

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Amar Telidji – Laghouat
Faculté des Sciences
Département des Sciences Agronomiques



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Option : Protection des végétaux

Présenté par :
ZIGHAT Rabia

Thème

Etude de l'effet antagoniste des rhizobactéries
associées aux plantes médicinales vis-à-vis de
certains agents phytopathogènes

Soutenance prévue le 30/06/2025, devant le jury :

AMARA Yacine	MCA	Univ. Laghouat	Président
HATTAB Sihem	MCB	Univ. Laghouat	Examinatrice
MEKHALDI Delel	MCB	Univ. Laghouat	Promotrice
AITIALEFF Khouloud	MCB	Univ. Laghouat	Co-promotrice

Année universitaire

2024/2025

Remerciements

Merci à Dieu, Seigneur du Trône de l'univers, de m'avoir éclairée le chemin tout au long de ma vie et de m'avoir aidée dans mes recherches. C'est grâce à Lui que je peux aujourd'hui présenter ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite et à l'aboutissement de ce mémoire.

Mes remerciements les plus vifs et les plus sincères vont à ma promotrice, MEKHALDI D. pour son encadrement judicieux, sa disponibilité, ses précieux conseils et ses encouragements constants tout au long de ce travail. Je la remercie également de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude. J'ai réellement eu beaucoup de chance de l'avoir comme encadrante.

Mes remerciements sont aussi adressés aux membres de jury : M^r AMARA Y. pour l'honneur qu'il m'a fait pour présider de jury, et M^{me} HATTAB S. pour avoir acceptée d'examiner mon travail.

Je tiens aussi à remercier vivement M^{me} AMEUR pour son aide précieux et ses conseils avisés dans le travail de laboratoire.

Je remercie également mes collègues de master pour leur solidarité et leur enthousiasme, sans oublier les membres du laboratoire du Département des Sciences agronomiques pour leur accueil et leur soutien.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A mes chers parents pour leur soutien, leur aide, et leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance, Ma gratitude et tout mon amour.

A mes chers frères vous m'avez toujours manifesté une grande affection et un grand respect, à mon tour de vous exprimer mon grand estime à travers ce Travail

A toute ma famille et à toutes mes amies

A toute la promotion de protection des végétaux (2024/2025).

Résumé

Etude de l'effet antagoniste des rhizobactéries associées aux plantes médicinales vis-à-vis de certains agents phytopathogènes

Notre étude a pour objectif d'évaluer le pouvoir antagoniste des rhizobactéries associées au romarin (*Rosmarinus officinalis*) et au thym (*Thymus vulgaris*) à l'encontre de souches fongiques phytopathogènes. L'isolement des bactéries a été effectué à partir du sol rhizosphérique des deux plantes médicinales. Nous avons sélectionné 8 isolats pour chacune des deux plantes, en se basant sur leurs caractéristiques culturales. Ces isolats ont ensuite été classés selon leur type de Gram, leur capacité sporulante évaluée par la coloration au vert de malachite, ainsi que sur la base des résultats obtenus au test KOH. Afin d'identifier et de caractériser d'avantage les isolats, plusieurs tests biochimiques ont été effectués. Le test de l'oxydase a révélé que la majorité des isolats rhizobactériens présentent une activité oxydasique positive, tandis que cinq isolats se sont avérés négatifs. Le test mannitol-mobilité a montré que huit isolats rhizobactériens (R2, R3, R5, R6, T4, T5, T6) sont capables de fermenter le mannitol, tandis que quatre isolats (R2, R4, T3, T4) ont démontré une mobilité dans le milieu. Concernant le test d'utilisation du citrate, seuls quatre isolats (R2, R3, T4, T5) ont donné un résultat positif. La confrontation directe *in vitro* avec les deux souches phytopathogènes *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii* et *F. culmorum*, réalisée sur les milieux LPGA et PDA, a permis de mettre en évidence un fort pouvoir antagoniste chez les isolats R2, R3, R4, R7, T1, T2, T3 et T6. Ces derniers ont significativement inhibé la croissance mycélienne des agents fongiques, avec des taux d'inhibition dépassant 70%, témoignant de leur potentiel antifongique élevé. Ces isolats présentent un fort potentiel pour une utilisation future en tant qu'agents de lutte biologique contre les maladies fongiques des plantes.

Mots clés : Rhizobactéries, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, antagonisme, phytopathogène.

Abstract

Study of the Antagonistic Effect of Rhizobacteria Associated with Medicinal Plants Against Certain Phytopathogenic Agents

The objective of this study was to evaluate the antagonistic potential of rhizobacteria associated with rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*) against phytopathogenic fungal strains. Bacteria were isolated from the rhizospheric soil of both medicinal plants. Eight isolates were selected from each plant based on their cultural characteristics. These isolates were then classified according to their Gram type, sporulation capacity (evaluated using malachite green staining), and KOH test results. In order to further identify and characterize the isolates, several biochemical tests were performed. The oxidase test revealed that the majority of rhizobacterial isolates exhibited positive oxidase activity, while five isolates tested negative. The mannitol-motility test showed that eight isolates (R2, R3, R5, R6, T4, T5 and T6) were capable of fermenting mannitol, and four isolates (R2, R4, T3, T4) demonstrated motility. Regarding citrate utilization, only four isolates (R2, R3, T4 and T5) tested positive. Direct *in vitro* confrontation with two phytopathogenic strains, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* and *F. culmorum*, conducted on LPGA and PDA media, revealed a strong antagonistic effect by isolates R2, R3, R4, R7, T1, T2, T3 and T6. These isolates significantly inhibited the mycelial growth of the fungal pathogens, with inhibition rates exceeding 70%, indicating their high antifungal potential. These findings suggest that the selected isolates hold strong potential for future use as biological control agents against plant fungal diseases.

Keywords: Rhizobacteria, rosemary, thyme, antagonism, phytopathogen.

دراسة تأثير التضاد الحيوي للبكتيريا الجذرية المرتبطة بالنباتات الطبية ضد بعض العوامل الممرضة النباتية

تهدف دراستنا إلى تقييم القدرة المضادة للعوامل الممرضة الفطرية للبكتيريا الجذرية المرتبطة بنباتي إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) والزعتر (*Thymus vulgaris*). تم عزل البكتيريا من تربة الجذور لكلا النباتين الطبيين. قمنا باختبار 8 عزلات بكتيرية من كل نبات بناءً على خصائصها المورفولوجية الظاهرية. تم تصنيف هذه العزلات لاحقاً وفقاً لنوع صبغة غرام، وقدرتها على تكوين الأبواغ من خلال التلوين بأخضر المالاكيت، بالإضافة إلى نتائج اختبار KOH. ولتحديد خصائص هذه العزلات بشكل أدق، أجريت عدة اختبارات بيوكيميائية. أظهر اختبار الأوكسيداز أن غالبية العزلات كانت إيجابية، بينما كانت خمس عزلات سالبة. أما اختبار المانيتول والحركية، فقد أظهر أن 8 عزلات (R2، R3، R5، R6، T4، T5، T6) قادرة على تخمير المانيتول، و4 عزلات (R2، R4، T3، T4) أظهرت حركة في الوسط الزرع. فيما يخص اختبار استخدام السيترات، فقد كانت 4 عزلات فقط (R2، R3، T4، T5) إيجابية. أظهرت المواجهة المباشرة في المختبر مع السلالتين الفطريتين الممرضتين *Fusarium oxysporum* f. sp. *psii* و *F. culmorum*، على أوساط الزرع LPGA و PDA، قدرة تضاد حيوي قوي للعزلات R2، R3، R4، R7، T1، T2، T3 و T6، حيث سجلت معدلات تثبيط لنمو الفطريات تجاوزت 70%. تشير هذه النتائج إلى الإمكانية العالية لهذه العزلات في استخدامها مستقبلاً كعوامل مكافحة بيولوجية ضد الأمراض الفطرية التي تصيب النباتات.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الجذرية، إكليل الجبل، الزعتر، التضاد الحيوي، مسببات الأمراض النباتية.

Liste des abréviations

AIA	Acide indole acétique
AIA	Acide indole acétique (auxine)
CK	Cytokinines
Fop	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>
G	Grossissement
GA	Acide gibbérellique (gibbérelline)
HCN	Cyanure d'hydrogène
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i>
LPGA	Levure Peptone Glucose Agar (milieu de culture)
N₂	Azote atmosphérique
NH₃	Ammoniac
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (milieu de culture)
PGPR	<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>
SA	Acide salicylique
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i>

Liste des figures

Figure 1. Les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère.....	5
Figure 2. Mécanismes d'action des PGPR.....	7
Figure 3. Le romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	13
Figure 4. Morphologie du thym (<i>Thymus vulgaris</i>)	15
Figure 5. Préparation des suspensions-dilutions à partir de la solution mère du sol	18
Figure 6. Test d'antagonisme in vitro des isolats bactériens obtenus vis-à-vis des souches pathogènes fongiques.....	23
Figure 7. Résultats de l'isolement à partir du sol rhizosphérique des deux plantes médicinales après une semaine d'incubation.....	25
Figure 8. Aspect cultural de quelques isolats purifiés	26
Figure 9. Observation microscopique des frottis après la coloration de Gram des isolats....	27
Figure 10. Observation microscopique des frottis après la coloration au vert de malachite des isolats rhizobactériens (G×1000).....	28
Figure 11. Lecture Des résultats du test mannitol-mobilité	29
Figure 12. Lecture des résultats du test d'utilisation de citrate	30
Figure 13. Lecture du résultat du test d'oxydase	30
Figure 14. Résultat positif du test KOH.....	31
Figure 15. Résultat du test de la mise en évidence de fluorescence sur King B	32
Figure 16. Résultats de la confrontation directe de quelques isolats rhizobactériens vis-à-vis de la souche de <i>Fusarium culmorum</i> sur le milieu PDA	33
Figure 17. Résultats de la confrontation directe de quelques isolats rhizobactériens vis-à-vis de la souche de <i>Fusarium culmorum</i> sur le milieu LPGA	34
Figure 18. Taux d'inhibition enregistrés par les isolats rhizosphériques vis-à-vis de la souche phytopathogène de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lisi</i>	35

Figure 19. Taux d'inhibition enregistrés par les isolats rhizosphériques vis-à-vis de la souche phytopathogène de *Fusarium culmorum*36

Liste des tableaux

Tableau 1. Description macroscopique des isolats rhizobactériens associés au romarin	26
Tableau 2. Description macroscopique des isolats rhizobactériens associés au thym	27
Tableau 3. Type de Gram et capacité sporogène des isolats rhizobactériens obtenus	28
Tableau 4. Résultats des tests biochimiques sur les isolats rizophobactériens obtenus	31
Tableau 5. Comparaison des résultats du test KOH avec les résultats de la coloration de Gram	32

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures et tableaux	
Introduction.....	1

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. La rhizosphère	4
1.1.Définition.....	4
1.2.Interaction plante-bactéries	4
2. Les rhizobactéries.....	5
2.1. Définition des PGPR	5
2.2. Le rôle des rhizobactéries dans la sante des plantes.....	6
2.3. Mode d'action des PGPR	6
2.3.1. Mécanismes directs.....	7
2.3.1.1. Fixation d'azote	7
2.3.1.2. Solubilisation du phosphate.....	8
2.3.1.3. Solubilisation du potassium.....	8
2.3.1.4. Production des phytohormones.....	8
a. Acide indole acétique (AIA).....	9
b. Production de cytokinines	9
c. Production de gibbérellines	10
2.3.1.5. Production de sidérophores.....	10
2.3.2. Mécanismes indirects	10
2.3.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments	10
2.3.2.2. L'antibiose	11
2.3.2.3. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	11

2.3.2.4. Résistance systémique induite (ISR).....	11
3. Les plantes médicinales	12
3.1. Définition.....	12
3.2. Le romarin	12
3.2.1. Systématique de l'espèce.....	14
3.3. Le thym.....	14
3.3.1. Systématique de l'espèce.....	15

Chapitre 2. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal et échantillonnage	17
2. Souches phytopathogènes utilisées	17
3. Isolement des bactéries rhizosphériques	18
3.1. Préparation de la solution mère	18
3.2. Préparation des suspensions-dilutions.....	18
3.3. Ensemencement et incubation	18
3.4. Purification des isolats obtenus	19
4. Identification des isolats rhizobactériens.....	19
4.1. Description macroscopique	19
4.2. Etude microscopique	19
4.2.1. Coloration de Gram	19
4.2.2. Coloration au vert de malachite.....	20
4.3. Identification biochimique et métabolique	21
4.3.1. Test mannitol-mobilité.....	21
4.3.2. Test de citrate	21
4.3.3. Test de KOH.....	21
4.3.4. Recherche de l'oxydase.....	21
4.4. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B	21
5. Recherche de l'activité antagoniste in vitro des isolats rhizobactériens	22

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. Isolement des rhizobactéries	25
2. Identification des isolats rhizobactériens.....	25
2.1. Description macroscopique	25
2.2. Étude microscopique	27
2.2.1. Coloration de Gram	27
2.2.2. Coloration au vert de malachite.....	28

2.3. Identification biochimique et métabolique.....	29
2.3.1. Test de mannitol-mobilité.....	29
2.3.2. Test de citrate	29
2.3.3. Test d'oxydase.....	30
2.3.4. Test de KOH.....	31
2.4. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B.....	32
3. Recherche de l'activité antagoniste in vitro des isolats rhizobactériens	33
4. Discussion générale.....	36
Conclusion	40
Références bibliographiques.....	42
Annexes	

Introduction

Introduction

Les plantes peuvent être attaquées par différents types de microorganismes phytopathogènes, tels que des champignons, des bactéries, des virus et des viroïdes, provoquant des pertes économiques significatives (Bonnemain et Chollet, 2003). Pour faire face à ce fléau, la lutte biologique est perçue comme une alternative aux produits chimiques, qui présentent des risques pour l'environnement et la santé humaine. L'emploi de divers mécanismes d'action par un même agent antagoniste, ainsi que sa capacité à s'adapter à la rhizosphère, font de la lutte biologique une méthode plus durable que l'utilisation de pesticides chimiques (Aouar *et al.*, 2019).

En réponse aux préoccupations actuelles du public sur les effets secondaires des produits agrochimiques, il est donc essentiel de recourir à des agents biologiques reconnus à l'échelle mondiale. L'adoption de rhizobactéries promouvant la croissance des plantes (PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) représente une solution plus efficace pour traiter ce problème. Ces bactéries jouent un rôle clé dans l'amélioration de la fertilité des sols, le soutien à la croissance des plantes et la lutte contre les maladies végétales, favorisant ainsi une agriculture durable et écologique (Gupta *et al.*, 2015).

Les microorganismes capables de se développer dans la rhizosphère sont d'excellents candidats pour la lutte biologique, car cette zone représente la première défense des racines contre les agents pathogènes. Ces derniers doivent faire face à l'antagonisme des microorganismes de la rhizosphère tant avant que pendant l'infection initiale, ainsi que lors de la propagation secondaire sur les racines. Dans certains sols qualifiés de microbiologiquement suppressifs pour les agents pathogènes, l'antagonisme microbien revêt une importance particulière, permettant un contrôle significatif des maladies (Weller, 1988).

De nombreuses études ont montré que les plantes médicinales interagissent avec divers microorganismes de la rhizosphère, tels que les microorganismes libres et symbiotiques. L'inoculation de ces derniers peut améliorer la croissance des plantes médicinales, ainsi que d'autres plantes, l'absorption des nutriments et la teneur en composés médicinaux (Solaiman et Anawar, 2015). Dans cette optique, notre travail a pour objectif principal d'étudier l'éventuel pouvoir antagoniste des rhizobactéries associés au romarin (*Rosmarinus officinalis*) et au thym

(*Thymus vulgaris*), face à certains champignons phytopathogènes. L'expérimentation est effectuée en enchainant trois principales parties :

- La première est dédiée à l'isolement des rhizobactéries associées au romarin et au thym.
- La deuxième est consacrée à l'identification préliminaire des isolats obtenus.
- La troisième porte sur l'évaluation de l'effet antagoniste des isolats face à certains champignons phytopathogènes.

Chapitre 1.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. La rhizosphère

1.1. Définition

Bien que la rhizosphère souvent conceptualisée comme une fine couche de sol entourant les racines, elle est en réalité un système dynamique de processus interactifs. Hiltner fut le premier à définir la rhizosphère comme la zone du sol influencée par l'activité des racines des plantes (York *et al.*, 2016).

La rhizosphère est la zone du sol qui est affectée par les racines des plantes grâce à la libération d'exsudats, de mucilage et de cellules mortes. Les exsudats racinaires contiennent une variété de composés, principalement des acides organiques et des sucres, mais aussi des acides aminés, des acides gras, des vitamines, des facteurs de croissance, des hormones et des composés antimicrobiens (Turner *et al.*, 2013).

La zone racinaire peut être définie aussi comme la zone étroite du sol qui entoure et est affectée par les racines des plantes. Elle est riche en nutriments par rapport aux sols meubles et présente donc des activités biologiques et chimiques intenses. Une large gamme de microorganismes et de macroorganismes, notamment des bactéries, des champignons, des virus, des protozoaires, des algues, des nématodes et des microarthropodes, coexistent dans la rhizosphère et présentent diverses interactions entre eux et avec la plante. Les bactéries bénéfiques qui vivent dans la zone racinaire des plantes et les affectent positivement sont appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Prashar *et al.*, 2014).

1.2. Interaction plante-bactéries

La rhizosphère, influencée par les racines, est essentielle aux microbes bénéfiques. Le microbiome rhizosphérique, très diversifié, comprend des microbes "bons" favorisant la croissance, l'absorption des nutriments, la lutte contre les pathogènes et la tolérance au stress. Cependant, il y a aussi des microbes "mauvais" causant des maladies et affectant la productivité. De plus, certains microbes peuvent envahir le corps humain, devenant des agents pathogènes opportunistes (Ali *et al.*, 2017).

Il y a un lien fort entre les microorganismes du sol, les végétaux et la région des racines. Le renforcement de cette relation est lié à la libération d'exsudats racinaires par les plantes. Une multitude de microorganismes, qui dépendent de ces exsudats, crée des interactions variées, allant du soutien à la croissance jusqu'à des comportements parasites (Figure 1) (Mushtaq, 2021).

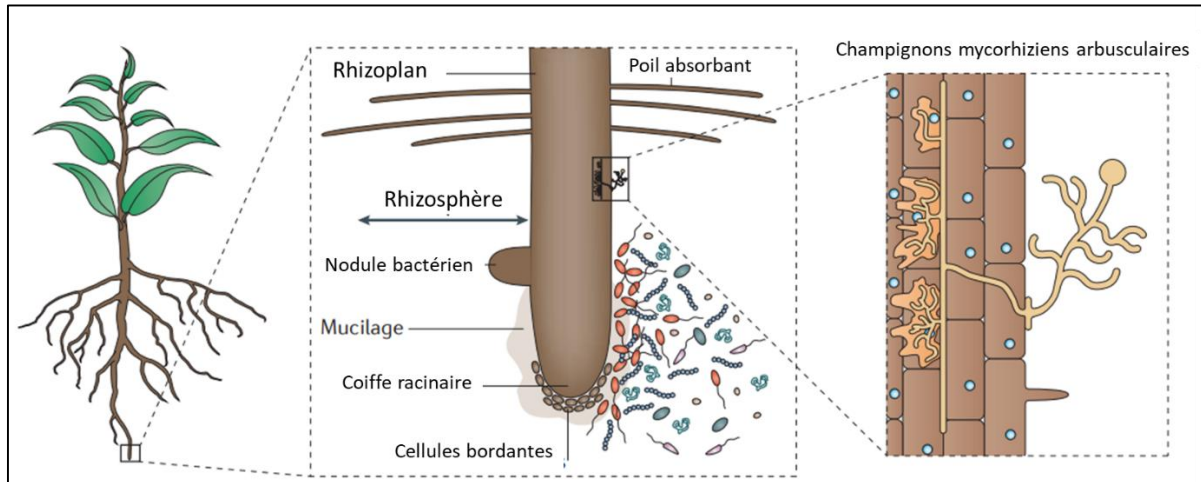


Figure 1. Les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Philippot *et al.*, 2013).

De nombreuses interactions se déroulent entre les bactéries elles-mêmes et aussi entre celles-ci et d'autres microorganismes, notamment à travers la compétition, l'antibiose, le parasitisme et la prédation. Des interactions variées se forment également entre les bactéries et les racines des plantes, pouvant être bénéfiques pour celles-ci. Alors que l'antagonisme implique principalement des mécanismes que les rhizobactéries utilisent également pour concurrencer d'autres microorganismes dans l'environnement racinaire, les interactions avec les racines des plantes peuvent déclencher une résistance systémique induite qui renforce la capacité de défense de la plante contre les attaques ultérieures des pathogènes (Van Loon et Bakker, 2003).

2. Les rhizobactéries

2.1. Définition des PGPR

Les rhizobactéries constituent un groupe de flore microbienne naturelle du sol, qui s'installe dans la rhizosphère et à la surface des racines des plantes, a un effet bénéfique sur le bien-être général de la plante (Goswami *et al.*, 2016).

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), un groupe de bactéries associées aux racines, interagissent étroitement avec les racines des plantes et influencent ainsi

leur santé et la fertilité du sol. Elles offrent une excellente combinaison de caractéristiques utiles pour la lutte contre les maladies et la promotion de la croissance des plantes. Les PGPR ont été initialement définies par Kloepper et Schroth (1978) comme les bactéries du sol qui colonisent les racines des plantes (Dorjey *et al.*, 2017).

Les PGPR sont un important groupe de bactéries bénéfiques colonisant les racines, qui prospèrent dans la rhizosphère végétale et le sol. Elles présentent des interactions synergétiques et antagonistes avec le microbiote du sol et participent à un ensemble d'activités d'importance écologique. Elles favorisent la croissance des plantes en facilitant la tolérance aux stress biotiques et abiotiques et en soutenant la nutrition des plantes hôtes (Basu *et al.*, 2021).

2.2. Le rôle des rhizobactéries dans la sante des plantes

Les rhizobactéries encouragent et favorisent la croissance des plantes. De plus, elles jouent un rôle antagoniste en tant qu'agents de lutte biologique. Les rhizobactéries soutiennent directement la croissance des plantes en fixant l'azote de l'air, en rendant le phosphate insoluble accessible et en sécrétant des hormones telles que l'AIA, les cytokinines et les gibbérellines (GA). Indirectement, elles favorisent également la croissance des plantes en induisant une résistance systémique, en produisant des sidérophores, des antibiotiques et des enzymes lytiques, en synthétisant du cyanure d'hydrogène (HCN) et en régulant les conditions de stress (Rehman *et al.*, 2020).

Les plantes peuvent mobiliser les bactéries les plus adaptées pour soutenir leur croissance en fonction du stress environnemental. Ces PGPR peuvent faciliter la croissance et le développement des plantes, avec plusieurs effets bénéfiques, d'autant plus évidents lorsque les plantes sont cultivées dans des conditions environnementales critiques, comme la présence de contaminants toxiques. Par exemple, les PGPR peuvent atténuer la phytotoxicité des métaux en modifiant leur biodisponibilité dans le sol et en augmentant leur translocation au sein de la plante (Vocciante *et al.*, 2022).

2.3. Mode d'action des PGPR

Les rhizobactéries capables de stimuler la croissance des plantes directement et indirectement et possèdent plusieurs mécanismes complexes qui interagissent entre elles pour établir des relations bénéfiques, notamment avec les racines des plantes cibles. L'étude et la compréhension des PGPR ont fait l'objet d'une grande importance dans de nombreuses études à l'échelle mondiale (Camelo *et al.*, 2011).

Ces mécanismes d'action se divisent en deux catégories : direct et indirect (Figure 2). Les mécanismes directs sont ceux qui favorisent la croissance des plantes de manière immédiate, que ce soit par l'apport de nutriments ou la production de régulateurs de croissance. À l'inverse, les mécanismes indirects la protègent les plantes contre les infections (stress biotique) ou les aident à se développer en bonne santé en cas de stress environnemental (stress abiotique) (Goswami *et al.*, 2016).

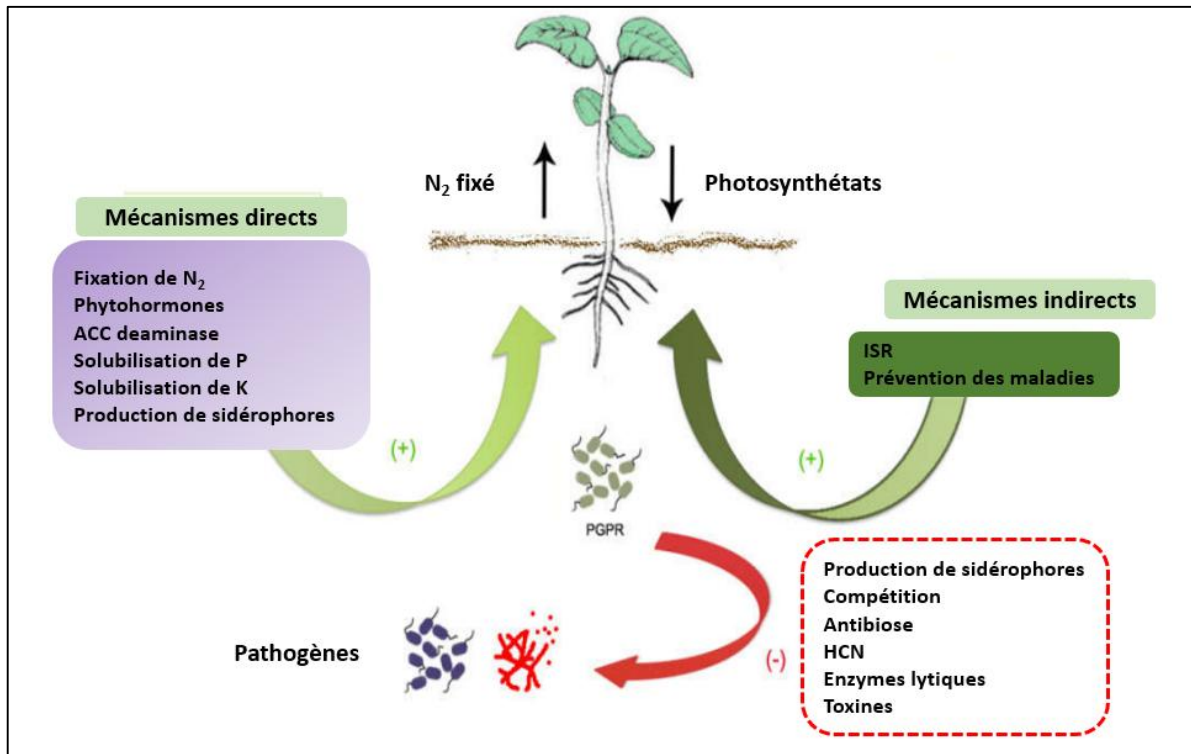


Figure 2. Mécanismes d'action des PGPR (Nazir *et al.*, 2018).

2.3.1. Mécanismes directs

2.3.1.1. fixation d'azote

L'azote constitue 78 % de l'atmosphère terrestre, ce qui en fait l'élément le plus présent. Bien qu'il soit en grande quantité, il existe principalement sous la forme de N_2 , un gaz diatomique relativement inerte et peu réactif (Pedraza, 2008).

Dans le monde végétal, il est crucial pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines, les deux polymères essentiels à la vie. Cependant, la majorité des plantes ne peuvent pas utiliser l'azote sous cette forme N_2 . Seules les formes d'azote fixées inorganique, comme l'ammoniac (NH_3) ou les ions nitrates (NO_3^-), sont adéquates pour leur utilisation. En conséquence, l'azote constitue un facteur limitant pour la productivité et la croissance des légumineuses (Miloud, 2018). Certaines espèces de *Bacillus* font partie des PGPR capables de fixer l'azote grâce à la

nitrogénase, qui catalyse la conversion enzymatique de l'azote atmosphérique en ammoniac (NH_3) (Pedraza, 2008).

2.3.1.2. Solubilisation du phosphate

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus crucial pour la croissance des plantes. De nombreux sols agricoles à travers le monde manquent de phosphore, ce qui nécessite des apports pour satisfaire les besoins des cultures. Il est essentiel de continuer à améliorer la fertilité des sols afin d'accroître les rendements et la productivité agricole. Lorsqu'on utilise des engrais phosphatés, il est rare que les plantes absorbent le phosphore dissous, car celui-ci précipite et devient donc indisponible. Les bactéries présentes dans la rhizosphère, y compris les PGPR, prennent de l'importance en raison de leur potentiel à améliorer la fertilité des sols et à augmenter le rendement des cultures ainsi que leur teneur en nutriments. Ces bactéries transforment le phosphore insoluble en formes solubles lors de l'application d'engrais phosphatés, rendant ainsi le phosphore accessible aux plantes (Ofdo *et al.*, 2016).

2.3.1.3. Solubilisation du potassium

Le potassium (K) est le troisième macronutriment crucial pour la croissance végétale. Les niveaux de potassium soluble dans le sol sont généralement très bas, et plus de 90 % du potassium présent se trouve sous forme de roches insolubles et de minéraux silicatés. Des études ont montré que les bactéries de la rhizosphère peuvent dissoudre le potassium contenu dans ces minéraux insolubles (Singh et Sindhu, 2013).

La majorité de ce potassium ne peut pas être absorbée par les plantes. On sait que les bactéries solubilisatrices du potassium peuvent solubiliser les minéraux contenant du potassium et convertir le potassium insoluble en formes solubles de potassium assimilables par les plantes. L'application d'engrais chimiques a un impact négatif considérable sur la durabilité environnementale. En revanche, la gestion d'engrais biologiques contenant des rhizobactéries peuvent constituer une alternative efficace aux engrais chimiques (Etesami *et al.*, 2017).

2.3.1.4. Production des phytohormones

Les phytohormones, de petites molécules, jouent un rôle essentiel dans la régulation de la croissance et du développement des plantes, en plus de leur aptitude à résister au stress, ce qui contribue à leur survie et à leur adaptation à divers milieux. Afin de gérer des défis tels que la salinité, les températures extrêmes et le stress osmotique, les plantes mobilisent leur génétique ainsi que divers mécanismes d'adaptation biologique pour survivre et maintenir une production optimale (Fahad *et al.*, 2015).

Les rhizobactéries qui produisent des phytohormones forment un ensemble de bactéries utiles vivant dans la rhizosphère. Elles ont la capacité exceptionnelle de synthétiser, libérer et réguler des phytohormones telles que les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'acide jasmonique, ainsi que leurs effets sur la croissance de différentes plantes (Kejela, 2024).

a. Acide indole acétique (AIA)

L'acide indole-3-acétique (AIA) est une hormone couramment produite par de nombreuses rhizobactéries, notamment *Azospirillum* et *Pseudomonas*. Les producteurs d'AIA favorisent la croissance des plantes par de multiples mécanismes et joue également un rôle essentiel dans les interactions plantes-microbes (Kejela, 2024).

La production d'AIA bactérien affecte l'architecture racinaire, l'absorption des nutriments et la résistance à divers stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité et la toxicité des métaux lourds, améliorant la résilience des plantes et offrant ainsi des pistes prometteuses pour une agriculture durable. La synthèse d'AIA bactérienne est régulée par des réseaux génétiques complexes, sensibles aux signaux environnementaux, qui influencent l'équilibre hormonal et les relations symbiotiques des plantes. Les bactéries pathogènes ont adapté des mécanismes pour manipuler la dynamique de l'AIA de l'hôte, influençant ainsi l'évolution des maladies. D'autre part, les bactéries bénéfiques utilisent l'AIA pour favoriser la croissance des plantes et atténuer les stress abiotiques, améliorant ainsi l'efficacité de l'utilisation des nutriments et réduisant la dépendance aux engrais chimiques (Etesami et Glick, 2024).

b. Production de cytokinines

Les cytokinines sont des hormones végétales qui jouent un rôle essentiel dans la morphologie, la défense des plantes et la sénescence des feuilles. Elles interviennent dans de nombreuses interactions entre les plantes et les organismes biotiques (Giron *et al.*, 2013).

Les cytokinines sont produites non seulement par les plantes, mais aussi par d'autres organismes tels que les bactéries. Elles sont notamment produites par des microorganismes pathogènes et bénéfiques et sont connues pour induire une résistance des plantes aux infections pathogènes (Akhtar *et al.*, 2020). Les cytokinines sont produites par les rhizobactéries, notamment *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Azospirillum* (Kejela, 2024).

Les effets régulés par les cytokinines impactent fortement non seulement la croissance et la défense des plantes, mais aussi des pathogènes partageant la même plante, en facilitant ou en

empêchant l'invasion. Cela suggère que les cytokinines (CK) sont des régulateurs clés du compromis croissance-défense des plantes (Giron *et al.*, 2013).

c. Production de gibbérellines

Les gibbérellines constituent une vaste famille d'hormones de croissance végétale découvertes dans les années 1930 dont l'acide gibbérellique (GA₃), qui agit comme un régulateur naturel de la croissance des plantes, notamment pour l'allongement des tiges, la germination des graines et l'augmentation de la taille des fruits. On peut l'obtenir à partir de plantes, de champignons et de bactéries (Camara *et al.*, 2018).

L'acide gibbérellique (GA), une hormone végétale essentielle, est crucial pour la bonne santé des plantes. De même, plusieurs bactéries favorisant la croissance des plantes produisent des métabolites secondaires identiques, stimulants de la croissance (Baliyan *et al.*, 2022). L'acide gibbérellique (GA₃) est produit par certaines espèces de rhizobactéries améliorant la hauteur des plantes et la biomasse de différentes cultures (Kejela, 2024).

2.3.1.5. Production de sidérophores

Les sidérophores constituent un système à haute affinité pour l'absorption du fer de l'environnement, présent chez de nombreux microorganismes. Les PGPR peuvent produire des sidérophores, contribuant ainsi à leur nutrition et à leur protection contre les phytopathogènes (Scavino et Pedraza, 2013). L'exploitation biotechnologique la plus importante des protéines sidérophores est celle des récepteurs protéiques produits dans la zone racinaire des plantes, où ils lui fournissent des nutriments en fer, constituent sa première défense contre les parasites envahissant les racines et contribuent à l'élimination des métaux toxiques des sols pollués. Les protéines sidérophores produites pour les récepteurs protéiques agissent comme des agents antibactériens, privant le pathogène de nutriments en fer, ce qui augmente les rendements des cultures (Sayyed *et al.*, 2012).

2.3.2. Mécanismes indirects

2.3.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Les PGPR exercent un effet direct sur la croissance des plantes par la production de phytohormones et la solubilisation des phosphates. De plus, par l'antibiose, la compétition pour l'espace et les nutriments, et l'induction d'une résistance systémique des plantes contre un large spectre de pathogènes racinaires et foliaires, les PGPR réduisent les populations de pathogènes racinaires et d'autres micro-organismes délétères dans la rhizosphère, favorisant ainsi la

croissance végétale. La colonisation racinaire, influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, est un facteur limitant le succès des PGPR (Podile et Kishore, 2006).

De nombreuses PGPR possèdent des systèmes de sécrétion et produisent des composés antimicrobiens, tels que des antibiotiques, des composés organiques volatils et des enzymes lytiques, qui leur permettent de limiter la croissance des microorganismes potentiellement phytopathogènes (Santoyo *et al.*, 2021).

2.3.2.2. L'antibiose

Les PGPR suscitent un vif intérêt en raison de leurs avantages en agriculture. L'un de leurs principaux atouts réside dans leur capacité de lutte biologique contre divers agents pathogènes des plantes. Cette capacité de lutte biologique est étroitement liée leur capacité à produire divers types de substances antimicrobiennes. Les principaux métabolites secondaires antimicrobiens sécrétés par les PGPR comprennent les lipopeptides non ribosomiques, les polycétides, les peptides ribosomiques, les phénazines et les pyrrolnitrines (Wang *et al.*, 2024).

De nombreux antibiotiques, tels que les polycétides, les composés thermogéniques non protecteurs et divers peptides, offrent un large spectre d'activité contre les agents phytopathogènes qui endommagent les plantes. Pour cette raison, de nombreux composés produits par les PGPR, tels que les sidérophores et les antibiotiques, empêchent indirectement les agents pathogènes de se multiplier au sein de nombreuses plantes (Hamed *et al.*, 2021).

2.3.2.3. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

Les PGPR produisent des composés chimiques aux effets bénéfiques variés. Parmi eux, l'HCN est reconnu comme un agent de lutte biologique, en raison de sa toxicité présumée contre les phytopathogènes (Rijavec et Lapanje, 2016).

L'HCN est un métabolite secondaire antimicrobien volatil et toxique très courant, produit par de nombreux microorganismes, dont les PGPR. Il joue un rôle essentiel dans la suppression des agents phytopathogènes grâce à sa toxicité efficace. Il joue également un rôle important dans la régulation de la disponibilité du phosphore pour les plantes et dans la lutte contre les mauvaises herbes. Un nombre considérable de bactéries produisent l'HCN comme métabolite volatil ou exogène sécrété en culture microbienne (Gupta et Sinha, 2020).

2.3.2.4. Résistance systémique induite (ISR)

Certaines souches de bactéries de la rhizosphère réduisent les maladies en activant un mécanisme de résistance chez la plante, appelé résistance systémique induite par les

rhizobactéries (ISR : *Induced Systemic Resistance*). L'ISR induite par les rhizobactéries ressemble à la résistance systémique acquise induite par les pathogènes (SAR : *Systemic Acquired Resistance*) dans la mesure où les deux types de résistance induite rendent les parties non infectées de la plante plus résistantes à un large spectre de pathogènes. Certaines rhizobactéries déclenchent la voie SAR dépendante de l'acide salicylique (SA) en produisant du SA à la surface des racines. Dans d'autres cas, les rhizobactéries déclenchent une voie de signalisation différente qui ne nécessite pas de SA (Pieterse *et al.*, 2001).

3. Les plantes médicinales

3.1. Définition

Les plantes médicinales ont joué un rôle essentiel dans le développement de la culture humaine. Source de médicaments, elles sont perçues comme une ressource essentielle pour la médecine traditionnelle et ont donné naissance à de nombreux médicaments contemporains. Depuis des millénaires, elles sont utilisées pour traiter les troubles de santé, aromatiser, conserver les aliments et prévenir les épidémies. Les métabolites secondaires produits par les plantes sont généralement responsables des caractéristiques biologiques des espèces végétales utilisées dans le monde entier. La croissance microbienne, dans diverses situations, est contrôlée par des produits dérivés des plantes (Dar *et al.*, 2017).

Les racines des plantes médicinales sécrètent un grand nombre de métabolites secondaires qui déterminent la diversité des communautés microbiennes de leur rhizosphère. Les bactéries dominantes isolées de diverses plantes médicinales comprennent diverses espèces de *Bacillus*, *Rhizobium* et *Pseudomonas*. Les rhizobactéries colonisent également la rhizosphère des plantes médicinales, libérant ainsi des solutés organiques de faible poids moléculaire facilitant la solubilisation du phosphate inorganique. De plus, les exsudats racinaires des plantes médicinales résistent au stress abiotique (Jaborova *et al.*, 2024).

3.2. Le romarin

Le romarin, un arbuste vivace aromatique méditerranéen bien connu pouvant atteindre 3 mètres de hauteur, est cultivé depuis l'Antiquité pour ses propriétés médicinales, culinaires et décoratives. Le genre *Rosmarinus* L. (famille des Lamiacées) comprend trois espèces, dont la plus répandue est *Rosmarinus officinalis* (Hammer et Junghanns, 2020).

La plante du romarin, qui possède de petites fleurs hermaphrodites blanches, roses ou bleues, a de petites feuilles (2 à 4 cm) pointues, collantes, velues et résineuses (la face supérieure de la feuille est vert foncé, tandis que sa face inférieure est blanche. Les branches

sont rigides, l'écorce fissurée et la tige carrée, ligneuse et brune) (Figure 3.A). De petites fleurs bleu pâle apparaissent en inflorescences cymeuses avec des fruits sous forme de baies sèches et lisses (Figure 3.B et C). Les feuilles, les sommités fleuries et les rameaux produisent une huile essentielle et une oléorésine appréciées en médecine traditionnelle et moderne. Le romarin est également utilisé en médecine et en aromathérapie, ainsi que dans l'industrie des parfums et des arômes (Sasikumar, 2012 ; Boulezazen, 2017 ; Hammer et Junghanns, 2020). Le romarin est originaire du bassin méditerranéen, de l'Espagne aux Balkans et en Afrique du Nord (Giugnolini, 1985, cité par Sasikumar, 2012).

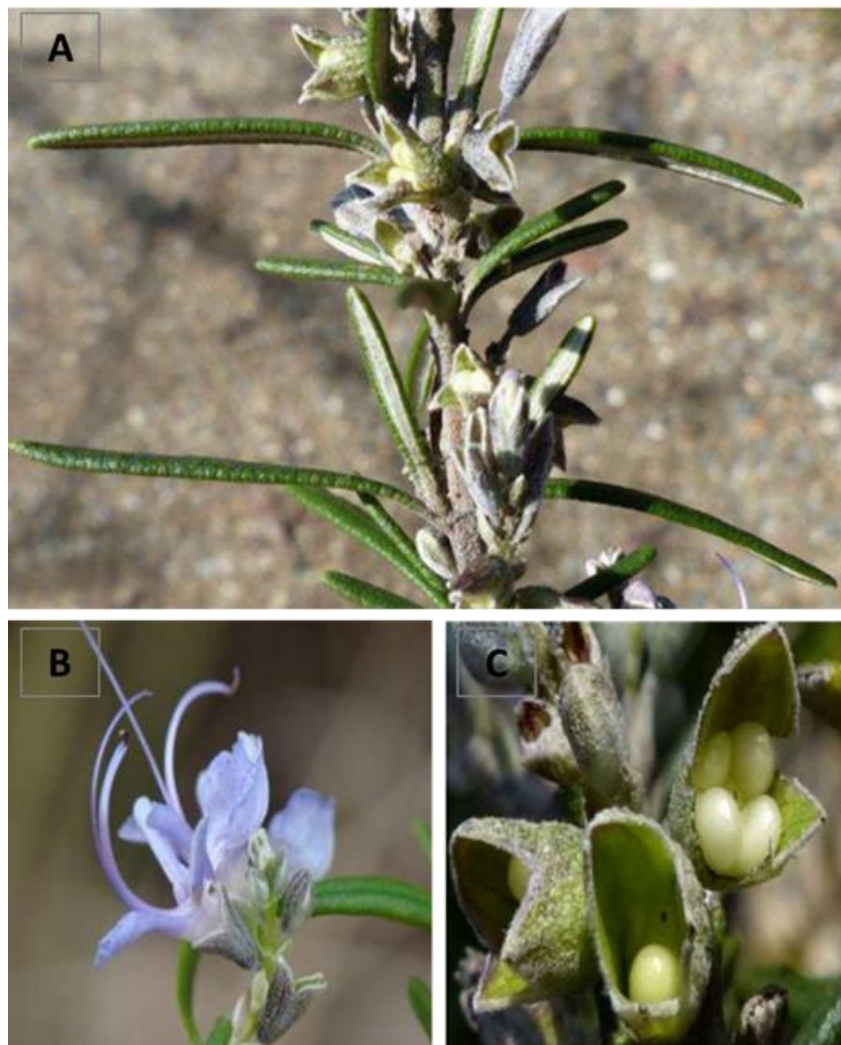


Figure 3. Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Boulezazen, 2017).

(A) feuilles et tige, (B) fleurs et (C) fruits.

3.2.1. Systématique de l'espèce

Selon Quezel et Santa (1963), la classification taxonomique du romarin est la suivant :

- **Règne** : *Plantae*
- **Embranchement** : Phanérogames
- **Sous-règne** : *Tracheobionta*
- **Division** : *Magnoliophyta*
- **Classe** : *Magnoliopsida*
- **Ordre** : *Lamiales*
- **Famille** : *Lamiaceae* (Labiées)
- **Sous-famille** : *Nepetoideae*
- **Genre** : *Rosmarinus*
- **Espèce** : *Rosmarinus officinalis*

3.3. Le thym

Le thym est une espèce de plante à fleurs de la famille des Lamiacées. C'est une plante médicinale largement utilisée dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique. Parmi les différentes espèces de thym, *Thymus vulgaris* est plus utilisé que les autres espèces dans les formes galéniques thérapeutiques. En médecine traditionnelle, *T. vulgaris* est cultivé dans de nombreux pays par la plupart des populations, notamment en milieu rural, qui dépendent des plantes médicinales pour traiter de nombreuses maladies (Hosseinzadeh *et al.*, 2015).

Le thym commun est un sous-arbrisseau vivace, de 10 à 30 cm de haut, aux branches fines, raides et étalées (Figure 4.A). Les petites feuilles sont persistantes, opposées, presque sessiles, oblongues-lancéolées à linéaires, de 5 à 10 mm de long et de 0,8 à 2,5 mm de large, gris-vert, finement duveteuses et parsemées de glandes avec des marges recourbées (Figure 4.C). Les fleurs sont violet clair, à deux lèvres, de 5 mm de long, avec un calice glandulaire poilu, portées par des bractées foliacées en verticilles lâches en grappes axillaires sur les rameaux ou en capitules terminaux ovales ou arrondis (Figure 4.B) (Venskutonis et Stahl-Biskup, 2004).

Le thym est originaire du sud de l'Europe, de l'Espagne à l'Italie. Il y est couramment cultivé, ainsi que dans la plupart des climats tempérés doux et subtropicaux, notamment en Europe méridionale et centrale (Venskutonis et Stahl-Biskup, 2004).

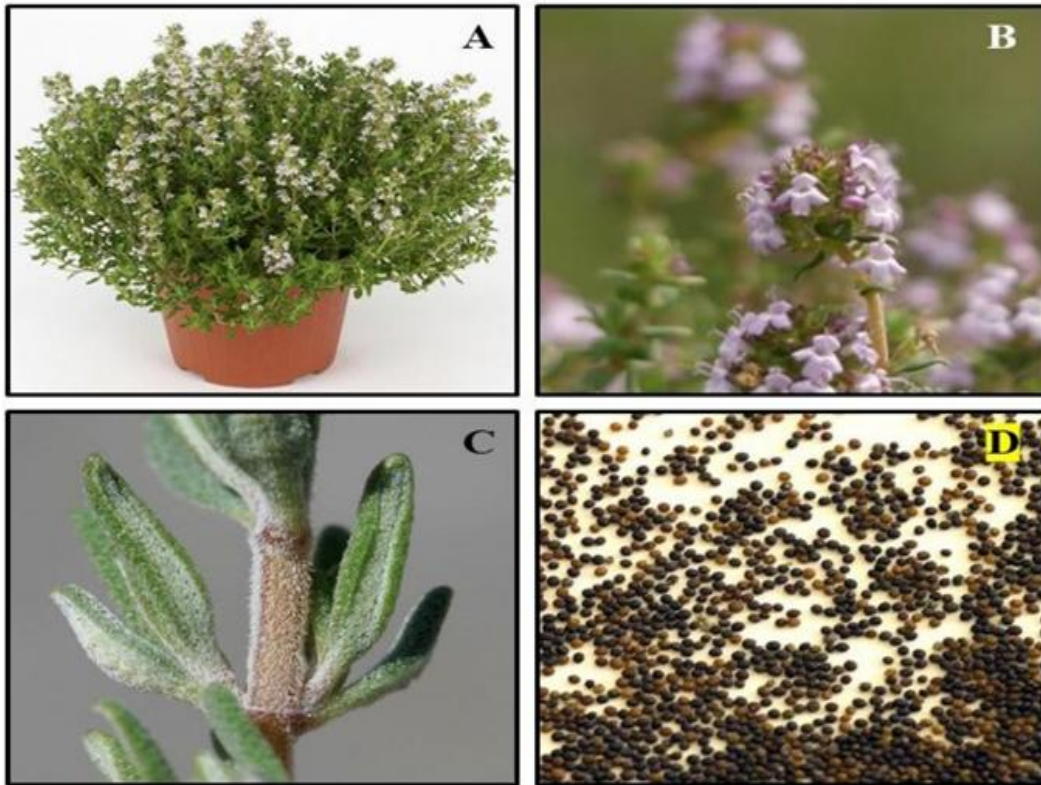


Figure 4. Morphologie du thym (*Thymus vulgaris*) (Patil *et al.*, 2021).

(A) Plante, (B) fleurs (C) feuilles et (D) graines.

3.3.1. Systématique de l'espèce

Selon les organisations Européenne et Méditerranéenne de protection des plantes, la systématique du thym est la suivante (Patil *et al.*, 2021) :

- **Règne :** *Plantae*
- **Embranchement :** *Magnoliophyta*
- **Classe :** *Angiospermae*
- **Ordre :** *Lamiales*
- **Famille :** *Lamiaceae*
- **Genre:** *Thymus*
- **Espèce:** *Thymus vulgaris*.

Chapitre 2.

Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Ce travail vise principalement à isoler, caractériser et identifier les bactéries rhizosphériques associées au romarin (*Rosmarinus officinalis*) et au thym (*Thymus vulgaris*) ainsi qu'à évaluer leur activité antagoniste *in vitro* vis-à-vis des agents phytopathogènes d'intérêt agronomique, en vue de contribuer au développement de stratégies de biocontrôle écologiquement durables. Notre étude a été réalisée au sein des laboratoires pédagogiques du département des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences de l'université Amar Telidji de Laghouat. Le travail a été mené sur une durée de trois mois, entre avril et juin 2025.

1. Matériel végétal et échantillonnage

Pour l'isolement des rhizobactéries, deux plantes médicinales ont été choisies : le romarin et le thym. L'échantillon de sol rhizosphérique du romarin a été prélevé sur un terrain non cultivé situé dans la région d'Anfous, près d'El Ghicha, wilaya de Laghouat, caractérisée par un climat semi-aride à aride, avec des étés chauds et secs, et des hivers froids. En ce qui concerne le thym, l'échantillon de sol a été collecté dans la région de Oued Morra, relevant de la wilaya déléguée d'Aflou. Cette région, située sur les hauteurs de l'Atlas saharien, présente également un climat semi-aride, avec une amplitude thermique marquée entre le jour et la nuit, et des précipitations faibles, concentrées principalement en hiver et au début du printemps. Le prélèvement du sol a été effectué au début du mois de mars, correspondant au début de la saison printanière.

Lors de l'échantillonnage, un prélèvement à partir du sol rhizosphérique (entourant les racines) a été effectué au niveau des deux plantes médicinales choisies. L'échantillon recueilli a été débarrassé des graviers, puis séché à l'air libre dans un environnement propre. Il a ensuite été conditionné dans des sachets plastiques et transporté au laboratoire pour l'isolement ultérieur des bactéries associées.

2. Souches phytopathogènes utilisées

Afin d'évaluer le pouvoir antagoniste des isolats de rhizobactéries obtenus, ceux-ci ont été testés contre deux souches phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* (Fop), agent causal de la fusariose vasculaire du pois, et *Fusarium culmorum*, responsable de la pourriture du collet et des racines ainsi que de la fusariose de l'épi chez le blé. Ces souches font partie de

la collection de laboratoire de mycologie, département de Biotechnologie et de l'Agro-écologie, faculté SNV de l'université Saad Dahleb – Blida 1.

3. Isolement des bactéries rhizosphériques

3.1. Préparation de la solution mère

A partir de chaque échantillon de sol, un poids de 1 g a été prélevé et mis dans des tubes contenant 9 ml d'eau distillée stérilisée. Les tubes ont ensuite été agités afin de détacher les bactéries des particules du sol et de les mettre en suspension.

3.2. Préparation des suspensions-dilutions

Une dilution en série a été réalisée en ajoutant 1 ml de la solution mère dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile, suivi d'une agitation, obtenant ainsi la dilution 10^{-1} . Ensuite, 1 ml de cette dilution a été transféré dans un nouveau tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution 10^{-2} . Ce processus a été répété de manière successive jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} (Figure 5).

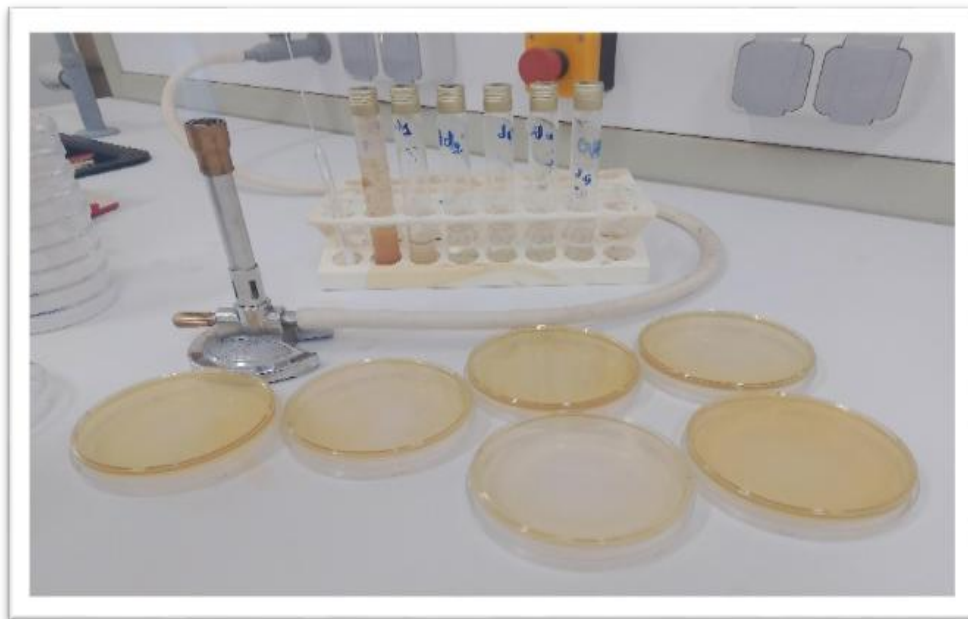


Figure 5. Préparation des suspensions-dilutions à partir de la solution mère du sol.

3.3. Ensemencement et incubation

Des aliquotes de 0,1 ml prélevées de chacune des cinq dilutions ont été ensemencées en triple sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LPGA (Levure-Peptone-Glucose-Agar) préalablement coulé et solidifié. La suspension a ensuite été répartie uniformément à la surface du milieu à l'aide d'un râteau en verre stérile. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant une semaine.

3.4. Purification des isolats obtenus

La purification des souches obtenues après l'isolement a été effectuée par des repiquages successifs sur milieux LPGA (Annexe 1). Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures. Ce processus est répété plusieurs fois pour garantir l'obtention de souches pures et correctement isolées.

4. Identification des isolats rhizobactériens

4.1 Description macroscopique

L'analyse des caractéristiques morphologiques (macroscopiques) implique l'examen des colonies bactériennes, soit à l'œil nu, soit à l'aide d'une loupe binoculaire, en prenant en considération les éléments d'identification macroscopiques suivants (Joffin et Leyral, 2006) :

- La taille des colonies : petite, moyenne ou grande.
- La couleur de la colonie.
- La forme des colonies : irrégulières, rondes, etc.
- L'élévation : convexe, concave ou plate.
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- La texture de la surface : rugueuse, lisse, sèche ou dentelée.

4.2 Etude microscopique

4.2.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram est une méthode fondamentale utilisée en bactériologie. Elle permet de détecter la présence de bactéries, ainsi que leur forme et leurs caractéristiques, les classifiant en "Gram-positif" ou "Gram-négatif" selon qu'elles conservent une couleur violette. Les bactéries Gram-négatives apparaîtront en rose/rouge, tandis que les Gram-positives seront bleues/violettes (Haichour, 2017).

La coloration de Gram suit une série d'étapes précises permettant de distinguer les deux types de bactéries (Paray *et al.*, 2023) :

- **Préparation du frottis** : un frottis bactérien est réalisé sur une lame de verre, puis fixé par passage à la flamme pour assurer l'adhérence des cellules.
- **Coloration primaire** : la lame est recouverte de cristal violet pendant environ 1 minute, puis rincée à l'eau. Ce colorant pénètre toutes les cellules bactériennes.

- **Mordantage** : une solution d'iode de Lugol est appliquée pendant 1 minute. L'iode forme un complexe insoluble avec le cristal violet dans les cellules. La lame est ensuite rincée à l'eau.
- **Décoloration** : la lame est traitée par un alcool (éthanol à 95%) pendant 10 à 20 secondes. Cette étape est cruciale, car elle dissout la membrane externe des Gram négatives et déshydrate la paroi des Gram positives. Elle est immédiatement suivie d'un rinçage rapide à l'eau.
- **Contre-coloration** : la lame est ensuite colorée avec de la fuchsine pendant 1 minute afin de colorer les bactéries ayant perdu la coloration violette. Un dernier rinçage est effectué, suivi d'un séchage doux à l'aide de papier absorbant.
- **Observation microscopique** : la lame est observée à l'aide d'un microscope optique en immersion à l'objectif $\times 100$, permettant de différencier les cellules Gram positives (violette) des Gram négatives (roses/rouges).

4.2.2 Coloration au vert de malachite

La technique de coloration au vert de malachite, développée par Schaeffer et Fulton en 1933, est une méthode différentielle classique utilisée pour la mise en évidence des spores bactériennes. Elle repose sur la capacité du vert de malachite à pénétrer les structures résistantes des spores sous l'effet de la chaleur (Bartholomew et Mittwer, 1950).

La procédure débute par la préparation d'un frottis à partir d'une culture bactérienne, étalé soigneusement sur une lame propre. Ce frottis est ensuite fixé par passage rapide à la flamme afin d'assurer une bonne adhésion des cellules à la lame. Une fois la fixation achevée, on applique une solution aqueuse de vert de malachite à 5 % sur l'ensemble du frottis. La lame est alors exposée à la vapeur d'eau pendant une dizaine de minutes. Cette étape de chauffage est essentielle, car elle permet d'assouplir la paroi épaisse des spores, facilitant ainsi la pénétration du colorant. Après le chauffage, le frottis est rincé délicatement à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de colorant retenu par les structures non sporulées.

Une contre-coloration est ensuite réalisée à l'aide de la fuchsine, appliquée pendant une trentaine de secondes. Ce colorant secondaire permet de colorer les cellules végétatives qui n'ont pas retenu le vert de malachite. L'observation microscopique se fait à l'objectif $\times 100$ à immersion, sous lumière directe. Les spores apparaissent en vert, tandis que les cellules végétatives se distinguent en rouge ou en rose.

4.3. Identification biochimique et métabolique

4.3.1. Test mannitol-mobilité

L'objectif de ce test est d'évaluer à la fois la mobilité des bactéries à une température donnée et leur aptitude à métaboliser le mannitol. La technique consiste à ensemencer des tubes contenant de la gélose mannitol-mobilité en culot par une piqûre centrale. Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures. La lecture du test repose sur l'observation d'une turbidité s'étendant au-delà de la ligne de piqûre, indiquant un déplacement des bactéries et donc leur mobilité. Par ailleurs, la fermentation du mannitol se manifeste par un changement de couleur du milieu, qui passe du rouge au jaune (Bouchaala, 2010).

4.3.2. Test de citrate

La technique consiste à ensemencer la pente du milieu au citrate de Simmons à l'aide d'une anse en platine, en traçant des stries en surface. L'incubation est effectuée à 37 °C pendant 24 heures. Lors de la lecture, un changement de couleur du milieu, passant du vert au bleu, traduit une alcalinisation due à l'utilisation du citrate comme unique source de carbone. Ce changement indique que la souche testée produit l'enzyme citrate-perméase (Solbi, 2013).

4.3.3. Test de KOH

Pour vérifier la coloration de Gram, une colonie isolée a été mélangée à une goutte d'une solution de KOH à 3% à l'aide d'une anse stérile. Après quelques secondes, le mélange est étiré vers le haut. Si un filament se forme entre la boucle de l'anse et la lame, cela indique que la bactérie est Gram négatif, tandis que l'absence de filament indique une bactérie Gram positif (Ryu, 1938).

4.3.4. Recherche de l'oxydase

Le test oxydase a été effectué à l'aide de disques d'oxydase préfabriqués, qui contiennent de l'oxalate de N-diméthyl-paraphénylène diamine. Les bactéries positives pour l'oxydase décomposent le substrat présent sur le disque, produisant une teinte violette foncée après quelques secondes (Marchall *et al.*, 1982).

4.4. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B

Les isolats à Gram négatif ont été sélectionnés et striés en triangle le milieu de culture King B afin d'assurer une bonne répartition et isolation des colonies. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant une semaine à 30 °C. Les résultats ont été analysés afin d'identifier les bactéries productrices de sidérophores, appartenant potentiellement au genre *Pseudomonas*. Le

King B permet la mise en évidence de la pyoverdine (pigment diffusible de couleur jaune-vert fluorescent, sous la lumière (Schaad *et al.*, 2001).

5. Recherche de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats rhizobactériens

Les isolats de rhizobactéries obtenus à partir du sol rhizosphérique du romarin et du thym ont été évalués pour leur activité antagoniste par confrontation directe *in vitro* avec les deux souches de champignons phytopathogènes de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* et *F. culmorum*.

Pour la réalisation de ce test, nous avons suivi la méthode décrite par Rios-velasco *et al.* (2016). Un disque mycélien de chaque isolat fongique a été prélevé et placé au centre de boîtes de Pétri contenant deux milieux de culture distincts : LPGA et PDA. Autour du disque mycélien central, quatre isolats de rhizobactéries ont été ensemencés de manière équidistante (sur les quatre points cardinaux de la boîte) sur chaque milieu, dans le but d'évaluer leur effet inhibiteur potentiel sur la croissance fongique (Figure 6). L'expérience a été réalisée en trois répétitions pour garantir la fiabilité des résultats.

Par ailleurs, des boîtes témoins ont été préparées en ensemençant séparément chaque souche fongique pathogène sur chacun des deux milieux utilisés, sans ajout d'isolats bactériens. Les boîtes sont par la suite incubées pendant une semaine à 30 °C.

L'activité antagoniste des isolats bactériens vis-à-vis des souches phytopathogènes a été quantifiée en mesurant la zone de croissance mycélienne après une semaine d'incubation. L'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminée à l'aide de la formule suivante (Idris *et al.*, 2007) :

$$I (\%) = \frac{R-r}{R} \times 100 , \text{ dont :}$$

- **I (%)** : taux d'inhibition de la croissance mycélienne.
- **R** : rayon de la colonie fongique dans le témoin (sans bactérie).
- **r** : rayon de la colonie fongique en direction de la bactérie.

Cette méthode permet d'évaluer l'effet inhibiteur potentiel des bactéries en comparant la croissance du champignon en présence ou en absence d'interaction avec un antagoniste. Une inhibition élevée (supérieur ou égal à 20%) indique une interaction antagoniste marquée. La moyenne des trois répétitions a été utilisée pour chaque isolat testé.

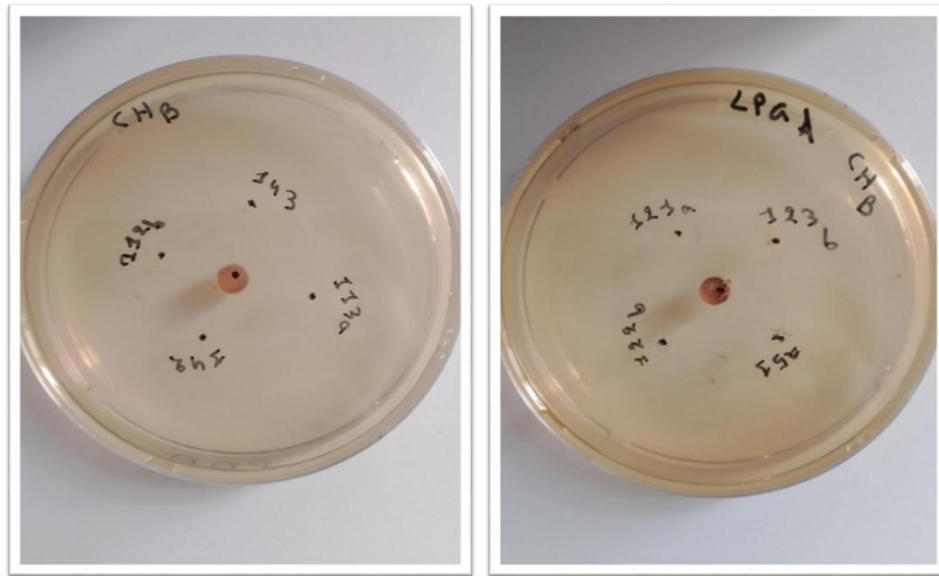


Figure 6. Test d'antagonisme *in vitro* des isolats bactériens obtenus vis-à-vis des souches pathogènes fongiques.

Chapitre 3.

Résultats et discussion

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. Isolement des rhizobactéries

Une semaine après l'incubation, l'étape d'observation des résultats concernant l'isolement du microbiote rhizosphérique des deux plantes médicinales sélectionnées, le romarin et le thym, a été réalisée. Nous avons observé l'apparition et le développement de colonies bactériennes sur le milieu de culture LPGA utilisé (Figure 7). Au total, 16 isolats bactériens ont été sélectionnés et différenciés sur la base des caractéristiques macroscopiques de leurs colonies : 8 issus de la rhizosphère du romarin et 8 de celle du thym.

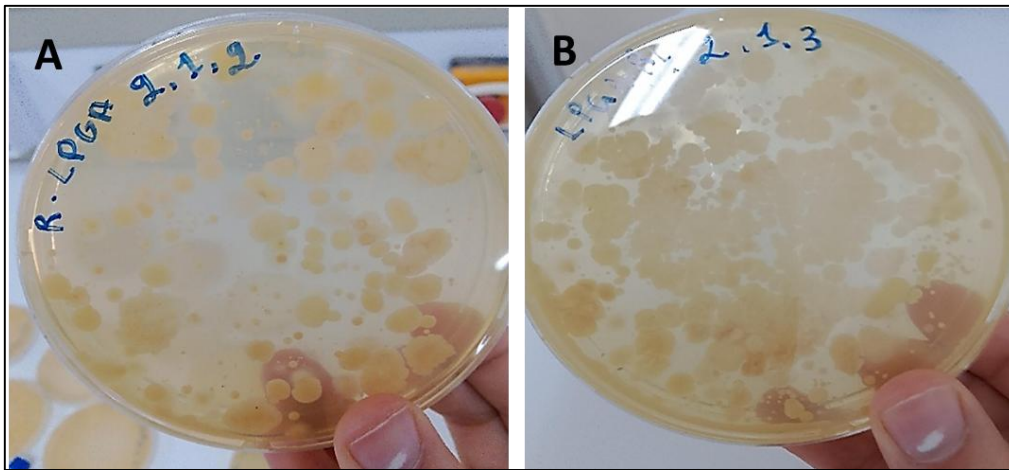


Figure 7. Résultats de l'isolement à partir du sol rhizosphérique des deux plantes médicinales après une semaine d'incubation.

(A) A partir de la rhizosphère du romarin et du (B) thym.

2. Identification des isolats rhizobactériens

Avant d'entreprendre les différents tests d'identification, les isolats obtenus ont été soumis à plusieurs étapes de purification successives en vue d'obtenir des cultures pures (Figure 8).

2.1. Description macroscopique

L'analyse macroscopique des 16 isolats bactériens issus des rhizosphères de romarin et de thym a permis de mettre en évidence une diversité notable en termes de phénotype des colonies. Cette diversité s'est exprimée à travers plusieurs caractéristiques observables à l'œil nu, notamment :

- La couleur des colonies, variant entre crème, blanc et jaune ;
- La taille, allant de petites à moyennes colonies ;
- La forme, incluant des morphologies circulaires, filamenteuses ou irrégulières ;

- Le relief, avec des colonies à surface plane, bombée, convexe ou élevée ;
- Le bord, présentant des contours réguliers, ondulés, lobés ou dentelés.

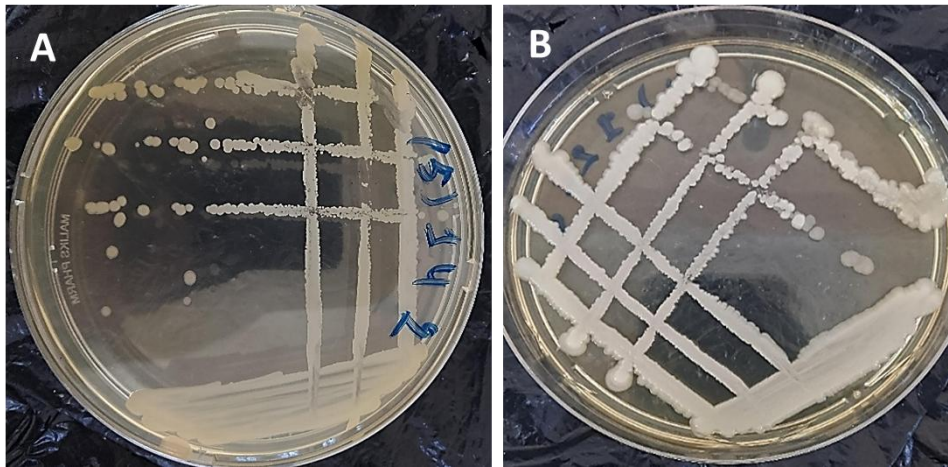


Figure 8. Aspect cultural de quelques isolats purifiés.
(A) L'isolat R6. (B) L'isolat R3.

Ces observations macroscopiques traduisent une hétérogénéité phénotypique au sein du microbiote rhizosphérique associé aux deux espèces végétales. Les résultats de la description des caractères culturaux de chaque isolat pur sont synthétisés dans les tableaux 1 et 2, respectivement pour les isolats issus de la rhizosphère du romarin et du thym.

Tableau 1. Description macroscopique des isolats rhizobactériens associés au romarin.

Isolat	Couleur	Taille	Forme	Relief	Bord
R1	Crémeuse	Moyenne	Circulaire	Plane	Ondulé
R2	Crémeuse	Moyenne	Circulaire	Elevée	Régulier
R3	Crémeuse	Moyenne	Circulaire	Plane	Régulier
R4	Blanche	Moyenne	Filamenteuse	Plane	Lobé
R5	Crémeuse	Petite	Irrégulière	Plane	Ondulé
R6	Crémeuse	Petite	Circulaire	Convexe	Régulier
R7	Blanche	Petite	Irrégulière	Bombée	Ondulé
R8	Blanche	Petite	Irrégulière	Plane	Ondulé

Tableau 2. Description macroscopique des isolats rhizobactériens associés au thym.

Isolat	Couleur	Taille	Forme	Relief	Bord
T1	Crémeuse	Moyenne	Circulaire	Elevée	Régulier
T2	Crémeuse	Petite	Irrégulière	Elevée	Ondulé
T3	Blanche	Moyenne	Irrégulière	Plane	Dentelé
T4	Blanche	Moyenne	Circulaire	Plane	Régulier
T5	Blanche	Petite	Circulaire	Elevée	Régulier
T6	Blanche	Petite	Filamenteuse	Plane	Dentelé
T7	Jaune	Moyenne	Circulaire	Convexe	Régulier
T8	Crémeuse	Moyenne	Circulaire	Elevée	Ondulé

2.2. Étude microscopique

2.2.1. Coloration de Gram

L'observation microscopique des 16 isolats rhizobactériens après coloration a mis en évidence la présence des deux types bactériens : 6 isolats Gram positif, colorés en violet, et 10 isolats Gram négatif, colorés en rose (Figure 9, Tableau 3).

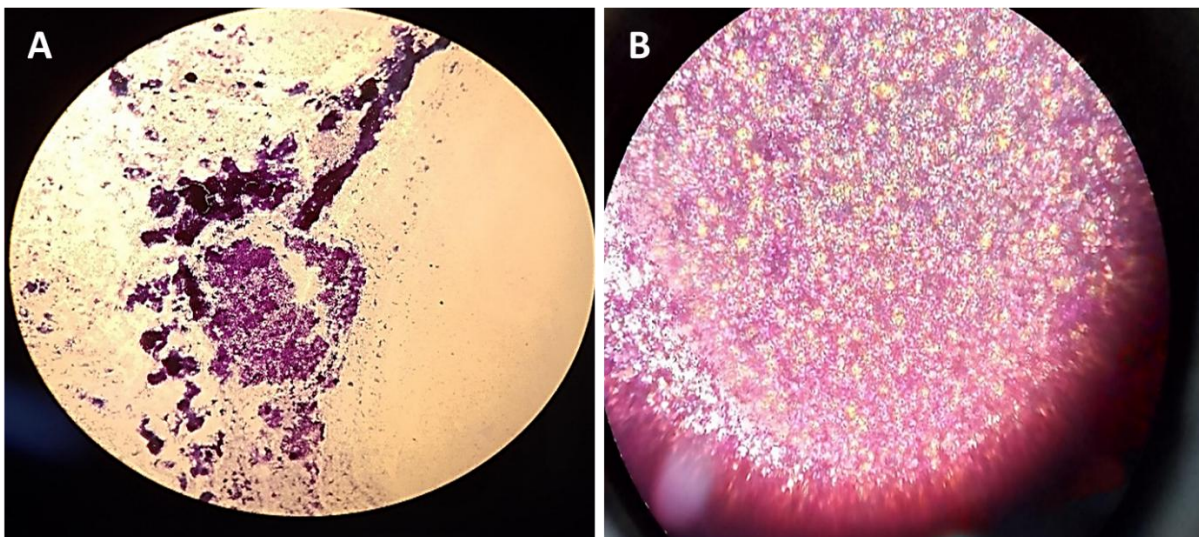


Figure 9. Observation microscopique des frottis après la coloration de Gram des isolats rhizobactériens (G×1000).

(A) R3 (Gram +). (B) T1 (Gram -).

2.2.2. Coloration au vert de malachite

L'analyse des isolats rhizobactériens à l'aide de la technique de coloration au vert de malachite a permis de mettre en évidence, chez certains d'entre eux, la présence de spores. Cette observation suggère que ces isolats appartiennent à des espèces sporogènes, c'est-à-dire capables de former des spores en conditions appropriées (Figure 10, Tableau 3).

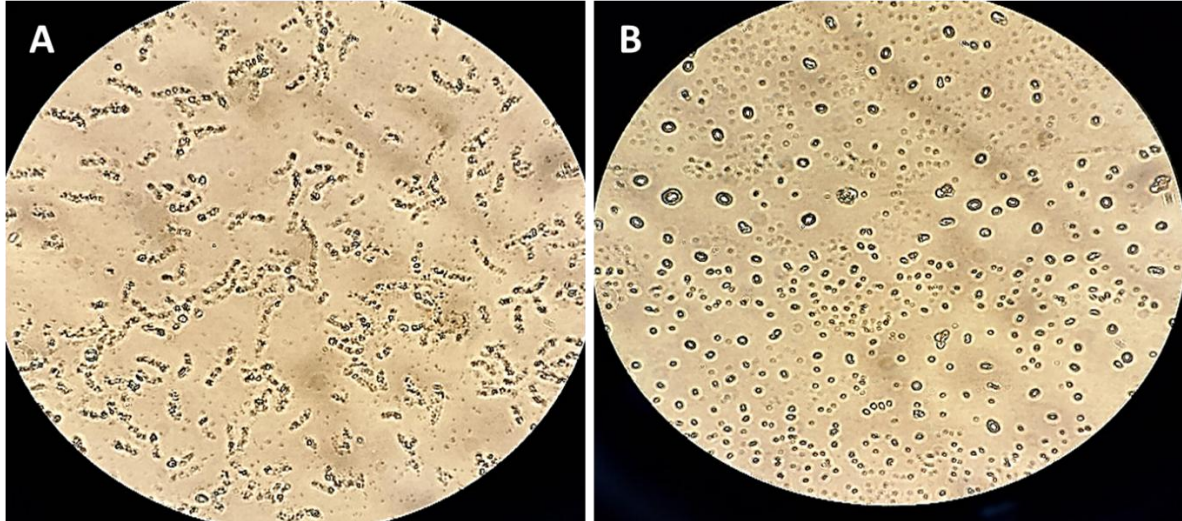


Figure 10. Observation microscopique des frottis après la coloration au vert de malachite des isolats rhizobactériens (G×1000).
(A) R2 (sporulant). (B) R4 (non sporulant).

Tableau 3. Type de Gram et capacité sporogène des isolats rhizobactériens obtenus.

Isolat	Type de Gram	Sporulation
R1	-	-
R2	+	+
R3	+	+
R4	-	-
R5	+	+
R6	+	+
R7	+	+
R8	+	+
T1	-	-
T2	-	-
T3	+	+
T4	+	+
T5	+	+
T6	-	-
T7	-	-
T8	+	+

2.3. Identification biochimique et métabolique

2.3.1. Test de mannitol-mobilité

Après incubation, le test mannitol-mobilité a révélé que, parmi les 16 isolats étudiés, 8 isolats n'ont pas été capables d'utiliser le mannitol, tandis que les 8 autres ont provoqué un changement de couleur du milieu, passant du rouge au jaune, ce qui indique une activité fermentaire du mannitol (Figure 11). Ce virage de couleur est lié à l'acidification du milieu, résultant de la production d'acides organiques issus de la fermentation (Tableau 4).

En ce qui concerne la mobilité, la formation d'un voile diffus à partir du point de piqûre centrale indique que 4 isolats sont mobiles, tandis que les 12 autres isolats sont non mobiles, comme en témoigne l'absence de dispersion autour de la piqûre (Figure 11).

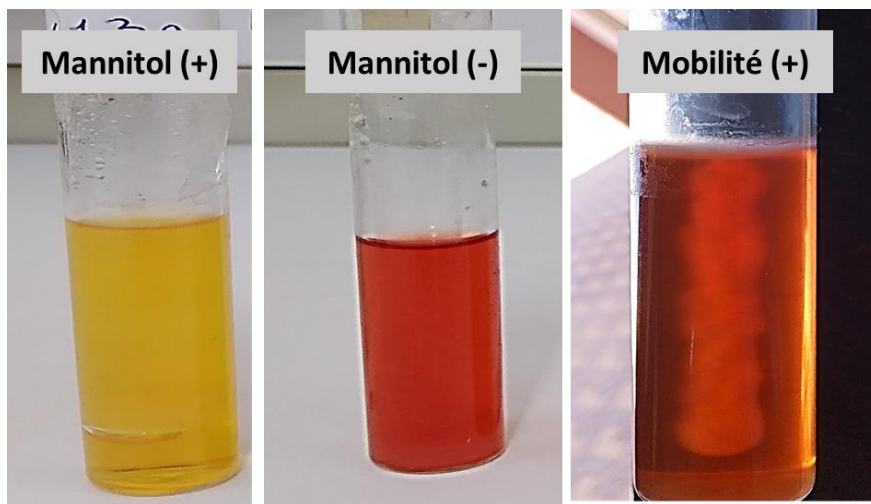


Figure 11. Lecture des résultats du test mannitol-mobilité.

2.3.2. Test de citrate

Parmi les 16 isolats analysés, 4 ont provoqué un changement de couleur du milieu, passant du vert au bleu, ce qui indique leur capacité à utiliser le citrate comme unique source de carbone (résultat citrate positif). En revanche, les isolats ne présentant aucun virage de couleur sont considérés comme citrate négatif, ce qui signifie qu'ils ne sont pas capables d'exploiter le citrate comme seule source de carbone (Figure 12, Tableau 4).

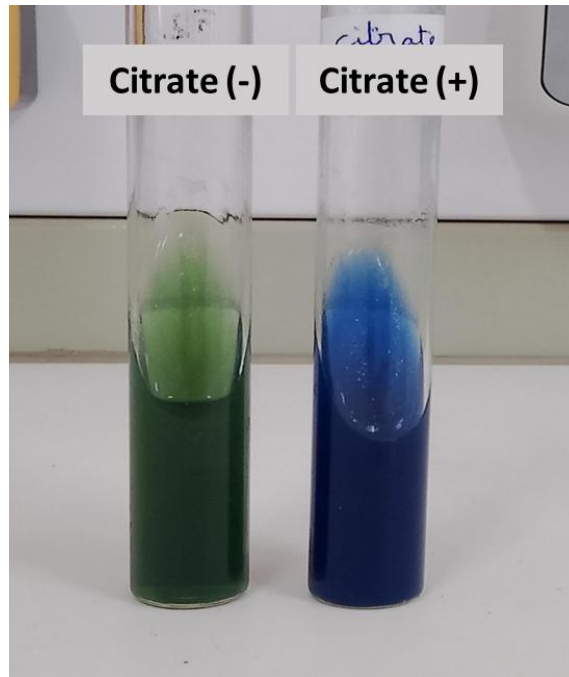


Figure 12. Lecture des résultats du test d'utilisation de citrate.

2.3.3. Test d'oxydase

L'étude de l'enzyme respiratoire cytochrome oxydase chez les isolats bactériens a révélé que 11 isolats sont oxydase positifs, tandis que 5 se sont avérés négatifs (Tableau 4). Ces résultats indiquent que la majorité des souches isolées possèdent l'enzyme cytochrome oxydase, impliquée dans la chaîne respiratoire. Le résultat positif s'est manifesté par l'apparition rapide d'une coloration violette sur le papier imprégné de réactif, confirmant ainsi l'activité oxydasique (Figure 13).

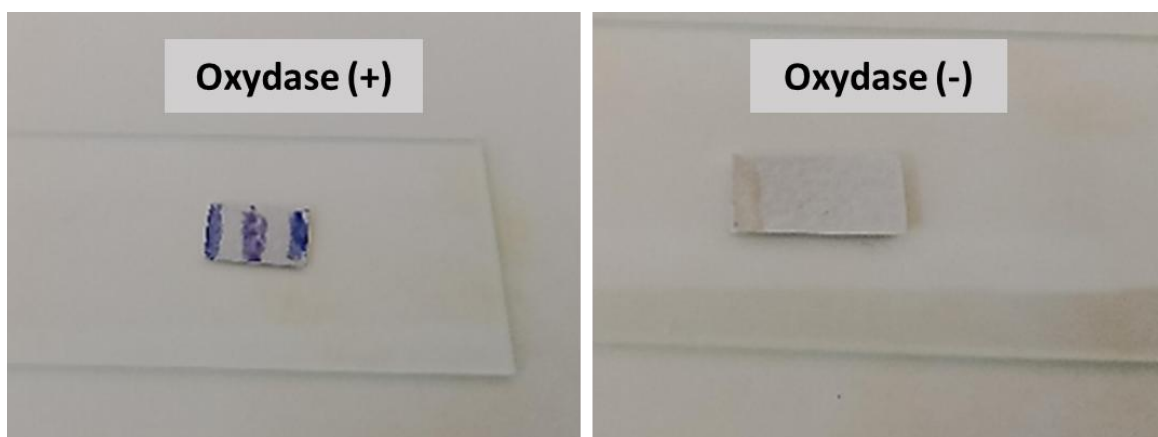


Figure 13. Lecture du résultat du test d'oxydase.

Tableau 4. Résultats des tests biochimiques sur les isolats rizhobactériens obtenus.

Isolat	Mannitol	Mobilité	Citrate	Oxydase
R1	-	-	-	+
R2	+	+	+	+
R3	+	-	+	+
R4	-	+	-	+
R5	+	-	-	+
R6	+	-	-	+
R7	-	-	-	+
R8	-	-	-	-
T1	-	-	-	+
T2	-	-	-	+
T3	-	+	-	+
T4	+	+	+	-
T5	+	-	+	-
T6	+	-	-	-
T7	-	-	-	+
T8	+	-	-	-

2.3.4. Test de KOH

Les résultats de ce test étaient en accord avec ceux de la coloration de Gram (Tableau 5), certaines souches présentant une solution visqueuse formant un filament mucoïde entre l'anse et la lame, indiquant un résultat KOH positif (Figure 14). Selon Ryu (1938), la formation d'un filament visqueux lors du contact entre la suspension bactérienne et le réactif KOH témoigne d'une paroi cellulaire fragile, caractéristique des bactéries à Gram négatif.



Figure 14. Résultat positif du test KOH.

Tableau 5. Comparaison des résultats du test KOH avec les résultats de la coloration de Gram.

Isolat	Type de Gram	Test KOH
R1	-	+
R2	+	-
R3	+	-
R4	-	+
R5	+	-
R6	+	-
R7	+	-
R8	+	-
T1	-	+
T2	-	+
T3	+	-
T4	+	-
T5	+	-
T6	-	+
T7	-	+
T8	+	-

2.4. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B

Les résultats de ce test ont été analysés dans le but d'identifier les bactéries capables de produire des sidérophores, notamment la pyoverdine, caractéristique du genre *Pseudomonas*. Lorsqu'elles sont cultivées sur le milieu King B, ces bactéries produisent une pigmentation jaune-verdâtre fluorescente due à la pyoverdine. Dans le cadre de ce test, une fluorescence a été observée uniquement chez un isolat associé au thym, identifié sous le code T1, suggérant son appartenance probable au genre *Pseudomonas* (Figure 15).

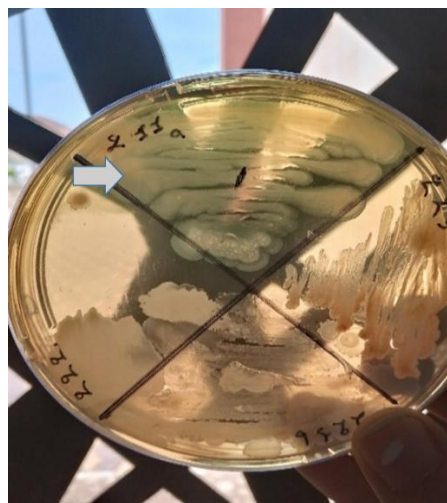


Figure 15. Résultat du test de la mise en évidence de fluorescence sur King B.

3. Recherche de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats rhizobactériens

Afin d'évaluer le pouvoir antagoniste des rhizobactéries isolées, celles-ci ont été mises en confrontation avec deux agents phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop) et *F. culmorum*. Après incubation, l'apparition de zones d'inhibition dans certaines interactions a mis en évidence l'effet inhibiteur de certains isolats sur la croissance fongique des deux souches phytopathogènes.

Lors des tests d'interaction avec la souche phytopathogène de Fop, plusieurs isolats ont révélé une activité antagoniste manifeste. Plus précisément, les isolats R2, R3, R4, R7, T2, T3 et T6 ont induit la formation de zones d'inhibition claires autour du champignon sur les deux milieux de culture utilisés, à savoir le LPGA et le PDA. Ces résultats suggèrent que ces isolats possèdent un potentiel inhibiteur stable, indépendant du type de milieu nutritif. À l'inverse, l'isolat T1 n'a montré un effet antifongique que sur le milieu LPGA, aucune zone d'inhibition n'ayant été observée sur PDA, ce qui pourrait indiquer que son activité antagoniste est influencée par les conditions nutritionnelles du milieu (Figure 16).

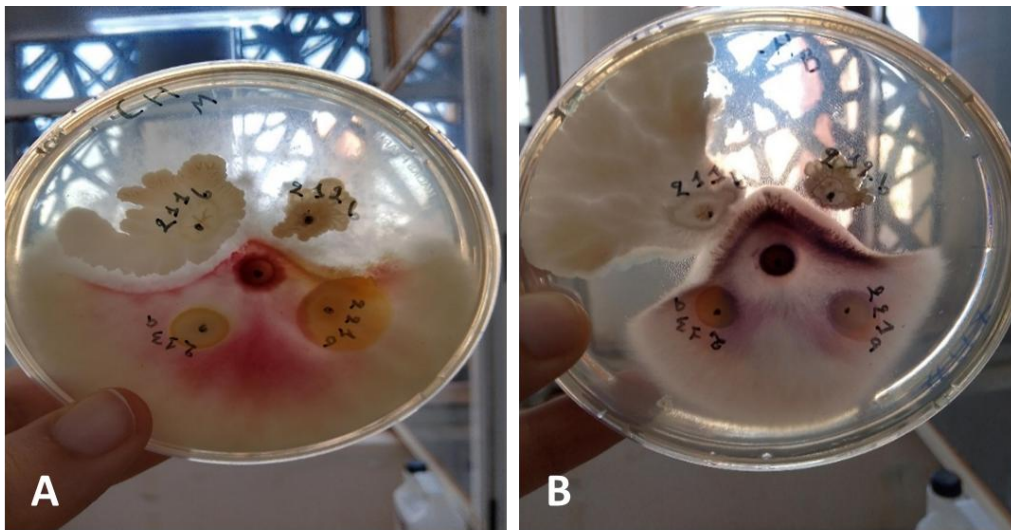


Figure 16. Résultats de la confrontation directe de quelques isolats rhizobactériens vis-à-vis de la souche de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop) sur le milieu PDA.

En ce qui concerne la souche *F. culmorum*, plusieurs isolats ont démontré une activité antagoniste notable. En effet, les isolats R2, R3, T2, T3 et T6 ont provoqué l'apparition de zones d'inhibition nettes autour de la croissance fongique, aussi bien sur le milieu LPGA que sur le milieu PDA, traduisant ainsi leur potentiel inhibiteur élevé et stable dans des conditions de culture variées. À l'inverse, l'isolat R7 n'a exprimé un effet inhibiteur que sur le milieu PDA,

tandis qu'aucune inhibition n'a été observée sur le milieu LPGA, suggérant une interaction dépendante du type de support nutritif (Figure 17).

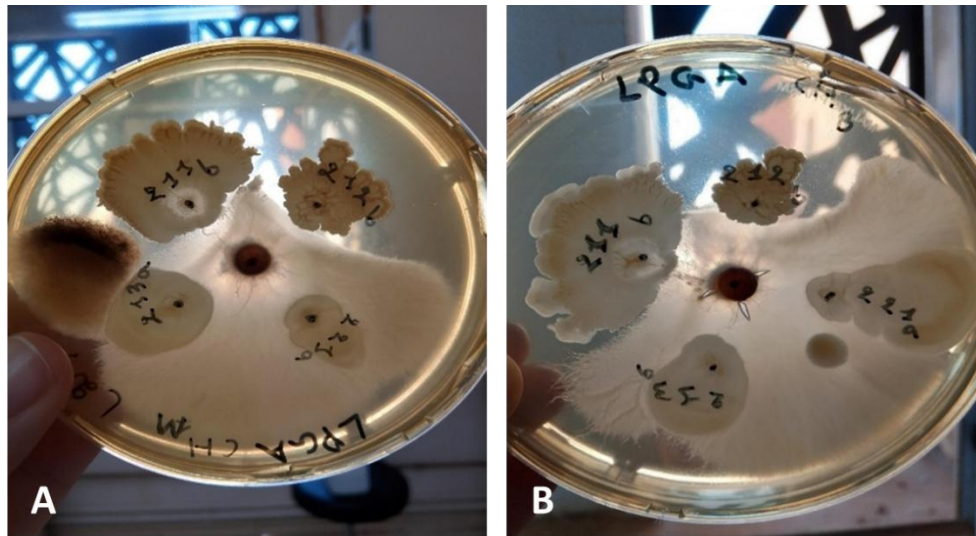


Figure 17. Résultats de la confrontation directe de quelques isolats rhizobactériens vis-à-vis de la souche de *Fusarium culmorum* sur le milieu LPGA.

Les calculs des taux d'inhibition ont permis d'évaluer de manière quantitative l'effet antagoniste de chaque isolat rhizosphérique sur les deux milieux de culture utilisés, LPGA et PDA, en interaction avec les deux souches phytopathogènes. Parmi les isolats testés, R2 et T3 ont montré les taux d'inhibition les plus élevés vis-à-vis de la souche de Fop, atteignant 96,25% sur le milieu PDA, traduisant une forte capacité antagoniste. Les isolats R3, R7, T2 et T7 se démarquent également par leur efficacité, avec des taux d'inhibition élevés sur les deux milieux, variant entre 76,25 % et 96,25 %, ce qui témoigne de leur potentiel de biocontrôle stable et polyvalent. De leur côté, T6 et R2 présentent une activité inhibitrice constante sur LPGA et PDA, suggérant leur adaptabilité à différents milieux nutritifs et leur intérêt pour des applications agricoles variées (Figure 18).

À l'inverse, l'isolat T1 n'a exprimé aucune activité antifongique sur PDA, bien qu'il ait montré une inhibition significative sur LPGA, en enregistrant une valeur de 87,5%. Ce comportement met en évidence une dépendance vis-à-vis du milieu, probablement liée à l'induction différentielle de la production de métabolites antimicrobiens. Enfin, plusieurs isolats, notamment R1, R5, R6, T4, T5, T7 et T8, n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la souche Fop, ce qui limite leur intérêt dans cette interaction spécifique (Figure 18).

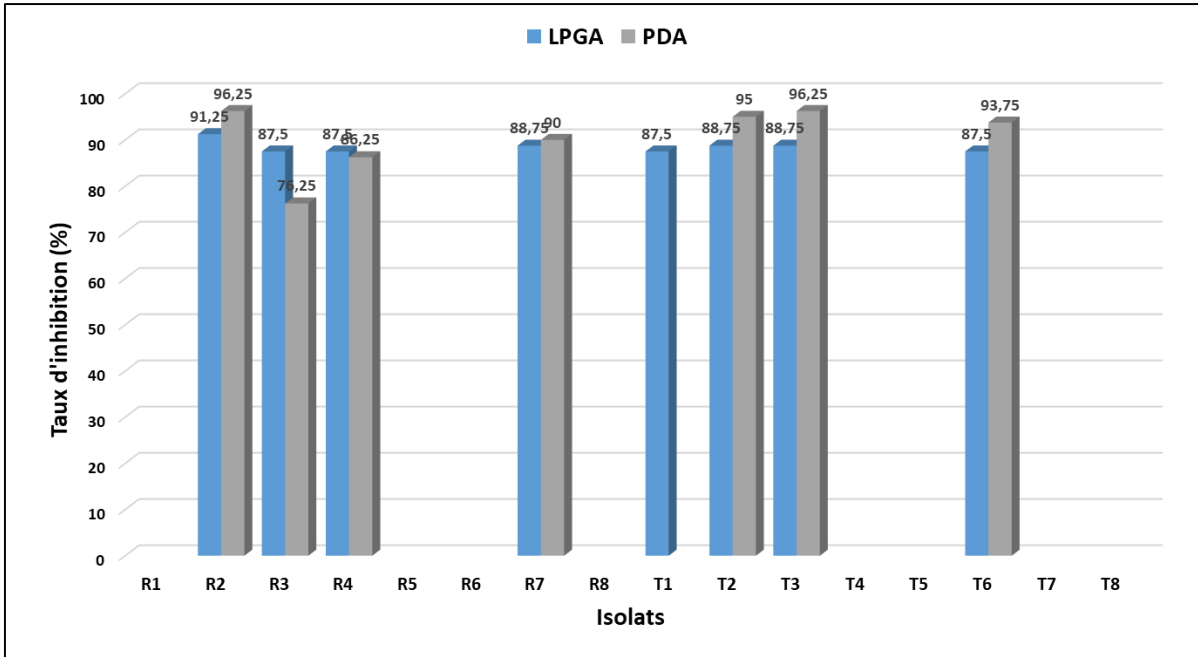


Figure 18. Taux d’inhibition enregistrés par les isolats rhizosphériques vis-à-vis de la souche phytopathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*.

Lors de l’interaction avec la souche de *F. culmorum*, les résultats du test d’antagonisme ont révélé que les isolats T3 et T6 ont présenté l’activité inhibitrice la plus élevée, atteignant 96,25 % sur les milieux LPGA et PDA respectivement. L’isolat R2 s’est également distingué par un taux d’inhibition de 95 % sur les deux milieux, indiquant un fort potentiel antifongique stable et efficace (Figure 19).

L’isolat R7 a montré une inhibition significative sur le milieu PDA avec 90 %, mais n’a exprimé aucune activité inhibitrice sur LPGA, ce qui suggère une dépendance au type de milieu de culture utilisé. Cependant, les isolats R1, R4, R5, R6, R8, T1, T4, T5, T7 et T8 n’ont démontré aucun effet inhibiteur sur *F. culmorum*, que ce soit sur le milieu LPGA ou PDA, indiquant une absence d’activité antagoniste mesurable dans ces conditions expérimentales (Figure 19).

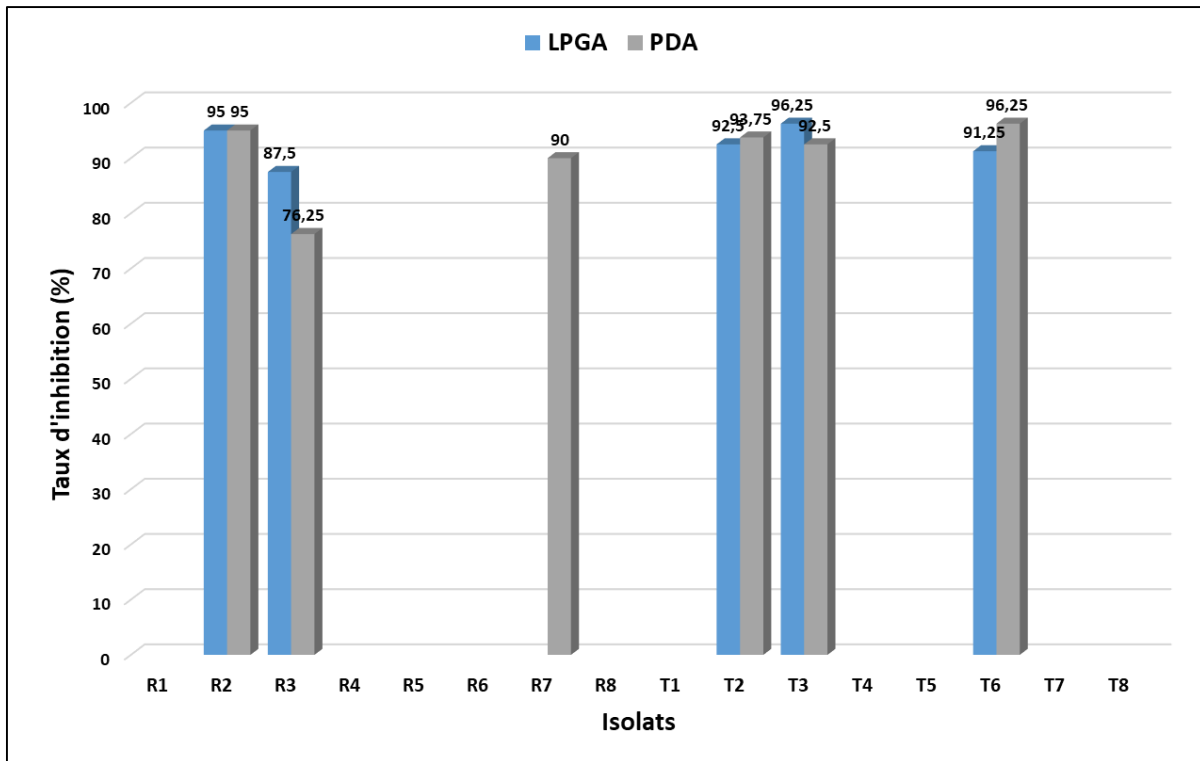


Figure 19. Taux d'inhibition enregistrés par les isolats rhizosphériques vis-à-vis de la souche phytopathogène de *Fusarium culmorum*.

4. Discussion générale

La première partie de notre travail consiste à isoler les bactéries associées au sol rhizosphérique des deux plantes médicinales : le romarin et le thym. Après la sélection de 8 isolats pour chacune des plantes cultivées sur le milieu d'isolement LPGA, l'observation à l'état frais a révélé une diversité morphologique notable parmi les isolats. La coloration de Gram, suivie de l'observation microscopique des frottis à fort grossissement ($\times 1000$), a permis de distinguer deux types d'isolats bactériens : des bactéries à Gram positif telles que R2, R4, T3 et T4, et des bactéries à Gram négatif comme R1, R4, T4 et T5. Dans une étude menée par Sukweenadhi *et al.* (2019), la présence de rhizobactéries a été confirmée par la réalisation d'une coloration de Gram sur 14 souches. Les résultats ont montré que 11 d'entre elles étaient à Gram négatif, tandis que les 3 restantes étaient à Gram positif, avec une diversité morphologique et culturelle notable.

Afin d'identifier les bactéries sporulantes, une coloration au vert de malachite a été réalisée. Cette technique a permis de mettre en évidence la capacité de plusieurs isolats à produire des spores, indiquée par la présence de structures colorées en vert au sein des cellules bactériennes.

La capacité des bacilles à former des endospores résistantes constitue un avantage majeur pour leur formulation et leur conservation à long terme (Ongena et Jacques, 2008).

Dans le but de mieux caractériser les isolats bactériens, plusieurs tests biochimiques ont été effectués, notamment le test combiné du mannitol et de la mobilité. La fermentation du mannitol se traduit par une modification de la couleur du milieu, passant du rouge au jaune (Bouchaala, 2010). Les résultats de ce test ont montré que Les isolats R2, R3, R5, R6, T4, T5, T6 sont fermentateurs du mannitol, et les isolats R2, R4, T3, T4 sont mobiles.

Le test de citrate permet d'identifier les microorganismes capables de produire l'enzyme citrate-perméase, qui leur permet d'utiliser le citrate comme unique source de carbone en le transformant en pyruvate. Lorsque cette utilisation entraîne une augmentation du pH au-delà de 7,6, l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol, change de couleur du vert au bleu (Roy *et al.*, 2023). Les résultats obtenus indiquent que seuls quatre isolats R2, R3, T4 et T5 ont donné une réaction positive au test, traduisant leur capacité à métaboliser le citrate.

L'activité oxydasique constitue l'un des critères les plus fiables et couramment utilisés pour l'identification des bactéries, notamment celles à Gram négatif. Ce test repose sur la détection de la cytochrome-oxydase, mise en évidence par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit d'application de la colonie (Bendoukhane et Djafer, 2016). Les résultats obtenus indiquent que la majorité des isolats testés sont oxydase positifs, à l'exception de six isolats R8, T4, T5, T6 et T7 qui se sont révélés négatifs.

Pour confirmer le type de Gram des isolats, nous avons réalisé le test KOH, qui a donné des résultats concordants avec la coloration de Gram. Selon Ryu (1938), la formation d'un filament visqueux lors du contact entre la suspension bactérienne et le réactif KOH caractéristique des bactéries à Gram négatif.

Le test de fluorescence réalisé sur le milieu King B a révélé que seul l'isolat T1, issu du thym, a produit une pigmentation jaune-verdâtre fluorescente, caractéristique de la pyoverdine. Ce résultat suggère que cet isolat pourrait appartenir au genre *Pseudomonas*, connu pour sa capacité à synthétiser ce type de pigment fluorescent.

Dans l'ensemble, les isoalts R1, R4, T1, T2 et T7 présentent un profil caractérisé par une coloration de Gram négatif, une activité oxydasique positive et une incapacité à fermenter le mannitol. À l'exception de la souche R4, elles sont non mobiles. Ces caractéristiques suggèrent leur appartenance probable au genre *Pseudomonas*. Ce lien est renforcé pour l'isolat T1, qui a

produit une pigmentation jaune-verdâtre fluorescente sur le milieu King B, confirmant ainsi son affiliation présumée à ce genre bactérien. Ces résultats concordent avec les observations de Palleroni (2015), selon lesquelles les *Pseudomonas* sont généralement des bactéries à Gram négatif, le plus souvent mobiles, bien que certains isolats puissent être immobiles. De plus, elles sont majoritairement oxydase positives, même si des exceptions à ce critère peuvent exister.

Les souches R2, R3, R5, R6, T3, T4, T5 et T8, caractérisées par un profil Gram positif, avec des résultats variables au test de l'oxydase (positifs ou négatifs), sont soupçonnées d'appartenir au genre *Bacillus*. En effet, selon Jurtschuk et Liu (1983), la majorité des souches de *Bacillus* sont Gram positives et généralement oxydase négatives ou indéterminées, bien que certaines puissent se révéler oxydase positives. De plus, ces isolats sont capables de sporuler, ce qui renforce leur affiliation probable à ce genre.

En ce qui concerne l'isolat R8, également Gram positif, mais oxydase négatif, non mobile et ne présentant pas de spores, ses caractéristiques morphologiques et biochimiques suggèrent une appartenance possible au genre *Corynebacterium*, conformément aux critères décrits par Bernard et Funke (2015).

Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué la croissance de deux agents phytopathogènes, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* (Fop) et *F. culmorum*, cultivés sur deux milieux de culture, LPGA et PDA, en présence de 16 isolats rhizobactériens sélectionnés à partir des deux plantes médicinales choisies. En calculant le taux d'inhibition afin de mesurer l'effet antagoniste des isolats sur les pathogènes, les résultats ont révélé que les souches R2, R3, R4 et R7 issues du romarin, ainsi que T1, T2, T3 et T6 isolées du thym, présentent une forte capacité inhibitrice, avec des taux d'inhibition particulièrement élevés sur l'un ou les deux milieux testés, atteignant parfois plus de 95 %.

Dans une étude réalisée par Yala *et al.* (2018), les auteurs ont évalué le potentiel antagoniste, aussi bien *in vitro* qu'*in situ*, de deux souches de rhizobactéries appartenant à *Pseudomonas fluorescens* dans la lutte biologique contre la fusariose vasculaire du pois. Les tests *in vitro* ont mis en évidence une inhibition de la croissance mycélienne de Fop par les deux souches, avec des taux allant de 2 % à 57 %. Les essais *in situ* en conditions de serre ont quant à eux montré une réduction significative des symptômes de la maladie, avec un effet de biocontrôle variant entre 19,29 % et 86,82 %.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié les rhizobactéries associées au romarin et au thym et mis en évidence leur éventuelle utilisation comme agents de lutte contre certains agents phytopathogènes. L'isolement à partir du sol rhizosphérique a permis de récupérer un grand nombre de rhizobactéries, parmi lesquelles 16 isolats ont été sélectionnés sur la base de leurs caractéristiques morphologiques distinctives. Leur classification selon les types de Gram a été établie grâce aux résultats obtenus par la coloration de Gram, la coloration au vert de malachite et le test KOH. Par ailleurs, plusieurs tests biochimiques, notamment le test mannitol-mobilité, le test du citrate et le test de l'oxydase, ont été réalisés. Les résultats issus de ces analyses ont contribué à mieux caractériser les propriétés biochimiques des isolats, facilitant ainsi une identification préliminaire de leur appartenance à différents genres bactériens

Le potentiel antagoniste des isolats rhizobactériens a été évalué par la méthode de confrontation directe face à deux souches phytopathogènes du genre *Fusarium* : *F. oxysporum* f. sp. *pisi* et *F. culmorum*. Parmi l'ensemble des isolats testés, ceux codés R2, R3, R4 et R7 (issus du romarin) ainsi que T1, T2, T3 et T6 (issus du thym) ont présenté les effets inhibiteurs les plus marqués. Ces résultats suggèrent que ces souches disposent d'un fort potentiel antagoniste, probablement lié à la production de métabolites antifongiques. En revanche, les autres isolats n'ont exprimé aucune activité inhibitrice à l'égard des deux agents pathogènes testés.

Bien que ce travail ne représente qu'une étape préliminaire, il constitue une base prometteuse pour des recherches plus approfondies. Les rhizobactéries étudiées, notamment celles associées aux plantes médicinales, se sont révélées particulièrement intéressantes en raison de leur capacité à inhiber l'action des agents pathogènes. Il serait pertinent, dans la suite de cette étude, de procéder à une caractérisation plus poussée de ces bactéries, d'élargir l'évaluation de leur efficacité à un éventail plus large de champignons et de bactéries phytopathogènes, d'identifier les métabolites bioactifs produits par les souches antagonistes, et d'examiner l'activité de ces composés, aussi bien en conditions de laboratoire qu'en conditions naturelles sur le terrain.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abe A., Assanvo J., Sanogo M. et Koffi K. (2018). Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire, 12 (5) : 2284-2293.
- Akhtar, S. S., Mekureyaw, M. F., Pandey, C., & Roitsch, T. (2020). Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>
- Ali, M. A., Naveed, M., Mustafa, A., & Abbas, A. (2017). The good, the bad, and the ugly of rhizosphere microbiome. In V. Kumar, M. Kumar, S. Sharma, & R. Prasad (Eds.), *Probiotics and plant health* (pp. 253–290). Springer.
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Gammoh, S., Al-Mahasneh, M. A., Tranchant, C. C., & Rawshdeh, M. (2018). Pharmaceutical, nutraceutical and therapeutic properties of selected wild medicinal plants: Thyme, spearmint, and rosemary. In A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Eds.), *Therapeutic, probiotic, and unconventional foods* (pp. 275–290). Elsevier.
- Aouar, L., Boukelloul, I., Benadjila, A., Medjoudj, H., & Zaabat, M. (2019). *Streptomyces griseus* LAC1: Biocontrôle et propriétés promotrices de la croissance des plantes. *Revue des BioRessources*, 9(1), 27–37.
- Baliyan, N., Dhiman, S., Dheeman, S., Kumar, S., Arora, N. K., & Maheshwari, D. K. (2022). Optimization of gibberellic acid production in endophytic *Bacillus cereus* using response surface methodology and its use as plant growth regulator in chickpea. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(7), 3019–3029. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10560-4>
- Bartholomew J. W. and Mittwer T. (1950). A Simplified Bacterial Spore Stain. *Stain Technology*, 25(3), 153–156.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., & Kalam, S. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13(3), 1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>

- Bendoukhane, H., & Djafer, K. (2016). MALDI-TOF spectrométrie de masse : Un outil efficace pour l'identification rapide et fiable des souches bactériennes. *Microbiologie générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*, UMF Constantine 1. (45 p.).
- Bernard, K. A., & Funke, G. (2015). *Corynebacterium*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00026>
- Bonnemain, J.-L., & Chollet, J.-F. (2003). L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes: Considérations générales. *Comptes Rendus Biologies*, 326(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00001-8](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00001-8)
- Bouchaala L. (2010). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et Physicochimique de l'eau de l'Oued-Zénati (Guelma). Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945, Guelma. 135 p.
- Boulezazen ,A. (2017). « Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'une plante aromatique (*Rosmarinus Officinalis* L.) de la forêt Béni Melloul – Khenchela ». Mémoire de Master en sciences biologiques, Université de d'El-Oued, 63 p.
- Camara, M. C., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., de Oliveira, J., Faulds, C., Bertrand, E., & Soccol, C. R. (2018). Current advances in gibberellic acid (GA₃) production, patented technologies and potential applications. *Food Research International*, 248, 1049–1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.067>
- Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R. (2011). Mechanisms of action of plant growth promoting rhizobacteria. *Science and Technology. Agricultural*, 12(8).
- Dar, R. A., Shahnawaz, M., & Qazi, P. H. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349–351.
- Dorjey, S., Dolkar, D., & Sharma, R. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 1335–1344.
- Etesami, H., & Glick, B. R. (2024). Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience.

- Microbiological Research, 281, 127602.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127602>
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects – A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 897–911.
<https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F. A., Khan, F., Chen, Y., Wu, C., Tabassum, M. A., Chun, M. X., Afzal, M., Jan, A., Jan, M. T., & Huang, J. (2015). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: Consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4907–4921.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3754-2>
- Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: Connecting plant growth and defence. *Functional Ecology*, 27(3), 599–609. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12042>
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1127500. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Gupta, D., & Sinha, S. N. (2020). Production of hydrogen cyanide (HCN) by a sulfur-free purple bacterium isolated from a paddy field of West Bengal. *IOSR Journal of Pharmacy and Biosciences*, 15(1), 16–26.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., & Snehi, S. K. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7(2), 96–102.
- Haichour, N. (2017). Travaux pratiques de microbiologie générale au Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Université de Sétif, Algérie. Pp. 1–19.
- Hamed, S., Lone, R., & Mohammed, H. (2021). Production of antibiotics from PGPR and their role in biocontrol of plant diseases. In M. A. Khan, A. S. Al-Huqail, &

- A. A. El-Keblawy (Eds.), Plant growth-promoting microbes for sustainable biotic and abiotic stress management (pp. 441–461). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-33-4928-3_18
- Hammer, M., & Junghanns, W. (2020). *Rosmarinus officinalis* L.: Rosemary. In Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants (pp. 501–521). Springer.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(9), 635–642. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2015.69084>
- Idris H., Labuschagne N. and Korsten L. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control* 40 (1) : 97-106.
- Jaborova, D., et al. (2024). Diversity and plant growth properties of rhizospheric bacteria associated with medicinal plants. *Indian Journal of Microbiology*. Advance online publication.
- Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006). *Microbiologie technique* (2e éd.). Collection Biologie Technique, CRDP d'Aquitaine.
- Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006). *Microbiologie technique* (2ème éd.). CRDP d'Aquitaine.
- JurtsHuk, P., Jr., & Liu, J. K. (1983). Cytochrome oxidase analyses of *Bacillus* strains: existence of oxidase-positive species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(4).
- Kejela, T. (2024). Phytohormone-producing rhizobacteria and their role in plant growth. In B. Ali & J. Iqbal (Eds.), *New insights into phytohormones*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1002823>
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting Rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7, 1–19.
- Lemanceau, P., Offre, P., Mougel, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. And Berta, G. (2006). Microbial ecology of the rhizosphere. In: *Microbiological*

- methods for Assessing soil quality. Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, pp. 228-230.
- LNPV. (2005, mars). Méthode B/05/07 version A : La mise en évidence d'*Erwinia* à partir de végétaux symptomatiques par isolement et identification de la souche. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité, Direction générale de l'alimentation, Sous-direction de la qualité de la protection des végétaux, Unité bactériologie.
- Logan, N. A., & De Vos, P. (2015). *Bacillus*. In W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Marchall, N., Bourdon, J.L. & Richard, C. (1982). Les milieux de culture pour L'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, Paris.
- Miloud, Y. (2018). Étude du potentiel bénéfique des souches de *Rhizobium* pour *Medicago truncatula* : symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse INP, France.
- Mushtaq, Z. (2021). PGPR: Current role, mechanism of action, and future prospects in light of marketing bottlenecks. *EQA – International Journal of Environmental Quality*, 41, 9–15.
- Nazir, N., Kamili, A. N., & Shah, D. (2018). Mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth – A review. *International Journal of Management, Technology and Engineering*, 7(8), 709–721.
- Ofdo, K., Pashtawi, N., Al-Alawi, A., Bendir, A., Dawi, K., & Gottfert, M. (2016). Symbiotic rhizobacteria to improve the agricultural effectiveness of fertilizers. *Engineering Lectures*, 138, 325–331.
- Ongena M. and Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* Mar;16 (3): 115-25.
- Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. In W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley.

- Paray A.A., Singh ,M., Mir M. A. and Kaur A. (2023). Gram Staining: A Brief Review. *International Journal of Research and Review*, 10 (9): 336-341.
- Patil, S. M., Ramu, R., Shirahatti, P. S., Shivamallu, C., & Amachawadi, R. G. (2021). A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon*, 7(5), e07054. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07054>
- Pedraza, R. O. (2008). Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.028>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799.
- Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Van Wees, S. C. M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K. M., Keurentjes, J. J. B., Verhagen, B. W. M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P. A. H. M., & Van Loon, L. C. (2001). Résistance systémique induite par les rhizobactéries : déclenchement, signalisation et expression. *Revue Européenne de Phytopathologie*, 107(1), 51–61.
- Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-associated bacteria* (pp. 195–230). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_7
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13, 63–77.
- Quezel, P., Santa, S. (1963). « Nouvelle flore d’Algérie et des régions désertiques méridionales ». Tome II. C.N.R.Sc. Pages : 781-793.
- Rehman, F. U., Kalsoom, M., Adnan, M., Toor, M., & Zulfiqar, A. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria and their mechanisms involved in agricultural crop production: A review. *SunText Review of Biotechnology*, 1(2), 1–6.

- Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785>
- Rios Velasco C., Caro Cisneros J., Berlanga Reyes D., Ruiz- Cineros M., Ornelas-Paz J., Salas Marina M. nd Guerrero-prieto V.V.-P. (2016). Identification and antantagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. And *Trichoderma* spp. isolates against common Phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 34(1),84-99.
- Roy B., Das S. and Bhattacharyya S. (2023). Overview on old and new biochemical test for bacterial identification. Associate Professor Microbiology, AIIH&PH, Kolkata, India.
- Ryu, E. (1938). On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest Method. *Journal of the Japanese Society of Veterinary Science*.
- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. del C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
- Sasikumar, B. (2012). Rosemary. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of herbs and spices* (2nd ed., Vol. 1, pp. 452–468). Woodhead Publishing
- Sasikumar, B. (2012). Rosemary. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of herbs and spices* (2nd ed., Vol. 1, pp. 452–468). Woodhead Publishing.
- Sayyed, R. Z., Chincholkar, S. B., Reddy, M. S., Gangurde, N. S., & Patel, P. R. (2012). Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Disease management* (pp. 449–471). Springer.
- Scavino, A. F., & Pedraza, R. O. (2013). The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Crop productivity* (pp. 265–285). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_12

- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (Eds.). (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd ed.). APS Press.
- Singh, P., & Sindhu, S. S. (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3(1), 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20130301.04>
- Solaiman, Z. M., & Anawar, H. M. (2015). Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants: Rhizosphere microbes interactions in medicinal plants. In Z. M. Solaiman, L. K. Abbott, & A. Varma (Eds.), *Mycorrhizal fungi: Use in sustainable agriculture and land restoration* (pp. 19–41). Springer.
- Solbi, S. (2013). Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères Morphologiques, biochimiques et sensibilités aux antibiotiques. Thèse de doctorat d'état, Université de Mohammed V-Souissi, Rabat, 79 p.
- Sukweenadhi, J., Purwanto, M. G. M., & Hardjo, P. H. (2019, September). Isolation and in vitro screening of plant growth promoting rhizobacteria from Barak Cenana red rice (Conference presentation). AIP Conference Proceedings.
- Rijavec T/ and Lapanje A. (2016). Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Front. Microbiol.* 7: 1785. doi: 10.3389/fmicb.2016.01785
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14, 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>
- Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2003). Signalling in rhizobacteria–plant interactions. In H. de Kroon & E. J. W. Visser (Eds.), *Root ecology* (pp. 297–330). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37113-2_12
- Venskutonis, R. P., Stahl-Biskup, E. (2004). Thyme. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of herbs and spices* (Vol. 2, pp. 297–321). Woodhead Publishing.
- Vocciante, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied Sciences*, 12(3), 1231. <https://doi.org/10.3390/app12031231>

- Wang, Y., Pei, Y., Wang, X., Dai, X., & Zhu, M. (2024). Antimicrobial metabolites produced by the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Advanced Agrochem*, 3(3), 206–221.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 379–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188.002115>
- Yala, A., Chouih, S., Benchabane, M., & Rispaïl, N. (2018). Biocontrôle des trachéomycoses par les PGPR : Cas de la fusariose du pois avec *Pseudomonas fluorescens*. *Agrobiologia*, 8 (2) : 1110-1116.
- York, L. M., Carminati, A., Mooney, S. J., Ritz, K., & Bennett, M. J. (2016). La rhizosphère holistique : intégration des zones, des processus et de la sémantique dans le sol influencés par les racines. *Journal de botanique expérimentale*, 67(12), 3629–3643.

Annexes

Annexes

Composition des milieux de culture utilisés

LPGA (Levure Peptone Glucose Agar)

Peptone	7 g
Glucose	7 g
Extrait de levure	7 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7

King B

Protéose peptone	20 g
Phosphate dibasique de potassium	1,145 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1,5 g
Glycérol	15 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2

PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pomme de terre	200 g
Glucose	15 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH	5,6

Mannitol-Mobilité

Hydrolysate trypsique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,6

Citrate de Simmons

Citrate de sodium	1,0g
Bleu de bromothymol	0,08g
Chlorure de sodium	5,0g
Sulfate de magnésium	0,2g
Hydrogénophosphate de potassium	1,0g
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1,0g
Agar-agar	15,0g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,9