

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-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

Mlle FEKIR MAROUA

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: Microbiologie appliquée**

THÈME

**La Résistance des *Pseudomonas* au cuivre**

JURY

Président :	Mr Bekada Mohamed Ali	Professeur	U. Tissemsilt
Encadreur :	Mr Djibaoui Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Examineur :	Mr Chadli Rabah	Professeur	U. Mostaganem
Co-encadreur :	Mme Mazari Hibat Errahman	Docteur	U.Mascara

Année universitaire 2020-2021

## *Remerciements*

Avant tous, je tiens à remercier DIEU de m'avoir orienté durant ce travail vers le bon chemin, m'as donnée la force, le courage, la santé, la puissance et la persistance à accomplir ce modeste travail, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Mes remerciements les plus chaleureux à Mr. DJIBAOUI Rachid Professeur à l'université de Mostaganem, pour avoir encadré ce travail, pour ces orientations et sa patience, ainsi que ses suggestions et ses conseils fournis à améliorer la qualité de ce mémoire.

Je tiens à remercier co-encadreur Mme MAZARI Hibat Errahmen, pour son aide précieuse, ses conseils judicieux, ses critiques constructives, son temps et sa patience.

Mes remerciements vont également aux membres du jury, qui ont bien voulu examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Mon vif remerciement je l'attribue à Ma douce Mère qui grâce a elle je suis arriver a finir mon travail , à mes frères MOHAMED, ABD EL WAHAD, et ABD EL KADER ainsi que leurs femmes et enfants, à tous les membres de ma famille FEKIR et SEREND, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

## Table des matières

Résumé.....	4
Liste des abréviations.....	7
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	9
Introduction.....	:

### Partie Bibliographique

#### Chapitre I : Impacte toxicologique du cuivre sur la santé

I.4 Définition des métaux lourds.....	;
I.5. Le cuivre.....	;
I. 4 . Définition du cuivre.....	;
I. 5 . L'origine du cuivre.....	<
I.5 .6.L'utilisation du cuivre.....	<
I.6.Transfert trophique des métaux lourds et ses conséquences.....	<
I.7.Toxicité et maladie liée au cuivre.....	
I.8.Bioremediation des sols polluées par le cuivre.....	

#### Chapitre II : Généralités sur les PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria).

II.4. Généralités sur (PGPR).....	
II.5. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR.....	
II. 4 . Les effets directs.....	
II. 4 . Fixation d'azote.....	

II. 5 . Solubilisation de phosphate.....	
II. 6. Production de sidérophores.....	
II. 7 . Production de phytohormones.....	
II. 7 .a.L'acide L'auxine.....	49
II. 7 .b.L'acide, Les cytokinines et les gibbérellines.....	
II. 7 .c.L'acide L'éthylène.....	
II. 5 .Les effets indirects.....	
II. 4 . Compétition pour l'espace et les nutriments.....	
II. 5 . Antibiose.....	
II. 6 .Effet phytoprotecteur des Sidérophores.....	
II.6.Les mécanismes de tolérance des PGPR au cuivre.....	
II. 4 Stratégies de résistances des Pseudomonas au cuivre.....	

## **Partie Pratique**

### **Chapitre III : Matériel et Méthodes**

III.4. Isolement, purification et l'identification des Pseudomons fluorescents.....	
III.4 . Isolement.....	
III. 5 . Identification.....	
III. 5 . Examens macro et microscopique.....	
a. Examen macroscopique.....	
b. Examen microscopique.....	
III. 5 . Tests biochimiques.....	
a. Recherche de l'oxydase.....	
b. Recherche du Catalase.....	
III. 6 . Mise en culture des Pseudomonas à 7°C et °C.....	
III.5. Test de la résistance des Pseudomonas fluorescents au cuivre.....	

<b>III.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre vis-à-vis les isolats testés.....</b>	.....
<b>III.7. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des Pseudomonas Fluorescents.....</b>	.....

**Chapitre IV : Résultats et Discussion**

<b>IV.4. Isolement et purification des isolats.....</b>	.....
<b>IV.5. Identification des bactéries isolées et purifiées.....</b>	.....
<b>IV. 4 . Examen macroscopique.....</b>	.....
<b>IV. 5 . Examen microscopique.....</b>	.....
<b>IV. 4 . Examen à l'état frais.....</b>	.....
<b>IV. 5 . Coloration de Gram.....</b>	.....
<b>IV. 6 . Test biochimique.....</b>	.....
<b>IV. 4 . Recherche de l'oxydase.....</b>	.....
<b>IV. 5 Recherche de la catalase.....</b>	.....
<b>IV. 7 . Mise en culture des Pseudomonas à 7°C et °C.....</b>	.....
<b>IV.6 Test de la résistance des Pseudomonas fluorescents au cuivre.....</b>	.....
<b>IV.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....</b>	.....
<b>IV.8. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des Pseudomonas fluorescents.....</b>	.....
<b>Conclusion.....</b>	.....
<b>Références bibliographiques.....</b>	.....
<b>Annexes.....</b>	.....

## الملخص

أنواع *Pseudomonas* هي من بين البكتيريا التي تفرز siderophores لتلبية احتياجاتهم الحديد. يتم استيعاب الروابع الجانبية المشحونة عبر الغشاء الخارجي بعد التعلق بمستقبلات محددة. ويمكن استغلال نظام حيازة الحديد هذا للمعادن الثقيلة المختونة بيولوجيا بما في ذلك النحاس.

والهدف من هذا العمل هو عزل وتوصيف البكتيريا من رهيزوسفير نبات العشب البري. تم اختبار 29 عزلة تشبه الزائفة لمقاومة النحاس، تم اختبار هذه البكتيريا من قبل بينيد وميداه (2018) بجرعات مختلفة (0,50؛ 1,2؛ 2,5؛ 3؛ 3؛ 4؛ 4,5 و 5 مليون متر) من كبريتات النحاس ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )، مما يدل على مقاومة النحاس خاصة لعزل K و 14.

يشير تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI) من كبريتات النحاس مقابل العزلات الأكثر كفاءة إلى أن بكتيريا *Pseudomonas* الفلورية (k و 14) يتم تثبيطها بتركيز 1,6 mM.

وتبين الأدلة على تأثير كبريتات النحاس على نمو نوعي السودوموناس الفلوريين المعزولين في الوسيلتين المختلفتين (King B و BN) أن النحاس له تأثير يبطئ النمو.

**الكلمات المفتاحية :** *Pseudomonas fluorescents* , المقاومة , CMI , جذور النبات

## Résumé

Les espèces de *Pseudomonas* sont parmi les bactéries qui sécrètent des sidérophores pour subvenir à leurs besoins en fer. Les sidérophores chargés sont internalisés à travers la membrane externe après fixation sur récepteurs spécifiques. Ce système d'acquisition de fer peut être exploité pour bioaccumuler les métaux lourds dont le cuivre.

Ce travail, a pour objectif d'isolement et de caractérisation des bactéries à partir de la rhizosphère d'une plante graminée sauvage. Isolats appartenant au genre *Pseudomonas* ont été soumis à un test de résistance au cuivre, ces bactéries ont été testées par **Benaïed et Meddah** ( ) à différentes doses ( ; 5 ; 8 ; 6 ; 8 ; 7 ; 8 et 8 mM) de sulfates de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), montrant une résistance au cuivre surtout pour les isolats K et .

La Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de sulfate de cuivre vis-à-vis les isolats les plus performantes indique que les deux bactéries de *Pseudomonas* fluorescent (k et ) sont inhibées par la concentration de 9 mM.

La mise en évidence de l'effet de sulfate de cuivre sur la croissance des deux espèces de *Pseudomonas* fluorescent isolées dans les deux milieux différents (King B et BN) montre que le cuivre a un effet ralentisseur de croissance.

**Mots clé :** *Pseudomonas* fluorescent, résistance, CMI, rhizosphère.

## **Abstract**

Pseudomonas species are among the bacteria that secrete siderophores to meet their iron needs. Charged siderophores are internalized across the outer membrane after attachment to specific receptors. This iron acquisition system can be exploited for bioaccumulated heavy metals including copper.

The objective of this work is to isolate and characterize bacteria from the rhizosphere of a wild grass plant. Pseudomonas-like isolates were tested for resistance to copper, these bacteria were tested by **Benaied and Meddah** ( ) at different doses ( ; 5 ; 8 ; 6; 6; 7; 8 and 8 mM) of copper sulphates (CuSO<sub>7</sub>, 8H<sub>5</sub>O), showing resistance to copper especially for isolates K and .

The Determination of the minimum inhibitory concentration (CMI) of copper sulphate vis-à-vis the most efficient isolates indicates that the two fluorescent Pseudomonas bacteria (k and ) are inhibited by the concentration of 9 mM.

The evidence of the effect of copper sulphate on the growth of the two fluorescent Pseudomonas species isolated in the two different mediums (King B and BN) shows that copper has a growth-slowing effect.

**Key words:** fluorescent pseudomonas, resistance, MIC, rhizosphere.



## Liste des abréviations

Cu:..... le cuivre

CuFeS<sub>5</sub> :..... la chalcopyrite

Cu<sub>5</sub>S :..... la chalcocite

Cu<sub>6</sub>FeS<sub>7</sub> :..... la bornite

Gpx :..... Glutathion-peroxydase

CRP :..... protéines-C réactives

ROS :..... espèces réactives d'oxygène

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

P : ..... phosphore

ACC: ..... carboxilate-4-aminicyclopropane

ISR: ..... indiced Systémique Résistance

IAA: ..... Indole acetic acid

DAPG: ..... d'acétyle phloroglicinol

GN:..... gélose nutritive

CuSO<sub>7</sub>, 8H<sub>5</sub>O : .....sulfate de cuivre pentahydraté

FAO :..... Foof Agriculture organisation

## Liste des figures

Figure . Mécanismes de résistances bactériens aux métaux

Figure . Aspect macroscopique de *Pseudomonas fluorescent* sur gélose King B, isolé à partir du sol rhizosphérique.

Figure . Aspect microscopique de *Pseudomonas fluorescent* (X 3 ).

## Liste des tableaux

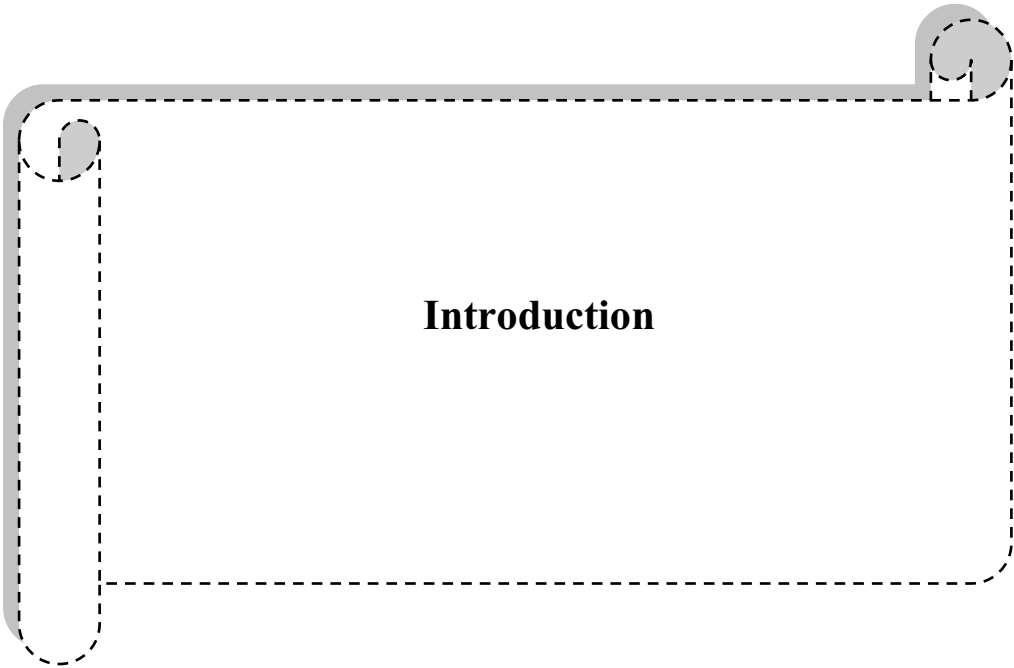
Tableau . Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlées par les PGPR .

Tableau . Concentration finale de sulfate de cuivre.

Tableau . Caractères morphologique, biochimique des Pseudomonas fluorescents

Tableau . Effet du sulfate de cuivre sur la croissance des isolats de Pseudomonas fluorescents

Tableau . Concentration minimale inhibitrice du cuivre vis-à-vis les deux isolats de Pseudomonas fluorescents étudiés.



## **Introduction**

## Introduction

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulées, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO<sub>3</sub> comme accepteur d'électrons. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (**Haas and Keel** ). Cette grande rhizo-compétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (**Chin-A-Woeng et al.** ).

De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (**Chin-A-Woeng et al.** . **Fenton et al.** ). Les *Pseudomonas* inhibent les microorganismes phytopathogènes ou délétères, Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante .

Les *Pseudomonas* contribuent aussi à la bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds. Parmi ces derniers nous avons choisis le cuivre sachant que ce métal est l'un des métaux lourds les plus abondants sur notre surface terrestre

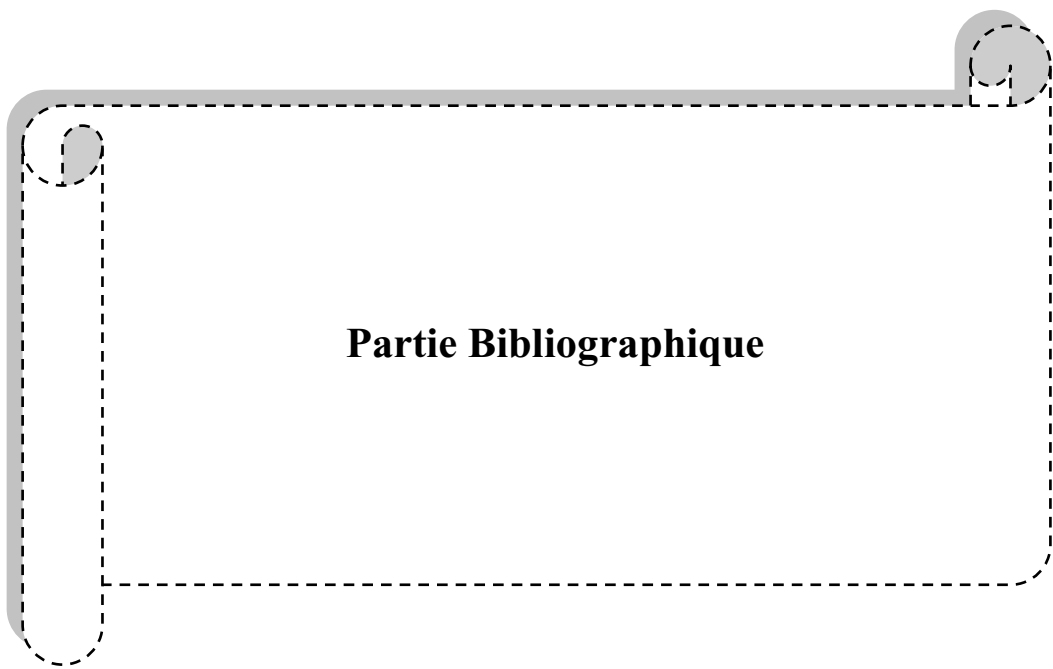
Dans ce travail nous avons pris l'étude présentée par **Benaïed et Meddah** ( ) comme **modèle** afin de pouvoir comprendre l'effet de la bioremédiation du sol pollué par le cuivre . dans Cette étude les étapes suivantes ont été effectuées.#

0 Isolement des *Pseudomonas fluorescens* à partir du sol rhizosphérique

- Mise en évidence du test de la résistance des *Pseudomonas fluorescens* au cuivre

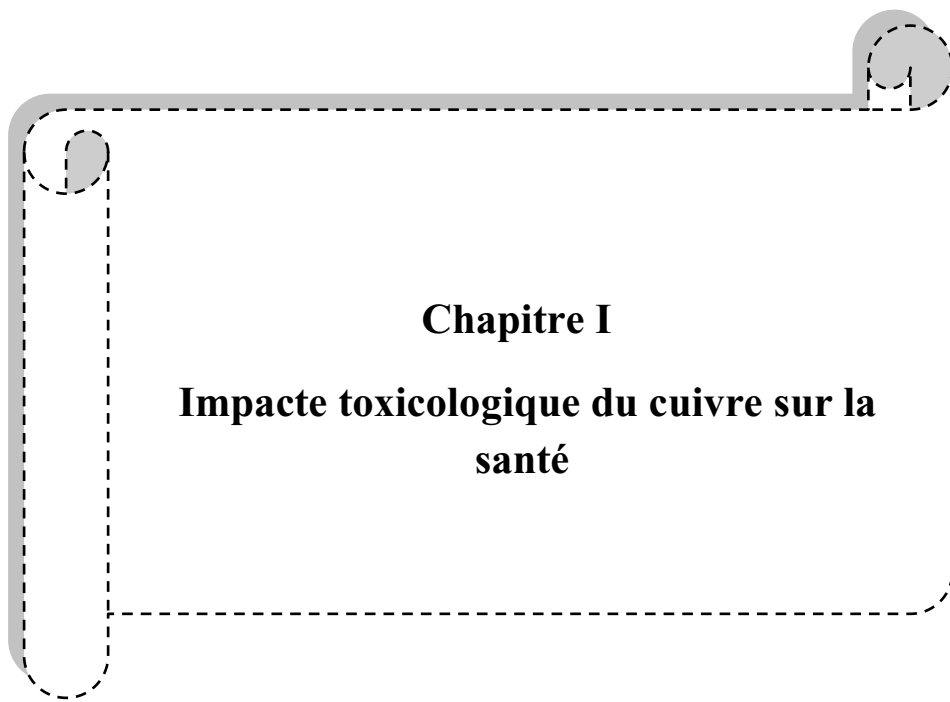
0 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre vis-à-vis les isolats testés.

0 Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des deux espèces de *Pseudomonas fluorescens* les plus résistantes



**Partie Bibliographique**

#



## **Chapitre I**

### **Impacte toxicologique du cuivre sur la santé**

## Chapitre I : Impacte toxicologique du cuivre sur la santé

### **I.4.Définition des Métaux lourds :**

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux.

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 20 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 8 g.cm<sup>3</sup>.

D'un autre point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques (**Belabed .** ).

### **I.5.Le cuivre :**

#### **I. 4 .Définition du cuivre :**

Le cuivre est un métal rougeâtre de configuration électronique [Ar] 6d<sup>9</sup> 7s<sup>1</sup>, de numéro atomique 29. Il est situé dans la colonne 11 et sur la 4<sup>ème</sup> période de la classification périodique de Mendeleïev. Le cuivre présente des degrés d'oxydation pour lesquels les sous couches «d» sont incomplètes et est donc un métal de transition (**Pujol,** ).

Ce métal peut être présent sous diverses formes minérales dans l'environnement. Il est abondamment utilisé dans les domaines industriels et domestiques. Ce métal peut être détecté dans les eaux de surface, les eaux souterraines ou l'eau de mer. Sa présence fait suite à l'érosion du sol ou des rochers, de la dislocation du sol, ou encore à des activités anthropogéniques, telle que l'activité minière ou agricole, et les effluents provenant des usines. Depuis longtemps, le cuivre métallique est utilisé dans la fabrication de matériaux d'armement, de monnaies, de fils électriques, et de tuyauterie (**Pascale. et François,** ).

Le cuivre est un élément essentiel aux plantes et animaux. Il fait partie du groupe IB tout comme l'argent et l'or. Le cuivre se situe dans des minéraux primaires et secondaires. On peut le retrouver sous sa forme métallique mais la majorité du cuivre se retrouve dans des minéraux primaires sulfurés comme la chalcopirite (CuFeS<sub>2</sub>), la chalcocite (Cu<sub>2</sub>S), la bornite



( $\text{Cu}_6\text{FeS}_7$ ) et la tétrahédrite ( $(\text{Cu}_6\text{FeS}_7)$ ). Le cuivre est également présent dans des minéraux secondaires tels que la cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), la malachite ( $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ ) et l'azurite ( $\text{Cu}_3(\text{OH})_6(\text{CO}_3)_2$ ) (Chaperon, 1998).

### **I. 5.L'origine du cuivre :**

Le cuivre est naturellement présent dans la croûte terrestre. Sa teneur moyenne dans la partie supérieure de l'écorce continentale est évaluée à  $10 \mu\text{g.g}^{-1}$  (Wedepohl, 1985). Lors du processus de pédogénèse, l'altération de la roche mère puis des minéraux primaires et secondaires va alimenter la solution du sol en éléments constitutifs. Ainsi, les minéraux dont la structure contient du cuivre le libèreront lors de leur altération. C'est entre autres le cas de certains sulfures (chalcopyrite, bornite), oxydes (cuprite, ténorite), carbonates (malachite, azurite), silicates (chrysocolle) et chlorures (tolbachite). La teneur naturelle en cuivre d'un sol dépend fortement de la nature de sa roche mère (Besnard, 1998; Adriano, 1998).

### **I.5 .6.L'utilisation du cuivre :**

Le cuivre est connu, extrait et utilisé par les humains depuis plus de 3000 ans. C'est probablement le deuxième élément le plus important, après le fer, en ce qui concerne son utilité pour les humains. Les tuyaux de cuivre sont très répandus en plomberie, particulièrement pour les systèmes d'alimentation en eau domestique. Le cuivre est utilisé pour la production de fil électrique et dans la fabrication d'alliages comme le laiton et le bronze. Il est aussi employé pour l'électro-placage, en photographie, pour les toitures, comme catalyseur dans l'industrie chimique et pour l'élimination des mercaptans dans le raffinage du pétrole. Le cuivre est beaucoup utilisé dans les préparations de pesticides comme fongicide et comme agent antimicrobien, en particulier pour le traitement du bois et des sources d'approvisionnement en eau potable et en eau destinée à des fins récréatives (Massy *et al.*, 1998).

### **I.6.Transfert trophique des métaux lourds et ses conséquences :**

Le transfert des métaux lourds par des niveaux trophiques a suscité des inquiétudes l'augmentation possible de ces toxines dans la chaîne alimentaire humaine. L'introduction de

contaminants dans l'environnement, et donc dans la chaîne alimentaire, peuvent se produire sources anthropologiques. Les métaux lourds sont situés dans les veines du sol, qui sont extraits et purifiés par des procédés d'extraction et de fusion. Ces activités ont introduit les métaux dans l'environnement, ce qui conduit à la possibilité de leur l'accumulation dans les plantes et les métaux se transfèrent par les niveaux trophiques.

Au cours de recherche actuelle, a été divisée en études plus petites : le la dispersion des métaux lourds à travers l'environnement terrestre, l'accumulation de métaux lourds dans les plantes et l'accumulation de métaux lourds chez l'homme et d'autres animaux (**Mitchell,** ).

### **I.7.Toxicité et maladie liée au cuivre :**

La toxicité de cuivre on générale, L'inhalation excessive de poussières contenant du cuivre peut mener à des irritations nasales et oculaires ainsi que des maux de tête, des nausées et des diarrhées. En ce qui concerne l'ingestion, les symptômes sont principalement liés au système gastro-intestinal comme des douleurs abdominales et des vomissements. L'ingestion d'eau dont la teneur excède 6 mg Cu/L entraîne l'apparition de nécroses hépatiques. La toxicité hépatique serait expliquée par la saturation des lysosomes où est complexé le cuivre avec des métallothionéines. Ces organites ne pouvant en métaboliser davantage, l'excès de cuivre migrerait au noyau où il causerait des dommages oxydatifs accrus. Il faut signaler ici que les études de toxicité du cuivre ont été effectuées chez des animaux de laboratoire et que l'applicabilité des données obtenues pour l'homme n'est pas connue .Son potentiel cancérigène a été classé dans le groupe 6 puisque les données pour l'humain et l'animal sont absentes ou inadéquates(**Robert-Nadeau,** ).

Le Cuivre, de par ses deux Espèces chimiques oxydo- réductrices ( $\text{Cu}^+ / \text{Cu}^{++}$ ) est considéré comme un Oligoélément essentiel important . Mais, il peut, lorsqu'il est absorbé sous forme ionisée hydrosoluble en excès, constituer un Toxique important surtout pour le Foie, provoquant une baisse de la Glutathion-péroxydase (Gpx), Enzyme de détoxification du Foie, puis une Stéatose et enfin une Cirrhose.

Plus globalement une Intoxication à long terme liée à un apport excessif de Cuivre sous forme ionisée hydrosoluble entraîne, selon les personnes : - un Processus inflammatoire (augmentation des protéines-C réactives CRP), une Action hémolytique, - des Irritations du

Tube digestif, - aussi une atteinte du Système nerveux central et périphérique Maladie d'Alzheimer, sclérose en plaque... ( **Picot**, ).

Le mécanisme par lequel le cuivre est toxique pour les cellules a généralement été attribué aux propriétés redox du cuivre, entraînant des dommages oxydatifs mortels aux cellules. Cependant, des travaux récents ont remis ce concept en question et on croit actuellement que la principale action toxique du cuivre est le remplacement du cofacteur de fer dans les protéines des grappes de fer-soufre. D'autres mécanismes de toxicité peuvent encore être à l'œuvre dans diverses mesures, pour ainsi dire en arrière-plan, selon les conditions environnementales et de croissance (**Soliz**, ).

Dans les plantes, Cu est un cofacteur essentiel de nombreuses métalloprotéines et est impliqué dans plusieurs processus biochimiques et physiologiques. Cependant, l'excès de Cu induit un stress oxydatif à l'intérieur des plantes grâce à une production accrue d'espèces réactives d'oxygène (ROS). En raison de sa double nature (essentielle et d'une toxicité potentielle), ce métal implique un réseau complexe d'absorption, de séquestration et de transport, d'essentialité, de toxicité et de désintoxication à l'intérieur des plantes (**Shabbir et al.**, ).

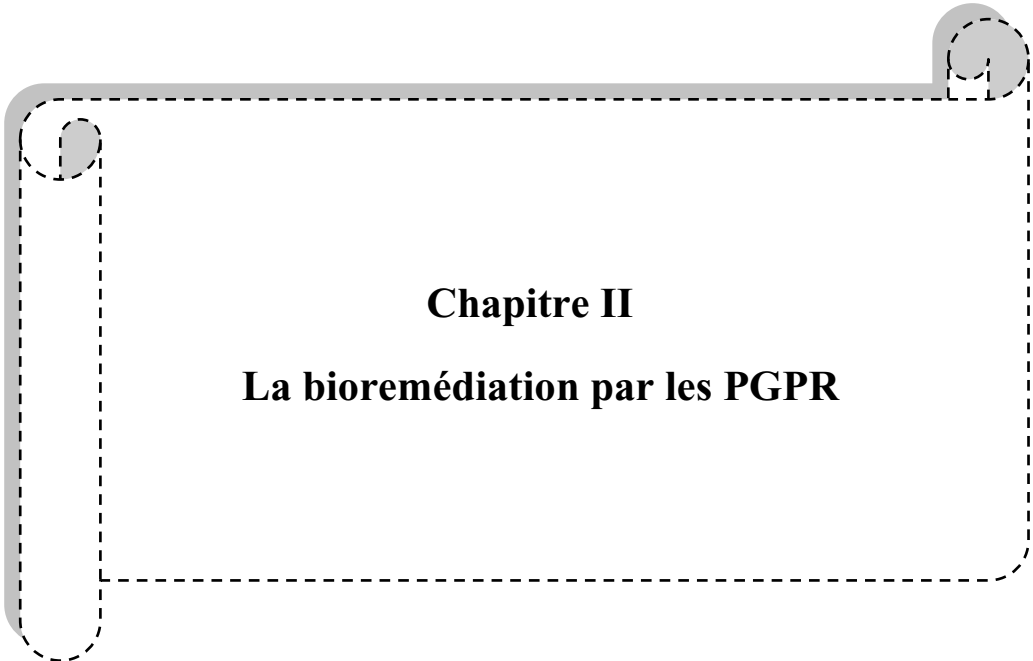
### **1.8. Bioremédiation des sols pollués par le cuivre :**

La Bioremédiation désigne l'ensemble des techniques utilisées pour dépolluer un site naturel.

Les sols pollués par les métaux lourds sont devenus communs dans le monde entier en raison de l'augmentation des activités géologiques et anthropiques. Les plantes qui poussent sur ces sols montrent une réduction de la croissance, de la performance et du rendement. La bioremédiation est une méthode efficace de traitement des sols pollués par les métaux lourds. Il s'agit d'une méthode largement acceptée qui est principalement effectuée in situ; par conséquent, il convient à l'établissement/rétablissement des cultures sur les sols traités. Les micro-organismes et les plantes utilisent différents mécanismes de biorestauration des sols pollués. L'utilisation de plantes pour le traitement des sols pollués est une approche plus courante dans la bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds (**Chibuiké et Obiora**, ).

Bien que le cuivre (Cu) soit un micro-nutriment essentiel pour tous les organismes vivants, il peut être toxique à de faibles concentrations. Ses effets bénéfiques ne sont donc observés que

pour une gamme étroite de concentrations. Les activités anthropiques telles que la pulvérisation de fongicides et l'exploitation minière ont entraîné la contamination par le cuivre, des compartiments environnementaux (sol, eau et sédiments) à des niveaux dépassant parfois le seuil de toxicité. Cet examen porte sur la bioremédiation des sols contaminés par le cuivre. Les mécanismes par lesquels les micro-organismes, et en particulier les bactéries, peuvent mobiliser ou immobiliser le Cu dans les sols sont décrits et les stratégies de bioremédiation correspondantes - de différents niveaux de maturité - sont abordées: (i) bioleaching comme un processus pour la récupération ex situ de Cu à partir de solides cu-bearing, (ii) bioimmobilisation pour limiter la lixiviation in situ de Cu dans les eaux souterraines et (iii) phytoextraction assistée par bioaugmentation comme un processus novateur pour l'amélioration in situ de Cu enlèvement du sol (**Cornu *et al.*,**).



**Chapitre II**  
**La bioremédiation par les PGPR**

## Chapitre II : La bioremédiation par les PGPR

### **II.4.Généralités sur (PGPR) :**

Le terme PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) a été introduit par (**Kloepper et Schroth .** ).

Elles désignent les bactéries qui colonisent les racines des plantes et favorisent leurs croissance (**Beneduzi , Ambrosini and Luciane.** ). Les PGPR sont retrouvés dans la rhizosphère, à la surface des racines ou encore en association avec les racines dû à la richesse des nutriments disponibles.

La rhizosphère peut être définie comme la zone du sol qui entoure les racines. La rhizosphère est une zone riche en nutriments pour les bactéries principalement grâce aux exsudats des racines(**Chibani.** ).

Plusieurs souches bactériennes ont été identifiées comme étant PGPR, notamment des bactéries appartenant aux genres Bacillus, Azospirillum, Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas, Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium, Allorhizobium, Sinorhizobium et Mesorhizobium . Parmi ceux-ci, les bactéries appartenant au genre Bacillus et Pseudomonas ssp sont prédominantes (**Lauriane.** ).

Les Pseudomonas ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes .Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux pathovars de Pseudomonas syringae qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes (**Höfte et de Vos.** ).

Néanmoins, d'autres espèces de Pseudomonas sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui promouvoient la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'action de ces Pseudomonas est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites

secondaires et à induire l'ISR induced systemic resistance chez les plantes (**Mezaache.** ).

## **II.5. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les 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.** ). 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.** ).

Les effets 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.** ).

Les effets 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.** ).

## **II. 4 .Les effets directs**

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

### **II. 4 .La fixation de l'azote**

L'azote se trouve fréquemment sous forme gazeuse (N<sub>2</sub>), 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.** ; **ARORA et al.** ). 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.** ; **ARORA et al.** ). 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 ammoniaque 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.** ).

## **II. 5 .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.,** ). Le phosphore est absorbé 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.** ).

## **II. 6.La production des sidérophores**

Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (**NEILANDS.** ). Certains PGPR produisent des sidérophores, composés de faibles poids moléculaire, généralement inférieurs à 4 kDa contenant des groupements fonctionnels capables de capter le fer en le rendant assimilable par les plantes (**KIRDI et ZERMANE.** ).

Les sidérophores (sidéros = fer ; phoros = transport) (**ROSSUM et al.** ) 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 Fe<sup>6+</sup>. Ces complexes restent en solution et augmentent de ce fait la diffusion du fer sur la surface de cellules. Presque 3 structures de sidérophore sont connues jusqu'ici, qui sont produites par des bactéries, des mycètes et des plantes (**BOUKHALFA et CRUMBLISS.** ).



## **II. 7. 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 acétique : auxines), l'acide gibbérellique et les cytokinines. 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. ; BACA et ELMERICH. ; KLOPPER et al.5 : ; MARTINEZ-VIVEROS 4 et al. ).

### **II. 7 .a.L'acide L'auxine**

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. ; AHMAD et KIBRET. ; GUPTA et al. ).

### **II. 7 .b.L'acide, Les cytokinines et les gibbérellines**

Sont aussi des phytohormones impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et la stimulation de la croissance de la partie aérienne (VANLOOM. ). 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. ; SALAMONE et al. ).

### **II. 7 .c.L'acide L'éthylène**

L'éthylène est 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 lourds...etc.), la plante augmente la sécrétion de l'éthylène, ce qui induit l'inhibition de la croissance des racines (SALEEM et al. ).

## **II. 5 .Les effets 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 . ; GLICK. ; TARIQ et al. ).

## **II. 4 .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 (SHAMEER et PRASAD. ). 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. ). 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. ). 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. ). 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. ).

## **II. 5 .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 SHORESH.** ). 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 7-diacétylphloroglucinol (DAPG), cyanure d'hydrogène (HCN) et la phénazine qui agissent comme des facteurs contre l'attaque des pathogènes (**CORBAZ.** ; **BABALOLA.** ; **SHAMEER et PRASAD.** ).

## **II. 6 .Effet phytoprotecteur des Sidérophores**

Les PGPR, notamment du genre *Pseudomonas* sp, sont connues pour leur capacité à produire des sidérophores dans le milieu. La chélation du fer est un phénomène qui participe efficacement à l'antagonisme contre les agents phytopathogènes en réduisant leurs effectifs dans le sol (**KIRDI et ZERMANE.** ).

<p><b>Tableau</b> : Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlées par les PGPR (<b>MARTINEZ-VIVEROSET al.</b> ).</p>
---

Terme	Définition	Mécanisme	Référence
<b>Biofertiliseur</b>	Une suspension contenant des microorganismes vivants qui, une fois appliquée sur des graines, sur une plante ou dans le sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et promeuvent la croissance par l'augmentation de la disponibilité des nutriments principaux pour la plante hôte.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La fixation biologique de l'azote.</li> <li>- L'utilisation des formes insolubles de phosphore.</li> </ul>	Vessey, ; Somers et al. ; Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado. .
<b>Phytostimulateur</b>	Des microorganismes qui ont la capacité de produire ou de changer la concentration des régulateurs de la croissance.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Production des phytohormones</li> <li>- Réduction de la concentration de l'éthylène à l'intérieur de la plante.</li> </ul>	Lugtenberget al., ; Somers et al., .
<b>Biopesticide ou agent de biocontrôle</b>	Des microorganismes qui stimulent la croissance d'une plante par la production des antibiotiques et des métabolites antifongiques.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Production des antibiotiques</li> <li>- Production des enzymes qui dégradent les membranes des cellules fongiques - La compétition- L'ISR et l'ASR</li> </ul>	Vessey, ; Somers et al., ; Chandler et al., .

## **II.6. Les mécanismes de tolérance des PGPR au cuivre**

### **II.6/4 Stratégies de résistances des Pseudomonas au cuivre**

Les bactéries sont capables de réduire, oxyder, séquestrer, volatiliser ou dégrader les polluants. L'exploitation de leurs extraordinaires capacités métaboliques permet d'envisager leur utilisation dans des procédés efficaces et peu coûteux de bioremédiation des eaux ou sols contaminés, notamment par des métaux traces ou des radionucléides toxiques (Ferret. ).

Les bactéries ont développé différentes stratégies de résistances (fig. ) face à des concentrations toxiques de métaux :

#### **a. L'exclusion par perméabilité membranaire**

Les bactéries forment naturellement un « revêtement » de polysaccharides extracellulaires, absorbant les ions métalliques et les empêchant d'interagir avec les composés cellulaires vitaux. *Pseudomonas putida* peut ainsi lier du  $Cd^{5+}$  ajouté dans le milieu de culture, à une concentration de  $8 \text{ mg.L}^{-4}$ .

#### **b. L'efflux actif**

Il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les microorganismes. Ils utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'ion  $Cu^{5+}$  est exporté par un mécanisme impliquant 7 protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme.

#### **c. La séquestration intracellulaire**

Elle permet la séquestration des métaux au sein du cytoplasme pour éviter l'exposition des métaux au sein du cytoplasme afin d'éviter l'exposition des composants cellulaires essentiels aux métaux. Les ions  $Cd^{5+}$ ,  $Cu^{5+}$  et  $Zn^{5+}$  sont les métaux les plus fréquemment séquestrés. Cette stratégie a été mise en évidence chez *Pseudomonas putida* pour le  $Cd^{5+}$  par la synthèse de trois protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines.

#### d. La détoxification enzymatique

Elle fait appel à des gènes impliqués dans la réduction des composés métalliques.

#### e. La réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux

Cette protection se déroule par mutation, sans altérer les fonctions de bases de la cellule.

#### f. La production de sidérophores

En liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité. Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyochéline apparaît plus résistante aux métaux qu'une souche ne synthétisant pas de sidérophore (Ferret. ).

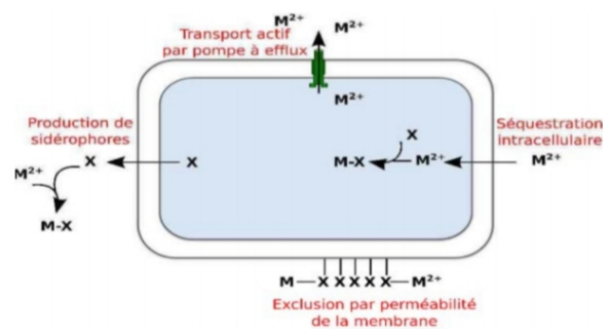
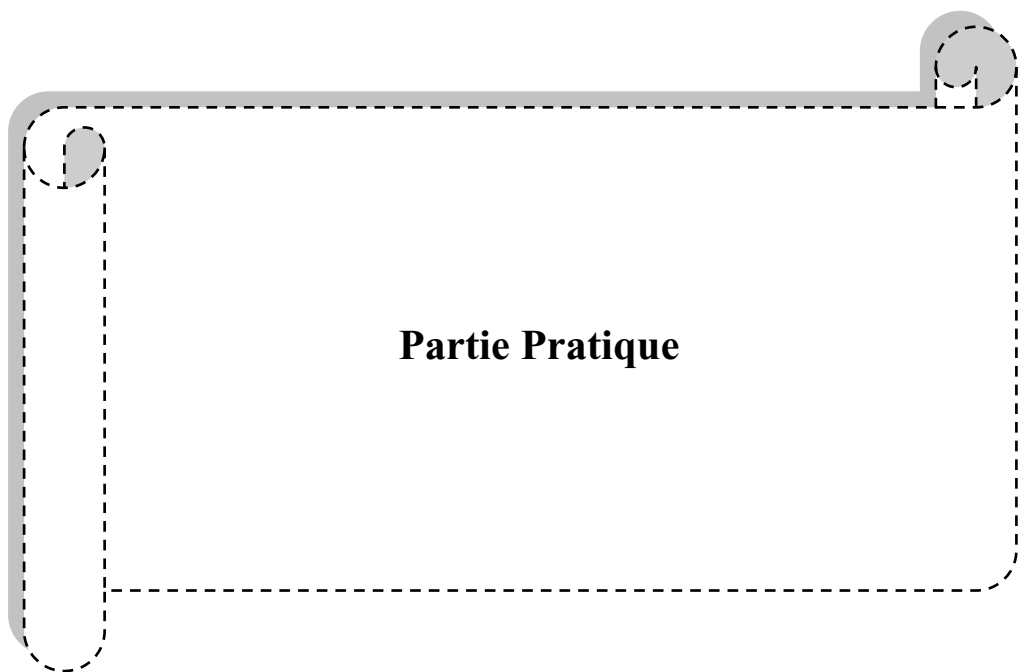


Figure : Mécanismes de résistances bactériens aux métaux (Haferburg, Kotche. ).

X : constituants cellulaires interagissant avec les cations métalliques.

M : cations métalliques .



**Partie Pratique**



**Chapitre III**  
**Matériel et Méthodes**



## Chapitre III : Matériel et Méthodes

Vu les difficultés et les risques de réaliser un travail expérimental au niveau du Laboratoire en raison de la pandémie qui a touché le monde entier et qui est causée par le Coronavirus Covid . Donc pour pouvoir présenter notre mémoire fin d'étude, nous présentons ici une synthèse d'un travail scientifique déjà abordé le sujet concerné (Etude de la tolérance au cuivre chez des isolats de *Pseudomonas fluorescents*. Ce travail est effectué par Benaied et Meddah ( ).

### III.4. Isolement et identification des *Pseudomonas fluorescents*

Les échantillons des racines de graminées sauvages , ont été prélevés au niveau des champs de la vigne de deux région situées à la wilaya de Mostaganem (Oued El Kheir et Sidi Lakhdar).

#### III.4 . Isolement

L'isolement des bactéries du genre *Pseudomonas* fluorescent du sol rhizosphérique à été effectué par la méthode de la suspension - dilution selon (Vidhyasekaran et al. ).

Un échantillon de g de sol adhère aux racines à été suspendu dans ml d'eau physiologique stérile (fig. ) et soumis à une agitation contenue pendant min. Une série de dilution décimale à été réalisée allons de -4 jusqu'au -8 , puis un volume de 4 ml de chacune de ces dilutions à été étalé sur gélose King B, les boites ensemencés sont incubés à °C pendant h.

Après heures d'incubation, les colonies qui caractérisent le genre *Pseudomonas fluorescent* (pigmentation jaune - verdâtre) ont été purifiées sur gélose King B et incubées par la suite à °C pendant h.

La sélection des isolats est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre et l'opacité. Une colonie de chacun des isolats à été prélevé et ensuite purifié par des repiquages successifs selon la méthode de stries (Martinneau . ).

### III. 5 . Identification

#### III. 5. 4. Examens macro et microscopique

##### a. Examen macroscopique

L'examen macroscopique consiste à étudier à l'œil nu l'aspect, la taille, la forme et la couleur des colonies.

## b. Examen microscopique

L'observation microscopique permet d'étudier l'aspect morphologique de la cellule microbienne, donc examiner les bactéries à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivante) et après la coloration de Gram (Annexe ).

### 4/5 . Tests biochimiques

#### a. Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à coloration de Gram négative. Le test de l'oxydase consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxydés un réactif incolore (NN-diméthyle - paraphylène diamine) (Annexe ) en un dérivé rose violacée. Le test est réalisé par mise en contact d'une culture avec un disque d'oxydase.

#### b. Recherche du Catalase

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à coloration de Gram positif. Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact avec le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Annexe ). Les bactéries qui possèdent la catalase, dégradent le peroxyde d'hydrogène en oxygène et dioxygène, visible par la formation des bulles d'air.

## 6 . Croissance des *Pseudomonas* à 7°C et °C

A partir des cultures jeunes, des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture GN ont été ensemencés. La mise en culture a été réalisée à deux températures différentes (7°C et °C) pendant h. La lecture s'effectue par la présence de la culture bactérienne dans les boîtes incubées à 7°C et °C.

### III.5. Test de la résistance des *Pseudomonas fluorescents* au cuivre

Le test de la résistance au cuivre est réalisé au milieu solide selon Andersen et al.( ). La préparation de la série des concentrations consiste à dissoudre des quantités de sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>, 8H<sub>2</sub>O) à raison de ; ; , ; ; ; ; et g dans ml d'eau distillée. Les solutions préparées ont été stérilisées par filtration à l'aide d'un filtre millipore (Millipore Millex-GN. Nylon, μm). Cette méthode de stérilisation est destinée pour les produits thermosensibles vu que la stérilisation par chaleur humide à 3 °C (autoclavage) provoque une complexation du cuivre avec les composants du milieu.

Chaque tube de la série de dilutions a été versé dans un flacon contenant ml de gélose nutritive en surfusion ( °C) préalablement stérilisée à l'autoclave pendant min à 3 °C, après homogénéisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri de mm à raison de ml

par boîte, laissés solidifié, ensuite les boîtes sont ensemencées par un volume de  $\mu\text{l}$  de chacune des suspensions bactériennes standardisées (fig. ). Des boîtes de Pétri ne contient que la gélose nutritive (sans  $\text{CuSO}_7$ ) ont été ensemencés, font l'objet d'un témoin. La densité optique des inoculas préparés est ajustée à - 4 à l'aide d'un spectrophotomètre ( UV/Vis. Spectrophotomètre ; multi- cell changer ; JENWAY) dans une longueur d'onde égal à 8 nm. Les boîtes ensemencées ont été incubées en aérobiose dans une étuve à  $^\circ\text{C}$  pendant h. La lecture des résultats à été effectués par la mise en évidence de la présence ou l'absence de la croissance bactérienne par rapport au témoin.

### III.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre vis-à-vis les isolats testés

La détermination de la concentration minimale inhibitrice de cuivre vis-à-vis les bactéries testées à été réaliser en milieu solide. Les solutions de sulfate de cuivre ont été préparées allons de - g dans ml d'eau distillée. Après filtration des solutions préparées, un volume de ml de chacune d'elles à été versé dans un flacon contenant ml de la gélose nutritive en surfusion ( $^\circ\text{C}$ ). Ensuite versées dans des boîtes de Petri vide à raison de ml par boîte, les concentrations finales en cuivre ou sulfate de cuivre sont de l'ordre de 8 ; 9 ; ; ; ; < 5 mM (tableau ). Des contrôles négatifs (témoins) ne contenant que le milieu gélosé (GN), ont été également préparés. Les boîtes préparées font l'objet d'un ensemencement des bactéries testées à l'aide d'une anse calibrée de  $\mu\text{l}$  (dans la densité des suspensions sont ajusté de la même manière précédente), après incubation à  $^\circ\text{C}$  pendant h, dans des conditions d'aérobiose la concentration minimale inhibitrice (CMI) est représentée par les concentrations des boîtes qui ne contiennent pas de culture.

Tableau : Concentration finale de sulfate de cuivre.

N°	Masse de sulfate de cuivre (g)	Volume d'eau distillée (ml)	[C] de la solution série de dilution (g/10 ml)	[C] finale	
				g/l	mM
1	0,03745	10 ml	0,003745	0,3745	1,5
2	0,0399		0,00399	0,399	1,6
3	0,0424		0,00424	0,424	1,7
4	0,0449		0,00449	0,449	1,8
5	0,0474		0,00474	0,474	1,9
6	0,0499		0,00499	0,499	2
7 (témoin)	0		0	0	0

### **III.7. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des *Pseudomonas* fluorescents**

Les isolats les plus résistants, sont sélectionnés dans ce test de résistance font l'objet d'un test de croissance sur deux milieux liquides différents (king B, Boullion nutritif) avec ou sans cuivre, dont la concentration est égale à 8 mM (la valeur située juste avant celle de la CMI). Deux séries de tubes à essai contenant 5 ml de chaque milieu utilisé, sont par la suiteensemencés par 4ml de la suspension bactérienne standardisées. L'incubation a été effectuée à 37 °C pendant 24 h, et la lecture se fait par la mesure de la densité optique chaque 5 heures. Les tubes sans cuivre représentent les témoins.

#

A decorative graphic of a scroll with a dashed border and three circular tabs at the corners. The text is centered within the scroll.

**Chapitre IV**  
**Résultats et Discussion**

## Chapitre IV : Résultats et Discussion

### IV.4. Isolement et purification des isolats

Dans ce travail nous avons examiné deux échantillons de sol rhizosphérique. Les méthodes de caractérisation bactériologique décrites ont permis une identification préliminaire des isolats des biotopes cités (sol + racines de l'orge des rats « *Hordeum murinum* »). La sélection basée sur la production d'un pigment jaune - vert fluorescent. La production de ce dernier et les caractères macromorphologiques sur le milieu King B, nous ont permis d'obtenir des isolats bactériens.

Les résultats obtenus après une purification, ont permis de retenir des isolats de *Pseudomonas fluorescens* repartis en deux groupes (groupe A ; isolats du site d'Oued El Kheir et groupe B ; isolats du site de Sidi Lakhdar).

### IV.5. Identification des bactéries isolées et purifiées

#### IV. 4 . Examen macroscopique

Sur le milieu gélosé King B la présence des colonies de 9 - 4 mm de diamètre de forme renflée, foncée, circulaire, muqueuse et homogène, avec une pigmentation fluorescente de couleur jaune verdâtre (fig. 1). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées chez les *Pseudomonas fluorescens* par (Idder 2010).

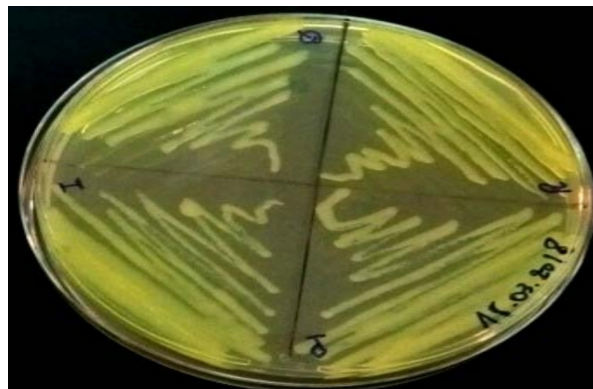


Figure 1 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas fluorescens* sur gélose King B, isolé à partir du sol rhizosphérique.

#### IV. 5 . Examen microscopique

##### IV. 4 . Examen à l'état frais

Les bactéries examinées à l'état frais, apparaissent mobiles sous microscope (tableau 1). La présence des flagelles polaires permet à ces bactéries de se déplacer facilement dans leurs environnements (Stanzin 2010).

#### IV. 5 . Coloration de Gram

Sous microscope optique et à émergence au grossissement X 3000, la coloration de Gram réalisée à partir des colonies distinctes, montrent la présence des cellules de forme bacillaire et de couleur rose est donc a coloration de Gram négative (fig. 10).

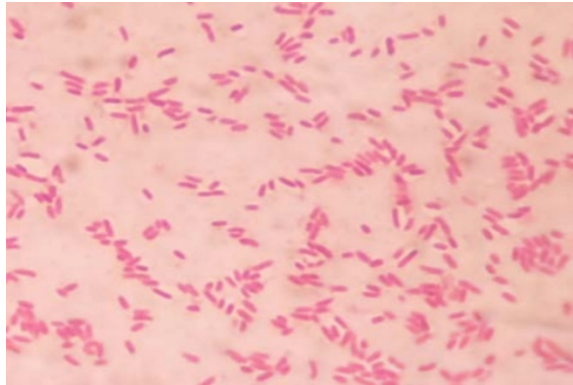


Figure 10 : Aspect microscopique de *Pseudomonas fluorescens* (× 3000)

#### IV. 6 . Test biochimique

##### IV. 4 . Recherche de l'oxydase

La mise en évidence d'un cytochrome oxydase qui oxyde le cytochrome c présent dans la chaîne respiratoire, grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction (N-méthylé du paraphénylène diamine), montre que les bactéries testées sont oxydase positive se traduit par l'apparition d'une couleur violette très foncée (Delarras, 1978).

##### IV. 5 Recherche de la catalase

Chez les bactéries isolées, le dégagement du gaz sous forme de bulles d'air, dû à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène comme indique la formule (Delarras, 1978) citée ci-dessous, montre la présence d'une catalase positive.

##### IV. 7 . Mise en culture des *Pseudomonas* à 7°C et 37°C

La culture positive des boîtes soumises à une incubation à 7°C indique que tous les isolats appartiennent au genre *Pseudomonas fluorescens* (tableau 10). Les *Pseudomonas fluorescens* ne poussent pas à la température 37°C mais se développent facilement dans à 7°C (Djibaoui et Bensoltan, 2010).

Tableau : Caractères morphologique, biochimique des *Pseudomonas fluorescents*.

Isolats	Coloration de Gram	forme	mobilité	oxydase	catalase	Croissance à 42°C	Croissance à 4°C
A	-	Bâtonnet	+	+	+	-	+
B	-		+	+	+	-	+
E	-		+	+	+	-	+
G	-		+	++	+	-	+
H	-		+	+	+	-	+
I	-		+	++	+	-	+
J	-		+	++	+	-	+
K	-		+	++	+	-	+
L	-		+	+	+	-	+
N	-		+	+++	+	-	+
Q	-		+	+++	+	-	+
R	-		+	+	+	-	+
S	-		+	++	+	-	+
1	-		+	+	+	-	+
2	-		+	+	+	-	+
3	-		+	-	+	-	+
9	-		+	+	+	-	+
10	-		+	++	+	-	+
11	-		+	++	+	-	+
12	-		+	-	+	-	+
14	-		+	+	+	-	+
15	-		+	+	+	-	+
17	-		+	+	+	-	+
19	-		+	+	+	-	+
21	-		+	+	+	-	+
22	-		+	++	+	-	+
25	-		+	+	+	-	+
26	-		+	-	+	-	+
28	-	+	+	+	-	+	

(-) : négative

(+) : positive

(++) : Fortement positive.

(+++): Extraînement positive



#### IV.6. Test de la résistance des *Pseudomonas fluorescents* au cuivre

Les résultats de la croissance des *Pseudomonas* sur gélose nutritive additionnée de  $\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  à différentes concentrations ( 8 - 8 mM) sont indiqués dans le tableau .

Tableau : Effet du sulfate de cuivre sur la croissance des isolats de *Pseudomonas fluorescents*

Isolats	Concentrations du sulfate de cuivre (mM)									
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
A	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
L	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
N	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
G	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
R	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
S	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
2	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
12	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
14	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
15	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
22	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
25	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) :absence de la croissance ; (+) :Faible croissance ; (++) : croissance abondante .

Tous les isolats ont poussés abondamment dans le milieu de culture à 8 mM, dont bactéries ont été développées sur la gélose nutritive additionnée de 4 mM de sulfate de cuivre hydratée. A cette même concentration d'autres bactéries étudiées ( isolats), ont montrées une faible croissance sur ce milieu. Par ailleurs à la concentration de 8 mM, nous avons constaté le développement des isolats K et .

Des travaux scientifiques réalisés par (**Andersen et al.** ) ont montrés que les souches de *Pseudomonas syringae* tolères des concentrations de cuivre allons de 6 Mm jusqu'au 5 mM. Par ailleurs, (**Aillo et al.** ) ont montré que les souches sensibles se développaient uniquement sur de milieu additionné de - mM de sulfate de cuivre : (de faible résistance avec 4 - 9 mM), (résistantes avec, ; - 7 mM) et (très résistants avec 9 - 5 mM).

Dans notre expérimentation les isolats les plus résistants au cuivre montrent une couleur Jaune très intense.

Cependant, des études de recherche réalisées par (**Ramos et Rosato .** ) montrent que la souche *Xanthomonas* ( 7 ) présentait une couleur ocre plus intense, lorsqu'elle était cultivée sur du milieu additionné de cuivre, ce qui suggérait une accumulation de ce métal.

Selon (**Altimira et al.** ), cinq bactéries isolés à partir de sols pollués au cuivre ont montré une résistance élevée au cuivre et une résistance à d'autres métaux lourds. Cette résistance est due à la présence du gène Cop A dans les plasmides de ces bactéries.

Des travaux de (**Huseyin et al.** ), montrent que des mutations au niveau du gène ORF8 ont entraînées un phénotype de résistance au cuivre.

(**Francisco et al.** ) suggèrent que la sélection de souches résistantes au cuivre pourrait être une raison majeure pour les échecs de contrôle de gestion des bactéricides composés de cuivre. La plupart des isolats résistants au cuivre abritaient des plasmides, bien que la majorité d'entre eux contienne un plasmide de kb qui a était également présent dans les souches sensibles au cuivre. Les plasmides de kb ont été différenciés par analyse d'enzymes de restriction et hybridation à l'ADN copABCD. Le type de plasmide résistant au cuivre le plus fréquemment trouvé était transférable par conjugaison. Les hybridations par transfert de Southern ont montré, que des déterminants génétiques partiellement homologues de copABCD étaient présents dans toutes les souches résistantes au cuivre examinées et étaient habituellement associés à des plasmides, ces déterminants n'ont pas été détectés dans les souches sensibles au cuivre.

#### IV.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration des échantillons testés où l'absence de croissance a été enregistré (**ARABI.** ). La CMI de cuivre à été déterminé à des concentrations de 8 - 5 mM. Les valeurs de la CMI mentionnée dans le tableau , indique que les deux isolats de *Pseudomonas* fluorescents (K et ) ont révélées une résistance importante au sulfate de cuivre, sachant que les deux bactéries tolèrent la concentration du sulfate de cuivre jusqu'au 8 mM. Cependant la valeur de la CMI elle est de l'ordre de 9 mM (tableau ) pour les deux isolats étudiés (fig. ). D'autres études montrent que *Pseudomonas putida* CZ4 ont enregistré une valeur de CMI de au 4 mM pour le cuivre et 6 mM pour le zinc (**Chen et al.** ).

D'après (**Virender et al.** ) la CMI de cuivre chez les souches *Pseudomonas* testés, est située entre 3 et 3 µg/ml. Cette même valeur est constatée par (**Rajbhansi.** ).

Tableau : Concentration minimale inhibitrice du cuivre vis-à-vis les deux isolats de *Pseudomonas fluorescents* étudiés.

Isolats	Concentration du sulfate de cuivre (mM)					
	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2
<b>14</b>	++	-	-	-	-	-
<b>K</b>	++	-	-	-	-	-

(-) : négative

(+) : positive

#### IV.8. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des *Pseudomonas fluorescents*

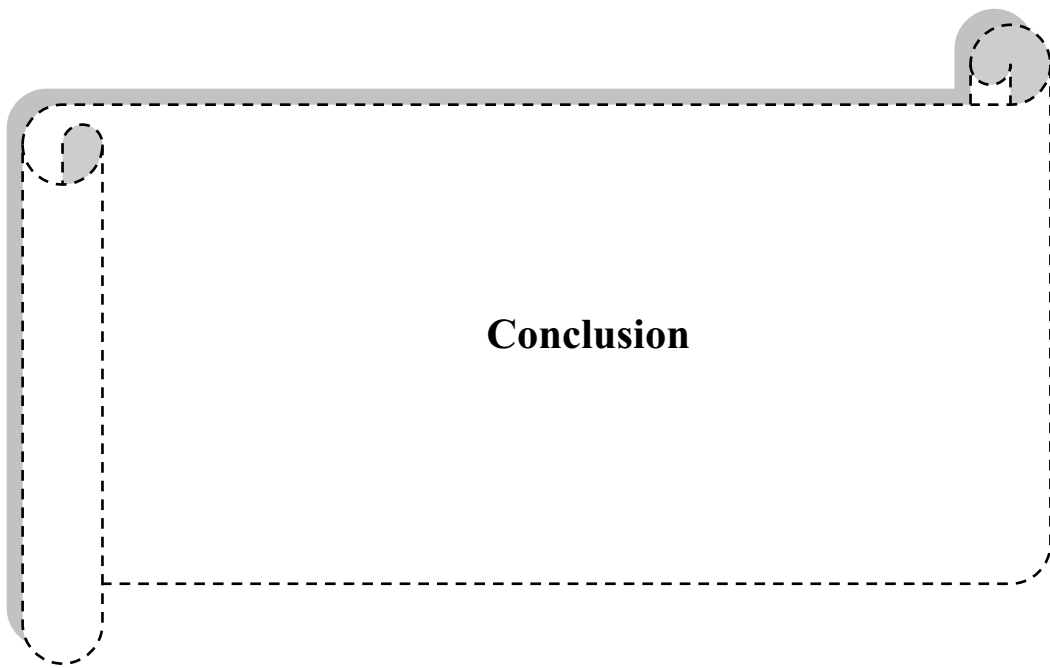
Pour évaluer l'effet de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas fluorescents*, des cultures ont été réalisées en milieu liquide. La croissance est déterminée par la mesure de la densité optique chaque 5 heures pendant heures.

Les résultats obtenus, montrent que la croissance est légèrement ralentie dans le milieu contenant le cuivre par rapport à celle du témoin. Ce ralentissement est probablement dû à la phase d'adaptation des bactéries aux conditions de la culture. Tandis que le cuivre à des concentrations inférieures à 9 mM n'inhibe pas les bactéries mais fait ralentir leurs croissances.

Bien que, les bactéries cultivées en milieu King B liquide se développe mieux dont celui qui contient du cuivre, contrairement aux témoins pour les deux isolats étudiés, ce qui explique la manière avec la quelle la bactérie se défendu aux agents toxiques, et cela est déjà justifié par la pigmentation intense sur les milieux gélosés.

En me référant aux résultats obtenu, les isolats étudié montre une résistance aux cuivre à degrés différents, au même temps on constate que la croissance des pseudomonas fluorescents est stimuler par le cuivre.

Cu-ci est indiqués grace au facteur CMI, qui a apuier sur le fait que nitre pseudomonas fleuorescents sont résistant au cuivre et qui peuvent, en effet, l'accumuler a des concentration inférieur ou égale a une valeur de 8 mM.



**Conclusion**

## Conclusion

*Pseudomonas fluorescens* est considéré comme une bactérie omniprésente, qui a la capacité de s'adapter aux sols, aux plantes et aux surfaces aqueuses, ainsi que d'y prospérer. Il existe plusieurs utilisations possibles de *P. fluorescens* dans différents secteurs industriels et commerciaux. Ces utilisations comprennent le traitement des eaux usées municipales et industrielles, la dégradation des déchets (plus précisément dans les raffineries de pétrole), la biorestauration et la biodégradation, les produits commerciaux et résidentiels de curage et de dégraissage de canalisations d'égouts, la production chimique et d'enzymes, les additifs pour fosse septique, ainsi que les produits généraux de nettoyage et désodorisants. Parmi les autres utilisations, nous comptons la lutte contre les ravageurs, l'aide à la croissance des plantes et l'utilisation en tant qu'agent antigel sur les plantes.

Les pseudomonades jouent un rôle dans les cycles biogéochimiques en tant que micro-organismes dans le sol et l'eau qui sont importants sur le plan écologique et contribuent à la dégradation de nombreux composés solubles provenant de matières végétales et animales (Palleroni, ).

La bactérie *Pseudomonas fluorescens* est également bien connue pour sa tolérance aux métaux (Appanna et al., ; Lemire et al., ).

Il a été clairement vu que les isolats étudiés par **Benaïed et Meddah** ( ) montrent une résistance au cuivre, mais ils ne s'expriment pas de la même manière. Les valeurs de la CMI obtenues indiquent d'une part, que les *Pseudomonas fluorescens* ayant le pouvoir de résister au cuivre et même de l'accumuler à des concentrations inférieures ou égales à 8 mM, d'autre part représente une croissance stimulée par ces métaux lourds.

**Benaïed et Meddah** ( ) ont aussi démontré que le type de milieu de culture utilisé joue un rôle important dans la croissance de *Pseudomonas fluorescens* et même celui qui contient le cuivre. Comme l'objectif de ce travail a été d'évaluer le comportement de *Pseudomonas fluorescens* qui se trouve dans un milieu qui contient le cuivre. Cependant, il est conseillé de diminuer ou bien minimiser l'utilisation de ce genre de traitement agricole dans la culture de la vigne qui influe par conséquent d'une façon négative sur la plante et de réfléchir à l'exploitation de ces bactéries PGPR .

## Références bibliographiques

A

- Adriano, D. C.** . Trace metal in terrestrial environment. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 5nd ed. Ed. Springer.
- Ahmad, M. & Kibret, M.** . Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J King Saud Univer-Scien ( ): 4- .
- Aiello D, Vitale A, Ferrante P, Polizzi G.** . Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in sicily and occurrence of copper-resistant strains. Journal of Plant Pathology, vol (5), 6 - 5 .
- Altimira F, Yáñez A, Vergara M G, Rojas A L.** . Characterization of copperresistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile, Article in BMC Microbiology, .
- Anaïs Pujol.** . Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson. Chimie. Université de Grenoble. Français. tel- .
- Andersen G L, Menkissoglou O, Lindow S E.** . Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae*. Isolated from fruit trees in California, Ecology and Epidemiology, vol (9), ; - 9 .
- André Picot.** . Président de l'ATC Directeur de Recherche honoraire au CNRS, Expert français honoraire auprès de l'Union européenne pour les Produits chimiques en Milieu de travail (SCOEL, Luxembourg).
- Antoun H. and Prévost D.** . Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A.Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. p 4- .
- Arabi A,** . Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine. Thèse de Doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie, ; .

- **Arora NK, Tewari S, Singh S, Lal N, Maheshwari DK** . PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed.) Bacteria in agrobiolology: Stress management, pp. < - ; .
- **Appanna, V.D., Gazsó, L.G., St. Pierre, M.** . Multiple-metal tolerance in *Pseudomonas fluorescens* and its biotechnological significance. J. Biotechnol. : - .

## *B*

- **Babalola, O.O.** . Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnol Lett : - .
- **Baca B.E. et Elmerich C.** 3 : . Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C., Newton W.E. (Eds). Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations, Springer, Netherlands. pp. 6 - 6 .
- **Belabed S.** . Contribution à l'Etude de la Pollution Métallique du Sol et de la Végétation au Niveau des Décharges publiques non Contrôlées . Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université de Abed El Hamid Ibn Badis . Mostaganem, Algérie.
- **Bell T.** . "The Ancient History of Copper." ThoughtCo, Oct. , , thoughtco.com/copper-history-pt-i- 5 .
- **Benaïed et Meddah ( )** . Etude de la tolérance au cuivre chez des isolats rhizosphériques de *Pseudomonas fluorescens* .Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université de Abed El Hamid Ibn Badis . Mostaganem, Algérie.
- **Beneduzi A, Ambrosini A and Luciane M.P.** . Genetics and Molecular Biology, , 7 (suppl). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências. - 1
- **Besnard, E.** . Influence d'amendements organiques sur la rétention du cuivre dans les sols du vignobles de Champagne : conséquences environnementales. Thèse. Université de Reims Champagne-Ardenne.
- **Boukhalfa H. and Crumbliss AL.** . Chemical aspects of siderophore mediated irontransport. BioMetals : 8 - < .

## C

- Chen x, Shi j, Chen Y, Xu X, ShengYou X, Wang Y.** . Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ4 isolated from metalpolluted soil, Canadian Journal Microbiology, Vol : ; – 9 .
  
- Chibani H.** . Sélection et caractérisation des bactéries solubilisant le phosphate isolées du sol salin dans l’ouest algérien: effet sur la promotion de la croissance du blé (*Triticum* sp.). These de doctorat .Université Abd El Hamid Ibn Badis.Mostaganem,Algérie.
  
- Chibuike G.U et Obiora S.C.** . Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. Applied and Environmental Soil Science. Volume |Article ID .
  
- Chin-A-Woeng, T. F. C., J. E. Thomas-Oates, B. J. J. Lugtenberg, and G. V.Bloemberg.** ( ). Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL extends the range of biocontrol ability of phenazine-4-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. Mol. Plant-Microbe Interact. : – .
  
- Chin-A-Woeng, T. F., G. V. Bloemberg, and B. J. Lugtenberg.**( ). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New. Phyto. : : 6 - 6 .
  
- Corbaz R.** . Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes.
  
- Cornu J , Huguenot D, Jézéquel K, lollier M, Lebeau T.** . Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria.Word J Microbiol Biotechnol : .

## D

- De Salamon I.G., Hynes R.K. and Nelson L.M.** . Role of Cytokinins in plant growth promotion by rhizosphère bacteria. P. 6 - 8 . In Siddiqui A. A. (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization.
  
- Delarras C.** . Pratique en microbiologie de laboratoire. 5 # Paris, 6 .
  
- Djibaoui R, Bensoltane A.** . Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*, African Journal of Biotechnology, Vol 7 (:), : 5 .



## *E*

- Emily claudia ricci.** .investingating the role of pseudomonas sp. And bacillus sp biofilms as plant growth promoting inoculants.McGill university,motereal.Quebec.Canada.

## *F*

- FAO.** . Utilization des phosphates naturels pour une agriculture durable.
- Francisco M. C, Eva A, Ane S, Alejandro P G, Juan C , Jesús M, Antonio V.** . Copper Resistance in Pseudomonas syringae Strains Isolated from Mango Is Encoded Mainly by Plasmids, Vol ( ;), < - 9 .
- François Robert-Nadeau.** . évaluation des risques toxicologiques et écotoxicologiques d'un terrain contaminé par des métaux . en vue de l'obtention du grade de maitre en environnement (M. Env.). Sherbrooke, Québec.
- FENTON, M. B.** . Bats. Facts On File Inc., New York, : pp.

## *G*

- Glick BR.** .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.** . Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. J Microb BiochemTechnol. Volume : (5), - 5 .

## *H*

- **Haas, D; Défago, G.** . Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Natra. Rev. Microb.* .
- **Haas, D., and C. Keel.** ( ). Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* : : - 6 .
- **Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W.** . Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR7 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* (4): - .
- **Harman G. E. and Shores M.** . The Mechanisms and Applications of Symbiotic Opportunistic Plant Symbionts. P. 4 - 8 . In Vurro M. and Gressel J. (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management.*
- **Helluy, S., & Holmes, J.C.** . Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural processes*, (6), 8 - 3 .
- **Höfte, M. and de Vos, P.** . Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant-associated bacteria. Part. 6*, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Netherlands, pp. : - 6 .
- **Hopkins WG.** . *physiologie végétale.* Traduction de la 5 édition américaine par SERGE R. Ed de Boeck. pp. < - 5 .
- **Huseyin B, Gerald V M, Robert E S, Jaw-Fen W, Savita Sh, Jeffrey B J.** . Characterization of a Unique Chromosomal copper resistance gene Cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Environmental microbiology*, Vol ( ), - .

## *I*

- **IDDER B.** 5 6 . Effet de la salinité et des pesticides sur l'interaction plante *Pseudomonas* spp: Cas de la fève (*Vicia faba* L.). Thèse de magister, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, Algérie, 6 .

## *ℓ*

- **Kirdi, B., Zermane, N.** . 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 cre* < . and *Cuscuta campestris* Yuncker .

- **Kirsty Mitchell.** . The transfert of heavy metals through trophic levels and their toxicity effects on organisms including humans. A thesis submitted in fulfillment of the requirements of Nottingham Trent University for the degree of Doctorate of Philosophy.
- **Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA.** . Photoperiodregulates elicitation of growth promotion but not inducedresistance by plant growth-promoting rhizobacteria. Can J Microbiol (5): < - : .
- **Kloepper, J.W. and Schroth, M.N.** . Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: 7th Int. Conf. Plant Pathogen. Bacteria. Angers France, 5: < - 5 .

## *L*

- **Lauriane Giroux .** . CARACTÉRISATION DE RHIZOBACTÉRIES DU GROUPE DES BACILLUS BÉNÉFIQUES À LA CROISSANCE DE LA TOMATE . Thèse de magister MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE , UNIVERSITÉ DU QUÉBEC .
- **Leyral Guy, Joffin Jean-Noël.** . Microbiologie technique 5, CRDP d'Aquitaine, 7 .
- **Lugtenberg B., Kamilova F.** . Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev.Microbiol. : 4 - 9 .

## *M*

- **Martineau B.** . Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. ED, DECLARIE, Montréal.
- **Martínez-Viveros , O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo and M.L. Mora.** . Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr. : 6 - < .
- **Massy A G. Thompson N R. Johnson B F G. Davis R.** . The chemistry of copper silver and Gold . First edition. Germany: 9 .
- **Munees, A., Mulugeta, K.** . Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspe Febr. - , 4- .

## *N*

- Neilands, J.B.** . Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 3 , 6 – 9 .

## *P*

- Pal K. K. and Gardener B. M.** . Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* : 4- .
- Palleroni, N.J.** . Introduction to the family Pseudomonadaceae. In: Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A., Schegel, H.G. (éd.) *The Prokaryotes – A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Berlin (Allemagne) : Springer-Verlag. p. 8 - 8 .
- Pascale N., François P.** . Contamination des eaux du canton de Genève par le cuivre : caractérisation des sources. *Service de l'écologie de l'eau (SECOE)*.
- Patten CL, Glick BR .** .Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* : – .
- Piano, S; Neyrotti, V; Migheli, Q; Gullino, M.L.** . Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* (6) : 4 - 3 .
- Pujic, P., Normand, P.** . La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofuture*, - .

## *Q*

- Qureshi M. A., Ahmad Z. A., Akhtar. N., Iqbal A., Mujeeb F. and Shakir M. A.** . Role of phosphate solubilizing bacteria (psb) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, (4): 7 - 3 .

## *R*

- **Rajbanshi A.** . Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant, Central Department of Microbiology, Vol 9: - .
- **Ramos A et Rosato B.** . Copper accumulation in *Xanthomonas campestris* pv. *Visicatoria*. Brazilian journal of Genetics, Vol (7). 4 - 7 .
- **Reyes, M.E.Q; Rohrbach, K.G; Paull, R.E.** . Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. Postharvest Biol. Technol. (5): 6 - 6 .
- **Rossum D. V., Muyotcha A., Verserveld V. W ., Stouthmer. A. H. and Boogerd F. C.** . Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. Stains nodulating groundnut. Plant and soil 6 : : - : .

## S

- **Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS.** . Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J Ind Microbiol Biotechnol ( ): 8 – .
- **Shabbir Z , Sardar A , Shabbir A, Abbas G , Shamshad S , Khalid S, Natasha, Murtaza G, Dumat C , Shahid M.** . Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. Chemosphere. Vol < . Abstract.
- **Solioz M.** . Copper and Bacteria. Part of the Springer Briefs in Molecular Science book series (BRIEFSMOLECULAR). Page .
- **Sophie Chaperon.** . Évaluation de la toxicité de combinaisons de métaux sur l'uréase et la déshydrogénase dans le sol. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) Département de chimie, Université de Montréal Facultés des arts et des sciences.
- **Stanzin D. Disket D. Richa Sh.** . Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*.
- **Syed Shameer, T. N. V. K. V Prasad.** . Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses.

## T

- **Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Zahid M, et al.** . Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) *World J Microbiol Biotechnol* : < - 8 .

V

- **Van Loon, L.C.** . Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* < : 6 - 7 .
- **Vidhyasekaran P, Rabindran R, Muthamilan M, Nayar K, Rajappan K, Subramanian N, Vasumathi K** < ). Development of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. *Plant Pathology*, : 4 - : .
- **Virender S, Chauhan P K, Rohini K, Tejpal D , Vinod K.** . Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to Heavy metals contaminants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* , Vol 6(5), 7 - : .

W

- **Wedepohl, K. H.** . The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* , - .
- **Weyens N., Monchy S., Vangronsveld J., Taghari. and Lelie D. V.** . Plant-Microbe Partnerships (ed.), *Hand book of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. : - : .

### Coloration de Gram

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser  $100^{\circ}$  (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 4mn.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 4 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.

Laver à l'eau.

- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant  $1$  à  $2$  mn.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers  $60^{\circ}$ . Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif x  $1000$ , en immersion avec de l'huile à immersion.

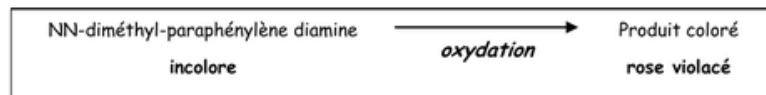
## L'OXYDASE

### 1. Intérêt

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram -.

### 2. Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



### 3. Technique

- placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque





#### Remarques :

- Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides

### 4. Lecture

Pas de lecture avant 30 secondes environ

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :  <b>Oxydase +</b>	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :  <b>Oxydase -</b>
	

#### Causes d'erreurs :

- réalisation du test sur un milieu glucidique (une fermentation peut cacher une respiration)
- humidification trop importante du disque, entraînant une élimination du réactif
- quantité de bactéries insuffisante
- réactif périmé (l tester avec une souche oxydase + et une souche oxydase -)
- utilisation d'un instrument « oxydase + »
- lecture trop tardive : au delà de 30 secondes



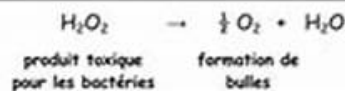
## LA CATALASE

### 1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

### 2. Principe

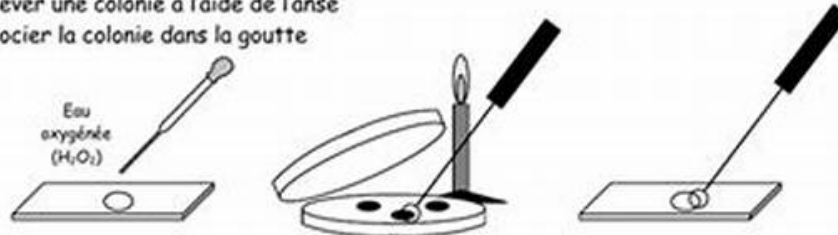
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

### 3. Technique

- déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte



**Remarque :** l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

### 4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + <span style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 30px; height: 30px; vertical-align: middle; text-align: center; margin-left: 10px;">⊙</span>	Catalase - <span style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 30px; height: 30px; vertical-align: middle; text-align: center; margin-left: 10px;">○</span>

#### Causes d'erreurs :

- réalisation du test sur un milieu contenant la catalase  
**Exemple :** réalisation du test à partir de colonies prélevées sur gélose au sang (l'hémoglobine possède une activité catalasique pouvant donc donner des résultats faussement positifs)
- quantité de bactéries insuffisante
- eau oxygénée périmée (la tester avec une souche catalase +)