

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمّار ثليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie

Par:

Hamdaoui Aicha

THEME

***Isolement, caractérisation de rhizobactéries,
Pseudomonas spp. Fluorescents à partir d'échantillons
de la rhizosphère de Stipa tenacissima et d'Artemisia
herba-alba collectées dans la région d'Aflou***

Encadrée par :

Mlle. AMEUR Djamilia

Année Universitaire 2012/2013

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمّار ثليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم و علوم المهندس

قسم :

مذكرة

للحصول على شهادة الماستر في :

ميدان : علوم الطبيعة والحياة

فرع : بيئة

الإسم واللقب

حمداوي عائشة

الموضوع

عزل، خصائص rhizobactéries،
Pseudomonas spp. Fluorescents المتواجدة في عينات ريزوسنفار
الحلفاء والشيح المجموعة بمنطقة أفلو.

تأطير :

الأستاذة: عامر جميلة

السّنة الجامعية 2012/2013

DEDICACE

DEDICACE

La louange est à Allah, Celui qui lui glorifie ce qui est dans les cieux et dans la terre, c'est Allah, le Souverain, le Pur, le Puissant, le Sage.

Maître des premiers et des derniers, envoyé comme miséricorde à tout l'univers.

Au terme de ce modeste travail, je le dédie : En premier lieu, à mes très chers parents « HALIMA et ABDELKADER » pour leur tendresse, leur amour et leur sacrifice, "Ô mon Seigneur, fais- leur ; à tous deux ; miséricorde comme ils m'ont élevé tout petit" ; pour leur aide morale et financière. (Aucune dédicace ne peut exprimer ma profonde reconnaissance et mon grandamour pour eux).

À tous mes très chers frères et soeurs sans acception.

À tous la famille « HAMDIAOUI ».

À ma très chère sœur pour l'amour de dieu : ZAINEB

À ma très chère« LAILA MAIDI ».

À ma très chère amies de la 2^{ème} année écologie végétales

AICHA
AICHA

REMERCIEMENT

REMERCIEMENT

Je tiens des remerciements spécifiques :

À M^{elle}. AMEUR Djamila ma promotrice, d'avoir accepté de diriger ce travail. Celui qui a bien su saisir et dresser mes erreurs dans ce travail. Pour sa patience, ses encouragements et surtout pour sa gentillesse.

AUX membres jury pour avoir acceptés de consacrer du temps évaluer notre travail.

À M^{elle} ZAZA M pour donner les conseils pratiques dans laboratoire et pour sa gentillesse et son soutien moral.

À M^r HOUICHER A pour donner les conseils pratiques dans laboratoire.

À tous le personnel du laboratoire de département de biologie surtout Mr. HADJ AISSA, Mr. CHOUERANA et M^{elle} KHADIDJA, SAFIA.

À M^r. BENJDIAA A, infirmier à l'hôpital de Laghouat.

À mes enseignants de tous les cycles pour leurs encouragements.

Un grand remerciement à tous les personnes qui ont participé pour atteindre notre travail surtout ma très chère sœur « ZAINEB » et mon frère « MAHBOUB T ».

MERCI

Table de matière	Pages
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Partie bibliographique	3
I. Caractérisation du sol	3
II. La rhizosphère	4
1. Les microorganismes de la rhizosphère	4
1.1 Les bactéries de la rhizosphère	5
1.1.1. Les <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> (PGPR):	5
1.1.2. Les Actinomycètes	6
1.2. Les champignons de la rhizosphère	6
III. La relation entre les micro-organismes et les plantes	6
VI. La relation entre les micro-organismes et le sol	10
V. La relation entre les micro-organismes, le sol et les plantes	10
IV. Les <i>Pseudomonas</i>	12
1. Caractères morphologiques	12
2. Caractères écologiques	12
3. Mécanismes d'action des <i>Pseudomonas spp. Fluorescents</i>	13
3.1. Les siderophores	13
3.2. Les antibiotiques	14
3.3. L'acide cyanhydrique (HCN)	14
IV. Généralités sur la végétation steppique	14
1. Position systématique de la plante	15
1.1. Armoise herbe blanche (<i>Artemisia herba-alba</i>)	15
1.2. Alfa (<i>Stipa tenacissima</i>)	16
MATERIELS ET METHODES	18
Méthodes	18
1. L'Echantillonnage	18
2. Méthode d'isolement	18
3. Dénombrement des bactéries	19
4. Méthode de purification	19
5. Conservation des isolats	20
6. Caractérisation des isolats	20
6.1. Identification physiologique et biochimique	24
6.1.1. Test de Gram	24
6.1.1.1. Coloration de Gram	24

6.1.1.2. Test de KOH.....	24
6.1.2. Production de pigment fluorescent	25
6.1.3. Croissance en anaérobiose	25
6.1.4. Test de LOPAT.....	26
6.1.4.1. Production de Levane sucrase.....	26
6.1.4.2. Test d'oxydase.....	26
6.1.4.3. test de pectinase.....	27
6.1.4.4. Test d'arginine déshydrolase	28
6.1.4.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac	28
6.1.5. Production de catalase.....	29
6.1.6. Test Gélatinolyse	29
6.1.7. Croissance à 41°C et à 4°C	29
6.2. Galerie API 20NE	30
RESULTATS ET DISCUSSIONS	32
I. RESULTATS	32
1. Caractérisation des <i>Pseudomonas spp.</i> Fluorescents	32
1.1. Test de Gram.....	32
1.2. Production de pigments fluorescents.....	33
1.3. Croissance en anaérobiose	33
1.4. Tests de LOPAT	33
1.4.1. Production Levane sucrase	33
1.4.2. Production d'oxydase	34
1.4.3. Test de Pectinase.....	34
1.4.4. Test d'arginine déshydrolase	35
1.4.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac.....	35
1.5. Production de catalase	36
1.6. Test Gélatinolyse	36
1.7. Croissance à 41°C et 4°C	37
1.8. Galerie API 20NE.....	38
2. Identification Taxonomique	40
II. DISCUSSION	42
CONCLUSION.....	47
REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
ANNEXE.....	56

Numéro	Titre	Page
01	La quantité de différentes matières vivantes dans le sol	04
02	Moyennes des températures moyennes mensuelles de la région d'étude (1996-2011)	19
03	Précipitations moyennes mensuelles de la région d'étude (1996-2011)	20
04	Tableau de lecture (API 20 NE)	34
05	Résultats tests de LOPAT	39
06	le résultat global des tests appliqués sur les souches étudiés.	41
07	Résultat de test de Galerie API 20NE	43
08	Résultats de Galerie API 20NE sur logiciel d'identification	44
09	Résultats d'identification des 7 souches de <i>Pseudomonas spp.</i> Fluorescents selon la clé A	45
10	Résultats d'identification des 7 souches de <i>Pseudomonas spp.</i> Fluorescents selon la clé B	45

Numéro	Titre	Page
01	Les cinq compartiments du sol	03
02	Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle décrivant les interactions plantes- microorganismes dans la rhizosphère	09
03	Les divers partenaires vivants des sols	11
04	L'armoise blanche (<i>Artemisia herba-alba</i>)	16
05	Alfa (<i>Stipa tenacissima</i>)	17
06	Localisation géographique de la région de Djebel Amour	18
07	Isolement et purification des bactéries	20
08	Schéma de détermination des différents genres bactériens proposé par Schaad et al., (2001)	21
09	La clé dicotomique (A) proposé par Jacques (1994) pour identification des <i>Pseudomonas spp.</i> Fluorescents	22
10	La clé dicotomique (B) proposé par Bossis (1995) pour identification des <i>Pseudomonas spp.</i> Fluorescents	23
11	Test Pécinase	28
12	Le taux total des bactéries chez les deux espèces végétales étudiées	32
13	Résultat de test Hugh et Leifson	33
14	Résultat de test Levane	34
15	Résultat de test oxydase	34
16	Résultat de test d'Arginine	35
17	Résultat d'hypersensibilité sur tabac	35
18	Résultats de Galerie API 20NE de la souche (A23)	38

°C : degré Celsius.

ADH : Arginine – dishydrolase.

API : Analyse Prohylactic Index.

ARA : Arabinose

cm : centimètre.

CO₂ : dioxyde de carbone.

EDS : Eau Distillée Stérile.

G- : Gram négative.

g : gramme.

Gél : Gélatine

GN : Gélose Nutritif.

h : heure.

H₂O₂ : eau oxygénée

HCN : acide cyanhydrique.

HL : Milieu Hugh et Leifson.

HR : hypersensibilité.

KA : King "A".

KB : King "B".

Kg : kilo gramme.

Km : kilomètre.

KOH : Hydroxyde de Potassium

LCD : Lysine – décarboxylase.

Lev : Levane

LOPAT : Levane, Oxydase, Pectinase, Arginine déshydrogénase et hypersensibilité sur tabac.

LPGA : Extrait de Levure, Peptone, Glucose, Agar

ml : millilitre.

mn : minute.

N : Azote.

NE : Non Entérobactéries

NO₃ : Dénitrification

NR : Non Réalité.

O : Oxygène.

ODC : Ornithine – décarboxylase.

ONPG: Orthonitrophényl-B-D-Galactopyranoside.

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

pH : Potentielle d'Hydrogène.

PVDs : Pyoverdines.

s : seconde.

T : Température

UFC : Unité Format Colonie.

Introduction

Introduction

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. La rhizosphère est définie comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne.

De meilleures connaissances des mécanismes d'interaction plantes-microorganismes permettent de favoriser des populations déjà présentes dans la rhizosphère et qui sont bénéfiques pour les plantes, et de développer des pratiques autres que l'utilisation d'inoculant (Elhassan *et al.*, 2010).

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002) et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004).

De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Pivato *et al.*, 2009), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006). Cependant, leur impact sur la productivité et la diversité des plantes est encore mal compris.

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. Ils sont trouvés sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique (Höfte et de Vos, 2006).

Les *Pseudomonas* ont une capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres *rhizobactéries* et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002). De plus, ces bactéries sont très faciles à

isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Fenton et *al.*, 1992 ; Chin-A-Woeng et *al.*, 2002).

De nombreux travaux ont mis en évidence les effets de ces rhizobactéries. Principalement, les *Pseudomonas spp.* Fluorescents sont connues sur la biostimulation de la croissance végétale avec différents types de cultures conduites en conditions contrôlées ou à l'état naturel (Lemanceau, 1992). Ainsi que leur grande capacité d'inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores.

Ces derniers permettent de compétitionner pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. Il a été noté également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Iavicoli et *al.*, 2003 ; Kim et *al.*, 2004).

Les actions directes résultent des activités rhizobactériennes par la solubilisation de divers éléments minéraux et la production de régulateurs de croissance (Lemanceau, 1992).

Notre objectif à travers cette étude consistée à chercher des souches de *Pseudomonas spp.* Fluorescents dans la rhizosphère de plantes spontanées (*Stipa tenacissima* et *Artemisia herba-alba*).

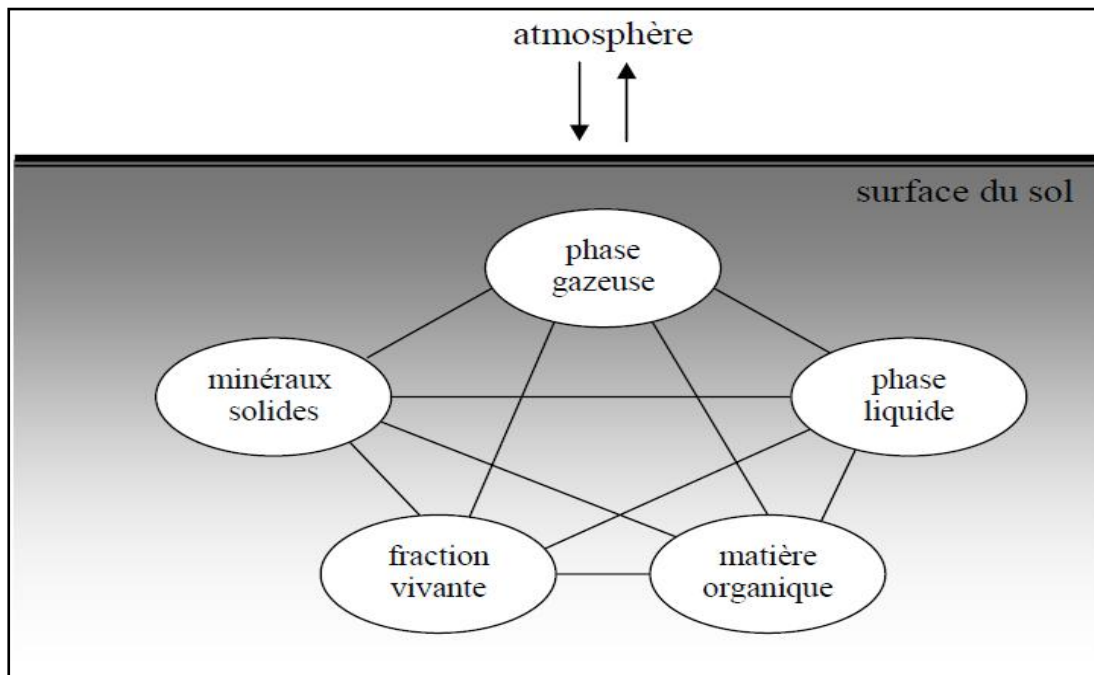
Notre expérimentation consiste à :

- Isoler à partir de la rhizosphère, une population bactérienne spécifique des *Pseudomonas spp.* Fluorescents ;
- Identifier et caractériser les souches par des différents tests physiologiques et biochimiques.

I. Caractérisation du sol :

Le sol est un milieu polyphasique composé d'une phase solide (minérale et organique), d'une phase liquide, d'une phase gazeuse et, colonisé par des organismes vivants. Il est traversé par des flux d'énergie et de matière dont la régulation est en grande partie assurée par les communautés vivantes qui le colonisent. C'est un milieu organisé et cette organisation, qui influe directement sur l'ensemble des propriétés du sol, dépend des interactions bio-organominérales (Djigal, 2003).

Selon Fuchs (1999), le sol est un milieu complexe au sein duquel de nombreux éléments s'influencent mutuellement. Les réactions que l'on y observe sont de natures chimiques, physiques et biologiques. Il peut être divisé en cinq compartiments (figure 1). En plus des interactions entre ces différents compartiments, le sol dans son ensemble est également influencé et réagit avec l'extérieur, c'est à dire l'atmosphère.



Source Morel, 1989 in Fuchs, 1999.

Figure1 : Les cinq compartiments du sol.

La matière vivante, visible ou non à l'œil nu, représente une quantité pas toujours facile à réaliser. Le tableau 1 présente la quantité de différentes matières vivantes qui se trouve dans le sol :

Tableau 1 : la quantité de différentes matières vivantes dans le sol.

La matière vivant	La quantité dans le sol (tonne, kg/ hectare)
Des bactéries	2,5 à 10 tonnes par hectare de biomasse
des champignons	1 à 10 tonnes par hectare de biomasse
des algues	100 à 500 kg par hectare de biomasse
des protozoaires	150 à 700 kg par hectare de biomasse
des nématodes	150 à 400 kg par hectare de biomasse
des acariens	environ 3 kg par hectare de biomasse
des collemboles	environ 2 kg par hectare de biomasse
des racines	2 à 12 tonnes par hectare de biomasse (matière sèche)

Source : Davet, 1996.

Dans les zones arides et semi-arides, les sols peuvent être profonds ou peu profonds, sableux ou argileux et varier en acidité et en fertilité. La productivité dépend de la capacité de rétention d'eau des sols qui tend à augmenter avec la profondeur et le contenu organique. La capacité de rétention d'eau des sols sableux est inférieure à celles des sols argileux (Gratzfeld, 2004).

II. La rhizosphère :

Selon Saisie (2013), la rhizosphère est une région du sol formée par les racines et les micro/macro-organismes associés et constitue un lieu d'échanges biogéochimiques intenses entre les végétaux et les sols.

La richesse de la rhizosphère en sucres, aminoacides, acides organiques, iso flavonoïdes, régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante (Pierson *et al.*, 2000), rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries.

1. Les microorganismes de la rhizosphère :

L'activité microbiologique dans la rhizosphère est de grande importance et a diverses conséquences pour les plantes. Tout d'abord, elle joue un rôle important dans le

recyclage des éléments minéraux, entraînant alors presque toujours leur meilleure assimilation par les plantes (Fuchs, 1999).

Ces êtres vivants, les microorganismes en particulier, sont requis dans le processus de décomposition et de recyclage des nutriments de la rhizosphère de la plante (Germida et al., 1998).

Les microorganismes rhizosphériques incluent les symbiotes (rhizobiums, actinobactéries et champignons mycorhiziens) et les saprophytes libres qui augmentent la disponibilité des nutriments et la synthèse de substances de croissance des plantes et/ou suppriment les pathogènes (Fitouri, 2011).

1.1. Les bactéries de la rhizosphère :

La communauté bactérienne rhizosphérique est différente tant au niveau qualitatif que quantitatif que celle colonisant le sol non rhizosphérique (Duponnois, 1992).

Dans la rhizosphère, les bactéries constituent les microorganismes les plus nombreux (leur densité est de l'ordre de 10^9 cellule par g de sol) et les plus variés. Elles sont plus fortement stimulées par l'effet rhizosphérique que les Actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires (Dommergues et Mangenot, 1970).

Ces bactéries ont des relations directes ou indirectes avec la plante et selon leur relation, les bactéries peuvent être saprophytes, délétères ou bénéfiques pour la plante dont les (PGPR) (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Rajaonarimamy, 2010).

1.1.1 Les *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR):

Les PGPR sont des microorganismes rhizosphériques intervenant dans la stimulation de la croissance de la plante. En effet, les PGPR déploient divers mécanismes qui influent directement ou indirectement sur la croissance de la plante. L'effet direct concerne l'amélioration de la nutrition minérale de la plante. Le phosphore est un élément essentiel à la croissance de la plante alors que sa disponibilité dans le sol est généralement faible. De ce fait, les PGPR produisent des enzymes solubilisant le phosphate peu soluble dans le sol qui, par la suite, devient disponible pour la plante (Glick, 1995).

1.1.2. Les Actinomycètes :

Les bactéries filamenteuses ou Actinomycètes, peuvent atteindre 10^7 unités par gramme de sol et elles manifestent souvent un antagonisme vis-à-vis des bactéries et des champignons voisins. Cet antagonisme résulte de la sécrétion de substances antibiotiques (Rajaonarimamy, 2010). Les Actinomycètes interviennent également dans la dégradation des matières organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries. De plus les Actinomycètes sont capables de produire des substances probiotiques dont les vitamines B1, B2, B6, B12, la biotine et l'acide folique (Dommergue et Mangenot, 1970) qui sont favorables à la croissance et à la survie de la plante.

1.2. Les champignons de la rhizosphère :

Comme dans le cas des bactéries, dans le sol et dans la rhizosphère, les champignons sont présents en masse dont la densité est estimée de 10^5 à 10^6 /g de sol. Suivant leur mode de vie, ils sont classés en saprophytes, parasites ou symbiotiques (Strullu, 1991)

Les champignons saprophytes interviennent dans la dégradation de substances résistantes comme la lignine. Cette association est bénéfique tant pour la plante que pour le champignon en matière de nutrition (Rajaonarimamy, 2010).

Les champignons symbiotiques s'unissent avec la plante et des échanges réciproques entre les deux s'établissent (Rajaonarimamy, 2010). En effet, selon Strullu (1991), la symbiose désigne les unions harmonieuses basées sur des échanges réciproques entre les deux partenaires.

D'autres champignons sont parasites de la racine des plantes, ce sont les champignons phytopathogènes (exemple : *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis* ou les oidiums de certains Angiospermes (Strullu, 1991).

III. La relation entre les micro-organismes et les plantes :

Les études des relations entre les plantes et les micro-organismes se sont nettement accrues au cours de ces dernières années, grâce à la microbiologie, à la biologie moléculaire et au choix des modèles sur lesquels de nombreuses équipes collaborent. C'est le cas des symbioses "Rhizobium-Légumineuses", des associations "Azospirillum-

Céréales", "*Pseudomonas*-Plantes cultivées", des "Mycorhizes" et des bactéries et champignons phytopathogènes.

La rhizosphère est le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La dynamique de ces interactions peut être représentée par une boucle de rétroaction comme celle décrite par Lemanceau *et al.*, (2006) *in* Viollet, (2010) (figure 3).

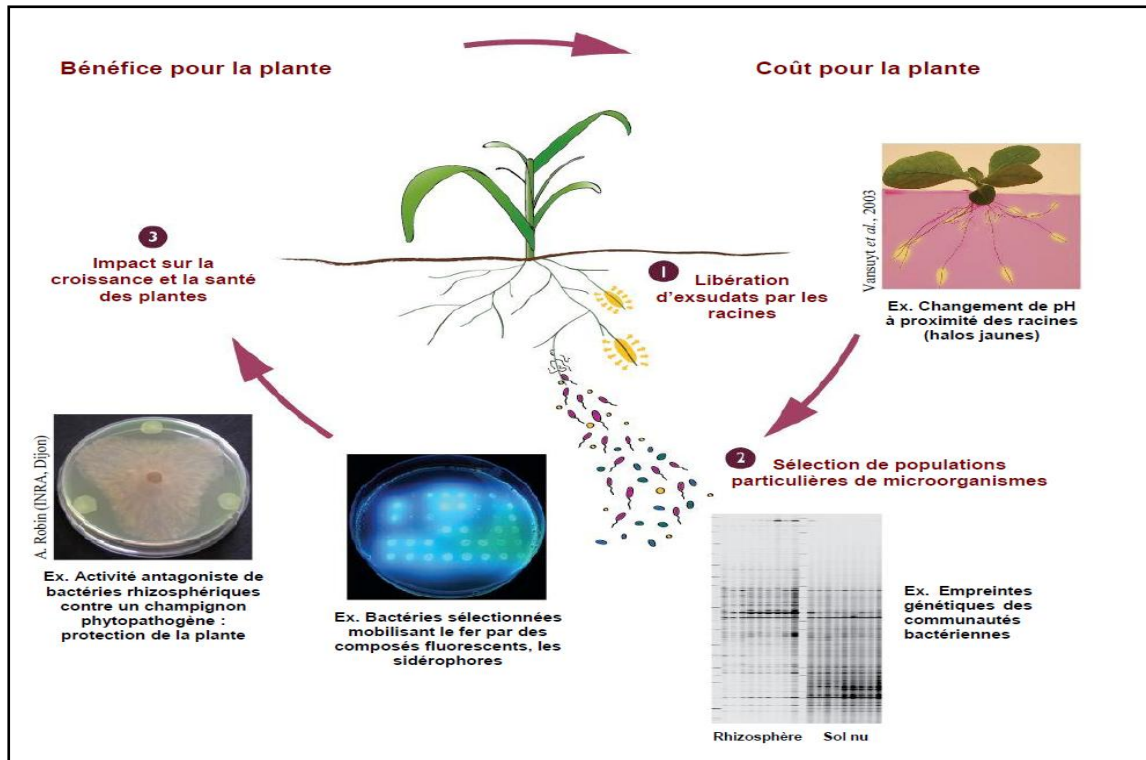
1. Les plantes transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique et la stockent temporairement sous forme de liaisons chimiques riches en énergie dans des molécules organiques par le processus de photosynthèse (Viollet, 2010). La photosynthèse conduit à une accumulation d'énergie d'origine solaire dans les végétaux chlorophylliens (production biologique primaire) et soutient le fonctionnement des écosystèmes en convertissant l'énergie lumineuse et les éléments minéraux en matières organiques utilisables par les niveaux trophiques supérieurs.
2. La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu (Curl, et Truelove, 1986 ; Lemanceau et Heulin, 1998 ; Morgan *et al.*, 2005 ; Van Loon, 2007). Ces modifications quantitatives de la microflore, ou l'effet rhizosphère, s'accompagnent également de modifications qualitatives. En effet, la diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère et leur activité métabolique diffèrent de celles du sol nu (Viollet, 2010). Les populations aptes à percevoir les variations de l'environnement rhizosphérique et à adapter leur physiologie, tirent profit de la perturbation et sont favorisées. Les composés organiques exsudés par les plantes dans la rhizosphère activent différents groupes de microorganismes et augmentent leur prolifération (Bais *et al.*, 2006).
3. Les rhizodépôts constituent donc un élément majeur de perturbation de la microflore tellurique qui en retour, influence la croissance et la santé des plantes et donc, à nouveau, l'émission des rhizodépôt. La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes (Kent et Triplett, 2002 ; Cardon et Gage, 2006). Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur

influence sur le développement des végétaux ne soit connue (microorganismes commensaux), certains sont favorables aux plantes (mutualistes) alors que d'autres ont des effets délétères sur les plantes (parasites et phytopathogènes). Les rhizodépôts jouent un rôle actif dans la régulation des interactions mutualistes et parasites/pathogènes, entre les plantes et les microbes du sol (Hirsch et *al.*, 2003).

La plante nourrit les bactéries, champignons, algues et autres espèces microbiennes dans la rhizosphère, qui à leur tour en échange, sécrètent des enzymes, des acides organiques, des antibiotiques, des régulateurs de croissance, des hormones et d'autres substances qui sont absorbés par les racines et transportés vers les feuilles (Gen et Tik, 2012).

D'après Gen et Tik (2012), les micro-organismes constitutifs de la rhizosphère sont impliqués dans divers mécanismes connus comme :

- la solubilisation d'éléments nutritifs facilitant leur absorption par la plante ;
- la synthèse de substances de croissance (hormones) ;
- le bio-contrôle (protection contre les pathogènes ou, à l'inverse, attaque des racines) ;
- la fixation d'azote atmosphérique par des bactéries.



Source : Viollet, 2010.

Figure 2 : Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère.

VI. La relation entre les micro-organismes et le sol :

Les microorganismes rhizosphériques (bactéries, algues, champignons) participent à la structure du sol.

Les relations établies entre les microorganismes et les particules du sol sont multiples et synergiques : les particules minérales influencent l'activité biologique et la survie des microorganismes, en partie grâce à la géométrie des pores et, par le contrôle des conditions physicochimiques locales (particulièrement la disponibilité de l'eau et de l'oxygène). Les microorganismes, à leur tour, modifient l'arrangement des particules du sol (structure) ainsi que leur stabilité (agrégation) (Valencia, 2008).

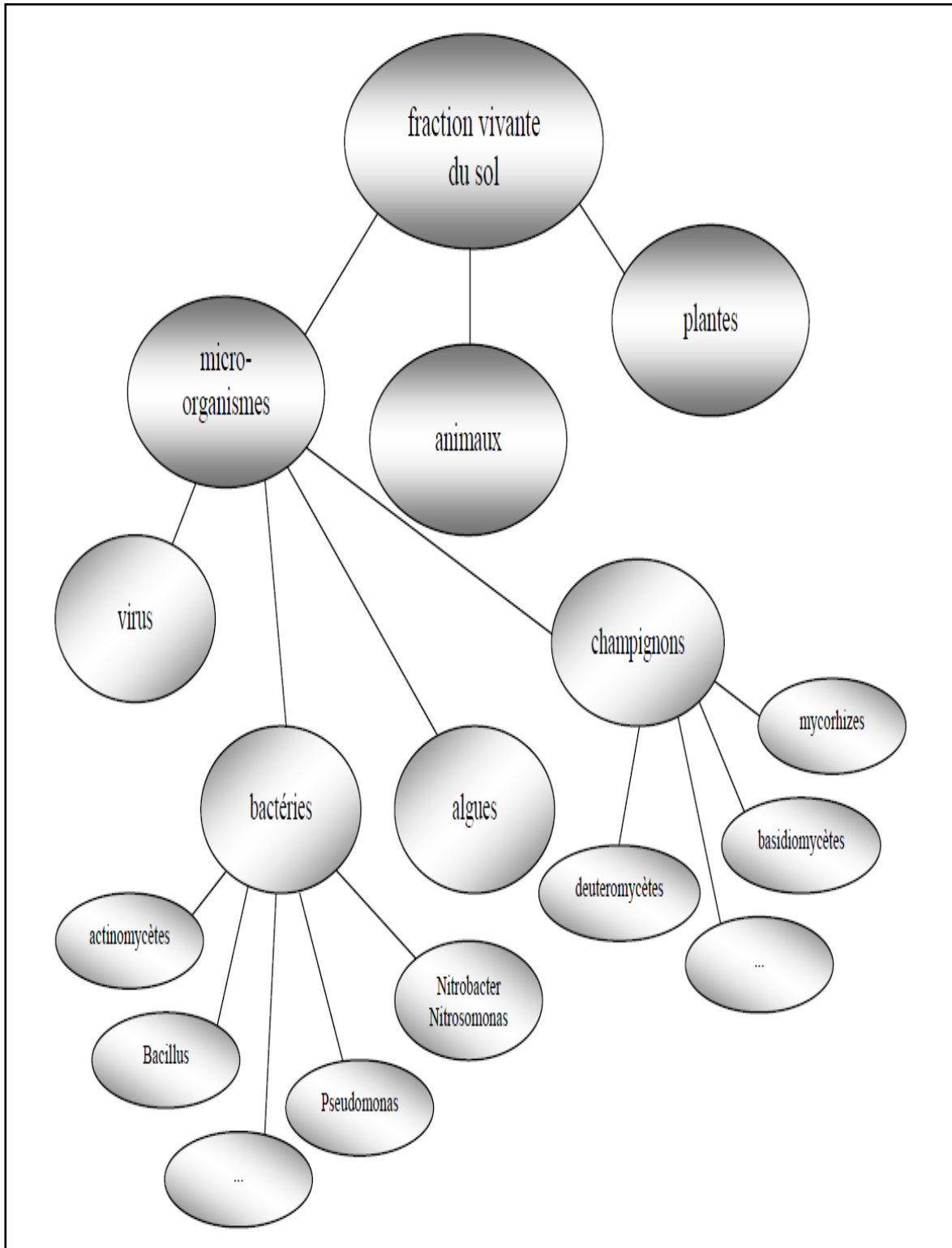
La principale contribution des microorganismes rhizosphériques à l'agrégation est associée à la production de sécrétions extracellulaires. Ces sécrétions sont un mélange complexe de biopolymères, comme les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques et les lipides (Alami, 2000).

V. La relation entre les micro-organismes, le sol et les plantes :

La fraction vivante du sol est extrêmement variée (figure 4). Elle est composée aussi bien d'organismes très simples (comme les bactéries) que d'organismes évolués (comme la microfaune). Certains organismes ne vivent que partiellement dans le sol, comme les plantes dont seules les racines s'y développent. Chaque sol possède une fraction vivante différente qui évolue également avec le temps. Son activité caractérise la fertilité du sol et son pouvoir à s'adapter et/ou à résister aux influences externes (Fuchs, 1999).

D'après Fuchs (1999), Les microorganismes jouent un rôle essentiel à ce niveau. Ils influencent directement ou indirectement la croissance des plantes et leur santé. Alors que certains microorganismes agissent négativement sur la vitalité de la plante (par exemple les agents pathogènes), certains autres favorisent positivement leur développement (comme les mycorhizes ou les antagonistes).

Les interactions entre ces différents acteurs – microorganismes «négatifs», microorganismes «positifs» et plantes – déterminent, sous l'influence des compartiments inertes du sol, la fertilité du sol. De part de son activité et des techniques de culture qu'il emploie, l'homme peut influencer grandement ces interactions.



Source : Fuchs, 1999.

Figure3 : Les divers partenaires vivants des sols.

IV. Les *Pseudomonas*

1. caractères morphologiques :

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Avril *et al.*, 1992 ; Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894). Certains espèces sont assignées au la rhizobactéries des PGPR (Lemanceau, 1992).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négative (Gram-), non sporulés, très généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimioorganotrophes (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni, 2009 ; Viollet, 2012).

2. caractères écologiques :

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. (Bossis *et al.*, 2000 ; Viollet, 2012). La plupart des *Pseudomonas* sont très ubiquistes et sont souvent isolés du sol, de l'eau, des poussières en suspension dans l'air (Palleroni *et al.*, 2005).

De nombreuses études sont dédiées à l'écologie des *Pseudomonas* spp. Fluorescents. Les bactéries appartenant à ces espèces présentent en effet un intérêt potentiel pour l'environnement. Certaines améliorent la croissance et la santé des plantes, et contribuent donc à réduire l'utilisation d'intrants de synthèse en agriculture. D'autres sont capables de réduire les oxydes d'azote et de dégrader les composés xénobiotiques (Bossis *et al.*, 2000).

Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Fenton *et al.*, 1992 ; Chin-A-Woeng *et al.*, 2001).

3. Mécanismes d'action des *Pseudomonas* spp. Fluorescents :

Les *Pseudomonas* sont des colonisateurs de la rhizosphère très efficaces. Ils sont efficaces contre de nombreux agents pathogènes telluriques, et ceci grâce à divers mécanismes. Il a également été démontré que certaines souches de *Pseudomonas* peuvent induire une résistance dans les plantes.

Elles sont utilisées des mécanismes directs et indirects pour produire ces métabolites. Les actions directes résultent des activités rhizobactériennes par les solubilisations de divers éléments minéraux et la production de régulations de croissance (Lemnaceau, 1992).

Les mécanismes indirects utilisés par ces *Pseudomonas* spp. fluorescents, comprennent la production d'antibiotiques contre des bactéries pathogènes (Thomashow *et al.*, 1990), la séquestration du fer pour les plantes par les siderophores, Et aussi la production l'acide cyanhydrique (HCN).

3.1. Les siderophores :

Le mot sidérophore, issu du grec, signifie sidêros : fer et phore : porteur. L'utilisation des sidérophores représente chez les bactéries l'un des systèmes les plus efficaces pour l'acquisition du fer.

D'après, Neilands (1995), les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, dont sont jouées le rôle de chélateur et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes.

La majorité des espèces de *Pseudomonas* spp. Fluorescents produisent des sidérophores. Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes Fe³⁺- sidérophore bactériens (Becker et Cook, 1988; Loper, 1988; Bitter *et al.*, 1991). Les sidérophores jaunes-verts sont nommés pyoverdines (PVDs) ou pseudobactines (Avril *et al.*, 1992). A côté de la PVD, *P. aereuginosa* produit un autre sidérophore nommé pyocheline avec une affinité plus faible pour le Fe³⁺ (Cox *et al.*, 1981).

La compétition pour le fer via les siderophores dans les rhizosphères est un déterminant majeur dans les interactions entre les microorganismes pathogènes et bénéfiques. L'aptitude de différentes souches de *Pseudomonas* à utiliser des siderophores hétérologues, a été testée dans le cadre de leur pouvoir antagoniste.

3.2. Les antibiotiques :

Les espèces de *Pseudomonas* qui produisent des antibiotiques comme le 2,4 diacétylphloroglucinol et les phénazines ont une capacité de biocontrôle envers plusieurs pathogènes racinaires fongiques.

Le rôle de ces antibiotiques a été mis en évidence par plusieurs auteurs en utilisant des mutants non producteurs de ces derniers.

Les phénazines sont des pigments hétérocycliques azotés intensément colorés, produits par différentes souches bactériennes (Leisinger et Margraff 1979; Budzikiewicz, 1993; Stevans *et al.*, 1994). Les phénazines jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique, incluant la survie et la compétence des bactéries productrices (Mazzola *et al.*, 1992).

3.3. L'acide cyanhydrique (HCN):

L'HCN est un métabolite secondaire produit par les bactéries à Gram négatifs *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, et *Chromobacterium violaceum* (Askeland et Morisson, 1983).

La production de l'HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Ramette *et al.*, 2003).

IV. Généralités sur la végétation steppique :

En Algérie, les steppes occupent environ 27 millions d'hectares de la superficie du Nord africain, ou elles constituent une ressource capitale en fourrage, essentiel à l'activité pastorale des régions semi-aride et aride (Melzi, 1990).

Les formations steppiques comprennent essentiellement des steppes à « Alfa », à « Armoise » et à « Sparte » qui couvrent des étendues immenses, outre que les « Dayas » à pistachier et jujubier ainsi que des étendues de sable et de sols salés (Ozanda, 1958).

D'après et Nadjraoui (2002), les steppes sont de vastes étendues couvertes d'une végétation basse très ouverte, sont dominées par les 4 grands types de formation végétales, mais les plus dominantes sont les deux types suivantes :

Les steppes à Alfa (4 millions d'ha en 1975) (Nadjraoui, 2002) présentent une forte amplitude écologique.

Les steppes à Armoise blanche, d'une valeur fourragère plus importante, recouvrent 3 millions d'hectares. Ces dernières, sont souvent considérées comme les meilleurs parcours (Aidoud, 1989 ; Hellal, 1998 ; Nadjraoui, 2002).

1. Position systématique de la plante :

1.1. Armoise herbe blanche (*Artemisia herba-alba*) :

L'Armoise herbe blanche est une plante herbacée à tiges ligneuses et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillées avec une souche épaisse. Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites (3à 1,5 mm) et ovoïdes. L'involucre est à bractées imbriquées, les externes orbiculaires et pubescentes. Le réceptacle floral est nu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitule toutes hermaphrodites (Pottier, 1981).

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Artemisia</i>
Espèce	<i>Artemisia herba-alba</i>



Figure 4 : l'armoise blanche (d'après Aouadhi, 2010).

1.2. Alfa (*Stipa tenacissima*) :

L'Alfa est une graminée vivace, formant des touffes constituées d'une partie aérienne cespiteuse de hauteur de (20 à 150cm) et de diamètre (10 à 80 cm) et d'une partie souterraine touffue et rameuse. La partie souterraine de l'Alfa est constitué par un rhizome très rameux et à entre nœuds très courts.

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Macrochloa</i>
Ordre	<i>Cyperales</i>
Famille	<i>Poacées (Graminées)</i>
Sous-famille	<i>Argostidées</i>
Genre	<i>Stipa</i>
Espèce	<i>Stipa tenacissima</i>



Source : Chehma, 2006

Figure 5 : Alfa : *Stipa tenacissima*.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Méthodes :

1. L'Echantillonnage :

Au printemps, l'échantillonnage a été effectué dans la région d'Aflou précisément dans la zone Sahoulahmar qui se caractérise par la dominance des deux espèces végétales : *Stipa tenacissima* et *Artemisia herba-alba*, nous avons prélevé un échantillon composé du sol de la zone rhizosphérique de chacun des espèces à une profondeur de 15-20 cm. Les échantillons ont été mis dans des sacs en plastique.

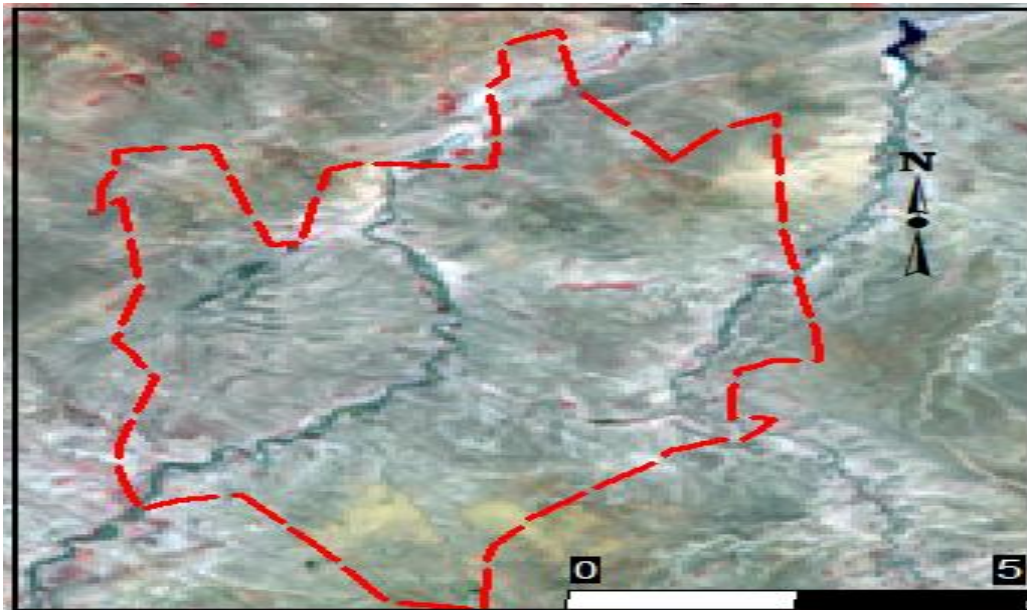


Figure 6 : Localisation géographique de la zone d'étude Sahoulahmar.

2. Méthode d'isolement :

L'isolement des bactéries appartenant aux *Pseudomonas spp.* Fluorescents du sol rhizosphérique a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions (Klement et al., 1990).

Pour la préparation de la solution mère, un (1) g du sol a été mis dans 9 ml d'eau distillée stérile.

Après l'agitation, 1ml de la solution mère a été prélevé et mis dans un tube contenant 9ml d'eau distillé stérile, une série de dilution en cascades a été réalisé jusqu'à 10^{-6} (figure 7).

L'isolement des bactéries est réalisé sur deux milieux de cultures, un milieu général LPGA (Smidi, 1982) et un autre milieu sélectif King B (King et al., 1954).

Nous avons étalé 0,1ml de chaque dilution sur les deux milieux (KB et LPGA) préparés en boîtes de Pétri avec deux répétitions pour chaque dilution.

Nous avons incubé l'ensemble des boîtes à une température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

3. Dénombrement des bactéries :

Après 24 h d'incubation, à l'aide de l'appareil compteur de colonies, nous avons affecté le comptage des colonies sur les deux milieux pour estimer le nombre des bactéries viables.

Le dénombrement consiste à calculer les bactéries présentes sur les boîtes en Unité Formant Colonie (UFC). Le comptage se fait macroscopiquement. Pour le calcul, seules les boîtes ayant 30 à 300 colonies sont retenues (Klement et *al.*, 1990).

Nous avons utilisé la formule UFC suivante :

$$\text{UFC} = N \times 10^x \times 10 \text{ (cellule.ml}^{-1}\text{)}$$

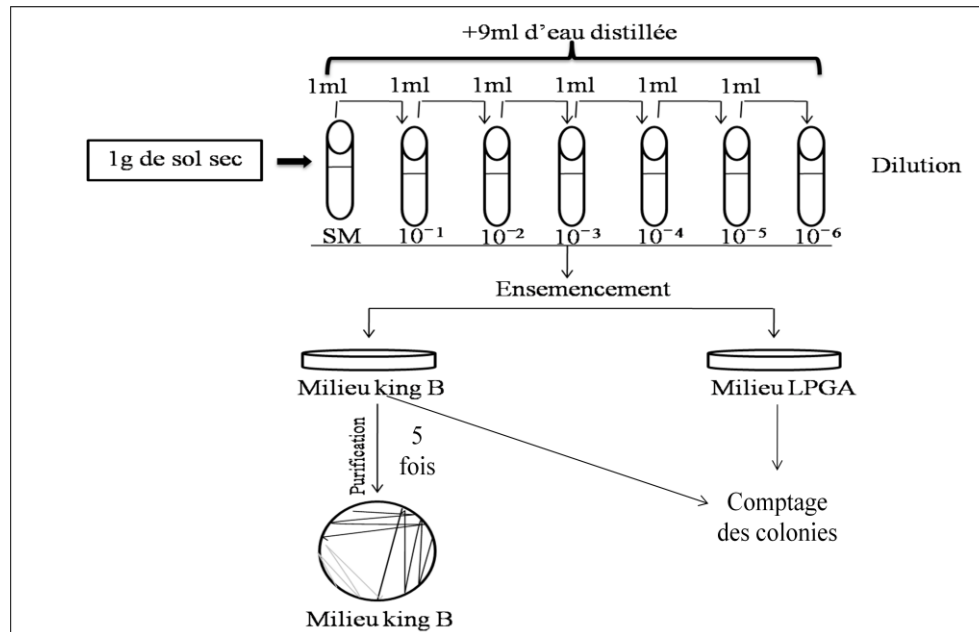
N : la moyenne entre de boîtes de même dilution ;

x : le nombre de dilution.

4. Méthode de purification :

Après 48 h d'incubation, nous avons repéré les colonies fluorescentes sur le milieu de KB (celles produisant un pigment fluorescent) à l'œil nu, en plus des caractères morphologiques des *Pseudomonas spp.* Fluorescents, qui porte principalement sur la couleur, l'aspect, le contour et les dimensions des colonies bactériennes.

Nous avons prélevé ces isolats et sont étalé sur le milieu de King B. Après cinq purifications successives, nous avons obtenue des cultures pures.



SM : solution mère

Figure 7 : Isolement et purification des bactéries.

5. Conservation des souches :

Après la purification, les souches bactériennes pures sont repiquées dans des tubes contenant un milieu KB (King B) et d'autres tubes contenant un milieu GN (Gélose Nutritif). Après la croissance à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, ces tubes ont été mis au réfrigérateur à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ pour utiliser ultérieur.

6. Caractérisation des souches :

L'identification préliminaire de *Pseudomonas spp.* Fluorescent, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de l'oxydase, levane sucrase, arginine dihydrolase, hypersensibilité de Tabac, voie d'utilisation du glucose, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (Figure 8) (Schaad et al., 2001).

Aussi, l'identification est basée sur les clés dichotomiques de Jacques, (1994) et Bossis, (1995) (Figures 9 et 10) et le Galerie API 20NE.

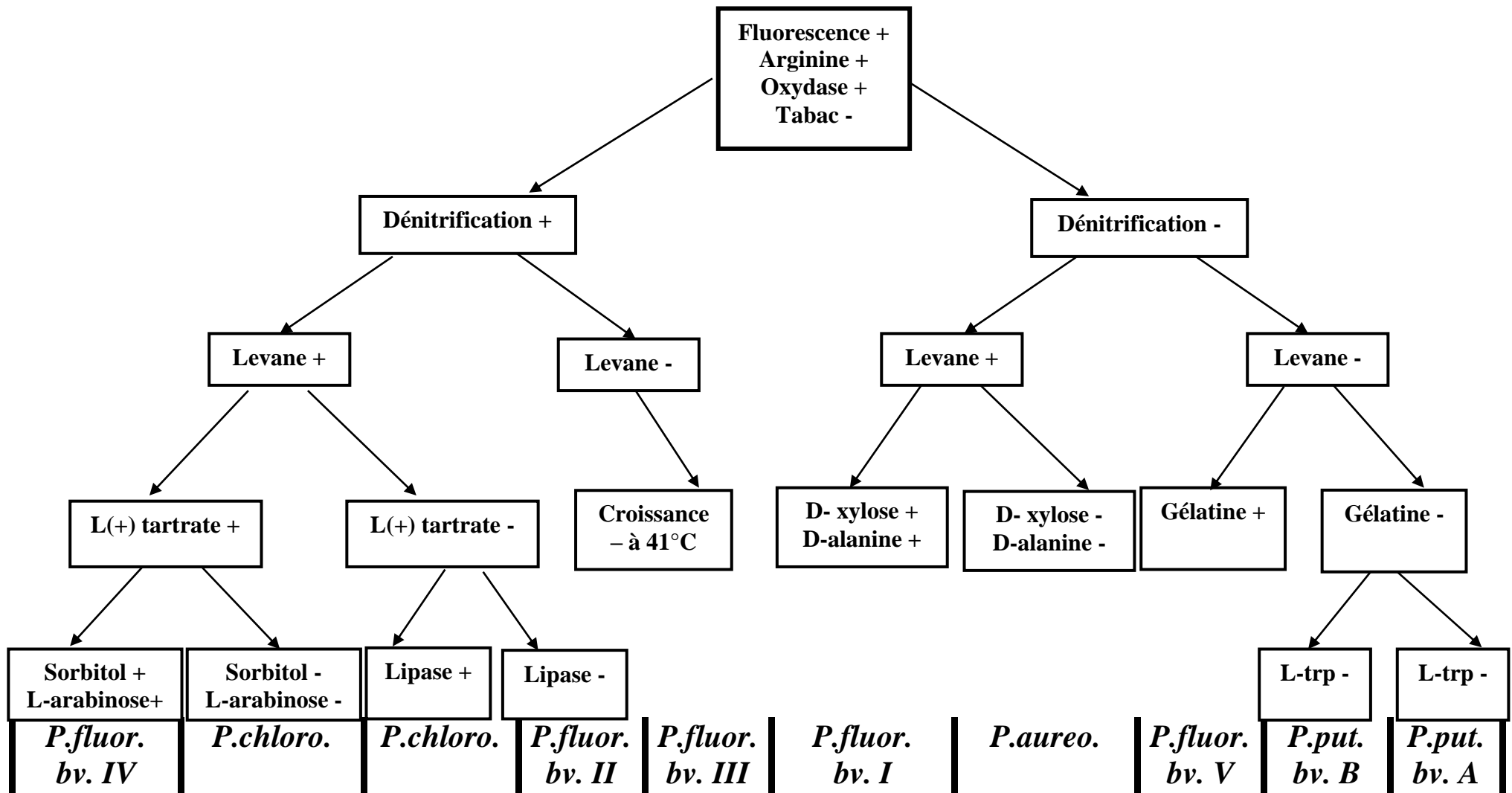


Figure 9 : la clé dicotomique (A) proposé par Jacques (1994) pour identification des *Pseudomonas* spp. Fluorescents.

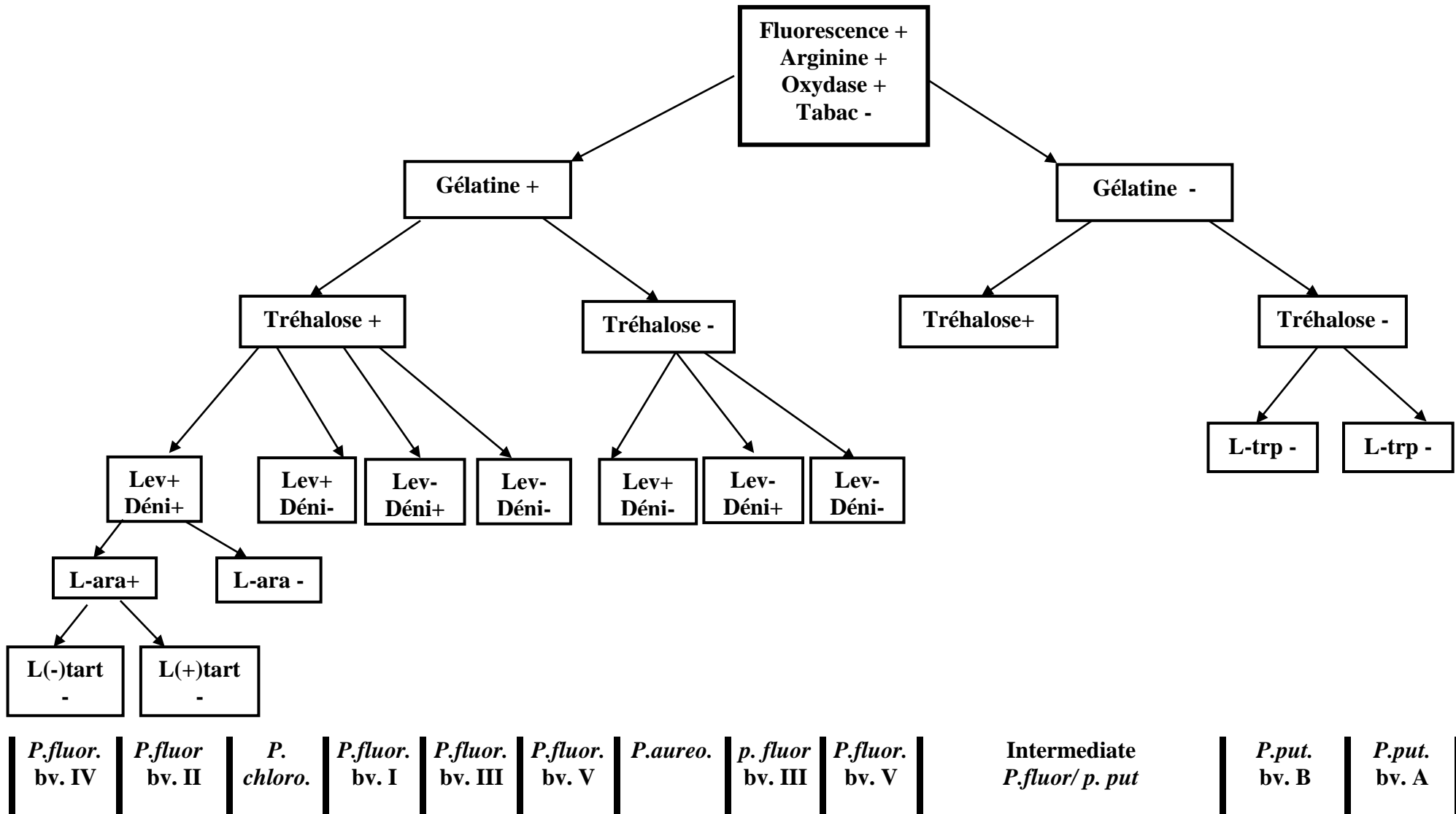


Figure 10 : la clé dicotomique (B) proposé par Bossis (1995) pour identification des *Pseudomonas spp.* Fluorescents.

6.1. Identification physiologique et biochimique :

6.1.1. Test de Gram :

6.1.1.1. Coloration de Gram :

La coloration a été effectuée selon la méthode classique.

C'est la coloration de base en Bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des critères essentiels de la classification des bactéries (Schaad et *al.*, 2001). Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration : la différence de composition chimique de bactéries et la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool.

Nous avons préparé et étalé en couche mince la colonie isolée d'une culture pure sur une goutte d'eau distillée stérile, séché, fixé, recouverte de violet de gentiane ; nous avons laissé agir 1 minute, jetés l'excès du colorant. Nous avons versé sur la lame quelques gouttes de Lugol, et laissé agir 1 minute, nous avons égoutté la lame l'incliné et laissé tomber goutte à goutte l'éthanol pure jusqu'à ce qu'il s'écoule incolore à l'extrémité inférieure. Nous avons arrêté la différenciation par un lavage abondant à l'eau distillée, recolore, en faisant agir sur la préparation la fuschine pendant 1 minute.

Nous avons lavé à l'eau distillée et séché la lame en fin nous avons observé au microscope optique. L'observation se fait sous microscope optique à (G : 100×10×1,5) en ajoutant une goutte de l'huile à immersion.

La lecture de la coloration de Gram est basée sur le changement de couleur, où, les germes qui ont gardés la première coloration violette sont des Gram positif (+). Ceux qui ont été décoloré par l'alcool se présente en rose coloré par la fuschine sont des Gram négatif (-).

6.1.1.2. Test de KOH:

Parallèlement, un test plus rapide, a été effectué. Deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 3%, sont mises en contact avec une crème bactérienne sur une lame en effectuant un mouvement circulaire. La solution de KOH devient

visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s (Schaad et *al.*, 2001).

6.1.2. Production de pigment fluorescent :

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B) permettent de différencier entre elles les différences espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques (Avril et *al.*, 1992).

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents : King A et King B.

La production de pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A (King et *al.*, 1954).

La production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B (King et *al.*, 1954).

A partir d'une culture bactérienne jeune âgée de 24h, nous avonsensemencé des tubes de KB en faisant une strie à la surface de milieu. Nous avons incubé à une température de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Après 48h à 72h, l'apparition de la couleur bleue sur le milieu King A (présence de pyocyanine), la couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B (présence de pyoverdine).

6.1.3. Croissance en anaérobiose :

Le milieu de Hugh et Leifson permet de distinguer entre les deux processus. La dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu : lors des respirations le glucide est oxydé en CO_2 , par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral); Lors des fermentations le glucide est oxydé en acides, alcools, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement. Toutes les voies fermentaires ne sont cependant pas également acidifiantes (Schaad et *al.*, 2001).

Nous avonsensemencé par piqûre centrale, avec un fil de platine la bactérie. Nous avons ajouté 1cm d'huile de paraffine stérile pour anaérobiose bactérienne. Nous avons incubé à une température $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pendant 24 à 48 h.

La réaction positive (+) : obtenue la couleur jaune (Les bactéries oxydent le glucide par respiration aérobie), la réaction négative (-) : les bactéries inactives ou inertes ne change pas la couleur verte.

Le milieu de Hugh et Leifson contient un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, qui prend une couleur jaune en milieu acide.

6.1.4. Test de LOPAT :

Les tests à effectuer pour identifier les espèces de *Pseudomonas spp.* Fluorescents sont: production de Levane, présence d'oxydase, dégradation de la pectine (pectinase), présence d'arginine déshydrogénase et hypersensibilité sur tabac (Schaad et *al.*, 2001).

6.1.4.1. Production de Levane sucrase :

Le test Levane sert à vérifier la polymérisation du fructose en poly-fructose par la bactérie (Schaad et *al.*, 2001).

Chaque boites de Pétri contenant le milieu Levane est divisé en trois secteurs pour tester trois souches bactériennes au même temps. Avec l'anse de platine, nous avonsensemencé les bactéries jeunes par striés, et laissé les boites en l'incubation à $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Après 24 à 48 heures d'incubation, nous avons lu la réaction obtenu : Strie partiellement saillante et luisante (vue du dessus) : réaction positive (+). Présence d'une zone opaque et luisante en marge de la strie (vue du dessous). Réaction négative (-) : Strie prostrée et non luisante.

6.1.4.2. Test d'oxydase:

Le test oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C.

Sur une lame propre, nous avons placé un disque d'oxydase (MASTDISCS ID™) et à l'aide d'une anse de platine stérile, prélevé la colonie bactérienne isolée jeune et étalée sur le disque.

La réaction d'oxydase est obtenue après quelques secondes, la réaction positive (+) indique qu'il y a eu oxydation du réactif phénylènediamine pour former un composé coloré en bleu violète, l'indophénol, et l'absence de coloration indique une réaction négative (-) (Schaad et *al.*, 2001).

6.1.4.3. Test de Pectinase :

Le test Pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire, sa capacité à dégrader la pectine.

Des tubercules de pomme de terre ont été désinfecté avec de l'eau de javel puis l'éthanol pure (95%), nous les avons coupé en tranches de 7mm, déposé chaque tranche une dans une boîte de Pétri stérile contenant de papier Buvard stérile.

A l'aide d'un scalpel, nous avons réalisé un petit creux au centre des tranches. Un volume de 0,1ml d'une suspension bactérienne de chaque souche, a été mis dans le creux réalisé.

Nous avons ajouté un volume de l'eau physiologie stérile dans les boîtes de Pétri. Nous avons réalisé deux répétitions pour chaque souche. Laissé en incubation à une température de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

L'observation a été faite après 10 à 14 jours. La réaction positive (+) indique qu'il y a eu dégradation de la pectine du milieu et se traduit par la couleur marron à la surface et une odeur spécifique. La réaction négative (-), aucun changement (Schaad et *al.*, 2001).

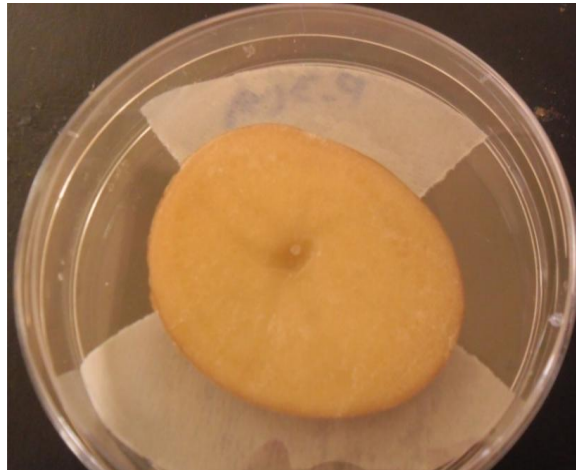


Figure 11: test Pectinase.

6.1.4.4. Test d'arginine déshydrolase :

Le test d'arginine déshydrolase sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine (un acide aminé) à l'aide de l'enzyme arginine déshydrolase.

Avec une piqure centrale, nous avons ensemencé la bactérie sur le milieu d'arginine et ajouter environ 1cm d'huile de paraffine stérile. La réaction se fait en condition anaérobique. Incubation à la température de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 5 jours.

La réaction obtenue réaction positive (+) : le milieu demeure rosé, si le milieu devient jaune orangé est une réaction négative (-).

6.1.4.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac:

Le test d'hypersensibilité (HR) sur tabac met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie suite au dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac (Klement, 1963).

Nous avons préparé la suspension bactérienne à partir d'une culture jeune âgée de 24h et 5ml d'eau physiologie stérile. À l'aide d'une seringue stérile de 1 ml, nous avons inoculé l'espace intracellulaire le long de la nervure centrale de la feuille de Tabac. Les plantes sont placées au laboratoire à la température ambiante.

Dans le cas de repense négative (-), aucun changement dans la couleur et l'aspect du tissu, mais pour la repense positive (+), la zone foliaire inoculée avec la bactérie devient

légèrement translucide et a un aspect humide, par la suite, les tissus s'assèchent et prennent une coloration brun clair à beige.

6.1.5. Production de catalase:

L'enzyme catalase est produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène.

Sur une lame, nous avons déposé une goutte de l'eau oxygénée (H₂O₂) et prélever la bactérie à identifier et la déposer dans la solution de l'eau oxygénée. Nous avons attendu quelque seconde et lu la réaction obtenue.

La réaction catalase positive (+) se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène et la réaction négative (-) est connue par absence de bulles (Lévy et *al.*, 1992).

6.1.6. Test Gélatinolyse :

La gélatinolyse est une enzyme extracellulaire qui entraîne une fragmentation poussée de la gélatine, en modifiant ses propriétés physiques de prise en gel (Schaad et *al.*, 2001).

Nous avonsensemencé les tubes contenant 5ml de milieu gélatine avec une crème bactérienne de 24 heures, par piqure centrale. Les tubes sont ensuite incubés 28 ± 2°C de 3 à 10 jours. Après l'incubation, sont mis à une température de +4 ± 2°C pendant 10mn pour vérifier la liquéfaction de la gélatine.

La gélatinolyse s'exprime par l'absence de prise de gel, c'est-à-dire la liquéfaction du milieu.

6.1.7. Croissance à 41°C et à 4°C :

Le test de croissance détermine la croissance optimale des bactéries des *Pseudomonas spp.* Fluorescents.

Nous avonsensemencé le milieu de KB en boite avec des bactéries jeune deux répétitions pour chaque souche, nous avons incubé à 41 ± 2°C une moitié des boites, autre moitié à été laissé au réfrigérateur à 4 ± 2°C, pendant 48h.

6.2 Galerie API 20NE:

API 20NE (bio Mérieux SA) est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

Pour la réalisation de ce test, nous avons suivi le protocole et les institutions de bio Mérieux (Annexe 2).

Préparation de l'inoculum :

Sur un tube d'essai contenant 5 ml d'eau physiologie stérile, à l'aide d'une anse en platine, nous avons prélevé des colonies jeunes bien isolées sur un milieu gélosé (KB), ensuite homogénéisé soigneusement pour réaliser une suspension bactérienne.

Inoculation de la galerie :

Premièrement, à l'aide d'une seringue, nous avons réparti l'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite, les micro-tubes sont inoculés à partir d'une suspension bactérienne préparée. Pour les tests NO₃ jusqu'à PNPG, il faut remplir le tubes (et non les cupules).

Nous avons déposé 3ml de volume de milieu AUX Medium dans un tube et ajouté des gouttes de suspension précédente. Après l'homogénéiser, nous avons rempli les tubes et les cupules des tests GLU à PAC

Pour les tests : ADH, GLU, URE, il faut créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. A la fin, nous avons refermé les plaques et incubé à température 29 ± 2°C pendant 24 ± 2h.

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.

Pour appliquer le test de Galerie API 20NE, nous avons choisi au hasard 7 souches bactériennes de collection.

Tableau 04 : Tableau de lecture (API 20 NE) (bio Mérieux).

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

I. RESULTATS :

Le nombre total des bactéries viables dans la rhizosphère de deux plantes étudiées est de 27×10^4 chez *Artemisia herba-alba* et de 25×10^4 chez *Stipa tenacissima*.

Le taux de *Pseudomonas spp.* Fluorescents par rapport au nombre des bactéries total est de 66,67% chez *Artemisia herba-alba* et de 60% chez *Stipa tenacissima* (figure 12).

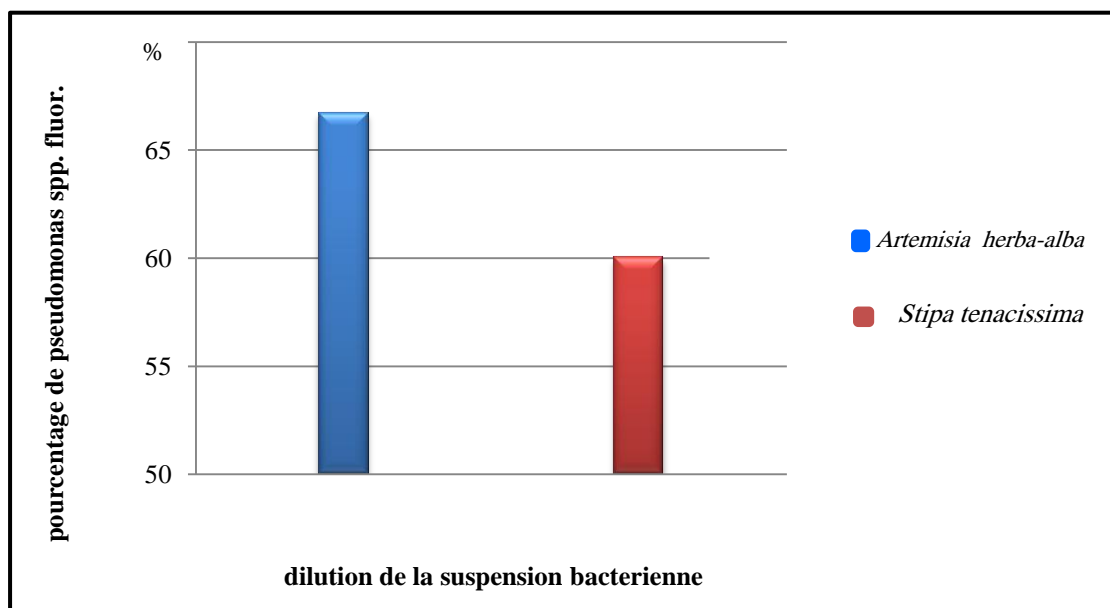


Figure 12 : Taux des *Pseudomonas spp.* Fluorescents chez les deux espèces végétales étudiées.

1. Caractérisation des *Pseudomonas spp.* Fluorescents :

Après l'isolement et la purification des souches bactériennes sur le milieu de KB, nous avons sélectionné 13 souches bactériennes fluorescentes et montré les caractères culturaux à l'œil nu sur le milieu de King B des colonies bactériennes de petite taille, circulaires, régulier, lisses et brillantes avec une pigmentation jaune à verte.

1.1. Test de Gram :

Après la coloration de Gram montre que toutes les souches sont des bacilles à Gram négatif (couleur rose).

Après le test de KOH nous avons obtenu une viscosité pour l'ensemble des souches étudiés qui confirme que les bactéries étudiées sont des Gram-.

1.2. Production de pigments fluorescents :

Sur le milieu de King B, nous avons observé une réaction positive par un Pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, (Avril et *al.*, 1992), la bactérie a produit la pyoverdine. Mais dans le milieu de King A, nous avons observé aucun changement de couleur (résultat négatif).

1.3. Croissance en anaérobiose :

Après l'incubation, nous n'avons pas remarqué aucun changement de couleur dans le tube, les bactéries étudiées sont des bactéries aérobies strictes non fermentatives.



Figure 13: Résultat de test Hugh et Leifson

1.4. Tests de LOPAT :

Les tests de LOPAT sont réalisés pour étudier les caractères biochimiques et bactériologiques des souches, dont les résultats de ces tests sont représentés dans le tableau (5).

1.4.1. Production Levane sucrase :

Nous avons observées des stries saillante et luisante pour les 10 souches étudiées, une Levane positif, indique une activité de fructose. Mais les trois autres souches, on

observe des stries non luisantes, aucune dégradation de fructose, c'est une réaction négatif (-).



Figure 14: Résultat de Levane sucrose.

1.4.2. Production d'oxydase :

L'apparition d'une coloration bleu violète sur les disques pour les 13 souches testées, qui montre des bactéries d'oxydase positive (+).

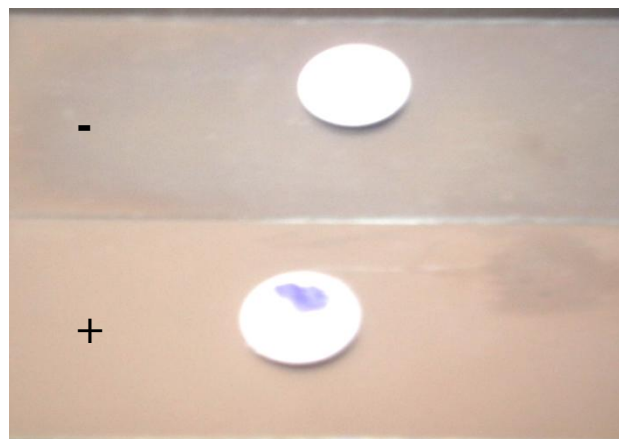


Figure 15: Résultat du test oxydase.

1.4.3. Test de Pectinase :

Après 14 jours d'incubation, nous n'avons pas remarqué aucun changement sur les tranches de la pomme de terre et aucune odeur, donc c'est un résultat négatif (-), les bactéries étudiées ne sont pas capable de la dégradation de pectine.

1.4.4. Test d'arginine déshydrolase :

Le résultat obtenu pour le test d'ADH a donné une réaction positive chez toutes les souches à tester (Tableau 5).



Réaction +

Figure 16: Résultat de l'Arginine

1.4.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac :

Après 24 heures, le test HR sur Tabac a donné un résultat négatif pour toutes les feuilles, nous n'avons pas observé de changement sur de l'aspect et la couleur de la zone foliaire inoculé.



Figure 17: Résultat d'hypersensibilité sur tabac.

Tableau 5 : Résultats tests de LOPAT.

Les souches	A11	A12	A13	A14	A2	A21	A22	A23	A24	S1	S2	S3	S4
Levane	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
HR sur Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : réaction négative ; + : réaction positive.

1.5. Production de catalase :

Toutes les souches que nous avons analysées sont des catalases positives, dont la présence de la catalase se matérialise par la production de bulles (dégagement d'oxygène).

1.6. Test Gélatinolyse :

Après 10 jours, le résultat obtenu par la gélatinolyse est déterminé de gélatine positive pour les tous souches étudiés (Tableau 6).

1.7. Croissance à 41°C et à 4°C :

Pour les 13 souches testées, nous avons remarqué une croissance bactérienne à +4°C, mais à la température +41°C, nous n'avons pas constaté développement de bactérien (Tableau 6).

A l'aide d'un logiciel d'identification (identification microbienne via les API–Microsoft Excel) on obtient les résultats donnés dans le tableau (8).

Tableau 8 : Résultats de Galerie API 20NE sur logiciel d'identification.

Les souches	Souche (taxon le plus probable)	Remarque	Indice de typicité	Probabilité
S4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	identification Excellent	1	99,90%
A23	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	identification Excellent	1	99,90%
A11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	identification Excellent	0,82	89,10%
A12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	bonne identification	0,36	87,70%
S1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	bonne identification	0,36	87,70%
A22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	bonne identification	0,26	82,70%
A24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon identification	-0,01	66,40%

2. Identification Taxonomique :

La classification intra spécifique peut être effectuée pour 7 souches (A11, A22, A24, A23, A12, S1, S4) par la lecture des tests NO₃, Arabinose sur la Galerie API 20NE et les deux clés A et B.

En se basant sur les réponses aux tests métaboliques figurants dans la clé A proposée par Jacques (1994), les 7 souches sont affiliées aux biovars suivants (Tableau 9) :

Pour les souches A11, A23 avec NO₃ -, Lev - et Gél +, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar V.

Pour les trois souches A22, A24, S4 avec NO₃ -, Lev + et ARA +, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar I.

En fin, pour les deux souches A12, S1 avec NO₃ +, Lev + et ARA +, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar IV.

Tableau 9 : Résultats d'identification des 7 souches de *Pseudomonas spp. Fluorescents* selon la clé A.

Les souches	A11	A12	A22	A23	A24	S1	S4	
LOPAT	Levane	-	+	+	-	+	+	
	Oxydase	+	+	+	+	+	+	
	Pectinase	-	-	-	-	-	-	
	Arginine	+	+	+	-	+	+	
	HR sur Tabac	-	-	-	-	-	-	
	King A	-	-	-	-	-	-	
	King B	+	++	++	+	++	+	
	Gélatine	+	+	+	+	+	+	
	T: 41°C	-	-	-	-	-	+	
	T: 4°C	+	+	+	+	+	+	
	NO ₃ [*]	-	+	-	-	-	+	
	ARA [*]	+	+	+	+	+	+	
	Biovars	V	IV	I	V	I	IV	I

* : sont existées dans les plaques API 20NE. + : positif, - : négatif, ++ : plus fluorescente.

Selon la proportion de Bossis, (1995) nous avons affiliées ces 7 souches (Tableau 10).

Pour les souches A11, A23 avec NO₃ -, Lev - et GéL +, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar V.

Pour les trois souches A22, A24, S4 avec NO₃ -, Lev + et ARA +, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar I.

En fin, pour les deux souches A12, S1 avec NO₃ +, Lev + et ARA +, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar IV ou biovar II.

Tableau 10 : Résultats d'identification des 7 souches de *Pseudomonas spp. Fluorescents* selon la clé B.

Les souches	A11	A12	A22	A23	A24	S1	S4	
LOPAT	Levane	-	+	+	-	+	+	
	Oxydase	+	+	+	+	+	+	
	Pectinase	-	-	-	-	-	-	
	Arginine	+	+	+	-	+	+	
	HR sur Tabac	-	-	-	-	-	-	
	King A	-	-	-	-	-	-	
	King B	+	++	++	+	++	+	
	Gélatine	+	+	+	+	+	+	
	T: 41°C	-	-	-	-	-	+	
	T: 4°C	+	+	+	+	+	+	
	NO ₃ [*]	-	+	-	-	-	+	
	ARA [*]	+	+	+	+	+	+	
	Biovars	V	II/IV	I	V	I	II/IV	I

* : sont existées dans les plaques API 20NE. + : positif, - : négatif, ++ : plus fluorescente.

II. DISCUSSION :

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressées à la flore bactérienne, précisément les *Pseudomonas spp.* Fluorescents qui colonisent à la rhizosphère de l'*Artemisia herba-alba* et *Stipa tenacissima*.

Après le dénombrement les *Pseudomonas spp.* Fluorescents, nous avons remarqué que le taux de *Pseudomonas spp.* Fluorescents au niveau du sol et de la rhizosphère entre les deux plantes étudiées *Artemisia herba-alba* et chez *Stipa tenacissima* varie respectivement entre 60% et 66,67%.

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas spp.* Fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat et Gardan, 1987). D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Sands et Rovira, 1971).

Les résultats obtenus ont encore souligné le rôle de la rhizosphère dans la sélection de microorganismes tellurique. Il a été suggéré que la plante influencerait la structure et l'activité des communautés microbiennes en favorisant les populations qui lui sont bénéfique (Lynch, 1987 ; Cook *et al.*, 1995).

Les méthodes de caractérisation bactériologiques décrites ont permis une identification préliminaire des souches des biovars. La sélection est basée sur la production de pigments fluorescents et les caractères macromorphologiques, sur le milieu de King B permet la constitution des 13 souches bactériennes.

La coloration de Gram et la fermentation du glucose ont été des caractères clés pour classer les familles des bacilles à gram négatif non fermentaires.

Pour les résultats de la coloration de Gram toutes les souches étudiées dans notre travail sont des bacilles à Gram négative.

D'après Ghafir (2007), Le genre *Pseudomonas* est constitué de bacilles Gram négatifs, droits ou légèrement incurvés, ayant une taille de 0,5 à 1,0 μm sur 1,5 à 5,0 μm , aérobies, oxydase positifs, non sporulés et généralement mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires.

Le test de Hugh et Leifson c'est un test qui précise l'aérobiose ou l'anaérobiose des bactéries. Dans notre travail, le résultat obtenu par ce test est négatif pour toutes les 13 souches, ce sont des souches aérobies strictes.

Les *Pseudomonas* fluorescents sont définis comme étant des microorganismes aérobies (Palleroni, 1984). Toutes les souches testées sont des catalases positives.

Le milieu de Hugh et Leifson est constitué par le bleu de prométhymol qui permet d'apprécier le type de dégradation du glucide (glucose) qui libère des acides et éventuellement des gaz.

L'ensemble des tests de LOPAT sont des tests de base pour l'identification des *Pseudomonas* spp. Fluorescents. Les tests biochimiques utilisés pour l'identification des souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents, peuvent être considérés comme indicateurs de l'aspect métabolique de ces bactéries, qui semble être un avantage pour leurs adaptation au sol et à la rhizosphère.

Selon Semal (1989), les tests de LOPAT permettent de distinguer, au sein du groupe, les espèces non pathogènes telles que *Pseudomonas* spp. Fluorescents et les espèces phytopathogènes.

La production de Levane sucrase extracellulaire est présente chez quelques biovars de *Pseudomonas fluorescens*, mais absente chez *Pseudomonas putida* (Jacques, 1994; Bossis, 1995). Le résultat de test de Levane dans ce travail est positif pour 10 souches et négatifs pour les trois autres souches. Cette enzyme catalyse la synthèse de Levane à partir du sucrose, mais catalyse aussi l'hydrolyse du Levane en monosaccharides (Hettwer *et al.*, 1995).

Nos souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents ont donné une réaction positive par rapport au test d'oxydase. Cela est dû au fait qu'elles possèdent un cytochrome oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire. Le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder Le tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, substrat qui prend une coloration bleue violète (Avril *et al.*, 1992).

Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents oxydase positive ont caractérisé, en fonction de pouvoir pectolytique sur tranches de pomme de terre d'une part et l'induction de la

réaction d'hypersensibilité sur plante de tabac d'autre part (Lelliot *et al.*, 1966; Lelliot et Stead, 1987; Cottyn *et al.*, 2009).

La HR est une réaction rapide de défense des plantes correspondant à une mort programmée des cellules aux sites d'invasion, qui bloque la progression du pathogène (Klement, 1982).

Toutes les souches ont répondu positivement au test d'arginine ce qui s'implique par leur capacité à dégrader l'arginine. Ce test constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. Ainsi que, l'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique. Ce caractère existe chez des *Pseudomonas* fluorescents saprophytes (Thornley, 1960). Donc, les *Pseudomonas* fluorescents sont des bactéries aérobiques (Avril *et al.*, 1992).

Le test de l'oxydase considéré comme caractère taxonomique permettant de discriminer aisément les *Pseudomonas* fluorescents (Palleroni *et al.*, 1984; Jacques, 1994; Bossis, 1995); ainsi que le test de l'arginine dihydrolase considéré comme déterminatif a été pratiqué sur toutes les souches (Jacques, 1994; Bossis, 1995). Les tests de l'hypersensibilité sur tabac (Klement, 1963), et le pectinase, qui provoquent respectivement une hypersensibilité et des nécroses ont permis de discriminer davantage les saprophytes des phytopathogènes (Cooksey *et al.*, 1990).

Selon Avril *et al.*, (1992), la pyocyanine a de plus une action bactériostatique sur certaines bactéries en particulier à Gram positif. Elle est mise en évidence dans le milieu King A à un pigment bleu. Le résultat négatif sur le milieu de King A montre que toutes les souches étudiées ne produisent pas la pyocyanine, elles ne sont pas des *Pseudomonas aeruginosa*.

La couleur jaune-vertes sur King B est obtenu chez toutes les souches, ces bactéries produisent la pyoverdine. La majorité des espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des sidérophores. Ces sidérophores jaunes-verts sont només pyoverdines (PVDs) (Budzikiewicz, 1993). Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes Fe³⁺- sidérophore bactériens (Becker et Cook, 1988; Loper, 1988; Bitter *et al.*, 1991).

L'identification taxonomique, est basée sur la caractérisation iso-électrophorétique des sidérophores et la détermination de la spécificité des pyoverdines pour les souches productrices. Ceci a permis la caractérisation des espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de pyoverdines spécifiques aux espèces (Meyer et al., 2002).

L'hydrolyse de la gélatine est une propriété présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P. putida* (Stanier et al., 1966). Selon les clés dichotomiques proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995), l'hydrolyse de la gélatine permet la distinction de *P. putida* des autres *Pseudomonas* spp. Fluorescents.

La réponse de nos souches est positive vis-à-vis du test gélatine, donc toutes les souches étudiées ne sont pas des *Pseudomonas putida*.

La croissance *Pseudomonas* spp. Fluorescents est possible entre 4°C et 41°C (Schaad et al., 1992). Ce test est utilisé pour éliminer le *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas chlororaphis*. Les *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas capable de croître à une température de 4°C (Avril et al., 1992). Cependant, *Pseudomonas chlororaphis* la seule capable de croître à une température supérieure à 41°C (Schaad et al., 2001).

En se basant sur les résultats de la Galerie API 20NE pour les sept souches testées sont identifiées comme étant des *Pseudomonas fluorescens*, avec des différentes probabilités, excellente identification chez les deux souches (S4 et A23) avec (99,90%) et pas bonne identification chez la souche (A24) avec (66,4%).

La classification spécifique et intra spécifique des souches bactériennes sélectionnées a été basée, essentiellement sur les tests physiologiques et biochimiques proposés dans les deux clés dichotomiques (A et B) et les résultats de la Galerie API 20NE après l'élimination des *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis* et *Pseudomonas putida*, nous nous sommes basés respectivement, sur les résultats du test King A, croissance à 41°C et à 4°C, test Arabinose et le test de gélatine.

Selon la clé A qui est proposée par Jacques (1994), les deux souches A11 et A23 sont rattachées au biovar V, les souches A22, A24, S4 sont affiliées au biovar I et les deux souches A12 et S1 sont rattachées au biovar IV.

Selon la clé B qui est proposée par Bossis (1995), les deux souches A11 et A23 sont rattachées au biovar V et les souches A22, A24, S4 sont affiliées au biovar I et les

deux souches A12 et S1 sont rattachées au biovar IV ou le biovar II, dans ce dernière cas, il faut réaliser le test L.tartrate pour différencier entre les deux biovars. Pour l'ensemble le test tréhalose est nécessaire pour plus de précision.

L'identification taxonomique a permis de constaté que la totalité des souches étudiées sont des *Pseudomonas. fluorescens*.

D'après cette analyse, nous remarquons que les cinq souches sont affilées au même biovar quelques soit les clés d'identification utilisées. Nous remarquons aussi qu'il y a différente biovar au sein de chaque biotope.

L'identification précise des souches bactériennes utilisées lors des études d'écologie est nécessaire. Les premiers travaux relatifs à la taxonomie de *Pseudomonas. fluorescens* étaient basés sur la caractérisation phénotypique des bactéries. Ces études ont abouti à la subdivision de *Pseudomonas. fluorescens* en 5 biovars.

La subdivision de cette espèce en biovars révèle les limites de l'identification basée sur des caractères phénotypiques. Des travaux complémentaires ont donc pris en compte certains caractères génotypiques tels que la variabilité de gènes conservés (ADNr) et l'ensemble du génome (hybridation ADN-ADN). L'ensemble des travaux conduits sur la taxonomie *Pseudomonas fluorescens* montre que la définition de cette espèce est obsolète et qu'elle devrait être divisée en plusieurs nomenclatures. La clarification de la taxonomie de *Pseudomonas fluorescens* requiert des recherches complémentaires qui associent des méthodes phénotypiques récentes, et génotypiques (Bossis, 2000).

conclusion

conclusion

La recherche des *Pseudomonas spp.* Fluorescents dans le sol rhizosphérique d'*Artemisia herba-alba* et *Stipa tenacissima* peut s'avérer utile pour chercher d'éventuelles antagonistes.

Nous avons constaté la dominance de *Pseudomonas spp.* Fluorescents avec un taux supérieur à 60% chez les deux espèces végétales.

Les tests physiologiques effectuées aux opérations, d'isolement et purification, ont permis d'isoler 13 isolats bactériens, présentant les caractères morphologiques des espèces de *Pseudomonas spp.* Fluorescents.

Les tests physiologiques et biochimiques appliqués sur les 13 isolats isolés, ont permis d'affilier tous ces isolats comme étant des espèces de *Pseudomonas spp.* Fluorescents.

L'utilisation de la galerie API 20NE rendre l'identification biochimique plus facile et rapide. Cette dernière, a été appliquée que pour 7 isolats bactériens.

Nous avons obtenu de *Pseudomonas fluorescens* sur les 7 plaques API 20NE utilisées, mais avec variable des probabilités.

Une combinaison entre la galerie classique et la galerie API 20NE est souvent souhaitée, pour récupérer le manque des tests les plus importantes (ex : test de dénitrification, tests des sucres) pour l'identification taxonomique les souches bactériennes par les deux clés dichotomiques (A et B).

L'identification taxonomique des 7 souches, selon les deux clés dichotomiques (A et B) nous a permis de constater les limites de l'identification basée sur la caractérisation phénotypiques. Selon les deux clés utilisées, nous n'avons constaté que tous les 7 étudiées de *Pseudomonas fluorescens* divisées sur les quatre biovars.

Les propriétés nutritionnelles n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique totale et précise.

Les résultats obtenus dans ce travail sont des résultats préliminaires. Nous suggérons d'utiliser les tests génétiques pour confirmer les caractères phénotypiques.

Nous proposons aussi de faire une étude plus étendue afin de déterminer la relation entre les micro-organismes rhisosphériques et les facteurs écologiques influençant la diversité de ces rhizobactéries (caractéristiques physico-chimiques du sol, l'humidité du sol).

Références bibliographie

Références bibliographie

Aidoud, A. 1989. Les écosystèmes steppiques pâturés d'Algérie : fonctionnement, évaluation et dynamique des ressources végétales. Thèse Doctorat : Université Hoauri Boumédiène. Alger, 250 p.

Aouadhi, S. 2010. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. A étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Mémoire Master : Faculté de médecine de Tunis. p. 1-12.

Avril, J.L., Dabernat. H., Denis, F., Monteil, H. 1992. Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. Paris : ISBN. 511p.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. et Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology, 57. 66-233 p.

Becker, J.O. et Cook, R.J., 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent *Pseudomonas*. *Phytopathol.* **78.** p. 778–782.

Bitter, W., Marugg, J.D., de Weger, L.A., Tommassen, J. and Weisbeek, M.P.J., 1991. The ferric-pseudobactin receptor PUPA of *Pseudomonas putida* WCS358 : homology to TonB-dependent *Escherchia coli* receptors and specificity of the protein. *Mol. Microbiol.* **5.** p. 647-655.

Bossis, E., 1995. Les *Pseudomonas* fluorescents de la rhizosphère : étude taxonomique et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée. Thèse de doctorat : Université de Nantes. France. 143p.

Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan. L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* : current status and need for revision. *Agronomie* 20^{ème} édition. p. 51-53.

Botelho, G. R. et Mendonça-Hagler, L. C., 2006. Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops - an overview. *Braz. J. Microbiol.* **37.** (4). p. 401- 416.

Budzikiewicz, H., 1993. Secondary metabolites from fluorescent *pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* **104.** p. 209–228.

Cardon, Z.J. et Gage, D.J. 2006. Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics. 37^{ème} édition. p. 459-488.

CHEHMA, A. 2006. Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 141p.

Chin-A-Woeng, T.F., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J., Bloemberg. G.V. 2002. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas spp.* strains. Mol. Plant Microbe Interact. 14^{ème} édition. P.1006-1015.

Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D.K., Mazzola, M., Bangera, G. et Kim, D.S., 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92.** p. 4197–4201.

Cooksey, D.A., H.R., Azad, Cha, J.S. and C.K. Lim. 1990. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* **56:** 431-435.

Cottyn, B., Heylen, K., Heyrman, J., Vanhouteghem, K., Pauwelyn, E., Bleyaert, P., Van Vaerenbergha, J., Hofte, M., De Vos, P. and Maes, M., 2009. *Pseudomonas cichorii* as the causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butterhead lettuce in Flanders. *Sys Appl Microbiol.* 32^{ème} édition. p. 211–225.

Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L. et Cook, J.C., 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **78.** p. 302-308.

Curel, E.A. et Truelove, B. 1986. The rhizosphere. Springer-Verlag, New York, Etats-Unis. 288 p.

Curtis, T.P., Sloan, W.T. et Scannell, J.W., 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99.** Pp. 10494-10499.

Davet, P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. 6^{ème} édition. Paris : INRA. 383 p.

Digat, B et Gardan, L., 1987. Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP*. 17^{ème} édition. p. 559-568.

Djigal, D. 2003. Interactions entre la communauté microbienne de sol (bactéries et champignons mycorrhisiens) et les nématodes bactérioses : effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse de doctorat : Université Cheikh Anta diop de Dakar. 166p.

Dommergues, Y. 1979. La fixation d'azote dans la rhizosphère des céréales à paille. ORSTOM : C.N.R.S. p. 3-7.

Dommergues, Y., Mangenot, F. 1970. Ecologie microbienne du sol. Paris : Masson. 76 p.

Duponnois, R. 1992. Les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco) par *Laccaria laccata* souche S 238. Thèse de Doctorat : Université de Nancy. 244 p.

Elhassan, G.A., Abdelgani, M.E., Osman, A.G., Mohamed, S.S. et Abdelgadir, B.S., 2010. Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan. *J. Nutrition*. 9^{ème} édition. p. 926-934.

Emberger, L. 1955. Une classification biogéographique des climats. *Rev. Tra. Tab. Géol. Fac. Sci. Montpellier*. 7^{ème} édition. p.1-43.

Euzéby, J.P. 2007. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J., O'Callaghan, M., O'Gara, F. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58^{ème} édition. P. 3873-3878.

Fitouri, D.S., Ben jeddi, F., Zribi, K., Rezgui, S et Mhamdi, R. 2012. Effet de l'inoculation par une souche osmotolérante de *Rhizobium sullae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique. *Journal of Applied Biosciences*. 51^{ème} édition: ISSN 1997. P. 3642- 3651.

Fitouri, S. D. 2011. Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du Nord (HEDYSARUM CORONARIUML) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat : Institut national agronomique de Tunisie. 145p.

Fuchs, J. 1999. Fertilité des sols : les produits biologiques : bien les connaître pour mieux les utiliser. Paris : Jean- Michel Herisse. 61p.

Gen., Tik. 2012. Le système racinaire : Partie 2 – Les micro-organismes et la rhizosphère. 24 Septembre 2012.

Germida, J. J., Siciliano, S. D., Freitas, J. R. et Seid., A. M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) FEMS Microbiol. Ecologie. 26^{ème} édition. P. 43- 50.

Ghafir, Y. 2008. Pertinence des indicateurs de contamination fécale pour surveiller et maîtriser la contamination par salmonella et campylobacter dans les filières belges de production de viande. Thèse de Doctorat : Université de Liège. 122p.

Ghafir, Y., Daube, G. 2007. Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale. Ann. Méd. Vét, 30/04/2007, vol. 151, P 79- 100.

Glick, B.R. 1995. The enchantement of plant growth by free-living bacteria. 4^{ème} édition. Can, J. P. 109-117.

Gratzfeld, J. 2004. Industries extractives dans les zones arides et semi-arides. 1^{er} éd. 2004- . UICN, Gland, Suisse et Cambridge, Royaume-Uni : GRATZFELD Joachim. UICN – Union Mondiale pour la Nature.

Haas, D., Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annul. Rev. Phytopathol. 41^{ème} édition. p.117-153.

Hellal, B., 1998. Diagnostic phytoécologique d'une nappe alfatière du Nord de la steppe occidentale d'Algérie. Séminaire national sur les zones arides : rétrospectives, enjeux et stratégie. CRSTRA. Adrar. 9p.

- Hettwer, U., Gross, M. et Rudolph, K., 1995.** Purification and Characterization of an Extracellular Levan sucrose from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 177(10). p. 2834–2839.
- Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B. et Yoder, J.I. 2003.** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*. 84^{ème} édition. p. 858-868.
- Höfte, M. et de Vos, P., 2006.** Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant-associated bacteria*. Part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Netherlands. p. 507-533.
- Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. et Read, D.J., 2001.** Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*. 411. p. 789-792.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994.** Genus *Pseudomonas*. In: Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (Eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins. p. 93-94.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. et Bohannon, B.J.M., 2003.** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* Ed 6. Pp. 613-622.
- Houerou, N., 1980.** L'impacte de l'homme et de ses animaux sur les forets méditerranéens. *Forêt méditerranéenne* II, I. p. 31-34.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Metraux, J.P. 2003.** Induced systemec resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact* Vol. 16, No.10. p. 851-858.
- Jacques, M. A., 1994.** Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllle de *Cichorium endivia* var. *latifolia* L. Thèse de doctorat : université de Paris-XI Orsay, 123 p.
- Kaci, A. 2007.** Contribution à l'étude hydrogéologique de la partie occidentale du Bassin versant du Chott Melghir. Thèse de Magister : Université Khmis Miliana. 275 p.

- Kadik, B., 1983.** Contribution à l'étude de pin d'Alep (*pinus halepensis* Mill.) en Algérie. Ecologie, dendrométrie, morphologie. Thèse doct. D'état, Faculté Aix-Marseille III. 318p.
- Keith, H., Oades, J.M., Martin, J.K. 1986.** Input of carbon to soil from wheat plants. 18^{ème} édition. Soil Biology et Biochemistry. p. 445-449.
- Kent, A.D., Triplett, E.W. 2002.** Microbial communities and their interactions in soil land rhizosphere ecosystems. Annual Review of Microbiology. 56^{ème} édition. p. 211-236.
- Kim, M. S., Kim, Y. C., Cho, B.H. 2004.** Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassicola*. Plant Biol. Mar-Apr;6(2). p.105-108.
- King, E.O, Ward, M.K., Raney, D.E. 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. 44^{ème} édition. J Clin Med. Pp 301–307.
- Klement, Z. 1990.** Methods in phytobacteriology. Ed. Printed in Hungary. 568p.
- Klement, Z., 1963.** Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic Pseudomonads. *Nature*, **199**: 299–300.
- Kowalchuk, G.A., et Stephen, J.R., 2001.** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55^{ème} édition. p. 485-529.
- Labadie, J.C., Dousset, X., Hebraud, M. 1996.** Les *Pseudomonas* et autres bactéries Gram -. Tome 1: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Paris. p. 209-220.
- Latour, X. and Lemanceau, P., 1997.** Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas spp.* *Agronomie*, 17^{ème} édition. p. 427–443.
- Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. et Read, D.J., 2004.** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82. p. 1016-1045.
- Lelliott, R.A. et Stead, D.E., 1987.** Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. In: T.F. Preece. Ed. Methods in Plant pathology. Vol 2: Blackwell. Oxford. UK, 212 p.
- Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., 1966.** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29^{ème} édition. p. 470–489.

Lemanceau, P. 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants : exemple of *fluorescent Pseudomonas* spp. Faculté Agronomie. 12^{ème} édition. p. 413-437.

Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J.M. et Alabouvette, C. 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum Usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**^{ème} édition. p. 1004-1012.

Lemanceau, P., Heulin, T., Stengel, P., Gelin, S. 1998. La rhizosphère dans "Sol : interface fragile". (Eds). INRA, Paris, France. P 93-106.

Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., Hochman, A. 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40^{ème} édition. p. 71-163.

Loper, J.E., 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathol.* **78**^{ème} édition. p.166–172.

Lynch, J.M., 1987. The rhizosphere. Chichester: Wiley Interscience. p. 35–57.

Marschner, P., Crowley, D. et Yang, C. H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil.* p.199–208.

Mazzola, M., Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M. and Pierson, L.S.III, 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**^{ème} édition. p.2616-2624.

Melzi, S., 1990. Evaluation du processus de la désertification dans une région présaharienne du sud Algérois. *Biocénoses* 5(1.2). p. 85-102.

Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. et Palleroni, N. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2745–2753.

Migula, W. 1894. Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1^{ère} édition. p. 235-238.

Morgan, J.A.W., Bending, G.D., White, P.J. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. 56^{ème} édition. Journal of Experimental Botany. p. 1729-1739.

Nedjraoui D., 2002. Evaluation des ressources pastorales des régions steppiques algériennes et définition des indicateurs de dégradation. Options Méditerranéennes,

Neilands, J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem.* p.26723-26726.

O.N.M (Office National de Météorologie), 2012- Données météorologique, Laghouat.

Ozenda, P.1958. Flore du Sahara septentrional et central. Paris : C.N.R.S. 486p.

Palleroni, N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore. USA. p. 141-171.

Palleroni, N.J., MOORE, E.R.B. 2004. Taxonomy of *Pseudomonads*: experimental approaches. Dans "*Pseudomonas*", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis. P 3-44.

Pierson, L.S., Pierson, E.A. 2000. Microbial gossiping: signaling. In the rhizosphere proceedings of 5th PGPR Workshop.

Rajaonarimamy, E. 2010. Influence de la diversité mycorhizienne sur la symbiose *Dalbergia trichocarpa* – *Rhizobia* et sur la structure de la microflore tellurique. Mémoire pour l'obtention de diplôme d'études approfondies en sciences de la vie option : Biotechnologie/microbiologie : Université d'Antananarivo. 60p.

Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., et Moëgne-Loccoz, Y. 2003. Phylogeny of HCN relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol Plant Microbe Interact*

Rillig, M.C. et Mummey, D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171. p. 41-53.

Saisie, A. 2013. Au pays des racines. Auditorum de la Société Nationale d'Horticulture. 1^{ère} éd. 2013-. Paris : Saisie A. Journée de conférences et d'échanges.

Sands , D.C. and Rovira, A.D., 1971. Fluorescent *Pseudomonads* a Residual Component in the Soil Microflora? *J. Appl. Microbiol.* p. 253–259.

Schaad, N.W., Jones, J.B et Chun, W. 2001. Initial identification of commun genera. In : SCHAAD, N.W. Ed. Lab. Guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd, Ed. St. Paul, M.N. APS Press. p. 1-15.

Semal, J., 1989. L'épidémiologie en pathologie végétale :Mycoses aérienne .11^{ème} édition. Lavoisier : Paris. 621p.

Smidi,M.L ;Vidarver ,A.K.1982.Bacteriocin Production by *Pseudomonas Syringae* in plant Tissue .Can .J.Microbiol.28^{ème} édition. p. 600-604.

Stamboul, M. 2004. Contribution à l'étude hydrogéologique de l'Atlas Saharien, l'exemple de Djebel Amour. Thèse de Doctorat : Université d'Oran.329 p.

Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. et Doudoroff, M. 1966. The aerobic *pseudomonads*, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43^{ème} édition. p. 159-271

Stevans, A.M., Dolan, K.M. and Grecnberg, E.P. 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the fax promoter region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* p. 12619-12623.

Strullu, D. G. 1991. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivees. 3^{ème} édition. Lavoisier: Paris. 250p.

Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology. 40^{ème} édition. p. 309-348.

Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 23^{ème} édition. p. 37-52.

Valencia, H. 2008. Etude des bases moléculaires de l'agrégation des sols par des exopolysaccharides bactériens. Thèse de doctorat : Université Joseph Fourier de Grenoble 1^{ère} édition. 196 p.

Van loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 119^{ème} édition. P. 243-254.

Viollet, A. 2010. Influence du système de sécrétion de type III bactéries dans les interactions plantes- *Pseudomonas* spp. Fluorescents non pathogènes. Thèse de doctorat : Université de Bourgogne. 171p.

Annexes

Annexes

ANNEXE 1 : compositions les milieux de culture :

1. LPGA

Extrait de levure	5g
Bactopeptone	5g
Glucose	10g
Agar bactériologique	18g
Eau distillée	1L

3. King B

Peptone	20g
Glycérol	15L
K ₂ HPO ₄	1,5g
MgSO ₄	1,5g
Agar	20g
Eau distillée	1L

5. LEVANE

Extrait de levure	20g
Bactopeptone	15g
NaCl	1,5g
Saccharose	1,5g
Agar bactériologique	15g
Eau distillée	1L

7. Hugh et Leifson

Bactopeptone	2g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Bleu de promothymol	1%: 3ml
Glucose	10g
Agar	3g
Eau distillée	1L

2. Gélose Nutritif (GN)

Peptone	10g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Agar	18g
Eau distillée	1L

4. King A

Peptone	20g
Glycérol	10L
Chlorure de magnésium	1,4g
Sulfate de potassium	10g
Agar (gélose)	13,6g
Eau distillée	1L

6. ARGIKINE

Bactopeptone	1g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Agar bactériologique	3g
Rouge de phénol	Solution 0,1%:10ml
Arginine	10g
Eau distillée	1L

8. Gélatine Gélatinase

Bactopeptone	5g
Extrait de levure	3g
Gélatine	12g
Eau distillée	1L

ANNEXE 2 : protocole des plaques API20NE.

ANNEXE 3 : fiches de la lecture les plaques API20NE.

Tableau 6 : le résultat global des tests appliqués sur les souches étudiés.

Les souches	A11	A12	A13	A14	A2	A21	A22	A23	A24	S1	S2	S3	S4
Coloration de Gram	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-
KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HL	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LOPAT {	Levane	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
	Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pectinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Arginine	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	HR sur Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
King A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
King B	+	++	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	++
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T: 41°C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
T: 4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

G- : Gram négatif, HL : Hugh et Leifson, HR : hypersensibilité, T : température, + : réaction positive, - : réaction négative, ++ : Très fluorescents.

Tableau 7: Résultat de test de Galerie API 20NE.

Les souches	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNA	MAN	MAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
A11	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
A12	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
A22	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
A23	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
A24	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
S1	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
S4	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+