

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badais-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

MAHI NORA & BELLIL KHADHRA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THÈME

**Mise en évidence de la solubilisation du zinc par des
bactéries de sol**

DEVANT LE JURY :

Président : MEKHALDIA

Pr

U. Mostaganem

Encadreur : BOUZNED.A

MCB

U. Mostaganem

Examineur : HAMOUM.H

MCB

U. Mostaganem

Année universitaire 2021-2022

Remerciement

Nos remerciements S'adressent tout d'abord à DIEU, le tout puissant qui nous a tracé le chemin de notre vie et accordé la volonté, la santé et la patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire ;

*Nos vifs remerciements, à nos parents pour leurs encouragements, soutiens
Moraux, tout au long de notre formation.*

*Nous tenons à remercier en premier lieu notre encadreur **Bouznad A** pour son aide précieuse et ces conseils judicieux.*

*Nous remercions **Mr. Hamoum H** pour son aide tout au long de ce travail*

*Nous remercions **Mr. Hamoum H** et **Mr. Mekhaldi A** d'avoir accepté de juger ce travail.*

Nous remercions les responsables des laboratoires Mm. Hafida qui nous a permis de travailler dans des conditions favorables.

Aussi à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Modeste travail A tous ces personnes nous retirons nos remerciements du fond de coeur.

Dédicace

*Je dédie ce travail premièrement à mes chers parents qu'ils
Trouvent ici toute ma gratitude pour leur aide précieuse et
Leur soutien tout le long de mes études.*

A :

*Mon cher fiancé en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le
Réconfort.*

Ma belle famille

*Mes très chers frères et sœurs qui m'ont toujours
Encouragé à aller de l'avant*

Toute ma famille

*Tous mes amis (es) et camarades de la promotion
2021-2022.*

NORA

Dédicace

A l'homme de ma vie,, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A mes sœurs HAFIDA. ZAHIRA. FATMA et mon frère OMAR. et toute ma famille que j'aime.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés

A mes amis, et tous mes collègues d'étude

KHADHRA

Sommaire

Remerciements	i
Dédicace	ii
Sommaire.....	iii
Liste des abréviations.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Résumé.....	viii
Introduction.....	01
Chapitre I : Revue bibliographique	
I.1. Diversité microbienne dans le sol.....	04
I.1.1 Rhizosphère.....	04
I.2 Bactérie solubilisent le zinc.....	05
I.2.1 Définition du zinc.....	05
I.2.2 Zinc dans le sol.....	06
I.2.3 Zinc dans la plante.....	06
I.2.4 Formes chimiques du Zinc dans le sol.....	06
I.2.5 Rôle du Zinc	07
I.2.6 Distribution du zinc dans la plante	07
I.2.7 L'effet de l'excès de zinc.....	07
I.2.8 L'effet de la carence en Zinc.....	08
I.2.9 Mécanismes de solubilisation du zinc.....	08
I.3 Les activités PGPR	08
I.3.1 Effet directs.....	09
I.3.1.1 La fixation de l'azote.....	09
I.3.1.2 La solubilisation du phosphate.....	09
I.3.1.3 La solubilisation du potassium.....	10
I.3.1.4 La production des sidérophores.....	10
I.3.1.5 La production des phytohormones.....	10
I.3.2 Effet indirects.....	11
I.3.2.1 La compétition pour l'espace et les nutriments.....	12
I.3.2.2 L'Antibiose.....	12
I.3.2.3 Le parasitisme.....	13
I.3.2.4 Résistance systémique induite ISR.....	13
Chapitre II : Matériels et méthodes	
II.1 Echantillonnage	15
II.1.1 Lieu de l'expérimentation.....	15
II.1.2 Localisation des sites de prélèvement.....	15
II.1.3 Prélèvement des échantillons.....	16
II.2 Isolement des bactéries solubilisent le zinc.....	16
II.2.1 Préparation du milieu Bunt and Rovira.....	16
II.2.2 Préparation des dilutions décimales	16
II.2.3 Isolement des bactéries ectophyte	16
II.2.4 Isolement des bactéries épiphytes.....	17
II.2.5 Isolement des bactéries endophytes	17
II.3 Purification et conservation des microorganismes isolés	18

II.4	Identification des isolats bactériens :.....	19
II.4.1	Caractérisation morphologique.....	19
II.4.1.1	Etude microscopique.....	19
II.4.1.2	Examen macroscopique.....	19
II.5	Caractérisation biochimique.....	19
II.5.1	Test catalase.....	19
II.5.2	Test oxydase.....	20
II.5.3	Test de mannitol mobilité.....	20
II.6	Test de solubilisation du zinc :.....	20
II.7	Test de solubilisation du phosphate.....	21
II.8	Fixation d'azote.....	21
II.9	Production de l'acide indole acétique(AIA).....	21
II.10	Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	22

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1	Isolement des bactéries solubilisent le zinc.....	24
III.2	Test de solubilisation du zinc	24
III.3	Etude de certains caractères morphologiques des isolats	26
III.4	Caractérisation biochimique.....	27
III.5	Mise en évidence des activités PGP.....	28
	Conclusion.....	38
	Références bibliographiques.....	40

Annexe

Liste des abréviations

BSZ : Bactéries solubilisant le zinc

PGPR : plant growth promoting rhizobacteria (Bactéries promotrices de la Croissance des Plantes)

Zn : zinc

pH : Potentiel d'Hydrogène

PVK : Pikovskaya

Tr/min : Tour par minute

UFC : Unité formant colonie

AIA : Acide Indole -3- Acétique

ANOVA : Analyse de la variance

BSP : Bactéries solubilisant le phosphate

BN : Bouillon nutritif.

LB : Milieux Luria-Bertani

NBRIP : De l'anglais "National botanical research institut of phosphate medium"

P : Phosphore.

ISR: induced Systemic resistance

HCN: Cyanure d'hydrogène

N₂ : azote atmosphérique

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractérisation phénotypique et biochimique des bactéries.....30

Tableau 02 : production d'AIA , solubilisation du phosphate et du zinc ,fixation d'azote, production HCN par des isolats testés.....35

Liste des figures

Figure 01	Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère.....	04
Figure 02	Carte géographique de région d'étude :Ouled Boukhatem	15
Figure 03	La zone de la région d'étude : Ouled Boukhatem.....	16
Figure II.1	Isolement des bactéries ectophyte.....	17
Figure II.2	Isolement des bactéries épiphytes.....	17
Figure II.2	Isolement des bactéries endophytes.....	18
Figure 04	Méthode d'isolement par stries d'épuisement.....	19
Figure 05	isolat DY3.....	24
Figure 06	isolat DY6.....	24
Figure 07	solubilisation du phosphate par isolat (DY3, DY7 ,DY8) sur milieu BR.....	25
Figure 08	Concentration de solubilisation du zinc par les souches bactériens.....	25
Figure 09	Pourcentage de Gram négatif et positif des isolats bactériens.....	26
Figure 10	Aspect microscopiques d'isolat DY3 (observation microscopique (G x100)après coloration de gram).....	27
Figure 11	Aspect microscopiques d' isolat DY8 (observation microscopique (G x100)après coloration de gram).....	27
Figure 12	Résultats test catalase des isolats (DY3 , DY5,DY6 ,DY7,DY8 et DY9).....	28
Figure 13	Pourcentage de test d'oxydase des isolats bactériens.....	28
Figure 14	Résultats test oxydase chez isolats	29
Figure 15	Test de mobilité sur milieu Mannitol Mobilité des isolats (CZ11 ,CZ112 et CZ12).....	29
Figure 16	solubilisation du phosphate par des isolat bactériens (D Y 3 ,DY7 ,DY8) sur milieuPVK.....	31
Figure 17	Concentration de solubilisation du phosphate par les souches bactériennes.....	31
Figure 18	fixation d'azote des isolats bactériens (DY3 ,DY5 , DY6) par apport un témoin ..	32
Figure 19	: Production d'H ₂ CN par isolat(CZ15) résultat négatif.....	33
Figure 20	: production d'AIA par isolats bactériens.....	34
Figure 21	: Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA.....	34

Résumé

La capacité des bactéries solubilisatrices du zinc à solubiliser le zinc est considéré comme l'un des caractères les plus importants associés à la nutrition des plantes. Ces bactéries jouent un rôle important dans l'apport de zinc aux plantes. L'objectif de la présente étude est l'isolement des bactéries solubilisant le zinc ainsi que la mise en évidence de la présence de caractères impliqués dans la promotion de la croissance plantes.

Au cours de notre travail, 13 souches bactériennes ont été isolées à partir de la rhizosphère de courgette, ail, haricot et betterave de la région de la wilaya de Mostaganem parmi lesquelles 11 isolats ont montré une réponse positive à la solubilisation du Zn sur milieu Bunt et Rovira modifiés avec l'oxyde de Zinc comme seule source de Zn. Ils ont été sélectionnés sur la base d'halozone clair et diamètre de la colonie, ces isolats ont montré une teneur en Zn maximale équivalente à $303 \pm 6,08 \mu\text{g/ml}$ chez l'isolat DY8. Les isolats ont été ensuite évalués pour leurs traits de la promotion de croissance des plantes telles que la solubilisation, la capacité à fixer l'azote atmosphérique, la production d'AIA et la production de l'acide HCN. Les résultats montrent, en effet, que la solubilisation des phosphates et la production d'AIA ont été détectés dans la plus part des isolats bactériens.

Mots clé : Bactéries solubilisatrices du zinc, phosphate, AIA, HCN

Abstract

The ability of zinc solubilising bacteria to solubilise zinc is considered one of the most important traits associated with plant nutrition. These bacteria play an important role in the supply of zinc to plants. The objective of the present study was to isolate zinc solubilising bacteria and to identify the presence of traits involved in plant growth promotion.

In the course of our work, 13 bacterial strains were isolated from the rhizosphere of courgette, garlic, bean and beetroot from the region of the wilaya of Mostaganem, among which 11 isolates showed a positive response to Zn solubilisation on Bunt and Rovira medium modified with Zinc oxide as the only Zn source. They were selected on the basis of clear halozone and colony diameter, these isolates showed a maximum Zn content equivalent to $303 \pm 6.08 \mu\text{g/ml}$ in isolate DY8. The isolates were then evaluated for their plant growth promotion traits such as solubilisation, ability to fix atmospheric nitrogen, IAA production and HCN acid production. The results show, indeed, that phosphate solubilisation and IAA production were detected in most of the bacterial isolates.

Key words : zinc solubilising bacteria, plant promotion, Phosphate, IAA, HCN

Introduction

Introduction

Le zinc est un micronutriment essentiel à la croissance et le développement des plantes.

Le zinc se présente sous la forme d'un ion libre qui augmente la vitesse de nombreuses réactions métaboliques des plantes. Il joue un rôle essentiel dans la biosynthèse d'AIA à travers la formation de tryptophane, le précurseur de l'AIA. Habituellement dans l'absence d'AIA, la croissance des plantes est rabougrie. Le zinc est également impliqué dans le contrôle de l'expression de certains gènes et il semble avoir un rôle important dans la stabilisation de l'ARN et la structure d'ADN et le maintien de l'activité des enzymes dégradantes de l'ARN (Beulah J et al. 2017).

Une carence en Zn entraînera une inhibition des activités physiologiques et biochimiques des plantes conduisant à une croissance anormale. La carence en zinc augmente aussi la fuite à travers la membrane des enzymes contenant du zinc et qui sont impliqués dans la détoxification des membranes des radicaux oxygénés.

Les PGPR constituent un groupe diversifié de bactéries qui peuvent être dans la rhizosphère, à la surface des racines ainsi qu'en association avec les racines (Maheshwari et al., 2012 ; Ahmad et al., 2008). Il a été démontré que ces bactéries du sol améliorent la santé des plantes ou augmentent le rendement peuvent également mobiliser les micronutriments comme le Zn et le Fe. La bio-fortification est le processus par lequel la qualité nutritionnelle des cultures vivrières est améliorée par des pratiques agronomiques, la sélection végétale conventionnelle ou de la biotechnologie moderne. Ainsi, la bio-fortification est une approche visant à augmenter la biodisponibilité de micronutriments tels que le Zn et le Fe dans les cultures de base de région spécifique (Stein, 2010). Par conséquent, cette étude a pour objectif d'examiner les PGPR ayant la capacité de solubiliser le Zn indigène et d'améliorer son accumulation dans la partie comestible de la culture.

Pour atteindre ces objectifs, le plan travail suivant a été réalisé :

- 1) Isolement et criblage des bactéries solubilisatrices du Zn à partir des sites différents de la rhizosphère.
- 2) Etude des caractères morphologiques et biochimiques des isolats sélectionnés.
- 2) évaluation du potentiel PGP des bactéries solubilisatrices du Zn sélectionnées.

*Revue
bibliographique*

I.1. Diversité microbienne dans le sol

I.1. 1. Rhizosphère

La rhizosphère, du grec *rhiza* signifiant racine et du grec ancien *sphaira* signifiant sphère (Lynch, 1990). La rhizosphère a été définie par Hiltner en 1904 comme la fraction de sol sous l'influence des racines de la plante (Louvel, 2010). C'est une zone étroite adjacente aux racines des plantes et influencées par une forte activité microbienne dans le sol, et autour des racines (Nazir *et al.*, 2016 ; Benaïssa, 2019). Cette interface entre la racine et le sol crée des conditions favorables pour le développement microbien notamment par la libération d'exsudats racinaires (Louvel, 2010). La rhizosphère est divisée en trois zones représentées par la figure 1 ; il s'agit de l'endorhizosphère, le rhizoplane et l'ectorhizosphère (Badri et Vivanco, 2009 ; Nazir *et al.*, 2016).

- Ectorhizosphère : La rhizosphère au sens strict, zone constituée par le sol rhizosphérique, à l'intérieur de laquelle diffusent les exsudats solubles et volatils en provenance des racines.
- Le rhizoplane, zone constituée par la surface des racines et le mucilage.
- La rhizosphère interne ou endorhizosphère, constituée par les cellules du cortex racinaire qui est colonisée par les microorganismes saprophytes (Dommergues, 1975).

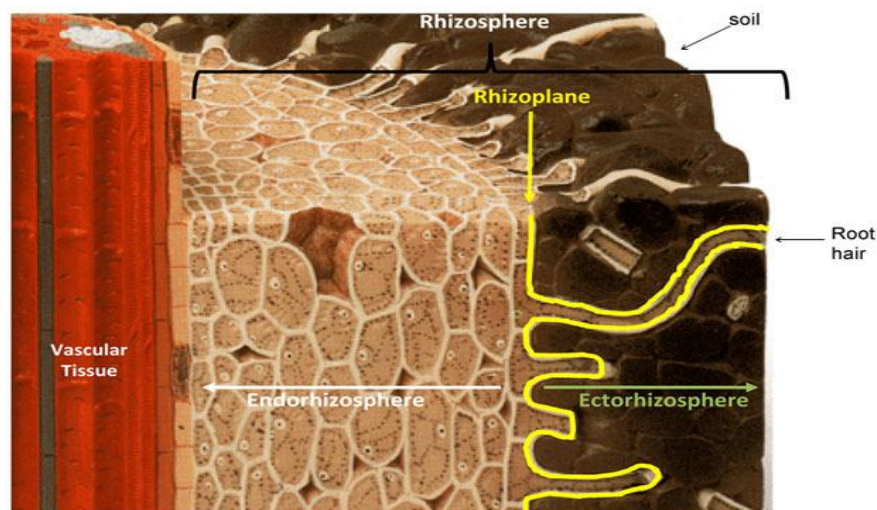


Figure 1: Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (Mougel, 2013)

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I.2. Bactéries solubilisent le zinc

I.2.1. Définition du zinc

Le zinc, élément du groupe IIB du tableau périodique, de masse atomique 65,38 g/mol, possède une densité élevée de 7,14 g.cm⁻³. (Finney et Halloran .2003).

Le zinc est un métal ductile, bleu gris, moyennement réactif, qui se combine avec l'oxygène et d'autres non-métaux, et qui réagit avec des acides dilués en dégageant de l'hydrogène. La teneur moyenne en zinc de la croûte terrestre serait comprise entre 70 et 132 mg/kg. (Richardson et al. 2001) Le zinc possède cinq isotopes stables. Leurs masses et abondances naturelles sont : 64 Zn (48,27 %), 66 Zn (27,90 %), 68 Zn (18,80 %) et 67 Zn (4,10 %) et 70 Zn (0,63 %). (Vallee et Falchuk, 1993).

Les minerais de zinc les plus répandus dans la nature sont le sphalérite (ZnS) et le smithsonite Zn(CO₃). Les principaux apports de zinc anthropiques sont les déchets agricoles qui représentent 61% de la pollution totale suivis par les déchets urbains (20%) et les retombées atmosphériques (18%) (Feix, 1998).

Le zinc fait partie des éléments essentiels pour l'homme, les animaux et les plantes. Il est contenu dans certaines enzymes et il est indispensable pour beaucoup de processus biologiques et biochimiques. La limite de toxicité pour l'homme dans l'eau est assez haute (30 mg.l⁻¹) par contre, il est très toxique pour tous les organismes aquatiques (quelques centièmes de mg.l⁻¹), dépend de la spéciation en solution (Pitter, 1999).

Par contre, dans les sols acides ou neutres, le zinc est l'un des éléments traces les plus mobiles (El Zahaby, 1998 ; Ashley, 1996). Dans les sols riches en matière organique, l'ordre de stabilité du métal complexé avec la matière organique suit la série d'Irving-Williams : Fe³⁺ > Al³⁺ > Cu²⁺ > Ni²⁺ > Co²⁺ > Ca²⁺ > Zn²⁺ > Mn²⁺ > Mg²⁺. Par rapport à un type de ligand donné, l'ordre de la série est celui de la diminution du rayon ionique du métal (Ashley, 1996).

Par ailleurs, certaines études montrent (Harita et al .,1990 ; Cavallaro et McBride, 1984) que le zinc ne se complexe pas avec la matière organique et que le principal mode de rétention du zinc dans le sol est l'échange ionique.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I.2.2 Le Zinc dans le sol

Zinc dans le sol : La teneur moyenne en zinc de la lithosphère est en général de 50 mg/kg environ (Kovda et al, 1964) et les variations ne sont pas très importantes: de 10 à 150 mg/kg. La teneur en zinc de la roche-mère dépend de son origine géologique. Dans les roches, le zinc se trouve principalement sous forme de sulfures (sphalérite), carbonates (smithsonite) et de silicates (willemite). On le rencontre comme ion de remplacement dans les mailles cristallines des roches ferro-magnésiennes (augite, horblende, biotite). Il est adsorbé entre les feuillets des argiles minérales ou en substitution du magnésium (montmorillonite).

I.2.3. Le Zinc dans la plante

Les plantes sont généralement très tolérantes aux métaux car elles possèdent des mécanismes de protection qui empêchent le métal d'affecter le métabolisme de la plante. Elle capterait et séquestrerait aussi les métaux dans les cellules à l'intérieur de vacuoles ou par des métallothionéines, des protéines capables de s'attacher aux métaux et de désintoxiquer le métabolisme végétal (Reichman, 2002). La phytotoxicité du Zn survient lorsque les tissus végétaux accumulent en moyenne plus de 300 mg/kg de Zn, variant entre 44 à 5000 mg/kg selon l'espèce végétale testée, la partie de la plante analysée (racines, feuilles, jeunes pousses, etc.) et la méthode de culture utilisée (Tambasco et al., 2000).

I.2.4. Les formes chimiques du Zinc dans le sol

D'une façon générale, le Zn dans les sols est plutôt lié aux silicates primaires, aux minéraux argileux et à la matière organique (Loué, 1993), L'espèce ionique la plus commune est le Zn^{2+} . Toutefois on peut retrouver d'autres espèces telles : $ZnCl^+$; $ZnOH^+$; $Zn(OH)_2$, ZnO ; $ZnCO_3$, $ZnHCO_3$ (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Les formes oxydées (trivalentes et tétravalentes) sont les principaux états du Mn dans les sols (Loué, 1993) et dans la solution du sol sous forme de Zn^{2+} ou plus souvent de complexe soluble avec les matières organiques (Barber S.A., Silberbush M., 1984). La proportion de Zn complexe dans la solution de sol augmente avec le pH (5 à 90 %). Le Zn échangeable diminue lorsque le pH augmente. Le Zn réalise aussi des complexes insolubles avec les matières organiques (Bourrelrier P et J Berthelin 1998). La concentration minimale de Zn en solution est entre pH 7 et 8. La concentration en solution de Zn augmente fortement pour des pH < 6 (Ofefp, 1996).

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I.2.5. Le rôle du Zinc

Le zinc est indispensable pour la croissance et la reproduction normale des plantes. Cet élément est requis en faible quantité afin de permettre, d'une part, le fonctionnement normal de plusieurs voies physiologiques des plantes et d'assurer, d'autre part, l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes. Le Zn a un rôle important dans la régulation de la croissance des plantes et celle de l'expression des gènes. Il intervient aussi dans les différentes voies métaboliques telles que l'activité de phytohormones, la synthèse des protéines, la photosynthèse, le métabolisme des glucides, la défense contre les maladies et aussi dans la fertilité et la production de semence (Sadeghzadeh, 2013).

I.2.6. La distribution du zinc dans la plante

Le zinc est plus mobile au sein de la plante, cependant, les racines contiennent de plus grandes quantités que les parties aériennes, en particulier lorsque les apports sont importants. Dans le cas d'une consommation de luxe, le zinc peut être déplacé des racines vers les parties aériennes où ils se concentrent dans les chloroplastes, les vacuoles et les membranes cellulaires. Lors de la translocation, le zinc est chélaté à des acides organiques (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Le vaisseau conducteur xylème contient une teneur plus importante supérieure à celle de la solution prélevé par les racines. Le zinc semble être transporté dans sève brute sous forme ionique (Tiffin, 1967) ou lié à des acides organiques (White et al, 1981). Par contre, dans la sève élaborée du phloème, il est transporté sous forme de complexe anionique (Van Goor et Wiersma, 1976). Le zinc est un élément peu mobile et, en cas de consommation, il tend à s'accumuler dans les racines (Loneragan, 1977 ; Massey et Loeffel, 1967) ont montré, sur maïs, la possibilité d'une remobilisation du zinc foliaire au moment de la formation de l'épi, mais cette remobilisation ne se manifeste plus si la plante est carencée (Rice man et Jones, 1958).

I.2.7. L'effet de l'excès du zinc

D'après (Loué, 1993) En quantité excessive dans le sol, le zinc peut devenir toxique pour les plantes. La toxicité de Zn concerne généralement des sols acides ou des cultures sur solutions nutritive. L'excès de Zn se traduit par des teneurs en Zn anormalement élevées dans la plante, supérieure à 400 ppm, le déséquilibre nutritionnel peuvent en résulter et il est démontré que les teneurs des tissus végétaux en P et Fe sont diminuées.

I.2.8.L'effet de la carence en Zinc

Le maïs et le lin sont les plantes annuelles, les plus sensibles à la carence en zinc. Chez les espèces ligneuses il faut citer le pommier, le poirier, la vigne...etc. avec un symptôme commun, la « maladie des rosettes ». Les entre-nœuds sont raccourcis, les feuilles sont petites, cassantes, à bord ondulé avec parfois des plages chlorotiques ; elles sont groupées en rosettes. Les feuilles sont petites et déformées (Coïc et Coppenet, 1989).

I.2.9. Les mécanismes de solubilisation du zinc

Le zinc est insoluble dans le sol et n'est pas disponible pour l'absorption par les plantes (Barbier 1995). La solubilité des sels métalliques est une caractéristique importante du PGPR, telle que le composé conditionné devient disponible pour les plantes. Comparaison de bactérien et fonctionnel La recherche en génomique a ouvert de nouvelles voies pour traiter ces causes sous-jacentes Mécanismes au niveau moléculaire et biochimique. De nombreuses études ont été faites Examiner les mécanismes de solubilité du zinc dans le PGPR.

Le PGPR est différent les mécanismes de dissolution des nutriments dans le sol, c'est-à-dire par des réactions d'échange, Chélation, libération d'acides organiques et acidification (Chung *et al.* 2005 ; Hafeez *et coll.* 2005). Le mécanisme de mobilisation fer-zinc est susceptible d'inclure l'acide ferrique Tashkeel (Tariq *et al.* 2007; Burd *et al.* 2000; Wani *et al.* 2007; Saravanan *et coll.* 2011) et la production de dérivés de gluconate ou d'acide gluconique, par exemple, Acide 2-céto-gluconique (Fasim *et al.* 2002), acide 5-céto-gluconique (Saravanan *et al.* 2007) et plusieurs autres acides organiques par PGPR (Wani *et al.* 2007; Di Simine *et coll.* 1998 ; Tariq *et al.* 2007). Le mécanisme le plus préféré pour dissoudre le zinc Les micro-organismes sont acidifiants.

I.1.2.Les activités PGPR

Plusieurs interactions, bénéfiques (symbioses) ou non, voire délétères (pathogénie) sont observées entre plantes, bactéries et champignons du sol fleuriront l'activité biologique de ce sol. (Emily., 2015). Les PGPR interviennent sur la croissance des plantes selon plusieurs mécanismes, de manière directe ou indirecte. Ces bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. (Haas et Defago., 2005).

Chapitre 1 : Revue bibliographique

Les modes directs incluent la fixation d'azote atmosphérique, l'apport de nutriments non disponibles, (phosphore et autres nutriments minéraux), la production de régulateurs de croissance végétale (auxines, cytokinines et gibbérellines) et la répression de la synthèse d'éthylène (Hassen et Labuschagne., 2010). Les mécanismes indirects sont les éliminations des agents phytopathogènes à travers la compétition pour l'espace et les nutriments, la synthèse d'enzymes hydrolytiques, l'inhibition des enzymes ou des toxines produites par les pathogènes, et l'induction des mécanismes de résistance de la plante (Antoun et Prévost., 2005).

I.1.2.1. Effets directs

L'effet direct de la croissance des plantes peut se produire par plusieurs processus :

I.1.2.1.1. La fixation de l'azote

L'azote se trouve fréquemment sous forme gazeuse (N₂), inaccessible aux animaux et aux plantes où aucune espèce végétale n'est capable de fixer l'azote atmosphérique et de l'utiliser directement pour sa croissance (Pujic et Normand, 2009 ; Arora et al. 2012). Les PGPRs les plus connus pour leur rôle de stimulation des plantes grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique sont : *Azoarcus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* ; *Azotobacter Paenibacillus* et *Azospirillum brasilense*, qui transforment l'azote atmosphérique en ammoniac en utilisant un système enzymatique complexe connu sous le nom de la nitrogénase (Weyens et al, 2010; Arora et al., 2012). La rhizobie est un vaste groupe de rhizobactérie qui ont la capacité d'établir des interactions symbiotiques par la colonisation et forme de nodules racinaires dans le végétale, dans lesquelles l'azote est fixé en ammoniac qui est rapidement transformé en nitrates et le rendre disponible pour l'hôte ; La bactérie entre d'abord dans la racine et plus tard sur les nodules dans lesquelles se produit la fixation de l'azote (Munees et Mulugeta., 2013).

I.1.2.1.2. La solubilisation du phosphate

Le phosphore (P) est un élément largement distribué dans la nature. Il est considéré, avec l'azote (N) et le potassium (K), comme un constituant fondamental de la vie des plantes et des animaux. Le phosphore a un rôle important dans le métabolisme de la plante, et il est l'un des éléments nutritifs essentiels pour la croissance et le développement des végétaux. Cependant, le phosphore existe sous forme inaccessible pour la plante, il reste donc de le mobilisé dans le sol (Qureshi et al. 2012). Le phosphore est absorbé

Chapitre 1 : Revue bibliographique

principalement pendant la croissance végétale et, par la suite, la majeure partie du phosphore absorbée est transférée dans les fruits et les graines pendant les étapes de reproduction. Toutefois, les plantes déficientes en phosphore montrent un retard de croissance (réduction de la croissance des cellules et des feuilles, perturbation de la respiration et de la photosynthèse) (Fao., 2004).

I.1.2.1.3. La solubilisation du potassium

Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% de potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux de silicate (Parmar et Sindhu., 2013). En raison de l'application déséquilibrée des engrais, la carence en potassium devient l'une des principales contraintes dans la production végétale. Sans potassium adéquat, les plantes ont des racines mal développées, poussent lentement, produisent de petites graines et ont des rendements plus faibles (Kumar et Dubey., 2012). Les microorganismes des sols jouent un rôle clé dans le cycle K naturel. Les microorganismes solubilisant de potassium présent dans le sol pourraient fournir une solution alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes (Rogers et al., 1998).

I.1.2.1.4. La production des sidérophores

Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (Neilands., 1995). Certains PGPR produisent des sidérophores, composés de faibles poids moléculaire, généralement inférieurs à 1 kDa contenant des groupements fonctionnels capables de capter le fer en le rendant assimilable par les plantes (Kirdi et Zermane., 2010). Les sidérophores (sidéros = fer ; phoros = transport) (Rossum et al., 1994) sont des composés organiques ont une affinité très élevée et spécifique pour chélater le fer. Les Sidérophores augmentent aussi la disponibilité du fer par la complexations forte de Fe³⁺. Ces complexes restent en solution et augmentent de ce fait la diffusion du fer sur la surface de cellules. Presque 500 structures de sidérophore sont connues jusqu'ici, qui sont produites par des bactéries, des mycètes et des plantes (Boukhalfa et Crumbliss., 2002).

I.1.2.1.5. La production des phytohormones

Il existe deux sources de phytohormones naturellement disponibles pour les plantes : production endogène par les tissus de la plante et exogène par des micro-organismes associés. Les PGPRs produisent différentes phytohormones comme : l'AIA (Acide indole

Chapitre 1 : Revue bibliographique

acétique : auxines), les gibbérellique et les cytokinines et l' éthylène. Ce sont des petites molécules de signal produites en très faible concentration influençant les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques dans les plantes. (Han et al., 2005 ; Baca et Elmerich., 2007 ; Kloepper et al., 2007 ; Martinezviveros 1 et al., 2010)

La plus importante des hormones de croissance des plantes. Elle est impliquée dans plusieurs processus : la division cellulaire, la différenciation et la formation de faisceaux vasculaires, et elle a un effet positif sur l'initiation de la croissance et l'élongation des racinaire. Elle augmente également la ramification des racines et améliore l'absorption de minéraux et d'eau (Patten et Glick, 2002 ; Ahmad et Kibret, 2013 ; Gupta et al., 2015). Sont aussi des phytohormones impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et la stimulation de la croissance de la partie aérienne (Van Loom., 2007). Les Gibbérellines forment le groupe de phytohormones impliqué dans la modification de la morphologie de la plante par l'extension des tissus, en particulier de la tige. Ils affectent les processus de reproduction dans une large variété de plantes et retarde la sénescence des fruits et des feuilles. Les cytokinines sont retrouvées dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines, mais une forte évidence indique que la racine est le site principal de la biosynthèse de cytokinines (Hopkins, 2003 ; de Salamone et al., 2005).

L'éthylène et un régulateur impliqué dans la stimulation de la croissance des plantes à des concentrations modérées. Dans les conditions du stress (salinité, pollution par les métaux lourd...etc.), la plante augmente la sécrétion de l'éthylène, ce qui induit l'inhibition de la croissance des racines (Saleem et al., 2007).

I.1.2.2.Effet indirects

Le principal avantage de l'utilisation des PGPR est la résistance conférée aux plantes contre les maladies causées par les agents pathogènes. Les rhizobactéries jouent un rôle majeur dans la lutte contre ces agents, où un large spectre des maladies bactériennes, fongiques et parasitaires est supprimé via la production d'antibiotiques, compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène et l'espace), l'activation de la résistance systématique induite (ISR) et la production des enzymes (chitinase, protéase, lipase), cette protection est nommée biocontrôle. De plus, les PGPR peuvent être utilisées comme un biofertilisant efficace dans l'amélioration du rendement des cultures par la production d'enzymes telles que (cellulases, amylases, etc.) (Lugtenberg et Kamilova ,2009 ; Glick, 2012 ; Tariq *et al.* 2014).

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I.1.2.2.1. La compétition pour l'espace et les nutriments

La compétition pour l'espace et les nutriments est un mécanisme biologique utilisé par les PGPR pour éliminer les phytopathogènes. Cette compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour leur croissance (Dommergues et Mangenot., 1970).

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Piano *et al.* 1997).

Mais, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est, dans certains cas, pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale (Reyes *et al.* 2004).

L'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie fut beaucoup discutée. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique et capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005).

Toutefois, La compétition pour les nutriments et les différentes sources nécessaires pour la vie se produit généralement entre les microorganismes du sol. Ces PGPR fixateur du fer et du phosphore, inhiberont la croissance des pathogènes d'une part, et favoriseront celle des plantes, d'une autre part (PAL *et al.* 2006).

I.1.2.2.2. L'Antibiose

La production et la libération des molécules qui tuent ou réduisent la croissance des pathogènes cibles est le mécanisme le plus efficace par lequel les microorganismes peuvent contrôler les maladies des plantes, (Harman et Shores., 2007).

Il consiste à produire des antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène par l'agent antagoniste. Ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire tels que les antibiotiques comme l'amphicine, le 2,4-diacétylphloroglucinol

Chapitre 1 : Revue bibliographique

(DAPG), cyanure d'hydrogène (HCN) et la phénazine qui agissent comme des facteurs contre l'attaque des pathogènes. (Corbaz, 1990 ; Babalola, 2010).

I.1.2.2.3. Le parasitisme

Ce mécanisme consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes., 2005). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste. L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques telles que les glucanases, les chitinases et les lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène (Corbaz, 1990).

I.1.2.2.4. Résistance systémique induite ISR

L'expression de mécanismes de défense systémique chez les plantes peut être initiée suite à l'interaction avec certaines rhizobactéries non pathogènes lors d'un phénomène appelé ISR, ce mécanisme rend la plante plus résistante contre d'éventuelle attaque des agents pathogènes (virus, bactéries et champignons).

De nombreux composants bactériens tels que les lipopolysaccharides (LPS), sidérophores, lipopeptides cycliques, peuvent induire une résistance systémique des plantes (Gupta *et al*, 2015).

*Matériels et
méthodes*

II.1. Echantillonnage

II.1.1. Lieu de l'expérimentation

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie N° 01 de l'université « ABDELHAMID IBN BADIS » de Mostaganem pendant une période de 2 mois.

II.1.2. Localisation des sites de prélèvement

Le choix de site des prélèvements des échantillons a porté sur des sols de la région Ouled Boukhatem Mostaganem (figure 1).

Les échantillons de sol ont été collectés de la rhizosphère de différentes plantes à savoir : la courgette, l'ail, la betterave et l'haricot.

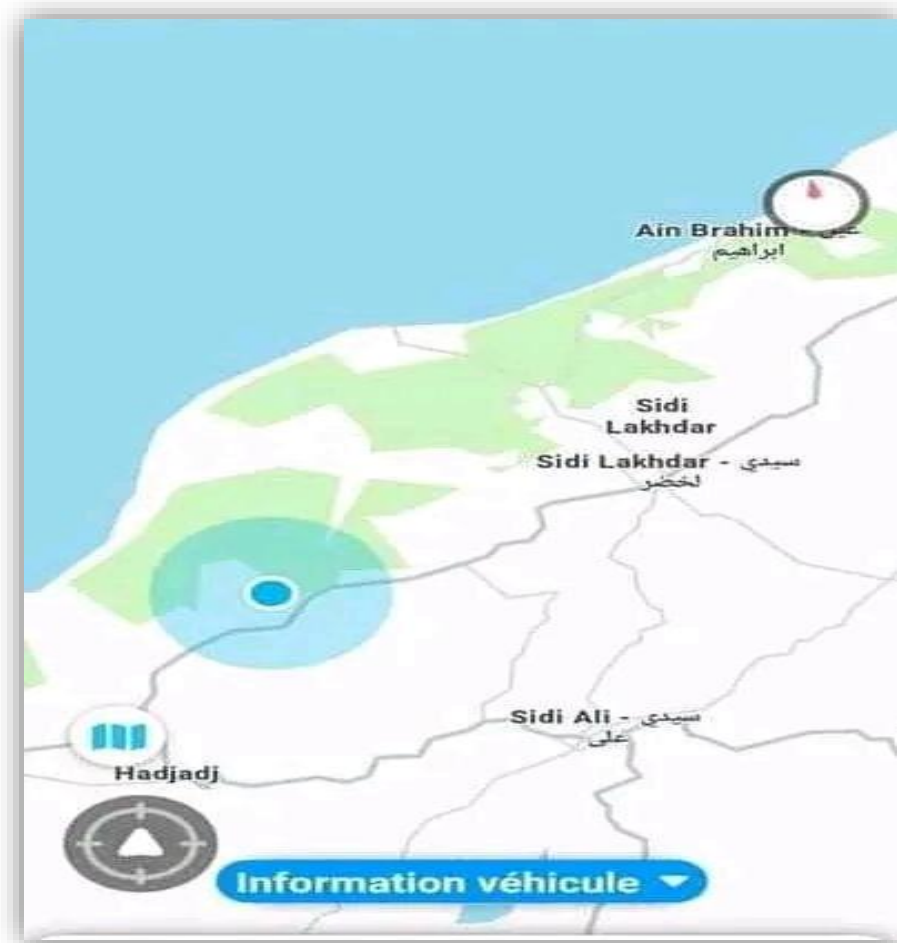


Figure 02 : Carte géographique de la région d'étude :Ouled Boukhatem



Figure 03 : La zone de la région d'étude :Ouled Boukhatem (photo originale).

II.1.3. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements ont été effectués le 20/04/2022 , Afin d'isoler des bactéries solubilisant du phosphate, des prélèvements de quatre échantillons(A , B , C et D) à partir de la partie rhizosphérique du sol ont été effectués à une profondeur à 15 cm, ces échantillons ont été mis dans des sacs fermés préalablement stérilisés dans un autoclave, puis transportés directement au laboratoire. Chaque échantillon de sol ainsi obtenus a été divisé en deux parties. Une première moitié pour l'analyse physico-chimique du sol et l'autre moitié pour l'isolement.

II. 3. Isolement des bactéries solubilisent le zinc

II.3.1 . Préparation des dilutions décimales

Une quantité de 10 g du sol est suspendue dans 90 ml d'eau physiologie stérile. Le mélange est agité pendant 30 minutes afin d'homogénéiser la solution qui sert à préparer une série de dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} 10^{-6}) (Almi,201

II.3.2. Isolement des bactéries ectophyte

Les racines ont été soigneusement secouées afin de séparer la terre des racines. 10g de terre de chaque échantillon a été pesé aseptiquement, homogénéisé dans un flacon Erlenmeyer avec 90 ml d'eau stérilisée, et agité pendant 30 min à environ 180 r min⁻¹. Après agitation, des échantillons de sol dilués en série ont été étalés sur une plaque de BR. (LIU Hui et al.,2010).

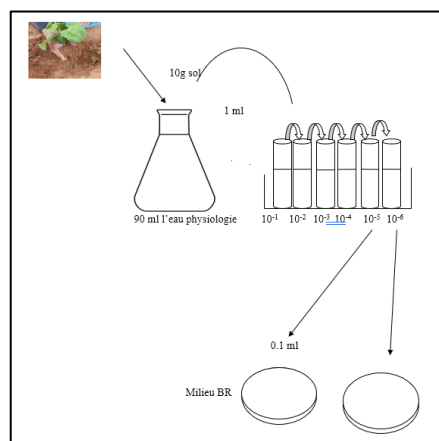


Figure II.1 : Isolement des bactéries ectophyte

II.3.3. Isolement des bactéries épiphytes

Les racines des échantillons étaient coupées aseptiquement entières, 4-5 racines par plante. Racines de 2,5 g ont été hachées à 2-5 mm et remplies dans 125 ml de flacons avec 50 ml d'eau distillée et 2 gouttes de tween80. Le mélange a été secoué à 100 tr/min pendant 30 min. Les solutions ont été ensuite diluées en série de 10⁻¹ à 10⁻⁶ et utilisées comme inoculum et incubées à 25-30°C (Kajohnpong *et al.* 2014).

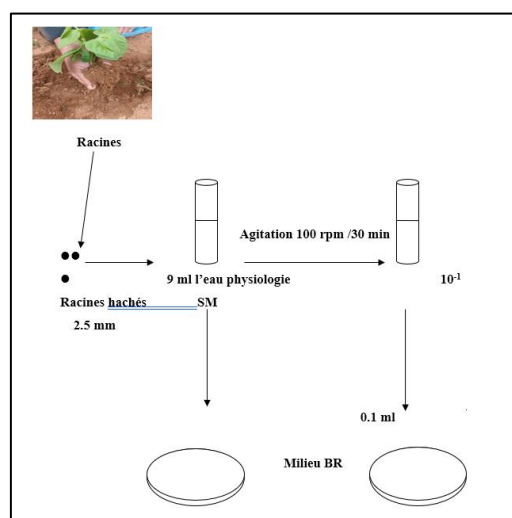


Figure II.2 : Isolement des bactéries épiphytes

II.3.4. Isolement des bactéries endophytes

Les échantillons ont été coupés séparément en tranches de 2 à 3 cm, stérilisés en surface avec une solution d'éthanol pendant 2 min sous agitation orbitale (150 rpm) et rincés trois fois avec de l'eau stérile pendant 1 min. Ils ont ensuite été pilonnés dans un mortier de verre dans 2 ml d'eau stérile. Des aliquotes d'un millilitre ont été diluées une fois. (Antonella Furin, 2015)

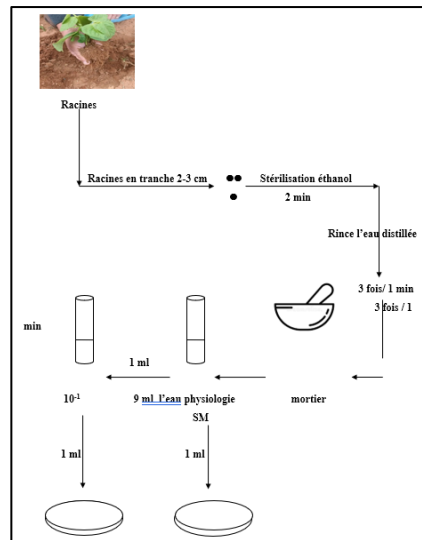


Figure II.2 : Isolement des bactéries endophytes

II.4. Purification et conservation des microorganismes isolés

Dans leur environnement naturel, pratiquement tous les microorganismes coexistent avec une multitude d'autres espèces .

La méthode pour purifier est l'épuisement sur boîtes (ou épuisement par stries),procédure mise au point dans le laboratoire de Robert Koch. Dans cette technique ,un échantillon de population mixte de bactéries a été prélevé au moyen d'un fil métallique (anse de platine),l'anse a été d'abord stérilisée en la chauffant au rouge directement sur la flamme d'un bec bunsen .La boucle stérilisée a été alors refroidir au contact du milieu solide.

L' échantillon de microorganisme a été prélevé en touchant une colonie .La separation a été réalisée par épuisement en stries du contenu la boucle sur la surface solide d'un gelose en boîte L 'épuisement a été effectué en trois étapes successives permettant d'isoler des cellules (figure)

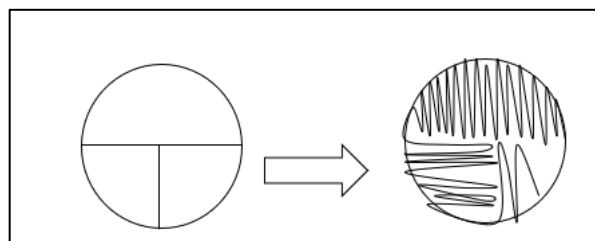


Figure 04: Méthode d'isolement par stries d'épuisement

Le premier tiers de la boîte a été inoculé en balayant avec l'anse la surface de la gélose de stries.L'anse a été alors stérilisée et refroidir. L'inoculation de seconde tiers a été

Chapitre II : Matériel Et Méthodes

réalisée par des stries en empiétant légèrement avec l'anse la premier quadrant a fin d'obtenir quelques cellules qui ont été étalées sur le seconde .

La répétition de cette procédure sur le troisième secteur active la séparation des bactéries. Grace à cette procédure ,chaque microorganisme d'échantillon d'origine sera progressivement séparé des autres et la quantité de chacun d'entre eux diminuera entre le premier et le troisième quadrant. A l'issue de l'étape d'épuisement par stries , les boites ont été incubées à 37°C dans une étuve .

II.5. Identification des isolats bactériens :

II.5.1. Caractérisation morphologique

• Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué pour l'identification des bactéries par l'étude de l'aspect des colonies bactériennes (la taille ,la couleur ,la consistance et la forme des colonies) . L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées.

• Etude microscopique

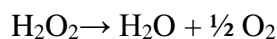
La coloration de Gram, est réalisée selon la technique classique ([Hildebrand et al., 1988](#)). Un frottis fixé à la chaleur a été coloré pendant une minute au violet de cristal; ensuite il a été rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de lugol, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. Le frottis coloré a été ensuite soumis à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol à 95% pendant 30 secondes puis il a été rincé à l'eau distillée. Ensuite le frottis a été coloré par la fushine pendant 1 minute et après un bref rinçage à l'eau distillée, et il a été séché au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec bunsen . L'observation a été faite au microscope optique avec un grossissement de 1000 avec immersion. En utilisant cette coloration double, les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose ([Delarras, 2007](#)).

II.6. Caractérisation biochimique

II.6.1. Test catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et Anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage.

Chapitre II : Matériel Et Méthodes



Une goutte d'eau oxygénée a été Déposée sur une lame propre. Des colonies bactériennes ont mélangées avec l'eau oxygénée . Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène : le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles : le test catalase est négatif (Delarras, 2007).

II.6.2. Test oxydase

C'est une enzyme qui intervient dans divers couples d'oxydoréduction, l'enzyme Recherchée est la phénylène-diamine-oxydase. Pour cela, un disque d'oxydase imbibé avec une Goutte d'eau physiologique stérile été déposé sur une lame. Puis une partie de la colonie à été Étalée sur le disque (Flandroits et Chomarar, 1988). Une coloration de violet foncé apparait immédiatement sur le disque indiquant une oxydase positive. L'absence de coloration indique que l'oxydase est négative.

II.6.3. Test de mannitol mobilité

Ce test a été effectué pour trois butes ; la mobilité microbienne, dégradation du mannitol au mannose et l'aérobiose ou l'anaérobiose bactérienne. Pour ces butes ,l'ensemencement a été réalisé par piqure centrale à l'aide d'un fil droit stérile. Ensuite, on a incubé les tubes dans une étuves à 37°C pendant 24h

II.7. Test de solubilisation du zinc :

La capacité de la souche bactérienne à solubiliser le zinc est testée sur le milieu BR contenant 0.1% du ZnO, Zncl comme seule source de zinc insoluble. Des cultures pures de chaque isolat ayant montré un halo sur le milieu BR sont ensemencées par piqure central a la surface des boites de pétri contenant le milieu BR. Après incubation à 30°C pendant 48h (Beulah et al.2017). Le diamètre de la zone claire et la croissance des colonies a été mesurée pour calculer Zn efficacité de solubilisation .

$$\text{ES} = (\text{DS}/\text{DC}) * 100$$

ES : efficacité de solubilisation

DS : diamètre de solubilisation

DC : diamètre de croissance

II.8. Test de solubilisation du phosphate

La capacité des isolats à solubiliser le phosphore inorganique a été testée selon la méthode décrite par Pikovskaya (PVK) ([Pikovskaya,1948](#)). Les isolats sont ensemencés par spot sur le milieu PVK solide contenant le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme la seule source de phosphore . Après 4 à 8 jours d'incubation à 28°C, la solubilisation du P complexé est mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie. La capacité solubilisatrice des isolats a été estimée par mesure du diamètre total (le diamètre du halo+le diamètre de la colonie) pour chaque colonie.

L'indice de solubilisation a été calculé par la formule suivante :

$$\text{IS phosphate} : \frac{\text{Diamètre de la zone halo (mm)} - \text{Diamètre de la colonie (mm)}}{\text{Le diamètre de la colonie (mm)}} \times 100$$

II.10. Fixation d'azote

La détection visuelle de la fixation d'azote chez les isolats bactériennes a été réalisée en utilisant le milieu exempt d'azote NF-MM (Nitrogène-Free Malate-mannitol Medium) contenant BTB comme indicateur ([Herman et al., 1994](#)) . Le milieu solide a été ensemencé par touches à partir les isolats bactériennes et incubé à 28 ±2 °C pendant 24 h. Le virage de la couleur verte du milieu de culture vers la couleur bleue indique une fixation d'azote positif. La zone colorée a été calculée en soustrayant le diamètre des colonies à partir du diamètre de la zone bleue ([Dobereiner et Day, 1976](#)).

II.11. Production de l'acide indole acétique(AIA)

La production d'AIA a été testée sur bouillon LB additionné de tryptophane (100mg/l).Le milieu a été ensemencé avec 1 ml de culture bactérienne (DO=0.8) et incubé à l'obscurité à 28°C/ 96 heures dans une étuve agitée à 180 rpm, 5ml de la culture ont été centrifugés à 6000 tr/20 min et puis 2 ml de reactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorique à 35% +1 ml de FeCl_3 0.5 M) et deux et gouttes d'acides orthophonique ont été ajouté à 1 ml de surnageant .Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'apparition d'une couleur rose indique la production d'AIA et la densité optique (DO) a été mesurée à 530 nm en utilisant un spectrophotomètre (Jenway 6760) pour quantifier l'AIA produit ([Lauriane,2015](#)).

II.12. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production d'HCN par les souches bactériennes a été testée sur milieu solide «King B» dans lequel on a ajouté de la glycine (4.4g/l) selon la méthode de Lorck (1948). Du papier Whatman n°1 (90mm de diamètre), imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) a été déposé à l'intérieur des boîtes de Pétri contenant la culture bactérienne. Ces dernières sont scellées au parafilm et gardées en position inverse dans l'étuve à 30°C/4.jours. Elles sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les souches HCN+. L'apparition d'une couleur orange à rouge traduit la production d'HCN par la bactérie productrice (Ahmad *et al.*, 2008 ; Trivedi *et al.*, 2008; Abbas-Zadeh *et al.*, 2010).

*Résultats et
discussion*

III.1. Isolement des bactéries solubilisent le zinc

L'isolement bactérien à partir du trois compartiment de la rhizosphère des plantes (ectosphère , rhizoplane et endosphère) réalisé sur le milieu Bunt and Rovira (Annexe 01) a permis de récolter 13 isolats.



Figure 05 : aspect macroscopique de l'isolat DY3 sur la gélose BR



Figure 06 : Aspect macroscopique de l'isolat DY6 sur milieu BR

III.2. Test de solubilisation du zinc

Tous les isolats bactériens ont été cultivés sur le milieu gélosé BR contenant oxyde de zinc (ZnO) comme seule source de zinc pour tester leur potentiel de solubilisation du Zn inorganique. Sur un total de 13 souches parmi eux 11 souches bactériennes ont montré une solubilisation du Zn (Figure 07) et deux souches bactériennes (DY 10, C Z 112) ont montré une réponse négative vis-à-vis de la solubilisation du Zn.. L'efficacité de ces souches bactériennes a ensuite été estimée par le calcul de l'indice d'efficacité calculé par la formule en fonction du diamètre de la colonie et de l'halozone.

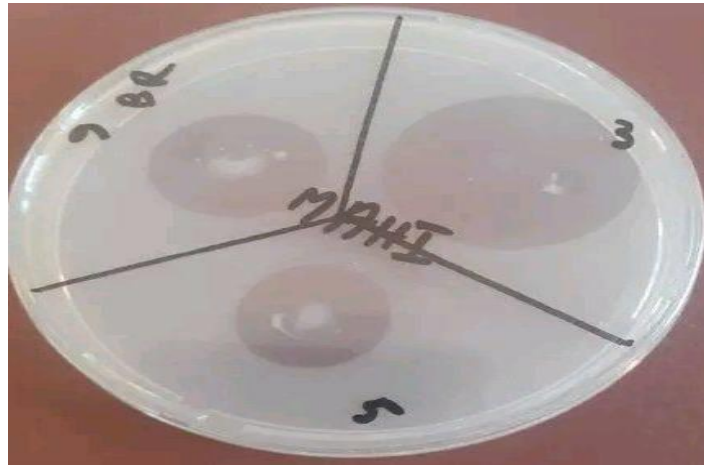


Figure 07: solubilisation du phosphate par isolat (DY3, DY7 ,DY8) sur milieu BR

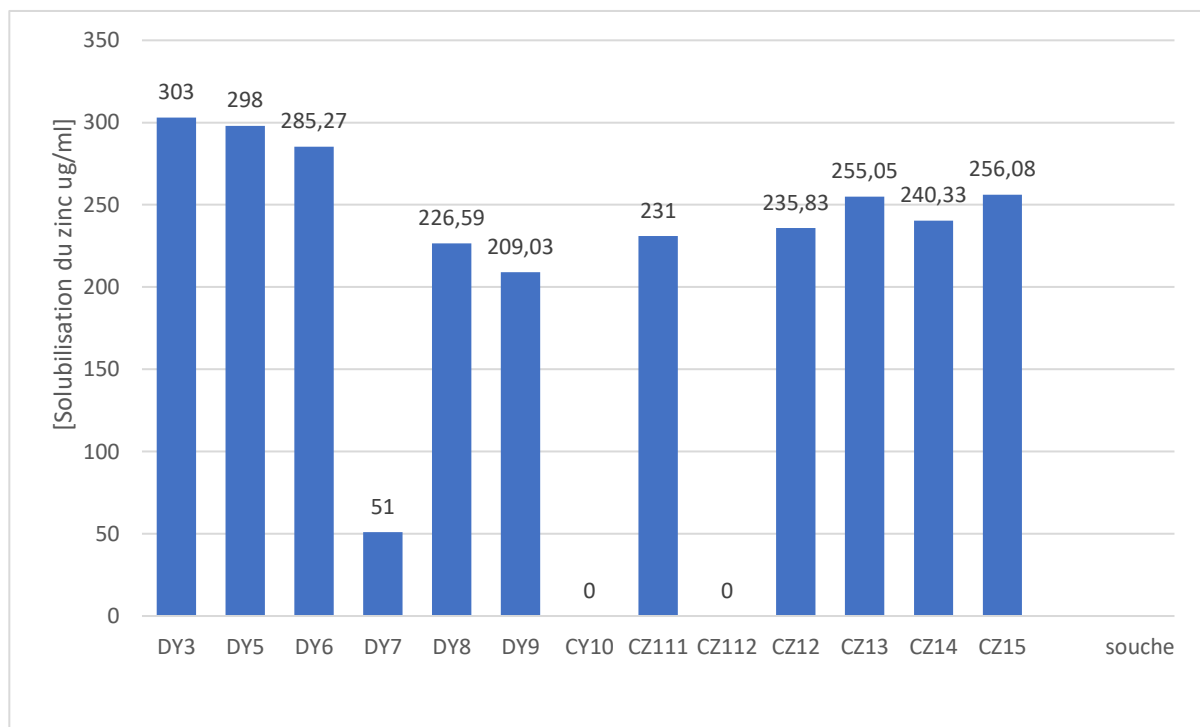


Figure 08 : Concentration de la solubilisation du zinc par les souches bactériens

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (08), on remarque une solubilisation maximale du zinc a été obtenue chez l'isolat DY3, DY5 et DY6 avec une solubilisation ($\mu\text{g/ml}$) de $285,27 \pm 4,97$ jusqu'à $303 \pm 6,08$ de zinc libre respectivement. L'isolats DY8, DY9, CZ111 , CZ12 , CZ13 ,CZ14 et CZ15 ont provoqué une solubilisation

Chapitre III : Résultats et Discussion

moyennes du zinc ($\mu\text{g/ml}$) allant de $209,03 \pm 5$ jusqu'à $256,08 \pm 5,63$, l'isolat DY7 a observé une faible solubilisation avec valeur $51 \pm 2,65$.

Les résultats obtenus sont plus importantes qu'avec les résultats rapportés par (Javed et al.2018) avec des valeurs allant $17,5 \pm 1,51$ jusqu'a $31,9 \pm 1,93$

III.3. Etude de certains caractères morphologiques des isolats

Les études macroscopiques des isolats ont montré la présence de colonies de forme et de taille variable, transparente et opaque, de couleur blanchâtre et beige.

Après coloration de Gram, une observation microscopique des isolats bactériens (à grossissement de 100) a été effectuée. Parmi les isolats observés 84,61% ont une forme bacillaire et 15,38% des cocco-bacillaire.

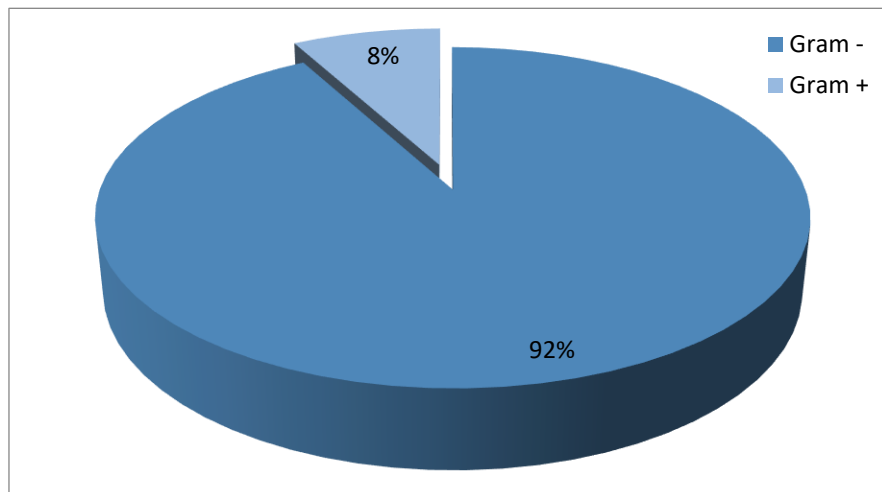


Figure 09: Pourcentage d'isolats à Gram négatif et positif

La coloration de Gram nous a permis de différencier les bactéries d'après leur couleur (rose et violet) : les bactéries à Gram positif se caractérisant par une couleur violette. Quand aux bactéries à Gram négatif, sont identifiées par une couleur rose (Figure 09) (Tableau 01). Les résultats obtenus montrent que 92% des souches se sont révélés Gram négatif et 8% sont des Gram positive.

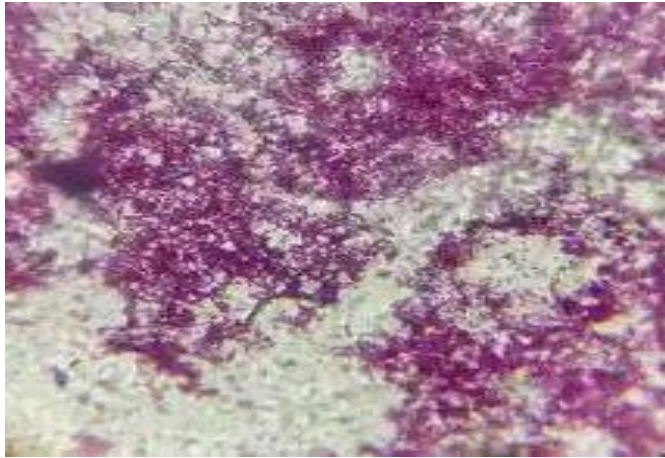


Figure 10 : Aspect microscopique de l'isolat DY3 (observation microscopique (G x100)après coloration de Gram)

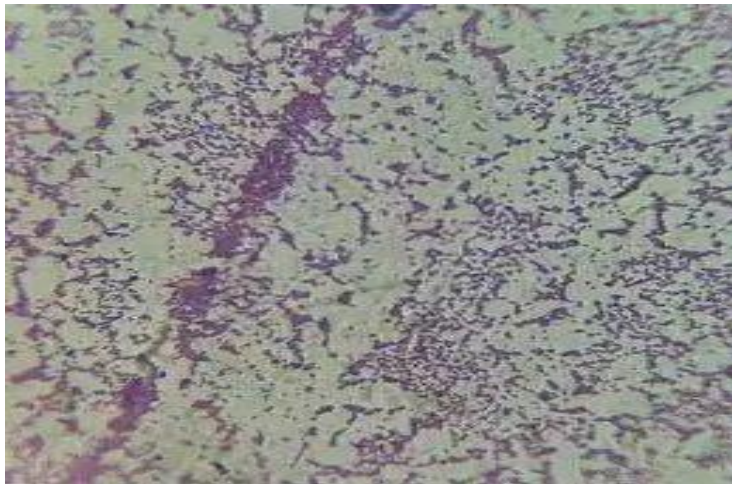


Figure 11 : Aspect microscopique de l'isolat DY8 (observation microscopique (G x100) après coloration de Gram)

La caractérisation morphologique des isolats a permis de constater que l'ensemble des isolats bactéries sont des bacilles et que la plupart sont des bactéries à coloration de Gram négatif. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont montré que les bactéries de formes bacillaires et à Gram négatif sont très abondants dans la rhizosphère dans des plantes ([khan et al., 2010](#)).

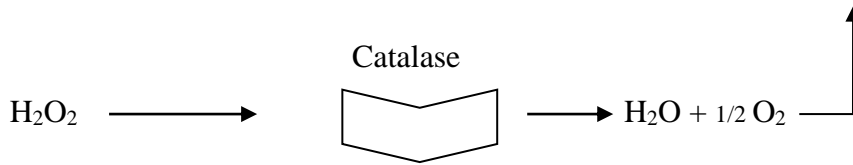
III.4. Caractérisation biochimique des isolats

Pour les caractéristiques biochimiques des bactéries isolées de la rhizosphère des Différentes plantes on a réalisé les tests suivants :

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.4.1. Test de catalase

Le dégagement gazeux chez les isolats sélectionnés est expliqué par la présence de catalase, l'enzyme est responsable de la dégradation du peroxyde dihydrogène (H_2O_2).



les résultats obtenus ont montré que toutes les isolats sont catalase positive (tableau 01).

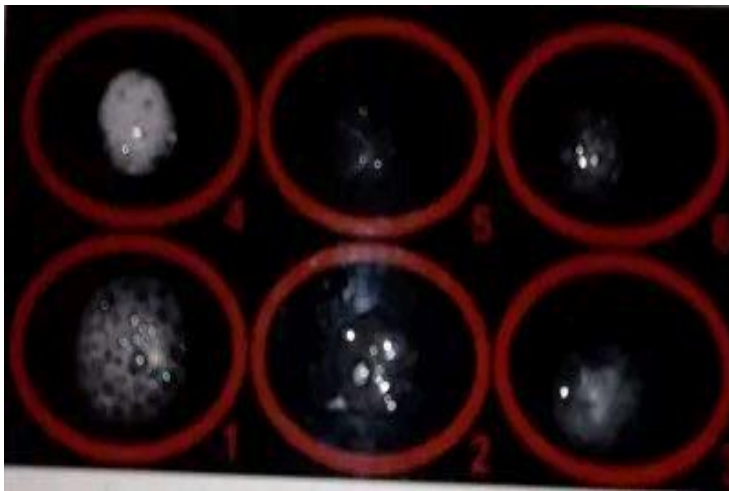


Figure 12 : Résultats test catalase des isolats (DY3, DY5,DY6 ,DY7,DY8 et DY9).

III.4.2. Test d'oxydase

Ce test positif (changement de couleur à violet sur les disques d'oxydase) a été détecté chez un pourcentage élevé (85 %) des bactéries testées et 15 % sont négatives.

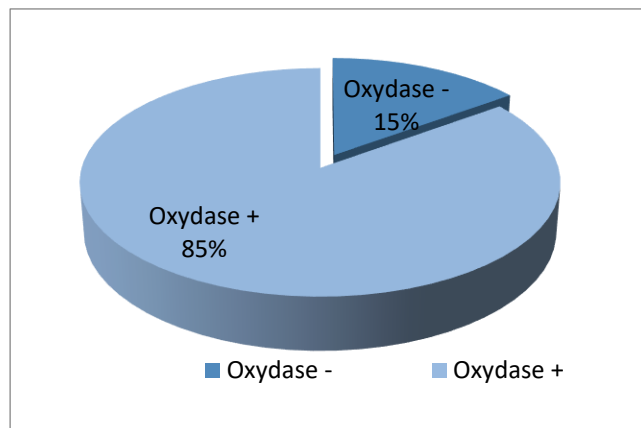


Figure 13 : Pourcentage de test d'oxydase des isolats bactériens.



Figure 14 : Résultats test oxydase

III.4.3. Test de mobilité

Pour la mobilité ; il a été remarqué que la plupart des isolats bactériens sont immobiles (10 des 13 des bactéries testées ne sont pas déplacées dans le milieu) alors que 3 sur les 13 des bactéries sont déplacées dans le milieu (tableau 01).

Ces résultats obtenus se différencient avec les travaux rapportés par (Gerhardt et al.,1994) ,(Dhayanithi et al.,2010),(Catherine et al.,1999) : les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la stries d'ensemencement .

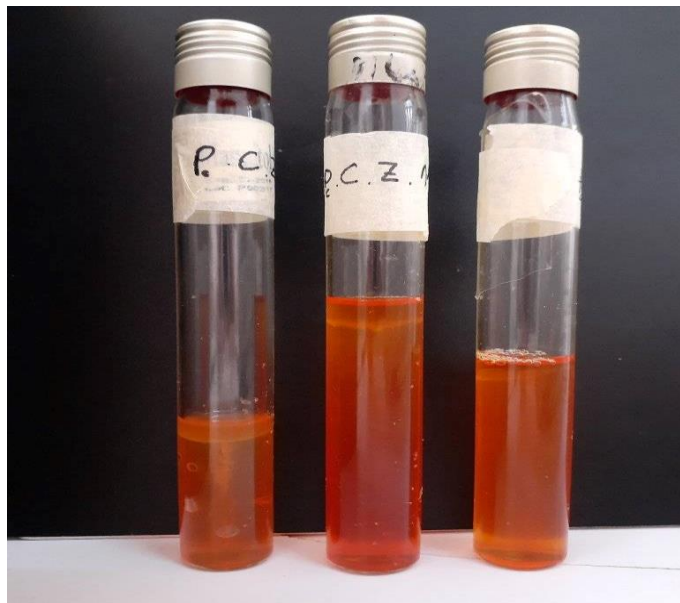


Figure 15: Test de mobilité sur milieu Mannitol Mobilité des isolats (CZ11 ,CZ112 et CZ12)

Tableau 01 : Caractérisation phénotypique et biochimique des bactéries

Souche	Forme	Gram	Type respiratoire	Catalase	Oxydase	Mannitol
D Y 3	Coccobacille	-	Aérobic strict	+	+	+
D Y 5	Bacille	-	Aéroanaérobic facultative	+	+	-
D Y 6	Coccobacille	-	Aéroanaérobic facultative	+	+	-
D Y 7	Bacille	-	Aérobic strict	+	+	-
D Y 8	Bacille	-	Aérobic strict	+	+	-
D Y 9	Bacille	-	Aérobic strict	+	+	-
C Y 10	Bacille	-	Aéroanaérobic facultative	+	+	-
C Z 111	Bacille	-	Aérobic strict	+	+	+
C Z 112	Bacille	+	Aéroanaérobic facultative	+	+	-
C Z 12	Bacille	-	Aéroanaérobic facultative	+	+	-
C Z 13	Bacille	-	Aérobic strict	+	-	-
C Z 14	Bacille	-	Aérobic strict	+	+	-
C Z 15	Bacille	-	Aérobic strict	+	-	+

III.5. Test des activités PGP

III.5.1. Test de solubilisation du phosphate

La capacité des isolats bactériens à solubiliser le phosphate inorganique a été étudiée par un test qualitatif sur un milieu gélosé PVK contenant le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphore, par la mesure de l'efficacité de solubilisation en fonction de différents diamètres des halos transparents autour des colonies (Figure 15).

Selon les résultats obtenus, la majorité des souches bactériennes ont montré une capacité de solubilisation du phosphate variables, seules deux souches bactériennes (CY10, C Z 112) ont eu une réponse négative vis-à-vis de caractère.



Figure 16 : solubilisation du phosphate par des isolat bactériens (D Y 3 ,DY7 ,DY8) sur milieu PVK

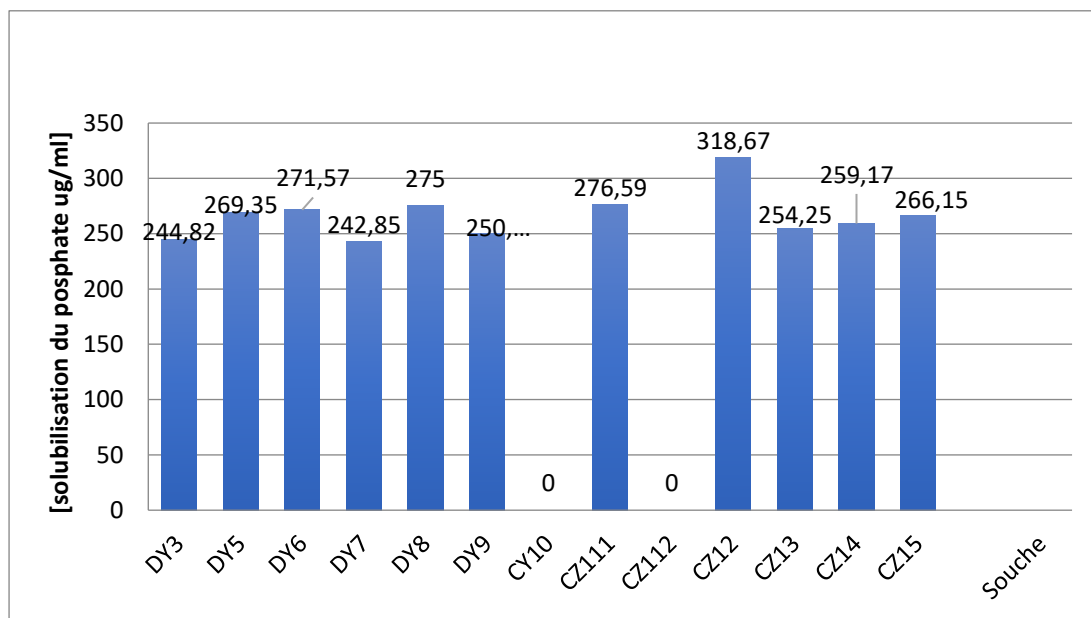


Figure 17 : Concentration du phosphate libéré par les souches bactériennes par solubilisation du phosphate inorganique

Chapitre III : Résultats et Discussion

La quantité de phosphore soluble libérée par les isolats bactériens dans le milieu de culture varie entre 0 à 318,67 µg/ml. La solubilisation maximale a été observée chez l'isolat DY5, DY6, DY8, CZ111 et CZ12 avec des concentrations de phosphore libéré variable entre 269,35 et 318,6 µg/ml respectivement. L'isolats CZ13, CZ14 et CZ15 ont provoqué une solubilisation moyenne du phosphate allant 254,2 jusqu'à 266,15 µg/ml. La solubilisation minimale a été observée chez l'isolats DY3, DY7 et DY9 avec valeurs qui varient entre 242,85 et 250,33. Les résultats obtenus montrent une régression non significative $P = 0,94777$

Les résultats obtenus varient avec les résultats obtenus par (Beulah et al. 2018) avec des valeurs allant $8,98 \pm 1,25$ jusqu'à $15,98 \pm 2,12$

III.5.2 Fixation d'azote

La fixation d'azote atmosphérique a été évaluée qualitativement par la technique de réduction de l'acétylène. Tous les isolats ont été testés positifs par le changement de la couleur du milieu de croissance du vert au bleu clair (figure 17).

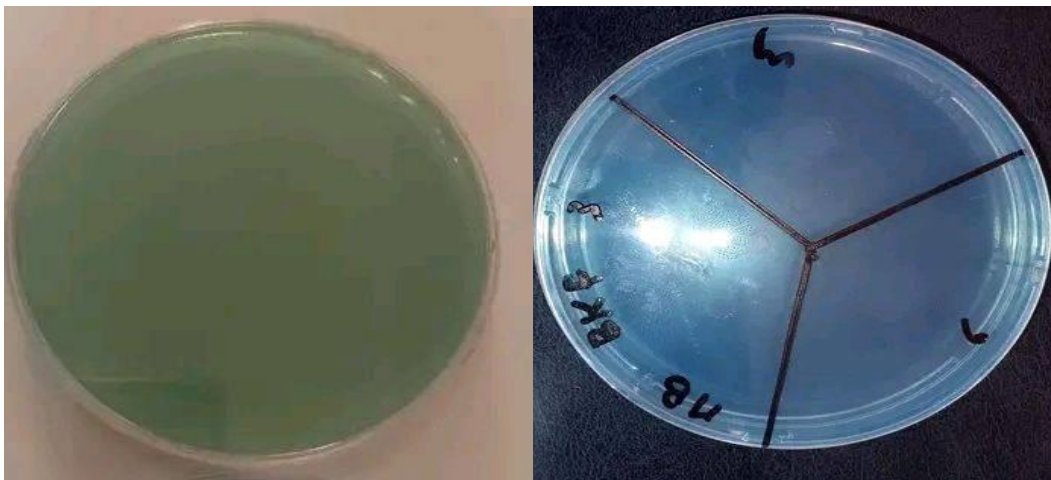


Figure 18 : fixation d'azote des isolats bactériens (DY3, DY5, DY6) par rapport à un témoin.

La fixation d'azote est une propriété importante des PGPR qui influence considérablement la croissance des plantes. Elle est considérée comme l'un des principaux mécanismes directs par lequel la plante bénéficie de l'azote atmosphérique à travers l'association microbienne (Dobereiner et Day, 1976). Les souches bactériennes fixatrices d'azote telles que *Pseudomonas* et *Bacillus* présentent un grand intérêt dans le domaine de la fixation d'azote (Cakmakci et al., 2007). Les travaux de (Lwin et al. 2012) ont montré que des isolats rhizosphériques identifiés comme *Serratia spp.* et *Bacillus spp.* avaient une grande capacité à

Chapitre III : Résultats et Discussion

fixer l'azote sur milieu G-NFM solide avec le BTB comme indicateur coloré (Hongrattipun et al. 2014; Habib et al, 2016) .

III.5.3. Production d'HCN

Tous les isolats étaient trouvés négatifs pour la production d'HCN du fait que le changement de la couleur n'a pas été observé par rapport au témoin. Le résultat est donc négatif, car le milieu est dépourvu de la présence d'HCN.



Figure19 : Production d'HCN par isolat (CZ15) résultat négatif.

Ces résultats obtenus se concordent avec les travaux rapportés par (Azadeh et al. 2012) ,par contre d'autres auteurs ont rapporté une réponse positive pour la production d'HCN (Chunxia et al., 2000).

III.5.4. Production d'AIA

Pour l'évaluation qualitative de l'AIA, tous les isolats ont affiché un changement de couleur allant du rose clair au rouge, après l'addition du réactif de Salkowski, indiquant un résultat positif pour AIA (tableau 02).

Les isolats DY8 ,DY7 et CZ13 ont présenté des taux de production d'AIA les plus élevés avec des valeurs d'AIA allant de 26,16 jusqu'à 36,35 $\mu\text{g/ml}$, des taux de production d'AIA moyennes ont été observées chez les trois isolats DY6 ;CZ111 et CZ12 avec des valeurs d'AIA allant de 11.06 Jusqu'à 15.68 $\mu\text{g/ml}$, les isolats DY3 ,DY5,DY7,CY10,CZ112,CZ14 et CZ15 ont présenté des taux de production d'AIA faibles avec valeurs d'AIA allant de 6,31 jusqu'à 8,69 $\mu\text{g/ml}$.

Le traitement statistique des résultats obtenu a démontré un effet hautement significatif ($P = 0,00289$) de la nature de la souche bactérienne sur la production de l'acide.

En effet selon la littérature la production de l'AIA est très commune entre les microorganismes de la rhizosphère ; D'après (Zakharova et al. 1999), environ 80% des

Chapitre III : Résultats et Discussion

bactéries rhizosphériques sont capables de produire cette phytohormone. Au niveau de la rhizosphère, la production de l'AIA par les microorganismes est effectuée à partir des exsudats racinaires. Selon les niveaux de production de l'AIA, nos résultats sont proches aux résultats obtenus par (Agueniou et Zeggaghz.2017) et inférieurs aux ceux obtenus par (Mezaache, 2012) qui ont noté un intervalle de production de 31.5 à 57.5µg/ml en analysant la production chez différentes espèces de *Pseudomonas* sp.

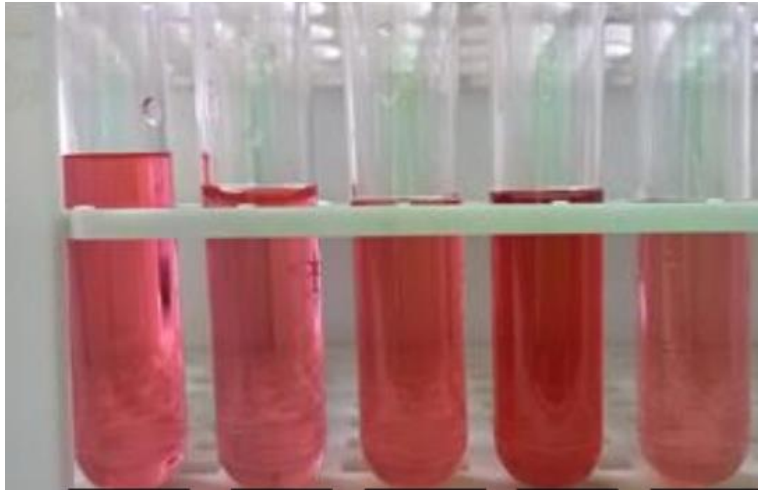


Figure 20 : production d'AIA par isolats bactériens

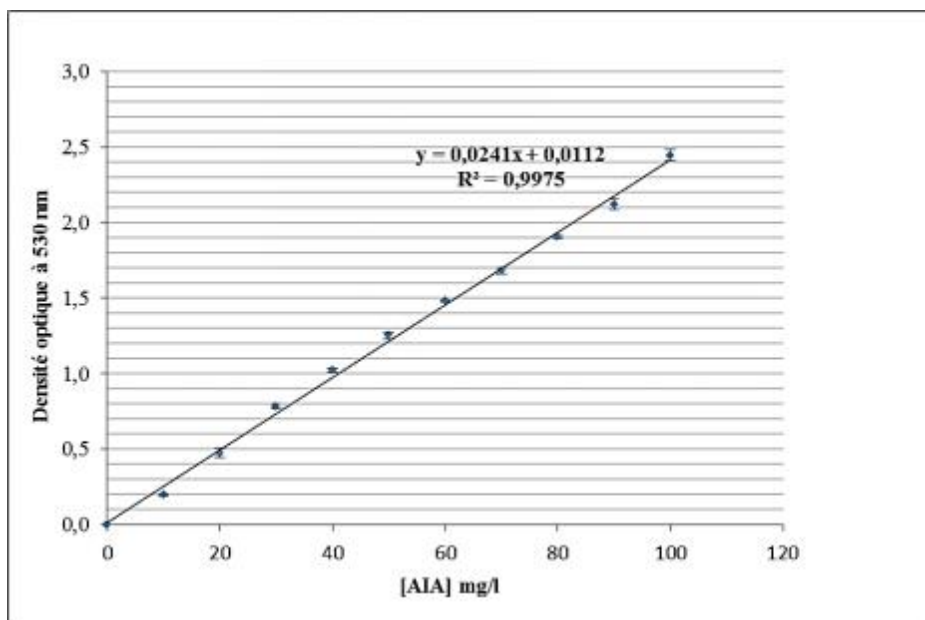


Figure 21: Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA (Hamoum .2022).

Chapitre III : Résultats et Discussion

Tableau 02 : Résultats et analyse statistiques de la production d'AIA , solubilisation du phosphate et du zinc ,fixation d'azote et production HCN par des isolats testés.

Souche	Acide Indole Acétique	ES P	ES Z	Fixation d'azote	HCN
D Y 3	7,31 ^j ± 0,09	244,82 ^e ± 6,53	303 ^a ± 6,08	+	-
D Y 5	7,59 ⁱ ± 0,04	269,35 ^b ± 2,62	298 ^a ± 8,19	+	-
D Y 6	11,06 ^f ± 0,06	271,57 ^b ± 3,35	285,27 ^b ± 4,97	+	-
D Y 7	6,31 ^k ± 0,09	242,85 ^e ± 3,15	51 ^g ± 2,65	+	-
D Y 8	36,35 ^a ± 0,06	275 ^b ± 5	226,59 ^e ± 4,29	+	-
D Y 9	26,16 ^c ± 0,06	250,33 ^{d e} ± 3,51	209,03 ^f ± 5	+	-
C Y 10	8,25 ^h ± 0,42	0	0	+	-
C Z 111	15,68 ^d ± 0,04	276,59 ^b ± 4,13	231 ^e ± 3,6	+	-
C Z 112	8,69 ^g ± 0,06	0	0	+	-
C Z 12	11,61 ^e ± 0,04	318,67 ^a ± 8,08	235,83 ^{d e} ± 5,2	+	-
C Z 13	31,28 ^b ± 0,04	254,25 ^d ± 5,52	255,05 ^c ± 4,22	+	-
C Z 14	8,29 ^h ± 0,04	259,17 ^{c d} ± 3,82	240,33 ^d ± 1,53	+	-
C Z 15	7,31 ^j ± 0,06	26 6,15 ^{b c} ± 5,12	256,08 ^c ± 5,63	+	-

Conclusion

Conclusion

Les bactéries solubilisant le zinc, ZSB sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour augmenter la disponibilité du Zn aux plantes par minéralisation du Zn organique du sol et par solubilisation du zinc précipité. Leurs actions permettent de libérer du zinc soluble assimilable par les racines, de manière totalement naturelle. Malgré les grandes recherches, l'utilisation des micro-organismes du sol rhizosphérique reste insuffisante par rapport à l'utilisation des pesticides et des engrais chimiques.

Concernant notre étude, 4 échantillons du sol sont prélevés de la région de la wilaya de Mostaganem (Ouled Boukhatem). Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement de bactéries solubilisant le zinc.

Au cours de ce travail, un isolement et purification des bactéries solubilisant de zinc ont été réalisées. La mise en évidence de l'activité solubilisante de 13 isolats a permis d'enregistrer une grande quantité de zinc allant jusqu'à : 303 µg/ml de zinc libre.

Un total de 13 isolats ont été isolés à partir de la rhizosphère. Elles ont été soumises à une identification préliminaire par des examens macroscopiques et microscopiques et quelques tests biochimiques. Tous les isolats ont été estimés leurs capacités de solubilité du zinc.

Les résultats obtenus dans ces tests montrent que la plupart des souches solubilisent le zinc sur milieu BR. Les résultats varient entre 51 à 303 µg/ml

Au terme de ce travail qui ouvre plusieurs perspectives de recherches, ils seraient intéressantes d'approfondir les investigations en :

- Identifier les souches les plus performantes par exemple : (identification moléculaire par le séquençage de l'ARNr 16S)
- Tester les autres activités PGP avant et après mutation pour détecter les autres améliorations.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- **Ahmad, M. & Kibret, M. (2013).** Mécanismes and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univer-Scien* 26(01): 1-20.
- **Agueniou, F., Zeggagh, H.,** 2017. Effet de la physicochimie des sols sur la diversité phénotypique et fonctionnelle des bactéries telluriques et l'interaction Bactérie-Blé dur. Mémoire de master en Sciences. Université A. MIRA, Bejaia.
- **Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K., Hasnain, S.,** 2008. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 542–547. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x>
- **Antonella Furini,** 2015-Uptake of carbamazepine by rhizomes and endophytic bacteria of *Phragmites australis*, *frontiers in plants sciences*, 83,08,(1-11).
- **Antoun H. and Prévost D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A.Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.
- **Arora NK, Tewari S, Singh S, Lal N, Maheshwari DK. (2012).** PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed.) *Bacteria in agrobiology: Stress management*, pp.239-258.
- **ASHLEY J.T.F.** Adsorption of Cu(II) and Zn(II) by estuarine, riverine and terrestrial humic acids, *Chemosphere*, 1996, Vol.33, No. 11, pp. 2175-2187 .
- **Babalola, O.O. (2010).** Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570.
- **Baca B.E. et Elmerich C. (2007).** Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C., Newton W.E. (Eds). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, Springer, Netherlands. pp. 113-143.
- **Badri, D. V., and Vivanco, J. M. (2009).** Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666-681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- **Barber S.A., Silberbush M.,** 1984. Chapter 4 :Plante morphology and nutrient uptake. In : *Roots, nutrient, water influx and plant growth*. Madison, Etats-Unis, 65-87 .
- **Benaissa, A. (2019).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria A review. 8.
- **Boukhalfa H. and Crumbliss AL. (2002).** Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15: 325–339.

Références bibliographiques

- **Bourrelier P et J Berthelin** 1998. "Contamination des sols par les éléments traces : les risques et leur gestion." Rapport de l'Académie des sciences Ed. Lavoisier, Paris.
- **Coïc Y., et Coppenet M.**, 1989 Les oligo-éléments en agriculture et élevage. INRA. Paris : 113 p.
- **Corbaz R. (1990)**. Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytechniques et universitaires romandes*.
- **Delarras, C. (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- **Dommergues, Y. (1975)**. Pourquoi et comment développer les recherches sur la rhizosphère ? *Bulletin de la Société Botanique de France*, 122(sup2), 7-19. <https://doi.org/10.1080/00378941.1975.10839348>
- **El Zahabym .** Contribution à la définition d'une norme des sites pollués. Elaboration d'une méthodologie pour l'évaluation de la contamination d'un sol par éléments traces, Thèse INPL. Nancy : INPL, 1998, 210p.
- **Emily Claudia Ricci, 2015**. Investigating the role of *Pseudomonas sp.* and *Bacillus sp.* biofilms as plant growth promoting inoculants. McGill university, Montreal. Quebec. Canada.
- **FAO. (2004)**. Utilisations des phosphates naturels pour une agriculture durable .
- **Feix I., Wiart J.** Connaissance et maîtrise des aspects sanitaires de l'épandage des boues d'épuration des collectivités locales. Paris : Ministère de l'agriculture et de la pêche, 1998, 74p.
- **Finney, L.A., et O'halloran, T.V.** 2003. Transition metal speciation in the Cell: insights from the Chemistry of metal ion receptors. *Science* 300, 931-936.
- **Flandrois, J. P., & Chomar, M. (1988)**. L'examen cyto-bactériologique des Urines. *Bactériologie médicale pratique, MEDSI/Mc GRAW-HILL, Paris*.
- **Glick BR. (2012)**. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, Waterloo.
- **Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015)**. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol*. Volume 7(2), 96-102.

Références bibliographiques

- **Haas, D; Defago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonas*. *Natra. Rev. Microb.* 1129.
- **Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. (2005).** Characterization of a Novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* 28(1):66–76.
- **Harman G. E. and Shores M. (2007).** The Mechanisms and Applications of Symbiotic Opportunistic Plant Symbionts. P.131-155. *In* Vurro M. and Gressel J. (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*.
- **Hatira A., Gallali T., ROUILLER J., GUILLET B.** Stabilité et solubilité des complexes formés entre le cuivre, le plomb, le zinc et les acides fulviques. *Science du Sol.*, 1990, Vol. 28, pp. 125-135.
- **Hildebrand D.C., Schroth M.N et Sand D.C.(1988).** *Pseudomonas* spp 60-77. In Shaaad, N.W.E.D *Laboratory guide for identification of plant pathogen bacteria 2 nd .ST. Paluel .Minnostosa.pps.*
- **Hopkins WG. (2003).** *physiologie végétale.* Traduction de la 2^e édition américaine par SERGE R .Ed de Boeck.pp. 309-362.
- **Helluy, S., & Holmes, J.C. (2005).** Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural processes*, 68(3), 205-210.
- **Kajohnpong Dasri 1, Jureporn Kaewharn1, Sungwan Kanso2 and Suphatee Sangchanjiradet, 2014-** Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids, 19, 268-275.
- **Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M., 2009.** Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7, 1–19. Kim J, D.C., 1994. Rees Nitrogenase and Biological nitrogen fixation *Biochemistry*, 33 (), pp. 389–397.
- **Kirdi, B., Zermane, N., 2010.** Rôle des PGPR dans la stimulation de la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites : *Orobanche crenata* Forsk. et *Cuscuta campestris* Yuncker / —Role of PGPR in plant growth promotion and control of the parasitic weeds: *Orobanche crenata* Forsk. and *Cuscuta campestris* Yunckerl.

Références bibliographiques

- **Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA. (2007).** Photoperiodregulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 53(2):159–167.
 - **Kumar, P., Dubey, R.C., 2012.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Curr. Perspect. Appl. Microbiol.* 1, 6–38.
 - **LIU Hui. WU Xiao-Qin. REN Jia-Hong and YE Jian-Ren, 2011-**Isolation and Identification of Phosphobacteria in Poplar Rhizosphere from Different Regions of China, *Pedosphere* 21(1): 90–97.
 - **Loué A., 1993** Oligo-éléments en agriculture. Nathan : SCPA. 210p.
 - **Loué A., 1993.** Oligoéléments en agriculture. Editions Nathan, 577 p.
 - **Loneragan JF (1981)** Distribution and movement of copper in plants. In: Copper in soils and plants. Eds Loneragan JF, Robson AD and Graham RD, Academic Press, pp. 165–187.
 - **Louvel, B.(2010).** Étude en microcosmes de l’effet du ray-grass et de ses exsudats racinaires sur la dissipation des HAP et les communautés bactériennes dégradantes. Université de Nancy. 163
 - **Lugtenberg B., Kamilova F. (2009).** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
 - **Lyunch. J. M.(1990).**éditeur. *The rhizosphere.* Chichester, Royaume-Uni : wiley-interscience.
- Mezaach, S., 2012. Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse doctorat en sciences. Université Ferhat ABBAS Sétif.
- **Martínez-Viveros 1, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo and M.L. Mora. (2010).** Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293 – 319.
 - **Massey HF, Loeffel A (1967)** Species specific variations in Zinc content of corn kernels. *Agron J*, 214-217.
 - **Munees, A., Mulugeta, K., 2013.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. 28 Febr. 2013 1018–3647, 1–20.
 - **Nazir, N., Kamili, A. N., & Shah, D. (2016).** Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth – *A Review.* 8, 14.

Références bibliographiques

- **Nellands, J.B., 1995.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.
- **Ofefp,** 1996. Sols pollues-métaux lourds et plantes bioindicatrices. Documents Environnement n° 58, Sol, Berne, Suisse.
- **Pal K. K. and Gardner B. M. (2006).** Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* : 1-25.
- **Parmar, P., Sindhu, S.S., 2013.** Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *J. Microbiol. Res.* 3, 25–31.
- **Patten CL, Glick BR (2002)** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795–3801.
- **Piano, S; Neyrotti, V; Migheli, Q; Gullino, M.L. (1997).** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis postharvest* rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 11(3) :131-140
- **Pikovskaya, R. I. (1948).** Mobilization of phosphates in soil in connection with the vital activities of some microbial species. *Mikrobiologia.* 17: 362 – 370.
- **Pitter P.** Hydrochimie. Praha : VSCHT 3e édition, 1999, 568 p.
- **Pujic, P., Normand, P. (2009)** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofuture*, 26-29.
- **Qureshi M. A., Ahmad Z. A., Akhtar. N., Iqbal A., Mujeeb F. and Shakir M. A. (2012)** Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(1): 204-210.
- **Reichman SM.** 2002. The responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on copper, Manganese and Zinc, The Australian Minerals & Energy Environment Foundation, Melbourne, 54 p.
- **Reyes, M.E.Q; Rohrbach, K.G; Paull, R.E. (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pine apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2):193-203.
- **Richardson, G.M., Garrett, R., Mitchell, I., Mah-Poulson, M., Hackbarth, T., 2001.** Critical review on natural global and regional emissions of six trace metals to the atmosphere. *Prep. Int. Lead Zinc Res. Organ. Int. Copp. Assoc. Nickel Prod. Environ. Res. Assoc.*
- **Rogers, J.R., Bennett, P.C., Choi, W.J., 1998.** Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *Am. Mineral.* 83, 15321540. Chauhan, J., Tomar, Y., Indrakumar, S.,

Références bibliographiques

- Seema, A., Debarati, A., 2009. Effect of growth hormones on seed germination and seedling growth of black gram and horse gram. *J Am Sci* 5, 79–84.
- **Rossum D. V., Muyotcha A., Verserveld V. W. ., Stouthmer. A. H. and Boogerd F. C. (1994).** Siderophore production by *Bradyrhizobium spp.* Stains nodulating groundnut. *Plant and soil* **163**: 177-187.
 - **Sadeghzadeh, B.,** 2013. A review of zinc nutrition and plant breeding. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 0–0. Doi:10.4067/S0718-95162013005000072.
 - **Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. (2007).** Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34(10):635–64.
 - **Tambasco G, Sauvé S, Cook N, McBride M & Hendershot W. 2000.** Phytoavailability of Cu and Zn to lettuce (*Lactuca sativa*) in contaminated urban soils. *Canadian Journal of Soil Science* 80: 309-317.
 - **Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Zahid M, et al. (2014)** Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum L.*) *World J Microbiol Biotechnol* 30: 719-725.
 - **Tiffin LO (1967)** Translocation of manganese, Iron, Cobalt and Zinc in Tomato. *Plant Physiol*, 42, 1427-1432.
 - **Vallee, B. L. et Falchuk, K. H. (1993).** The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews*, 73(1):79–118.
 - **Van Goor BJ, Wiersma D (1976)** Chemical form of Manganese and Zinc in phloem exudates. *Physiol Plant*, 36, 213-219.
 - **Van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
 - **Weyens N., Monchy S., Vangronsveld J., Taghari. and Lelie D. V. (2010).** Plant-Microbe Partnerships (ed.), *Hand booh of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* p. 547-257.
 - **Zakharova, E.A., Shcherbakov, A.A., Brudnik, V.V., Skripko, N.G., Bulkhin, N.S., Ignatov, V.V., 1999.** Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Eur. J. Biochem.* 259, 572–576. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00033.x>

Annexe

Annexe

Annexe 1 : Milieu de culture : (pour un volume 1L)

1. Composition du milieu BR (Bunt and Rovira):

Glucose.....	10 g
Ammonium ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	0.2 g
Magnésium(MgSO ₄).....	0.2 g
Potassium (Kcl).....	0.2 g
Di potassium hydrogène phosphate (K ₂ HPO ₄).....	0.1 g
ZnO ou Zncl.....	1 g
Agar.....	20 g
pH.....	7

2. Composition du milieu gélose nutritif (GN) :

Peptone.....	1 g
Chlorure sodium (NaCl)....	3 g
Extrait de levure.....	3 g
Extrait de viande	3 g
Agar.....	20 g
Ph.....	7.2

3. Composition du milieu PVK: Pikovskaya (1948) en g/l

Glucose	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
NaCl.	0,2 g
MnSO ₄ .7 H ₂ O.....	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.1 g
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.002 g
Kcl.....	0.2 g
MnSO ₄ 4H ₂ O.....	0.04 g
Extrait de levure.....	0.5 g
Pourpre de bromocrésol.....	0.1 g
Agar.....	20 g
Ph.....	7.2

Annexe

4. Bouillon Luria Bertani LB (g/l)

Peptone.....	10 g
NaCl	10 g
Extrait de levure.....	5 g
pH.....	7.2±0.2

5. Milieu NBRIP :

Glucose	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1g
Kcl.....	0.2 g
Mgcl ₂ 6h ₂ o.....	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2 g
pH.....	7

6. Composition du milieu burk N-fee :

KH ₂ PO ₄	0.4 g
Phosphate dipotassium.....	0.5 g
Chlorure de calcium.....	0.2 g
Sulfate de sodium.....	0.05 g
Sulfate de Mg.7H ₂ O.....	0.1 g
Sulfate de fer.7H ₂ O.....	0.005 g
Molybdatte sodium.....	0.003 g
Agar.....	15 g

Annexe

Annexe 2 : Analyse de variance des paramètres étudiés :

Zinc :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	422087,5	38	11107,57				
VAR.FACTEUR 1	421545,6	12	35128,8	1685,437	0		
VAR.RESIDUELLE 1	541,906	26	20,843			4,565	2,29 %

Phosphate :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	373692,4	38	9834,011				
VAR.FACTEUR 1	373169,4	12	31097,45	1545,861	0		
VAR.RESIDUELLE 1	523,031	26	20,117			4,485	1,99 %

Acide Indole Acétique :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	3737,813	38	98,363				
VAR.FACTEUR 1	3737,381	12	311,448	18760,19	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0,432	26	0,017			0,129	0,90%