

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّارثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master II

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences agronomiques
Option : Protection des végétaux

THEME

***Contribution à l'étude du rhizobactéries du haricot
(Phaseolus vulgaris L.)***

***Présenté par :
Bakha sabrina***

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

***Président : Dr. Mallem Hamida
Examineur : Dr Zaza Mesouda
Promoteur : Dr. Ameer Djamila***

Année Universitaire 2022/2023

REMERCEMENT

*A la fin de ce travail, nous remercions Dieu Tout-Puissant
pour sa grâce et sa grâce.*

*Nos sincères remerciements à mon encadrant, Amer
Jamila, qui a géré ce travail avec beaucoup d'efficiency et
d'efficacité, et pour sa pleine présence malgré ses
nombreuses responsabilités scientifiques, et pour son
orientation et ses conseils, que nous avons grandement
appréciés. Mme Zaza Masouda, Examinatrice et Président
Mm MALLEM Hamida. Contribution à tous et aux
personnes qui ont contribué à la réussite de ces travaux,
soit en participant aux discussions, soit en soumettant des
documents ; Nos sincères remerciements.*

*Enfin, nous tenons à remercier tous les collègues du 2^{ém}
Master en protections des végétaux, ainsi que tous les
enseignants et le personnel administratif du Département
de l'Agronomie. Merci à tous.*

Dédicace



*Enfin, mon rêve de fin d'études s'est réalisé, grâce à Dieu
Je dédie ce travail au cœur de ma mère.*

*Je dédie également ce travail à mon père qui m'a toujours aidé et
soutenu.*

*A mes soeurs (Fatima, Noura et Naima
Et Dalila).*

Et à tous les amis.



ملخص

تتضمن مكافحة الحيوية مجموعة من العوامل بيولوجية الاصل والطرق القائمة على التفاعلات الطبيعية يشارك في استراتيجية تهدف الى الحد او استبدال المنتجات التي يعقد انها تشكل خطر على الصحة والبيئة مع ضمان الانتاج المستدام.

نهذف من خلال هذا العمل الى اظهار الاثار المفيدة في البكتيريا معزولة من جذور الفاصولياء يشمل هذا العمل عدة اختبارات بيوكيميائية لاثنا عشرة عزلة كما قمنا باختبار قدرة العداء في المختبر للعزلات اثنا عشر مقابل عامل واحد ممرض لها من خلال المواجهة المباشرة لوسطين ثقافيين وصولا الى تتبع انبات نمو النبات باستعمال العزلات TSA.PDA وفقاً لاختبار KOH الذي يسمح لك بمعرفة إيجابية الجرام من السلبية، يتم تأكيد هذا الاختبار عن طريق تلوين الجرام؛ العزلات RA1 و S10 إيجابية لجرام، والعزلات الأخرى سلبية لجرام. اختبار الحركة وجود رد فعل إيجابي للوسط تم استخدام جميع البكتيريا الحركية، باستثناء BO ؛ 2. العزلات U و RH5 سالبة السترات ولا تنمو على وسط سيمون سيترات لأن لون الوسط لا يتغير إلى اللون الأزرق والعزلات الأخرى موجبة السترات. بالنسبة لألواح API 20 NE ، أربع عزلات B0 ؛ RA1 ؛ RH3 يقلل النترات ثلاث عزلات RA1 ؛ RH2.RH3 ، وبالنسبة لاختبار التريبتوفان فقط، يكون RH5 إيجابياً، بالنسبة لـ PNG يعزل B0 ؛ ش؛ RH5 سلبية. بالنسبة لاختبارات الاستيعاب، تختلف النتائج. جميع العزلات مقاومة لدرجات الحرارة الثلاثة العالية التي تم اختبارها لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة والنشاط الأنزيمي. عزلات B0 ؛ RH5 ؛ رهب. الموارد البشرية؛ RH3 له نشاط إيجابي لجميع الإنزيمات باستثناء السليوليز وهو سلبي. عزل J12 ينتج الفوسفاتيز. الأنزيم البروتيني. والسليولوز. عزل U ينتج الليباز. الأنزيم البروتيني. ويعزل السليوليز RA1 ؛ RH2 ينتج البروتياز فقط العاملان المدروسان (P: 0.005)، العزلة RA على الوسط PDA و B0 على الوسط TSA سجلت أفضل معدل تثبيط تم تصنيفه في المجموعة الأدنى D12 RA (a). على وسط PDA وتم تصنيف العزلات الأخرى ضمن المجموعة.(ab)

Les mots clés : Test Biochimique ; Activité enzymatique ; l'activité antifongique ; Citrate de simone ; Mannitol de Mobilité ; rhizobactérie.

Résumé

La lutte biologique regroupe un ensemble d'agents d'origine biologique et de méthodes basées sur des interactions naturelles et participe à une stratégie visant à réduire ou à remplacer les produits considérés comme présentant un risque pour la santé et l'environnement tout en assurant une production durable. A travers ce travail, nous visons à montrer les effets bénéfiques des bactéries isolées des racines de haricot. Ce travail comprend plusieurs tests biochimiques sur douze isolats. Nous avons également testé la capacité d'antagonisme en laboratoire de douze isolats contre un pathogène par confrontation directe avec deux cultures milieux TSA.PDA, conduisant au suivi de la croissance germinative.

D'après le test KOH qui permet de savoir Gram positive des négative ce test est confirmé par la coloration de Gram ; les isolats RA1 et S10 sont des Gram positive les autres sont des Gram négatives. Le test de mobilité la présence de flagelles réaction positif toutes les bactéries ont été utilisées mobilité, sauf que BO ; RH2. Les isolats U et RH5 sont à citrate négatives ne se développent sur le milieu Citrate de simone car la couleur du milieu ne vire pas au bleu et les autres sont des citrates positive. Pour les plaques API 20 NE quatre isolats B0 ; RA1 ; RH2. RH3 réduit le Nitrate trois isolats RA1 ; RH2.RH3, et pour test tryptophane seule RH5 est positif, pour PNG les isolats B0 ; U ; RH5 sont négatifs. Pour les tests d'assimilation les résultats sont variables. Tous les isolats résiste au les trois températures testés test élevée pour la température et le PH, et pour l'activité enzymatique ; les isolats B0 ; RH5 ; RHP ; RH ; RH3 ont une activité positive pour tous les enzymes sauf pour la cellulase qui est négative ; l'isolat J12 produit la phosphatase ; protéase ; et la cellulase ; l'isolat U produit la lipase ; protéase ; et le cellulase les isolats RA1 ; RH2 ne produisent que le protéase Pour ce qui est de l'activité antifongique les deux facteurs étudié (P : 0,005), l'isolat RA sur le milieu PDA et B0 sur le milieu TSA ont enregistré les meilleurs le taux d'inhibitions été classé dans le groupe (a) le plus faible taux a été enregistré par J12 RA sur le milieu PDA et les autres isolats ont été classé dans le groupe (ab).

Les mots clés : Test Biochimique ; Activité enzymatique ; l'activité antifongique ; Citrate de simone ; Mannitol de Mobilité ; rhizobactérie.

Abstract

Biological control brings together a set of agents of biological origin and a method based on natural interactions and participates in a strategy aimed at reducing or replacing products considered to present a risk to health and the environment while ensuring a sustainable production.

Through this work, we aim to show the beneficial effects of bacteria isolated from bean roots. This work includes several biochemical tests on twelve isolates. We also tested the laboratory antagonism capacity of twelve isolates against a pathogen by direct comparison with two cultures media TSA.PDA, leading to the monitoring of germinal growth.

According to the KOH test which allows you to know Gram positive from negative, this test is confirmed by Gram staining; isolates RA1 and S10 are Gram positive, the others are Gram negative. The mobility test the presence of flagella positive reaction all bacteria were used mobility, except that B0; RH2. Isolates U and RH5 are citrate negative and do not grow on Simone Citrate medium because the color of the medium does not change to blue and the others are citrate positive. For API 20 NE plates four B0 isolates; RA1; RH2. RH3 reduces Nitrate three RA1 isolates; RH2.RH3, and for tryptophan test only RH5 is positive, for PNG isolates B0; U; RH5 are negative. For assimilation tests, the results vary. All isolates are resistant to the three high temperatures tested for temperature and PH, and for enzymatic activity; B0 isolates; RH5; RHP; HR; RH3 have positive activity for all enzymes except for cellulase which is negative; isolate J12 produces phosphatase; protease; and cellulase; isolate U produces lipase; protease; and cellulase isolates RA1; RH2 only produce the protease the two factors studied ($P: 0.005$), the RA isolate on the PDA medium and B0 on the TSA medium recorded the best the inhibition rate was classified in the lowest group (a). Rate was recorded by D12 RA on PDA medium and the other isolates were classified in group (ab).

Key words: Biochemical Test; Enzymatic activity; antifungal activity; Simone citrate; Mobility Mannitol; rhizobacteria.

Sommaire

Remerciement

Dédicace

ملخص

Résumé

Abstract

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Listes abrégées

INTRODUCTION..... 01

CHAPITRE I : Revue Bibliographique

I.1. Généralité sur la rhizosphère.	03
I.1.1. La rhizosphère	03
I.1.2. Compartimentation de la rhizosphère	03
I.1.3. Communauté microbienne de la rhizosphère	04
I.1.4. Les bactéries rhizosphériques ou rhizobactéries.....	05
I.1.5. L'origine de la formation du sol rhizosphérique:	05
I.1.5. 1. Exsudats.....	06
I.1.5. 2. Sécrétions.....	06
I.1.5.3. Lysats.....	06
I.1.5. 4. Mucilages.....	06
I.1.5. 5. Mucigel.....	06
I.2. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes PGPR :.....	07
I.2. 1. Mode d'action des PGPR.....	08

CHAPITRE II : Matériel et Méthode

1- Matériel biologique.....	14
1-1- Isolats bactériens.....	14
1-2- Isolats fongiques.....	14
1-3- Matériel végétal	14

2- Identification des isolats bactériens.....	14
2-1- Caractérisation biochimique	14
a) Test de KOH 3%(détermination de Gram.....	15
b) Coloration de Gram.....	15
c) Test TSI (Triple Sugar Iron).....	15
d) Mannitol-mobilité.....	15
e) Test d'hypersensibilité sur tabac.....	15
f) Identification par galerie API 20 NE.....	16
2-2- Tolérance à la température.....	16
2-3- Tolérance au PH.....	16
3- Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	17
3-1- Détermination de l'activité cellulasique.....	17
3-2- Détermination de l'activité lipolytique.....	17
3-3- Détermination de l'activité protéasique.....	17
3-4- Détermination de l'activité amylolytique.....	17
3-5- Détermination de la capacité de Solubilisation des phosphates	18
4- Recherche des antagonistes in vitro	18
4-1- Dispositif expérimental.....	19
5- Biostimulation de la croissance des radicale et des tigelles du haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	19
6- Analyse statistique.....	21

CHAPITRE III : RESULTATS

1- Résultats.....	22
1-1- Identification des isolats bactérien.....	22
1-2- Test de Température et du pH.....	24
1-3- Résultats de l'activité enzymatique.....	24
1-4- Recherche des antagonistes vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i> (FOP)) par une confrontation directe <i>in vitro</i>.....	25
1-5- Biostimulation de la croissance des radicale et des tigelles du haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	26
1-5-1 Hauteur des tigelles	26
1-5-2-Longueur des radicale.....	28
2- Discussion	28

Conclusion

Références bibliographiques

Matériel de laboratoire

Annexes

Liste des Figures

N°	Titres des figures	Pages
01	Représentation schématique des zones de la rhizosphère	04
02	Interactions entre les plantes et les bactéries dans la rhizosphère	08
03	Test d'hypersensibilité	14
04	Résultats du Test Mobilité (A°et du test de Citrate de Cimone (CIT) (B)	21
05	Résultats de 'activité enzymatique des isolats testés	24
06	Taux d'inhibition des souches bactériennes vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> (FOP) sur les milieux TSA et PDA	25
07	Représenté les mesures métrique de la hauteur de la partie aérienne	26
08	Représenté les mesures métrique des racicules	27

Liste des Tableaux

N°	Titres de tableau	Pages
01	Représenté les résultats relatifs à l'identification des isolats bactériens	21
02	Résultats de la galerie API 20 NE	22
03	Résultats de test de Température et du pH	23
04	Résultats de 'activité enzymatique des isolats testés	24

Listes abrégées

AIA : L'acide indole-3-acétique

FOA : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FOP : *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

g : gram

HCN : Acide cyanhydrique

h : heures

KB : King B

l : litre

Min : Minute

Mm : Millimètre

PDA : Potato dextrose agar

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou rhizobactéries stimulant la croissance des plants

PH : Potentiel hydrogène

R : Répétition

T : Température

TSA : tryptic_soy_agar

% : pourcentage,

°C : Degré Celsius,

INTRODUCTION

Introduction

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont des bactéries bénéfiques qui colonisent efficacement la rhizosphère, elles exercent sur les plantes divers effets influençant leur croissance (Orozco Mosqueda et al., 2021 ; Moustaine et al., 2019).

Ces microorganismes rhizosphériques peuvent améliorer la croissance des plantes par une grande variété de mécanismes directes ou indirectes tels que la solubilisation des nutriments (P, K et Zn), la production de sidérophores, la fixation biologique de l'azote et la production de phytohormones (V. Dhayalan et al.2021, Odoh Chuks Kenneth 2017, Pravin Vejan et al., 2016)

Chez les plantes, de nombreux processus de croissance et de développement sont contrôlés par les phytohormones. En outre, ces intéressantes substances fonctionnent également comme des signaux moléculaires en réponse à des facteurs environnementaux (Racher Backer et al., 2018; Maheshwari et al., 2015).

En général, cinq classes d'hormones végétales ont suscitées l'intérêt des chercheurs à savoir les auxines qui sont représentée principalement par l'acide indole-acétique (Xingfeng et al., 2018)

Leurs rôles sont multiples, en effet, elle intervient dans la formation de tissus vasculaires, l'initiation des racines adventives, la dominance apicale et le développement des fleurs et des fruits.

L'auxine affecte également les processus cellulaires, tels que la division cellulaire, l'agrandissement et la différenciation (Jie Luo et al.2018, Singh.2018, Bernard R. Glick.2012) L'amélioration des souches est un élément essentiel du développement des procédés de production des substances biologiques. La mutagenèse induite est largement utilisée pour la sélection de microorganismes produisant des substances biologiquement actives et l'amélioration de leurs activités (Goodarzi, 2016).

Selon FAO.(2020),les effets négatifs à plus long terme, l'effet domino pourrait conduire à une baisse de la qualité et de quantité des produits agricoles, à une interruption de a recherche et des activités de développement, à la réduction de la capacité d'achat des agriculteurs en intrants et à une réduction de la demande des consommateurs, ce qui pourrait à terme provoquer l'effondrement de nombreuses exploitation agricoles de petite et moyenne taille et entrainer une pauvreté généralisée chez les agriculteurs les plus vulnérables.

Introduction

Il s'agit de bactéries adaptées à un biotope particulier, a rhizosphère (Vacheron *et al.*, 2017), l'augmentation l'absorption des nutriments, l'amélioration des fonction racinaires, de la germination et la production des graines sont les plus notables (Amir et al., 2005 ;Kenneth et al.,2019). Ainsi que, à leurs performances dans la phytostimulation de la croissance de nombreuses plantes, à leur capacité de colonisation racinaire, la synthèse de phytohormones, et à la solubilisation des phosphates, a la production d'enzyme et de métabolites, (Ouserire *et al.*, 2018), et à leur pouvoir dans l'induction de la défense de la plant (Osman *et al.*, 2017). Ces bactéries sont un bon outil de lutte biologique ; car elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses grâce à leur activité antagoniste vis-à-vis des phytopathogènes.

Nous avons envisagé par le présent travail de mettre en évidence l'effet bénéfique de des rhizobactéries isolé à partir de la rhizosphère du haricot, pour cela nous avons commencé par un isolement ; puis une identification préliminaire ; en suite la mise en évidence de l'activité enzymatique et l'activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* (FOP) ainsi que la stimulation de la croissance du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)

Reveu

REVEU

Bibiliographiq

BIBLIOGRAPHIE

ue

UE

I.1. Généralité sur la rhizosphère

I.1.1. La rhizosphère

Le mot rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner (Anton et al., 2008), bactériologiste spécialiste de microbiologie du sol et professeur d'agronomie au collège Technique de Munich (Lombi et al., 2001). Il a défini la rhizosphère comme étant la région du sol située sous les racines des plantes et soumise à leur influence directe, Et un lieu d'intenses échanges entre le végétal et le substrat minéral (Marie-Line Faure ,2018). Du fait de sa richesse en éléments nutritifs, la rhizosphère contient ainsi 10 à 100 fois plus de microorganismes par g de sol que le sol non rhizosphérique (Séverine Lopez, 2018).

Ainsi, elle est considérée comme un système complexe, hétérogène, dynamique et interactif, qui dépasse la simple notion d'interface entre le monde végétal et le monde minérale. Elle est un condensé des processus physiques, chimiques et biologiques qui animent les sols (Hinsinger., 1998 ; Michel et al., 2005). Cependant, Cette mince couche peut être affecté par les contraintes du sol, sa salinisation, son eutrophisation ou la pollution, ou encore par des phénomènes d'acidification (Anoua et al., 1997).

I.1.2. Compartimentation de la rhizosphère

La rhizosphère est divisée en trois grandes composantes qui interagissent ensemble : la rhizosphère sol, la rhizoplane, et les racines (Barea et al., 2005). La rhizosphère, qui est la zone du sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats qui affectent l'activité microbienne.

La rhizoplane, qui est la surface de la racine, y compris les particules du sol adhérant fortement. Et enfin, la racine elle-même (endorhizosphère), qui est une partie du système racinaire, parce que certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus racinaires internes. Un grand nombre d'organismes microscopiques tel que les bactéries et les algues coexistent dans la rhizosphère, cependant, les bactéries sont le groupe le plus abondant dans cette partie de l'environnement de la plante, et il est fort probable qu'ils influencent grandement la physiologie de la plante. (Bowen et Rovira, 1991).

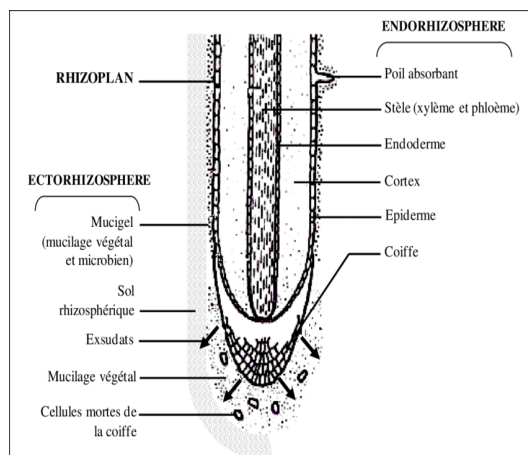


Figure.I.1 : Représentation schématique des zones de la rhizosphère (Lepinay, 2015).

I.1.3. Communauté microbienne de la rhizosphère

La rhizosphère est une niche écologique avec de nombreux micro-organismes qui jouent un rôle significatif sur la santé des plantes (Geoffroy Villejoubert, 2016).

Ces microorganismes ne sont pas isolés dans le sol et sont structurés en communautés complexes au sein desquelles diverses interactions microbiennes existent (Clémentine Lepinay, 2013). Parmi les interactions bénéfiques aux plantes, on peut citer les symbioses, la mieux connue est la symbiose rhizobienne chez les légumineuses (Quin Han et al., 2020). Ainsi, les mycorhizes qui sont contractées par les racines des végétaux avec certains champignons du sol (William R. Rimington et al., 2018)

Toutefois, certains microorganismes sont nuisibles à titre d'exemple *Ralstonia solanacearum* qui affecte les cultures de pomme de terre, d'autres microorganismes ne semblent avoir aucun effet (Huijuan Wang et al., 2019).

Les protozoaires et les nématodes qui se nourrissent sur des bactéries sont aussi concentrés autour des racines. Ainsi, la plupart des cycles des nutriments et des phénomènes de prédation se déroule dans la zone immédiatement adjacente aux racines, siège d'une activité métabolique intense (Dommergues, 1978).

D'une façon générale, la structure des racines et la composition des exsudats racinaires changent durant le développement de la plante et sous l'effet des conditions environnementales telles que la disponibilité de l'eau et la température. Par conséquent, la

dynamique de la population microbienne rhizosphérique peut aussi changer. En effet, les plantes, grâce à l'émission des signaux spécifiques, exercent une pression sélective qui tend généralement à réduire la diversité microbienne et à favoriser des espèces ou des souches particulières (Bertrand et al., 2000).

I.1.4. Les bactéries rhizosphérique ou rhizobacteries

Les bactéries de la rhizosphère, dits rhizobactéries, sont capables de coloniser l'intérieur ou l'extérieur des racines de nombreuses espèces des plantes et peuvent être divisé entre ceux qui forment une relation symbiotique avec la plante et ceux qui ne le font pas. ce dernier groupe, disant libre-vie, sont étroitement associés à la surface de la racine et réside dans les racines (Kloepper et al., 1989). Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp fluorescents (Lemanceau, 1992). Elles sont généralement très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs (Peter et al., 2015). Elles sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries favorise de la croissance des plantes, connues sous le terme RFCP (Beauchamp, 1993), (PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et al., 1989; Zahir et al., 2004).

I.1.5. L'origine de la formation du sol rhizosphérique:

L'effet rhizosphérique est déterminé en grande part par la libération de différents composés organiques regroupés sous le terme rhizodéposition. D'une façon générale la libération d'une partie des photosynthétats dans le sol contribue à la formation des sols. En effet, la fraction minérale provenant de la roche mère en se liant aux molécules organiques libérées par la plante, qu'elle soit vivante ou morte, aboutit à la formation du complexe organo-minéral caractérisant le sol. La rhizodéposition comprend différents composés organiques, certains libérés de façon active (sécrétions, mucilages,) d'autres de façon passive (exsudats, lysats, mucigel) (Stengel et al., 1998).

I.1.5. 1. Exsudats

Elles Sont de petites molécules, solubles dans l'eau ou volatiles, libérées selon des mécanismes passifs par des cellules vivantes, ces molécules sont variées hydrates de carbone, acides organiques, acide Aminés, acides gras, stérols, vitamines enzymes, nucléotides etc..., Même s'il apparait une certaine analogie entre les exsudats produits par de nombreuses plantes, des différences existent entre espèces végétales et pour une même espèce selon le stade de développement de la plante.

I.1.5. 2. Sécrétions

Elles sont des composés libérés selon des mécanismes actifs vers le milieu extérieur.

I.1.5.3. Lysats

Elles constituent le contenu cellulaire libéré suite à l'autolyse de cellules épidermiques âgées de la paroi racinaire.

I.1.5. 4. Mucilages

Elles sont constituées de polysaccharides, d'acides aminés et de protéines, ces composés ont plusieurs origines, ils peuvent provenir :

- De sécrétions issues des vésicules de l'appareil de golgi des cellules de la coiffe.
- D'hydrolysats de polysaccharides de la paroi de cellules situées entre l'épiderme et les cellules desquamées de la coiffe, de sécrétions par les cellules de l'épiderme dépourvues de paroi primaire.
- De la dégradation bactérienne de la paroi primaire de cellules mortes de l'épiderme.

I.1.5. 5. Mucigel

Correspondant aux composés gélatineux de nature polysaccharidique produits à la fois par les racines et les populations microbiennes de la rhizosphère. Ce gel favorise le contact entre les particules de sol. Et la surface racinaire et améliore donc le transfert des éléments

minéraux et de l'eau vers la racine. Par ailleurs, le mucigel assure une fonction de lubrification permettant la progression de la racine dans le sol.

I.2. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes PGPR :

Les PGPR ou « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » sont des bactéries qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont un effet positif sur la plante, pour ces effets on les considère comme rhizobactéries promotrice de la croissance végétale (Dey et al., 2004 ; Herman et al., 2008 ; Microrosky, 2008).

Les PGPR sont capables de coloniser les systèmes racinaires des plantes et de promouvoir leur croissance par des mécanismes directs ou indirects (Glick et al., 1998). Dans la rhizosphère, ces bactéries peuvent se retrouver aux niveaux intra ou extracellulaire (Gray et Smith, 2005). Au niveau intracellulaire, les bactéries sont dites endophytiques et colonisent l'apoplaste. Ces bactéries font parties de la famille des Rhizobiums. Généralement symbiotiques, ce sont notamment les PGPR spécialisées dans les structures nodales des Fabaceae. Au niveau extracellulaire, elles sont localisées en surface ou à proximité des racines, elles sont donc rhizosphériques (Vessey, 2003).

Quatre effets principaux ont été identifiés chez ces PGPR. Elles peuvent augmenter la disponibilité des éléments nutritifs, réguler la production de phytohormones, augmenter la tolérance aux stress abiotiques et inhiber les bio agresseurs par compétition (Glick, 2012 ; Souza, 2015).

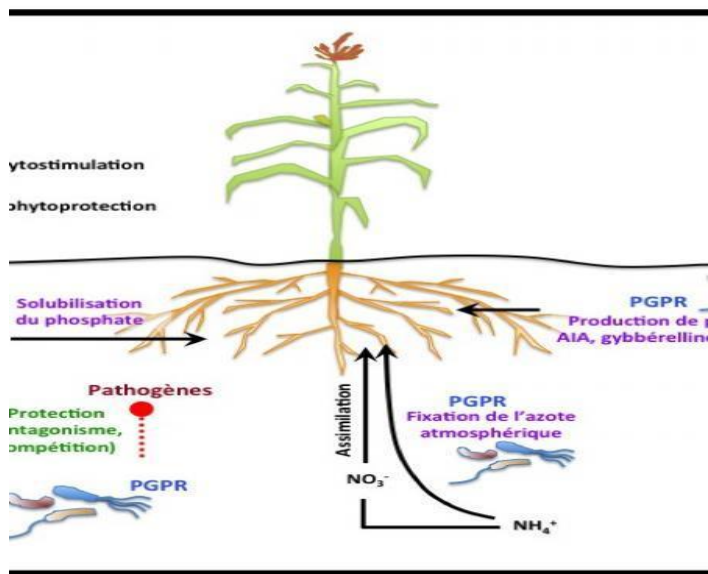


Figure.I.2: Interactions entre les plantes et les bactéries dans la rhizosphère (Khan et al., 2009)

I.2. 1. Mode d'action des PGPR

Les PGPR peuvent influencer la croissance des plantes de façon directe ou indirecte. Les mécanismes impliqués directement sont la sécrétion d'hormones (auxines, gibberellines, cytokinines, etc.) ou en facilitant l'absorption de nutriments (fixation d'azote, solubilisation de phosphate ou de potassium et synthèse de sidérophore).

Indirectement, les PGPR vont aider la croissance des plantes via la sécrétion d'antibiotiques ou d'enzymes limitant les phytopathogènes (Glick B.R et al ; 2007)

Matériel

INFORMATION

et

DE

Méthodes

INFORMATION

Le présent travail a été réalisé aux laboratoires de l'université de Amar Telidji Laghouat faculté des sciences' département des sciences agronomique. Il consiste à chercher des antagonistes vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (FOP) et la biostimulation du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), commençant par l'identification des bactéries isolé à partir de la rhizosphère du haricot (*Phaseolus vulgaris*)

2.1. Matériel biologique

2.1.1 Isolats bactériens

Dans la présente étude, Nous avons utilisé des isolats de BO. *G12. U. RA1. RH2. RH3. RH5. RH. RHP. S10. J2. RA.* Qui ont été isolée de la rhizosphère du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), au niveau de laboratoire de département des sciences agronomique à l'université d'Amar Telidji Laghouat, dans ce travail nous avons récupéré les souches précédentes qui ont été conservé à une température de 4°C, nous avons procédé à une réactivation sur le milieu GN, à une température 28° C pendant 24 heures.

2.1.2. Isolats fongiques

L'isolats fongique utilisé pour effectuer cette expérience est le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (FOP)) récupéré aux laboratoires de université de Amar Telidji Laghouat département d'agronomique réactive sur milieu PDA (Annexe1), a une température 28° C pendant 7jours.

2.1. 3. Matériel végétal

Pour l'essai du biostimulation de la croissance, nous avons utilisé une semence du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), appartenant à la variété Tema, originaire des pays bas.

2.2. Identification des isolats bactériens

2.2.1. Caractérisation biochimique

Quelques caractères ont été étudiés par des tests biochimiques classiques pour sélectionner progressivement les souches bactériennes

2.2.1.1 Test de KOOH

a) Test de KOOH 3%(détermination de Gram)

Ce test permet de déterminer la nature de la paroi de la cellule bactérienne, il consiste à : déposer une goutte d'une solution aqueuse KOH 3% sur une lame en verre propre ; prendre une goutte de la colonie bactérienne et l'émulsionner sur la goutte du KOH 3% avec une pipette pendant 5 à 10 secondes. Pour la fiabilité des résultats, le test est réalisé en trois répétitions.

b) Coloration de Gram

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur disposition, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liée à la structure de la paroi (Lezzar et Abdelmalek, 2016).

2.1.1.2 .Test TSI (Triple Sugar Iron)

La gélose TSI est un milieu qui différencie les bacilles à Gram négatif en fonction de leur capacité à fermenter les sucres et à libérer l'H₂S. Le milieu contient 0,1 % de glucose pour 1% de lactose et 1% de saccharose. Le rouge de phénol sert d'indicateur pour détecter le changement de pH et le sulfate ferreux détecte la formation d' H₂S (Tang et Stratton, 2018).

2.1.1.3 Le mannitol-mobilité :

Est un milieu permet l'étude de la dégradation de mannitol qui est un produit de dégradation du mannose. L'ensemencement par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit, et incubé à 24 h à T° optimale. Ce milieu est utilisable uniquement pour la bactérie fermentative.

Virage de milieu en jaune dit que mannitol +.

Milieu rouge : mannitol-. (Sayad, 2008)

2.1.1.4. Test de Citrate de Simmons :

Le milieu Citrate de Simmons permet de mettre en évidence certaines bactéries qui sont capables d'assimiler le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie. Ces bactéries possèdent un citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate, ainsi qu'il possède un indicateur de pH « le bleu de bromothymol » dont il vire vers la couleur verte (à pH acide) et en bleue (à pH alcalin) La pente du milieu estensemencée par strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C. Après 24 heures, s'il y a une culture avec une alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu), la bactérie est de Citrate positive. S'il ya pas de culture et la couleur du milieu inchangée, la bactérie est de citrate négatif. (Carbonnelle et al., 1988)

2.1.1.5. Test d'hypersensibilité sur tabac

Le test du pouvoir d'hypersensibilité d'une bactérie se pratique généralement sur plant de tabac, ce test consiste à préparer une suspension bactérienne par agitation d'un mélange de crème bactérienne avec eau distillée stérile dans un tube à essai ; puis l'inoculer la feuille de tabac sur la face inférieure en injectant la suspension dans la nervure centrale (Figure 04) observation des résultats a été faite après 24 à 48 h.



Figure 03. Test d'hypersensibilité (origine 2023).

2.1.1.6. Identification par galerie API 20 NE

API 20 NE. La galerie API 20NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Nous avons complété l'identification des souches (*BO. GI2. U. RAI. RH2. RH3. RH5. RH. RHP. S10. J2. RA*) par cette galerie. Il est vrai que la galerie API 20NE n'est pas adaptée à l'identification des bactéries, mais nous avons juste considéré quelques tests, en se basant sur les critères utilisés dans l'identification de cette espèce.

2.2.2. Tolérance à la température

La croissance à différentes températures a été réalisée par incubation des souches inoculées sur TSA, à différentes températures de 32°C, 37°C et 40°C, pendant 72 heures).

2.2.2. Tolérance au PH

La tolérance des souches bactériennes aux pH acides et alcalins est réalisée sur milieu TSA ajusté aux valeurs de pH variables 5, 6, jusqu'à pH 10. Les plaques inoculées ont été incubées à 28 ° C pendant 72 heures. (Hajjam. Y., I.T. Alami ., S. M. Udupa ., S. Cherkaoui . 2016.)

2.3. Mise en évidence de l'activité enzymatique

Afin de déterminer la capacité des isolats à produire des enzymes plusieurs enzymes ont été recherchées, telles que la protéase, cellulase, amylase phosphatase lipase., le screening a été effectué par la méthode des spots à incubation à 30°C,

2.3.1. Détermination de l'activité cellulasique

La présence de cellulase est révélée par le repiquage des souches sur milieu de Carder (1986) qui contient en g/l: Na_2HPO_4 (6 g/l); KH_2PO_4 (3 g/l); NaCl (0,5 g/l); NH_4Cl (1 g/l); Extrait de levure (3 g/l); Carboxyméthylcellulose (CMC) (7 g/l); Agar (15 g/l). Les boîtesensemencées sont incubées pendant 8 jours (Carrim *et al.*, 2006).

A la fin de l'incubation, une solution de rouge Congo préalablement préparée a été dispersée sur toute la surface du milieu. Après cinq minutes de contact, l'excès a été éliminé et les boîtes lavées à NaCl (1M). La présence d'une cellulase extracellulaire se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Carrim *et al.*, 2006).

2.3.2. Détermination de l'activité lipolytique

La recherche de l'activité lipolytique est réalisée. Nous avons ensemencé par les méthode de spot les isolats bactériens sur le milieu de culture dont la composition (g l⁻¹): peptone 10,0, NaCl 5,0, $\text{CaC}_2\text{H}_2\text{O}$ 0,1, agar 18,0, pH 7,4, additionné avec tween 80 1% (v/v) Sierra (1957), le résultat positif est déterminé par la présence d'un halo clair autour des colonies (Carrim *et al.*, 2006).

2.3.3. Détermination de l'activité protéasique

Le milieu de culture utilisé pour cette activité contient en g/l: Extrait de levure (2,5); glucose (1) et Agar (15). Après autoclavage pendant 20 min à 120°C., d'une solution de lait écrémé a été ajouté au milieu de culture.

L'activité protéolytique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Bach et Munch, 2000).

2.3.4. Détermination de l'activité amylolytique

Le test qui indique l'activité amylolytique a été réalisé sur une gélose à base d'amidon. Le milieu contient en (g/l): KNO_3 (0,5); K_2HPO_4 (1,0); MgSO_4 (0,2); CaCl_2 (1); FeCl_3 (0,001); amidon soluble (10,0); Agar (15). Le pH a été ensuite ajusté

à 7,2 et le milieu autoclavé à 121°C pendant 20 min. Un ensemencement du milieu par la méthode des spots a été effectué pour chaque isolat.

A la fin de l'incubation, une solution de lugol (Annexe 2) préalablement préparée a été dispersée sur toute la surface du milieu. Après cinq minutes de contact, l'excès a été éliminé et les boîtes lavées à l'eau distillée. La présence d'une cellulase extracellulaire se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Carrim et al., 2006).

2.3.5. Détermination de la capacité de Solubilisation des phosphates

La capacité de solubilisation des phosphates des bactéries isolées est testée selon la méthode décrite par Nautiyal (1999) sur un milieu NBRIP (Annexe 1) contenant 0,5% de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme source de phosphate insoluble (Pikovskaya, 1948).

Nous avons ensemencé des isolats bactériens sont déposés en spot à la surface du milieu solide. La capacité de solubilisation est évaluée par la formation d'un halo transparent autour de la colonie. Après 7 jours d'incubation, le diamètre du halo de solubilisation est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total.

2.4. Recherche des antagonistes in vitro

Cet essai a été effectué pour la recherche d'activité antagoniste de deux isolats bactériens sélectionnés vis-à-vis de champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (FOP)) par une confrontation directe.

Les deux isolats jeunes âgés de 24 heures, testées pour l'inhibition de la croissance mycélienne. Ont été ensemencés sur cinq milieux de culture solide PDA ; TSA. Ou la crème bactérienne quatre spots bactériens au périphérique de la boîte de pétri à 2cm de centre de la boîte. Par la suite les disques de 5mm de diamètre du champignon phytopathogène âgés de 7 jours ont été également déposés au centre de la boîte de pétri, a été déposé après 72h de l'incubation des bactéries antagonistes, et toutes les boîtes ont été incubées à 28°C.

Pour estimer l'activité antifongique nous avons déposé des disques pour chaque champignon testé seul comme des témoins sur d'autres boîtes. L'essai a été réalisé en deux répétitions

La lecture des résultats a été faite par la mesure de la distance parcourue par le mycélium de l'isolat fongique en direction de l'antagonisme bactérien à l'aide d'un pied à coulisse. Le taux d'inhibition a été calculé selon Traivedi et al. (2008) comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = (\text{R témoin} - \text{R testé} / \text{R témoin}) * 100$$

- ❖ **R témoin** : distance de la croissance radiale du mycélium de l'isolat témoin
- ❖ **R testé** : distance de la croissance radiale du mycélium de l'isolat fongique en présence de bactérie.

2.4.1. Dispositif expérimental

Pour l'essai de l'antagonisme in vitro, nous avons opté pour un dispositif en randomisation totale à deux facteurs étudiés et deux répétitions :

- ✚ Correspond aux souches bactériennes avec douze niveaux (BO. G12. U. RA1. RH2. RH3. RH5. RH. RHP. S10. J2. RA).
- ✚ Correspond au milieu de culture avec deux niveaux TSA ; PDA.

2.5. Biostimulation de la croissance des radicales et des tiges du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)

Les graines du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) sont mises à germer dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont remplies de sable humide stérile de 1 cm de hauteur. Quatre grains désinfectés au HgCl_2 du haricot et mis dans des suspensions bactériennes respectives pendant 3 h, puis quatre grains sont déposés sur le sable, espacés de manière à éviter un chevauchement des racines. Les boîtes étiquetées, sont ensuite placées à la lumière à une température ambiante. Nous avons considéré une graine

germée lorsque l'émergence et la croissance de la racicule se manifestent (Dussert *et al.*, 2002).

Nous avons procédé en une séparation des parties aériennes et souterraines, puis les radicales et les tigelles ont été mesurées séparément à l'aide d'une règle graduée.

2.6 Dispositif expérimental

Pour l'essai de l'antagonisme *in vitro*, nous avons opté pour un dispositif en randomisation total à un facteur étudié et quatre répétitions :

✚ Correspond aux souches bactériennes avec douze niveau BO. G12. RA1. RH2 RH3. RH5. RH. RHP. S10. J2. RA et TMB.

2.7. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été basée sur l'analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée en considérant l'essai aléatoire à l'aide du logiciel stat box végétal 6,9 version d'essai. La comparaison des moyennes est établie par le test de Nexaman-Keuls au seuil de risque d'erreur de 5%.

Résultats

et

Discussio

Discussio

n

n

Chapitre 03 : Résultats et discussion

3.1 Résultats

3.1.1 Identification des isolats bactériens

Selon les résultats représentés dans le tableau 1, d'après le test KOH qui permet de savoir Gram positive ou négative ce test est confirmé par la coloration de Gram ; les isolats RA1 et S10 sont des Gram positives, les autres sont des Gram négatives. Selon le test de mobilité la présence de flagelles réaction positive toutes les bactéries ont été utilisées mobilité, sauf que BO; RH2. Les isolats U et RH5 sont à citrate négatives ne se développent sur le milieu Citrate de Simone car la couleur du milieu ne vire pas au bleu et les autres sont des citrates positives. Pour le test d'hypersensibilité seule l'isolat U qui a une réaction positive (Tableau 01).

Tableau 01 : Représenté les résultats relatifs à l'identification des isolats bactériens

	BO	J12	U	RA1	RH2	RH3	RH5	RH	RHP	S10	J2	RA
KOH	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
C.Gram	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
mobilité	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Citrate de simone	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TSI		-	+	+	+		+	+	+			
HR	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Réponse positive ; (-) Réponse négative



Figure 04: Résultats du Test Mobilité (A) et du test de Citrate de Cimone (CIT) (B)

Chapitre 03 : Résultats et discussion

Selon les résultats de la galerie API 20 NE représenté dans le tableau 2 ; pour les tests conventionnels, seule quatre isolats B0 ; RA1 ; RH2. RH3 réduit le Nitrate trois isolats RA1 ; RH2.RH3, et pour test tryptophane seule RH5 est positif ; RH2.et RH3utilise le glucose dans les conditions d'anaérobiose ; pour l'ADH seule RH5 est négatif ; tous les isolats sont urease positif ; Pour le test esculine deux isolats RH et RH3 sont négatifs ; trois isolats RA1 ; RH2. RH3 sont gélatine positifs ; pour PNG les isolats B0 ; U ; RH5 sont négatifs. Pour les test d'assimilation les résultats sont variable

Tableau 02 : résultats de la galerie API 20 NE

Test Souches	B0	J12	U	RA1	RH2	RH3	RH5	RH	RHP
NO3	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TRP	-	-	-	-	-	-	+	-	-
GLU	-	-	-	-	+	+	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	-	+	+
URE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	-	+	-	+
GEL	-	-	-	+	+-	+	-	-	-
PNG	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<u>GLU</u>	+-	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>ARA</u>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<u>MNE</u>	-	+-	+	+	+	+	+	+	+
<u>MAN</u>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>NAG</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>MAL</u>	-	-	+	+-	+	+	+	+	+
<u>GNT</u>	-		+	+	+	+	+	+	+-
<u>CAP</u>	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<u>ADI</u>	+	-	-	-	-		+	+	-
<u>MLT</u>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>CIT</u>		+	+	+	+	+	+	+	-
<u>PAC</u>	-	-	+	-	+	+	+	+	-

(+) Réponse positive ; (-) Réponse négative

Chapitre 03 : Résultats et discussion

3.1.2 Test de Température et du pH

Selon les résultats représenté dans le tableau 3 pour les températures testés ; tous les isolats résiste au les trois températures testés test élevée, de même pour le pH

Tableau 03 : Résultats de test de Température et du pH

	pH						Température C°		
	5	6	7	8	9	10	32	37	40
Bo	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
J12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
U	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
RA1	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
RH2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RH3	+	+	+	+	+	+	+++	+	+++
RH5	+	+	+	+	+	+	+++	+	+++
RH	+	+	+	+	+	+	+++	+	+++
RHP	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
RA	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
S10	++	++	+	+	+	+	+++	+++	+++
J2	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++

(+) Réponse positive ; (-) Réponse négative

3.1.3 Résultats de l'activité enzymatique

D'après les résultats de l'activité enzymatique des isolats testés ; les isolats B0 ; RH5 ; RHP ont une activité positive pour tous les enzymes cherchées ; de même pour les isolats RH ; RH3 sauf pour la cellulase qui est négative ; l'isolat J12 produit la phosphatase ; protéase ; et la cellulase ; l'isolat U produit la lipase ; protéase ; et la cellulase les isolats RA1 ; RH2 ne produisent que le protéase (Tableau 04).

Tableau 04 : Résultats de l'activité enzymatique des isolats testés

souches	Lipase	Amylase	phosphatase	protéase	cellulase
Bo	+	+	+	+	+
J12	-	-	+	+	+
U	+	-	-	+	+
RA1	-	-	-	+	-
RH2	-	-	-	+	-
RH3	+	+	+	+	-
RH5	+	+	+	+	+
RH	+	+	+	+	-
RHP	+	+	+	+	+

(+)activité positive ; (-) activité négative

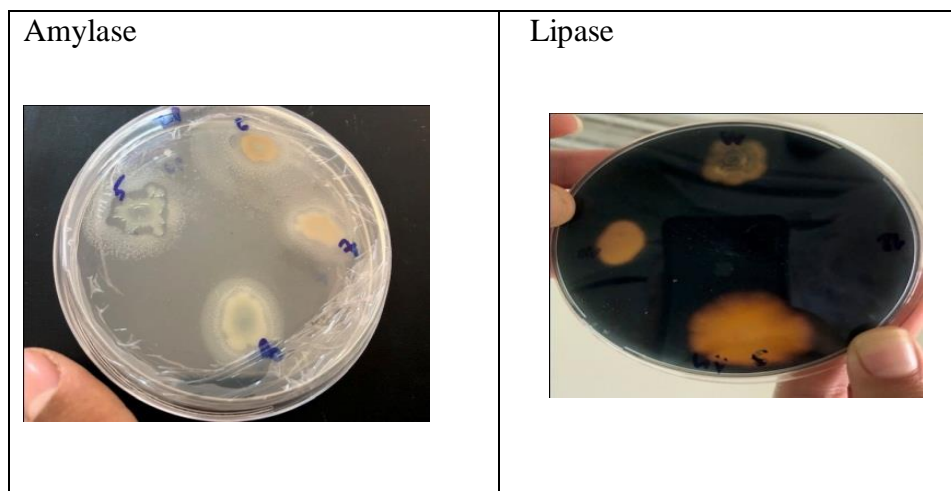


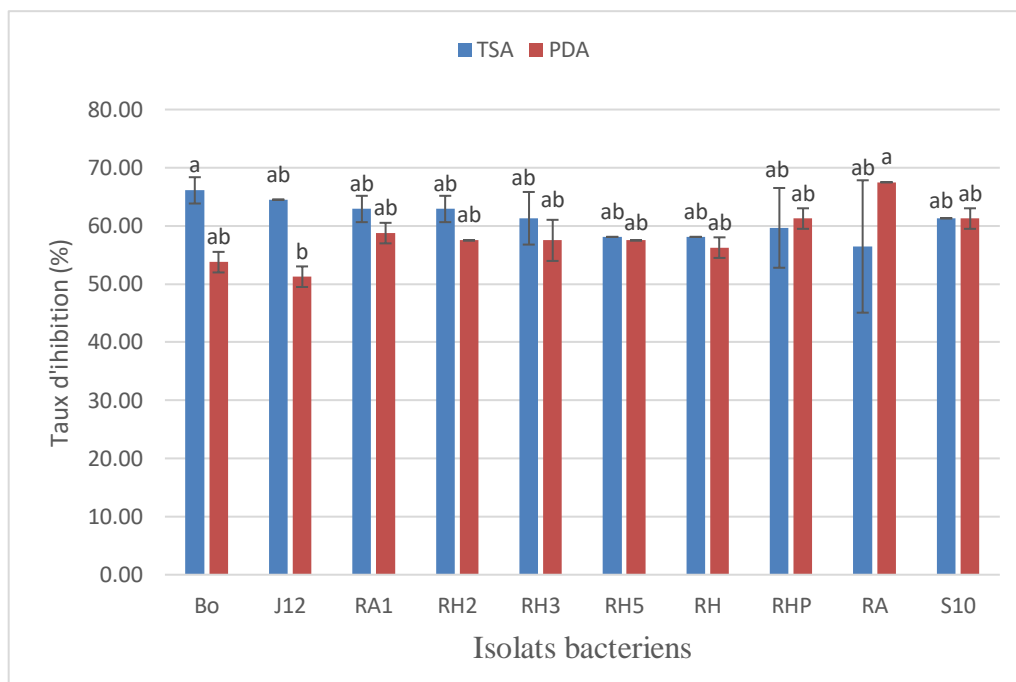
Figure 05: Résultats de 'activité enzymatique des isolats testés

3.1.4 Recherche des antagonistes vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp. pisi* (FOP)) par une confrontation directe *in vitro*

Les résultats de test d'antagonisme *in vitro* des huit isolats bactériens, vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. Pisi* (FOP), a été réalisé sur deux différents milieux de culture PDA et TSA pour la confrontation directe. (I2, I4, I5, I6, I8)

Chapitre 03 : Résultats et discussion

L'analyse de variance, réalisé sur les résultats obtenus ; a révèle une différence significative pour les deux facteurs étudié ($P : 0,005$), l'isolat RA sur le milieu PDA et B0 sur le milieu TSA ont enregistré les meilleurs le taux d'inhibitions avec une moyenne de l'ordre de 67.5 et 66.1 % respectivement, qui a été classé dans le groupe (a) le plus faible taux a été enregistré par J12 RA sur le milieu PDA avec un taux de l'ordre de 51.25%. Les autres isolats ont été classé dans le groupe (ab) quel que soit le milieu de culture avec des taux qui varie entre 64.5 et 53.75 % (Figure 06).



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure 06: Taux d'inhibition des souches bactériennes vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (FOP) sur les milieux TSA et PDA

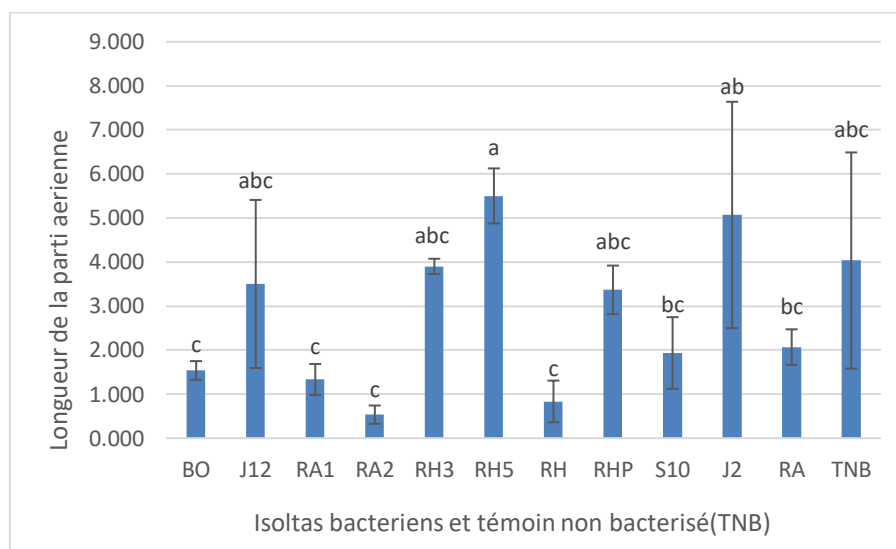
3.1.5 Biostimulation de la croissance des radicale et des tigelles du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)

Après la germination de la semence du haricot, nous avons mesures la longueur des radicules et la hauteur de partie aérienne et les résultats sont représentés ci-dessous

Chapitre 03 : Résultats et discussion

3.1.5.1 Hauteur des tiges

L'analyse de variance réalisée sur les résultats de la hauteur de la partie aérienne a montré une différence significative ($P : 0,000$), la hauteur la plus élevée a été enregistrée pour les bactéries RH5 d'une longueur de 5,5 mm, et classé dans le groupe homogène (a), suivi par J2 avec une moyenne de 5 mm, le témoin non bactérié et les isolats RH3. J12. RHP, ont enregistré des moyennes qui varient entre 4 et 3.3 cm, et classés dans le groupe (abc). Dans le groupe (bc) sont classés les isolats S10 et RA avec des moyennes de l'ordre respectif de 1.9 et 2 cm. Enfin dans le groupe (c) ; sont classés les isolats RA1 ; B0 ; RH ; RA2 avec des moyennes qui varient entre 0.5 et 1.5 cm (Figure 07).

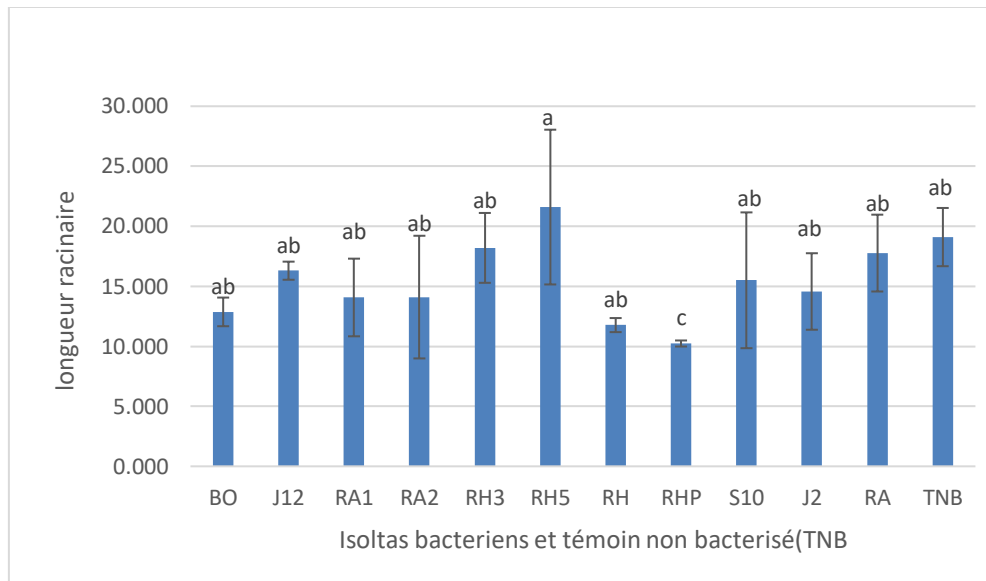


Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe homogène, selon le test de Newman-Keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure 07: représenté les mesures métriques de la hauteur de la partie aérienne

3.1.5.2 Longueur des racines

L'analyse de variance réalisée sur les résultats de la longueur des racines a montré une différence significative ($P : 0,025$), la plus longue a été enregistrée pour l'isolat RH5 avec une longueur de 21.6 cm, la plus faible longueur a été enregistrée par RHP avec une moyenne de l'ordre 10.2 cm. Les autres isolats ont été classés dans le groupe (ab) avec des moyennes qui varient entre 11.7 et 19.1 cm (Figure 08).



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure 08: représenté les mesures métrique des racicules

4. Discussion

Dans notre étude, nous somme intéressées à la flore bactérienne rhizosphérique précisément qui colonisent la rhizosphère de culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Laghouat) pour la sélection des bactéries afin de sélectionner les isolats les plus efficaces et résistants aux stress environnementaux biotique et abiotique,

La caractérisation phénotypique des isolats montre une diversité des isolats retenu, parmi les douze trois sont des Gram positifs, seule deux ne sont pas mobile ; pour le test hypersensibilité l'isolat U a montré une réaction positive ; pour les autres tests nous avons observé une fluctuation des résultats obtenu qui nous non pas permettre une identification même partielle. Tous les isolats étaient tolérants à une acidité, une alcalinité, entre au pH 5 à 10 et des températures élevées jusqu'à 40 ° C.

Plusieurs études ont montré l'importance d'étudier la capacité des isolats de *Phaseolus vulgaris* ainsi que la tolérance aux contraintes environnementales. Cette capacité est un avantage pour une souche pour survivre sur l'autre dans un environnement de sol extrême

Chapitre 03 : Résultats et discussion

(Hajjem et al., 2016). Selon Ouslim et al. (2019), les résultats de l'analyse physiologique dans l'ouest Algérie ont révélé que la plupart des souches *Phaseolus vulgaris* étaient mésophiles et croissaient à des températures variant de 32 à 40 ° C, elles étaient aussi tolérantes à un Ph variant de 5 à 9, les différents résultats indiquent que les rhizobiums pouvaient tolérer un pH de 4,5 à 9. Mustapha et al. (2020) rapportent que tous les isolats dans deux régions au Maroc (Doukkala et Zaer) ont développé dans une gamme de pH de 6,5 à 7,5, mais aucun n'a poussé dans des milieux avec des valeurs de pH inférieures à 6 ; trente-cinq pourcent n'ont pas réussi à croître à pH 8 et quatre-vingt-dix-huit pourcent n'ont pas grandi à pH 9.

Les résultats des différentes activités enzymatiques de tous les isolats nous ont permis de constater que RH. RH5 ; B0 ont des activités amylolytique, lipolytique, protéasique ; cellulastique et la solubilisation du phosphate.

Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-gluconase, exo et endopolygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Rabhi, 2011). La cellulase est largement utilisée pour la dégradation des débris de plantes, des parois cellulaires fongiques, l'inhibition de la germination des spores, de l'élongation du tube germinatif et de la croissance fongique, ainsi que dans le biocontrôle des pathogènes et des maladies de plantes (Bhat, 2000).

Concernant l'activité antagoniste vis à vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (FOP), le taux d'inhibitions varie de 51.25% et 67.5 la meilleure activité a été enregistrée par les isolats RA. En plus de l'action des antibiotiques, ou les siderophores, des substances volatiles, des enzymes sont connues comme agents principaux dans la réduction de la croissance des agents pathogènes, (Alwathnani et Perveen, 2012 ; Liu, 2015)

La présence de l'activité amylolytique chez les bactéries productrices d'amylase dans le milieu de culture, se manifeste par la formation d'une zone d'hydrolyse claire autour des colonies ensemencées par spots. Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène. Elles peuvent dériver de plusieurs sources comme les plantes, les animaux et les microorganismes, ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité et leur production volumineuse à l'échelle industrielle (Vidyalakshmi et al., 2009). Le phosphore (P), deuxième élément nutritif important pour la croissance des plantes après l'azote, est abondamment disponible dans les sols sous forme inorganique et organique. Le P insoluble est présent sous la forme d'un minéral inorganique tel que l'apatite ou sous forme de plusieurs

Chapitre 03 : Résultats et discussion

formes organiques comprenant l'inositol phosphate, les phosphomonesters et les phosphotriesters. Pour surmonter la carence en P dans les sols, il existe des applications fréquentes d'engrais phosphatés dans les champs agricoles (Munees, 2013).

Pour la biostimulation de croissance des plantules post germination du haricot (*Phaseolus vulgaris*), les résultats relatifs à la hauteur de la partie aérienne, et la longueur de racicule ont montré que RA et J12 ont enregistré la meilleure activité par rapport aux autres isolats. L'adsorption des bactéries à la racine résulte d'interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine (Lemanceau, 1992). Cette seule colonisation peut entraîner une occupation de sites suffisantes pour empêcher la croissance des pathogènes (Kamilova *et al.*, 2005). Plusieurs bactéries considérées comme PGPR produisent des auxines comme une partie de leurs métabolismes. A titre d'exemple l'auxine acide indole 3acétique (AIA) joue un rôle très important dans la régulation de la croissance des plantes, il affecte principalement les racines de ces dernières, leurs dimensions, le nombre des ramifications racinaires et ainsi la surface racinaire en contact avec le sol (Jha et Saraf, 2012). Les cytokinines ; les gibbérellines, l'acide abscisique et l'éthylène constituent également d'autres groupes de phytohormones bactériennes impliquées dans la promotion de la croissance des plantes (Morrone *et al.*, 2009 ; Reddy, 2014 ; Endo *et al.*, 2014).

Conclusi

CONCLUSI

on

ON

Conclusion

Il a conclu que toutes les bactéries ne sont pas nocives, car plusieurs bactéries présentes dans le sol contribuent à la croissance et à la germination des graines.

Nous sommes commencés par au test KOH et avons confirmé avec le Coloration de Gram que RA1 ; S10 Gram+ et les autres bactéries étaient négatives, mais dans le test Mobilité et citrate de simon et TSI et HR, toutes les bactéries ont été utilisées, à l'exception de BO.

Pour températures testés ; tous les isolats résistent au températures 40°C, de même pour le pH 5 et 10

Pour l'activité enzymatique des isolats testés ; les isolats B0 ; RH5 ; RHP ont une activité positive pour tous les enzymes cherchées ; de même pour les isolats RH ; RH3 sauf pour la cellulase qui est négative ; l'isolat J12 produit la phosphatase ; protéase ; et la cellulase ; l'isolat U produit la lipase ; protéase ; et le cellulase les isolats RA1 ; RH2 ne produisent que la protéase

Concernant l'activité antagoniste, le taux d'inhibitions le plus élevé avec une moyenne de 67.5 % et le taux le plus faible d'inhibition de 51.25%, l'isolats RA

Pour la biostimulation de croissance des plantules post germination du haricot (*Phaseolus vulgaris*), que RA et J12.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQU
UE

A

- 1- **Anoua, M., Jaillard, B., Ruiz, J., Bénet, J. C., et Cousin, B. (1997).**
Couplage entre transfert de matière et réactions chimiques dans un sol. Partie 2: Application à la modélisation des transferts de matière dans la rhizosphère. *Entropie*, 33(207), 13-24
- 2- **Anton Hartmann, Michael Rothballer et Michael Schmid, (2008).**« Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research », *Plant and Soil*, vol. 312, no 1-2, novembre, p. 7
- 3- **Asloum H., 1990:** Elaboration d'un système de production maraîchère (Tomate, *Lycopersicum esculentum* L.) en culture hors sol pour les régions sahariennes. Utilisation de substrats sableux et d'eaux saumâtres. Thèse de doctorat, développement et amélioration des végétaux, Université de Nice Sophia- Antipolis: 24- 32.

B

- 1- **Baba Sidi Kaci S., 2010 :** Effet du stress salin sur quelques paramètres phénologiques (biométrie, anatomie) et nutritionnels de l'*Atriplex* en vue d'une valorisation agronomique. Mémoire de magister en gestion des agrosystèmes sahariens, Université Kasdi Merbah Ouargla : 133P.
- 2- **Bach H. J., Munch J. C., (2000):** Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol Fertil Soils* 31: 219–224p. Barea, L.M; Pozo, M.J; Azcon, R; Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1761-1778.
- 3- **Beauchamp CJ. (1993).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique *Phytoprotection*, 74(1) :19-27.
- 4- **Bertrand, H., C. Plassard, X. Pinochet, B. Touraine, P. Normand et J.C. Cleyet-Marel (2000).** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.*, 46:229 –236.

C

- 1- **Carbonnelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A., (1988).** Bactériologie médicale techniques usuelles. *Méd. Mal. Inf. France*. 251 p.
- 2- **Cardona CA, Sánchez ÓJ. Fuel ethanol production:** process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol* 2007; 98: 2415–2457
- 3- **Carrim A. J. I., Barbosa E. C., Gonçalves V. J.D. (2006):** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49 : 353-359p.

D

Références bibliographique

- 1- **Denis F., Ploy M. C., Martine C., Bingen E., Quentin R. 2007.** Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris, Elsevier Masson SAS, 640p.
- 2- **Delarras C. 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire. Lavoisier, France, pp.66-67.
- 3- **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume Three. 63-67
- 4- **Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M. Chauhan S.M., (2004).** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria microbialres. 159: 371-394
- 5- **Dommergues, Y. (1978).** "Mycorrhizes et fixation d'azote". O.R.S.T.O.M. avril 1978.

G

- 1- **Geoffroy Villejoubert. (2016),** Synthèse bibliographique : Conversation dans la rhizosphère – Dialogue moléculaire et diversité des interactions plantes – micro-organismes, université Paul Savatier ,Toulouse
- 2- **Glick B.R., Penrose D. and Li J. (1998).** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology. 190: 63- 68.
- 3- **Gnanamanickam, Samuel S. 2007.** Plant-Associated Bacteria, University Of Madras, Chennai, India, 712 P, (ISBN 9781402045370), P.423.
- 4- **Goodarzi, Alireza. (2016),**"UV-induced mutagenesis in lactic acid bacteria." International Journal of Genetics and Genomics :1-4.
- 5- **Gray and L.M. Smith (2005).** Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. Journal of Wildlife Management. 69:515 524.

H

- 1- **Hayat .R, Safdar Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. 2010.** Soil Beneficial Bacteria And Their Role In Plant Growth Promotion: A Review. Ann Microbiol 60:579–598.
- 2- **Hajjam. Y., I.T. Alami ., S. M. Udupa ., S. Cherkaoui . 2016.** Isolation and evaluation of phosphate solubilizing rhizobia from root nodules of faba bean (*Vicia faba* L.) in Morocco 7(11) : 4000-4010
- 3- **Hinsinger P. (1998).** How do plant roots acquire mineral nutrients?.Chemical processesinvolved in the rhizosphere. Adv. Agron, 64: 225-265.

J

- 1- **Jie Luo ,Jing-Jing Zhou, Jin-Zhi Zhang.(2018).**Aux/IAA Gene Family in Plants: Molecular Structure, Regulation, and Function,International Journal of Molecular Sciences,MDPI;19(259):1.

Références bibliographique

- 2- **Joffin J. N & Leyral G. (2006).** Microbiologie technique - Tome 1, Dictionnaire des techniques, 4ème Ed., Collection Biologie Technique. CRDP d'aquitaine, Bordeaux. 368 p.
- 3- **Joffin JN and Leyral G, (2014).** Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. Scérén, France.

K

- 1- **Khan, M. S ., A. Zaidi., et M. Javed (2009).** Microbial Strategies for Crop Improvement. pp: 1- 371. Springer-Verlag Berlin.
- 2- **Kloepper, J.W., Schroth, M.N. 1978.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Radishes. in : Proc Int Conf Plant Pathol Bact. Angers, 379-382.
- 3- **Kloepper, J.W. & Beauchamp, C.J. (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Can. J. Microbiol 38(12):1219-1232.

L

- 1- **Lemanceau P, (1992).** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. Agronomie, EDP Sciences, 12 (6), pp.413-437.
- 2- **Lepinay C., (2013),** Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale, Université de Bourgogne, p.263.
- 3- **Lombi. E, (2001).** Trace Elements in the Rhizosphere. CRC Press. Cité dans Microbial Health of the Rhizosphere.
- 4- **Loubna B., Majida La., Khalid D., Zain elAbidine F., Ricardo G .C ., Michael G ., Khalid O. 2017 .** Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia*.

M

- 1- **Marie Line Faune. (2018).** La rhizosphère: Point de départ d'un vaste Réseau de Communication, Ag ricultures & Territoires- Chambres d'agriculture des Pays de la Loire;10:1.
- 2- **Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., 2008:** Botanique Biologie et physiologie végétales. 2ème édition. Maloine.p: 49-51.
- 3- **Minorsky PV (2008).** On the inside. Plant. Physiol. 146: 323-324.
- 4- **MuneesAhemad, Mulugeta Kibret , (2013).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, Journal of King Saud University – Science, January Volume 26, Issue 1, Page 1–20

O

- 1- **Orozco-Mosqueda, M.d.C.; Flores, A.; Rojas-Sánchez, B.; Urtis-Flores, C.A.; Morales-Cedeño, L.R.; Valencia-Marin, M.F.; Chávez-Avila, S.; Rojas-Solis, D.; Santoyo, G., (2021)-** Plant-Growth Promoting Bacteria as

Références bibliographique

Bioinoculants Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement, *Agronomy*, MDPI, 11(1167): p 1-2.

- 2- **Ouslim S., Merabet CH., Boukhatem Z., Bouchentouf L., Bekki A. (2019).** Phenotypic and Symbiotic Diversity, Of Nodulating Rhizobia Associated With Bean (*Vicia Faba*) In West Algeria 3(9): 2347-4289

P

- 1- **Peter H, Georges BJ, Raven KA, Mason JB, Losos SR et Singer. (2015).** *Biologies*, 9ème Ed. américaine du Raven, p: 1406.

Q

- 1- **Qin Han, Qun Ma, Yong Chen, Bing Tian, Lanxi Xu, Yang Bai, Wenfeng Chen, Xia Li. (2020).** Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean, *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 14:1915.

R

- 1- **Racher Backer, J. Stefan Rokem, Gayathri Ilangumaran, John Lamont, Dana Praslickova, Emily Ricci, Sowmyalakshmi Subramanian, Donald L. Smith. (2018).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture, *Frontiers in Plant Science* ;9(1473):4.
- 2- **Renard S., Goffork J.P., Frankinet. (2007):** Optimisation de l'efficience de l'azote dans les rotations intégrant les cultures de légumes industriels en Hesbaye. Les dossiers de la recherche agricoles.

S

- 1- **Sayad L., (2008).** Qualité physicochimique et bactériologie des eaux de l'écosystème lacustre .Lac des Oiseaux (wilaya de Taraf). Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie. 125 p.
- 2- **Séverine Lopez. (2018).** Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyper accumulateurs de nickel, Biodiversité et Écologie , Thèse doctorat, Université de Lorraine, 22.
- 3- **S. Imman, J. Arnthong, V. Burapatana, V. Champreda, and N. Laosiripojana,** "Effects of acid and alkali promoters on compressed liquid hot water pretreatment of rice straw," *Bioresource Technology*, vol. 171, pp. 29–36, 2014
- 4- **Sierra G.A. (1957):** A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. *Antonine van Leeuwenhoeck*. 28: 15-22p.
- 5- **Sirois M, (2018),** *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*. 8e edition. ELSEVIER.

T

- 1- **Tang Y and Stratton CW, (2018).** Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology: Volume 1: Techniques. 3^e edition. Springer.
- 2- **Tortorano G. J., Funke B. R., Case C. L., 2003.** Introduction à la microbiologie. Editions du Rrenouveau Pédagogique. France.

V

- 1- **Vessey J K (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil .255:571- 586.
- 2- **Vinoth Raj S., Kanikkai Raja A., Babu Vimalanathan A., Manoj G., Tyagi NamanHirenkumar Shah., Johnson Amala Justin N.A., Infant Santhose B., SathiyaseelanK. (2009);**Studyof starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. Recent Research in Science and Technology 1(1): 8–13p.

X

- 1- **Xingfeng Han ,Huiru Zeng ,Pietro Bartocci , Francesco Fantozzi ,Yunjun Yan.(2018).**Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review,fermentation,MDPI; 4(25):1.

Annexe 1

Principaux milieux de culture

* Milieux de king B

- king B 37g
- glycérol 10 ml
- eau distillé 1000ml

* Milieux de PDA

- Extrait de pomme de terre 200g
- glucose 20g
- agar_agar 18g
- Eau distillé 1000ml

* Milieu de TSA

- TSA(trytic_soy_agar)
- TSA40g
- Glycine 10 ml
- Eau distillé 1000ml

* Milieu de BHI

- BHI 52g
- Glycine 10 ml
- Eau distille 1000ml

* Milieu MH

- MH38G

-Eau distille 1000ml

* Milieu PVK

-Glycose 10G

-Ca₃(CO₃)₂ 5g

-(NH₄)₂ SO₄ 0.5g

-NaCl 0.2g

-MgSO₄ · 7H₂O 0.1g

-KCl 0.2G

-Extrait de levure 0.5g

-Fe SO₄ · 7H₂O 0.002g

-Mn SO₄ · H₂O 0.002g

-Agar 15g

- Eau distillé 1000 ml

*Milieu de Mueller Hinton Broth

- Mueller Hinton Broth 23g

- agar-agar 17g

- Eau distillé 1000ml

* Milieu GN

-28g Glycose Nutritif

-Eau distillé 1000mL

*MILIEU DE AMYLASE

-Peptone 0.5 g/l

-Extrait de levure 0.1g/l

-Glucose 1g/l

-Amidon 2g

*Milieu de Lypase

-Peptone 10 g/l

-NACL 5 g/L

-CaCl₂·2H₂O 0.10g/l

-Agar 20g/l

-Tiven 20g

-Eau distillé 1000ml

*Milieu de HCN

-TSA 40g

-Glycine 4.4g

-Eau distillé 1000ml

*Milieu de AIA

-TSB g

-Tryptophane 0.2g

-Eau distillé 1000ml