

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالاغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Science biologiques

Option : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Thème

Isolement, identification et caractérisation de quelques souches d'*Azotobacter* sp. dans la région de Taouila willaya de Laghouat.

Présenté par :

- DOUIK CHAIMA
- EL KHELLAL NADA YASMINE

Devant le jury composé de :

Président:(MAA) Boukerouis Djoudi

Examineur:.....(MAA) Zerrouki Mohamed Hocine

Rapporteur:.....(MAA) Krantar Kamel

Année universitaire 2022/2023

Remerciment :

Le grand remerciement à notre dieu créateur qui nous a aidés en nous donnant la force et le courage durant ce travaille.

Je tiens à exprimer mon respect aux membres du jury.

*Je souhaite en premier lieu à montrer toutes ma gratitude à mon encadrant, **Dr Kamal krantar** qui nous a beaucoup aidé , soutenu et nous a permis d'arriver à ce niveau-là et pour excellents conseils et surtout pour son temps passé avec nous et sa patience , sans lui on n'aurait pas pu réaliser ce modeste travail et pour sa confiance en nous.*

*Je tiens également à remerci **Mr Boukerouis Djoudi** ,vous me faites un grande hennur en acceptant de président ce jury. J'ai pu apprécier l'étendue de vos connaissances e vos grandes qualités humaines . veuillez accepter mes sincères remerciement et mon profond respect.*

*Mes remerciements s'orientent ensuite vers **Dr Zerrouki Mohamed Hocine**, qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail. j'ai eu le privilège de bénéficier de votre enseignement lumineux durant mes années d'étude. Veuillez cher maire , trouver dans ce travail, le témoignage de ma gratitude et mon profond respect.*

Enfin , nous renouvelons nos remerciements à ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour réaliser ce travail sans oublier les enseignants qui ont contribués à notre formation.

Dédicace

Au phare de la connaissance, l'imam choisi, aux illettrés, qui a enseigné aux instruits au maître de la création

^Notre noble messenger, notre maître Muhammad, que la paix et les bénédictions soient sur lui
^

A la fontaine qui ne se lasse pas de donner à celle qui a tissé mon bonheur avec les fils tissés de son cœur

A plus beau sourire de ma vie..... A la femme la plus merveilleuse qui existe

" Ma chère mère, Aicha "

A ceux qui m'ont appris que le monde est un combat Et que sa bonté est la connaissance et la connaissance

A celui qui a lutté et lutté pour mon confort et ma réussite à celui qui n'a lésiné sur rien pour me pousser sur le chemin du succès Avec sagesse et patience

" cher papa, Bachir "

A ceux à qui j'ai fait un cadeau par prédestination A ceux dont l'amour coule dans mes veines et remplit mon cœur de leur mémoire tu es les fleurs de ma vie

" Mes chères sœurs, soundous , fadoua, salsabil "

En particulier mon petit bourgeon le plus doux de ma vie

" Mon cher frère, Amir Ahmed "

A qui nous avons marché ensemble alors que nous ouvrons ensemble la route vers le succès en cueillant une fleur que nous avons apprise

" Mes amis et collègues "

Je dédie ce travail à mon estimé professeur "Dr Kamal krantar "

Et je la remercie pour toute la laideur qui m'a aidé à accomplir cette recherche

A ceux qui m'ont façonné à ceux qui leur ont appris les lettres Et qui les ont pensés un phare qui illumine pour nous le chemin de la connaissance et de la réussite

" chers professeurs, chacun en son nom "

Je dédie cet humble travail, souhaitant de AllaH en espérant qu'il trouvera acceptation et succès Chaimaa

Dédicace

Je dédie cet ouvrage

Ama maman et papa qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'étude Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Amex frères mbarka ,hada,haouriya,tnahiya masoda ,chahra ,aicha ,hoda, nacira, mokhtar Mohamed et mes grand mère et Ceux qui ont partagé avec moi tour les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours

Pour mon prance taim.abdou.awabe.

Et ma pransace.sjoude.

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité

A tous mes amis qui m'ont toujours encourage, et à qui je souhaite plus de succès

Isolement, identification et caractérisation de quelques souches d'Azotobacter sp. dans la région de Taouila willaya de Laghouat.

Résumé :

Le but de notre étude a été d'isoler et de caractériser des souches fixatrices de l'azote atmosphérique dans des conditions non symbiotiques. 16 souches ont été isolées purifiées, et identifiées à partir de deux sites différents dans la région de Taouila. Toutes les souches isolées ont été capables de métaboliser le mannitol, le nitrate, l'amidon et l'urée en cométabolisme avec le glucose. Nous avons aussi obtenus une croissance positive à 42° et une tolérance à 44°C pour toutes les souches isolées. Le test de la tolérance au NaCl a montré que seulement trois souches AZE₁₍₆₎, AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ ont pu croître à un taux de 20% de NaCl. Parmi ces trois souches, deux seulement AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ ont enregistré une croissance dans un large intervalle de pH allant de 3 à 12. Les deux souches AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ ont montré une activité de dégradation de l'amidon positive ainsi qu'un cométabolisme urée glucose. Le résultat le plus valorisant de l'étude a été le rendement énergétique de la fixation de l'azote enregistré par la souche AZE₁₍₇₎ qui été de 11,80 mg de NH₃ formé par un gramme de glucose consommé et représente presque 69% de plus que celui de la souche AZE₂₍₇₎.

Mots clés : *Azotobacter, fixation de N₂, nitrogénase, nitrate et cycle d'azote.*

Isolation, identification and characterization of some strains of Azotobacter sp. in the region of Taouila wilaya of Laghouat.

Abstract:

The aim of our study was to isolate and characterize atmospheric nitrogen-fixing strains under non-symbiotic conditions. 16 strains were isolated, purified and identified from two different sites in the Taouila region. All isolated strains were able to metabolize mannitol, nitrate, starch and urea in co-metabolism with glucose. We also obtained positive growth at 42° and tolerance at 44°C for all the strains isolated. The NaCl tolerance test showed that only three strains AZE1(6), AZE1(7) and AZE2(7) could grow at 20% NaCl. Among these three strains, only two AZE1(7) and AZE2(7) showed growth in a wide pH range from 3 to 12. Both AZE1(7) and AZE2(7) strains showed degradation activity positive starch as well as urea glucose cometabolism. The most rewarding result of the study was the energy yield of nitrogen fixation recorded by the AZE1(7) strain, which was 11.80 mg of NH₃ formed by one gram of glucose consumed and represents almost 69% more than that of the AZE2(7) strain.

Keywords: *Azotobacter, N₂ fixation, nitrogenase, nitrate and nitrogen cycle.*

في منطقة تاويالة ولاية الأغواط *Azotobacter* عزل وتحديد وتوصيف بعض سلالات

الملخص

الهدف من دراستنا هو عزل وتوصيف سلالات تثبيت النيتروجين في الغلاف الجوي في ظل ظروف غير تكافلية. تم عزل وتنقية وتحديد 16 سلالة من موقعين مختلفين في منطقة طويلة. كانت جميع السلالات المعزولة قادرة على استقلاب المانيتول والنترات والنشا واليوريا في التمثيل الغذائي المشترك مع الجلوكوز. لقد حصلنا أيضًا على نمو إيجابي عند 42 درجة وتحمل عند 44 درجة مئوية لجميع السلالات المعزولة. أظهر اختبار تحمل كلوريد الصوديوم أن ثلاث سلالات فقط (6) AZE1 و (7) AZE1 و (7) AZE2 يمكن أن تنمو بنسبة 20٪ كلوريد الصوديوم من بين هذه السلالات الثلاثة، أظهر اثنان فقط من (7) AZE1 و (7) AZE2 نموًا في نطاق واسع من الأس الهيدروجيني من 3 إلى 12. أظهر كل من سلالتي (7) AZE1 و (7) AZE2 تدهور نشاط النشا الإيجابي وكذلك مذنب جلوكوز اليوريا. كانت النتيجة الأكثر فائدة للدراسة هي إنتاجية الطاقة من تثبيت النيتروجين التي سجلتها سلالة (7) AZE1، والتي كانت 11.80 مجم من NH3 المكونة من جرام واحد من الجلوكوز المستهلك ويمثل ما يقرب من 69٪ أكثر من القيمة المسجلة من طرف السلالة AZE2 (7).

الكلمات المفتاحية :

أزوتوبكترا، تثبيت النيتروجين، نيتروجيناز، دورة النترات و النيتروجين.

Liste des tableaux :

Tableaux	page
Tableau 01: Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm	5
Tableau 02: Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote	18
Tableau 03: Caractères phénotypiques des espèces de Azotobacter	27
Tableau 04: Les différentes souches fongiques et leur origine.	38
Tableau 05: Les souches bactériennes isolées.	40
Tableau 06: Résultats de la coloration de Gram.	45
Tableau 07: Résultats du test de l'activité catalase.	46
Tableau 08: Résultats de la croissance des bactéries à différentes températures.	47
Tableau 09: Les résultats de la tolérance au sel des souches isolées.	48
Tableau 10: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour les 3 souches AZE₁₍₆₎ ; AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ étudiées dans le milieu Mannitol mobilité nitrate.	49
Tableau 11: Résultats de la croissance des bactéries à différentes pH.	50
Tableau 12: les valeurs des paramètres de fixation de l'azote par les souches AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ .	54

Liste des figures :

Figure	page
Figure01 : La zone rhizosphérique (Bazot, 2005).	4
Figure02 : le cycle de l'azote d'après Hofman et Van Cleemput (2004) .	12
Figure03 : Les interactions mutualistes entre la plante et les microorganismes et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère.	21
Figure04 : <i>Azotobacter chroococcum</i> (0.2µm)	25
Figure05 : Mécanisme d'action de la nitrogénase (Dixon et al., 2004)	30
Figure06 : Localisation géographique des sites de prélèvement autour de Taouiala	33
Figure07 : Les étapes de la coloration de Gram	35
Figure08 : La coloration des cystes.	35
Figure09 : La mesure du pH dans chaque tube par pH-mètre.	36
Figure10 : Figure 10 : Illustration montrant la méthode de dosage du NH ₃ par spectrophotométrie	40
Figure11 : Figure 11 : Illustration montrant la méthode de dosage du glucose par spectrophotométrie	41
Figure12 : L'aspect des souches bactériennes isolées sur le milieu GN.	43
Figure13 : Des cellules de forme de bacille à Gram négatif.	44
Figure14 : Photo du test catalase positif sur une des souches isolées.	45
Figure15 : Photo montrant les Kystes formé par une des souches isolées.	46
Figure16 : Photos montrant l'aspect de la croissance des souches AZE ₁₍₇₎ et AZE ₂₍₇₎ sur milieu GN à 20% de NaCl.	48
Figure17 : Résultats du changement de la couleur du milieu Mannitol mobilité.	49
Figure18 : Les résultats du test nitrate réductase après ajout des réactifs nitrate A et nitrate B.	50
Figure19 : Photos du test de dégradation de l'amidon par les souches AZE ₁₍₇₎ et AZE ₂₍₇₎	51
Figure20 : Photos du test de dégradation de la caséine par les souches AZE ₁₍₇₎ et AZE ₂₍₇₎ sur milieu PCA ajouté de lait écrémé.	51
Figure21 : Résultats du changement de la couleur du milieu urease.glucosé inoculé par les souches AZE ₁₍₇₎ et AZE ₂₍₇₎ et incubé à 28°C pendant 72 heures.	52
Figure22 : Photos des résultats du test d'inhibition des souches d' <i>Azotobacter</i> AZE ₁₍₇₎ et AZE ₂₍₇₎ envers les différentes souches fongiques de références.	53

Liste des abréviations :

Al_3^{+} : L'aluminium

ATP: Adénosine Triphosphate

C : Carbone

C : degré Celsius

CEC : la capacité d'échange cationique

C/N : Rapport de carbone organique sur l'azote total

CO_2 : Dioxyde de carbone

Fe: fer

H^{+} : Hydrogène

Li^{+} : lithium

Mg : magnésium

Mn: manganèse

MO: matière organique

N : Azote

Na: sodium

NH_4^{+} : Ammonium

NH_3 : Ammoniac

NH_2^{-} : Nitrite

NH_3^{-} : Nitrate

O_2 : dioxyde

P : Phosphore

PGPR : plant Growth promoting Rhizobacteria

PH : potentiel d'hydrogène

PHP : poly- β -hydroxybutyrates

WG : milieu Winogradsky

Zn : zinc

SOMMAIRE

RESUME

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LIST DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

RESUME

ABSTRACT

ملخص

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I : RHIZOSPHERE

I-1-LA RHIZOSPHERE :4

I-2-LES MICROORGANISMES DU SOL :4

I-3-ETYMOLOGIE6

I-4- DEFINITION6

I-5-COMMUNAUTE MICROBIENNE DE LA RHIZOSPHERE :7

I-6-EFFETS BENEFIQUES DES RHIZOBACTERIES :8

I-6-1-Directe :8

I-6-2-Indirecte :8

I-7- MODES D’ACTION DES PGPR :10

CHAPITRE II : FONCTIONNEMENT ET ROLE DE L’AZOTE DANS LA NUTRITION DU PLANT:

II-1-L’Azote12

II-2-LE CYCLE DE L’AZOTE.....12

II-3- LES RISQUES DE PERTES D’AZOTE ASSOCIE A LA VALORISATION DES
ENGRAIS ORGANIQUES14

II-4-LES SOURCES D’AZOTES DANS SOL.....15

II-4.1.- Une source atmosphérique15

II-4.2-Une source organique.....15

II-4.3- Une source synthétique15

II-5-LES DIFFERENTES FORMES DE L’AZOTE DANS LE SOL15

II-6- LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L’AZOTE.....17

II-7- LES MICROORGANISMES QUI FIXENT L’AZOTE ATMOSPHERIQUE.....17

II-7.1- Les fixateurs symbiotiques.....	19
II-7.2- Les fixateurs non symbiotiques.....	19
II-8- LE COMPETITION ENTRE PLANTE ET LES MICROORGANISMES POUR L'ZOTE	22
CHAPITER III :ROLES DES RHIZOBACTERIE DANS L'AMELIORATION DE LA CROISSANCE VEGETALE	
III-1-DEFINITION ET MORPHOLOGIE d'AZOTOBACTER :	24
III-1.1-Les différentes espèces d'Azotobacter :	25
III-1.2-Caractères écologiques :	28
III-1.3-La nitrogénase.....	28
III-1.4-Caractères biochimique :.....	29
III-2-CLASSIFICATION D'AZOTOBACTER :	30
III-3-APPLICATION D'AZOTOBACTER DANS L'AGRICULTURE :.....	30
III-3.1-bio fertilisation.....	30
III-3.2- Rôle d'Azotobacter dans la fertilité des sols.....	31

CHAPITRE III : PARTIE E EXPERIMENTAL

1- Matière et Méthode	33
1-1-Lieu de travail	33
1-2-Prélèvement des échantillons des sols.....	33
1-3-Isolement du souches d'azotobactère	33
1-3-1- Méthode d'isolement et de purification	33
1-4- Identification des souches isolées	34
1-4-1- Caractérisation des examan macroscopique.....	34
a-Coloration de gram.....	34
b-Colorations des spores (cyste/kyste).....	35
1-4-3-Activité de la catalase	35
1-4-4-Mobilité et réduction du nitrate	36
1-4-5-Croissance à différent de Température T°.....	36
1-4-6-Croissance à différente PH	36
1-4-7-Croissance à différente salinité Nacl	37
1-4-8-Dégradation Amidon	37
1-4-9- Dégradation de la caseïne	37
1-4-10-Activité uréase	37
a- Utilisation de uree comme seul source de carbone	37
b- Utilisation de urée avec une source de carbone	38

1-5- Dosage antifongique	38
1-6-Activité enzymatique de la nitrogénase.....	39
RESULTATS ET ENTERPRITATION.....	43
DISCUSION	56
CONCLUSION.....	57
ANNEXE	
REFERENCES	

INTRODUCTION

Introduction

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. C'est le quatrième constituant des plantes, incorporé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les nucléotides, les acides nucléiques et la chlorophylle (**Gros, 1969 ; Epstein, 1972**). Il favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (**Stevenson, 1984**), il est aussi essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (**Lamaze et al., 1990**), l'azote est un facteur limitant majeur de la production agricole. L'atmosphère terrestre est constituée de 79% d'azote (N₂) (**Haynes, 1986 ; Foth, 1990**).

Cependant la concentration des formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance de la majorité des êtres vivants. L'azote moléculaire, constituant majeur de l'atmosphère mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par certains micro-organismes procaryotes appelés fixateurs d'azote, qui peuvent être libre ou symbiotiques.

Il y a plus de 150 ans que l'on a constaté que le sol contenait plus d'azote que la roche mère et qu'il existait donc une importante source d'azote inexplicée. Le rôle des micro-organismes dans ce phénomène a été reconnu en 1888 par Hellriegel et Wilfart en constatant que des légumineuses non ondulées étaient incapables d'incorporer l'azote moléculaire. La découverte de la fixation de l'azote par les bactéries libres est due à Beijerinck, en 1901. Depuis, de nombreux genres bactériens ont été reconnus comme fixateurs. Ces genres représentent pratiquement tous les types de comportements en ce qui concerne les relations plante-microorganisme, les relations avec l'oxygène et les modes trophiques (**Roger, 1996**).

La production agricole mondiale a connu une augmentation importante sur les plants quantitatifs, qualitatifs et diversification des produits, afin de subvenir aux besoins alimentaires d'une population humaine sans cesse croissante (**FAO, 2010**). L'intensification des systèmes de production par la mécanisation, l'utilisation des intrants chimiques sous forme des fertilisants et pesticides et l'utilisation des géotypes performants exigeantes davantage d'intrants, sont à la base de l'amélioration des rendements des cultures.

Néanmoins, les effets négatifs des produits chimiques des synthèse sur l'environnement (**Elmholt, 1991**), sur la biodiversité (**Giller et al., 1997**) et sur la sante humain (**Huang et al., 2005**) ainsi que le développement des résistances chez les agents pathogènes (**Ishii, 2006**) ont

Introduction

motive la communauté scientifique à chercher d'autres alternatives aux intrants chimiques afin d'assurer la durabilité de agriculture en augmentant sa rentabilité et en sauvegardant les ressources naturelles aux générations futures .

L'enjeu est de diminuer l'utilisation d'engrais azotés coûteux et polluants en céréaliculture. Le genre *Azotobacter* est un exemple pertinent dans l'amélioration de la croissance végétale du blé et de l'orge. *Azotobacter*, étant une bactérie diazotrophe vivant à l'état libre dans le sol, s'approvisionne de différents acides aminés et des sucres facilement disponibles dans la rhizosphère (**Madkour et al., 1990**) ou fournis par les exsudations racinaires (**Barber et Martin, 1976**).

L'objectif de notre étude est, d'isolé d'une souche capable de fixer le N₂ dans le sol à l'état non symbiotique et qui possède des propriétés de résistance aux conditions défavorable de l'environnement comme la température le pH et la salinité des sols pauvre en azote utile, ainsi qu'une faible consommation d'énergie lors du processus de transformation du diazote en ammoniacque.

CHAPITRE I

Rhizosphère

Rhizosphère

I-1-La rhizosphère :

La rhizosphère, terme employé pour la première fois en 1904 par Hiltner, correspond à la zone du sol soumise à l'influence des racines vivantes (Cregut, 2009), cette partie du sol est le siège des interactions mutuelles entre le sol les micro-organismes et la plante (Kirdi, 2011). La rhizosphère peut être définie comme la partie du sol qui est adjacente au système racinaire d'une plante et qui est influencée par les exsudats racinaires (Manoharachary et Mukerji, 2006) où les racines libèrent une grande quantité de métabolites à partir de poils absorbants ou de systèmes racinaires fibreux. Ces métabolites agissent comme des signaux chimiques pour que les bactéries mobiles se déplacent vers la surface des racines, mais représentent aussi les principales sources de nutriments disponibles pour soutenir la croissance et la persistance dans la rhizosphère (Nihorimbere et al., 2010).



Figure 1: La zone rhizosphérique (Bazot, 2005).

I-2- Les microorganismes du sol :

Les organismes vivants du sol sont variés et nombreux. Un sol contient typiquement 10^{09} à 10^{10} microorganismes par gramme de sol (Stephanie et al., 2007)

Le sol constitue un milieu particulièrement favorable à la vie, l'humidité, l'air et les matières organiques diverses permettent le développement et la conservation d'une multitude d'organisme vivant (Diehl, 1974). La biomasse microbienne joue un rôle primordial dans la décomposition de la matière organique dans les cycles des nombreux éléments nutritifs et dans l'organisation du sol (Robert et Chenu, 1992). On peut considérer la microflore du sol comme étant à la fois transformateur d'espèces appartenant aux groupes suivants : Bactéries, actinomycètes, champignons, algues et protozoaires (Dommergues, 1977). Les sols peuvent

contenir de très fortes populations microbiennes. Dans un sol de surface la population bactérienne mesurée au microscope, peut approcher les 10^8 10^9 cellules par gramme de poids sec de terre. (Prescott et al., 1999). Les bactéries et les mycètes des sols adoptent des stratégies fonctionnelles différentes. Les mycètes ont tendance à se développer à la surface des agrégats tandis que les micros colonies bactériennes sont communément associées avec les pores de petite taille. (Prescott et al., 1999). La communauté microbienne du sol contribue de façon importante au recyclage biogéochimique et aux cycles du carbone, de l'azote, du soufre, du fer et du manganèse. Parce que le sol est essentiellement un milieu oxydé. Si le sol contient des milieux localisés saturée en eau, où la diffusion de l'oxygène est plus lente, les cycles biogéochimiques se déplaceront vers les formes réduites (Prescott et al., 1999).

Tableau 1 : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm (Islam et Wright, 2006).

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasse (g/m ²)
Bactéries	10^8 - 10^9	40-500
Actinomycètes	10^7 - 10^8	40-500
Champignons	10^5 - 10^6	100-1500
Algues	10^4 - 10^5	1-50
Protozoaires	10^3 - 10^4	Variée

- **Les bactéries** : sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. On estime d'ailleurs que tous les groupes de bactéries connus pourraient être isolés d'un échantillon du sol, si les techniques et les milieux adéquats sont utilisés. Ce qui ne signifie pas que le sol soit le milieu naturel de toutes les bactéries. Par sa nature de milieu ouvert et sensible aux facteurs de l'environnement, le sol est le réceptacle d'apport continu de microorganismes exogènes qui disparaissent ou survivent en situation de dormance, en raison des conditions défavorables d'un milieu qui n'est pas le leur. Mais certains d'entre eux peuvent ponctuellement s'implanter. **(Ben Ahmed, 2017).**

I-3-Étymologie : 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 du 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.

Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire, 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 ». **(Abdesselam, N et Latache N, 2017)**

I-4- Définition C'est un lieu d'intenses échanges entre le végétal et le substrat minéral. Qui peut être affecté par le tassement du sol, un ennoisement durable, sa salinisation, son eutrophisation ou la pollution, ou encore par des phénomènes d'aridification **(Anoua et al., 1997)**. Elle joue un rôle important dans la résistance des sols à l'érosion, au gel, aux incendies, aux inondations, etc. De même pour la résilience de ces sols et des plantes. **(Krafczyk et al., 1984).**

I-5- Communauté microbienne de la rhizosphère

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

plus, les microorganismes jouent un rôle clé dans un grand nombre de processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition d'éléments nutritifs pour les plantes (**Sprent, 2001; Smith et Read, 2008**), les cycles biogéochimiques de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) et du carbone (**Högberg et al., 2001**) et la structure du sol (**Rillig et Mummey, 2006**). Alors que le rôle des microorganismes est largement établi dans les cycles biogéochimiques, leur impact sur la productivité et la diversité des plantes est encore insuffisamment compris. Un processus majeur dans la rhizosphère consiste en la rhizodéposition de composés carbonés par les racines. Un tiers de ce carbone permet l'élaboration de la biomasse racinaire, un second tiers est respiré par les racines, alors qu'un dernier tiers correspond à la rhizodéposition qui constitue une source d'énergie essentielle pour les microorganismes du sol. Ainsi, les racines et leurs rhizodépôts (notamment les exsudats racinaires) jouent un rôle majeur en stimulant les activités microbiennes et l'ensemble des chaînes trophiques qui en découlent. La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu (**Van Loon, 2007**). Ces modifications quantitatives de la microflore ou « effet rhizosphère », s'accompagnent également de modifications qualitatives. En effet, la diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère (**Cardon et Gage, 2006 ; Garbeva et al., 2008**) et leur activité métabolique (**Pinton et al., 2001; Nannipieri et al., 2008**) diffèrent de celles du sol nu. Les composés organiques exsudés par les plantes dans la rhizosphère augmentent l'activité et la prolifération de différents groupes de microorganismes et augmentent leur prolifération (**Bais et al., 2006**).

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée de procaryotes et d'eucaryotes (**Kent et Triplett, 2002 ; Cardon et Gage, 2006**). Certains sont sans effets sur le développement des végétaux (microorganismes commensaux), d'autres encore sont favorables (mutualistes) alors que d'autres, enfin, ont des effets délétères (parasites et phytopathogènes). (**Whipps, 2001**). La rhizosphère joue un rôle actif dans la régulation des interactions entre plantes et microorganismes (**Hirsch et al., 2003**). De ce fait, il a été suggéré que la plante favorise celles qui lui sont bénéfiques (**Lynch, 1987; Cook et al., 1995**). Afin d'optimiser les interactions favorables et développer des pratiques agricoles respectueuses de l'environnement il est nécessaire de mieux connaître le mécanisme de ces interactions.

Actuellement, l'inoculation par les microorganismes tels que les champignons mycorhizogènes (**Elhassan et al., 2010; Gianinazzi et al., 2010**) et les bactéries fixatrices d'azote (**Bhattacharjee**

et al., 2008 ; Elhassan et al., 2010) représentent un potentiel important pour l'amélioration de la croissance et la lutte biologique contre les maladies d'origine tellurique. La variabilité des résultats obtenus par l'utilisation d'organismes vivants est souvent supérieure à celle obtenue par l'application de produits de synthèse. De meilleures connaissances des mécanismes d'interaction permettraient de développer des pratiques autres que l'utilisation d'inoculants notamment celle consistant à favoriser des populations déjà présentes dans la rhizosphère et bénéfiques pour les plantes.

I-6-Effets bénéfiques des rhizobactéries

La microflore rhizosphérique bénéfique pour les plantes peut avoir soit un effet direct *via* les organismes associés à la racine (relations mutualistes) ou indirect *via* l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère (Van der Heijden et al., 2008).

I-6-1- Directs

Différents microorganismes de la rhizosphère mettent en place des associations symbiotiques avec les plantes et stimulent leur productivité et leur diversité. Les associations les plus connues sont celles des bactéries fixatrices d'azote appartenant aux actinomycètes et aux Rhizobiaceae. Les *Rhizobia* sont particulièrement bien étudiées, elles établissent des relations symbiotiques avec les plantes appartenant à la famille des légumineuses (Bloemberg et Lugtenberg, 2001). Cette symbiose entre les *Rhizobia* et les légumineuses se caractérise par la formation sur les racines hôtes de nodosités dans lesquelles ces bactéries se logent (Dénarié et al., 1992 ; Franssen et al., 1992 ; Perret et al., 2000). L'association symbiotique permet aux *Rhizobia* de bénéficier d'un micro-habitat favorable dans lequel ces bactéries ont accès aux substrats carbonés issus de la photosynthèse. En échange, les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammonium et le rendent, ainsi, directement assimilables par les plantes-hôtes. Les bactéries fixatrices d'azote sont des régulateurs importants de la productivité des plantes incapables d'utiliser l'azote atmosphérique sans ces microorganismes.

I-6-2- Indirects

Les microorganismes vivant librement dans la rhizosphère ont un effet bénéfique indirect sur la plante (Van der Heijden et al., 2008) caractérisé d'une manière générale par le processus de minéralisation, voie importante par laquelle ces microorganismes décomposent la matière organique insoluble et soluble et libèrent ensuite des éléments minéraux disponibles pour les plantes.

La fixation de l'azote atmosphérique est un mécanisme permettant aux microorganismes fixateurs dits 'libres' de favoriser l'amélioration de la croissance de la plante. Ces bactéries

appartiennent à différents genres tels que *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter* et *Azoarcus* (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000). Elles fixent l'azote à des taux relativement faibles mais néanmoins significatives ($< 3 \text{ kg ha}^{-1}$) (Cleveland et al., 1999). Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols lorsque l'azote du sol est un facteur limitant (Bloemberg et Lugtenberg, 2001). Certaines bactéries sont utilisées pour améliorer le développement de la racine *via* la production de phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg, 2001) telles les auxines dont l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000; Vessey, 2003; Barea et al., 2005). Alors que d'autres sont capables de favoriser la croissance des plantes par de la mise en place des symbioses entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote (Remans et al., 2007) et les champignons mycorrhizogènes (Garbaye, 1994; Frey-Klett et al., 2007; Pivato et al., 2009). Les

bactéries ayant la capacité de promouvoir l'établissement des mycorhizes en améliorant le contact des champignons avec les racines des plantes hôtes et la colonisation de ces racines, sont appelées **MHB (Mycorrhiza Helper Bacteria)** (Garbaye, 1994).

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

Ces bactéries sont capables d'avoir un effet protecteur en induisant des mécanismes de défense chez les plantes par la résistance systémique induite (**ISR : Induced Systemic Resistance**) (Van Loon, 2007) permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes. D'autres bactéries peuvent contrôler la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, pour le carbone (Lemanceau et al., 1988) et pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau et al., 2009). L'antagonisme microbien lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les phytopathogènes (Van Loon, 2007 ; Mazurier et al., 2009). Ces bactéries existants à l'état libre dans la rhizosphère et dont l'effet global favorise la croissance de la plante (Lemanceau, 1992) sont désignées collectivement par le terme **PGPR (Kloepper et Schroth, 1978)**.

Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a connu une grande augmentation 2 à 5% des rhizobactéries; elles comprennent de nombreuses espèces bactériennes parmi elles *Azotobacter* est présent en quantité importante au niveau de la rhizosphère (Whipps 2001; Ahmad et al., 2008).

I-7-Modes d'action des PGPR :

Les modes d'action des PGPR sont regroupés traditionnellement en directs et indirects. Bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes directs sont ceux agissant à l'intérieur des plantes et affectent directement leur métabolisme tandis que les mécanismes indirects, en général, sont ceux qui se produisent en dehors des plantes. Les mécanismes directs comprennent les processus de bio fertilisation (solubilisation des phosphates) et de bio stimulation (production des phytohormones : l'acide indole acétique, les cytokinines, l'acide gibbérillique...). Les processus de bio contrôle (production des métabolites antifongiques, production de composés volatiles...) constituent des mécanismes indirects. (Silini A , 2013).

Chapitre II

Fonctionnement et rôle de l'azote dans
la nutrition du plant

II-Fonctionnement et rôle de l'azote dans la nutrition du plant

II-1-L'Azote :

L'azote (N) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes. Bien qu'il y ait environ 78% de N_2 dans l'atmosphère, il est indisponible pour les plantes en croissance. Le N_2 atmosphérique est converti en formes utilisables par la plante par la fixation biologique de N_2 par les bactéries en utilisant un système enzymatique complexe appelé nitrogénase (Kim et Rees, 1994). Les bactéries fixatrices de l'azote ont la capacité de récupérer l'azote atmosphérique et de le fournir aux plantes par deux mécanismes: symbiotiques et non symbiotiques. La fixation d'azote symbiotique est une relation mutualiste entre une bactérie et la plante. La bactérie entre d'abord dans la racine et plus tard sur les nodules de forme dans lesquels se produit la fixation de l'azote. La rhizobie est un vaste groupe de rhizobactéries qui ont la capacité d'établir des interactions symbiotiques par la colonisation et forme de nodules racines dans le végétale, dans le quelle l'azote est fixé à L'ammoniaque et le rendre disponible pour l'hôte (Munees et Mulugeta, 2014).

II-2-Le cycle de l'azote

L'azote se déplace constamment entre sa forme minérale (NO_3 et NH_4), et sa forme organique (azote provenant de matières organiques azotées des organismes vivants ou morts, résidus de culture, déjections animales, matières organiques du sol). Le cycle d'azote

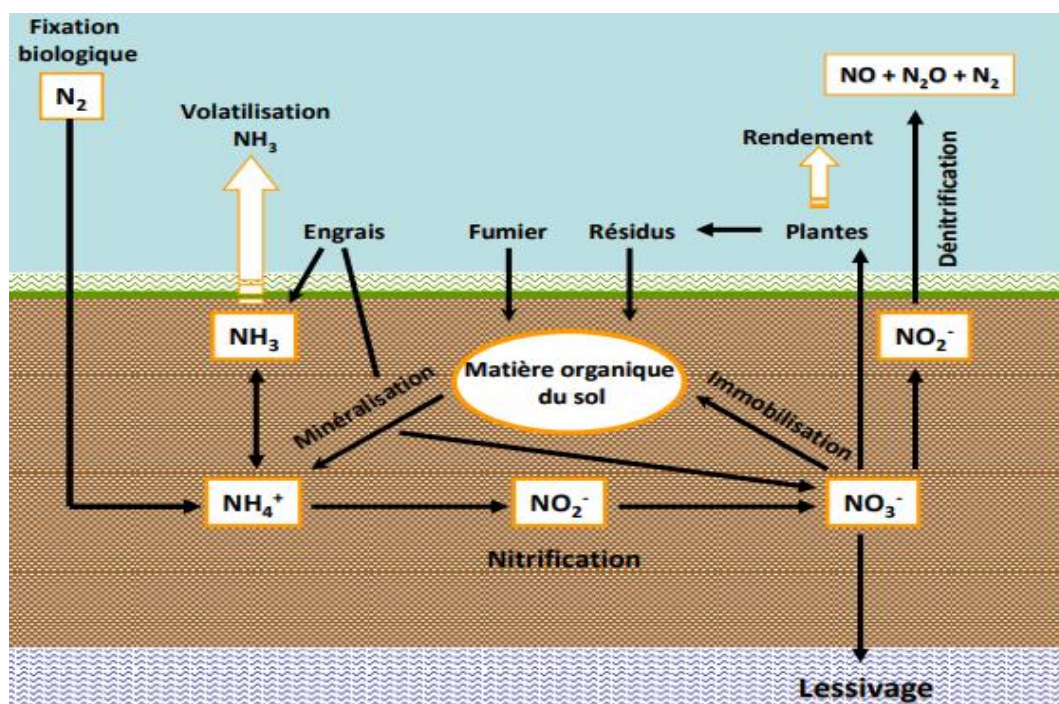


figure 02 : le cycle de l'azote d'après Hofman et Van Cleemput (2004).

comprend les étapes suivantes : Matière organique - décomposition – humification – minéralisation – **nitrification** $R-NH_2$ NH_3/NH_4 NO_2/NO_3

• Les végétaux produisent leur propre matière organique azotée à partir des sucres fabriqués par la photosynthèse et des ions NO_3^- (parfois NH_4) dissous dans l'eau du sol.

• Les animaux utilisent à leur tour les végétaux pour fabriquer de la viande, qui est aussi une matière organique azotée. De plus, comme les animaux n'utilisent pas 100 % de l'azote consommé, ils excrètent des déjections animales contenant de l'azote minéral (surtout NH_4) et de la matière organique azotée (R-NH_2).

• Une fois au sol, et lorsque les conditions sont favorables, les micro-organismes décomposeurs (bactéries et champignons), par le processus de la décomposition, de l'humification et de la minéralisation, transforment la matière organique azotée provenant des végétaux, des animaux morts ou des déjections animales, en CO_2 , H_2O et ammoniac (NH_3). Cet ammoniac est rapidement transformé en ammonium (NH_4) au contact de l'eau. Dans le cas inverse, il est volatilisé dans l'atmosphère.

• Par le phénomène de l'échange cationique du sol, l'ion ammonium (NH_4) est fixé aux colloïdes du sol (chargés négativement), et par la suite, échangé à la solution de sol. Plus le complexe argilo-humique est saturé en NH_4 , plus la solution de sol sera concentrée en cet élément.

• Par les bactéries responsables de la nitrification, l'ammonium (NH_4) est transformé en nitrate(NO_3).

• Dans le sol, le nitrate(NO_3) est de nouveau réutilisé par les végétaux et les microorganismes responsables de la décomposition de la matière organique, ou encore transformé en oxyde nitreux (N_2O) et en azote atmosphérique (N_2) par dénitrification dans des conditions humides et anaérobiques. Le N_2O est un puissant gaz à effet de serre.

Les systèmes de production agricole sont conçus pour maximiser la quantité d'azote contenue dans les parties végétales sous forme de protéines ou d'énergie. Par conséquent, le cycle de l'azote est marqué par d'importants prélèvements sous forme de récolte. Donc, pour maintenir les systèmes de production, et permettre que le cycle de l'azote se poursuive, il faut importer des apports d'azote, sous forme d'engrais minéral et organique, afin de remplacer l'azote exporté sous forme de récolte. En ce qui concerne les engrais organiques, certaines caractéristiques vont influencer leur efficacité fertilisante, c'est-à-dire leur capacité à libérer de l'azote minéral disponible pour les plantes. Précisons d'abord que le contenu en azote total des engrais organiques est composé d'azote organique et d'azote minéral (NH_4). $N_{\text{total}} = N^{\text{organique}} + \text{NH}_4$

Ainsi, outre le contenu en azote total des engrais organiques, les caractéristiques suivantes conditionnent la capacité de l'engrais organique à fournir de l'azote disponible (azote minéral sous forme NH_4) :

• Le rapport C/N (rapport entre le contenu en carbone et azote d'une matière organique). Plus ce rapport est élevé, moins rapidement l'azote sera minéralisé; à l'inverse, plus ce rapport est bas, plus rapidement l'azote organique sera minéralisé en NH_4 dans des conditions de minéralisation favorable. (Jocelyn, M.2006). La disponibilité de l'azote est donc fortement influencée par ce ratio.

• Le rapport NH_4/N total. Un rapport élevé indique que l'engrais organique est composé d'une grande proportion d'azote minéral (NH_4). Cet azote sera transformé en nitrate (NO_3) dans des conditions favorables de nitrification. À l'inverse, il y aura accumulation de NH_4 dans le sol. Ainsi, lorsque les conditions de minéralisation sont favorables, l'épandage d'un engrais organique, caractérisé à la fois par un faible rapport C/N de sa fraction organique et un rapport NH_4/N total élevé, fournira au sol une grande quantité d'azote disponible. Épandage post-récolte des engrais organiques et risques environnementaux liés aux pertes d'azote.

(Jocelyn, M.2006).

II-3- Les risques de pertes d'azote associés à la valorisation des engrais organiques

Sur la simple base théorique du cycle de l'azote, on peut comprendre qu'à chaque étape de ce cycle, il existe des risques de pertes d'azote. Les différents véhicules de pertes d'azote sont les suivants :

• Volatilisation de l'ammoniac (NH_3) quand celui-ci n'est pas rapidement mis au contact de l'eau.

• Lessivage du nitrate (NO_3) quand celui-ci est présent dans le sol mais n'est pas utilisé par une plante ou un micro-organisme. Par le phénomène de l'échange cationique : le NH_4 dissous dans la solution de sol peut aussi être lessivé.

• Ruissellement de l'ammonium (NH_4) et du nitrate (NO_3) dissous dans l'eau de surface.

• Érosion hydrique des particules fines de sol (argile + humus) qui sont chargées d'ammonium (NH_4), ainsi que de l'azote contenu dans la fraction solide des engrais organiques et des résidus de culture.

• Dénitrification : production d'oxyde nitreux (N_2O) et d'azote atmosphérique (N_2), à partir du nitrate (NO_3) dans des conditions de sols humides et d'anaérobies. Peut aussi être produit durant la nitrification, en condition de faible concentration d' O_2 qui limite l'oxydation des produits intermédiaires au nitrate (NO_3).

• Immobilisation : situation qui se produit lorsque les bactéries utilisent l'azote disponible du sol pour décomposer du matériel riche en carbone (> 40 C/N). Il est important de noter que l'immobilisation sous-entend une multiplication bactérienne et donc, que les conditions

doivent être adéquates, notamment quant à la température et l'humidité du sol. (Jocelyn, M.2006).

II-4-Les sources d'azote dans sol : Contrairement au calcium, au potassium et au phosphore, l'azote que l'on trouve dans les sols sous plusieurs formes ne provient pas de la dégradation de roches mais de deux autres sources.

II-4.1.- Une source atmosphérique : l'azote gazeux ou dioxyde d'azote N_2 , qui constitue 78 % de l'atmosphère, mélangé à l'oxygène. C'est la source primordiale d'azote du sol, qui s'y incorpore : - par les orages synthétisants, à partir de ce gaz, de l'acide nitrique H_2NO_3 , que les pluies entraîneront dans la terre où il évoluera en nitrate (très faible quantité), - par les bactéries fixatrices d'azote libres ou associées à des plantes. Ces bactéries l'utiliseront pour la synthèse de leurs protéines, dont se nourriront à leur tour les plantes.(Huber, G ; Schub, ch 2011)

II-4.2-Une source organique : l'azote incorporé dans les matières organiques végétales ou animales. Cette source dérive évidemment de la première. Les bactéries qui dégradent les matières organiques libèrent l'azote sous des formes assimilables par les plantes. (Huber, G ; Schub, Ch. 2011)

II-4.3- Une source synthétique : l'azote des engrais azotés synthétisés à partir de l'azote de l'air mais avec une forte dépense d'énergie, celle du pétrole. Il s'agit des engrais azotés dérivant de la synthèse de l'ammoniac NH_3 , dans lequel N vient de l'air, et H des hydrocarbures pétroliers. Si, au niveau d'une parcelle, les fumures azotées à base d'engrais de synthèse peuvent sembler importantes (de 100 à 500 kg de N/ha) au niveau d'un territoire englobant de vastes surfaces non fertilisées artificiellement, les sources naturelles d'azote sont de loin les plus importantes (Huber, G ; Schub, Ch 2011)

II-5-Les différentes formes de l'azote dans le sol : Christian, et al., (2005) montrent que dans la nature, l'azote est présent sous deux états : à l'état libre (N_2) dans l'atmosphère et à l'état combiné, sous forme minérale (ammoniacale et nitrique) ou organique.

II-5.1-L'azote élémentaire : En phase gazeuse, la teneur en azote élémentaire (N_2) est voisine de celle de l'atmosphère 20 à 21 %. Seuls certains micro-organismes sont capables d'utiliser cet azote (Vilain, 1997).

II-5.2- L'azote minéral : Dans le sol, l'azote minéral peut être présent sous trois formes : l'ion ammonium (NH_4^+) ou azote ammoniacal, l'ion nitrite (NO_2) ou azote nitreux et l'ion nitrate (NO_3^-) ou azote nitrique. Les deux formes (ammoniacal et nitrique) sont présentes dans la solution du sol et facilement extractibles au laboratoire (Vilain, 1997 ; Baize, 2000 ; Christian, et al., 2005).

• **Azote ammoniacal (N-NH₄⁺)** Selon **Vilain (1997) ; Mathieu et Pieltain (2003)**, le sol renferme peu d'azote ammoniacal, c'est une forme essentiellement transitoire, rapidement transformée en azote nitrique à la belle saison. Les plantes peuvent absorber légèrement les ions ammonium (NH₄⁺). **Barroin et al., (1997) in Lemaire et Nicolardot (1997)**, mentionnent que c'est la forme la plus réduite de l'azote. L'ammoniac, produit de la dissolution du gaz ammoniac (NH₃) dans l'eau, se présente sous deux formes : Une forme non dissociée (NH₃) et une forme dissociée en anion hydroxyle (OH⁻) et cation ammonium (NH₄⁺). Ces deux formes sont à l'équilibre : $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$

• **Azote nitreux (N-NO₂)** C'est une forme de transition, éphémère, soit de l'oxydation d'N-NH₄⁺ en azote nitrique (N-NO₃³), soit de la réaction inverse de réduction (**Barroin et al., 1997 in Lemaire et Nicolardot, 1997**).

• **Azote nitrique (N-NO₃)** **Barroin et al., (1997) in Lemaire et Nicolardot (1997)**, constatent que l'azote nitrique représente la forme la plus oxydée de l'azote ; Il est considéré comme une source de l'azote pour les organismes végétaux. L'azote nitrique très mobile est la forme principale d'absorption de l'azote par les plantes, ce surtout les ions nitrate (NO₃⁻) qu'elles utilisent (**Mathieu et Pieltain, 2003**).

II-5.3-L'azote organique C'est celui qui est intégré à des molécules organiques plus ou moins complexes résultant de la décomposition des

matières végétales, animales ou microbiennes (protéines, acides nucléiques, amino-sucres, etc.). C'est également celui qui compose la biomasse vivante du sol (micro-organismes). De plus, **Hebert (1979) in Bouhidel (2006)**, note que l'azote organique représente plus de 95% de l'azote total, dans la plupart des sols. Ces formes ne sont pas généralement assimilables sauf les très petites molécules telles que l'urée (**Baize, 2000**). **D'après Christian et al., (2005)**, la masse d'azote, presque exclusivement organique, contenue dans les sols cultivés, atteint souvent 3 à 5 tonnes par hectare. Elle est principalement localisée dans la couche labourée (0 à 30 cm environ).

II-5.4- L'azote total C'est l'ensemble de toutes les formes d'azote minéral et organique présentes dans un échantillon du sol, excepté l'azote gazeux (essentiellement représenté par le N₂ de l'air). L'azote total représente un pourcentage variant dans de larges limites. Sa teneur en sol cultivé est comprise entre 0.1 et 0.5%. Les abaques de fertilité, que rapportent **Calvet et Villemin (1986) in Bouhidel (2006)** concernant l'azote total permettent de séparer :

- Sol très pauvre avec : N < 0.05 %
- Sol pauvre avec : 0.05 > N > 0.10 %
- Sol moyen avec : 0.10 > N > 0.15 %

- Sol riche avec : $0.15 > N > 0.25$ %

- Sol très riche avec : $N > 0.25$ % (Lakhab, R.2012).

II-6- La fixation biologique de l'azote : (ou « diazotrophie ») La fixation biologique de l'azote atmosphérique est l'une des premières étapes du cycle de l'azote. C'est un processus métabolique, réalisé exclusivement par des organismes procaryotes (azotobacter ou rhizobiums) possédant les enzymes nécessaires pour fixer l'azote atmosphérique (N_2), notamment une enzyme appelée la Nitrogénase. Cette enzyme permet de convertir le nitrogène (N_2) en azote ammoniacal (NH_3), qui lui est assimilable par la plante. Cette dernière peut constituer les molécules organiques nécessaires à sa croissance (notamment les protéines) .

II-7- Les microorganismes qui fixent l'azote atmosphérique : Les microorganismes qui fixent le nitrogène (N_2) sont tous des microorganismes diazotrophes. Ils sont réparti en deux groupes : les fixateurs libres tels que Azotobacter, Klebsiella (Tourte et al., 2005)et les fixateurs symbiotiques tels que les ont besoin de la présence d'un végétal en croissance fixer l'azote, et ceci de manière très spécifique, c'est à dire que chaque espèce de rhizobium s'associe avec une espèce particulière de légumineuses (Madigan et Martink, 2007)

Tableau 2 : Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote (**Roger et al., 1996**)

Micro-organismes libres				
Aérobies	Hétérotrophes	Azotobacter spp ; Klebsiella pneumoniae		
		Beijerinckia indica ; Azospirillum lipoferum		
	Phototrophes : Cyanobactéries	Hétérocystées	Nostoc ; Anabaena ; Calothrix ; Tolypocheix	
		Homocystées	Trichodesmium, Oscillatoria	
		Unicellulaires	Gloeotheca ; Gloeocapsa	
Anaérobies	Hétérotrophes	Clostridium pasteurianum ; Desulfovibrio vulgaris ;		
		Desulfotomaculum spp ; Methanobacterium spp		
	Phototrophes	Rhodospirillum rubrum ; Rhodobacter capsulata ;		
		Chromatium vinosum		
Micro-organismes symbiotiques				
Légumineuses	à nodules racinaires	Rhizobium melilon		
		Bradyrhizobium japonicum		
	à nodules caulinaires	Azorhizobium caulinodans		
Symbioses actinorhiziennes		Frankia		
Symbioses à cyanobactéries	Azolla	Anabaena azollae		
	Cycas	Anabaena cycadeae		
	Lichens	Nostoc		
	Mousses et hépatiques	Nostoc		

II-7.1- Les fixateurs symbiotiques : Ganry et Domergues, (1995) ont divisé les fixateurs d'azote associées aux plantes supérieures en trois groupes distinct : Le vaste groupe des rhizobiums associés à des légumineuse; la symbiose est plus fréquente avec les espèces des sous familles des papilionacées et des mimosacées qu'avec celles des césalpiniacees. Les Frankias, bactéries filamenteuses sporulante (actinomycètes), associées aux plantes dites actinorhiziennes. Ces dernières, sauf exception, sont des arbres et des arbustes, par exemple des genres Alanus, Casuarina, Eleagnus et en fin les cyanobactéries, associées à des hôtes divers allant des cycades aux Azolla (petite fougère aquatique que l'on rencontre en particulier dans les rizières) ce troisième groupe ne concerne pas les plantes ligneuses.(**Dekak, A.2011**)

II-7.2- Les fixateurs non symbiotiques : Les photosynthétats qui ne sont pas utilisés par la plante ou par les symbiotes sont alors utilisés par les microorganismes du sol pour leur croissance. Ils vont les décomposer et les minéraliser. Les produits de cette minéralisation seront ainsi directement assimilables par la plante (**Loreau 2000**). Ces nutriments peuvent également être stockés dans la biomasse microbienne du sol. Les microorganismes vont de ce fait influencer leur répartition spatiale et temporelle. Par exemple, l'immobilisation de l'azote par les microbes telluriques va limiter les pertes de cet élément dans les eaux souterraines (**Brooks et al., 1998**) et ainsi le maintenir à disposition pour la plante. De plus, dans les écosystèmes pauvres en azote, la biomasse microbienne accumule cet élément de façon importante en automne, au moment de la sénescence de la plante et le retient durant l'hiver et jusqu'au printemps où il sera alors disponible pour la plante (**Bardgett et al., 2005**). Les microorganismes telluriques peuvent également avoir un rôle de protection contre les maladies (**Eparvier et al., 1991**). Le rôle de protection passe le plus couramment par la production d'antibiotiques. *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* sont des bactéries capables de produire des antibiotiques permettant à la plante *Raphanus sativus*, le radis, de se défendre contre les *Fusarium*, des champignons pathogènes du sol (**Brencic & Winans 2005**). La protection assurée par les microorganismes non symbiotiques envers la plante peut également passer par des phénomènes de compétition entre ces microorganismes et les pathogènes. C'est le cas pour *P. fluorescens* qui permet la suppression des maladies par la compétition pour le fer. Le fer a une faible solubilité et par conséquent il est souvent en quantité limitée dans le sol et la rhizosphère. *Pseudomonas fluorescens* va sécréter des sidérophores (les pyoverdines) qui sont des composés ayant une forte affinité pour le fer et permettant à la bactérie de chélater le fer et de l'accumuler (**Lemanceau 1992**). Le fer n'est alors plus disponible pour les microorganismes pathogènes du sol qui en ont besoin pour leur croissance et leur activité.

Certains microorganismes sont capables de produire des biosurfactants qui sont des composés pouvant endommager directement les membranes cellulaires de certains pathogènes et entraîner leur mort (**Brencic & Winans 2005**). En outre, des bactéries comme les *Pseudomonas* peuvent sécréter des enzymes (protéase, chitinase, lipase) capables de perturber la croissance de champignons pathogènes (**Bolwerk et al., 2003**). Elles peuvent aussi produire des métabolites antifongiques qui vont limiter la maladie chez la plante (**Bolwerk et al., 2003**). Les microorganismes non symbiotiques mutualistes vont donc influencer positivement la croissance de la plante en jouant un rôle sur la disponibilité et la répartition des nutriments (**van der Heijden et al., 2008**).

Certaines espèces microbiennes comme les bactéries *Pseudomonas* (**Doornbos et al., 2012**) ou les champignons du genre *Trichoderma* (**Harman et al., 2004**) sont des microorganismes libres, non symbiotiques à la base, mais qui ont aussi la capacité de s'associer avec une plante et de s'établir dans les racines. Ils vont alors s'assurer une source de nutriments et vont être bénéfiques pour la plante hôte. Les bactéries qui sont mutualistes vis-à-vis de la plante, qu'elles soient symbiotiques ou non, sont appelées bactéries PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria), ou Rhizobactéries promouvant la croissance de la plante. Elles ont des effets bénéfiques sur le développement et la croissance végétale, le contrôle des pathogènes et la dégradation des composés toxiques pour la plante (**Bakker et al., 2007**). Cependant, certains microorganismes non-symbiotiques peuvent avoir un effet négatif sur la plante quand ils sont impliqués dans des phénomènes de compétition avec la plante ou quand ils sont responsables de la perte de nutriments. Par exemple, en cas de carence en azote, les microorganismes qui utilisent également une partie de l'azote minéral vont être en compétition avec la plante pour cet élément. Enfin, le processus de dénitrification, effectué par les bactéries dénitrifiantes et par quelques espèces de champignons, peut entraîner la perte de l'azote sous une forme gazeuse. Par exemple, dans les écosystèmes forestiers tropicaux, la perte d'azote minéral du sol par le processus de dénitrification peut représenter jusqu'à 50 % du pool d'azote. La croissance de la plante va alors être négativement affectée par ce type de microorganismes de par le manque de nutriments. La productivité végétale peut aussi être affectée directement par certains pathogènes entraînant la mort de la plante. C'est le cas par exemple des bactéries *Erwinia* qui libèrent des enzymes provoquant une dépolymérisation des parois cellulaires végétales et donc le pourrissement de la plante (**Brencic & Winans 2005**). Qu'ils soient mutualistes ou parasites, les microorganismes non symbiotiques peuvent influencer la diversité et la composition des communautés végétales, en influençant le potentiel adaptatif des plantes au

milieu abiotique (apport en nutriments) ou biotique (compétition intra-règne et meilleure tolérance/résistance à des organismes pathogènes)

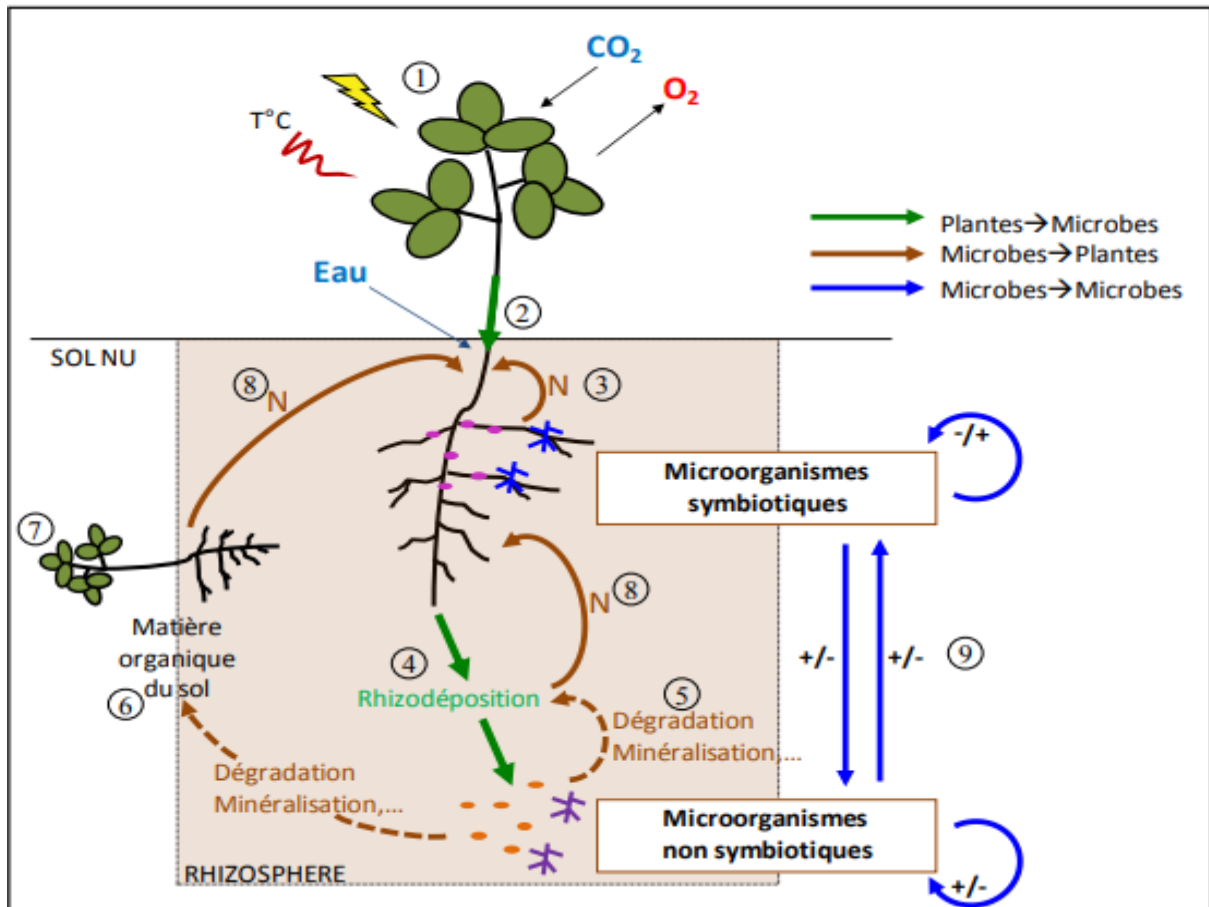


Figure 03 : Représentation schématique des interactions mutualistes entre la plante (autotrophe) et les microorganismes (hétérotrophes) et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère. (1) La plante réalise la photosynthèse grâce à l'énergie lumineuse, le CO₂, l'eau et les nutriments ; la température est également un facteur important dans ce processus. (2) Une partie des photosynthétats produits par la plante suite à la photosynthèse va être fourni aux microorganismes symbiotiques qui (3) en échange vont fournir des nutriments (N) à la plante. (4) Le reste des photosynthétats sera libéré dans le sol, via la rhizodéposition, et disponible pour la croissance des microorganismes non symbiotiques. Ces derniers vont, en retour, dégrader la matière organique présente (5) dans la rhizosphère ou (6) dans le sol nu, ainsi que (7) la matière végétale à la mort de la plante afin de (8) fournir des nutriments à la plante. (9) Il existe aussi des interactions entre les microorganismes eux-mêmes qui peuvent intervenir dans les interactions plante-microbes. (Clémentine, L, 2013).

II-8- le compétition entre plante et les microorganisme pour l'azote : La compétition entre les plantes et les microorganismes pour l'azote minéral est un phénomène commun dans le sol. Il a été souvent démontré que les microorganismes sont beaucoup plus compétiteurs par rapport aux plantes pour l'azote minéral dans le sol (**Jackson et al., 1989**). Les microbes ont l'avantage d'avoir une affinité plus élevée avec le substrat, un plus large rapport surface/volume et un plus rapide taux de croissance (**Hodge et al., 2000**). Ceci étant, « Comment les plantes peuvent elles concurrencer avec succès contre les microbes pour l'azote du sol ? », si elles sont des pauvres compétiteurs individuellement ou à l'échelle locale comment réussissent elles dans une échelle plus large de l'ensemble du sol ? Deux explications peuvent être fournies : Les mycorhizes agissent comme des mercenaires microbiens : - elles augmentent les surfaces d'absorption de la racine des plantes et par conséquent l'absorption des éléments minéraux ; elles ont un rôle direct dans la décomposition et dans l'absorption des nutriments organiques. Donc, les mycorhizes permettent aux plantes partenaires d'être un bon compétiteur contre les microorganismes saprophytes. La seconde est l'amélioration de la compréhension des dynamiques des microsites dans le sol (**Hodge et al., 2000; Korsaeath et al., 2001**). Ils existent des microsites où c'est la minéralisation nette qui domine et d'autres où c'est l'immobilisation qui domine (**Jackson et al., 1989; Burger et Jackson, 2003**). L'azote (organique ou inorganique) disponible diffuse entre ces sites et est disponible pour l'organisme qui le rencontre en premier. Ce mécanisme permet à la racine des plantes et aux mycorhizes l'accès à l'azote qui pourrait être absorbé par les microorganismes libres vivants.

Puisque la plante retient l'azote pour un temps plus ou moins long, alors que le turnover microbien est plus rapide, même si la plante a seulement accès à une petite fraction de l'azote biodisponible dans le sol, quand on intègre le temps, les plantes deviennent plus compétitives (**Kaye et Hart, 1997**).

Chapiter III :

Rôles des Rhizobactérie dans
l'amélioration de la croissance végétale

III-Rôles des rhizobactérie dans l'amélioration de la croissance végétale

Diverses études visent à développer des cultures tolérantes au sel et surmonter ainsi l'effet de la salinisation (**Khan et al., 2009**). Actuellement, la création par sélection ou d'OGM de variétés résistantes aux sols salins et/ou aux eaux d'irrigations saumâtres est un sujet de recherche et de spéculation financière. Les généticiens cherchent à insérer dans des plantes cultivées des éléments de génomes d'autres plantes ou d'autres organismes résistants au sel. Mais l'un des problèmes agronomiques est qu'en zone salinisée (ou à risque de salinisation), des cultures intensives d'arbres ou plantes résistantes au sel peuvent en augmentant l'évapotranspiration concentrer le sel encore plus dans les couches supérieures du sol et aggraver les effets de la salinisation pour les autres organismes. Ce type d'approche n'est ni facile, ni économique pour une agriculture durable, tandis que l'inoculation microbienne est une meilleure option (**Hartmond et al., 1987**). L'utilisation de **PGPR** (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) comme inocula dans l'agriculture pour réduire le stress salin est la voie la plus prometteuse pour améliorer la production et le rendement des régions touchées par la salinité.

III-1-Définition et morphologie d'Azotobacter :

Les bactéries du genre *Azotobacter*, en plus d'être des diazotrophes, jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. *Azotobacter* étant qualifié de PGPR synthétise des substances biologiquement actives telles que les phytohormones (les auxines) stimulant ainsi la croissance des plantes (**Ahmed et al., 2005**). Ils facilitent également la solubilité de certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration des sols (**Rajae et al., 2007**).

Les *Azotobacter* sont les plus abondantes, et les plus actives, ce sont des bactéries ovoïde ou en bâtonnets de 1.5 à 2 μm ou plus, groupées par paires ou en amas ou encore en chaînettes de longueur très variée, elles sont mobiles grâce à des cils pérétriches ou immobiles. ([Http://dspase.univer-mslla.dz](http://dspase.univer-mslla.dz))

peuvent prendre plusieurs formes (cocci ou batonnets) non sporulés, Ce sont des bactéries aérobies à métabolisme strictement respiratoire. Contrairement au genre *Azomonas*, *Azotobacter* a la capacité de former des cystes en absence de nutriments. Ceux-ci remplis de poly- β -hydroxybutyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux comme source d'énergie. Le genre comprend plusieurs espèces (*chroococcum*, *beijerinckii*, *vinelandii*, *nigricans*, *armeniacus*, *paspali*...) qui se distinguent par leurs caractères biochimiques et la production de pigments.

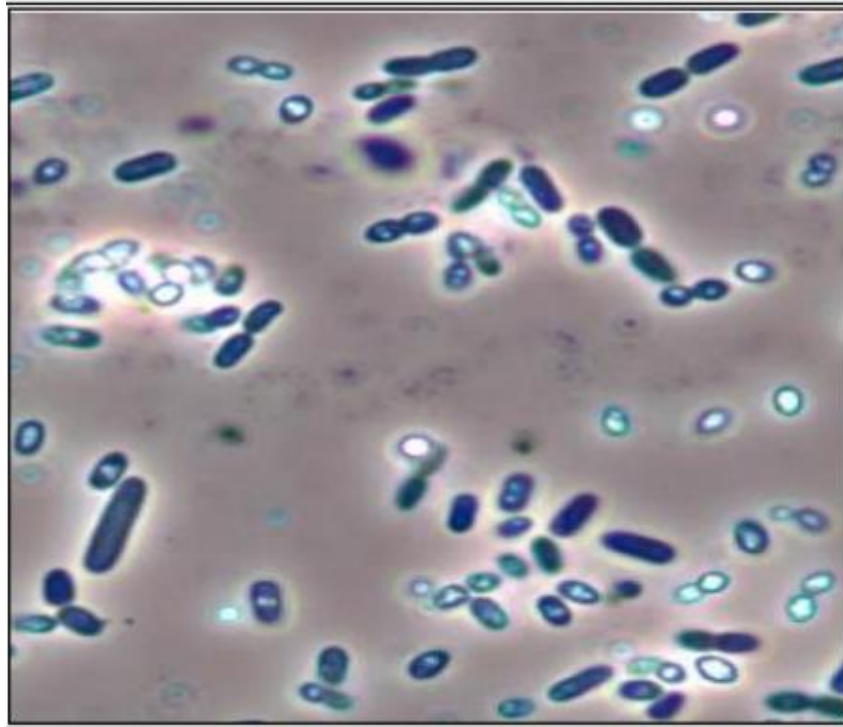


Figure 04: *Azotobacter chroococcum* (0.2 μ m de diamètre en microscope)

- Aérobic mais peu se développer dans des états réduits en l'oxygène.
- Gram négatif.
- Catalase positif.
- Fixateur non symbiotique d'azote.
- Le pourcentage : G + C = 63 % à 66 %.
- Peuvent se développer à des pH : 5.5 à 8.5 mais l'optimum est de 7 à 7.5.
- La gamme de température est de 20 à 30 C°.
- Peuvent produire des pigments hydrosolubles vert jaunâtre florissante ou rouge violet

Elles sont incapables de former les endospores, mais elles forment des kystes pour le protéger contre le séchage et le rayonnement ([Http://dspase.univer-mslla.dz](http://dspase.univer-mslla.dz)).

III-1.1-Les différentes espèces d'*Azotobacter* :

Le genre *Azotobacter* a six espèces qui sont les fixateurs d'azote atmosphérique mais peuvent se développer sur des sources alternatives de l'azote tel que l'ammoniaque, l'urée et le nitrate (**Buchanan et Gibbons, 1974**).

Azotobacter est un genre bactérien appartenant à la sous-classe des *Gammaproteobacteria*. Selon la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(2005) (**Brener et al., 2005**) le genre *Azotobacter* est transféré de la famille des Azotobacteriaceae à la famille des Pseudomonadaceae sur la base des séquences des ADNr 16S. Les cellules du genre *Azotobacter* sont des bacilles à Gram négatif, ovoïdes et relativement larges (2 à 4 μ m, jusqu'à 6 μ m) et peuvent prendre plusieurs formes (cocci ou batonnets) non sporulés, mobiles grâce des flagelles

multiples. Ce sont des bactéries aérobies à métabolisme strictement respiratoire. Contrairement au genre *Azomonas*, *Azotobacter* a la capacité de former des cystes en absence de nutriments. Ceux-ci remplis de poly- β -hydroxybutyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux comme source d'énergie. Le genre comprend plusieurs espèces (*chroococcum*, *beijerinckii*, *vinelandii*, *nigricans*, *armeniacus*, *paspali*...) qui se distinguent par leurs caractères biochimiques et la production de pigments (Tableau. 3).

Les *Azotobacter* sont ubiquitaires et peuvent être isolés de l'eau et du sol où ils y vivent librement. Cependant, ils sont beaucoup plus nombreux au voisinage des racelles. Bien qu'ils n'en soient pas dépendants, ils sont plus abondants près des racines et dans la rhizosphère qu'ailleurs dans le sol. Les *Azotobacter* préfèrent les sols neutres ou légèrement alcalins, bien oxygénés et moyennement humides. Ces bactéries fixent mieux l'azote atmosphérique dans les sols où les apports d'azote minéral sont réduits. Elles peuvent fixer au moins 10 μ g d'azote/g de glucose consommé. La fixation nécessite les ions molybdène. Ces bactéries exigent néanmoins des apports organiques importants probablement comme source de carbone. Il semblerait que ces bactéries aient d'importantes facultés à utiliser les apports minéraux sous forme insoluble qu'il s'agisse de phosphates ou de nitrates (**Buchan et Gibbous, 1974**).

Les bactéries du genre *Azotobacter*, en plus d'être des diazotrophes, jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. *Azotobacter* étant qualifié de PGPR synthétise des substances biologiquement actives telles que les phytohormones (les auxines) stimulant ainsi la croissance des plantes (**Ahmed et al., 2005**). Ils facilitent également la solubilité de certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration des sols (**Rajae et al., 2007**).

Tableau 03: Caractères phénotypiques des espèces de Azotobacter (**Brener et al.,2005**)

	A. chroococcum	A. beijerinckii	A. vinelandii	A. nigricans	A. armeniacus	A. paspali
Morphologie	Bâtonnets ovales ou cocci.	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets long aux extrémités arrondies.	Bâtonnets aux extrémités arrondies.
Dimension	3 à 7µm de long 1,5 à 2,3µm de large.	3,2 à 5,3µm de long 1,7 à 2,7µm de large.	3 à 4,5µm de long 1,5 à 2,4 µm de large.	4,1 à 4,9µm de long 1,5 à 2,7µm de large.	5 à 5,7µm de long 1,7 à 2 µm de large.	7 à 10,9µm 1,3à 1,7µm Mais des fois 3,2 à 4,2µm 1,6 à 1,9µm.
Disposition	En paire.	Cellules isolées ou en paires parfois en petite chainette	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires
Mobilité	Mobile par des flagelles péritriches.	-	Mobile par des flagelles péritriches	-	Mobile par des flagelles péritriches.	Mobile par des flagelles péritriches.
Fluorescence vert jaunâtre	-	-	+	-	-	+
Fluorescence verte	-	-	+	-	-	-
Fluorescence marron – noir	+	-	-	+	-	-
Fluorescence rouge– violet	-	-	+	+	+	+
MannitoL	+	+	+	+	+	-
Rhamnose	-	-	+	-	+	-
Caprylate	-	-	+	-	+	-
Malonnat	+	+	+	+	-	-
	-			-		

III-1.2-Caractères écologiques :

Les Azotobacter sont ubiquitaires et peuvent être isolés de l'eau et du sol où ils y vivent librement. Cependant, ils sont beaucoup plus nombreux au voisinage des racelles. Bien qu'ils n'en soient pas dépendants, ils sont plus abondants près des racines et dans la rhizosphère qu'ailleurs dans le sol. Les Azotobacter préfèrent les sols neutres ou légèrement alcalins, bien oxygénés et moyennement humides. Ces bactéries fixent mieux l'azote atmosphérique dans les sols où les apports d'azote minéral sont réduits. Elles peuvent fixer au moins 10µg d'azote/g du glucose consommé. La fixation nécessite les ions molybdène. Ces bactéries exigent néanmoins des apports organiques importants probablement comme source de carbone. Il semblerait que ces bactéries aient d'importantes facultés à utiliser les apports minéraux sous forme insoluble qu'ils s'agissent de phosphates ou de nitrates (**A.Boulanger, 2009**).

. Les bactéries du genre Azotobacter sp, en plus d'être des diazotrophes, jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. Azotobacter sp étant qualifié de PGPR synthétise des substances biologiquement actives telles que les phytohormones (les auxines) stimulant ainsi la croissance des plantes. Ils facilitent également la solubilité de certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration des sols (**A.Boulanger, 2009**).

III-1.3-La nitrogénase : C'est une enzyme bactérienne, responsable de la fixation de l'azote et de sa transformation en ammonium directement assimilable par la plante qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines solubles des bactéroïdes (**Ramdane et Boukarana, 2016**). La nitrogénase bactériostatique catalyse la réduction à six électrons de N₂ en ammonium et à une réduction associée de 2H⁺ en H₂ qui utilise 16 à 18 molécules d'ATP (**White et al., 2007**).

La fixation de l'azote catalysée par la nitrogénase se fait selon la réaction suivante :



La nitrogénase la plus étudiée est le système contenant le molybdène et consiste en deux métalloprotéines, à savoir la dinitrogénase réductase (protéine Fe), un homo-dimère possédant un cluster "fer-soufre" (4Fe4S) et considérée comme un transmetteur d'électrons ATP- dépendant, à partir d'un donneur tel que la flavodoxine ou ferrédoxine, à la deuxième

protéine dite la dinitrogénase (protéine MoFe) qui contient le site de fixation et de réduction

du nitrogène (**Ferguson 1998; Rees et al., 2000; Dixon et al., 2004; Cheng 2008**). La protéine MoFe possède deux types de cluster: le P-cluster et le cofacteur MoFe (MoFeco) (**Ferguson1998 ; Rees et al., 2000**). La réaction requiert un donneur d'électrons en plus de l'adénosinetriphosphate (ATP). Les électrons sont générés de différentes manières dépendamment du métabolisme de l'organisme (**Cheng 2008**). Ces électrons sont transférés directement à la flavodoxine ou à la ferrédoxine, transporteurs qui assurent le transfert des électrons de la protéine Fe de la nitrogénase et un cycle de réactions d'oxydo- réduction démarrera en conséquence (**Dixon et al., 2004 ; Cheng 2008**). En effet, la compréhension du mécanisme d'action de la nitrogénase s'est amélioré après la détermination de la structure cristallographique des protéines Fe et MoFe (**Ferguson 1998 ; Rees et al., 2000; Dixon et al., 2004**) ainsi que celle du complexe formé entre les deux protéines sous forme stabilisée (**Dixon et al., 2004**). Alors, deux molécules de MgATP vont se lier à la protéine Fe réduite puis elles vont être hydrolysées pour qu'il y ait un transfert d'un électron de la protéine Fe à la protéine MoFe (figure 5).

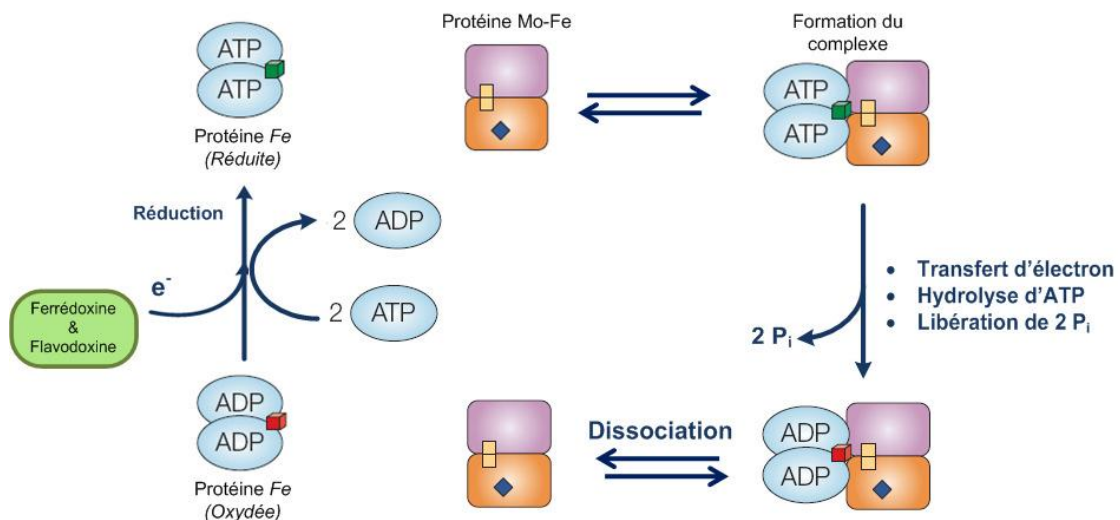


Figure 05: Mécanisme d'action de la nitrogénase (**Dixon et al., 2004**)

III-1.4-Caractères biochimique :

Azotobacteraceae sont des aérobies, hétérotrophes, micro-organismes fixateurs d'azote, et par conséquent possède toutes les enzymes oxydatives pour la dégradation de nombreuses composées organiques utilisables par différentes espèces comme seule source de carbone et d'énergie. Toutes les études montrent que les taux élevés d'oxygène, même ceux atmosphériques inhibent l'activité de la fixation de l'azote chez l'Azotobacter. Les expériences révèlent que chez l'Azotobacter un mécanisme spéciale fonctionne pour minimiser les dommages contre la nitrogénase, le haut taux de respiration d'Azotobacter

expliqué comme un mécanisme endommagent le site de nitrogénase pour la fixation de nitrogénase, ce processus appelé « la protection respiratoire de nitrogénase » et couplé avec une multitude de cytochromes et protéines redox, ainsi la maintenance des nitrogénases dans un environnement anoxique essentiellement à l'intérieur des cellules qui néanmoins dérive l'énergie de métabolisme aérobie .Un important argument est le complexe nitrogénase qui est constitué de deux composants, elle est extrêmement sensible à l'oxygène, rapidement et réversiblement inactivé lors de l'exposition à l'air ([Http://dspase.univer-mslla.dz](http://dspase.univer-mslla.dz))

III-2-Classification d'azotobacter :

Le genre *Azotobacter* est utilisé comme biofertilisant depuis plus de un siècle. Ce genre a été décrit pour la première fois en 1901 par Martinus Beijerinck. *Azotobacter* appartient à la famille des Pseudomonadaceae / Azotobacteraceae et classe Gammaproteobacteria, qui est commun dans les sols échantillonnés à travers le monde. Les espèces notables du genre *Azotobacter* sont *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* et *A. salinestri*. L'espèce la plus travaillée est *A. vinelandii*, le génome dont la séquence a été déterminée par. Critiques sur les *Azotobacter* peut être vu (**Hirendra K, (2019)**).

Regne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadaceae

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Azotobacter* (**Hirendra K, 2019**).

III-3-Application d'azotobacter dans l'agriculture :

III-3.1-bio fertilisation :

Un bio-fertilisant (classé parmi les engrais biologique) est une substance utilisée comme pour ses microorganismes (bactérien, fongiques ou animaux) qui, lorsqu'ils sont appliqués sur les semences, sur des racines, sur le sol ou sur des surfaces végétales colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante en favorisant sa santé, sa croissance et en augmentant indirectement l'apport en nutriments primaires (azote, phosphore, potassium...), vitamines et oligoéléments. C'est un concept proche de celui de l'entretien ou de la restauration du microbiote chez l'animal. (**Vessey, J.k. 2003**)

III-3.2- Rôle d'*Azotobacter* dans la fertilité des sols :

La présence d'*Azotobacter* sp. dans les sols a effets bénéfiques sur les plantes, mais l'abondance de ces bactéries estliés à de nombreux facteurs, physico-chimiques du sol (par exemple la matière organique, pH, température, humidité du sol) et propriétés microbiologiques (**Kizilkaya, 2009**). Son abondance varie selon la profondeur du profil du sol. Les azotobactéries sont beaucoup plus abondantes dans la rhizosphèrede plantes que dans le sol environnant et que cette abondance dépend des espèces cultivées (**Kalaigandhi et al., 2010**).

Matériels et Méthodes

1-Matériels et Méthodes :

1-1-Lieu de travail :

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie au département de biologie à l'université Amar Thelidji -Laghouat.

1-2-Prélèvement des échantillons des sols :

Des échantillons de sol ont été prélevés dans un jardin à 4 Km de la ville de Taouila près du palais antique. Les échantillons ont été prélevés dans deux sites distincts.

Chaque échantillon de sol composé de plantules et de sol rhizosphérique a été recueilli dans des récipients stériles. Ces derniers sont gardés dans des glacières et transportés immédiatement au laboratoire où ils ont été traités.



Figure 6 : Localisation géographique des sites de prélèvement autour de Taouiala

1-3- Isolement des souches bactériennes :

Afin d'isoler sélectivement les souches, un enrichissement est réalisé au préalable sur un milieu liquide exempt d'azote Winogradsky Broth à 2% en glucose (mannitol). Sa composition est donnée dans l'annexe.

L'incubation a été faite en Erlen Meyer avec agitation et aération, à 28°C, pendant 7 jours.

1-3-1- Méthode d'isolement et de purification:

L'ensemencement est une méthode qui permet d'obtenir des souches bactérienne pures à partir de la suspension enrichie. Une anse pleine de chaque culture est étalée à la surface du milieu Winogradsky sans azote à 2% en glucose ou mannitol (gélose) coulé en boîtes de Pétri, la technique utilisé a été la technique des stries.

Les stries sont faites à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. L'étalement a été réalisé selon un protocole précis. On dépose l'échantillon sur le bord de la boîte puis on étale en larges stries puis en stries serrées et à chaque fois on tourne la boîte 60 degrés et on recommence l'ensemencement. Après l'incubation des boîtes à 28°C pendant 2 jours dans l'étuve.

1-4-Identification des souches isolées :

L'identification des souches isolées a été basée essentiellement sur les examens macro- et microscopiques et certains caractères biochimiques. L'aspect des colonies sur milieux solides (forme, pigmentation et consistance) est un critère important d'identification. L'examen microscopique permet d'étudier la coloration de Gram, la forme, la taille, le mode d'association et la présence de cystes (critère fondamental dans l'identification des *Azotobacter*). Les caractères biochimiques reposent essentiellement sur la recherche de la catalase et de l'utilisation du glucose ou le mannitol.

1-4-1- Caractéristiques morphologiques des colonies:

L'examen macroscopique des cultures a été réalisé sur milieu GN. L'aspect des colonies a été le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation à 28°C pendant 2 jours.

1-4-2- Caractéristiques morphologiques des bactéries :

Il s'agit de la détermination de la forme, l'arrangement cellulaire, le Gram et la formation de cystes.

a/ Coloration de Gram :

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries d'après leur affinité pour les colorants. A cet effet nous avons examiné les souches isolées par la technique classique qui consiste à :

- préparer un frottis sur une lame,
- recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute,
- verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes,
- décolorer la lame par l'éthanol à 95° en laissant tomber goutte à goutte l'alcool.
- laver à l'eau distillée.
- recouvrir la lame par la fuschine et laisser agir pendant 1 minute
- laver à l'eau distillée
- observer au microscope (Gx100) à immersion. Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge.

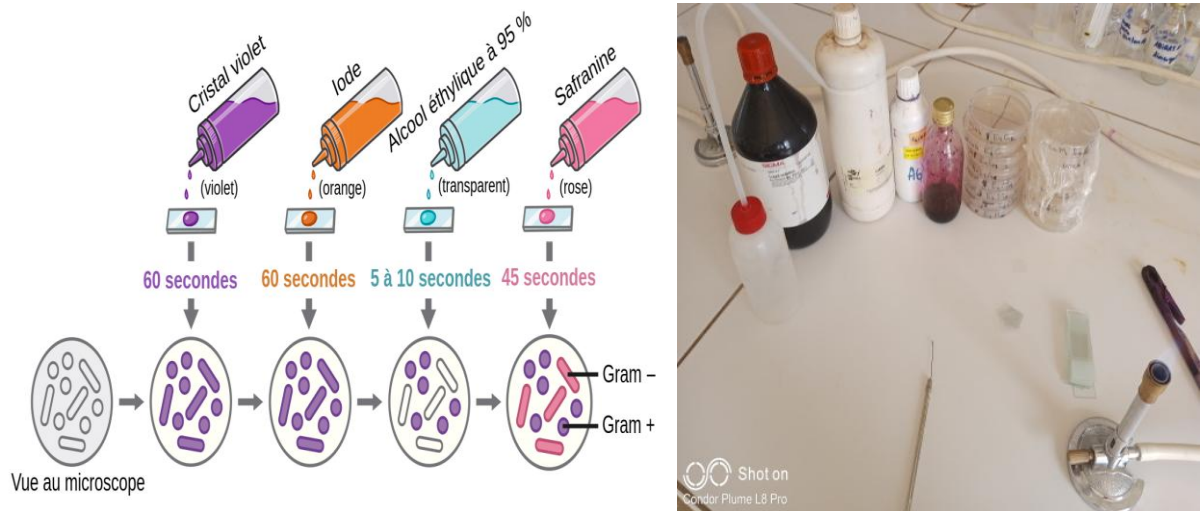


Figure 7: Les étapes de la coloration de Gram

b/ Colorations des cystes (kystes) :

Prendre une culture âgée de 5 jours, préparé un frottis submergé avec une solution aqueuse de 5% (vert de malachite), après laver l'excès du colorant par de l'eau distillé, après on ajouté une solution de 5% de Mercurochrome pendant 1 minute et ½ après on lave et on sèche, l'observation a été réalisé au microscope à X100 avec immersion.

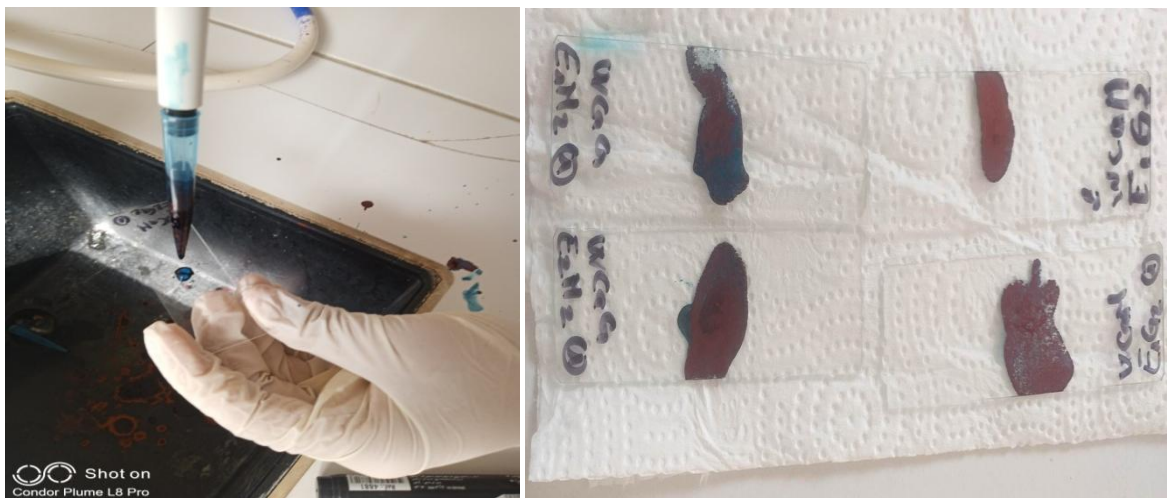


Figure 8 : La coloration des cystes.

1-4-3- Activité de la catalase :

Le test consiste à mettre les bactéries âgées de 48 heures en contact du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent l'enzyme catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène qui se manifeste par une effervescence (formation de bulles).

1-4-4- Mannitol mobilité et réduction du nitrate :

Ce test permet de mettre en évidence la présence de la nitrate réductase. Les tubes ont été ensemencés en piqure centrale à partir des colonies prélevées. Après 48 heures d'incubation à 28°C, la réduction des nitrates (NO_3^-) a été mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes de réactif NR1 et NR2. Dans le cas où les bactéries possèdent la nitrate réductase, les nitrates (NO_3^-) seront réduits en nitrites (NO_2^-) ce qui se manifeste par une coloration rose ou rouge du milieu. Si le milieu reste incolore, ajouter des gouttes de zinc (réducteur des nitrates), si le milieu devient rouge, donc il reste des nitrates dans le milieu.

La souche est considérée dans ce cas comme étant nitrate réductase négative, dans le cas où le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries ont réduit les nitrates au-delà du stade nitrite ; les souches présentent une nitrate réductase très positive, et elles possèdent les deux enzymes (la nitrate et nitrite réductases).

1-4-5- Croissance à différentes températures :

L'effet de la température sur la croissance des souches isolées a été déterminé sur milieu GN à pH = 7 aux températures suivantes : 37°C, 42°C. Les lectures sont effectuées après 24h et 48 heures d'incubation, la croissance bactérienne a été évaluée par lecture de la croissance des colonies bactériennes.

1-4-6- Croissance à différents pH :

Le test a été effectué dans des tubes contenant le milieu BN ajustés à des différents pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 et 12). La croissance bactérienne a été évaluée par l'apparition de trouble après 24 et 48 heures d'incubation à 28°C.



Figure 9 : La mesure du pH dans chaque tube par pH-mètre.

1-4-7- Croissance à différentes concentrations de NaCl :

La tolérance au sel des souches isolées a été déterminée sur milieu GN aux différentes concentrations de sel : 6%, 10%, 15% et 20%. Les boîtes ont étéensemencées en stries à partir d'une colonie prélevée dans des tubes sur milieu GN. La croissance bactérienne a été évaluée par l'observation de la croissance des colonies bactériennes.

1-4-8-Dégradation de l'amidon :

Après une bonne incubation des souches isolées sur milieu GN supplémenté de 2% d'amidon, les boîtes de pétrie ont été inondées à la surface par une solution d'iode (Lugol).

Il faut enregistrer les résultats immédiatement car la couleur bleu-noir formée avec l'amidon peut s'estomper donnant un résultat faussement positif d'absence d'amidon.

L'apparition d'une zone claire entourant la croissance bactérienne indique une hydrolyse de l'amidon (+) par l'organisme en raison de sa production d'enzymes extracellulaires. La zone commencera en jaune (à partir de l'iode) et deviendra progressivement jaune plus clair puis claire. L'absence d'une zone claire entourant la croissance indique que l'amidon est présent et n'a pas été hydrolysé (-) et que l'organisme n'a pas produit les enzymes extracellulaires.

1-4-9- Dégradation de la caséine :

Dans le but de tester l'activité protéasique des souches isolées un milieu à base de caséine a été utilisé. Un volume de 10 µl de chaque culture bactérienne est déposé en spot à la surface de la gélose PCA+lait écrémé, après l'ensemencement les souches ont été incubées à 28°C pendant 24 et 48 heures. Les résultats sont exprimés par l'apparition d'un halo transparent au tour de la zone de croissance.

1-4-10- Test de l'activité urease:

a/ Utilisation d'urée comme seule source de carbone :

L'utilisation de l'urée comme seule source de carbone par les souches isolées a été effectuée dans des tubes contenant le milieu uréase (composition, voir l'annexe).

L'évaluation de la croissance des souches bactériennes isolées a été observée après incubation à 28°C pendant 5 jours. L'apparition d'un trouble montre la croissance bactérienne donc l'utilisation de l'urée comme seule source de carbone.

b/ Utilisation de l'urée avec une source de carbone :

L'utilisation de l'urée en co-métabolisme avec un sucre par les souches isolées a été effectuée sur des géloses de milieu uréase additionné du glucose et d'un indicateur coloré (rouge de phénol). Après incubation à 28°C pendant 48 à 72 heures, la croissance de colonies et le virage de couleur montre l'utilisation de l'urée.

1-5- Dosage antifongique :

Pour la recherche de l'activité antifongique des souches bactériennes isolées, la méthode de doubles couches ou de recouvrement décrite par (Magnusson et Schnurer, 2001) a été utilisée avec quelques modifications. Les souches isolées (S1, S2 et S3) ont été d'abord ensemencés en spots de 6 mm de diamètres sur milieu GN préalablement coulés dans des boîtes de Pétri puis ont été incubés à 28°C en pendant 48 heures.

Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes avec 10 ml de milieu PDA (0,8 % d'agar) contenant 10^6 spores / ml de souches fongiques (AF, AO, FG et PE) (Tableau 04)

Tableau 04 : Les différentes souches fongiques et leur origine.

Les souches fongiques	codes	Références
<i>Penicillium expansum</i>	PE	CECT 2278
<i>Aspergillus flavus</i>	AF	CECT 20802
<i>Fusarium graminearum</i>	FG	CECT 2150
<i>Aspergillus ochraceus</i>	AO	NRRL 3174

Après 48 heures d'incubation à 28°C, les zones d'inhibitions ont été évaluées autour de chaque strie de bactéries et évaluées selon les critères suivants :

(-) : absence de zone d'inhibition autour de chaque strie

(+) : zone d'inhibition par strie comprise entre 0,1 à 3% de la surface des boîtes de Pétri

(++) : zone d'inhibition par strie comprise entre 3 à 8 % de la surface des boîtes de Pétri

(+++): zone d'inhibition par strie supérieur à 8% de la surface des boîtes de Pétri.

1-6- Activité enzymatique de la nitrogénase :

La capacité de fixation de l'azote par les souches a été déterminée par le calcul du rendement (R) de production du NH₃ par les souches isolées dans un milieu de culture aéré et sans aucune source d'azote, par rapport à la quantité de glucose consommée par ces souches. Le calcul se fait selon la formule suivante : $R = \frac{\text{NH}_3 \text{ formé (g)}}{\text{Glucose consommé (g)}}$

Le dosage de NH₃ formé a été mesuré à 420 nm par spectrophotométrie, en utilisant le réactif de Nessler et une solution aqueuse d'azote ammoniacal de 10 mg/l a été utilisé comme étalon. Le dosage du glucose a été effectué par la méthode enzymatique avec lecture au spectrophotomètre à 560 nm, comme étalon une solution aqueuse de 1 g/l de glucose a été préparée. Le protocole utilisé est expliqué dans la figure10 et la figure11

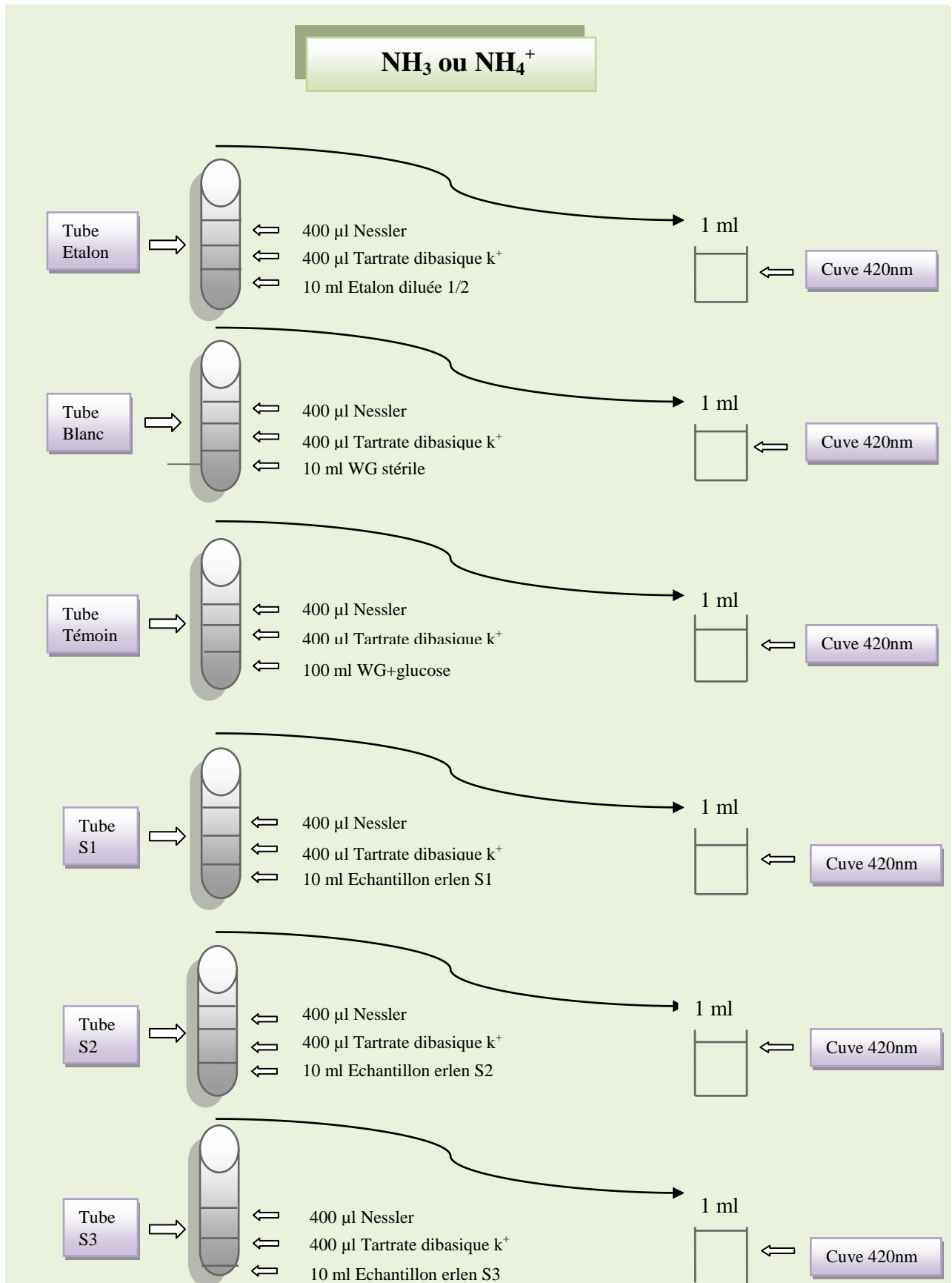


Figure 10 : Illustration montrant résumé la méthode de dosage du NH₃ par spectrophotométrie

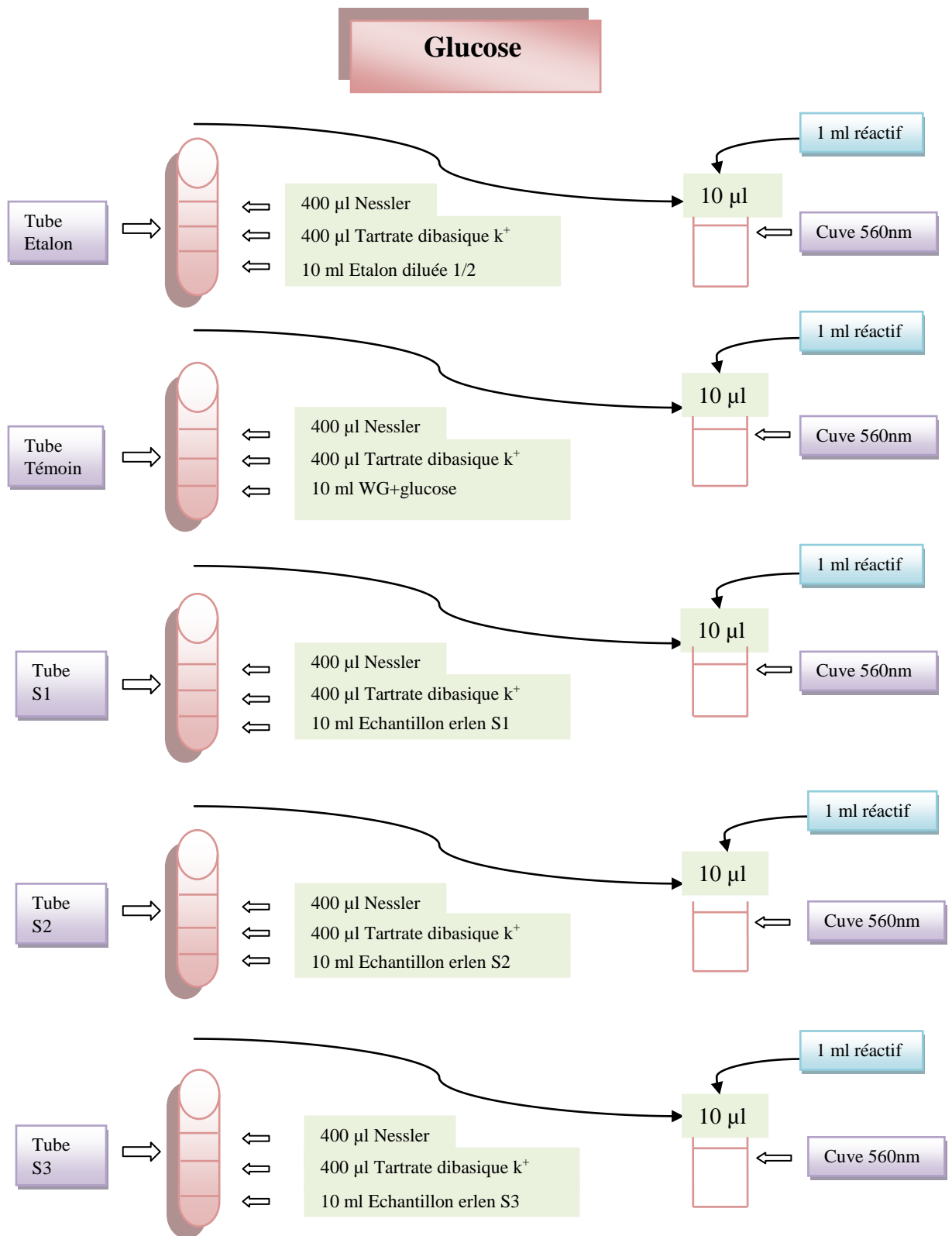


Figure 11 : Illustration montrant résumé la méthode de dosage du glucose par spectrophotométrie

Résultats

Résultats :

1-Isolement des souches bactériennes :

Nous avons isolés 16 souches à partir de deux sites différents, le tableau 05 présente le codage des souches isolées. La figure 12 montre l'aspect de quelques souches isolées sur milieu GN.

Tableau 04 : Les souches bactériennes isolées.

Souche de site 1							
AZE ₁₍₁₎	AZE ₁₍₂₎	AZE ₁₍₃₎	AZE ₁₍₄₎	AZE ₁₍₅₎	AZE ₁₍₆₎	AZE ₁₍₇₎	AZE ₁₍₈₎
+	+	+	+	+	+	+	+
Souche de site 2							
AZE ₂₍₁₎	AZE ₂₍₂₎	AZE ₂₍₃₎	AZE ₂₍₄₎	AZE ₂₍₅₎	AZE ₂₍₆₎	AZE ₂₍₇₎	AZE ₂₍₈₎
+	+	+	+	+	+	+	+

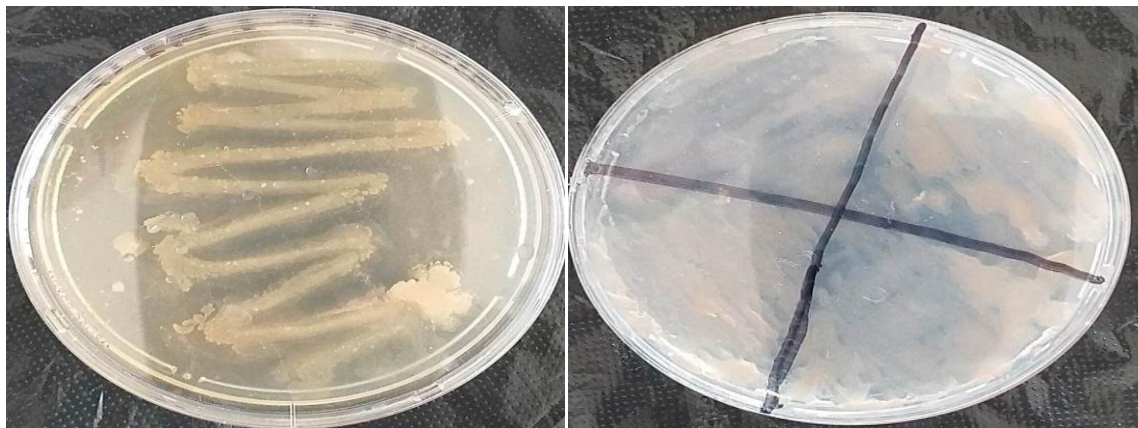


Figure 12 : L'aspect des souches bactériennes isolées sur le milieu GN.

2-Identification des souches isolées:

Sur la base de l'étude réalisée sur l'isolement et l'identification des bactéries fixatrices d'azote libres. Les isolats ont montrés un profile presque identique. De plus, l'identification des isolats comme des souches appartenant au genre *Azotobacter* doit être confirmée au moyen d'une technique moléculaire qu'on n'a pas pu réaliser au niveau de notre laboratoire donc l'identification c'est limité aux caractéristiques culturelles, morphologiques et biochimiques de croissance.

2-1-Caractéristiques macroscopiques :

Après 2 jours d'incubation sur milieu WG, apparaissent des colonies envahissantes de couleur crème, et d'un aspect lisse brillant.

2-2-Caractéristiques morphologiques des bactéries :

L'examen microscopique des cellules bactériennes isolées donne des cellules de forme bacille ou coccobacille à Gram négatif plus ou moins ovales, diploïdes ou isolés (Figure 13). Le tableau 06 regroupe les résultats de la coloration de Gram pour les 16 souches isolées.

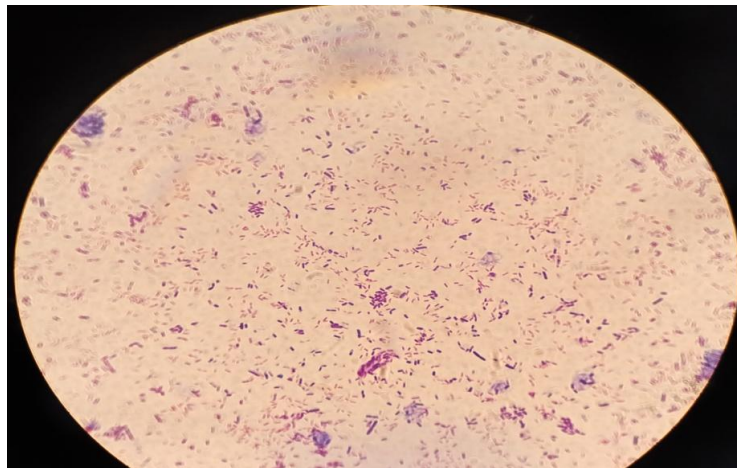


Figure 13: Des cellules de forme de bacille à Gram négatif

Tableau 06 : Résultats de la coloration de Gram.

Les souches	La coloration	Gram
AZE ₁₍₁₎	Rose	-
AZE ₁₍₂₎	Rose	-
AZE ₁₍₃₎	Rose	-
AZE ₁₍₄₎	Rose	-
AZE ₁₍₅₎	Rose	-
AZE ₁₍₆₎	Rose	-
AZE ₁₍₇₎	Rose	-
AZE ₁₍₈₎	Rose	-
AZE ₂₍₁₎	Rose	-
AZE ₂₍₂₎	Rose	-
AZE ₂₍₃₎	Rose	-
AZE ₂₍₄₎	Rose	-
AZE ₂₍₅₎	Rose	-
AZE ₂₍₆₎	Rose	-
AZE ₂₍₇₎	Rose	-
AZE ₂₍₈₎	Rose	-

2-3- Test catalase :

Les résultats du test catalase sont montrés dans le tableau 07 et la figure 14. Tous les isolats ont été testé catalase positifs.



Figure 14: Photo du test catalase positif sur une des souches isolées.

Tableau 07 : Résultats du test de l'activité catalase.

Souches	Catalase
AZE ₁ (1)	+
AZE ₁ (2)	+
AZE ₁ (3)	+
AZE ₁ (4)	+
AZE ₁ (5)	+
AZE ₁ (6)	+
AZE ₁ (7)	+
AZE ₁ (8)	+
AZE ₂ (1)	+
AZE ₂ (2)	+
AZE ₂ (3)	+
AZE ₂ (4)	+
AZE ₂ (5)	+
AZE ₂ (6)	+
AZE ₂ (7)	+
AZE ₂ (8)	+

2-4- Formation des spores (kystes/cystes) :

La formation des kystes est un critère fondamental d'identification séparant le genre *Azotobacter*, des autres genres qui fixe le diazote. La figure 15 illustre les kystes en bleu formé par nos isolats.

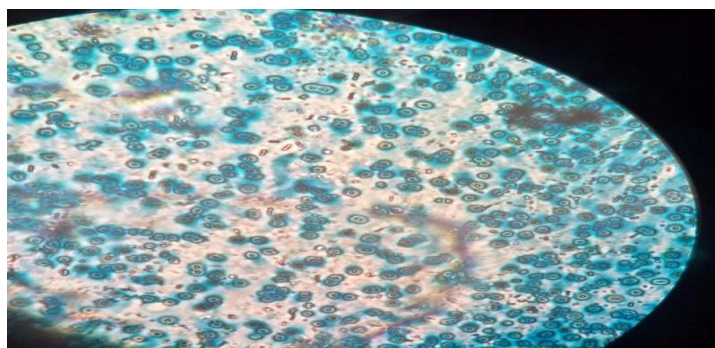


Figure 15: Photo montrant les Kystes formé par une des souches isolées.

Résultats

2-5- Croissance à différente de température :

Les résultats obtenus dans le tableau 08 montrent que toutes les souches testées sont capables de croître à 28°C, 37°C et 42°C. Ces résultats confirment la grande variabilité de la thermotolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de *Azotobacter*. Pour la plupart des *Azotobacter*, l'intervalle de températures optimales de croissance est situé entre 28°C et 31°C et nombreuses d'entre elles sont capables de croître à 37°C. Nos souches ont été capables de résister à 44°C durant 3 jours d'incubation.

Tableau 08: Résultats de la croissance des bactéries à différentes températures.

La température Les souches	28°C	42°C	37°C	44°C
AZE ₁₍₁₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₁₍₂₎	+++	++	+	Résistante
AZE ₁₍₃₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₁₍₄₎	+++	+	++	Résistante
AZE ₁₍₅₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₁₍₆₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₁₍₇₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₁₍₈₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₂₍₁₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₂₍₂₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₂₍₃₎	+++	++	+	Résistante
AZE ₂₍₄₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₂₍₅₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₂₍₆₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₂₍₇₎	+++	+	+	Résistante
AZE ₂₍₈₎	+++	+	+	Résistante

+++ : Croissance optimale.

2-6- Croissance à différents taux de NaCl :

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches poussent à 6% de NaCl et la pluparts tolèrent 10 % à 15 % de NaCl. Cependant on a remarqué que seulement 3 souches (AZE₁₍₆₎ ; AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎) qui ont poussées à 20% de NaCl, donc considérés comme halotolérants. La majorité des isolats demeure osmotolérants, il semble que ses bactéries développent des mécanismes de protection contre les pressions osmotiques par production de produits organiques ou inorganiques tels que le glutamate et K⁺ (Tableau 09, figure 16).

Résultats

Tableau 9: Les résultats de la tolérance au sel des souches isolées.

	NaCl 6%	NaCl 10%	NaCl 15%	NaCl 20%
AZE 1(1)	+	+	+	-
AZE 1(2)	+	-	-	-
AZE 1(3)	+	+	+	-
AZE 1(4)	+	-	-	-
AZE 1(5)	+	+	+	-
AZE 1(6)	+	+	+	+
AZE 1(7)	+	+	+	+
AZE 1(8)	+	+	-	-
AZE 2(1)	+	+	+	-
AZE 2(2)	+	+	+	-
AZE 2(3)	+	+	+	-
AZE 2(4)	+	+	+	-
AZE 2(5)	+	+	-	-
AZE 2(6)	+	+	-	-
AZE 2(7)	+	+	+	+
AZE 2(8)	+	+	-	-

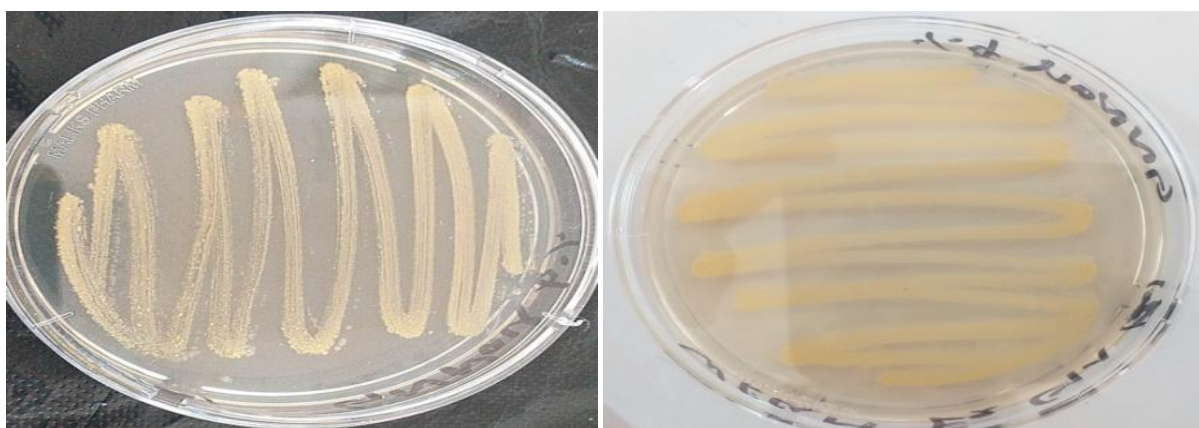


Figure 16 : Photos montrant l'aspect de la croissance des souches **AZE** 1(7) et **AZE** 2(7) sur milieu GN à 20% de NaCl

NB. Sur la base de ces résultats nous avons sélectionnés les 3 souches **AZE**₁₍₆₎ ; **AZE**₁₍₇₎ et **AZE**₂₍₇₎ pour la continuité des expériences de caractérisation d'une souche d'azotobacter performante dans la fixation du diazote.

2-7- Test mannitol mobilité et réduction des nitrates :

Les résultats du test sont montrés dans le tableau 10 et les figures 17 et 18. Les 3 souches testées $AZE_{1(6)}$; $AZE_{1(7)}$ et $AZE_{2(7)}$ sont mobiles et métabolises le mannitol comme seul source de carbone. La réduction du nitrate est instantané, après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs de nitrate réductase (nitrate A et nitrate B), les premiers changements de couleur vers le rouge indiquent une réduction des nitrates (réduire les nitrates en nitrites) (figure 11).



Figure 17: Résultats du changement de la couleur du milieu Mannitol mobilité.

- A: Couleur d'origine de milieu (couleur rouge)
- B: Pas de fermentation de mannitol (couleur rouge)
- C: Fermentation de mannitol (couleur jaune)
- D: Culture uniquement au niveau de la piqûre centrale (immobiles)
- E: Diffusion des bactéries dans la gélose (mobiles)

Tableau 10: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour les 3 souches $AZE_{1(6)}$; $AZE_{1(7)}$ et $AZE_{2(7)}$ étudiées dans le milieu Mannitol mobilité nitrate.

Souche	Mannitol	Mobilité
	Fermentation	Mobile
$AZE_{1(6)}$ (S1)	+	+
$AZE_{1(7)}$ (S2)	+	+
$AZE_{2(7)}$ (S3)	+	+

+ : indique qu'il y'a un changement de couleur dans le milieu.

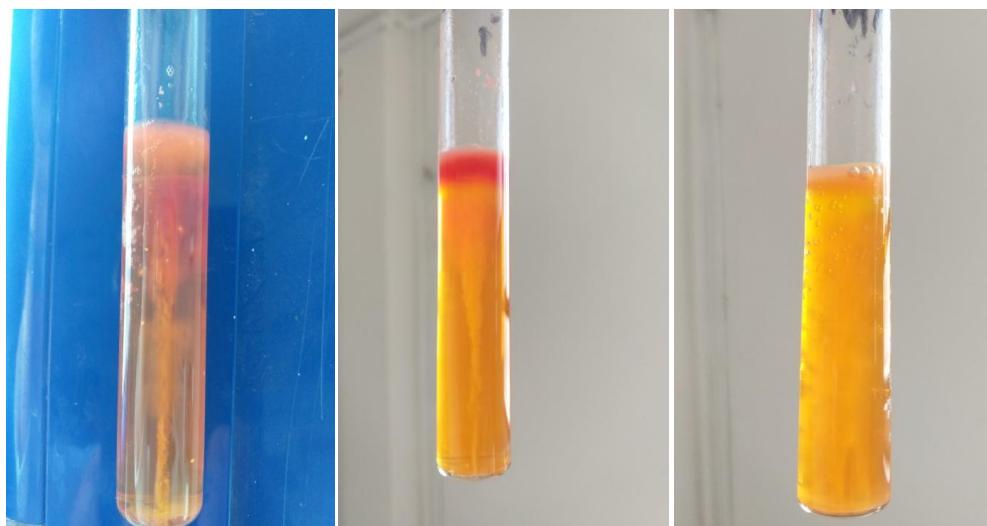


Figure 18: Les résultats du test nitrate réductase après ajout des réactifs nitrate A et nitrate B.

2-8-Croissance à différents pH :

Les résultats obtenus montrent que les souches testées **AZE₁₍₇₎ (S2)** et **AZE₂₍₇₎ (S3)** sont capables de pousser dans un intervalle de pH allant de pH=3 à pH=12. Ceci montre que ces souches isolées dans cette étude présentent un large spectre de tolérance au pH, puisqu'elles sont capables de croître aussi bien à des pH acides qu'alcalins (Tableau 11).

Tableau 11 : Résultats de la croissance des bactéries à différentes pH.

Souches	AZE ₁₍₆₎ (S1)	AZE ₁₍₇₎ (S2)	AZE ₂₍₇₎ (S3)
pH = 3	-	+	+
pH = 5	+	+	+
pH = 7	+	+	+
pH = 10	+	+	+
pH = 12	+	+	+

Pour chaque pH et pour chaque souche à utilisé 3 tubes ; + + + : croissance maximal.

2-9- Dégradation de l'amidon :

La dégradation de l'amidon par les souches **AZE₁₍₇₎ (S2)** et **AZE₂₍₇₎ (S3)** a été testée sur milieu GN plus amidon, les deux souches ont été capables de dégrader l'amidon en 24 heures à 28°C, comme le montre la figure 19.

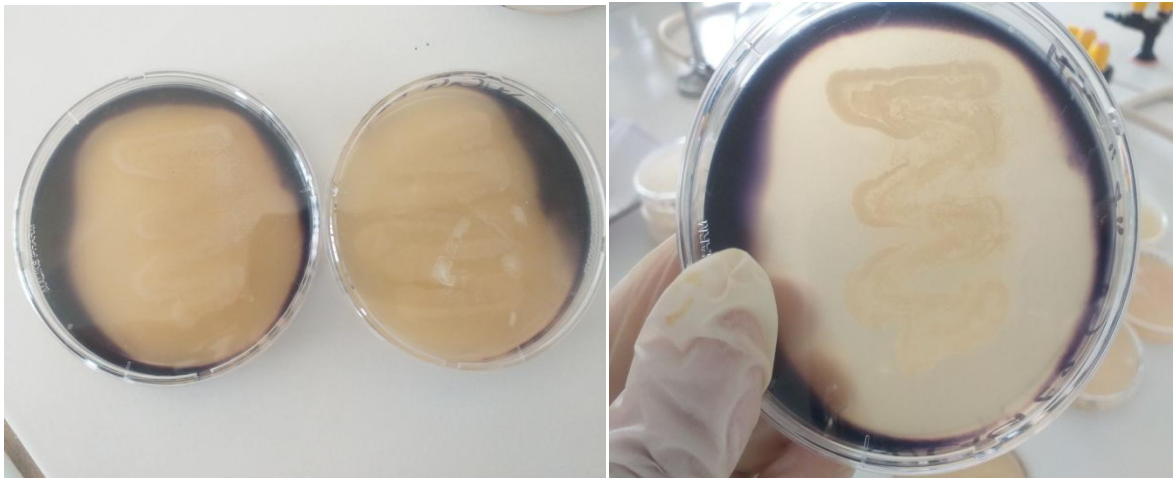


Figure 19: Photos du test de dégradation de l'amidon par les souches $AZE_{1(7)}$ et $AZE_{2(7)}$

2-10- Dégradation de la caséine (Test protéase) :

Les résultats de la figure 20 montrent que les souches $AZE_{1(7)}$ et $AZE_{2(7)}$ ne possèdent pas d'activité protéasique donc elles n'ont pas dégradé la caséine ajoutée au milieu PCA.

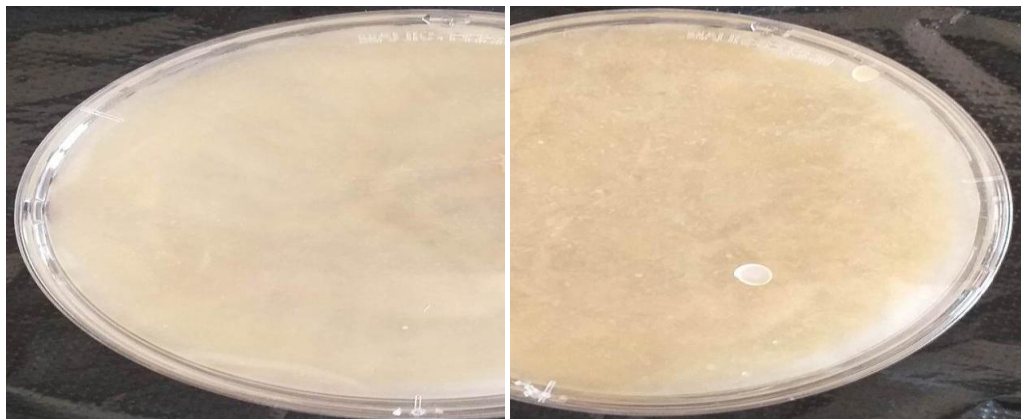


Figure 20: Photos du test de dégradation de la caséine par les souches $AZE_{1(7)}$ et $AZE_{2(7)}$ sur milieu PCA ajouté de lait écrémé.

2-11-Test biochimique de l'activité uréase :

2-11-1-Utilisation de l'urée comme seul source de carbone :

Les résultats montrent que les souches $AZE_{1(7)}$ et $AZE_{2(7)}$ n'ont pas la capacité à utiliser l'urée comme seule source de carbone car après incubation de 5 jours sur milieu urease broth à 28°C aucun trouble n'est apparu.

2-11-2-Utilisation de l'urée avec une source de carbone :

La figure 21 montre le virage de la couleur du milieu urease glucosé avec l'indicateur coloré rouge de phénol du rouge vers l'orange et indique que le milieu est devenu alcalin après incubation à 28°C pendant 72 heures avec les souches AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ ce qui démontre que ces souche cométabolisent l'urée avec le glucose.

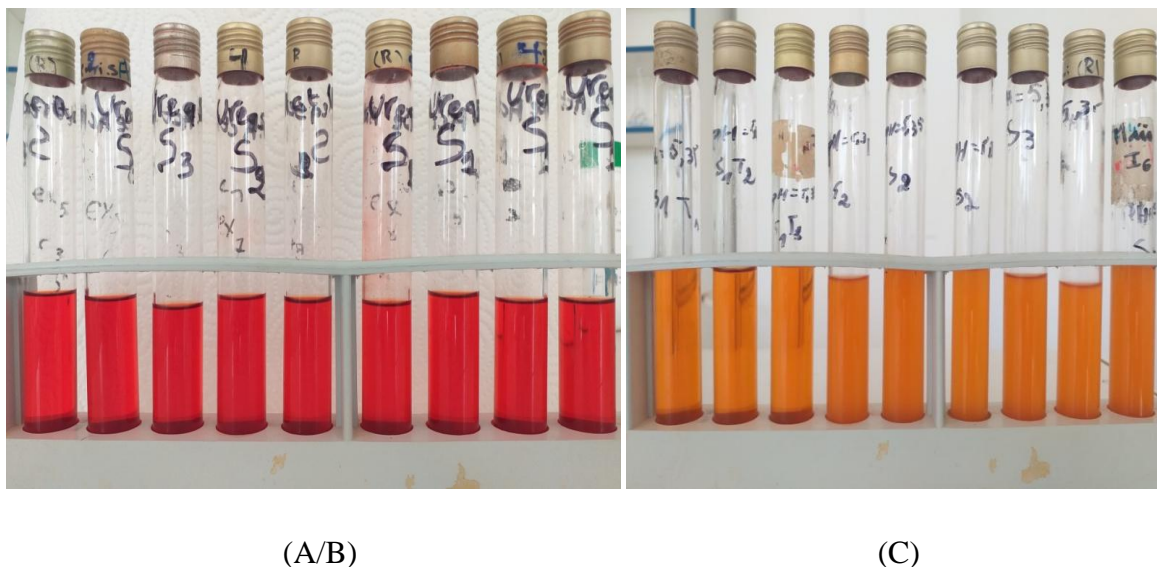


Figure 21 : Résultats du changement de la couleur du milieu urease.glucosé inoculé par les souches AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ et incubé à 28°C pendant 72 heures.

- A : Couleur d'origine de milieu (couleur rouge)
- B : milieu acide, couleur rouge (Absence d'uréase)
- C : milieu alcalin, couleur orange (présence d'uréase)

3- Activité antifongique :

L'étude de l'activité antifongique des souches isolées d'*Azotobacter* AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ a permis de vérifier l'antagonisme envers les champignons phytopathogènes. Les résultats obtenus dans notre étude montrent que les é souches testées AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ n'ont montré aucune activité antifongique contre les souches de références *Penicillium expansum* CECT 2278 ; *Aspergillus flavus* CECT 20802 ; *Fusarium graminearum* CECT 2150 et *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 comme le montre la figure 22.

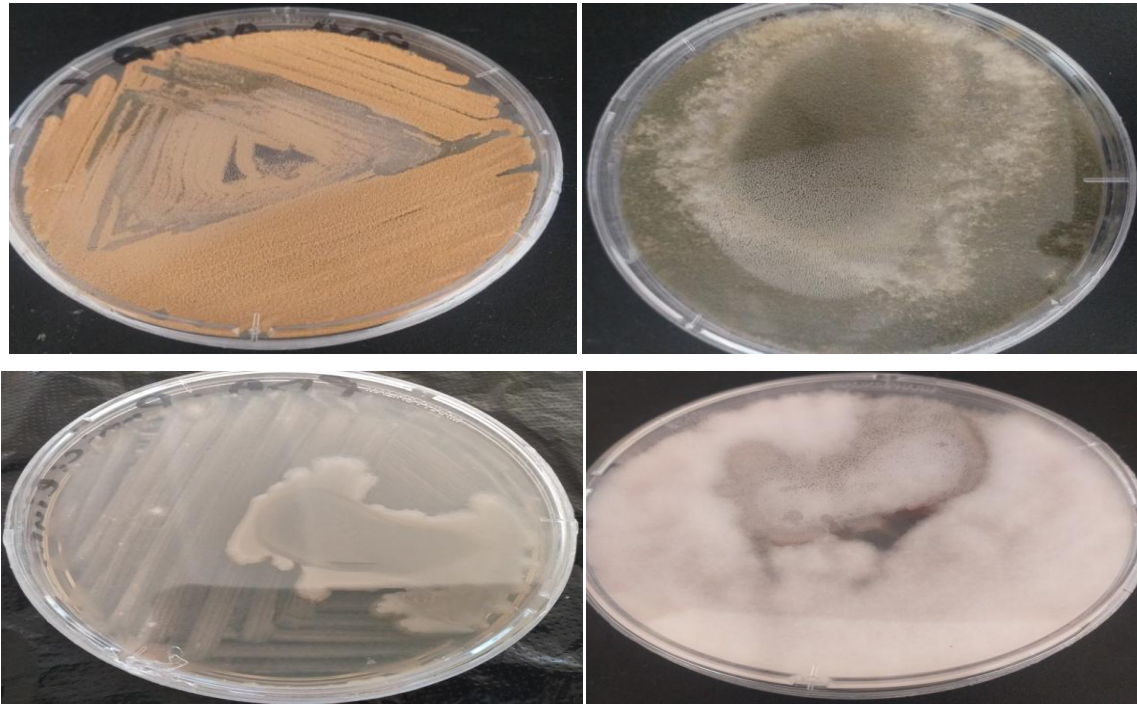


Figure 22: Photos des résultats du test d'inhibition des souches d'*Azotobacter* AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ envers les différentes souches fongiques de références.

5- Activité enzymatique de la nitrogénase :

La capacité de fixation de l'azote par les souches AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Rendement de production de NH}_3 = \frac{\text{NH}_3 \text{ produit g/l}}{\text{Glucose consommé g/l}}$$

Le tableau 12 présente les valeurs des mesures de la quantité de NH₃ produite et celle du glucose consommé par les souches AZE₁₍₇₎ et AZE₂₍₇₎ dans les conditions d'aérobiose à 30°C dans le milieu WG sans azote avec le glucose comme source de carbone pendant 48 heures, ainsi que le rendement de production qui nous permettra de comparé la capacité de fixation de l'azote des deux souches utilisées.

Tableau 12 : les valeurs des paramètres de fixation de l'azote par les souches $AZE_{1(7)}$ et $AZE_{2(7)}$.

Souches	NH ₃ produit (mg/l)	Glucose consommé (mg/l)	Rendement
$AZE_{1(7)}$	0,803	68,04	11,80
$AZE_{2(7)}$	3,585	514,79	7

On remarque que la souche $AZE_{2(7)}$ produit plus de NH₃ (3,585 mg/l) que la souche $AZE_{1(7)}$ (0,803 mg/l), mais elle consomme plus de glucose pour fournir l'ATP nécessaire à la nitrogénase pour transformer le N₂ en NH₃. Donc le rendement de la souche $AZE_{1(7)}$ est plus élevé que celui de la souche $AZE_{2(7)}$ de presque 69 %.

DISCUSSION

DISCUSSION

La capacité de fixation de l'azote est l'élément le plus important limitant le rendement dans de nombreuses productions agricoles. On sait par quel processus les micro-organismes, appelés diazotrophes, convertissent l'azote (N_2) en composés ammoniacaux assimilables par d'autres organismes. La nitrogénase complexe enzymatique, codé par les gènes nif HDK, catalyse cette réaction (**Passaglia et al., 1995**).

Pour les isolats d'*Azotobacter*, un total de 16 isolats issus de deux échantillons de sol ont été testés à l'aide de divers caractérisations et tests biochimiques. La croissance d'*Azotobacter* sp. a été observé comme une apparence visqueuse, opaque, lisse, et ovale sur gélose au mannitol WG sans nitrate. La morphologie cellulaire apparaît sous forme de bâtonnets à ellipsoïdes. Tous les isolats cultivés étaient Gram négatifs et catalase positives. Ces résultats sont similaires à ceux d'**Akhter et al., (2012)**. Tous les isolats ont été mobile, produisent du nitrite et du N_2 sur un bouillon de mannitol nitrate au rouge de phénol contenant ce qui est en accord avec les résultats obtenus par **Upadhyay et al., (2015)** et **Yorukce et al., (2017)** qui utilisé du mannitol, de l'amidon, de l'uréase et de l'oxydase. Les souches ayant des résultats positifs à l'uréase, mobiles et ovales, hydrolyse de l'amidon sont des traits caractéristiques d'*A. beijerinckii*. Les caractères des isolats étaient également similaires à celles d' *A. salinestris* (**Patel et al., 2013**). Deux souches isolées avaient une efficacité de fixation de l'azote. **Stella et Suhaimi (2010)** ont également rapporté que parmi les *Azotobacter*, *A. chroococcum*, *A. vinelandii* et *A. beijerinckii* ont présenté une croissance élevée et une production *in vitro* d'ammoniaque. La capacité de fixation de l'azote des 16 isolats a été mesurée par la méthode du calcule du rendement de formation du NH_3 par rapport au glucose consommé Parmi les 16 isolats testés, 2 isolats ont pu fixer l'azote. La gamme de capacité de fixation de l'azote était de 7 à 11,8 mg NH_3 /g glucose, enregistré chez $AZE_{2(7)}$ et $AZE_{1(7)}$ respectivement. Ces résultats corrent avec ceux obtenus par **Sant'Anna et al., 2011** et **Hosain et al., (2014)** chez *Azospirillum brasilense*.

En général, l'isolat $AZE_{1(7)}$ a montré une capacité de fixation de N_2 plus élevée qu' $AZE_{2(7)}$. Des résultats similaires ont été obtenus par **Tanvir et al., (2017)** chez *Azotobacter beijerinckii* où la fixation de N_2 était élevée (7,6 NH_3 mg/g), ce qui est comparable aux résultats de **Upadhyay et al., (2015)** qui ont rapporté que la fixation de N_2 d'*Azotobacter chroococcum* était élevée par rapport à *Azotobacter beijerinckii*.

Conclusion

Conclusion

L'azote est un élément essentiel à la croissance et au développement des plantes, il se trouve principalement sous forme organique et inorganique dans le sol, et sous forme moléculaire N_2 dans l'atmosphère. *Azotobacter* est une bactérie qui a la capacité de fixer d'azote, par des mécanismes non symbiotique parce que vivant librement dans le sol, on utilisant un system enzymatique complexe appelé nitrogénase.

Les objectifs fixés dans cette étude ont été atteint dans leurs globalités, les résultats montrent que les souches isolées dans la région de Taouila -wilaya de Laghouat- possèdent une capacité d'adaptation et de résistance aux conditions de stress thermique, acide, alcalin et salin avec une activité de fixation de N_2 comparable au souches utilisées comme biofertilisant dans le domaine agricole.

Néanmoins, cette étude comporte certaines lacunes qui sont dues au manque de moyens, surtout pour l'identification génétique des souches isolées et aussi le dosage de l'ammoniaque produit par des méthodes standardisées.

Pour la continuité de cette étude, nous pouvant proposer les perspectives suivantes :

- 1- Etudié la capacité de fixation du N_2 par la souche $AZE_{1(7)}$ dans des conditions de stress salin, alcalin et thermique.
- 2- Faire des tests *in vivo* avec la souche $AZE_{1(7)}$ sur des plantes agricoles misent dans des conditions de croissance défavorables.

Références

Références

- **A.Boulanger. (2009).** Analyse d un nouveau système CUT impliqué dans l acquisition et l'utilisation du N-acétylglucosamine par *Xanthomonas campestris pathovar campestris* Université de Toulouse, 2-4p.
- **Abdeslam,N. ,Latache,N. (2017) .**identifications et caractérisations des bactéries a partir de différents sols thèse master , université tlemcen .p
- **Ahmad, F., I. Ahmad et M.S. Khan (2005).** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, **29**: 29-34.
- **Ahmed,D.(2011) .**isolement et caracterisation des bacteries nouduant les légumineuses en démiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*, , these Magister ,Université de Tébessa ,p.19
- **Akhter MS, Hossain SJ, Amir Hossain SK and Datta RK 2012.** Isolation and characterization of salinity tolerant *Azotobacter* sp. *Greener J. Biol. Sci.* **2**: 43-51.
- **Anoua, B., Jaillard, B., Ruiz, J., Bénet, J. C., et Cousin, B. (1997).** Couplage entre transfert de matière et réactions chimiques dans un sol. Partie 2: Application à la modélisation des transferts de matière dans la rhizosphère. *Entropie*, **33**(207), 13-24.
- **Bais, H.P., T.L. Weir, L.G.Perry, S.Gilroy, et J.M. Vivanco (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **57**: 233-266.
- **Baize D, 2000.** Guide des analyses en pédologie. 2eme Ed. Rev et augmentée. INRA, Paris. 255p.
- **Barber, D.A. et J.K. Martin (1976).** The release of organic substances by cereal roots to soil. *New Phytol.*, **76**: 69-80.
- **Bardgett, R. (2005) .** The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach. Oxford University Press, Oxford.
- **Benahmed,M .(2017).** effet des précipitations sur la distribution du zn et du pb issus de retombées atmosphériques dans le sol : cas de la fonderie de tiaret (alfet) , université djillali liabes de sidi bel abbes. P12.
- **Bhattacharjee S., L.Y. Lee, H. Oltmanns, H. Cao, Veena, J. Cuperus et S.B. Gelvin (2008).** AtImpa-4, an *Arabidopsis* importin α isoform, is preferentially involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Cell.*, **20**: 2661-2680.

Références

- **Bloemberg, G.V. et B.J.J. Lugtenberg (2001)**. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**:343-350
- **Bolwerk A, Lagopodi AL, Wijfjes AH, Lamers GE, Chin-A-Woeng TF, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV (2003)**. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol Plant Microbe Interact*.
- **Brencic A, Angert ER, Winans SC(2005)** . Unwounded plants elicit *Agrobacterium* vir gene induction and T-DNA transfer: transformed plant cells produce opines yet are tumour free. *Mol Microbiol*.
- **Brenner, D. J., R.N. Krieg et J.T. Staley(2005)**. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Michigan State University publishers, 82(2) pp. 384-402.
- **Brooks RR.et Mark R. Macnair (1998)**. *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. 384 pp.
- **Buchanan, R.E. and N.E, Gibbons, ed. (1974)**. *Bergey*s Manual of determinative bacteriology*, 8th Edition. Williams and Wilkins, Baltimore. 1268 pp.
- **Burger, M., Jackson, L.E., (2003)**. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 29-36.
- **Campbell R. and Greaves M. P. (1990)**. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In the rhizosphere. Lynch I. M. (Ed). *Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology*. 11-34p.
- **Campbell, R.,et M.P. Greaves (1990)**. Anatomy and community structure of the rhizosphere in The Rhizosphere (ed. J.M. Lynch), John Wiley & Sons, Ltd, Essex, pp. 11–34.
- **Cardon, Z., et D. J. Gage (2006)**. Resource exchange in the rhizosphere - molecular tools and the microbial perspective. *Ann. Rev. Ecol.*, **37**: 459-488.
- **Cheng, Q.** 2008. "Perspectives in biological nitrogen fixation research". *Journal of Integrative Plant Biology* **50**(7): 786-798.
- **Christian S, Muller J-C, Decroux J. 2005**. *Guide de la fertilization raisonnée*. Ed. France Agricole. pp105-142.
- **Cleveland, C.C., A.R. Townsend, D.S. Schimel, H. Fisher, R.W. Howarth, L.O. Hedin, S.S Perakis, E.F. Latty, J.C. Von Fischer, A. Elseroad, et M.F. Wasson**

Références

- (1999). Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, **13**: 623-645.
- **Clémentine, L.(2013)** . Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes, au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale, these ,doctrat ,l'université de bourgogne ecole doctorale environnements-santé. p 30.
 - **Cregut Mickael, et S.Piutti, et Ph.Vong, et S.Slezack-Deschaumes, et I.Crovisier, et E. Benizri,Density (2009)**. structure, and diversity of the cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley,*Soil Biology and Biochemistry*, 41(4).
 - **Curtis, T.P., W. T. Sloan, et J. W. Scannell (2002)**. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 10494–10499
 - **Dénarié, J., F. Debellé, et C. Rosenberg (1992)**. Signaling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **46**: 497-531.
 - **Diehl, R., 1974**. Agriculture générale .Ed.J.B ,Baillière, Paris,396 p. Dingman, S.
 - **Dixon, R. et D. Kahn. (2004)**. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews. Microbiology*. 2:621-631.
 - **Dommergues, Y., (1977)**. 2ème éd La biologie des sols, Ed. Que sais-Je ?, Presse Universitaire France.
 - **Doornbos, R.F., van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. (2012)** . Impact of Root Exudates and Plant Defense Signaling on Bacterial Communities in the Rhizosphere.
 - **Elhassan, G.A., M.E.Abdelgani, A.G. Osman, S.S. Mohamed, et B.S. Abdelgadir (2010)**. Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan. *J. Nutr.*, **9**: 926-934.
 - **Elmholt, S., 1991**. Side effects of propiconazole (tilt 250 ECTM) on non-target soil fungi in a field trial compared with natural stress effects. *Microbial Ecology***22**, 99-108. –Encyclopedia of Soil Science. CRC Press.
 - **Epstein E., (1972)** . Mineral nutrition of plants: Principes and Perspectives. John Wiley, New York.
 - **Faostat ,(2010)**. L'alimentation et l'agriculture (FAO). *FAOSTAT* . Disponible en ligne à : <http://faostat.fao.org/default.aspx>
 - **Ferguson, S. J. 1998**. Nitrogen cycle enzymology. *Bio-inorganic Chemistry, Current Biology*. **2**: 182-193.
 - **Foth ,H.D, 1990** - Fundamentals of soil science.Henry, D. Foth., Ed. John Wiley et Son New York. 336p.

Références

- **Ganry F., DOMMERGUES YVON. (1995).** Rôle des arbres fixateurs d'azote dans le maintien de la fertilité azotée des sols.
- **Garbeva, P., J.D. van Elsas, et J.A. van Veen (2008).** Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil*, **302**: 19-32.
- **Garbaye, J. (1994).** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley review,76). *New Phytologist*, **128**: 197-210.
- **Giller, K. E., Beare, M. H, Lavelle P., Izac A. M. N., Swift, M. J., (1997).** Agricultural, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology* **1**,316.
- **Gros A.,(1967) .**Engrais –Guide pratique de la fertilisation. Ed. La maison Rustique Paris France.430 p.
- **Guenoune , S.(2009).** Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine d'El Harrouch, mémoire magister, Université Mentouri Constantine, p3.
- **Hartmond, U., N.V. Schaesberg, J.H. Graham et J.P. Syverten (1987).** Salinity and flooding stress effects on mycorrhizal and nonmycorrhizal citrus rootstock seedlings. *Plant Soil*, **104**: 37–43.
- **Haynes R.J., (1986) -** Origin, distribution and cycling of nitrogen in terrestrial ecosystems. In Mineral nitrogen in the plant – Soil system R.J Haynes (Ed 1 -15) Acad. Press Orlando NRA, Paris 113-121.
- **Hirendra Kumar Das (2019) ,**Azotobacters as biofertilizer, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India, *Advances in Applied Microbiology*, Volume 108,p3
- **Hirsch, A.M., W.D. Bauer, D.M.Bird, J. Cullimore, B. Tyler et J.I. Yoder (2003).** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, **84**: 858-868.
- **Hodge, A., Robinson, D., Fitter, A., (2000).** Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trend in Plant Science* **5**, 304-308.
- **Hofman, G. et Van Cleemput, O. (2004) .**Soil and Plant Nitrogen. International Fertilizer Industry Association, Paris, 49.
- **Högberg, P., A. Nordgren, , N. Buchmann , A.F.S. Taylor, A. Ekblad, M.N. Hogberg, G. Nyberg, M. Ottosson-Löfvenius, et D.J. Read (2001).** Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*, **411**: 789-792.

Références

- **Horner-Devine, M. C., M. A. Leibold, V. H. Smithe et B. J. M. Bohannon (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.*, **6**: 613-622.
- **Hossain MM, Akter S, Hasan MM, Hasan A, Uddin KR, Parvin A, Jahan I, Rahman MN and Rahman SMB (2014).** Nitrogen fixing efficiency and physiological characteristics of Azospirillum isolates from the paddy fields of North Bengal, Jahang.Univ. J. Biol. Sci. **3**: 47-53.
- [Http://dspase.univer-mslla.dz](http://dspase.univer-mslla.dz)
- **Huang, J.K., Hu, R.F., Rozelle, S., Pray, C., (2005).** Insect resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science* **308**, 688-690.
- **Huber ,Gerald , Schaub Christiane (2011) :** Guide des fertilisants azotés utilisables en bio
- **Ishii, H., (2006).** Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly* **40**, 205-211.
- **Islam, K.R. and Wright, S.R., (2006).** Microbial communities. In: R.R. Lal (Editor), *J. Sci. Technol. Agric. Nat. Resources*, **11**: 297.).
- **Jackson, L.E., Schimel, J.P., Firestone, M.K., (1989).** Short-term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland. *Soil Biology & Biochemistry* **21**, 409-415.
- **Jocelyn ,M.(2006), épandage post-récolte des engrais organiques et risques environnementaux reliés aux pertes d'azote , agronomes du québec,p9**
- **Kalaigandhi V, Kannapiran E, Harimuraleedharan, et al.** Azotobacter population in Rhizosphere and Non-Rhizosphere sediments of Tondi Coast. *International Journal of Biological Technology*. (2010);1(1):63-65.
- **Kaye, J.P., Hart, S.C., (1997).** Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* **12**, 139-143.
- **Kent, A.D. et E.W. Triplett, (2002).** Microbial communities and their interactions in soil land rhizosphere ecosystems. *Ann.Rev. Microbiol.*, **56**: 211-236.
- **Khan, et.al., (2009).** Microbial Strategies for Crop Improvement. pp: 1-371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- **Kim, J. and Rees, D.C. (1994).**Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. *Biochemistry*.

Références

- **Kirdi billal, (2011)** . Rôle des PGPR « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites.
- **Kizilkaya R.** Nitrogen fixation capacity of *Azotobacterspp.* Strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *J Environ Biol.* (2009);30(1):73–82.
- **Kloepper, J. W., et M. N. Schroth (1978).** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. pp. 879-882. *In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* ,2. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France.
- **Korsaeth, A., Molstad, L., Bakken, L.R., (2001).** Modelling the competition for nitrogen between plants and microflora as a function of soil heterogeneity. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 215-226.
- **Krafczyk, I., Trolldenier, G., et Beringer, H. (1984).** Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(4), 315-322.
- **Lamaze et S.Khamis et Y.lemoine et CH.foyer (1990)** . Adaptation of the Photosynthetic Apparatus in Maize Leaves as a Result of Nitrogen Limitation : Relationships between Electron Transport and Carbon Assimilation, *Plant Physiology*, 94(3).
- **Lakhab, Riadh.(2012)** . effet de la fertilisation azotée sur la culture du blé dur (*triticum durum* desf.) variété « bousselam » et sur la décomposition de la matière organique en semis direct dans la region semi-aride de sétif. ,mémoire magister université ,ferhat abbas sétif,p 19.20.21.
- **Leake, J.R., S.L. McKendrick, M. Bidartondo et D.J. Read (2004).** Symbiotic germination and development of the myco-heterotroph *Monotropia hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Trichoderma* spp. *New Phytologist*, **163**: 405–423.
- **Lemanceau, P. (1992).** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie* ,**12** :413-437.
- **Lemanceau, P., C. Alabouvette, et Y. Couteaudier (1988).** Recherches sur la résistance des sols aux maladies, XIV : modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, **8**: 155-162.

Références

- **Loreau Michel (2000)** . Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. 91(1).
- **Lemanceau, P., D. Expert, F. Gaymard, P.A.H.M. Bakker et J.F. Briat (2009)**. Role of iron in plant–microbe interactions. *Adv. Bot. Res.*, **51**: 491-549.
- **Lynch, J.M. (1990)**. The Rhizosphere. Lynch JM, (ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- **Madigan M., Martink J., (2007)**. Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Edition Person Education France. p 599 - 601, 676 - 681.
- **Madkour, M.A., L.T. Smith et G.M. Smith (1990)**. Preferential osmolyte accumulation: A mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**:2876-2881.
- **Manoharachary, C., Mukerj, K. J. (2006)** Rhizosphere Biology-an Overview. (Eds), Microbial Activity in the Rhizosphere,, 7p.
- **Mathieu C et Pieltain F, (2003)**. Analyse chimique des sols. Edition tech et doc. Lavoisier. Paris. pp 65-66.
- **Munees, Ahemad., MulugetaKibret ,(2013)**.Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, Journal of King Saud University –Science, January Volume 26, Issue 1, P 1–20.
- **Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini , L. Landi, G. Pietramellara, G.Renella, et F. Valori (2008)**. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. pp: 339-365. *In: Soil biology: molecular mechanisms of plant and microbe coexistence*. Nautiyal, C.S. et Dion, P. (Eds). Springer, Berlin Heidelberg, Allemagne,
- **N.belaid, M.cherifi, L.tebani. (2013)**. Etude de la production de l’acide-3-indole acétique et de l’activité antifongique d’une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée à partir de la rhizosphère du blé de la wilaya de Guelma, 1p.
- **Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., Thonart, P. (2010)** .Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health, p 15.
- **Upadhyay S, Kumar N, Singh V and Singh A (2015)**. Isolation, characterization and morphological study of Azotobacter isolates. *J. Appl. Nat. Sci.* **7**: 984-990.
- **Passaglia, L.M.P., Scharank, A. and Schrank, I.S., 1995. Can. J. Microbiol., 41: 849 – 854.**
- **Patel PH, Patel JP and Bhatt SA (2013)**. Characterization and phylogenetic relatedness of *Azotobacter salinestris*. *J. Microbiol. Biotech. Res.* **3**: 65-70.

Références

- **Perret, X., C. Staehelin et W.J. Broughton (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 180-201.
- **Pinton, R., Z. Varanini et P. Nannipieri (2001).** The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. pp: 1-17. *In: The rhizosphere.* Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. (Eds). Marcel Dekker, Inc., USA.
- **Pivato, B., P. Offre, S. Marchelli, B. Barbonaglia, C. Mougel, P. Lemanceau, et G. Berta(2009).** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, **19**: 81-90
- **Prescott, C.E., Chappell, H.N. and Vesterdal. L., (1999).** Nitrogen turn- over in forest floors of coastal Douglas-fir along a gradient in soil nitrogen capital. *Ecology* (In press).
- **P. 4741 ,S., H.A Alikham et F. Raiesi (2007).** Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat.
- **Ramdane, Iman. Boukarana, Iman.K. (2016).** Sélection des souches rhizobiennes efficaces, autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la luzerne (*Medicago sativa L.*). Mémoire Master Académique .Université KasdiMerbah. Ouargla. p.95
- **Rajaei ,et.al., (2007).** Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. *J. Sci. Technol. Agric. Nat. Resources*, **11**: 297.
- **Rees, D. C. et J. B. Howard. (2000).** Nitrogenase: standing at the crossroads, Elsevier Science. 4: p559-566.
- **Remans, R., A. Croonenborghs, R.D. Gutierrez, J. Michiels et J. Vanderleyden (2007).** Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* are dependent on plant P nutrition. pp: 341-351. *In : New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research.* Lemanceau, P., Bakker, P., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas.
- **Rillig, M.C. et D.L. Mummey (2006).** Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, **171**: 41-53.

Références

- **Robert, M., Chenu, C., (1992).** Inter-actions between microorganisms and soil minerals, In :
- **Roger P., (1996).** La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement? Conférence débat de l'ORSTOM. Paris Xe France.
- **Roger P., Dommergues Y., Balandreau J., Dredus B., Sougoufara B. 1996.** La fixation biologique de l'azote, quelles potentialités pour le développement ? 2.
- **Sant'Anna FH, Almeida LGP, Cecagno R, Reolon LA, Siqueira FM, Machado MRS, Vasconcelos ATR and SchrankIS (2011).** Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics*. **12**: 409.
- **Sarag, H. (1980).** Essai de caractérisation de la matière organique dans quelques sols du nord de l'Algérie, Ann, agro, (El harrach), Vol VI, N° 2, pp: 33-35
- **Silini , A. (2013) .**Effets des molécules Osmoprotectrices sur la survie et l'activité de AZOTOBACTER et sur la croissance de blé dur en milieu salin , Thèse de Doctorat En Sciences ,université ferhat Abbas sétif. P22.
- **Sprent, J.I. (2001).** Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- **Steenhoudt, O. et J. Vanderleyden (2000).** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects, *FEMS Microb.Rev.*,**24**: 487-506.
- **Stella M and Suhaimi M (2010).** Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. *J. Trop. Agric. Fd. Sci.* **38**: 211-219.
- **Stephanie A. E., John A. B., Thomas M. S., (2007).** Isolation and characterization of soil Bacteria That Define *Terriglobus* gen. nov; in the phylum Acidobacteria *Applied and environmental microbiology*, **73**: 2708-2717.
- **Stevensen J.F., (1984)** -Humus chemistry, genesis, composition, reactions, John Wiley et Son, New York. is In : Physiologie et production du maïs.
- **Tanvir R, Javeed A and Bajwa AG (2017).** Endophyte bioprospecting in South Asian medicinal plants: an attractive resource for biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotech.* **101**: 1831-1844.
- **Tourte Y., Bordonneau M.,et Tourte C., (2005).** Le monde des végétaux. Edition Dunod, Paris.
- **Van der Heijden, M.G.A., R.D. Bardgett, et N.M. van Straalen (2008).** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.*, **11**: 296-310.

Références

- **Van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Euro. J. Plant Pathol.*, **119**: 243-254.
- **Van Peer, R., G.J. Niemann et B. Schippers (1991).** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, **81**: 728–734.
- **Vessey, J.k. (2003),** Plant growth promoting rhizobacteria as bio-fertilizers. *Plant Soil* p255, 571-586.
- **Vilain.M(1997).** Production végétale. Vol 2. Ed. Lavoisier. Tech et doc. 449p.
- **Whipps , J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Experimen. Bot.*, **52**: 487-511.
- **White, J., Prell, J., James, E.K., Poole, P., (2007).**Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiology*.144(2): 604–614.
- **Yorukce MA, Aktaş B, Geroğlu Y, Poyrazoğlu E and Biyik HH 2017.** Isolation and Identification of Bacteria from Fruit Garden Soils in Aydın Province. *Int. J. Second. Metabol.***4**: 66-73.
- **Zahir, ZA, M.Arshad et WT. Frankenberger (2004).** Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture.*Adv. Agron.*, **81**, 97-168.

ANNEXES

ANNEXE

Protocole de calcul de la capacité de fixation de l'azote

NH3 produit :

1- La souche S2 : $DO_{S2} - DO_T$

$$NH3\ S2 = 0,803\ mg/l$$

2-La souche S3 : $DO_{S3} - DO_T$

$$NH3\ S3 = 3,585\ mg/l$$

Glucose consommé :

1- La souche S2 : $DO_T - DO_{S2}$

$$Glucose\ S2 = 68,04\ mg/l$$

2- La souche S3 : $DO_T - DO_{S3}$

$$Glucose\ S3 = 514,79\ mg/l$$

➤ **Rendement de la production de NH3 par rapport au glucose consommé :**

$$1- RS2 = \frac{NH3\ S2\ Produit\ mg/l}{Glucose\ S2\ Consommé\ mg/l}$$

$$RS2 = 11,80\ mg/mg$$

$$2-RS3 = \frac{NH3\ S3\ Produit\ mg/l}{Glucose\ S3\ Consommé\ mg/l}$$

$$RS3 = 7\ mg/mg$$

ANNEXES

ANNEXE

Base minérale concentrée de **winogradsky sans azote** :

- KH₂PO₄ 50g/L,
- MgSO₄ 7H₂O 25 g/L,
- NaCl 25 g/L,
- FeSO₄ 7H₂O 1,0 g/L,
- Na₂MoO₄ 2H₂O 1g/L,
- MnSO₄ 4H₂O 1g/L,
- 0,1 g de CaCO₃ +
- pH 7,2.

-Potato Dextrose Agar (PDA) :

- Pomme de terre :250g
- Glucose :20g
- Agar :15g
- Eau distillée : litre
- pH: 5.1 ± 0.2

-Uréase : (Urea Broth médium)

- urée : 0,1g ;
- KH₂PO₄ : 9,1g ;
- K₂HPO₄ : 9,5g ;
- rouge de phenol : 0,01g

-Uréase : (Glucose Broth médium)

- urée : 0,1g ;
- KH₂PO₄ : 9,1g ;
- K₂HPO₄ : 9,5g ;
- rouge de phénol : 0,01g ;
- glucose : 4g