

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI - Laghouat -  
Faculté des Sciences  
Département des Sciences Agronomiques

جامعة عمار ثليجي - الاغواط -  
كلية العلوم  
قسم العلوم الفلاحية



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme de Master en Agronomie  
Option : Protection Des Végétaux et d'Environnement*

### *Thème*

Isolement, caractérisation de rhisobactéries,  
*Pseudomonas* spp. fluorescents à partir de la  
rhizosphère des six plantes cultivées

Présenté (e) par : *Amireche omar.*

Le : 26/06/2014

Encadré (e) par : *M<sup>elle</sup> AMEUR Djamila ; Maître-assistant A*

## Remerciement

*Je remercie dieu le tout puissant d'avoir donné la santé et la volonte  
d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord ; je voudrais présenter tous mes remerciement, ainsi que  
toute ma gratitude, à mon encadreur de mémoire, ma professeur Ameur  
Djamila, pour m'avoir accompagné au cours de ma préparation de ma  
mémoire de fin d'étude avec leurs conseils, leurs encouragements  
précieux et sa gentillesse.*

*Je tiens à remercier le président du jury qui m'a fait l'honneur d'être et  
également le rapporteur. Ainsi je souhaite remercier tous les membres de  
jury qui doivent avoir l'acceptation de me examiner.vos remarques  
pertinents sur le contenu m'ont permis d'améliorer la qualité de ce  
document.*

*A M<sup>elle</sup> ZAZA.M pour donner le conseil pratique dans laboratoire et  
pour sa gentillesse et son soutien moral.*

*Mon remerciement s'adresse également à tous mes professeurs pour leur  
générosités et fa grande patience dont ils ont su faire preuve malgré  
leurs charges académiques et professionnelles.*

*A tous le personnel du laboratoire de département d'agronomie.*

*Je remercie mes parents qui me sont très chers, pour m'avoir soutenu et  
sans qui je n'aurai pas eu la possibilité d'effectuer cette mémoire.*

*Mes remerciements s'adressent maintenant aux nombreuses personnes  
qui ont largement contribué à la réussite de ce travail en  
m'encourageant tout au long de ces deux années et en me permettant  
notamment de surmonter certains moments difficiles. chahra zad*

*J'ai une mention très spéciale pour mon cher ami bilal*

*Mes remerciements pour tous mes amis à l'université de laghouat, mes chères amis de jijel Abd llah, amir ,zohir ,rafic, aimene, adelle, naime, k2, , ammar , hamza, yaeqoube,yasser , ramzi. Djammel, ainsi à tous personne avoir m'aidé pour complété mon travail.*

*Amireche Omar.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents pour leurs dévouements,  
leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements.  
Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de  
ma profonde affection et tendresse.*

*A mes frères Hacham et Youcef  
A mes sœurs Zahra et Zinebe  
A toute ma famille et à tous mes chers amis  
Chacun par son nom.*

*Je tiens également à associer à cette œuvre à mes  
collègues de protection des végétaux et de  
l'environnement que j'ai eu le plaisir de côtoyer  
pendant cette période de formation.*

*Amireche omar*

# Sommaire

---

Introduction.....	1
<b>Données bibliographiques.....</b>	<b>4</b>
1. Sol.....	4
2. La rhizosphère.....	5
3. Rhizodépôts.....	6
3.1. Exsudats.....	6
3.2. Substances sécrétées.....	6
3.3. Lysats.....	7
3.4. Gaz.....	7
4. Micro-organismes de la rhizosphère.....	8
4.1. Les champignons de la rhizosphère.....	9
4.2. Les bactéries de la rhizosphère.....	9
5. Généralité sur les <i>Pseudomonas</i> .....	10
5.1. Caractéristiques générales.....	10
5.1.1. Caractères morphologiques.....	10
5.1.2. Caractères écologiques.....	10
5.1.3. Caractères métaboliques.....	11
5.1.4. Caractères biochimique.....	12
6. Classification du genre <i>Pseudomonas</i> .....	12
6.1. Etapes de classificationsw.....	13
6.1.1. Classification contemporaines.....	14
6.1.2. Caractéristiques phénotypiques.....	15
6.2. Interactions de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents dans la rhizosphère.....	15
6.2.1 Effets directs.....	16
6.2.1.1. Solubilisation des phosphates.....	16
6.2.1.2. Production de sidérophores.....	16
6.2.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale.....	17
6.2.2. Effets indirects.....	17
6.2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments.....	17
6.2.2.2. Antibiose.....	18

---

# Sommaire

---

6.2.2.3. Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance) .....	18
6.3 Pseudomonas spp. Face aux stress abiotiques .....	20
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>22</b>
1. Origine des échantillons du sol.....	22
2. Méthode d'isolement.....	22
3. Dénombrement des bactéries.....	23
4. Méthode de purification.....	23
5. Conservation des isolats .....	24
6. Identification et caractérisation taxinomique .....	25
6.1. Critère d'identification .....	25
6.1.1. Production du pigment fluorescent .....	25
6.1.2. Tests biochimiques et physiologiques .....	25
7. Tests biochimiques et physiologiques .....	25
7.1. Test de Gram .....	25
7.1.1. Test de KOH .....	25
7.1.2. Coloration de Gram.....	29
7.2. Croissance en anaérobiose (Test de Hugh Leifson) : .....	29
7.3. Catalase.....	30
7.4. Test de LOPAT.....	31
7.4.1. Production de Levane sucrase.....	31
7.4.2. Test d'oxydase.....	32
7.4.3. Test de pectinase .....	32
7.4.4. Test d'arginine déshydrolase .....	33
7.4.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac .....	33
7.5. Test de gélatinolyse .....	34
7.6. Nitrates réductase .....	34
7.7. Production du pigment fluorescent.....	35
7.8. Croissance à 41oC et à 4oC.....	35
8. Galerie API 20 NE.....	35
8.1. Préparation des inoculum.....	36

---

# Sommaire

---

8.2. Inoculation de la galerie .....	36
9. Recherche des activités antagonismes (test d'antagonisme <i>in vitro</i> ) ....	38
9.1. Matériel biologique .....	38
9.1.1. Souche bactériennes.....	38
9.1.2. Isolats de champignons .....	38
<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>40</b>
1. Résultats .....	40
1.1. Dénombrement bactériens.....	40
1.2. Caractérisation des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents .....	40
1.3. Test de Gram .....	41
1.3.1. Test de KOH .....	41
1.3.2. La coloration de Gram .....	42
Croissance en anaérobiose (Test de Hugh et Leifson ) .....	42
1.4. Catalase.....	43
1.5. Test de LOPAT.....	43
1.5.1. Production de Levane sucrase.....	43
1.5.2. Test d'oxydase.....	45
1.5.3. Test de pectinase.....	45
1.5.4. Test d'arginine déshydrolase .....	45
1.5.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac .....	46
1.6. Test de la gélatinolyse .....	46
1.7. Nitrates réductase .....	48
1.8. Production du pigment fluorescent.....	48
1.9. Croissance à 41oC et à 4oC.....	49
1.10. Galerie API 20 NE.....	49
1.11. Test d'antagonismes <i>in vitro</i> .....	55
2. Discussion .....	56
<b>Conclusion .....</b>	<b>62</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>63</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>68</b>

---

**La liste des tableaux**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>page</b>
<b>Tableau 01</b>	La quantité de différentes matières vivantes dans le sol.....	<b>5</b>
<b>Tableau 02</b>	Tableau de lecture (API 20NE) (bio Mérieux).....	<b>37</b>
<b>Tableau 03</b>	les résultats des testes préliminaires.....	<b>44</b>
<b>Tableau 04</b>	les résultats des Test de LOPAT.....	<b>47</b>
<b>Tableau 05</b>	les résultats final des testes biochimiques et physiologiques.....	<b>50</b>
<b>Tableau 06</b>	les résultats des testes de Galerie API 20 NE.....	<b>51</b>
<b>Tableau 07</b>	Les résultats d'identification de la galerie API 20 NE.....	<b>52</b>
<b>Tableau 08</b>	la clé dichotomique (A) proposé par Jacque (1994) pour identification des <i>pseudomonas spp</i> fluorescentes.....	<b>53</b>
<b>Tableau 09</b>	La clé dichotomique (B) propose par Bossis (1995) pour identification des <i>pseudomonas spp</i> fluorescents.....	<b>54</b>
<b>Tableau 10</b>	Resultat du test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	<b>55</b>

---

La liste des figures

N°	Titre	Page
<b>Figure 01</b>	Les cinq compartiments du sol.....	4
<b>Figure 02</b>	Diagramme simplifié d'une racine et des rhizodépôts (Arango et Tarnawski, 2002).....	7
<b>Figure 03</b>	Interaction entre les <i>pseudomonas</i> spp.fluorescents, les microorganismes pathogènes et les cellules racinaires.....	19
<b>Figure 04</b>	Isolement et purification des bactéries .....	24
<b>Figure 05</b>	schéma de détermination des différents genres bactériens proposé par schaad <i>et al.</i> ,(2001).....	26
<b>Figure 06</b>	La clé dichotomique (A) proposé par Jacques (1994) pour identification de <i>pseudomonas</i> spp. Fluorescents.....	27
<b>Figure 07</b>	La clé dichotomique (B) proposé par Bossis (1995) pour identification de <i>pseudomonas</i> spp fluorescents.....	28
<b>Figure 08</b>	Teste de Hugh Leifson.....	30
<b>Figure 09</b>	Test de catalase.....	30
<b>Figure 10</b>	Test de Levane.....	31
<b>Figure 11</b>	Test d'arginine déshydrolase.....	33
<b>Figure 12</b>	Test d'hypersensibilité sur Tabac.....	33
<b>Figure 13</b>	Test d'antagonisme <i>invitro</i> .....	39
<b>Figure 14</b>	Le taux de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent .....	40
<b>Figure 15</b>	Culture pur des isolats .....	41
<b>Figure 16</b>	LA formation d'un fil visqueux pour les gram –.....	41
<b>Figure 17</b>	la couleur et la forme du gram <sup>-</sup> sous microscope optique (G10x100x1.5).....	42
<b>Figure 18</b>	Résultats de teste (HL).....	42
<b>Figure 19</b>	Résultats de Test de Catalase.....	43
<b>Figure 20</b>	Résultats de test levane.....	43
<b>Figure 21</b>	Résultats de test d'oxydase.....	45
<b>Figure 22</b>	Résultats de teste pecténase.....	45
<b>Figure 23</b>	Résultats de Test d'arginine déshydrolase.....	46
<b>Figure 24</b>	Résultats de Test d'hypersensibilité sur Tabac.....	46
<b>Figure 25</b>	Résultats de Test Gélatinolyse.....	46
<b>Figure 26</b>	Résultats de Test Nitrate réductase.....	48
<b>Figure 27</b>	Résultats de la production du pigment fluorescent.....	48
<b>Figure 28</b>	Résultats de la Croissance à 41°C et à 4°C.....	49

**Liste des abréviations**

ADH : Arginine - dishydrolase.

API : Analyse Prohylactic Index.

AIA : acide indole acétique.

ACC : La 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate.

bv : biovar.

C° : degré Celsius.

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone.

EDS : Eau Distillée Stérile.

G- : Gram négative.

g: gramme.

Gél: Gélatine

h : heure.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Eau Oxygénée.

HCN : l'acide cyanhydrique.

HL : Milieu Hugh et Leifson.

HR : Hypersensibilité.

KA : King "A".

KB : King "B".

KOH : Hydroxyde de Potassium.

LCD : Lysine - décarboxylase.

LDC : Lysine-décarboxylase.

Lev: Levane.

LPGA : extrait de Levure, Peptone, Glucose, Agar.

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

min : minute.

ml: millilitre.

N : Azote.

NO<sub>3</sub> : Dénitrification

NR : non réalité.

ODC : ornithine - décarboxylase.

ONPG : orthonitrophényl-B -D- galactopyranoside.

P : Pseudomonas.

---

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

pH : Potentielle d'Hydrogène.

T : température.

UFC : unité format colonie.

UV : ultra violette.

---

**Amireche omar.**

**Thème : Isolement, caractérisation de rhizobactéries, *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir de la rhizosphère des six plantes cultivée.**

**Resumé :**

Les isollements et les purifications effectués à partir des échantillons de la rhizosphère de cultures cultivées (blé, oignon, carotte, laitues, navet et fève) dans la région EL-ASSAFIA (Laghouat –Algérie) ont permis d'isoler 43 isolats identifier comme des *Pseudomonas* spp. Fluorescents.

Après utilisations des tests biochimiques et physiologiques nous avons sélectionné 21 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Parmi ces souches, est a la base de les deux clés de Jacques (1994) et Bossis (1995) et aussi les réponses des tests appliquées, Nous avons pu affilier 7 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescens (C3, N15, L17, B20, B22, B26 et F31) au biovar III et les deux souches (N14 et B24) au biovar IV.

Le test de l'activité antagonisme de trois isolats C3, L17et F31 vis-à-vis des deux champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (FOA1), *Fusarium culmorum* (BD11) sur les deux milieux KB et PDA montre une variabilité de réponse d'inhibitions de la croissance mycélienne. La B20 a montre la meilleure activité antagonisme vis-à-vis des deux champignons.

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

**Mots clés :** Caractérisation, Cultures cultivées, Rhizosphère, *Pseudomonas* spp. fluorescents, Tests biochimiques, API 20NE, Antagonisme.

عميرش عمر

**الموضوع : عزل وتنصيف ريزو بكتيريا بسودوموناس مشعة من تربة ستة نباتات مزروعة**

**ملخص:**

عملية العزل والتطهير التي احدثناها لعينات ريزوسفير المأخوذة من المحاصيل الزراعية (القمح، البصل، الجزر، الخس، اللفت و الفول) التي جمعت في المنطقة EL-ASSAFIA- الاغواط - الجزائر- سمحت لنا بعزل 43 عينة اعتبرت البكتيريا بسودوموناس فلورسنت.

بعد إجراء الاختبارات البيوكيميائية والفيزيولوجية حصلنا على 21 سلالة البكتيرية بسودوموناس فلورسنت ، بمساعدة مفاتيحين جاك (1994) وبوسيس (1995) ونتائج الاختبارات البيوكيميائية والفيزيولوجية التقليدية ونتائج اختبار API20NE اصبحنا قادرين على تصنيف 7 سلالات البكتيرية بسودوموناس فلورسنت ، (C3, N15, L17, B20, B22, B26, F31) هلى النوع الحيوى الثالث و سلالتين (N14 و B24) الى النوع الحيوى الرابع .

اختبار الرد المعاكس الذي اجرى على الفطريات الممرضة *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (FOA1), *Fusarium culmorum*(BD11) من طرف السلالات البكتيرية C3, L17, F31 فى وسطى الزرع KB و PDA اعطت نتائج مختلفة.

النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل هي الأولية. نقترح استخدام الاختبارات الجينية تأكد الشكل المظهري.

**الكلمات الرئيسية:** الخصائص، المحاصيل الزراعية ، ريزوسفير المأخوذة ، بسودوموناس فلورسنت ، الاختبارات البيوكيميائية والفيزيولوجية ، و API 20NE.

**Amireche omar**

**Theme : isolation and characterisation the rhizobacterie ,*Pseudomonas* spp.fluorescent from the rhisosphere for six cultivated crops.**

**Resumé :**

Isolation and purification performed from samples of the rhizosphere of cultivated crops (wheat, onion, carrot, lettuce, turnip and bean) in the EL-ASSAFIA (Laghouat, Algeria ) region, have isolated 43 isolates considers *Pseudomonas* spp.fluorescent.

After use the biochemical and physiological tests on these isolates we selected 21 strains *Pseudomonas* spp.fluorescent. among these strains and using the two keys Jacques (1994) and Bossis (1995) ,the responses of applied tests and API 20 NE gallery, we were able to join the 7 strains of *Pseudomonas* spp. fluorescens (C3, N15, L17, B20, B22, B26 and F31) au biovar III and two strains (N14 and B24) au biovar IV.

Testing the antagonistic activity of three strains C3, L17, F31 vis -à-vis the two phytopatogenic fungi *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (FOA1), *Fusarium culmorum* (BD11) on both media KB and PDA shows variability of responses on inhibition of mycelial growth.

The results obtained in this work are preliminary. We suggest to use genetic tests confirmed the phenotypic characters.

**Keywords:** Characterization, crops grown, rhizosphere, *Pseudomonas* spp. fluorescent, biochemical tests, API 20NE. antagonism

# **Introduction**

## **Introduction**

En agriculture, La recherche intensive de l'homme pour l'amélioration de la productivité et la réduction des coûts des produits agricoles ont eu des impacts négatifs à plusieurs niveaux. l'environnement en particulièrement sa qualité a été la plus menacé et la plus touchée : contamination de l'eau par une utilisation extrême de produits phytosanitaires et d'engrais de synthèse, présence dans les aliments de résidus nocifs pour la santé, appauvrissement des sols, réduction de la biodiversité du fait de la présence de mono cultures de masse, et particulièrement la perturbation de la vie microbienne.

Sur la base de ce constat, l'agro-écologie cherchera des solutions dans le but de garantir un développement agricole durable et compétitif, nécessaire pour couvrir des besoins croissants, tout en respectant l'environnement afin de récolter des aliments sains et de préserver environnement et les écosystèmes.

Le sol naturel est d'une extrême complexité biologique ou les interactions entre les micro-organismes y sont multiples, dans le sol, ces dernier représentent la majorité des organismes vivants constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2004) et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004).

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance saprophyte des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Whipps, 2001).

Certaines souches bactériennes promotrices de la croissance végétale (PGPR) considérée comme une technologie émergente et écologiquement très intéressante.

Le terme PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) désignant ces bactéries a été introduit par Kloepper et Schroth (1978). Différents mécanismes sont à l'origine des effets PGPR des bactéries rhizosphériques.

Parmi les bactéries d'intérêt agricole (PGPR), les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que bio- fertilisants pour améliorer le développement des racines via la production de certaines

phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg.2001). Telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA). Des cytokinines et des gibbérellines (Vessey, 2003), elles offrent un bon rendement même dans des conditions sévères (Ali *et al.*, 2009 ; Bano et Fatima, 2009).

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

Les *Pseudomonas* spp.fluorescents forment un groupe diversifié de bactéries qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert soluble dans l'eau (Palleroni *et al.*, 1973) qui sont les pyoverdines produites dans des milieux pauvres en fer (Palleroni, 1984). Ce sont des bacilles à Gram négatifs typiques, chimio-hétérotrophes mobiles avec un flagelle polaire et sont regroupés au sein d'un même groupe d'homologie rRNA I (Palleroni et al ; 1973).

Ces derniers permettent une compétition pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. Il a été noté également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Iavicoli *et al.*, 2003 ; Kim *et at.*, 2004).Les actions directes résultent des activités rhizobactériennes par la solubilisation de divers éléments minéraux et la production de régulateurs de croissance (Lemanceau,1992).

*P. fluorescens* est communément retrouvé dans le sol et dans l'eau, associé aux plantes, certaines espèces sont cliniques. Ces espèces peuvent être subdivisées en 5 biovars : I, II, III, IV et V (Stanier et al ; 1966). *P. putida* communément isolé du sol et de l'eau, est divisée en 3 biovars A, B (Stanier *et al.*, 1966; Palleroni, 1984, 2005), un d'importance mineur C (Barrett *et al.*, 1986). Ces travaux conduits sur la taxonomie de *P. fluorescens* et de *P. putida* montrent que la définition de ces espèces est obsolète, et qu'elles devraient être divisées en plusieurs espèces (Bossis *et al.*, 2000). La classification de la taxonomie de *P. fluorescens* (Couillerot *et al.*, 2009; Palleroni, 2010) et de *P. putida*

requiert des recherches complémentaires qui associent des méthodes phénotypiques récentes, et génotypiques (Palleroni. 2010).

Les *Pseudomonas* ont une capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Fenton *et al.*, 1992 : Chin-A-Woeng *et al.*, 2002).

Notre objectif à travers cette étude consistée à chercher des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhézosphère des cultures cultivées. L'étude de la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents rhizosphériques a été effectuée après isolement, purification et identification préliminaire des populations bactériennes. Alors notre expérimentation consiste à :

- Isoler à partir de la rhizosphère des plantes cultivées (blé, oignon, fève, navet, laitue, carotte), une population bactérienne spécifique en l'occurrence des *Pseudomonas* spp. fluorescents ;
- Identifier et caractériser ces isolats en réalisant des tests biochimiques et physiologiques, complétés par l'utilisation de la galerie API 20 NE.
- Recherche de l'activité antagonisme *in vitro* vis-à-vis de : des deux champignons phytopathogènes ( *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium culmorum* ).

# **Partie**

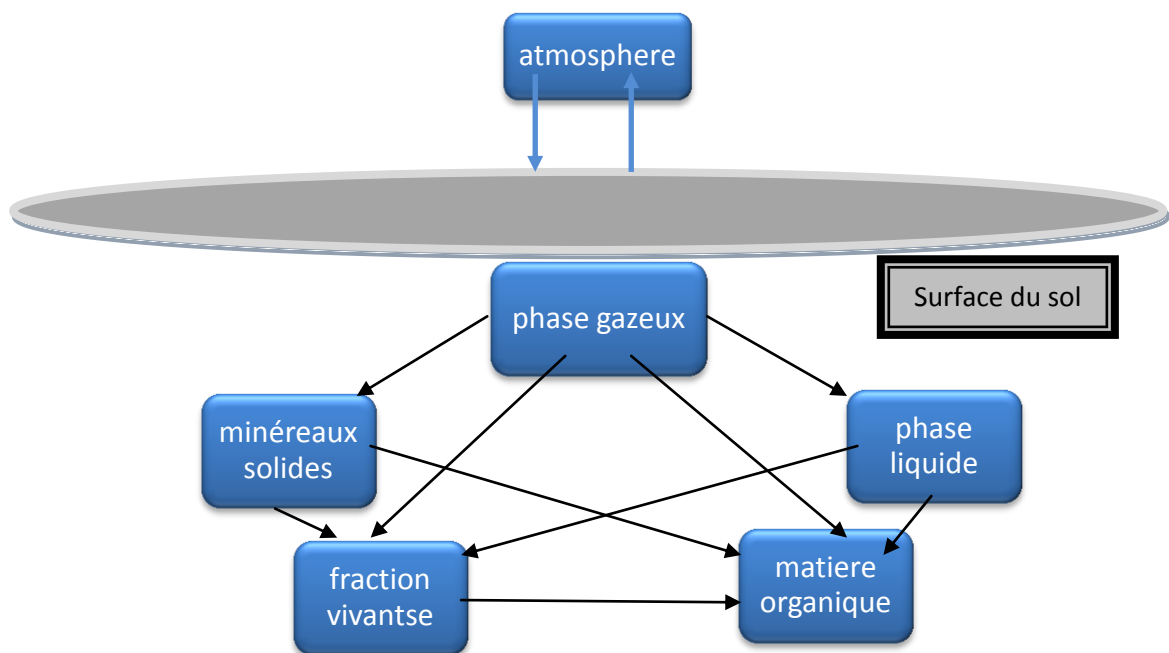
# **données bibliographiques**

## 1. Sol

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

Selon Fuchs (1999), le sol est un milieu complexe au sein duquel de nombreux éléments s'influencent mutuellement. Les réactions que l'on y observe sont de natures chimiques, physiques et biologiques. Il peut être divisé en cinq compartiments (figure 01).

En plus des interactions entre ces différents compartiments, le sol dans son ensemble est également influencé et réagit avec l'extérieur, c'est à dire l'atmosphère.



**Figure 01:** Les cinq compartiments du sol.

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

La matière vivante, visible ou non à l'œil nu, représente une quantité pas toujours facile à réaliser. Le tableau 01 représente la quantité de différentes matières vivantes qui se trouve dans le sol

**Tableau 01:** la quantité de différentes matières vivantes dans le sol

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

## 2. La rhizosphère

Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "rhizo" ou "rhiza" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou d'influence.

Hiltner (1904) fut le premier à définir la rhizosphère comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne.

Elle est caractérisée par une forte activité microbienne due au renouvellement des composés organiques assimilables issus des exsudats racinaires, des mucilages et des cellules épidermiques mortes. La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Keith *et al* ; 1986).

Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «l'effet rhizosphère» (Lemanceau, 1992 ; Whipps, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Dans la rhizosphère sensu stricto il faut distinguer :

- l'endorhizosphère (intérieur de la racine),
- le rhizoplan (surface racinaire),
- l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe *et al.*, 2008).

### **3. Rhizodépôts**

Une partie significative des photo-synthétases de la plante est directement libérée dans le sol sous forme de molécules organiques appelées « rhizodépôts ». Ces rhizodépôts représentent de 5 à 40% des produits de la photosynthèse (Nguyen. 2009). La plante modifie donc l'environnement rhizosphérique en libérant divers composés dans les rhizodépôts.

Les rhizodépôts jouent un rôle actif dans la régulation des interactions mutualistes et parasites/pathogènes, entre les plantes et les microbes du sol (Hirsch *et al.*, 2003).

Une grande diversité quantifiées et qualitatives des composés organiques libérés par les plantes est trouvée dans la rhizosphère. Elle peut être divisée en :

#### **3.1. Exsudats**

Les exsudats sont des composés hydrosolubles de faible poids moléculaire tels que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les phytosidérophores, les flavonoïdes, les hormones et les vitamines.

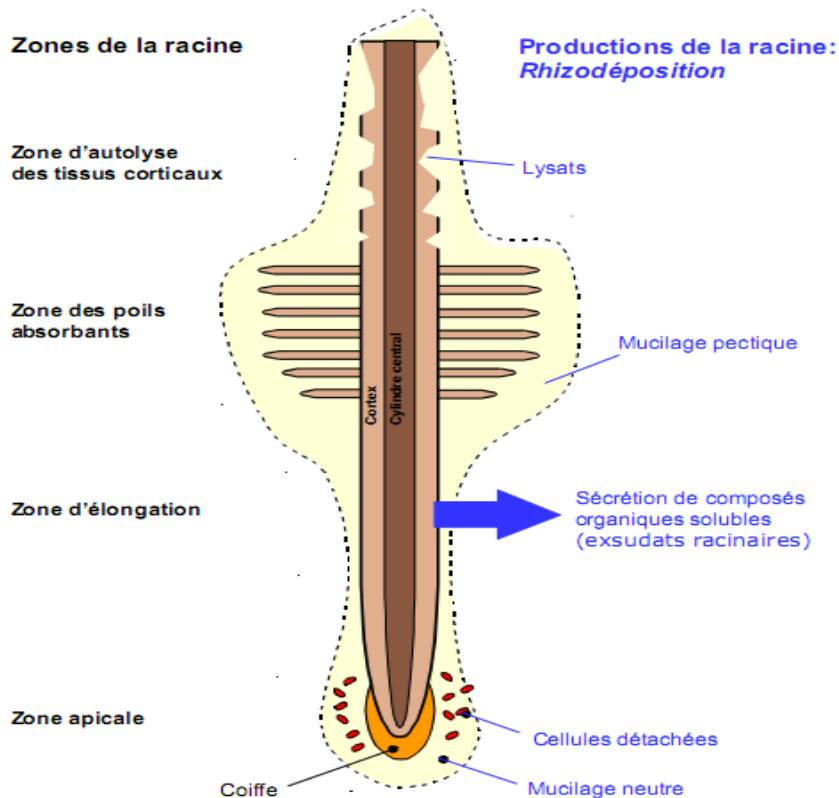
Ils sortent de la racine en suivant le gradient de concentration entre le cytosol de la racine et la solution du sol. La part des exsudats est la plus importante dans la rhizodéposition (Uren, 2007).

#### **3.2. Substances sécrétées**

Les substances sécrétées sont des composés de poids moléculaire le plus souvent élevé. Elles sont représentées par les mucilages, les polymères de carbohydrates et les enzymes. Leur libération dans le sol est dépendante du métabolisme énergétique. Elles jouent un rôle très important dans le maintien de la stabilité du sol (Kennedy et de Luna, 2004).

### 3.3. Lysats :

Les lysats sont libérés quand les cellules des tissus corticaux des racines s'autolysent, ils incluent aussi les cellules desquamées de la coiffe et les membranes cellulaires (Bell-Perkins et Lynch, 2002).



**Figure 02:** Diagramme simplifié d'une racine et des rhizodépôts (Arango et Tarnawski, 2002).

### 3.4. Gaz :

Les gaz comme l'éthylène, le CO<sub>2</sub> et d'autres composés volatiles sont exportés vers le sol par respiration.

Les rhizodépôts impliquent un effet qualitatif et quantitatif sur la microflore de la rhizosphère (Walker *et al.*, 2003). Celle-ci peut soit utiliser les biomatériaux libérés comme source d'éléments nutritifs soit être inhibée par eux (Walker *et al.*, 2003 ; Brimecombe *et al.*, 2008). Du fait de leur solubilité dans l'eau, leur mobilité, ainsi que leur incorporation rapide dans les cellules microbiennes, les rhizodépôts peuvent changer le taux de décomposition de la matière organique du sol dans l'environnement de la racine (Brimecombe *et al.*, 2008).

Le pH de la rhizosphère est également différent de celui du sol ambiant, la différence peut atteindre deux unités.

Cette différence de pH, observable principalement à l'extrémité des racines, joue un rôle important et influence particulièrement la solubilité et ainsi la disponibilité de divers éléments nutritifs. (biophyt ,1999)

Les rhizodépôts constituent donc un élément majeur de perturbation de la microflore tellurique qui en retour, influence la croissance et la santé des plantes et donc à nouveau l'émission des rhizodépôts.

#### **4. Micro-organismes de la rhizosphère**

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

De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Smith et Read, 2008 ; Sprent, 2001), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006).

La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu. Ces modifications quantitatives de la microflore, ou 'effet rhizosphère', s'accompagnent également de modifications qualitatives (van Loon, 2007).

La diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Latour *et al.*, 2009; Kowalchuk *et al.*, 2010) et leur activité métabolique diffèrent de celles du sol nu. Les populations aptes à percevoir les variations de l'environnement rhizosphérique et à adapter leur physiologie, sont favorisées et tirent profit de cette perturbation (Nannipieri *et al.*, 2008).

#### 4.1. Les champignons de la rhizosphère

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

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

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

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

#### 4.2. Les bactéries de la rhizosphère

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

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

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

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* (Gray et Smith, 2005) et *Streptomyces spp.* (Tokala *et al.*, 2002) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires.

Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

## **5. Généralité sur les *Pseudomonas***

### **5.1. Caractéristiques générales :**

Au sein de la population rhizosphériques, les *Pseudomonas* spp fluorescent sont prédominants et peuvent constituer plus de 60% de la flore bactérienne (Digat et Gardan, 1987)

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonaceae, ordre des Pseudomonales (Moore *et al.*, 2006).

Parmi les *Pseudomonas* spp fluorescent les deux espèces les *Pseudomonas* fluorescents et *Pseudomonas putida* constituent un intérêt particulier en lutte biologique qui sont des saprophytes à oxydase positive (Palleroni 1984)

#### **5.1.1. caractères morphologiques**

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe  $\gamma$  des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Avril *et al.*, 1992; Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004).

Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894). Certaines espèces sont assignées au la rhizobactéries des PGPR (Lemanceau, 1992).

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

#### **5.1.2. caractères écologiques**

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. (Bossis *et al.*, 2000 ; Viollet, 2012). La plupart des *Pseudomonas* sont très ubiquistes et

sont souvent isolés du sol, de l'eau, des poussières en suspension dans l'air (Palleroni *et al.*, 2005).

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

Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002).

De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Fenton *et al.*, 1992 ; Chin-A-Woeng *et al.*, 2001)

La température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5 (PH neutre). (Palleroni, 1984). Mais elle peut aussi se développer à une température aussi basse que 4°C.

### **5.1.3. caractères métaboliques**

Le catabolisme des xénobiotiques par les *Pseudomonas* spp fluorescents se caractérise en effet par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes dégradatives. Il présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une gamme importante de composés (Golovlera *et al.*, 1992). Enfin, certaines populations de *Pseudomonas* spp fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'azote (Clays-Josserand *et al.*, 1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara *et Zumft*, 1982).

Ces bactéries contribuent donc, de façon significative, à la réduction des nitrates (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose). Et des nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques (Latour *et Lemanceau*, 1997).

En raison de la richesse de leurs voies métaboliques. Elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide. (Euzeby, 2008).

Néanmoins, d'autres espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. (Viollet, 2010).

Les *Pseudomonas* produisent notamment, de nombreux métabolites antifongiques (AFM pour anti-fungal metabolite ; Weller *et al.*, 2002 et 2007).

Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Toutefois, certaines sont chimio-organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier.

Elles peuvent utiliser des sources de carbones variables, et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (Stanier *et al.*, 1966). La plupart étant saprophytes (Bossis *et al.*, 2000 ; Ramalho *et al.*, 2002).

#### **5.1.4. Caractères biochimique**

L'aptitude de certains isolats à dégrader des substances xénobiotiques a également retenu l'attention de différents chercheurs (Latour et Lemanceau, 1997 ; Bossis *et al.*, 2000). De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes.

L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Campbell *et al.*, 1995 ; Latour *et al.*, 1996).

### **6. Classification du genre *Pseudomonas***

Par définition les bactéries du genre *Pseudomonas*, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies. Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (Palleroni, 2008).

### 6.1. Etapes de classification :

Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques fût atteint par Palleroni et ses collaborateurs. Qui ont classifiés ce groupe bactérien en cinq sous-groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN (Palleroni *et al.*, 1973).

Toutefois ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et finalement seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas*. (Peix *et al.* ; 2009).

Pourtant dans l'édition de 1974 du Bergey's Manual, ces bactéries sont incluses dans la famille des Pseudomonaceae. Leur classification repose sur des caractéristiques phénotypiques, seules la composition en G+C fût rajouté comme caractéristique génétique. Dans la première édition du Bergey's Manual, la classification basée sur les cette homologie ARN/ADN fût incluse, mais le nombre d'espèces et les caractéristiques phénotypiques ont été maintenu (Palleroni, 1984).

En 1960 Stanier *et al.*, dans une approche de clarification de la taxonomie du genre, ont publié un travail reportant les caractéristiques nutritionnelles de 267 isolats du genre ; basé sur l'utilisation de 146 composés organiques, en plus d'autres tests considérés comme déterminants dans la classification du genre. Permet de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN (Colwell et Mandel, 1964; Colwell *et al.*, 1965; Johnson et Ordal, 1968).

Permis plus tard la subdivision par Kersters *et al.* (1996) des protéobactéries en 15 genres appartenant aux classes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  proposé par Stackebrandt *et al.* (1987).

Depuis 1990, le séquençage du gène codant ARNr 16S a débuté, et est appliqué pour toutes les bactéries connus. Partiel au début, mais plus tard des génomes entiers ont été séquencés et déposés dans les banques de données. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres représentant les similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (Peix *et al.*, 2009).

L'identification taxinomique exacte d'un micro-organisme est essentielle pour distinguer les espèces et les souches pathogènes de celles qui ne le sont pas. Une approche polyphasique est utile pour identifier correctement la souche de *Pseudomonas fluorescents*.

Le genre *Pseudomonas* « sens strict » dérive de la sous-classe des Proteobactéries et contient en grande partie des *Pseudomonas* fluorescents et peu d'espèces non fluorescentes. *Pseudomonas* fluorescent et *Pseudomonas putida* sont des bactéries ubiquistes qui peuvent se développer dans le sol, dans l'eau et particulièrement au niveau des rhizosphères des plantes.

Plusieurs chercheurs (Jessen, 1965; Lettiot *et al.*, 1966; Stanier *et al.*, 1966) ont montré que les espèces de *P. Fluorescent* et *P. putida* sont très hétérogènes.

D'autres méthodes de taxonomie ont été proposés par (Sneath *et al.*, 1973) suite aux limites de taxonomie phénotypiques. Cette méthode de classification est basée sur un nombre important de propriétés phénotypiques faisant recours à un nombre considérable de souches pour établir une taxonomie numérique.

Un minimum de 50 caractères comme les caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques, nutritionnel et critères sérologiques attentivement choisie, sont requière pour chaque analyse. Les similarités entre les souches ont été calculées par l'utilisation d'un indice numérique qui révèle une paie de souche de similarité.

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres les plus diversifiés, et sa taxinomie a subi de nombreux changements. Des études antérieures ont donné lieu à la division du groupe *Pseudomonas fluorescents* en cinq biovars (de I à V, synonymes des biotypes A, B, C, F et G) en fonction de caractéristiques phénotypiques tels que les essais métaboliques, la composition de l'acide gras et les profils des protéines (Palleroni, 2005).

La taxonomie du groupe de *Pseudomonas* fluorescents est continuellement à l'étude. Même si les caractéristiques phénotypiques et les biovars de I à V sont toujours valides pour identifier les souches de *Pseudomonas fluorescens*, la caractérisation moléculaire est plus 8 fiable pour démontrer les relations phylogénétiques et les variations entre les souches de *Pseudomonas fluorescents* et les espèces de *Pseudomonas* étroitement apparentées. Cette caractérisation comprend des analyses complètes des séquences génomiques (Ivanova *et al.*, 2003 ;Paulsen *et al.*, 2005; Silby *et al.*, 2009).

### **6.1.1. Classification contemporaine**

L'édition actuelle du Bergey's (Palleroni, 2005) compte de nombreuses méthodes utilisées dans la classification des *Pseudomonas*, ces méthodes révèlent les efforts fournis

pour la caractérisation des espèces de *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les caractéristiques génétiques et écologiques, le pouvoir pathogène et la structure antigénique. (Peix *et al.*, 2009)

### **6.1.2. Caractéristiques phénotypiques**

Comprennent les tests tels que : la forme cellulaire, le type de flagelle, l'utilisation des sources de carbones tel que : les acides organiques, les polyols, les acides aminés, la capacité de croissance dans des conditions de culture variables, la synthèse d'exo-enzymes et la production d'antibiotiques (Palleroni, 2005).

## **6.2. Interactions de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère**

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents associés aux plantes incluent des souches pathogènes et des souches bénéfiques. Les souches influençant avantageusement l'hôte végétal sont désignées sous le terme « plant- probiotic fluorescent *Pseudomonas* spp. » (Höfte et Altier, 2010).

Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines (Lemanceau, 1992).

Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses que le piétin échaudage des céréales, les pourritures des tubercules de pomme de terre, les fusarioses des racines et du collet de la tomate (Bell-Perkins et Lynch, 2002).

Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ces bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive. Puis elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère (Lemanceau, 1992 ; Brimecombe *et al.*, 2008).

Les exsudats racinaires, et en particulier les sucres et les acides aminés, attirent les bactéries par chimiotactisme à la surface des racines. Ils stimulent notamment la mobilité flagellée des bactéries, ce qui permet à ces dernières de coloniser la rhizosphère (de Weert *et al.*, 2002). Chez *P. fluorescens* WCS417 les chaînes lipo-polysaccharides latérales constituant l'antigène O des LPS bactériens jouent un rôle important dans la colonisation racinaire (Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

### 6.2.1 Effets directs

Les espèces de *Pseudomonas* affectent également la croissance des plantes en améliorant leur alimentation minérale. *Pseudomonas striata* , *P. cissicola* , *P. fluorescens*, *P. pinophilum*, *P. putida* , *P. syringae* , *P. aeruginosa* , *P. putrefaciens* et *P. stutzeri* isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, du maïs, du soja et d'autres céréales solubilisent efficacement les phosphates (Tilak *et al.*, 2005).

#### 6.2.1.1. Solubilisation des phosphates

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques ( $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ) (Ramos Solano *et al.*, 2008b ; Keneni *et al.*, 2010). Les *Pseudomonas putida* sont des exemples de bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate inorganique en produisant de l'acide gluconique et l'acide 2- céto gluconique (Khan *et al.*, 2009).

Elles sont aussi capables de minéraliser le phosphate organique par l'excrétion des enzymes extracellulaires telles les phosphatases, les phytases et C-P lyases (Kim *et al.*, 1998 in Weyens *et al.*, 2010)

#### 6.2.1.2. Production de sidérophores

Le fer est un élément capital aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer ( $Fe^{3+}$ ) (Compant *et al.*, 2005), mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance des bactéries et des plantes. La plupart des microorganismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores. Ce sont des substances de faible poids moléculaire et servant de transporteur de l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  à l'intérieur de la cellule microbienne (Jacques *et al.*, 1993).

Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992).

Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autres microorganismes. Elles peuvent aussi reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces

dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent (Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

Ils jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels le Zn et Pb (Dimkpa *et al.*, 2009).

#### **6.2.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale**

Il existe cinq catégories des régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.*, 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007).

D'autre part, la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) par *Pseudomonas putida* GR12-2 améliore le rendement du colza (Patten et Glick, 2002). La stimulation du métabolisme hormonal de la plante via la sécrétion de phytohormones telles les auxines, les cytokinines et les gibbérellines favorisent le développement racinaire et par conséquent la croissance végétale (van Loon, 2007 ; Sandhya *et al.*, 2010).

### **6.2.2. Effets indirects**

#### **6.2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments**

L'adsorption des bactéries à la racine résulte d'interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine (Lemanceau, 1992). Cette seule colonisation peut entraîner une occupation de sites suffisantes pour empêcher la croissance des pathogènes (Kamilova *et al.*, 2005).

Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005).

Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant la colonisation racinaire sont la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme, les lipopolysaccharides (LPS), la capacité de synthétiser des vitamines et des macromolécules et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

#### 6.2.2.2. Antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels  $\beta$ -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001).

Des métabolites produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent également interférer avec la croissance des phytopathogènes. Le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et les différents dérivés de la phenazine jouent un rôle très important dans son activité antagoniste contre *Gaeumannomyces graminis* (agent de la piétine échaudage). La production de HCN par la souche de *P. fluorescens* CHA0 réduit la pathogénicité des champignons tels *Thielaviopsis basicola*, agent de la pourriture noire du tabac ((Defago, 1993 ; de Souza *et al.*, 2003 ; Haas et Defago 2005 ; Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

#### 6.2.2.3. Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (van Loon, 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008).

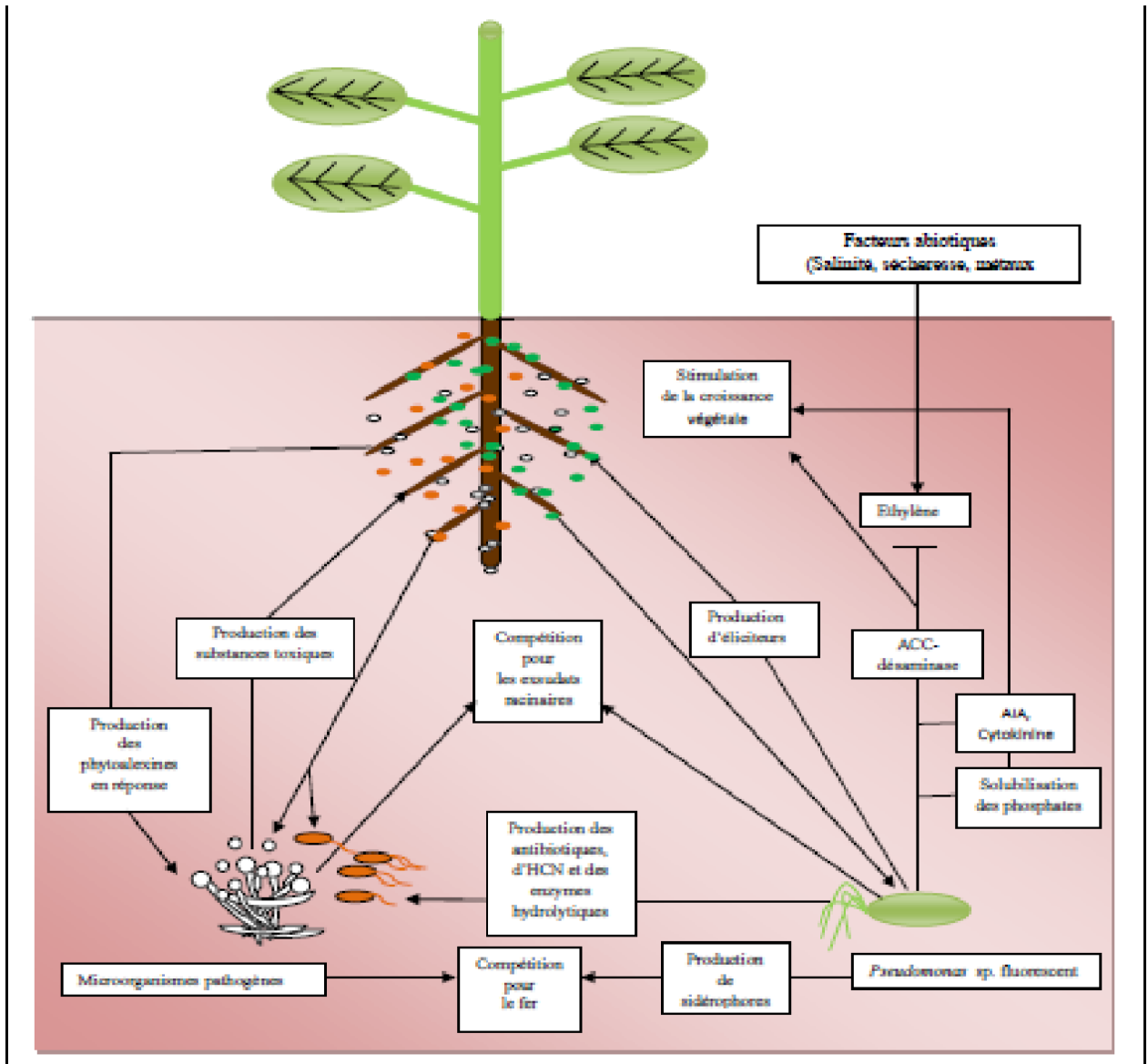
Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartiennent au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcescens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont capables de synthétiser de nombreuses molécules appelés « déterminants ou éliciteurs ». Elles sont impliquées dans l'induction ou la potentialisation des réactions de défense de la plante et conduisant à leur tour à la mise

en place d'une ISR. Ces molécules sont de natures variées et pouvaient être divisées en trois classes :

- des composants de surface cellulaire (e.g. LPS) ;
- des métabolites à activité chélatrice du fer (e.g. sidérophores, acide abscissique) ;
- des molécules à activité antibiotique (e.g. HCN, DAPG) (van Loon et Bakker, 2005).

Les éliciteurs stimulent la production, par la plante, de phytoalexines toxiques vis-à-vis du pathogène (Ramos Solano *et al.*, 2008 ).



**Figure03 :** interaction entre les pseudomonas spp.Fluorescents, les microorganismes pathogènes et les cellules racinaires

### 6.3. *Pseudomonas* spp. Face aux stress abiotiques

Divers rhizobactéries, regroupées sous le terme PGPR, ont une capacité à promouvoir la croissance de leur plante hôte par des effets sur : la nutrition, l'architecture racinaire ou la santé de leur partenaire végétal (Grover *et al.*, 2010).

Ils peuvent aussi déclencher l'expression des mécanismes de la tolérance systémique induite (TSI) vis-à-vis de différents facteurs de stress abiotiques tels la sécheresse, la salinité et les métaux lourds (Yang *et al.*, 2009) (Fig. 4).

L'inoculation de la souche *Pseudomonas* AMK-P6, par exemple, induit une thermotolérance au sorgho (47-50°C) ; ceci est réalisé par une amélioration de sa biomasse végétale ainsi que de sa teneur en chlorophylle, en sucres, en acides aminés et en proline (Ali *et al.*, 2009).

Chez le maïs (*Zea mays*), l'inoculation de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* induit une réaction de tolérance au sel se traduisant par une augmentation de la production de proline, un maintien de la teneur en eau dans les feuilles et une absorption sélective des ions K<sup>+</sup> (Bano et Fatima, 2009). Malgré la présence de cadmium, la croissance du colza (*Brassica napus*) pourrait améliorer suite à l'inoculation des souches de *Pseudomonas* (*tolasii* ou *fluorescens*) résistantes au cadmium.

La production de sidérophores, de l'AIA et l'expression de l'ACC-désaminase par ces dernières permet de diminuer la toxicité de ce métal (Dell' Amico *et al.*, 2008).

Certaines espèces de *Pseudomonas* possèdent la machinerie enzymatique nécessaire à lever l'inhibition de la croissance végétale causée par une forte production d'éthylène. Par exemple *Pseudomonas putida* qui possèdent l'ACC-désaminase confèrent une résistance efficace au blé et au colza, en abaissant la synthèse d'éthylène induite par un stress salin (Zahir *et al.*, 2009 ; Cheng *et al.*, 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* R75 et *P. savastanoi* CB35 peuvent améliorer la croissance d'Elyme de Daourie (*Elymus dauricus*) par la dégradation des contaminants organiques tels les chloro-benzoates (Zhuang *et al.*, 2007). Les naphthalènes sont dégradés par *P. putida* (Kuiper, 2001).

Les exopolysaccharides (EPS) produits par *Pseudomonas putida* GAP-P45 jouent un rôle positif dans les phénomènes de régulation de la teneur en eau, et la diffusion de la source de carbone aux plantes notamment dans des conditions de stress hydrique (Sandhya *et al.*, 2009).

# **Matériel et méthode**

## Matériels et méthodes

### 1. Origine des échantillons du sol

Dans notre travail les isollements bactériens utilisés sont issue a partir d'échantillon de sol rhizosphérique prélevé au niveau de plusieurs culture cultivé : blé, oignon, fève, navet, laitue et carotte.

Pour le but d'obtenir des souches de *Pseudomonas* spp, Le sol a été prélevé en févriers 2014 à partir d'une exploitation situe dans la région d'EL ASSAFIA (Laghouat). Cette région est caractérisé par la présence de plusieurs champ de culture et de différent type de culture cultivé.

De cette exploitation, après avoir écarté la couche superficielle du sol, nous avons prélevé des échantillons de 500 g composé du sol de la zone rhizosphérique de chacun des espèces (blé, oignon, fève, navet, laitue, carotte).

Les échantillons sont prélevés à une profondeur de 15-20 cm, et ont été mis dans des sacs en plastique stérile portant de date, température et nom d'espèce marqué par marqueur permanent. Les échantillons sont transportés au laboratoire pour subir les analyses.

### 2. Méthode d'isolement

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

Pour la préparation de la solution mère, une quantité représentative de (1 g) du sol prélevé aléatoirement de chaque échantillon a été mise dans un tube d'essai contenant 9 ml d'eau distillé stérile.

Après l'agitation avec le vortex, un (1) ml de la solution mère de chaque échantillon a été prélevé et mis dans des tubes contenant 9ml d'eau distillé stérile. Une série de dilution en cascades est préparée jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-6}$  (Figure 4).

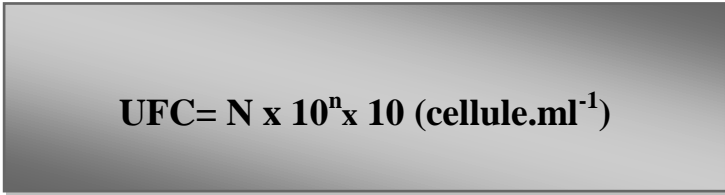
Nous avons étalé à l'aide de pipette de Pasteure 0,1 ml de chaque dilution sur deux milieux de cultures, un milieu général LPGA (Smidi, 1982) et un autre milieu sélectif King B (King *et al.*, 1954).

Les opérations d'isolement ont été effectuées avec les dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  à raison de deux répétitions pour chaque dilution sur les deux milieux (KB et LPGA). L'ensemble des boîtes a été incubé à une température de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24h à 48h.

### 3. Dénombrement des bactéries

Après 24 h et 48h d'incubation, à l'aide de l'appareil compteur de colonies, nous avons effectué le comptage des colonies sur les deux milieux pour estimer le nombre des bactéries viables. Le dénombrement consiste à calculer les bactéries présentes sur les boîtes en Unité Formant Colonie (UFC). Le comptage se fait macroscopiquement. Pour le calcul, seules les boîtes ayant 30 à 300 colonies sont retenues (Klement *et al.*, 1990). (Figure 4).

Nous avons utilisé la formule suivante (Klement *et al.*, 1990):

A rectangular box with a grey gradient background and a thin black border. Inside the box, the formula for UFC is written in black text.
$$\text{UFC} = N \times 10^n \times 10 \text{ (cellule.ml}^{-1}\text{)}$$

N : la moyenne entre le nombre de colonies dans les boîtes de la même dilution ;  
n : le nombre de dilution.

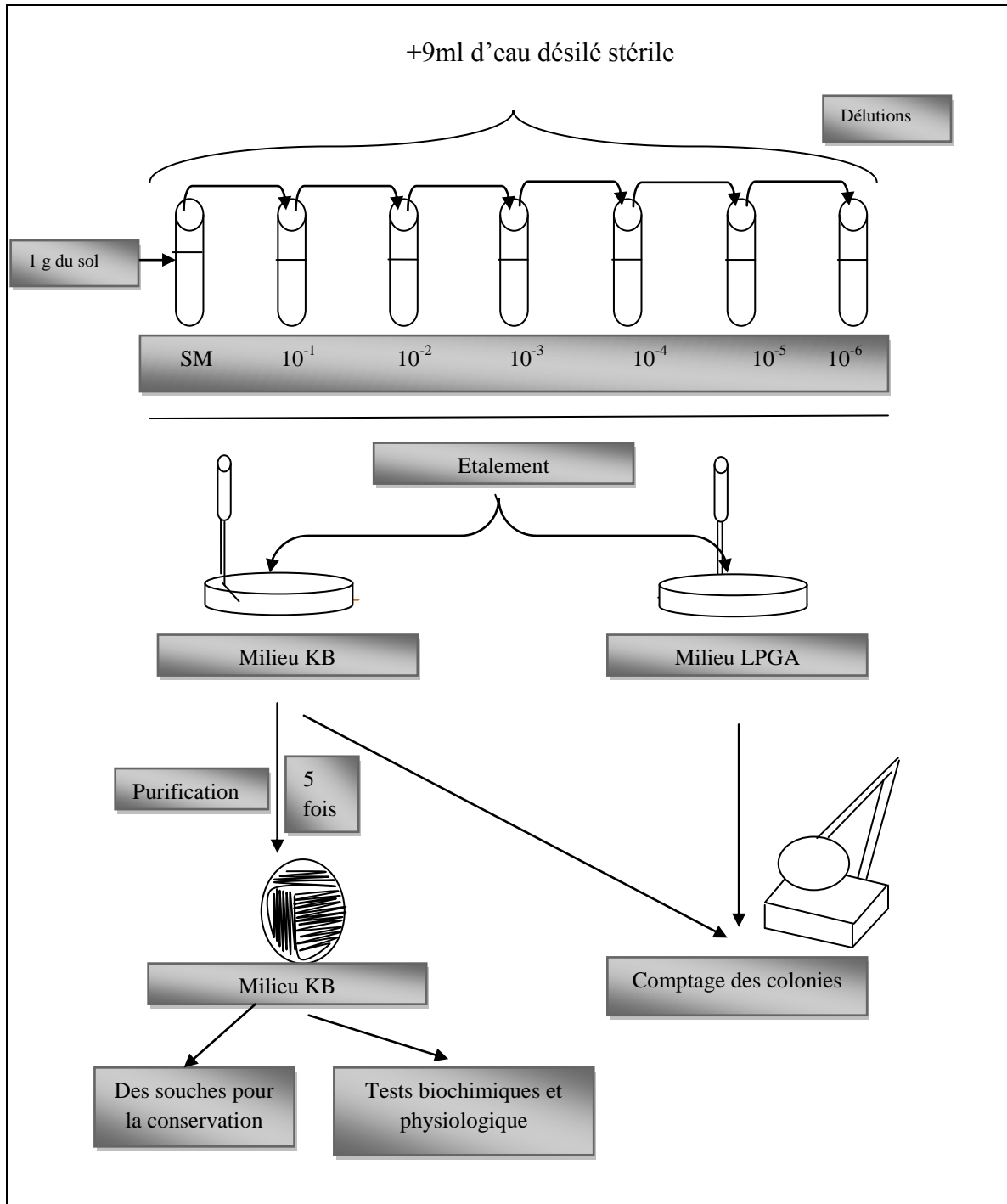
### 4. Méthode de purification

Après 48 h d'incubation, le choix des colonies bactériennes est basé sur les critères macro morphologiques reconnus chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Palleroni, 1981), le contour et l'aspect des colonies aussi que leurs dimension. sur le milieu LPGA, en plus de ces critères nous avons recherché des colonies fluorescentes (celles produisant un pigment fluorescent repère à l'œil nu) sur KB. Ces colonies ont été repiquées sur le milieu de culture KB.

Nous avons effectué des opérations de repiquages successives (environ cinq) jusqu'à l'obtention de colonie bactérienne pure sur le milieu de culture KB.

## 5. Conservation des isolats

Les isolats bactériennes pures issues après la purification sont repiquées dans des tubes contenant le milieu KB additionné du glycérol sont mis au réfrigérateur à  $4 \pm 2$  °C pour les utiliser ultérieurement.



**Figure04 :** isolement et purification des bactéries.

## **6. Identification et caractérisation taxinomique**

### **6.1. Critère d'identification**

#### **6.1.1. Production du pigment fluorescent**

La production du pigment fluorescent a été recherchée sur milieu KB après une incubation de 24 à 96 heures à une température de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , le développement du pigment fluorescent a été révélé à l'œil nu.

#### **6.1.2. Tests biochimiques et physiologiques**

L'identification préliminaire de *Pseudomonas* spp. fluorescents, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de l'oxydase, croissance en anaérobiose, levane sucrase, arginine dishydrolase, hypersensibilité de Tabac, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (Figure 05) (Schaad *et al.*, 2001).

Aussi, l'identification est basée sur les clés dichotomiques de Jacques, (1994) et Bossis, (1995) (Figures 06 et 07) et la galerie API20NE.

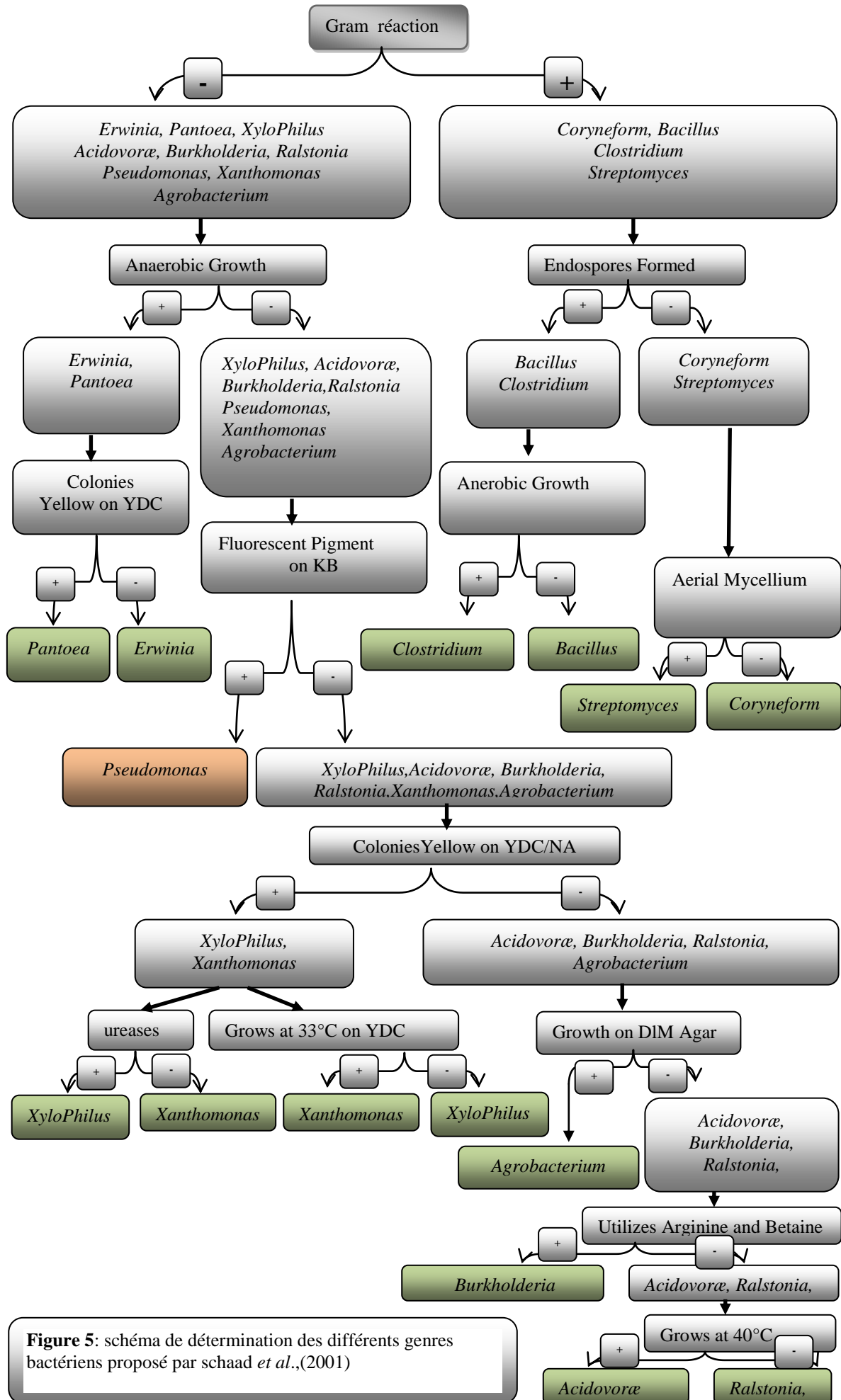
## **7. Tests biochimiques et physiologiques**

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries. Grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées. Ces tests sont utilisés pour identifier les *Pseudomonas* spp. fluorescents

### **7.1. Test de Gram**

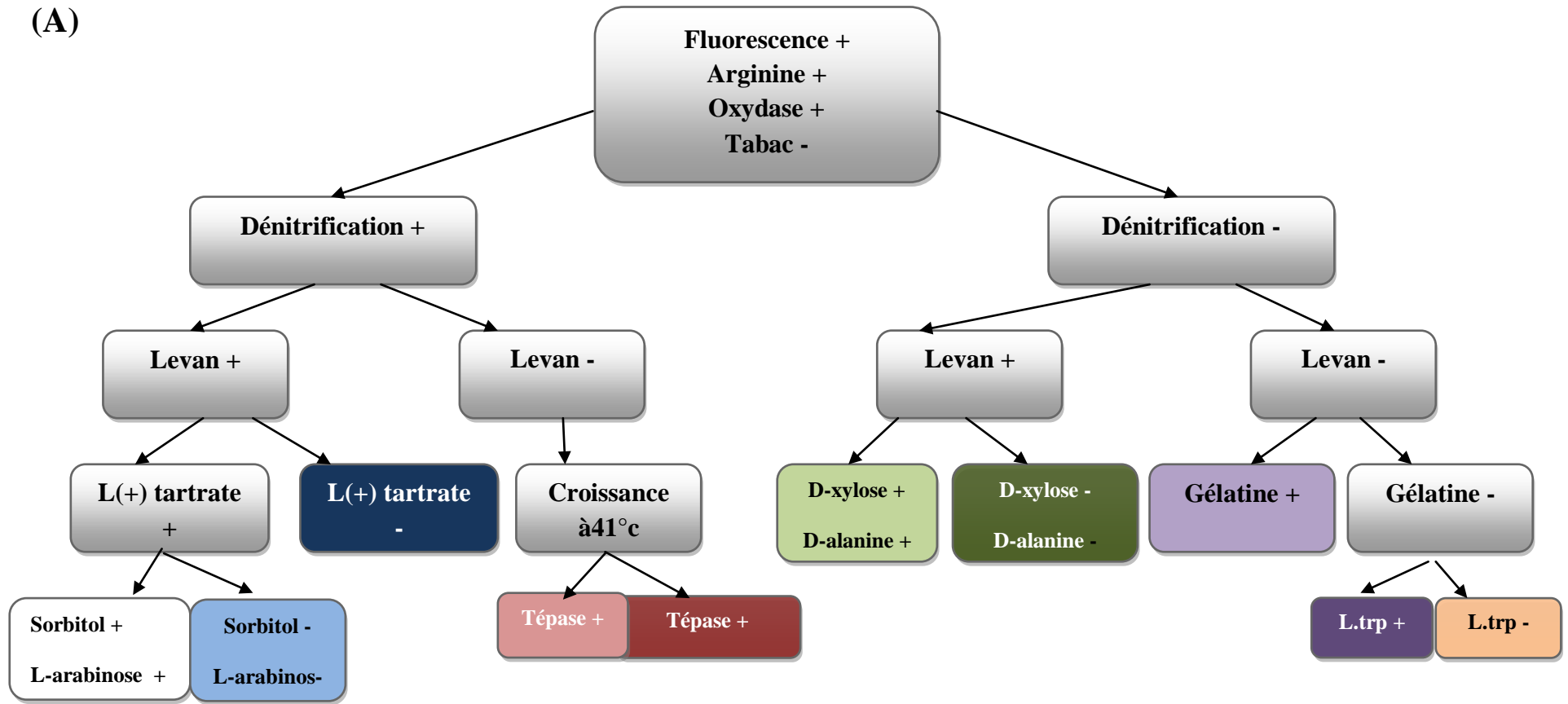
#### **7.1.1. Test de KOH**

Le test de KOH est un test rapide, qui a été effectué pour montrer le type de gram (positif ou négatif). Deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 3% ont été mis en contact avec la crème bactérienne de chaque isolat en effectuant un mouvement circulaire la solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s (Suslow *et al.*, 1980).



**Figure 5:** schéma de détermination des différents genres bactériens proposé par schaad *et al.*, (2001)

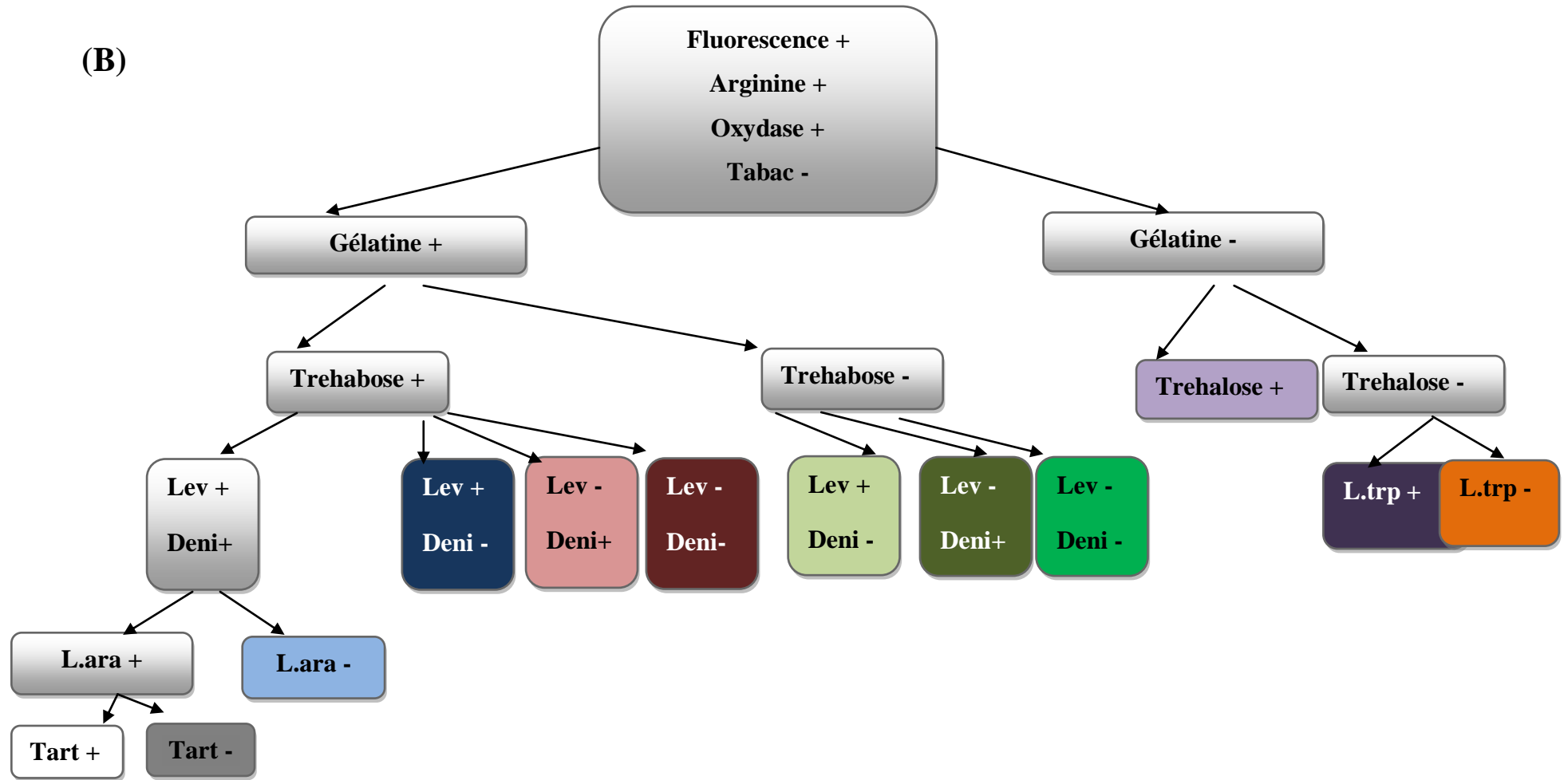
(A)



P.fluor bv.IV	P.chloro	P.chloro	P.fluor bv.II	P.fluor bv.III	P.fluor bv.I	P.aureo	P.fluor bv.V	P.put bv.B	P.put bv.A
---------------	----------	----------	---------------	----------------	--------------	---------	--------------	------------	------------

Figure 06 : La clé dichotomique (A) proposé par Jacques (1994) pour identification de *Pseudomonas* spp. fluorescents

(B)



<i>P.fluor</i> <i>bv.IV</i>	<i>P.fluor</i> <i>bv.II</i>	<i>P.chloro</i>	<i>P.fluor</i> <i>bv.I</i>	<i>P.fluor</i> <i>bv.III</i>	<i>P.fluor</i> <i>bv.V</i>	<i>P.aureo</i>	<i>P.fluor</i> <i>bv.III</i>	<i>P.fluor</i> <i>bv.V</i>	<i>Intermediere</i> <i>P.fluor/P.put</i>	<i>P.put</i> <i>bv.B</i>	<i>P.put</i> <i>bv.A</i>
--------------------------------	--------------------------------	-----------------	-------------------------------	---------------------------------	-------------------------------	----------------	---------------------------------	-------------------------------	---	-----------------------------	-----------------------------

Figure 07 : La clé dichotomique (B) proposé par Bossis (1990) pour identification de *Pseudomonas* spp fluorescents .

### 7.1.2. Coloration de Gram

La coloration a été effectuée selon la méthode classique.

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

Sur une lame porte le code de chaque isolat étudié, avec une anse de platine nous avons prélevé et étalé une couche mince de la colonie bactérienne isolée d'une culture pure sur une goutte d'eau distillée stérile.

Après séchage de la lame nous avons ajouté de violet de gentiane et laissé agir une minute ; puis nous avons jeté l'excès du colorant est rincé par l'eau distillée stérile.

Nous avons versé sur la lame quelque goutte de Lugol, et laissé agir 1 minute, nous avons incliné la lame et laissé tomber goutte à goutte l'éthanol pure jusqu'à ce qu'il s'écoule incolore à l'extrémité inferieur.

Nous avons arrêté la différenciation par un lavage abondant à l'eau distillée, recoloré par la fuschine et laissé agir pendant une minute. Nous avons rincé par l'eau distillée stérile, séché la lame et en fin nous avons observé sous microscope optique, à (G: 10 x100x1.25).

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

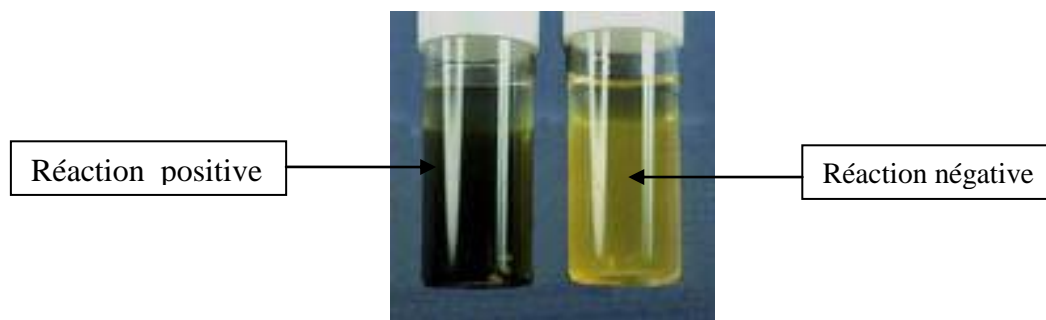
### 7. 2. Croissance en anaérobiose (Test de Hugh Leifson) :

Le milieu de Hugh et Leifson (Annexe1) permet de distinguer entre les deux processus. La dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu : lors des respirations le glucide est oxydé en CO<sub>2</sub>, par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral); Lors des fermentations le glucide est oxydé en acides, alcools, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement. Toutes les voies fermentaires ne sont cependant pas également acidifiantes (Schaad *et al.*, 2001).

Nous avonsensemencé les bactéries par piqûre centrale dans un tube d'essai contenant un milieu de Hugh et Leifson puis nous avons ajouté environ 1cm d'huile de

paraffine stérile. Laissé les tubes en incubation à une température  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , pendant 24 à 48h.

Le milieu de Hugh et Leifson contient un indicateur de pH. Le bleu de bromothymol qui prend une couleur jaune en milieu acide. Une réaction positive se traduit par obtention de la couleur jaune (Les bactéries oxydent le glucide par respiration. la réaction négative (-) les bactéries inactives ou inertes ne change pas la couleur verte du milieu (fig 8).



Source : [www.agrireseau.qc.ca](http://www.agrireseau.qc.ca)

Figure 8 : Test de Hugh Leifson

### 7.3 . Catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde-de d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). L'enzyme catalase est produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène.

Sur une lame en verre propre nous avons déposé une goutte de l'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et par une pipette de pasteur on met une colonie bactérienne, après quelque seconde nous avons vu la réaction obtenue. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène, la réaction négative (-) est reconnue par absence de bulles (fig9) (Léry *et al.* , 1992).



Source : [www.agrireseau.qc.ca](http://www.agrireseau.qc.ca)

Figure 9 : Test de catalase

## 7.4. Test de LOPAT

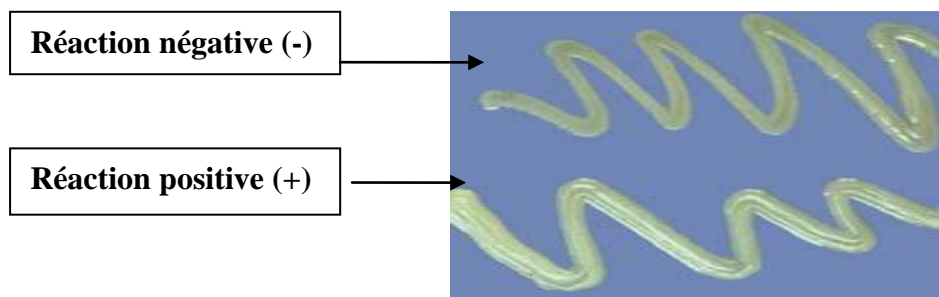
Les tests à effectuer pour identifier les espèces de *Pseudomonas* spp fluorescents sont: production de Levane, présence d'oxydase, dégradation de la pectine (pectinase), présence d'arginine déshydrogénase et hypersensibilité sur tabac (Schaad. *et al.*, 2001).

### 7.4.1. Production de Levane sucrase

Le test Levane sert à vérifier la polymérisation du fructose en poly-fructose par la bactérie (Schaad *et al.*, 2001). Les souches qui possèdent une Levane sucrase vont scinder le saccharose en glucose et fructose.

Chaque boîtes de Pétri contenant le milieu Levane (Annexe1) est divisé en trois secteurs pour tester trois souches bactériennes au même temps. Avec l'anse de platine, nous avons ensemencé les bactéries jeunes isolat par striés, nous laissons les boîtes en incubation à  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48 heures.

Pour une réaction positive (levane +) une strie partiellement saillante et luisante est observé en vue du dessus, ainsi que la présence d'une zone opaque et luisante en marge de la strie en vue du dessous (Lelliot et Stead. 1987: Hildebrand, 1988). Une réaction négative (levane-) s'exprime par une strie prostrée et non luisante (fig 10)



Source : [www.agrireseau.qc.ca](http://www.agrireseau.qc.ca)

**Figure 10 :** Test de Levane

#### 7.4.2. Test d'oxydase:

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

Sur une lame propre, nous avons placé un disque d'oxydase (MASTDISCS ID™), à l'aide d'une pèpète de pasteur stérile, nous avons prélevé et étalée une colonie bactérienne jeune âgée de 24 h sur le disque.

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

#### 7.4.3. Test de pectinase

Le test pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie (sa capacité à dégrader la pectine).

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

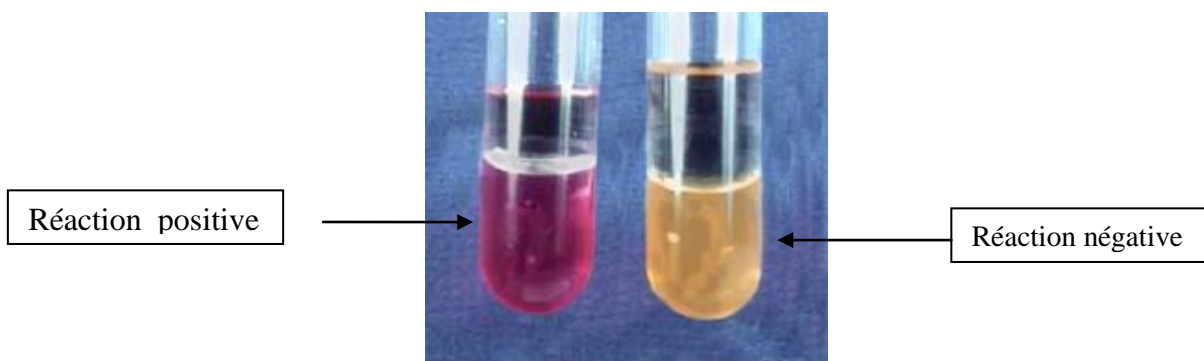
La suspension bactérienne a été préparée à une concentration supérieure à  $10^7$  UFC/ml, en mettant de la crème bactérienne jeune âgée de 24 h dans de l'eau physiologique stérile (0,09% de NaCl).

A l'aide d'un scalpel, nous avons réalisé un petit creux au centre des tranches. Un volume de 0,1 ml d'une suspension bactérienne de chaque isolat a été mis dans le creux réalisé. Nous les avons mis en incubation à une température de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 10 à 14 jours. La réaction positive (+) indique qu'il y a eu la dégradation de la pectine du milieu et se traduit par la couleur marron à la surface et une odeur spécifique. pour une réaction négative (-) aucun changement n'est observé sur les tranche de pomme de terre (Schaad *et al.*, 2001).

#### 7.4.4.: Test d'arginine déshydrolase

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

Nous avons ensemencé les isolats par piqûre centrale à l'aide d'une anse de platine la bactérie dans un tube d'essai contenant le milieu d'arginine (Annexe 1) et ajouté environ 1 cm d'huile de paraffine stérile. Après 5 jours d'incubation à une température de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , l'apparition d'une couleur jaune orangé indique une réaction négative, si le milieu demeure rosé c'est une réaction positive et l'isolat en question est un arginine positif (Figure 11)



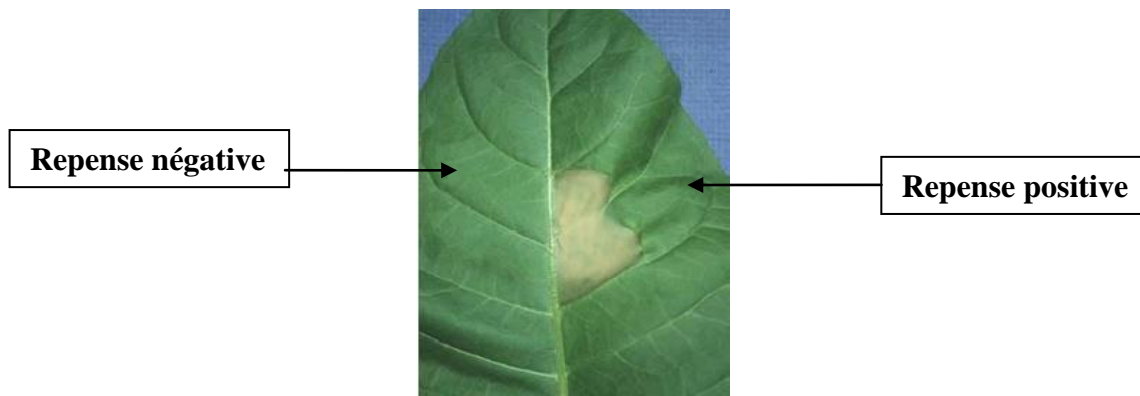
Source : [www.agrireseau.qc.ca](http://www.agrireseau.qc.ca)

Figure 11 : Test d'arginine déshydrolase

#### 7.4.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac

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

Nous avons préparé la suspension bactérienne à partir d'une culture jeune âgée de 24h dans 5ml d'eau physiologie stérile, à une concentration supérieure à  $10^7$  UFC/ml. À l'aide d'une seringue stérile de 1 ml, nous avons inoculé l'espace intracellulaire le long de la nervure centrale de la face inférieure de feuille de Tabac. Les plantes sont placées dans une salle à la température ambiante pendant 24h à 72h. Pour la repense positive la zone foliaire inoculée avec la bactérie devient légèrement translucide et a un aspect humide, une coloration brun clair à beige. Dans le cas d'une repense négative aucun changement de la couleur et l'aspect du tissu (fig12).



Source : [www.agrireseau.qc.ca](http://www.agrireseau.qc.ca)

**Figure12:** Test d'hypersensibilité sur Tabac

### 7.5. Test de gélatinolyse

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

Nous avons ensemencé chaque isolat par piqûre centrale, à l'aide de l'anse de platine, la bactérie jeune de 24 heures dans un tube d'essai contenant 8ml du milieu gélatine(Annexe 1). Les tubes sont ensuite incubés  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de 3 à 10 jours. Après l'incubation, avant la lecture des résultats les tubes sont déposés à une température de  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min en présence d'un témoin non ensemencé pour vérifier la liquéfaction de la gélatine.

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

### 7.6. Nitrates réductase

La réduction des nitrates décrite par Gardan et Luisetti (1981) est déterminée sur milieu EPN (Annexe1), Nous avons ensemencé les isolats par piqûre centrale à l'aide de l'anse de platine, les bactéries jeunes de 24 h dans un tube d'essai contenant 8ml de milieu EPN, incubés à une température de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours.

La lecture des résultats se fait après addition des deux réactifs spécifiques révélateurs des nitrates 1 et 2 et/ou une pincés de zinc, les notations des réactions sont en fonction des colorations obtenue en indiquant la réduction des nitrates en nitrite, La dénitrification ou l'absence de réduction de nitrate.

### 7.7. Production du pigment fluorescent

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

La composition du milieu influence sur les bactéries, précisément sur l'élaboration des pigments ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents : King A et King B.

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

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

A partir d'une culture bactérienne jeune âgée de 24h, nous avonsensemencé une colonie bactérienne de chaque isolat dans des tubes contenant du milieu KB et du milieu KA. Laissé les tubes en incubation à une température  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , pendant 48h à 72h.

L'apparition de la couleur bleue sur le milieu King A (présence de pyocyanine), la couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B (présence de pyoverdine). Observé à l'œil nu ou sous lumière ultraviolette (UV) à 366nm.

### 7.8. Croissance à $41^{\circ}\text{C}$ et à $4^{\circ}\text{C}$

Dans des boîtes des Pétri contenant le milieu (King B), nous avonsensemencé les isolats bactériens, ces isolats ont été incubé à la température  $41\pm 2^{\circ}\text{C}$ , est à la température  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Schaad *et al.*, 2001).

## 8. Galerie API 20 NE

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

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstruit les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se

traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

Nous avons appliqué la galerie API 20NE, pour 5 isolats bactériens choisis aléatoirement de notre collection, Pour sa réalisation nous avons suivi le protocole et les institutions du producteur bio Mérieux.

### **8.1. Préparation des inoculums**

Sur un tube d'essai contenant 5 ml d'eau physiologie stérile, nous avons prélevé des colonies bactériennes jeunes bien isolées sur un milieu gélosé (KB), ensuite homogénéisé soigneusement avec le vortex pour réaliser la suspension bactérienne (A).

La suspension bactérienne (B) a été préparée en mettant 200µl de la suspension bactérienne (A) dans l'ampoule du milieu AUX ; l'homogénéisation a été faite à l'aide d'une pipette pasteur.

### **8.2. Inoculation de la galerie:**

Premièrement, nous avons réparti l'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite, nous avons rempli avec la suspension bactérienne (A) les micr-tubes (et non les cupules), des tests NO<sub>3</sub> jusqu'à PNPG, Pour les tests : ADH, GLU, URE, nous avons créé une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine stérile.

Avec la suspension bactérienne (B), nous avons rempli les micr-tubes et les cupules des tests GLU jusqu'à PAC. A la fin, nous avons refermé les plaques et les incubé à la température 29±2<sup>0</sup>C pendant 24 h jusqu'à 48h.

La lecture de ces réactions se fait en se référant au tableau de lecture (Tableau 02) et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel (identification microbienne via les API Microsoft Excel)

Après incubation, la révélation des deux tests NO<sub>3</sub> et TRP doit se faire juste avant la lecture des résultats en ajoutant les réactifs correspondant pour chaque test. Pour le test TRP une goutte de réactif JAMES est ajouté dans le micr-tubes, et les deux réactifs NIT 1 +NIT 2 et/ou Zn

Tableau 02 : Tableau de lecture (API 20NE) (bio Mérieux).

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	nitrate de potassium	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2 / 5 min	
				Incolore	Rose rouge
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min	
				Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / immédiat	
				vert pâle jaune	Rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	Jaune	orange rose rouge
URE	urée	0,76	UREase	Jaune	orange rose rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase) (ESCUline)	Jaune	Gris Marron Noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- $\beta$ D-galactopyranoside	0,22	$\beta$ -galactosidase (Para-NitroPhényl- $\beta$ D-Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
<u>GLU</u>	D-glucose	1,56	Assimilation glucose	Transparence	Trouble
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	Assimilation arabinose	Transparence	Trouble
<u>MNE</u>	D-mannose	1,4	Assimilation mannose	Transparence	Trouble
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	Assimilation mannitol	Transparence	Trouble
<u>NAG</u>	N-acetyl-glucosamine	1,28	Assimilation N-acétyl-glucosamine	Transparence	Trouble
<u>MAL</u>	D-maltose	1,4	Assimilation maltose	Transparence	Trouble
<u>GNT</u>	potassium gluconate	1,84	Assimilation potassium gluconate	Transparence	Trouble
<u>CAP</u>	acide caprique	0,78	Assimilation acide caprique	Transparence	Trouble
<u>ADI</u>	acide adipique	1,12	Assimilation acide adipique	Transparence	Trouble
<u>MLT</u>	acide malique	1,56	Assimilation acide malique	Transparence	Trouble
<u>CIT</u>	trisodium citrate	2,28	Assimilation trisodium citrate	Transparence	Trouble
<u>PAC</u>	acide phénylacétique	0,8	Assimilation acide phénylacétique	Transparence	Trouble

## 9. Recherche des activités antagonismes (test d'antagonisme *in vitro*)

### 9.1. Matériel biologique

#### 9.1.1. Souche bactériennes

Pour tester le pouvoir antagonismes (*in vitro*) des isolats bactériennes, nous avons utilisé trois souches (C3, B24, F31) pour les opérations (isolements, purification et identification) ont été effectués antérieurement

#### 9.1.2. Isolats de champignons

Deux isolats phytopathogènes ont été utilisés dans nos essais, il s'agit des isolats de :

- *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (FOA1); isolée et identifiée par M<sup>me</sup> Houaiti ;
- *Fusarium culmorum* (BD11), isolée et identifiée par M<sup>me</sup> Touati.

Nous avons déposé dans chaque boîte de Pétri quatre sports bactériens (deux sports bactériens du même isolat sont opposés dans la même boîte), des répétitions ont été réalisées pour chaque isolat bactérien (Figure 15).

Selon la méthode décrite par Backer et Cook (1988), un disque de 4mm de diamètre de chaque champignon a été prélevé à l'aide de pipette de Pasteur, puis placé au centre de chaque boîte de Pétri contenant le milieu KB et des boîtes contenant PDA. Le témoin de l'agent pathogène est effectué en absence de colonies bactérienne Les boîtes ont été ensuite incubées à 25±2°C.

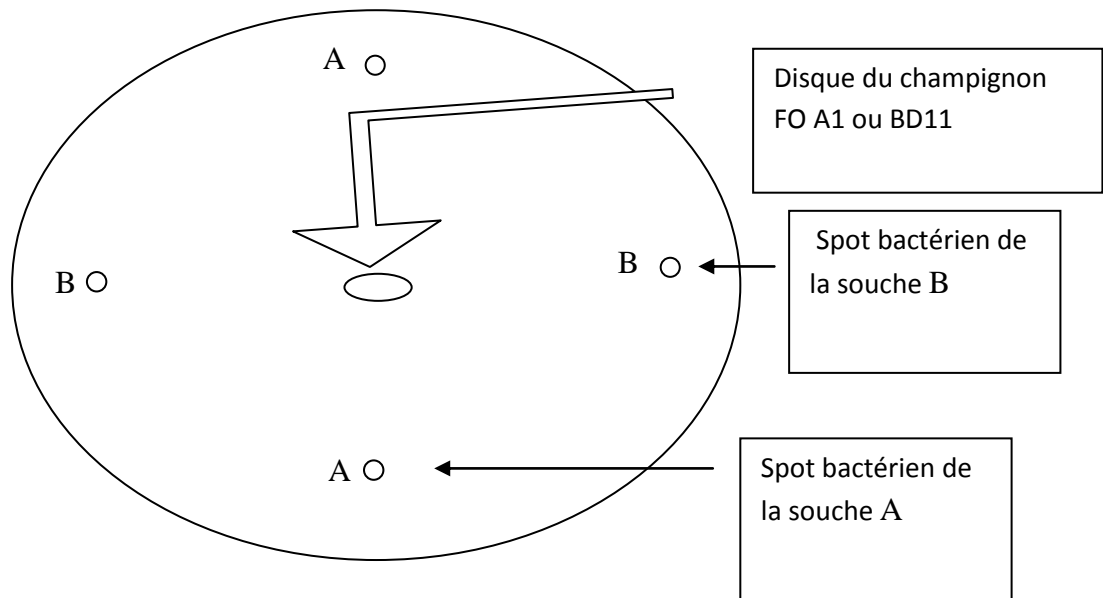
Les résultats ont été notés par la réduction du diamètre de la croissance de l'agent pathogène chaque 24 heures, en présence des isolats de *Pseudomonas*, en comparaisons avec la croissance de témoin qui indique la présence ou l'absence d'une activité antagoniste, pendant cinq (05) jours d'incubation nous avons obtenu le résultat final ; la présence ou l'absence de la zone d'inhibition, dans le cas de présence de la zone d'inhibition est évaluée en (mm).

Le pourcentage d'inhibition I(%) de la croissance mycélienne du pathogène a été évaluée selon la formule suivante : (Hamouni *et al.*, 1996) :

$$I(\%) = (1 - D_{PA}/D_T) * 100.$$

$D_T$  : croissance radiale du témoin.

$D_{PA}$  : croissance mycélienne radiale du pathogène en présence de l'antagoniste.



**Figure 13:** Test d'antagonisme *in vitro*

# **Partie**

# **Résultats et discussion**

## 1. Résultats

### 1.1. Dénombrement bactériens

Après 24h d'incubation des boîtes de Pétri, nous avons observé une formation de colonies bactériennes sur les deux milieux King A et LPGA de toutes les déluitions. Le taux des *Pseudomonas* spp. fluorescents est estimé par le nombre total des bactéries, il varie entre 53 et 71% (Figure 14)

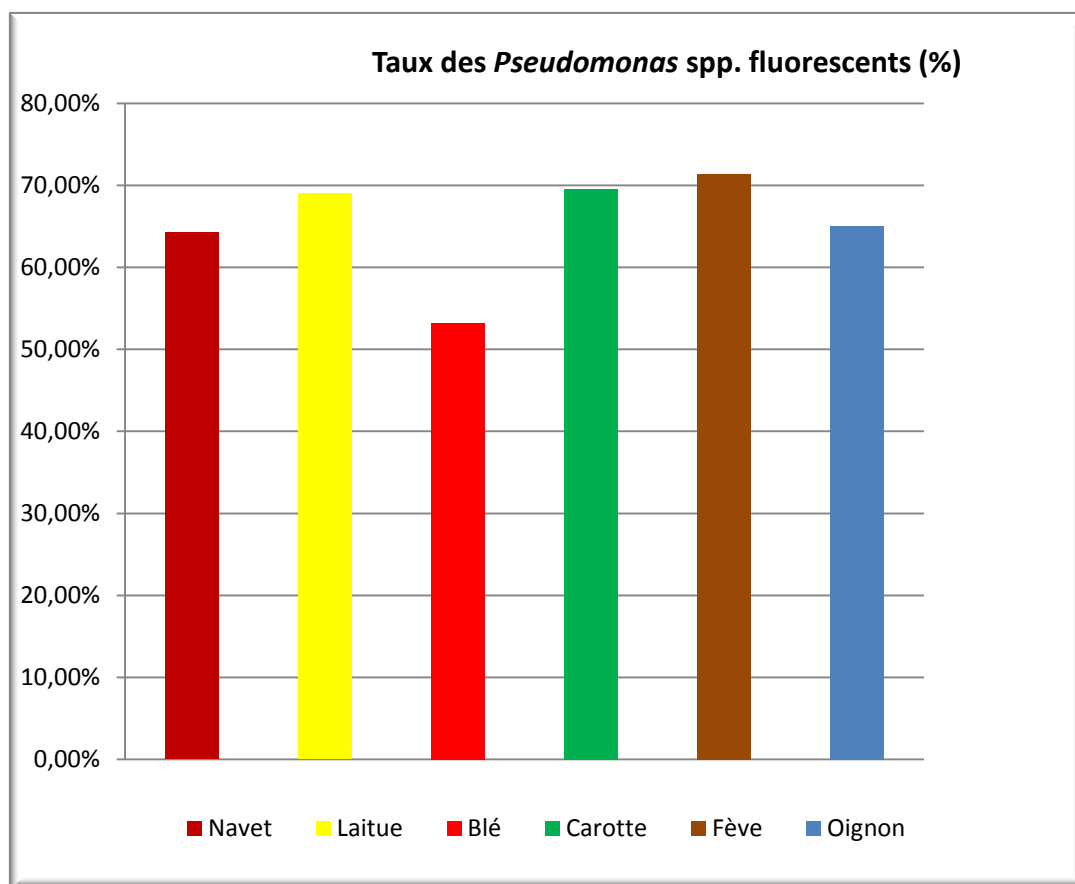
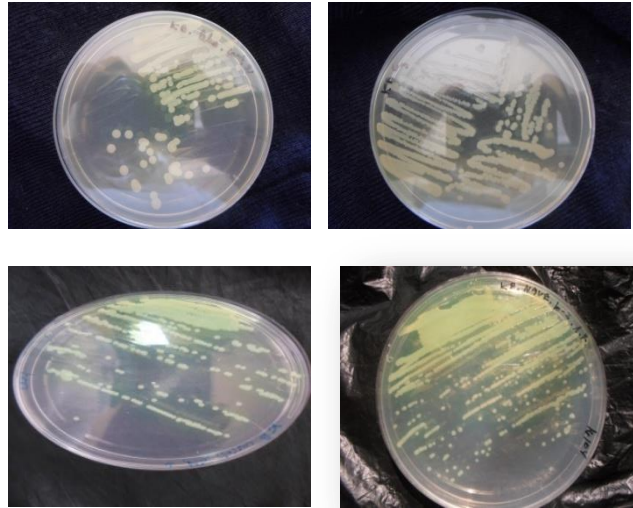


Figure 14: Le taux des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

### 1.2. Caractérisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents

A partir des cultures bactériennes issues des isolement, nous avons gardé 43 isolats isolés sur milieu King B et le milieu LPGA, choisi d'une observation à l'œil nu selon les caractères morphologique de *Pseudomonas* spp fluorescents, des colonies bactériennes de petite taille, rondes brillantes, des reliefs bombés et des surfaces lisses, ainsi que une pigmentation jaune à verte sur KB.

Après la purification des isolats (fig15) bactériennes sur le milieu de KB, nous avons réalisé les tests biochimique et physiologique voir le test de gram, test de Hugh Leifson, test catalase, test de LOPAT, etc.



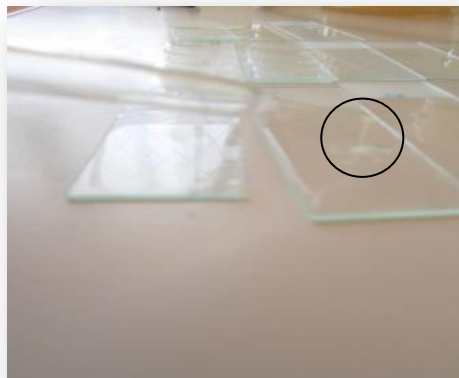
(Auteur 2014)

Figure 15: Culture pure des isolats

### 1.3. Test de Gram

#### 1.3.1. Test de KOH

Après le test de KOH, nous avons observé la formation d'un fil visqueux (réaction positive) pour 30 isolats, ces derniers sont des Gram négatifs, et 13 isolats ne ont pas forme un fil visqueux (réaction négative), sont considères des Gram positifs (Tableau 03, fig 16).



(Auteur 2014)

Figure 16: La formation d'un fil visqueux pour les Gram -

### 1.3.2. La coloration de Gram

Après la sélection par le test de KOH, tous les 30 isolats ont donné une couleur rose sous le microscope optique (G10x100x1.5), après le test de la coloration de Gram. Nous avons confirmé que tous les isolats étudiés sont des bacilles à Gram négatif. (Tableau 03, fig 17)

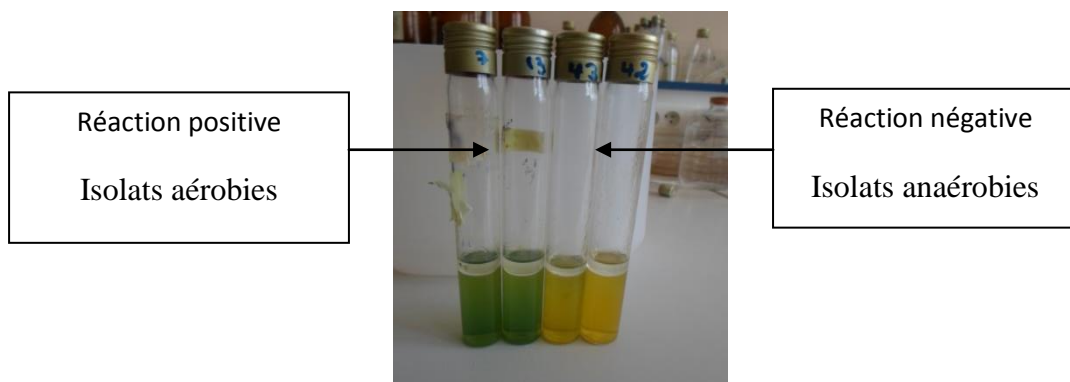


(Auteur 2014)

**Figure 17 :** la couleur et la forme du Gram- sous microscope optique (G10x100x1.5)

### Croissance en anaérobiose (Test de Hugh et Leifson) :

Après 24h d'incubation, nous avons remarqué un virage de couleur du vert au jaune pour 9 isolats ce sont des bactéries anaérobique. Les autres isolats aucun virage de couleur n'a été observé, le milieu de culture a gardé sa couleur verte, les 21 bactéries sont des bactéries aérobie (Tableau 03, Fig 18).

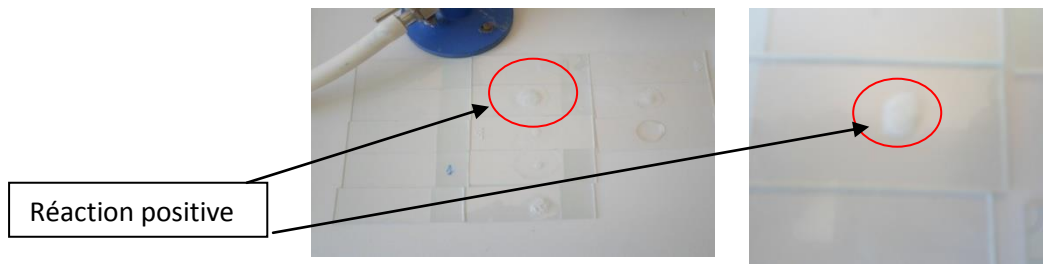


(Auteur 2014)

**Figure 18:** Résultats de test de Hugh et Leifson

### 1.4.Catalase

Pour toutes les isolats testées nous avons obtenu une réaction positive, la production des bulles indique que il 'y a eu une destruction de le peroxyde-de d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et une libération d'oxygène (Présence de Catalase). (Tableau 03,fig 19).



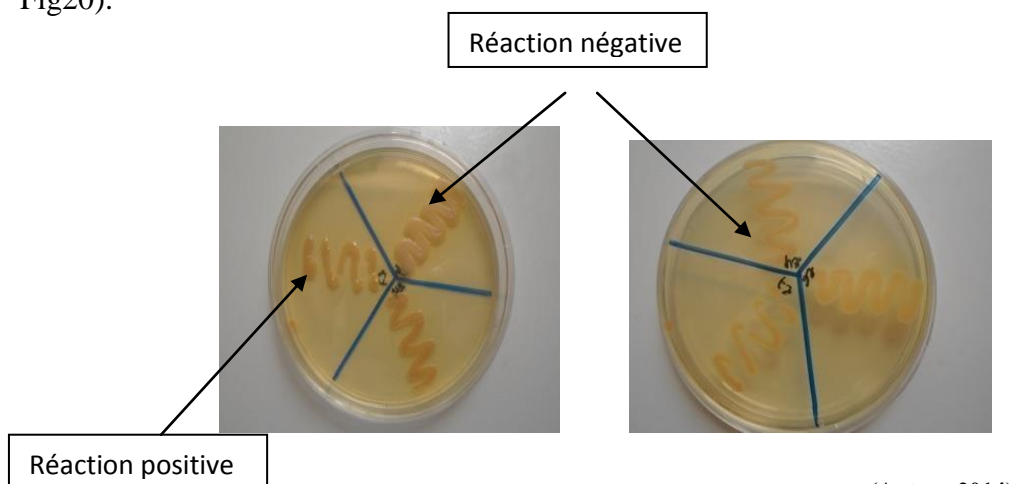
(Auteur 2014)

Figure 19 : Résultats de test de catalase

### 1.5.Test de LOPAT

#### 1.5.1. Production de Levane sucrase

Après 48h d'incubation des boîtes de Pétrie nous avons lu les résultats obtenu, Nous avons observé pour 14 isolats : des stries saillante et luisante (Une levane positif), indique la dégradation du fructose. Mais pour les 7 autres isolats, nous avons observé des stries prostrées non luisantes (Levane négatif), aucune dégradation du fructose (Tableau 04, Fig20).



(Auteur 2014)

Figure 20: Résultats de test levane

**Tableau 03** : les résultats des testes préliminaires

test* isolats	Test KOH	Test de la coloration de gram	Fluorescents dans KB	Fluorescents dans KA	Test de HL	Test de catalase
C 1	+	G-	+	-	+	EL
C 2	+	G-	+	-	+	EL
C 3	+	G-	+	-	-	+
C 4	+	G-	+	-	-	+
C 5	-	EL	EL	EL	EL	EL
C 6	-	EL	EL	EL	EL	EL
O 7	+	G-	+	-	-	+
O 8	-	EL	EL	EL	EL	EL
O 9	+	G-	+	-	-	+
O 10	+	G-	+	-	+	EL
O 11	+	G-	+	-	-	+
O 12	+	G-	+	-	-	+
O 13	+	G-	+	-	-	+
N 14	+	G-	+	-	-	+
N 15	+	G-	+	-	-	+
N 16	+	G-	+	-	-	+
L 17	+	G-	+	-	-	+
L 18	+	G-	+	-	+	EL
B 19	+	G-	+	-	-	+
B 20	+	G-	+	-	-	+
B 21	+	G-	+	-	-	+
B 22	+	G-	+	-	-	+
B 23	+	G-	+	-	-	+
B 24	+	G-	+	-	-	+
B 25	-	EL	EL	EL	EL	EL
B 26	+	G-	+	-	-	+
B 27	-	EL	EL	EL	EL	EL
B 28	+	G-	+	-	+	EL
B 29	-	EL	EL	EL	EL	EL
B 30	+	G-	+	-	-	+
F 31	+	G-	+	-	-	+
F 32	-	EL	EL	EL	EL	EL
F 33	-	EL	EL	EL	EL	EL
F 34	-	EL	EL	EL	EL	EL
F 35	-	EL	EL	EL	EL	EL
F 36	+	G-	+	-	+	EL
F 37	-	EL	EL	EL	EL	EL
F 38	-	EL	EL	EL	EL	EL
F 39	+	G-	+	-	-	+
F 40	-	EL	EL	EL	EL	EL
F 41	+	G-	+	-	+	EL
F 42	+	G-	+	-	+	EL
F 43	+	G-	+	-	+	EL

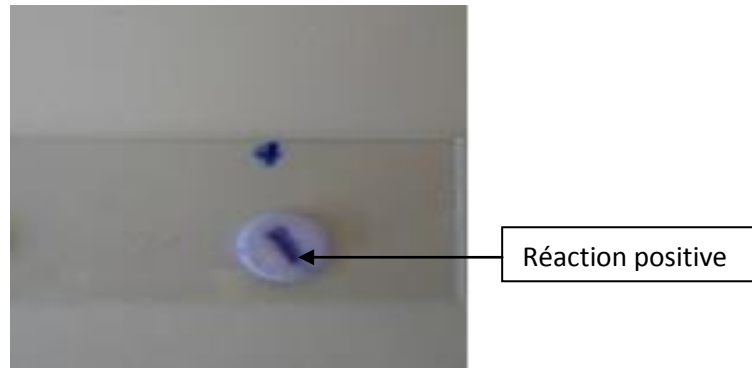
**Test\*** ordre des tests.

**EL** : éliminé par le teste précédant.

(+) réaction positive (-) réaction négative. G- gram négative

### 1.5.2. Test d'oxydase:

Nous avons observé l'apparition d'une couleur bleue violète sur les disques pour les 30 isolats testées, qui montre que ces bactéries sont d'oxydase positive (+) (Tableau 04, Fig21).

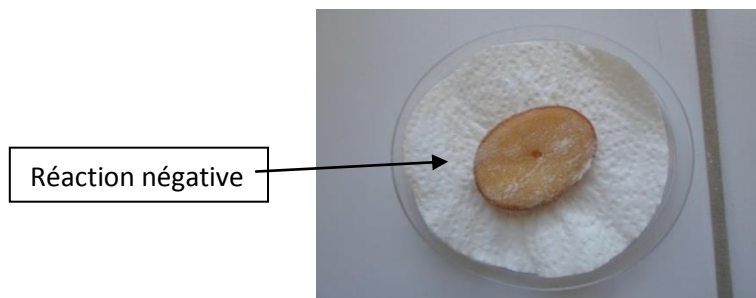


(Auteur 2014)

Figure 21 : Résultats du test d'oxydase

### 1.5.3. Test de pectinase:

Après 14 jours d'incubation, nous n'avons pas observé de changement ou de modification remarquable et aucune odeur reniflé sur les tranches de la pomme de terre, ce la indique que les bactéries étudiées ne sont pas capable de dégrader la pectine (Tableau 04 Fig22).

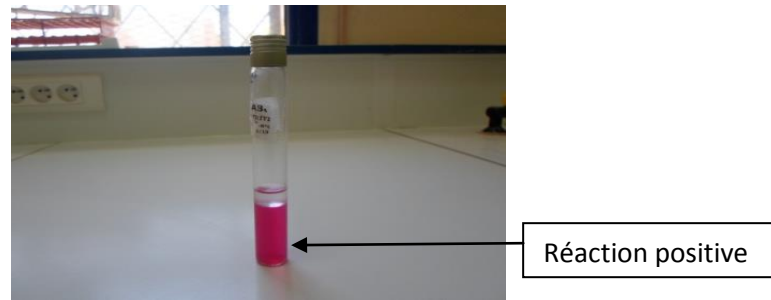


(Auteur 2014)

Figure 22: Résultats du test pecténase

### 1.5.4. Test d'arginine déshydrolase :

Après cinq jours d'incubation, le milieu a demeuré rose, ce résultat montre que tous nos isolats sont des arginine positif (Tableau 04, fig23).



(Auteur 2014)

**Figure 23:** Résultats de Test d'arginine déshydrolase

### 1.5.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac:

Après 24 heures, aucune modification de l'aspect et de la couleur de la zone foliaire inoculé. Le test HR sur Tabac a donné des résultats négatifs pour tous les isolats testés. (Tableau 04,fig24)

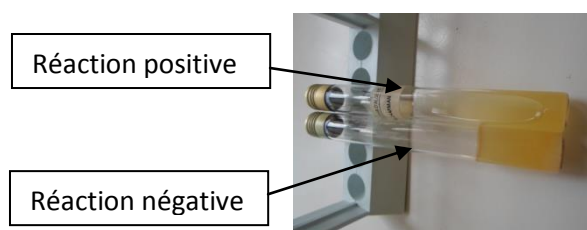


(Auteur 2014)

**Figure 24 :** Résultats du test d'hypersensibilité sur Tabac

### 1.6. Test de la gélatinolyse

Après 10 jours d'incubation, les tubes ont été mis à une température de  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min avec la présence d'un témoin non ensemencé pour vérifier la liquéfaction de la gélatine. Nous avons obtenu une liquéfaction pour six isolats (gélatine positive), pour les 15 autres isolats le milieu a resté gélifiant, (gélatine négative) (Tableau 5,fig25).



(Auteur 2014)

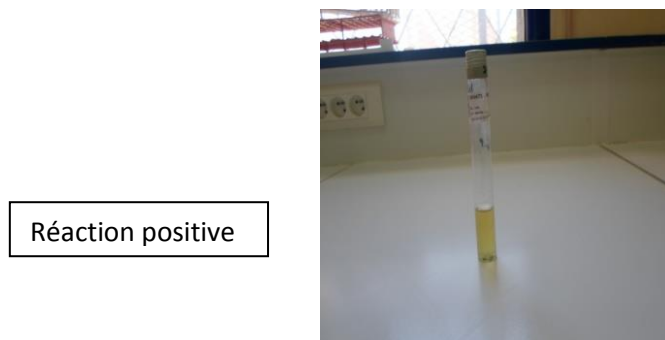
**Figure 25:** Résultats de test gélatinolyse

**Tableau 04:** Tableau des résultats du test de LOPAT

<b>Test de LOPAT</b>	<b>Production de Levane sucrase</b>	<b>Test d'oxydase</b>	<b>Pectinase</b>	<b>Test d'arginine déshydrolase</b>	<b>Test d'hypersensibilité sur Tabac</b>
<b>C 3</b>	-	+	-	+	-
<b>C 4</b>	+	+	-	+	-
<b>O 7</b>	+	+	-	+	-
<b>O 9</b>	+	+	-	+	-
<b>O 11</b>	+	+	-	+	-
<b>O 12</b>	+	+	-	+	-
<b>O 13</b>	+	+	-	+	-
<b>N 14</b>	+	+	-	+	-
<b>N 15</b>	-	+	-	+	-
<b>N 16</b>	+	+	-	+	-
<b>L 17</b>	-	+	-	+	-
<b>B 19</b>	+	+	-	+	-
<b>B 20</b>	-	+	-	+	-
<b>B 21</b>	+	+	-	+	-
<b>B 22</b>	-	+	-	+	-
<b>B 23</b>	+	+	-	+	-
<b>B 24</b>	+	+	-	+	-
<b>B 26</b>	-	+	-	+	-
<b>B 30</b>	+	+	-	+	-
<b>F 31</b>	-	+	-	+	-
<b>F 39</b>	+	+	-	+	-

### 1.7. Nitrates réductase

Après cinq jours d'incubation, pour la lecture des résultats nous avons ajouté aux milieux EPN des gouttes de nitrate 1 (NIT 1) et nitrate 2 (NIT 2), nous avons attendu cinq minutes, l'absence d'une coloration orange à rouge brique (milieu incolore), indique une réaction négative, mais les isolats peuvent réduire le nitrate en  $N_2$ , pour cela nous avons ajouté du Zinc, les milieux ont resté incolore c'est une réaction positive, ces isolats ont un pouvoir dénitrifiant. (Tableau 5, fig26).



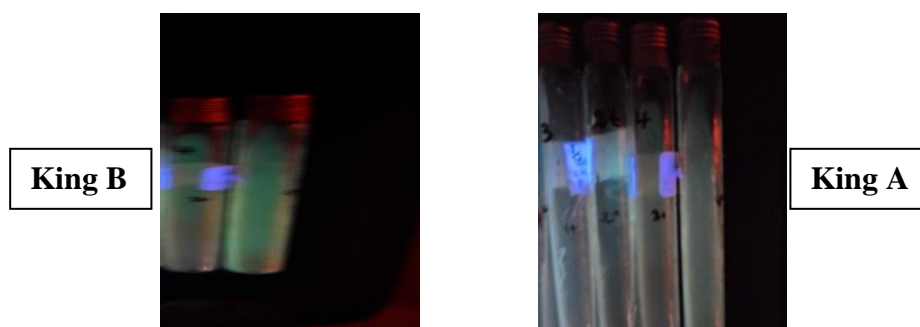
(Auteur 2014)

Figure 26 : Résultats de Test Nitrate réductase

### 1.8. Production du pigment fluorescent

Pour l'ensemble des isolats, sur le milieu de King B, nous avons observé un pigment jaune-vert fluorescent sous UV (365nm) diffusible dans le milieu la bactérie a produit la pyoverdine (résultat positif).

Dans le milieu de King A, aucun changement de couleur n'a été observé, soit à l'œil nu ou sous la lumière ultraviolette UV (365nm) (résultat négatif). (Tableau 03, fig27)

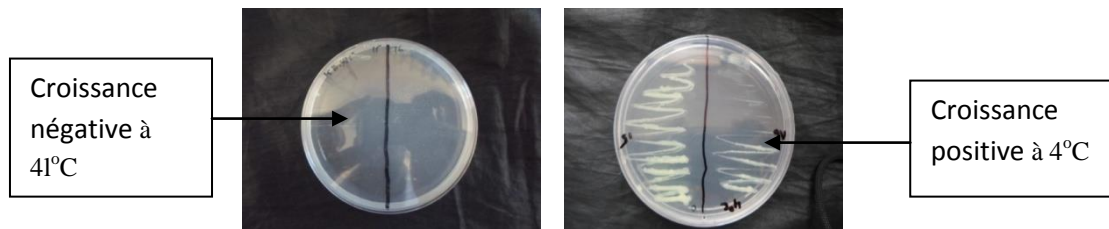


(Auteur 2014)

Figure 27: Résultats de la production du pigment fluorescent

### 1.9. Croissance à 41°C et à 4°C

Après 24h l'incubation des isolats bactériens à la température 41°C, nous n'avons pas observé une croissance. Contrairement à la température 4°C nous avons remarqué une croissance bactérienne lente pour tous les 21 isolats. (Tableau 5, Fig28)



(Auteur 2014)

**Figure 28** : Résultats de la Croissance à 41°C et à 4°C

### 1.10. Galerie API 20 NE

La lecture des plaques de Galerie API 20 NE effectuée après 24h et 48h, à l'aide du tableau de lecture, pour les cinq (5) isolats (C3, N14, L17, B24, F31) qui ont été choisis aléatoirement (tableau 02).

Pour la lecture du test  $\text{NO}_3$ , nous avons ajoutées une goutte de réactifs NIT 1, puis une goutte NIT 2 dans la cupule  $\text{NO}_3$ , après 5 min nous n'avons pas observé la couleur rouge ou rose qui indique une réaction positive, cette réaction négative peut être due à la production d'azote directement ( $\text{N}_2$ ). Pour cela nous avons ajouté 2-3 mg du Zn, après 5 min, la cupule restée incolore cela indique une réaction positive, une dénitrification.

Pour la lecture du test TRP nous avons ajouté une goutte de réactif JAMES dans la cupule du test TRP, nous n'avons pas observé de couleur rose diffusant dans toute la cupule (une réaction positive).

Les résultats obtenus des galeries API 20 NE sont représentés dans le tableau (06)

**Tableau 05:** les résultats final des testes biochimiques et physiologiques

test \ Isolats	C3	C4	O 7	O9	O11	O12	O13	N14	N15	N16	L17	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B26	B30	F31	F39
Test de KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coloration de Gram	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>
Test de HL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test LOPAT { Levane Oxydase Pecténase Arginine HRsur Tabac	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gélatinolyse	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Nitrate reductase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
King B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
King A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à T 41°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à T 4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) réaction positive, (-) réaction négative

G<sup>-</sup> : Gram négative.

HL : Test de Hugh et Leifson

HR sur Tabac: Test d'Hypersensibilité de tabac.

gélatinolyse : (+) la gélatine dégradée, (-) la gélatine non dégradée.

**Tableau 06:** les résultats de la galerie API 20 NE

souches Les tests	C 3	N 14	L 17	B 24	F 31
NO3	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+
URE	-	+	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+
GEL	+	+	-	+	-
PNG	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+
MAL	+	+	-	-	+
GNT	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	+
ADI	-	+	-	-	+
MLT	+	+	+	+	-
CIT	+	+	+	+	+
PAC	+	+	-	-	-
OX	+	+	+	+	+

A l'aide d'un logiciel d'identification (identification microbienne via les API Microsoft Excel) nous avons obtenu les résultats tableau (07) montrent que les souches (C 3, L 17, B 24, F 31) sont des *Pseudomonas fluorescens*, elles prennent différentes probabilités. La souche (N14) est une *Burkholderia cepacia*.

Concernant l'isolat L 17 elle a une très bonne identification avec la probabilité 98.6%, suivi par l'isolat B 24 avec une bonne identification et une probabilité de 99.6%, alors que les isolats (C3, F 31) ont eu des remarques d'identification pas bonne avec des probabilités 40.2%, 55.8% successivement. A propos de la souche N14 sa remarque d'identification n'est pas bonne avec une probabilité de 72.6%.

**Tableau (07) :** Les résultats d'identification de la galerie API 20 NE

Les souches	Souche (taxon le plus probable)	Remarque	Indice de typicité	Probabilité
L 17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Très bon	0.37	98.6%
B 24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	bon	0.48	99.6%
C 3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	-0.25	63.8%
F 31	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	-0.47	55.8%
N 14	<i>Burkholdera cepacea</i>	Pas bon	-0.15	72.6%

La classification inter et intra spécifique peut être effectuée pour les souches par la lecture de l'ensemble des tests réalisés dans le laboratoire, de tests Arabinose et Tréptophane sur la Galerie API 20NE avec utilisation de la clé dichotomique (A) proposée par Jacque (1994) et la clé dichotomique (B) proposée par Bossis pour l'identification des *pseudomonas* spp. fluorescents. Malgré le manque de quelques tests essentiels pour la classification inter et intra spécifiques (arabinose, tartrate, sorbitol, lipase, tréhalose), nous avons essayé de faire une identification taxonomique de nos souches.

Selon la clé dichotomique (A) proposée par Jacque (1994) pour l'identification des *pseudomonas* spp. fluorescentes, les tests effectués dans le laboratoire et de la lecture de test Arabinose sur la Galerie API 20NE toutes les souches sont des *pseudomonas fluorescens* qui inclus au différent biovars, nous avons pu classer 9 souches précisément, (C3, N15, N14, L17, B20, B22, B24, B26, F31). Les 7 souches (C3, N15, L17, B20, B22, B26, F31) sont affiliées au biovar III et les deux souches (N14, B24) affiliées au biovar IV. Les autres souches est difficile de les classer et d'affiliées dans un biovars à cause de manque de quelques tests essentiels pour la différenciation. (tableau 08)

Selon la clé dichotomique (B) proposée par Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescentes, les tests effectués dans le laboratoire et de la lecture de test Arabinose sur la galerie API 20NE toutes les souches sont des *Pseudomonas fluorescens* qui inclus au différent biovars, nous avons pu classer deux souches précisément (B20, B26) qui sont affiliées au biovar III. Pour les autres souches, il est difficile de les classer et de les affiliées dans un biovars à cause de manque de quelques tests essentiels. (Tableau 09)

Tableau 08: la clé dichotomique (A) proposé par Jacque (1994) pour identification des *pseudomonas spp* fluorescentes

	C3	C4	O7	O9	O11	O12	O13	N14	N15	N16	L17	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B26	B30	F31	F39
King B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
King A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HR sur Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPN (NO <sub>3</sub> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Levane	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Tartrat	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sorbitol arabinose	NR +	NR NR	NR NR	NR NR	NR NR	NR NR	NR NR	NR +	NR NR	NR NR	NR +	NR NR	NR NR	NR NR	NR NR	NR NR	NR +	NR NR	NR NR	NR +	NR NR
T : 41 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P.fluore.bv.III	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.IV	P.fluore.bv.III	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.III	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.III	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.III	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.IV	P.fluore.bv.III	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II	P.fluore.bv.III	P.fluore.bv.IV, P.fluore.bv.II

HR sur Tabac : test d'hypersensibilité sur tabac

(+) réaction positive (-) réaction négative

NR : test non réalisée

Tableau 09 : La clé dichotomique (B) proposée par Bossis (1995) pour identification des *pseudomonas spp* fluorescents.

	C3	C4	O7	O9	O11	O12	O13	N14	N15	N16	L17	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B26	B30	F31	F39
King B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
King A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HR sur Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatine	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Tréhalose	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Levane	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
EPN (NO <sub>3</sub> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	NR	+	NR
Tart	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Trp	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	-	NR	NR	-	NR
	P.fluor.bv. II, P.fluor.bv. IV	P.fluor.bv. IV, P.fluor.bv. II	P.fluor	P.fluor	P.fluor	P.fluor	P.fluor	P.fluor.bv. IV, P.fluor.bv. II	P.fluor	P.fluor	P.fluor	P.fluor	P.fluor.bv. III	P.fluor	P.fluor	P.fluor	P.fluor	P.fluor.bv. III	P.fluor	P.fluor	P.fluor.bv. IV, P.fluor.bv. II

HR sur Tabac : test d'hypersensibilité sur tabac

(+) réaction positive (-) réaction négative

NR : test non réalisée

### 1.11. Test d'antagonismes *in vitro*

Pour l'étude de test de antagonistes *in vitro* nous avons utilisé la méthode de confrontation directe sur le milieu PDA et le milieu KB, l'estimation de la zone d'inhibition obtenus par les trois souches bactériens (C 3, B 24, et F 31) qui son identifier comme des *Pseudomonas* spp fluorescentes vis-à-vis les deux champignons (*Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (FOA1), *Fusarium culmorum* (BD11) est donne par un pourcentage, ce dernier représente la zones d'inhibition de la croissance mycélienne par rapport au témoin. Apres cinq jours, parmi les 18 boites, seulement 8 boites montre une activité antagonistes où intensités de réponse est variable. Les résultats obtenus est dans le tableau 10.

Sur le milieu KB, en comparant l'effet antagoniste des différentes souches bactériennes, il ressort que toutes les souches présentent une activité d'antibiose importante, vis-à-vis des deux champignons phytopathogène sauf la souche F31 qui n'a pas une activité sur le champignon *Fusarium culmorum* (BD11). Un taux minimal d'inhibition a été enregistré avec la souche C3 de l'ordre de 33,33% vis-à-vis de champignon 2[ *Fusarium culmorum* (BD11)]. et un taux maximal d'inhibition avec la souche B24 vis-à-vis de champignon ch1 [(*Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (FOA1)] qui est de l'ordre de 44,15%. (Tableau 10 ).

Sur le milieu PDA, nous avons remarqué qu'il n'existe pas une activité antagoniste chez les différentes souches bactériennes vis-à-vis des deux phytopathogène exceptionnellement la souche C3 qui eux une activité antagonistes sur le champignon *Fusarium culmorum* (BD11), dont le taux d'inhibition 29,41%.(Tableau10 ).

**Tableau10 : résultats du test d'antagonisme *in vitro***

Traitement	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (FOA1)		<i>Fusarium culmorum</i> (BD11)	
	KB	PDA	KB	PDA
C 3	38,96%	00,00%	33,33%	29,41%
B 24	44,15%	00,00%	44%	00,00%
F 31	42,28%	00,00%	00,00%	00,00%

## 2. Discussion

Dans notre étude, nous sommes intéressées à la flore bactérienne rhizosphérique précisément les *Pseudomonas* spp. fluorescents qui colonisent la rhizosphère de culture cultivé (navet, laitue, blé, carotte, fève et d'oignon) de la région D'EL-ASSAFIA (Laghouat) pour la sélection des bactéries antagonistes.

Après le dénombrement des bactéries, nous avons remarqué que le taux des bactéries *Pseudomonas* spp. fluorescents au niveau de la rhizosphère du sol des plantes cultures cultivé sujettes de notre étude varie entre 53% et 71%.

Les méthodes de caractérisation bactériologiques et les tests biochimiques utilisés pour l'identification des isolats de *Pseudomonas* spp peuvent être considérés comme indicateurs de l'aspect de ces bactéries, ils permettent une identification préliminaire des souches et des biovars.

Premièrement la sélection a été basée sur l'observation à l'œil nu, nous avons choisi les isolats qui montrent les caractères macromorphologiques (des colonies bactériennes de petite taille, rondes brillantes pigmentées avec pigment jaune à vert dans le milieu KB, des reliefs bombés et des surfaces lisses) de *Pseudomonas* spp sur le milieu de King B et le milieu LPGA, cette sélection a permis la constitution des 43 isolats bactériens à partir de toutes les cultures (blé, oignon, fève, navet, laitue et carotte).

Après la purification des 43 isolats bactériens, nous avons réalisé les tests biochimiques et physiologiques ainsi que la galerie API 20 NE.

Le test de KOH est un caractère clé pour la différenciation entre les isolats de Gram – et de Gram +, la solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s (schaad *et al.*, 2001). Dans notre travail, nous avons observé la formation d'un fil visqueux pour 30 isolats par contre nous n'avons pas observé pour les 13 autres isolats. À partir de ce test nous avons sélectionné 30 isolats.

Après la sélection, nous avons effectuée une régénération pour les 30 isolats bactériens sur le milieu de KB, ces isolats montrent les caractères culturels à l'œil nu sur le milieu de King B, des colonies bactériennes de petite taille, rondes brillantes pigmentées avec pigment jaune à vert, des reliefs bombés et des surfaces lisses.

Selon Höfte et Altier (2010) ; Les *Pseudomonas* spp. fluorescents rassemblent des espèces saprophytes se distingue par la production de pigments jaune-vert fluorescents (pyoverdine) dans des conditions de carence en fer.

La coloration de Gram et la fermentation du glucose ont été des caractères clés pour classer les familles des bacilles à gram négatif non fermentaires. Pour les résultats de la coloration de Gram tous les 30 isolats qui sont étudiées après les sélections sont des bacilles à Gram négative.

Le genre *Pseudomonas* spp. fluorescents est constitué de bacilles Gram négatifs, droits ou légèrement incurvés, ayant une taille de 0,5 à 1,0 µm sur 1,5 à 5,0 µm, aérobies stricte, oxydase positifs, non sporulés et généralement mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires(Bell-Perkins et Lynch, 2002 ; Ghafir, 2007)).

Le test de Hugh et Leifson c'est un test qui précise l'aérobiose ou l'anaérobiose des bactéries. Les résultats obtenus par ce test est négatif pour 21 isolats ce sont des isolats aérobies strictes, et positive pour 9 isolats ce sont des isolats anaérobies strictes.

Le milieu de Hugh et Leifson est constitue par le bleu de promothymol qui prend une couleur jaune lorsque il est en contacte avec acidification, ce milieu est précise le type de dégradation du glucide (glucose) qui libère des acides et éventuellement des gaz. La faible teneur en peptone et la forte concentration en glucose dans le milieu de Hugh et Leifson vérifier si la bactérie peut utiliser le glucose en présence et en absence de oxygène, après utilisation de glucose il y a la formation d'un acide, cette acidification du milieu fait virer l'indicative coloré le bleu de bromothymol du quelle passe de vert au jaune. Les *Pseudomonase* spp. fluorescents sont des bactéries aérobies ne peut pas utiliser le glucose dans les conditions anaérobie. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des bactéries aérobiques (Avril *et al.*, 1992).

Pour le teste de catalase tous les 21 isolats qui sont sélectionnée après le test de HL sont de catalase positive, La bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde-de d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont définis comme étant des microorganismes aérobies (Palleroni, 1984).

L'ensemble des tests de LOPAT sont des tests de base pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

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

Pour les résultats teste Levane sont positif pour 14 souches et négative pour sept (7). Cette enzyme catalyse la synthèse de levane à partir du sucrose et catalyse l'hydrolyse du Levane en monosaccharides.

La production de levane sucrase extracellulaire est présente chez quelques biovars de *Pseudomonas fluorescens*, mais absente chez *Pseudomonas putida* (Jacques, 1994, Bossis, 1995).

Les résultats d'oxydase pour tous les 21 isolats étudiés sont positives. Selon Avril *et al* (1992) les *Pseudomonas spp.* Fluorescents possèdent un cytochrome oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire. Le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder Le tétraméthyl-1, 4-phénylène diamine, substrat qui prend une coloration bleue violète.

Pour l'ensemble de nos isolats la réaction pour le test de pecténas est négative, le test pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine.

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

Pour le test HR tous les isolats donnent résultats négative. Avec ceux du test de pecténase, ils montrent que nos isolats ne sont pas pathogènes.

Pour le teste de arginine, tous nos isolats ont répondu positivement. Une réaction positive indique qu'il y a eu transformation de l'arginine (un acide aminé) par l'enzyme arginine déshydrolase. La dégradation de l'arginine est une voie caractéristique des *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophytes (Thornley. 1960). Elle fonctionne seulement en absence d'O<sub>2</sub>, lorsque la chaîne respiratoire est totalement bloquée (Shoesmith et Sherris. 1960; Mercenier *et al.*, 1980). C'est la seule voie fermentative connue chez ces bactéries (Latour et Lemanceau 1997).

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

La capacité d'utiliser les nitrates à la place de l'oxygène comme récepteur final d'électrons et donc de croitre de manière anaérobique. Est un autre caractère multienzymatique ayant une signification taxonomique considérable chez les *Pseudomonas* aérobies (Stanier *et al.*, 1966).tous les 21 isolats de notre travail sont dénitrifiant.

Les capacités dénitrifiantes des *Pseudomonas* spp. fluorescents est varient selon l'espèce et le biovar. *P. fluoresces* biovars I, *P. fluoresces* biovars V, *P. fluoresces* biovars VI et *P. putida* peuvent uniquement réduire les nitrates (Palleroni, 1984), grâce à un nitrate réductase (latour et lemanceau, 1997). Les isolats dénitrifiant sont les plus compétitifs dans la rhizosphère (Botelho et Mendonça-Hagler, 2006).

Dans notre travail nous avons obtenu 6 isolats ayant la capacité de hydrolyser la gélatine et 15 souche n'avez pas la cette capacité. Les résultats de L'hydrolyse de la gélatine avec le test de levane et le test de nitrate réductase permettent la distinction entre les *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* (jacques, 1994 ; Bossis ,1995).

La croissance de *Pseudomonas fluorescens* est possible dans la température 4°C (Schaad *et al.*, 2001). Ce test est utilisé pour différencier entre *Pseudornonas aeruginosa* et les autre espèces ne sont pas capable de croitre à une température de 4°C (Avril *et al.*, 1992), alors que elles sont capable de croitre à une température supérieure à 41°C (Schaad *et al.*, 2001).

La classification inter et intra spécifique peut être effectué pour les souches par la lecture de l'ensemble des testes subit dans laboratoire, de tests Arabinose et Tréptophane sur la galerie API 20NE, avec l'utilisation de la clé dichotomique (A) proposé par Jacque (1994) et La clé dichotomique (B) propose par Bossis pour identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Malgré le manque de quelques tests essentielles pour la classification inter et intra spécifiques (arabinose, tartrate, sorbitol, lipase, tréhalose), nous avons essayé de faire l'identification taxonomique de nos souches.

Selon la clé dichotomique (A) proposée par Jacque (1994) pour l'identification des *Pseudomonas* spp fluorescentes, les tests effectués dans le laboratoire et de la lecture de test Arabinose sur la Galerie API 20NE toutes les souches sont des *Pseudomonas fluorescens* qui inclus au différent biovars, nous avons pu classer 9 souches précisément, (C3, N15, N14, L17, B20, B22, B24, B26, F31). Les 7 souches (C3, N15, L17, B20, B22, B26, F31) sont affiliées au biovar III et Les deux souches (N14, B24) affiliées au biovar IV.

Selon la clé dichotomique (B) proposée par Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp fluorescentes, les tests effectués dans le laboratoire et de la lecture de test Arabinose sur la galerie API 20NE toutes les souches sont des *Pseudomonas fluorescens* qui inclus au différent biovars, nous avons pu affilier les deux souches (B20, B26) au biovar III.

Les autres souches est difficile de les classer et d'affiliées dans un biovars à cause de manque de quelques tests essentiels que soit par la clé (A) ou la clé (B) (tableau 07 tableau 08)

D'après les résultats du test d'antagonistes *in vitro* de trois souches bactériennes (C3, B24, et F31) vis-à-vis les deux champignons (*Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (FOA1), *Fusarium culmorum* (BD11)) des zones d'inhibition supérieures à 29,41% soit sur le milieu PDA ou le milieu KB. La souche B24 a révélé la meilleure activité inhibitrice sur le milieu KB, avec une zone d'inhibition de 44% vis à vis des deux champignons phytopathogènes.

Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels  $\beta$ -1,3-galactosidase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001).

Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyrolutérine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza et al., 2003 ; Haas et Defago 2005). Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent

influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992).

**Conclusion**

## Conclusion

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. Certaines bactéries associées aux plantes particulièrement les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont fait l'objet d'explorations suppressives des maladies des cultures par antagonisme direct entre la bactérie et les phytopathogènes du sol.

A partir de nos travaux réalisés sur la recherche de la bactérie *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir du sol rhizosphérique des six cultures cultivées :(blé, oignon, fève, navet, laitue et carotte)

Nous avons pu isoler de différent rhizosphère des cultures cultivées 43 isolats. Les tests biochimiques et physiologiques réalisés, ont permis d'isoler 21 isolats bactériens, présentant les caractères morphologiques des espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents, accompagné avec des réactions physiologiques et biochimiques propre a ces espèces

L'utilisation de la galerie API 20NE rendre l'identification biochimique plus facile et rapide, elle a été appliquée seulement pour 5 souches bactériennes. Nous avons obtenu de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur quatre plaques Api 20NE utilisées, mais avec des probabilités variables.

L'identification taxonomique nous permis de faire l'affiliation des 9 souches. (C3, N15, L17, B20, B22, B26 et F31) sont affiliées au biovar III et les deux souches (N14 et B24) affiliées au biovar IV. Utilisation des caractérisations phénotypiques ne peut pas permettre une identification taxonomique totale et précise.

Nous avons obtenu certain résultats contradictoire entre la galerie classique et la galerie API 20NE pour la L17 pour le test de la gelatinolyse et l'identification de N14

Les résultats obtenus dans ce travail sont des résultats préliminaires. Nous conseillons d'utiliser les tests génétiques pour confirmées les caractères génétiques. Le rôle essentiel de *Pseudomonas* spp. fluorescents est de réduire l'incidence des maladies, elles possèdent un énorme potentiel d'amélioration des rendements des cultures, mais le succès de leur exploration reste limité au niveau des champs. Nous suggérons de faire des essais *in vivo*.

# Références bibliographiques

**Références bibliographiques :**

- Arango M et al. (2002)**. La plante: une intermédiaire essentiel entre le CO<sub>2</sub> atmosphérique et le carbone du sol. *Bulletin de la société Suisse de Pédologie*. n. 26. p. 5-9.
- Avril J. (1992)**. *Bactériologie clinique*. 2<sup>ème</sup> édition. Paris : ISBN. 511p.
- Bell-Perkins L et Lynch J. (2002)**. Rhizosphere microbiology. In Bitton G (ed). *Encyclopedia of environmental microbiology*. Canada: A Wiley-Interscience. p. 2713-2728.
- Brimecombe M et Lynch J. (2007)**. Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. In Pinto R et al. (ed.). *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York: CRC Press.
- Bloemberg G et al. (2001)**. molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* n. 4. P. 343-350.
- Compant S et al. (2005)**. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* n. 71. P. 4951-4959.
- Dimkpa C et al. (2009)**. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x. p 1-13.
- Dommergues Y, Mongenot F. (1970)**. *Ecologie microbienne du sol*. Ed Paris : Masson. 76p.
- Defago G. (1993)**. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* n. 42. P. 311–312.
- Duponnois R. (1992)**. *Les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas (Pseudotsugamenziesii (Mirb) Franco) par Laccaria laccata souche S 238*. Thèse de Doctorat : Université de Nancy.
- Djigal D. (2003)**. *Interactions entre la communauté microbienne de sol (bactéries et champignons mycorhisiens) et les nématodes bactérioses : effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes*. Thèse de doctorat : Université Cheikh Antadiop de Dakar. 166p.
- Gratzfeld J. (2004)**. *Industries extractives dans les zones arides et semi-arides*. 1ere éd. UICN, Gland, Suisse et Cambridge, Royaume-Uni : GRATZFELD Joachim ULCN -Union Mondiale pour la Nature.
- Gray E et al. (2005)**. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* n.37.p. 395- 412.

- Haas D et al. (2005)**. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* n. 3.P. 307-319.
- Högberg Pet al. (2001)**. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*.n. 411. p.789-792.
- Hiltner L. (1904)**. Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. *Arbeits und Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft*.n. 98. p.59-78.
- Hirsch A et al.(2003)**. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecol.* n. 84.P. 858-868.
- Jacques P et al. (1993)**. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agric.* n. 2.P. 301-307.
- Jourdan E et al. (2008)**. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* n. 12.P. 437-449.
- Karnwal A. (2009)**. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* n. 91. P. 61-63.
- Kamilova F et al. (2005)**. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.*n. 7.P. 1809–1817.
- Kennedy A et al. (2004)**. Rhizospher. In Hillel D et al. (ed.). *Encyclopedia of soil in the environment*.USA: Columbia University. p. 399-409.
- Khan A et al. (2009)**. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *J. agric. biol. sci.* n. 11. P. 48-58.
- Kim K et al. (1998)**. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil Soils*.n. 26.P. 79-87.
- Klement Z. (1990)**. *Methods in phytobacteriology*. Ed Printed: Hungary. 568p.
- King E et al. (1954)**. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. 44eme edition: *J Clin Med.* p 301-307.

- Kowalchuk G et al. (2001)**. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Ann. Rev. Microbiol.* n. 55. P. 485-529.
- Latour X et al. (2009)**. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of *Pseudomonas* spp. In Lichtfouse E. (Eds.). *Sustainable agriculture (Part 3)*. Netherlands: Springer. p. 285-296.
- Lelliot R et al. (1987)**. Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. In: Preece T. (Ed.). *Methods in Plant pathology*. Blackwell. Oxford. UK. 212 p.
- Levy E et al. (1992)**. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40<sup>e</sup> édition. p. 71-163.
- Lugtenberg B et al. (2009)**. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* n. 63. P. 541-56.
- Lemanceau P. (1992)**. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie*. n. 12. p. 413-43.
- Nannipieri P et al. (2008)**. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. In Nautiyal Cet Dion P. (Eds.). *Soil biology: molecular mechanisms of plant and microbe coexistence*. Deutschland: Springer, Berlin Heidelberg. p. 339-365.
- Nguyen C. (2009)**. Rhizodeposition of organic C by plant: mechanisms and controls. In Lichtfouse E et al. (Eds.). *Sustainable Agriculture*. p. 375-396.
- O' Sullivan D et al. (1992)**. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* n. 56. P. 662-676.
- Pujic P et al. (2009)**. La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*. n. 298. p. 26-29.
- Pierson L et al. (2000)**. Microbial gossiping: signaling. In the rhizosphere proceedings of 5th PGPR Workshop. In **Hamdaoui A. (2013)**.

- Palleroni N. (1984)**. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In Krieg N et al. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I. Williams and Wilkins Co. Baltimore. USA. P.141-171.*
- Rillig M et al. (2006)**. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*. n. 171. p.41-53.
- Ramos Solano B et al. (2008 a)**. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad J et al. (Ed.). *Plant-bacteria interactions*. Weinheim : Wiley -Vch. p. 41- 52.
- Rajaonarimamy E. (2010)**. *Influence de la diversité mycorhizienne sur la symbiose Dalbergia trichocarpa Rhizobia et sur la structure de la microflore tellurique*. Mémoire pour l'obtention de diplôme d'études approfondies en sciences de la vie option: Biotechnologie/microbiologie : Université d'Antananarivo.
- Spiers A et al. (2000)**. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*. n. 146. P. 2345-2350. York. 787 p.
- Smith S et Read DJ. (2008)**. *Mycorrhizal symbiosis*. 3ème édition. Etats-Unis: Academic Press, New-
- Strullu D. (1991)**. *Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées*. 3ème édition. Paris : Lavoisier. 250p.
- Smidi M et al. (1982)**. *Bacteriocin Production by Pseudomonas Syringae in plant Tissue*. 2ème édition: Can .J. Microbiol. P.600-604.
- Schaad N et al. (2001)**. Initial identification of commungenora. In SCHAAD N. (Ed. Lab). *Guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2ème Ed. St. Paul, M.N. APS Press. p. 1-15.
- Tokala R et al. (2002)**. Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S. lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* n. 68. p. 2161-2171.
- Tilak K et al. (2005)**. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* n. 89. P. 136-150.
- Uren N. (2007)**. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In Pinton R et al. (ed.). *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York: CRC Press. p. 1-15.

- Van der Heijden M et al.(2008)**. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* n. 11.P. 296-310.
- Van Loon L. (2007)**. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria.*Eur. J. Plant Pathol.*n. 119.P. 243-254.
- Whipps J. (2001)**. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.*J. Exp Bot.* n.52.p.487-511.
- Whipps J. (2001)**. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.*Journal of Experimental Botany.* n.52.p. 487-511.
- Walker T et al. (2003)**. Root exudation and rhizosphere biology.*Plant Physiol.* n. 132.p.44-5.
- Whipps J.(2001)**. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.*J. Exp. Bot.* n. 52. P. 487-511.
- Weller D et al.(2002)**. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens.*Annu. Rev. Phytopathol.* n. 40.P. 309–348.
- Weyens N et al. (2010)**. Plant-Microbe Partnerships. In Timmis K. (ed.). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag. p. 254-264
- Zahir A et al. (2009)**. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratiasp.* containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticumaestivum*L.) under salt-stressed conditions.*Arch. Microbiol.* n. 191. P. 415-424.

**annexe**

**ANNEXE 1 : compositions des milieux de culture****1. Milieu LPGA**

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

**2. Milieu King B:**

Peptone	20g
Glycérol	15 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5g
MgSO <sub>2</sub>	1,5g
Agar	20g
Eau distillée	1L

**3. Milieu King A :**

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

**4. Milieu LEVANE**

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

**5. Milieu Hugh et Leifson**

Bactopeptone	2g
NaCl	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3g
Bleu de promothymol	1% 3mL
Glucose	10g
Agar	3g
Eau distillée	1L

**6. Milieu ARGININE**

Bactopeptone	1g
NaCl	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3g
Agar bactériologique	3g
Rouge de phénol	10m1
Solution 0.1%	
Arginine	10
Eau distillée	1L

**7. Milieu Gélatine**

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

**8. Milieu EPN.**

Peptone	10g
Nitrate de potassium	0,1
Eau distillé	1L

**9. Milieu PDA**

Agar	20 g
Glucose	20 g
Pomme de terre	200 g
Eau distillée	1l