



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par

BEKADA Ahmed Abdelsamed Abdelbasat

&

BETTOUATI Karima

Thème :

Isolement et caractérisation des rhizobactéries solubilisant le Zinc

Soutenu le 11/06/2024 devant le jury composé de :

Président	MEKHALDI AEK	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	HAMOUM Hakim	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	BENSLIMANE Sabria	MAB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu (notre dieu) qui nous a donné la santé , la volonté , le courage et la patience tout au long de nos étude.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr.Hamoum H**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour son patience, son rigueur et son disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

On tient à présenter nos sincèresremercîmentsa tous les membres du jury :

Mr.Mekhaldi A, Mr.Niami M etMm.Bensliman S.

*Nous remercions également toute l'équipe de laboratoire, particulièrement **Mm. Tahlaïti A** Pour leur disponibilité, et leur aide et leur patience.*

Enfin, nos profond remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

A ma chère mère, à mon cher père, et à Hassiba

Quelles que soient mes actions ou mes paroles, je ne saurai pas jamais vous exprimer toute ma gratitude.

Votre amour, votre soutien et votre tendresse sont mon rempart. Votre bienveillance m'éclaire, et vos sages conseils ont toujours été mes armes les plus précieuses.

Très cher Bilel,

Comme ton prénom l'indique, tu es si cher et précieux, pour moi et pour tout le monde.

Toi qui as commencé à explorer un an avant moi, à me préparer le terrain et à t'assurer que tout ira bien à la fin. Pour nos larmes et nos rires ensemble, nos danses, nos disputes, nos joies et nos chagrins.

Que ce mémoire soit le témoin de mon amour et de ma gratitude envers toi, Ghali.

Alae, Mohamed,

Que dieu vous accorde une vie à la hauteur de la grandeur de votre âme, aussi belle que la beauté de vos sourires, et aussi brillante que l'éclat de vos yeux.

Ahmed

Dédicaces

Grace a dieu tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté, la force pour réaliser ce mémoire, quel nul ne peut se faire sans son désir.

A nos très chers parents qui ont tout sacrifié pour nous, et nous espérons qu'ils seront toujours fiers de nous, a toute personne de notre grande famille.

A nos amis et collègues de la promotion de microbiologie 2023 /2024.

On dédie ce modeste travail : a tous ceux qui ont aimé.

Karima

Sommaire

Remerciements.....	i
Dédicace.....	ii
Sommaire.....	iii
Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	vi
Résumé.....	viii
Introduction.....	01

Chapitre 1 : Revue Bibliographique

I.1.	Le sol.....	04
I.2.	La rhizosphère.....	04
I.2.1.	Définition.....	04
I.2.2.	Les activités rhizosphériques.....	05
I.3.	Les rhizobactéries.....	06
I.3.1.	Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP).....	06
I.3.1.1.	Les activités PGP.....	07
I.3.1.1.1.	Effets directs.....	07
I.3.1.1.2.	Effets indirects.....	08
I.4.	Zinc.....	08
I.4.1.	Définition du zinc.....	08
I.4.1.2.	Le zinc dans la plante.....	09
I.4.1.3.	Le rôle du zinc.....	09
I.4.1.4.	Les mécanismes de solubilisation du zinc.....	09

Chapitre 2 : Matériel et Méthode

II.1.	Isolement des rhizobactéries solubilisant le zinc.....	12
II.1.1.	Echantillonnage.....	12

II.1.2.	Isolement des rhizobactéries.....	12
II.2.	Purification et conservation des isolats.....	12
II.3.	Caractérisation des isolats.....	13
II.3.1.	Caractérisation macroscopique.....	13
II.3.2.	Caractérisation microscopique.....	13
II.3.2.1.	Coloration de gram.....	13
II.4.	Test biochimique.....	13
II.4.1.	Catalase.....	13
II.4.2.	Oxydase.....	14
II.5.	Test de solubilisation de zinc.....	14
II.6.	Evaluation des activités PGP.....	14
II.6.1.	Solubilisation du phosphate.....	14
II.6.1.1.	Test qualitatif.....	14
II.6.1.2.	Test quantitatif.....	15
II.6.2.	Test de production de l'AIA.....	15
II.6.3.	Test de production de HCN.....	15

Chapitre 3 : Résultat et discussion

III.1.	Isolement et purification des rhizobactéries solubilisent le zinc.....	18
III.2.	Caractérisation macro et microscopiques des isolats.....	19
III.3.	Test biochimique.....	20
III.3.1	Test de catalase.....	20
III.3.2.	Test d'oxydase.....	20
III.4.	Test de solubilisation de zinc.....	21
III.5.	Evaluation des activités PGP.....	22
III.5.1.	Test de solubilisation de phosphate.....	22
III.5.1.1.	Test qualitatif.....	22
III.5.1.2.	Test quantitatif.....	23

III.5.2.	Test de production de l'AIA.....	24
III.5.3.	Test de production de HCN.....	25
	Conclusion.....	28
	Références Bibliographiques.....	31
	Annexe.....	39

Liste des abréviations

PGPR : plant growth promoting rhizobacteria (bactéries promotrices de la croissance des plantes).

BR: Bunt and Rovira.

ES:efficacité de solubilisation.

PVK: pikowskaya.

NBRIP: en anglais 'National botanical research institut of phosphate medium'

AIA: Acide indole acétique.

HCN: cyannure d'hydrogène.

LB: lauria bertani.

S-UV: spectrophotomètre UV-visible.

Rpm : rotation par minute.

Liste des figures

Figure 01: Représentation schématique des différentes zones de la rhizosphère (Lepinay, 2013).....	05
Figure 02: Prélèvement des échantillons de sol.....	12
Figure 03: isolement des BSZ dans milieu BR.....	18
Figure 04: les isolats Az2 et Kz2.....	18
Figure 05: Aspect microscopique de l'isolat Tz1a et Wz2 (grossissement 100).....	19
Figure 06: Pourcentage de la coloration de gram.....	20
Figure 07: Catalase positif par l'isolat Ez4b.....	20
Figure 08: Solubilisation du zinc par les isolats (Az1,Cz1,Ez2,kz1).....	21
Figure 09: Solubilisation du phosphate.....	22
Figure 10: Témoin, l'isolat Tz1a.....	23
Figure 11: Concentration de phosphate soluble par les isolats.....	23
Figure 12: Production de l'AIA par les isolats Kz1 et Az2.....	24
Figure 13: Concentration de l'AIA dans chaque isolat.....	25
Figure 14: Résultat de production de HCN (isolat Ez2 HCN + , isolat Kz2 HCN -)....	25
Figure 15 : Pourcentage de la production de HCN.....	26

Résumé

La capacité des bactéries à solubiliser le zinc est un caractère crucial pour la nutrition des plantes, jouant un rôle essentiel dans l'apport de ce micronutriment. Cette étude vise à isoler des bactéries capables de solubiliser le zinc et à identifier leurs caractéristiques impliquées dans la promotion de la croissance des plantes.

37 isolats bactériens ont été isolés à partir de la rhizosphère de diverses plantes (fève, fraise, oignon, betterave, petit pois) dans la région de Mostaganem. Parmi eux, 25 isolats ont démontré une capacité à solubiliser le zinc sur le milieu Bunt et Rovira modifié avec de l'oxyde de zinc comme seule source de zinc. La sélection de ces isolats s'est basée sur la formation d'halo clairs, le maximum de solubilisation de zinc a été observé chez l'isolat Wz2 avec une efficacité de 632 ± 252 $\mu\text{g/ml}$. Les isolats ont ensuite été évalués pour des activités de promotion de la croissance de plantes telles que la solubilisation des phosphates, et la production d'acide indole acétique (AIA) et la production de l'acide cyanhydrique (HCN). Les résultats montrent que la majorité des isolats présentent des capacités de solubilisation des phosphates par des concentrations de 79.17 ± 1.00 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à 32.3 ± 0.9 $\mu\text{g/ml}$ et de production d'AIA avec des concentrations de 24.33 ± 0.037 à 2.63 ± 0.048 $\mu\text{g/ml}$.

Mots-clés : Bactéries solubilisatrices du zinc, phosphate, AIA, HCN

Abstract

The ability of bacteria to solubilize zinc is a crucial trait for plant nutrition, playing an essential role in providing this micronutrient. This study aims to isolate bacteria capable of solubilizing zinc and to identify their characteristics involved in promoting plant growth.

37 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere of various plants (broad bean, strawberry, onion, beet, pea) in the Mostaganem region. Among them, 25 isolates demonstrated the ability to solubilize zinc on a modified Bunt and Rovira medium with zinc oxide as the sole zinc source. The selection of these isolates was based on the formation of clear halo zones and colony diameter, with the maximum zinc solubilization observed in isolate Wz2 with a concentration of 632 ± 252 $\mu\text{g/ml}$. The isolates were then evaluated for plant growth-promoting activities such as phosphate solubilization and the production of indole acetic acid (IAA) and hydrogen cyanide (HCN). The results show that the majority of isolates possess phosphate solubilization capacities with concentrations ranging from 79.17 ± 1.002 to 32.3 ± 0.9 $\mu\text{g/ml}$ and IAA production with concentrations from 24.33 ± 0.037 to 2.63 ± 0.048 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords: Zinc-solubilizing bacteria, phosphate, IAA.

المخلص

تُعدُّ قدرة البكتيريا على إذابة الزنك خاصيةً حيويةً لتغذية النباتات، حيث تلعب دورًا أساسيًا في توفير هذا العنصر الغذائي الدقيق. تهدف هذه الدراسة إلى عزل البكتيريا القادرة على إذابة الزنك وتحديد خصائصها التي تُسهم في تعزيز نمو النباتات.

تم عزل 37 سلالة بكتيرية من منطقة الجذور لمجموعة متنوعة من النباتات (الفاول، الفراولة، البصل، الشمندر، البازلاء) في منطقة مستغانم. من بين هذه السلالات، أظهرت 25 سلالة قدرةً على إذابة الزنك في وسط بونت وروفيرا المعدل باستخدام أكسيد الزنك كمصدر وحيد للزنك. تم اختيار هذه السلالات بناءً على تشكيل هالات واضحة، حيث تم ملاحظة بفعالية بلغت 632 ± 252 ميكروجرام/مل. ثم تم تقييم السلالات من حيث أنشطتها Wz2 أقصى إذابة للزنك في السلالة (HCN) وإنتاج حمض السيانيديك (AIA) في تعزيز نمو النباتات مثل إذابة الفوسفات، وإنتاج حمض الإندول أسيتيك تُظهر النتائج أن غالبية السلالات تتمتع بقدرات على إذابة الفوسفات بتركيزات تتراوح بين 79.17 ± 1.00 ميكروجرام/مل إلى 32.3 ± 0.9 ميكروجرام/مل، وإنتاج حمض الإندول أسيتيك بتركيزات تتراوح بين 24.33 ± 0.037 إلى 2.63 ± 0.048 ميكروجرام/مل.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا مذوبة للزنك، الفوسفات



Introduction

Introduction

Sur terre, les microorganismes ont colonisé à peu près tous les écosystèmes, la rhizosphère, qui est la partie du sol entourant les racines vivantes, est un milieu extrêmement complexe où s'opèrent de multiples interactions entre la plante, le sol et les organismes telluriques, son volume est variable selon le développement racinaire : il représente entre 0,1 et 1% du sol global des écosystèmes forestiers et près de 100% des premiers centimètres des sols (**Bapiri et al, 2009**).

La rhizosphère présente des propriétés structurales (porosité-agrégation) et des caractéristiques physico-chimiques singulières (pH, minéraux, potentiel hydrique). Quant à la composante biologique, des études montrent une densité et une activité microbienne à proximité des racines particulièrement intenses, en comparaison au sol non rhizosphérique (**Lynch et Whipps, 1990**). Cette microflore se compose majoritairement de bactéries, de champignons, de protozoaires et d'algues unicellulaires (**Subba Rao, 1999**).

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



Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I. Revue Bibliographique

I.1. Le sol :

Le sol est défini comme étant une entité naturelle vivante et dynamique sur la surface de la terre, il est composé de solides (organique et minérale), liquides et gazes, présentant au moins l'un des deux caractères suivants :

- Composé de couches qui se différencient par leurs matières premières suite à des ajouts, des pertes ou des transformations de matière et d'énergie.
- Capacité à supporter les plantes enracinées dans un environnement naturel (**Osman, 2013**).

Le sol constitue le support de vie d'une très grande variété d'organismes vivants en interactions continues (plantes, vers, nématodes, acariens, protozoaires, algues, champignons, eubactéries, archaea, etc) (**Scow, 2004**).

I.2. La rhizosphère

I.2.1. Définition

Le mot rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner (**Hartmann et al, 2008**). Il est composé de deux mots :

- Rhizo : Vient du grec Rhiza signifiant racine (**Lombi et al, 2001**)
- Sphère : Qui vient du latin Sphaera ou du grec ancien Sfaira (signifiant balle)
 - Il définit le champ d'influence du système racinaire (**Bowen et Roriva, 1991**).

Lorenz Hiltner a défini, en 1904, la rhizosphère comme étant « la partie du sol qui entoure immédiatement les racines de la plante » (**Prescott et al, 2007**). Elle constitue ainsi un lieu d'échange entre le végétal et le minéral ; c'est un milieu complexe aux multiples interactions (Lynch, 1990).

Aujourd'hui, ce terme de rhizosphère correspond à une définition plus générale : « C'est le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire » (**Darrah, 1993**). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, la densité du système racinaire, ses propriétés de surface et les propriétés physicochimiques du sol (**Abhilash et Singh, 2009**).

Il existe trois composantes distinctes reconnues dans la rhizosphère (figure 1) :

La rhizosphère, qui est la zone du sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats qui affectent l'activité microbienne.

2. La rhizoplane, qui est la surface de la racine, y compris les particules du sol adhérant fortement.

3. La racine elle-même (endorhizosphère), est une partie du système racinaire, parce que certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus racinaires internes (**Bowen et Rovira, 1991**).

Un grand nombre d'organismes microscopiques tel que les bactéries et les algues coexistent dans la rhizosphère, cependant, les bactéries sont le groupe le plus abondant dans cette partie de l'environnement de la plante, et il est fort probable qu'ils influencent grandement la physiologie de la plante.

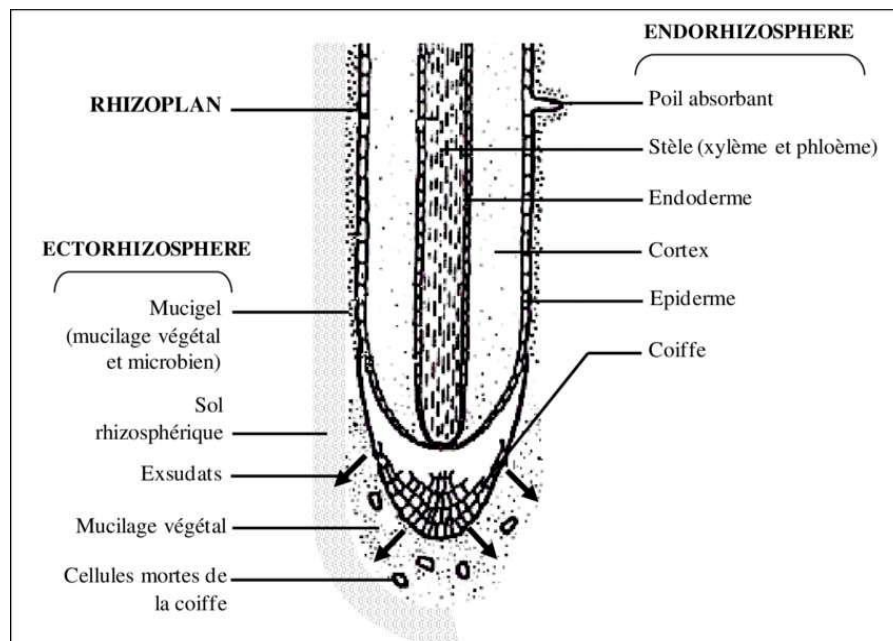


Figure 1 : Représentation schématique des différentes zones de la rhizosphère (**Lepinay, 2013**).

I.2.2. Les activités rhizosphériques

Des phénomènes écologiques particuliers se produisent au niveau de la rhizosphère. En effet, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, d'exsudats et plus de 40% des produits de photosynthèse passent au niveau du système racinaire (**Soufiane, 1989**). L'exsudation ; ce terme est souvent employé abusivement comme synonyme de rhizodéposition. Elle désigne en fait la diffusion passive hors des cellules de composés solubles de faible poids moléculaire, par exemple des sucres ou des acides aminés, qui sont rapidement métabolisés par les microorganismes (**Davet, 1996 ; Aouar, 2012**). Les exsudats racinaires représentent un élément clé dans les échanges entre la plante et les rhizobactéries, dont la densité et la diversité est en liaison directe avec la nature et la quantité des exsudats racinaires, cette influence se manifeste par une modification de la croissance de la plante (**Lemanceau, 1992**).

I.3. Les rhizobactéries

Les bactéries de la rhizosphère, dites rhizobactéries, sont capables de coloniser l'intérieur ou l'extérieur de la racine de nombreuses espèces de plantes et peuvent être divisées entre celles qui forment une relation symbiotique avec la plante et celles qui ne le font pas. (Kloepper *et al.*, 1989).

Elles sont généralement très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs (Peter *et al.* 2015) et sont des hétérotrophes typiques nécessitant des composés organiques comme source d'énergie, leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère (Campbell et Greaves, 1990). Quand elles émettent des substances favorisant la croissance des plantes tout au long de leur cycle de développement (Kloepper, 1993), elles sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, connues sous le terme RPCP (Beauchamp, 1993), ou bien (PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1989 ; Zahir *et al.*, 2004).

I.3.1. Les Rhizobactéries promotrices de la Croissance des Plantes (RPCP)

Une partie des bactéries présentes dans la rhizosphère peuvent être impliquées dans l'amélioration de la croissance des plantes par divers mécanismes. L'effet stimulateur de ces espèces bactériennes est connu depuis des décennies et elles ont été introduites dans le sol, sur les semences ou dans les racines afin d'améliorer la croissance des plantes et de les protéger vis-à-vis des maladies (Raaijmakers *et al.*, 2002). Le genre *Rhizobium*, un exemple parmi les microorganismes favorisant la croissance, et est le groupe le plus largement connu. Il a été commercialisé avec succès avec de nombreuses applications dans l'agriculture pour le développement de la symbiose avec les plantes.

Le terme rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP) a été initialement utilisé pour décrire uniquement le groupe microbien impliqué dans la lutte biologique (Kloepper *et al.*, 1980). Ce terme a ensuite été élargi pour englober toutes les bactéries bénéfiques associées aux plantes (Bashan et Holguin, 1998).

Les PGPR forment un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent être trouvées dans la rhizosphère, à la surface des racines et en association avec les racines, qui peuvent améliorer, la qualité de croissance de la plante. Elles sont majoritairement composées d'espèces du genre *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, et *Pseudomonas* et sont considérés comme inoffensifs pour la plante hôte, la densité de leurs population est souvent très élevés (10⁸ bactéries/g des racines) (Weller, 1988 ; Lugtenberg *et al.*, 2001).

La plupart des souches bactériennes exploitées comme agent de contrôle biologique (biocontrol RPCP) appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (**Haas et Défago, 2005**). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des colonisateurs communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies causées par les microorganismes du sol. Ils ont aussi la capacité de produire de nombreux antibiotiques et sont faciles à cultiver ou à manipuler en laboratoire. De plus, les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes aux conditions défavorables du milieu (**Raaijmakers et al, 2009 ; Cavaglieri et al, 2005**).

I.3.1.1. Les activités PGP

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**).

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.3.1.1.1. Effets directs :

L'effet direct de la croissance des plantes peut se produire par plusieurs processus : 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 comme *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azotobacter Paenibacillus* et *Azospirillum brasilense* sont les plus connus leur rôle de stimulation des plantes grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique qui est transformée en ammoniac

par un système enzymatique complexe connu sous le nom de la nitrogénase (**Weyens et al, 2010 ; Arora et al, 2012**).

Les PGPR peuvent augmenter les disponibilités des éléments nutritifs tels que le phosphore, le zinc, le potassium. Les majorités de ces éléments sont insoluble dans le sol et la plante ne peuvent pas absorber donc les PGPR solubilisent le P, Z et K à forme soluble devient disponible pour la plante et pour qu'elle assure leur croissance (**Glick et al, 2012**). Les PGPR jouent un rôle sur la production des phytohormones soit par inhibition par l'activité d'enzyme ACC désaminase ou par l'augmentation des phytohormones par la production de l'auxine Acide indole acétique et la cytokinine les hormones responsables à l'élongation racinaire (**Souza et al, 2015**).

I.3.1.1.2. Effets indirects

Les PGPR (bactéries rhizosphériques promoteurs de croissance des plantes) jouent un rôle clé dans la protection des plantes contre les maladies causées par les agents pathogènes. Leur action de biocontrôle repose sur plusieurs mécanismes, tels que la production d'antibiotiques comme le DAPG et le HCN, la compétition pour les nutriments et l'espace, l'activation de la résistance systématique induite (ISR) chez les plantes, et la production d'enzymes comme les chitinases et les lysozymes. Les PGPR peuvent également fixer le fer et le phosphore, inhiber la croissance des pathogènes, et favoriser celle des plantes. En outre, elles peuvent stimuler l'ISR en libérant des molécules qui induisent une résistance chez la plante. Ainsi, ces rhizobactéries offrent un potentiel pour être utilisées comme agents de biocontrôle et biofertilisants dans l'agriculture durable.

I.4. Le Zinc

I.4.1. Définition

Le zinc, élément du groupe II.B 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 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**).

I.4.1.2. 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.4.1.3. 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.4.1.4. 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 ; Burdet al. 2000 ; Wani et al. 2007 ; Saravanan et coll. 2011**) et la production de dérivés de gluconate ou d'acide

Chapitre I : Revue Bibliographique

gluconique, par exemple, Acide 2-céto-gluconique (**Fasimet *et al.* 2002**), acide 5-cétogluconique (**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.



Chapitre II :
Matériel et
méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Isolement des rhizobactéries solubilisant le zinc

II.1.1. Echantillonnage

Les échantillons ; petit pois, fève, betterave, oignon, fraise ont été prélevés durant le mois de février dans des différents sites de cultures (Benabdelmalek Ramdane, Hchem, sidi flag, Mesra) à Mostaganem nord-ouest d'Algérie. Ces prélèvements ont été effectués à une profondeur de 15 cm placés dans des sacs en plastiques et finalement en suite transporter au laboratoire pour le reste des tests (**figure 02**).



Figure 02 :prélèvement des échantillons de sol.

II.1.2. Isolement des rhizobactéries

Pour l'isolement des rhizobactéries solubilisant le zinc, 10g de sol ont été mélangés avec 90 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une solution mère. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, une dilution en série a été réalisée en transférant 1 ml de la solution mère dans 9 ml d'eau physiologique, pour avoir des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} . Ensuite, à l'aide de pipette pasteur, 0.1 ml des dilutions 10^{-4} à 10^{-6} a été prélevés et étalés à la surface du milieu de culture Bunt and Rovira (**Annexe 01**), les boîtes ont été étiquetées par les informations nécessaire (date, échantillon, milieu) et incubées à 30°C pendant 7 jours pour permettre la croissance et le développement des colonies bactériennes (**Saravanan et al, 2003**).

II.2. Purification et conservation des isolats

Les colonies entourées d'un halo de solubilisation ont été isolées et purifiées par la méthode de strie sur le milieu Gélose Nutritif (**Annexe 01**). Cette étape visait à obtenir des cultures pures de chaque isolat (**Bapiri et al, 2012**). Pour conserver les isolats, ils ont été ensemencés

Chapitre II : Matériel et méthode

dans des tubes contenant le milieu G.N inclinée, les tubes ont été incubé a 30⁰c pendant 24h. Après l'incubation, les isolats ont été mis dans un frigo à 4⁰C (Smith *et al*, 2012).

II.3. Caractérisation des isolats

II.3.1. Caractérisation macroscopique

L'observation macroscopique consiste à observer et analyser les caractéristiques visibles a l'œil nu des colonies bactériennes cultivées sur G.N. Cela comprend des aspects tels que la taille, la forme, la couleur et d'autres aspects. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et la température et l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées (Atlas *et al*. 2010).

II.3.2. Caractérisation microscopique

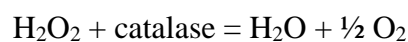
II.3.2.1. Coloration de gram

Technique utilisée pour différencier les bactéries en fonction de la structure de leur paroi cellulaire et pour identifier les déférentes formes des bactéries. Les étapes de cette ont été ensuite, Fixation des bactéries sur des lames de verre en les chauffant légèrement ensuite, application de la solution de cristal violet sur chaque préparation et laissée en contact pendant une minute ensuite, rinçage des lames à l'eau pour éliminer l'excès de colorant. Ensuite, application de la solution d'iodure de potassium (lugol) sur chaque lame et laissée agir pendant une minute supplémentaire. Rinçage à nouveau des lames à l'eau. Décoloration en ajoutant de l'alcool pendant quelques secondes jusqu'à ce que plus de colorant ne s'écoule. Rinçage rapide à l'eau pour stopper la décoloration. Application de la solution de fuchsine sur chaque lame pendant une minute pour contre-colorer. Rinçage à nouveau des lames à l'eau pour éliminer l'excès de fuchsine. Enfin, Observation au microscope pour noter la coloration des bactéries (Gram, 1884).

II.4. Tests biochimiques

II.4.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez les bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage.



Chapitre II : Matériel et méthode

Une goutte de peroxyde d'hydrogène a été déposée sur une lame propre. Des colonies bactériennes ont mélangé avec le peroxyde d'hydrogène. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de di oxygène : le test catalase est positive et s'il n'ya pas de bulles : le test catalase est négatif (Delarras, 2007).

II.4.2. Test d'oxydase

Ce test a été réalisée pour identifier les bactéries qui possèdent l'enzyme cytochrome c oxydase, une plaque d'oxydase préparée a été utilisée pour évaluer la présence de cet enzyme chez les bactéries testées. L'identification des bactéries a été réalisée par l'observation de la couleur des bactéries sur la plaque (Bendoukhane et Djafer, 2016).

II.5. Test de solubilisation du zinc :

Les isolats bactériens purifiés ont ensuite été soumises à des tests qualitatifs pour évaluer leur capacité à solubiliser le zinc. Ce test a été réalisée en cultivant les souches pures par technique de spot sur le milieu BR, les boites ont été devisées sur quatre coté chaque cotés porte un code d'isolat. Les boites ont été incubées à 30⁰c pendant 5 jours (Sharma *et al* 2014). La capacité de la solubilisation a été mesurée par la formule suivante :

$$E_s = (DS / DC) * 100$$

ES : efficacité de solubilisation.

DS : diamètre de solubilisation.

DC : diamètre de colonie.

II.6. Evaluation des activités PGP

II.6.1. Solubilisation de phosphate

II.6.1.1. Test qualitatif sur milieu Pikovskaya

Ce test a été réalisée en cultivant les isolats purs par technique de spot sur le milieu PVK (Annexe 01) contenant le Ca₃(Po₄)₂ comme seule source de phosphate insoluble, les boites ont été devisé sur quatre, chaque cotés porte un code d'isolat. Les boites ont été incubées à 30⁰c pendant 5 jours. La solubilisation du P complexé est mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie. La capacité de solubilisation des isolats a été estimée par mesure du diamètre total (le diamètre du halo + le diamètre de la colonie) pour chaque colonie (Ravindra Naik *et al*, 2008).

Par la formule suivante :

$$E_s = \frac{\text{Diamètre d' halo (mm)} - \text{Diamètre de la colonie (mm)}}{\text{diamètre de la colonie (mm)}} * 100$$

II.6.1.2. Test quantitatif sur milieu NBRIP

1 ml de la culture bactérienne à été transféré dans des flacons contenant de 50 ml de NBRIP (**Annexe 01**) incubé dans un agitateur de 160 rpm pendant 7 jours. Après incubation le mélange a été transféré dans des tubes à centrifuger et centrifuger à 6000 rpm pendant 20 min. à la fin de la centrifugation, 1 ml de chaque surnageant a été mis dans des fioles de 50 ml plus 2.5 ml de réactif de Barton (**Annexe 02**) le volume a été compléter par l'eau distillé jusqu'à 50 ml. Après 10 min, la lecture de la densité optique a été effectuée à 430 nm (Spectrophotomètre *JENWAY 6715*) (**Misra et al, 2012**).

Le phosphore soluble à été calculé à partir de l'équation de régression d'après la courbe d'étalonnage (**Annexe 04**).

II.6.2. Test de la production de l'AIA

L'analyse quantitative de la production de l'acide indole acétique a été effectuée suivant la méthode décrite par **Loper et Schroth (1986)**. Le milieu LB additionné de 100 mg/L de L-tryptophane a étéensemencée par 1 ml de la culture bactérienne ($DO_{620} = 0.8$) de chaque isolat. Après incubation à 30 °C pendant 96 h dans l'obscurité dans une étuve agitée à 160 rpm, 5 ml de la culture ont été centrifugés à 6000 rpm pendant 20 min, 1 ml de surnageant a été additionné de 2 gouttes d'acide ortho-phosphorique et 2 ml de réactif de Salkowski (50 ml d'acide perchlorique à 35% + 1 ml de $FeCl_3$ à 0.5M).

Après 30 min d'incubation à température ambiante dans l'obscurité, le développement de la couleur rose ou rouge indique la production de l'AIA. La densité optique a été mesurée à 530 nm (Spectrophotomètre *JENWAY 6715*).


Les concentrations de l'AIA ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle de 0 à 100 mg/L (**Annexe 04**).

II.6.3. Test de la production de HCN

La méthode de **Soltani et al, (2012)** a été utilisée pour tester la production de l'acide cyanhydrique (HCN), chaque isolat a étéensemencée par étalement sur la surface de gélose nutritif additionné de 4.4 g/l de glycine, un papier filtre whatman n°1 trempé a une solution de

Chapitre II : Matériel et méthode

Na_2CO_3 à 2% dans l'acide picrique à 0.5% a été déposé sur le couvercle de la boîte, ensuite les boîtes ont été scellées avec du para film et incubées à 30 °C pendant 4 jours. Le développement de la couleur brune rouge ou brune claire indique la production de l'acide cyanhydrique (HCN).



Chapitre III :
Résultats et
discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Isolement et purification des rhizobactéries solubilisent le zinc

L'isolement et la purification des isolats bactériens à partir de la rhizosphère a permis de récolter 37 isolats avec des différents diamètres d'halo de solubilisation dans chaque échantillon (**figure 03, 04**).

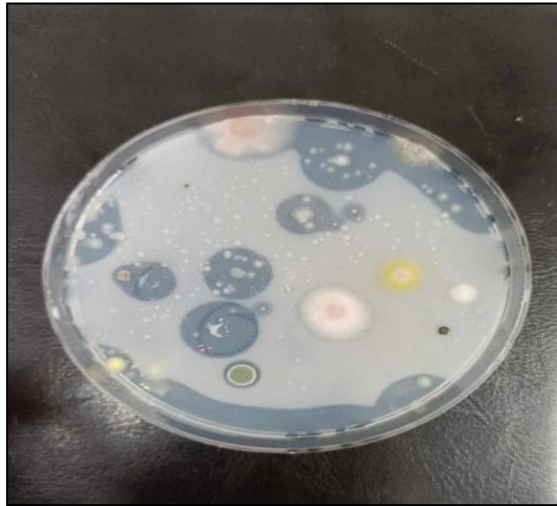


Figure 03 : Isolement des BSZ dans milieu B.R.



Figure 04 : les isolats Az2 et Kz2.

L'isolement de 37 isolats de rhizobactéries de la rhizosphère, avec des diamètres d'halo de solubilisation du zinc variés pour chaque échantillon. Gontia-Mishra *et al.* (2013) ont isolé 35 souches de *Bacillus* solubilisant le zinc, tandis que Rodriguez & Fraga (1999) ont isolé 42 souches de rhizobactéries solubilisant le

phosphate et le zinc. De même, Saharan&Nehra(2011) ont isolé 30 souches de rhizobactéries solubilisant le zinc à partir d'échantillon de sol d'oignon.

III.2. Caractérisation macro et microscopiques des isolats

La caractérisation macroscopiques des isolats a montré la présence des colonies de forme et de taille variable , transparente et opaque , de couleur blanc jaunatre et jaune et blanc.(Annexe 03).

Après la coloration de gram, l'observation microscopique des isolats a grossissement 100 a été effectuée. parmi les isolats observées 80% forme bacillaire et 20% forme cocci. La coloration de gram nous a permis de différencier les bactéries d'après la couleur , les gram positifs se caractérisant par la couleur violette et les gram négatifs sont identifiées par la couleur rose , 72% des isolats sont des gram négatifs et 28% des isolats sont des gram positifs.(Figure 05,06).

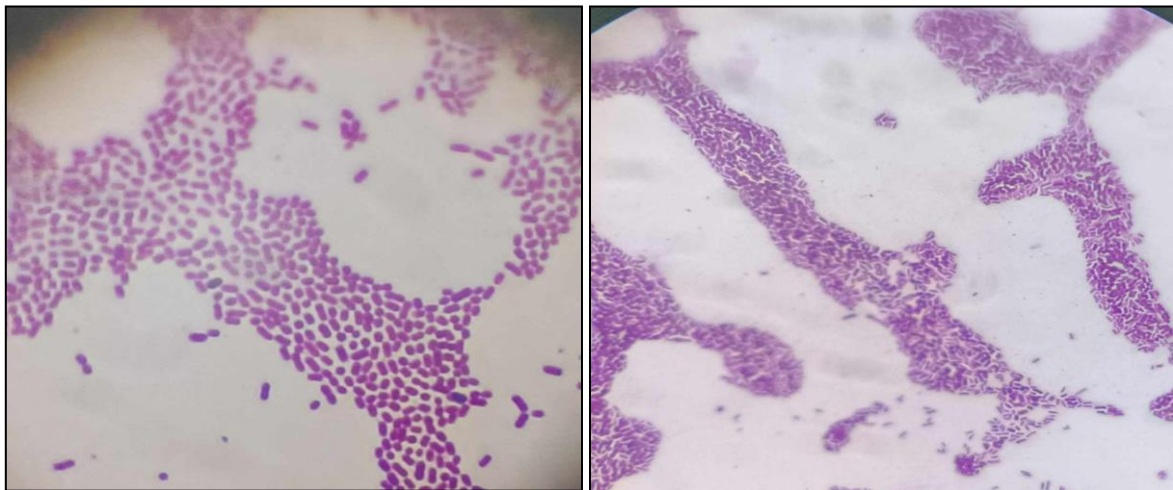


Figure 05: Aspect microscopique des isolats Tz1a , Wz2 (grossissement 100).

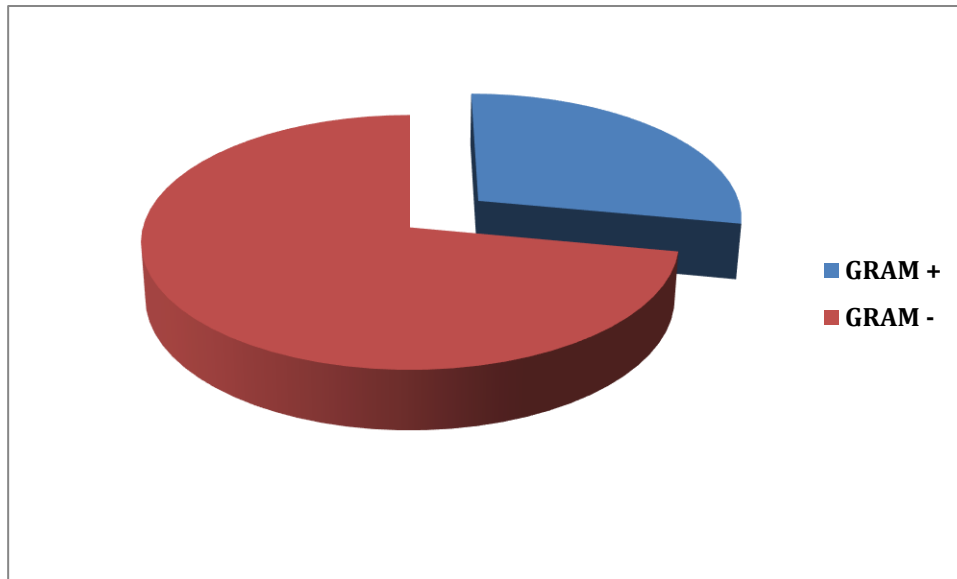


Figure 06 : Pourcentage de la coloration de gram des isolats.

La caractérisation morphologique des isolats a permis de constater que l'ensemble des isolats bactériens sont des bacilles et la plupart des bactéries sont des gram négatif. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont été montrées que les bactéries bacillaires à gram négatif sont très abondantes dans la rhizosphère des plantes (**khan *et al*, 2010**).

III.3. Test biochimique

III.3.1. Test de catalase

Dans notre étude 92% des isolats ont montré un dégagement des bulles d'air, ce qui signifie la présence de l'enzyme catalase, 8% des isolats ont montré une réponse négative, il n'y a pas de dégagement des bulles, l'absence de l'enzyme catalase (**Figure 07**).



Figure 07 : test de catalase de l'isolat Ez4b.

III.3.2. Test d'oxydase

Parmi nos isolats bactériens, les résultats de la recherche de l'enzyme respiratoire 72% étaient oxydase + et 28% oxydase -, ce qui signifie que la majorité des isolats possèdent l'enzyme

(cytochrome oxydase). Selon (Bendoukhane et Djafer , 2016), l'oxydase est l'un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, par l'apparition d'une couleur violette a l'endroit ou la colonie a été déposée surtout celles a gram négatifs.

III.4. Test de solubilisation de zinc

Les 37 isolats purs ont été cultivées sur le milieu BR, 25 isolats ont montrés une réponse positive signifie qu'ils solubilisent le zinc avec des différentes efficacités, par contre 12 isolats ont montrés une réponse négative, la solubilisation a été suivie par le calcul de l'efficacité de solubilisation par le diamètre de la colonie et la zone ou l'halo de solubilisation (figure 08).

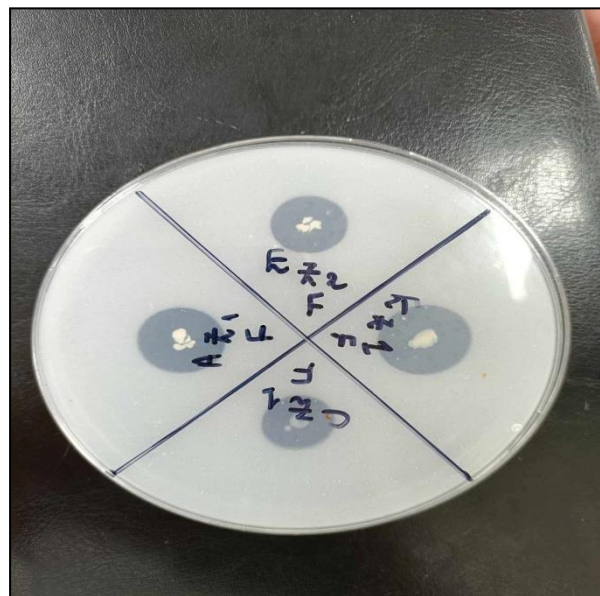


Figure 08 : La solubilisation du zinc par les isolats Az1,Cz1,Ez2,kz1.

Une solubilisation maximale de zinc a été observé chez les isolats Wz2, Xz2, Az2 et Kz2, avec des efficacités de solubilisation allant de $632,33 \pm 2,52$ à 442 ± 2 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Les isolats Cz1, Ez1, Dz1, Xz4, Az1, Oz2, Hz1, Tz1a, Pz2, Tz2, Fxz1b1.2, Xz2 et Ez2 ont montré une efficacité de solubilisation moyenne, avec des valeurs comprises entre 418 ± 3 et 269 ± 2 . Les isolats Pz1b, Wz1, Bz1, Ez4b, Xz3 et Cz2 ont montré une faible efficacité de solubilisation, variant de $204 \pm 1,02$ à $147 \pm 2,06$ par rapport aux autres isolats. En revanche, les isolats Ez4a, Ez6a, Ez6b, Fxz1a, Fxz1b1, Fxz1b2, Oz3b1, Pz3c1, Qz3o2 et Vz1 ont montré une réponse négative à la solubilisation de zinc.

De nombreuses stratégies sont disponibles pour aider à augmenter les niveaux de zinc dans les plantes sans nuire à l'environnement (Cakmak.2008 ; White and Broadly, 2011) La variation du diamètre de formation de la zone d'halo indique une variation dans le degré de solubilisation. Diverses études ont rapporté des variations dans la solubilisation par des souches bactériennes (Sharma *et al*, 2011 ; Ramesh *et al*, 2014a ; Khande *et al* ; 2017). Après l'analyse de la variance (Annexe 03) les isolats ont montré des niveaux variés de ZSE de 147 ± 2.06 jusqu'à 632.33 ± 2.52 , ces résultats sont plus efficaces que les résultats de Ramesh *et al* (2014) ils ont trouvé des efficacités de 148 jusqu'à 427. Nos résultats étaient presque similaires aux résultats de Saravanan *et al*, (2007) où ils ont trouvé des efficacités entre 150 et 630, sauf que (Saharan *et al*, 2011) ont trouvé des meilleures efficacités que nos résultats avec des valeurs de 750.

III.5. Evaluation des activités PGP

III.5.1. Solubilisation de phosphate

III.5.1.1 Test qualitatif sur milieu PVK

Les 25 isolats ont été cultivés sur le milieu PVK, 12 isolats ont montré une réponse positive de solubilisation de phosphate par différentes efficacités, 13 isolats ont montré une réponse négative (figure 09).



Figure 09: solubilisation du phosphate par les BSZ.

Les isolats Pz3b, Wz2, Bz1 et Kz2 ont montré une forte solubilisation de phosphate, avec une efficacité comprise entre $79,17 \pm 1,002$ et $64,83 \pm 0,95$. Les isolats Az2, Ez1, Hz1 et Ez2 ont montré une solubilisation moyenne, avec une efficacité allant de $53,27 \pm 1,15$ à $45,03 \pm 1,15$. Les isolats Xz1, Az1, Pz1a et Oz2 ont montré une faible solubilisation, avec une efficacité de

Chapitre III : Résultats et Discussions

41,47 ± 1,002 à 32,3 ± 0,9. En revanche, les isolats Cz1, Cz2, Dz1, Fxz1b1.2, Kz1, Pz2, Tz1a, Tz2, Wz1, Xz2, Xz3 et Xz4 ont montré une réponse négative à la solubilisation de phosphate.

nos résultats sont similaire aux résultats de Sundara Rao *et al* (1963) avec des efficacités de solubilisation de 35 à 75.

III.5.1.2. Test quantitatif sur milieu NBRIP

Tous isolats ont été cultivées dans le bouillon NBRIP, ils ont montré une réponse positive à la solubilisation de phosphate, la densité optique a été mesurée par le S-UV visible à longueur d'onde de 430 nm (figure 10 et 11).



Figure 10 : Témoin , l'isolat Tz1a.

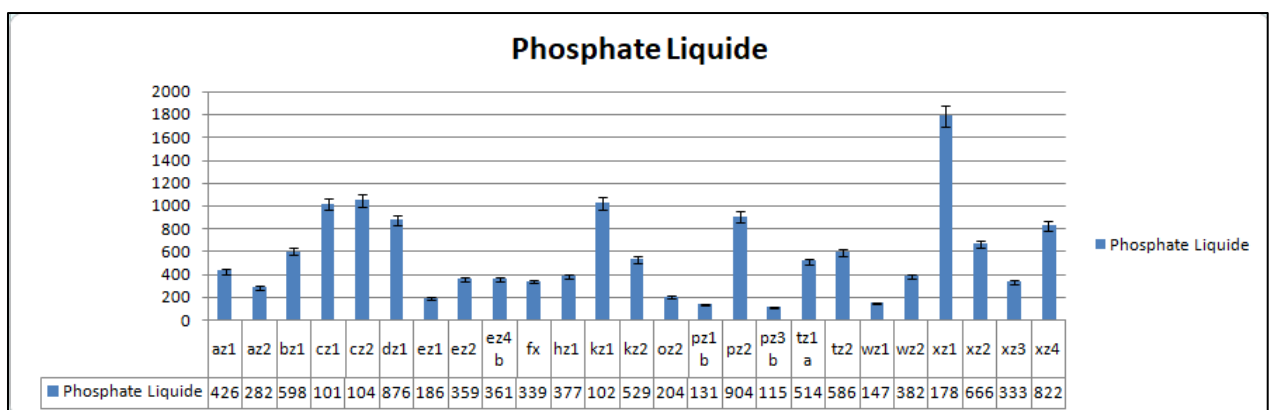


Figure 11 : Evaluation de la concentration de phosphate soluble par les isolats.

Selon l'analyse de la variance (Annexe 03), les résultats ont montré que tous les isolats solubilisent le phosphate par des concentrations différentes de 186.43±

Chapitre III : Résultats et Discussions

2.86 jusqu'à 1786.4 ± 7.1 $\mu\text{g/ml}$, les résultats obtenus sont plus efficaces que celles de (Chen *et al*, 2006), ils ont rapporté des concentrations entre 150 et 280 $\mu\text{g/ml}$, les chercheurs (Gaur *et al*, 1990) ont trouvé des résultats presque similaire à nos résultats avec des concentrations de 200 à 1700 $\mu\text{g/ml}$, par contre (Whitelaw *et al*, 2000) ont trouvé des concentrations plus efficaces à nos résultats de 2500 à 2700 $\mu\text{g/ml}$.

III.5.2. Test de production de l'AIA

Les 25 isolats BSZ ont été cultivée dans le bouillon LB+Tryptophane, la production de l'AIA a été suivie par l'apparition du couleur soit le rose ou le rouge du mélange (1 ml de surnageant + 2 ml réactif de salkowski + 2 gouttes d'acide phosphorique après incubation de 30 min) (figure 12).

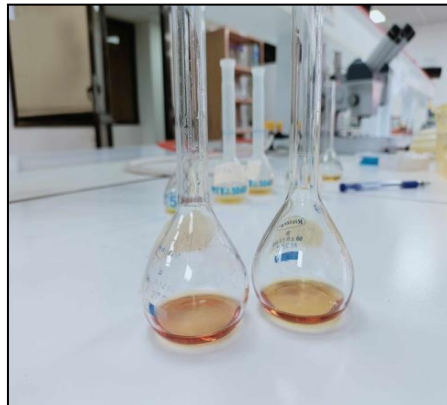


Figure 12 : Production de l'AIA par les isolats Kz1 et Az2.

Selon l'analyse de la variance (Annexe 03), les isolats Tz1a, Xz2, Az1 et Kz1 ont produit de l'AIA (acide indole-3-acétique) de manière efficace, avec des concentrations élevées variant de $24,33 \pm 0,037$ à $10,48 \pm 0,049$ $\mu\text{g/ml}$. Les isolats Wz1, Oz2, Cz1, Ez2 et Bz1 ont produit de l'AIA à des concentrations moyennes allant de $7,02 \pm 0,0488$ $\mu\text{g/ml}$ à $4,54 \pm 0,085$ $\mu\text{g/ml}$. En revanche, les isolats Xz4, Dz1 et Az2 ont montré des faibles concentrations de production d'AIA, comprises entre $3,65 \pm 0,0024$ et $2,63 \pm 0,048$ $\mu\text{g/ml}$. Enfin, les isolats Tz2, Hz1, Xz3, Cz2, Pz1b, Pz2, Wz2, Xz1, Ez1, Fxz1b1.2, Pz3b, Ez4b et Kz2 ont montré une réponse négative en termes de production d'AIA (figure 13).

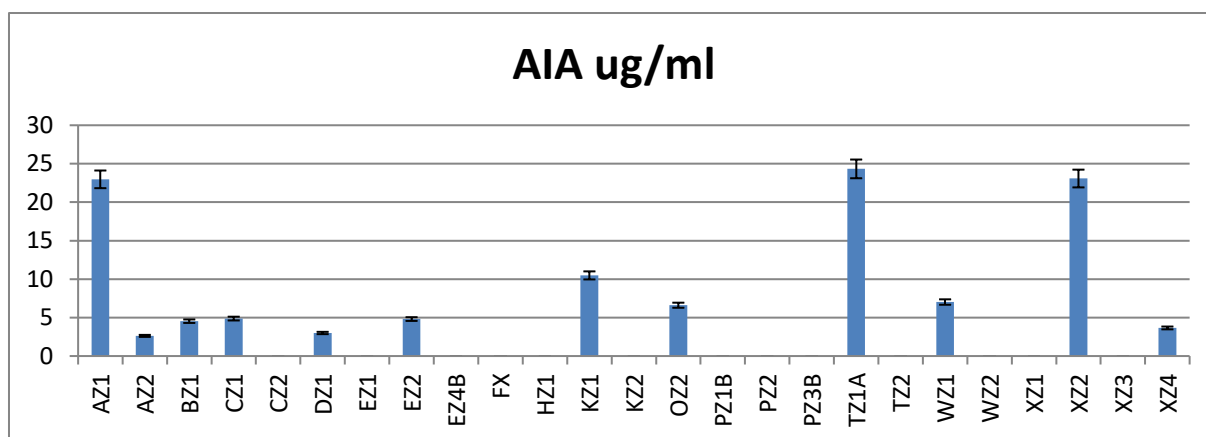


Figure 13 : Evaluation de la concentration d'AIA par les isolats.

Après l'analyse de la variance (**Annexe 03**), Nos valeurs se situent dans la plage moyenne à élevé par rapport à celles rapportées par Tsavkelova *et al.* (2007) et Khalid *et al.* (2004), avec des productions d'AIA respectives allant de 5 à 25 $\mu\text{g/mL}$ et de 3 à 20 $\mu\text{g/mL}$. En comparaison avec les études présentant des résultats plus élevés, telles que celles de Patten & Glick (2002) et Spaepen *et al.* (2007), qui ont enregistré des productions d'AIA allant jusqu'à 40-50 $\mu\text{g/mL}$, nos isolats démontrent une production d'AIA modérément efficace. À l'opposé, les études avec des résultats plus bas comme celles d'Ahmad *et al.* (2005) et Loper & Schroth (1986), qui ont observé des productions d'AIA de 1-5 $\mu\text{g/mL}$ et de 0,5-3 $\mu\text{g/mL}$ respectivement, montrent que nos isolats sont plus efficaces que certains autres.

III.5.3 Production de l'acide cyanidrique

Tous les 25 BSZ sont cultivées dans le milieu GN+Glycine, l'apparition du couleur de jaune vers le brune rouge ou le brune claire signifie la présence de l'acide (figure 14).



Figure 14 : production de l'acide cyanidrique par les isolats

Chapitre III : Résultats et Discussions

Les isolats Az2, Ez1, Ez2, Ez4b, Hz1, Tz1a, Xz1, Xz2 et Wz2, Cz1, Cz2, Dz1, Fxz1b1.2, Pz1b, Pz2, Pz3b, Wz2, Tz2, Xz3 et Xz4 ont montrés une réponse positif à la production d'HCN. En revanche, les isolats Wz1, Oz2 et Kz2 ont montrés une réponse négative au test (**Figure 15**).

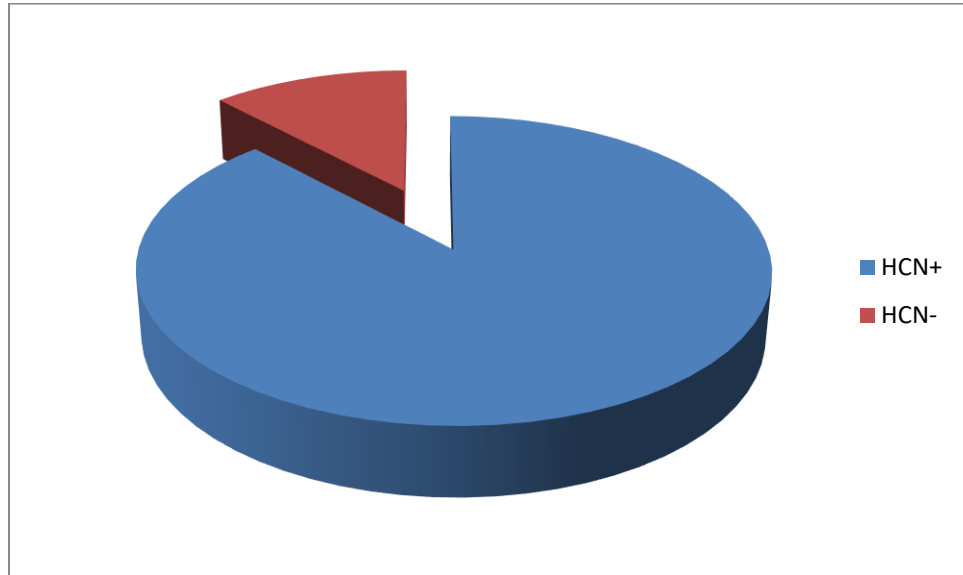


Figure 15 : Pourcentage de production de HCN.

Le cyanure d'hydrogéné (HCN) est un composé volatile antimicrobien a large spectre impliqué dans le contrôle biologique des maladies des racines par *Pseudomonas fluonrescens* associée aux plantes , il est produits en quantités différentes par différente espèces de *Pseudomonas*, mais aussi par d'autres bactéries (**Ramette et al, 2003 ; Weisskopf, 2013**).

Dans ce travail , tous les isolats ont montré une réponse positif de la production d'HCN. Sauf que les isolats Wz1,Oz2,Kz2 montré une réponse négatif signifie l'absence de gène responsable de la production de ce métabolite (**Laville et al, 1998**).



Conclusion

Conclusion

Les rhizobactéries ont été isolées à partir de divers échantillons de sol, en se concentrant sur celles capables de solubiliser le zinc. Ces isolats ont été purifiés et conservés en utilisant des méthodes standardisées pour garantir leur viabilité à long terme, permettant ainsi une analyse approfondie de leurs propriétés. Ce travail a permis d'explorer le potentiel des rhizobactéries solubilisant le zinc et le phosphate en tant qu'agents promoteurs de croissance des plantes (PGP). Plusieurs étapes clés ont été suivies pour atteindre cet objectif, aboutissant à des résultats prometteurs pour l'agriculture durable.

Des tests de solubilisation du zinc ont été effectués pour évaluer la capacité des isolats à rendre le zinc disponible pour les plantes. Les résultats ont montré une variation significative dans les capacités de solubilisation parmi les isolats, allant de 147 ± 2.06 à 632.33 ± 2.52 $\mu\text{g/mL}$, indiquant un potentiel différentiel pour l'application agricole.

L'identification des isolats a été réalisée à travers des observations microscopiques et macroscopiques. Cette étape a permis de déterminer les caractéristiques morphologiques distinctives de chaque isolat, facilitant ainsi leur classification et leur identification.

Les isolats ont été soumis à des tests biochimiques pour déterminer la présence des enzymes catalase et oxydase. Ces tests sont cruciaux pour caractériser les capacités métaboliques des isolats et pour leur identification taxonomique.

L'évaluation des activités PGP des isolats a inclus des tests de solubilisation du phosphate (en milieu solide et liquide), allant de $32,3 \pm 0,9$ à $79,17 \pm 1,002$ $\mu\text{g/mL}$, la production d'acide indole acétique (AIA), allant de $2,63 \pm 0,048$ à $24,33 \pm 0,037$ $\mu\text{g/mL}$, et la production d'acide cyanidrique (HCN). Les résultats ont révélé que plusieurs isolats possèdent des activités multiples de promotion de la croissance des plantes, rendant ces rhizobactéries particulièrement intéressantes pour une utilisation en agriculture.

Les résultats obtenus démontrent que les rhizobactéries étudiées possèdent un potentiel significatif pour être utilisées comme biofertilisants et agents de

biocontrôle en agriculture. Leur capacité à solubiliser le zinc et le phosphate, couplée à la production de phytohormones et de composés antimicrobiens, en fait des candidats prometteurs pour améliorer la croissance et la santé des plantes de manière écologique et durable. Ces résultats ouvrent la voie à des études supplémentaires pour optimiser l'utilisation de ces isolats dans divers contextes agricoles et pour comprendre pleinement leurs mécanismes d'action.



***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- **Abhilash, P. C., & Singh, N. (2009).** Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 727-740.
- **Ahmad, M., & Kibret, M. (2013).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univer-Science*, 26(01), 1-20.
- **Antoun, H., & Prévost, D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 1-38).
- **Aouar, L. (2012).** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Mémoire de master. Université Mentouri, Constantine, p. 5.
- **Ashley, J. T. F. (1996).** Adsorption of Cu(II) and Zn(II) by estuarine, riverine, and terrestrial humic acids. *Chemosphere*, 33(11), 2175-2187.
- **Ashley, J. T. F. (1996).** Adsorption of Cu(II) and Zn(II) by estuarine, riverine, and terrestrial humic acids. *Chemosphere*, 33(11), 2175-2187.
- **Atlas, R. M. (2010).** *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press.
- **Baca, B. E., & Elmerich, C. (2007).** Microbial Production of Plant Hormones. In C. Elmerich & W. E. Newton (Eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations* (pp. 113-143). Springer, Netherlands.
- **Bapiri, A., Asgharzadeh, A., Mujallali, H., Khavazi, K., & Pazira, E. (2012).** Evaluation of zinc solubilization potential by different strains of fluorescent pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4), 911-917.
- **Bashan, Y., & Holguin, G. (1998).** Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16, 729-770.
- **Beauchamp, C. J. (1993).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*, 74(1), 19-27.

Références bibliographiques

- **Bendoukhane, L., & Djafer, N. (2016).** Isolation and characterization of rhizospheric bacteria from maize (*Zea mays* L.) for their potential use as plant growth promoting rhizobacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 10(16), 536-543.
- **Bendoukhane, S., & Djafer, L. (2016).** Evaluation de l'activité des rhizobactéries dans la promotion de la croissance des plantes. *Revue des Bioressources*, 6(2), 45-54.
- **Bowen, G. D., & Rovira, A. D. (1991).** Microbial colonization of plant roots. *Annual Review of Phytopathology*, 14, 121-144.
- **Campbell, R., & Greaves, M. P. (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere. In J. M. Lynch (Ed.), *The Rhizosphere* (pp. 11-34). Wiley J & Sons, Ltd, Essex.
- **Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M. L., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 748-754.
- **Corbaz, R. (1990).** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes.
- **Darrah, P. R. (1993).** The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155, 1-20.
- **Dastager, S. G., Deepa, C. K., & Pandey, A. (2010).** Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 357-364.
- **Datta, C., & Basu, P. S. (2000).** Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiological Research*, 155(2), 123-127.
- **Davet, P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Éditions INRA, pp. 52-57.
- **Delarras, C. (2007).** Techniques de biochimie et biologie moléculaire. Dunod.
- **Dommergues, Y. (1975).** Pourquoi et comment développer les recherches sur la rhizosphère? *Bulletin de la Société Botanique de France*, 122(sup2), 7-19.

Références bibliographiques

- **El Zahaby, M.** Contribution à la définition d'une norme des sites pollués. Élaboration 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., & O'halloran, T. V. (2003).** Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*, 300, 931-936.
- **Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951).** Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192-195.
- **Gram, H. C. (1884).** Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. Fortgesetzte Untersuchungen über die Eigenschaften der Bakterien und ihre Beziehungen zum Eiter-, Blut- und Milzbrandbacillus. Fortsetzung. (In German).
- **Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, Waterloo.
- **Gull, M., Hafeez, F. Y., Saleem, M., Malik, K. A., & Danish, S. (2004).** Phosphate solubilizing rhizobacteria associated with chickpea in saline-sodic soil. *Pakistan Journal of Botany*, 36(4), 845-855.
- **Gull, M., Hafeez, F. Y., Saleem, M., Malik, K. A., & Hafeez, F. Y. (2004).** Phosphate uptake and growth promotion of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by coinoculation of mineral phosphate solubilizing bacteria and a mixed rhizobial culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(6), 623-628.
- **Haas, D., & Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 19-307.

Références bibliographiques

- **Haas, D., & Defago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 19-307.
- **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. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(1), 66-76.
- **Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008).** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312, 7-14.
- **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*, 28, 125-135.
- **Helluy, S., & Holmes, J. C. (2005).** Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural Processes*, 68, 205-210.
- **Hiltner, L. (1904).** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grunddüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59-78.
- **Hinsinger, P., Brauman, A., Devau, N., Gérard, F., Jourdan, C., Laclau, J. P., ... & Plassard, C. (2011).** Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? *Plant and Soil*, 348(1-2), 29-61.
- **Inglett, P. W., & Reddy, K. R. (2006).** Investigating the effects of site-specific conditions on the potential for phenol oxidase activity in wetland soils of the Florida Everglades. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1938-1945.
- **Jacobsen, C. S., & Poulsen, P. H. B. (1997).** Growth and survival of *Pseudomonas fluorescens* DF57 in soil microcosms: Effect of soil clay content and bacterial culture density. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(1), 53-62.
- **Jelenkovic, I., & Anderson, A. J. (1986).** Influence of fluorescent pseudomonads on the root morphology of sugar beet. *Phytopathology*, 76(1), 610-614.
- **Kang, S. C., & Lee, J. D. (2000).** Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control bacterial wilt of pepper. *Plant Pathology Journal*, 16, 14-22.

Références bibliographiques

- **Kloepper, J. W., & Schroth, M. N. (1978).** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, France (pp. 879-882).
- **Kremer, R. J., & Souissi, T. (2001).** Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Current Microbiology*, 43, 182-186.
- **Lakhdar, A. (2011).** Effet de la salinité sur les paramètres morpho-physiologiques chez les variétés locales d'orge (*Hordeum vulgare* L.). Mémoire de Magistère, Université El Hadj Lakhdar-Batna.
- **Lugtenberg, B. J. J., & Dekkers, L. C. (1999).** What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*, 1(1), 9-13.
- **McCully, M. E. (2001).** Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28(10), 983-990.
- **Othman, S. (2014).** Biologie de la rhizosphère des plantes. Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- **Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- **Pérez-Montaña, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., & Ollero, F. J. (2014).** Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5-6), 325-336.
- **Poirier, J. (1997).** Nutrition minérale des plantes et fertilisation. Québec, Canada : Éditions MultiMondes.
- **Prévost, D. (2008).** Microbiologie des sols et environnement. Presses de l'Université Laval.
- **Reynaud, P. (2002).** Les maladies des plantes cultivées, diagnostic, observation, symptômes. INRA.

Références bibliographiques

- **Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006).** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1-2), 15-21.
- **Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006).** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287, 15-21.
- **Säid, Z., Brauman, A., Gkorezis, P., Nasraoui, B., & Piredda, R. (2011).** Microbial Ecology of the Rhizosphere and its Importance for Plant Health and Growth. In H. El Enshasy, A. Driouich, & A. Ouhdouch (Eds.), *Microbial Strategies for Crop Improvement* (pp. 1-34). Springer.
- **Scher, F. M., & Baker, R. (1982).** Effects of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 72, 1567-1573.
- **Sharma, P., & Dubey, R. C. (2009).** Plant growth promoting rhizobacteria: An overview. *J Mycol Pl Pathol*, 39(1), 103-106.
- **Sharma, P., & Kumar, S. (2011).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *E3 Journal of Agricultural Research and Development*, 1(2), 022-030.
- **Singh, J. S., Singh, D. P., & Nair, A. (2012).** *Soil health and climate change*. Springer.
- **Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- **Wakelin, S. A., Warren, R. A., & Harvey, P. R. (2004).** Phosphate solubilizing microorganisms associated with improved fertility in an Australian Canola cropping system. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 697-706.
- **West, E. R., Cother, E. J., Steel, C. C., & Ash, G. J. (2010).** The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(3), 209-216.
- **Xu, J. (2013).** *Microbial Ecology in Sustainable Agroecosystems*. CRC Press.

Références bibliographiques

- **Zaidi, A., & Khan, M. S. (2006).** Co-inoculation effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on green gram-*Bradyrhizobium* symbiosis. *Agriculture and Environmental Biotechnology*, 1(4), 117-127.



Annexes

Annexes

Annexe 1 : Milieu de culture

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.....	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

Annexes

Extrait de levure.....	0.5 g
Pourpre de bromocrésol.....	0.1 g
Agar.....	20 g
Ph.....	7.2

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

Annexes

Annexe 2 : les réactifs

1. Réactif de Barton :

Solution A : Ammonium molybdate

Dissoudre 12.5 g d'ammonium molybdate $(\text{NH})_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, dans 200 ml d'eau distillé.

Solution B : Ammonium Vanadate

Dissoudre 0.625 g d'ammonium Vanadate $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_4$ dans 150 ml d'eau distillée bouilli et laisse au froid puis ajouter 125 ml d'acide nitrique à 60%.

La réaction de Vanado-molybdate (Barton) :

La solution B est mise dans une fiole de 500 ml, puis la solution A est ajoutée et le volume est complété par l'eau distillé.

2. Réactif de salkowski : dans 1l

Acide perchlorique.....50 ml

FeCl_3 de 0.5 M..... 1.62g

3. Solution picrate de sodium : dans 100 ml

Acide picrique.....5g

Carbonate de sodium.....2g

Annexes

Annexe 03 : Analyse de variance des paramètres étudiés

Zinc :

Analyse de la variance

<u>Source</u>	<u>DL</u>	<u>SomCar ajust</u>	<u>CM ajust</u>	<u>Valeur F</u>	<u>Valeur de p</u>
souches	24	1010337	42097,4	6036,91	0,000
Erreur	50	349	7,0		
Total	74	1010686			

Phosphate solide :

Analyse de la variance

<u>Source</u>	<u>DL</u>	<u>SomCar ajust</u>	<u>CM ajust</u>	<u>Valeur F</u>	<u>Valeur de p</u>
souches	24	61393,5	2558,06	5285,25	0,000
Erreur	50	24,2	0,48		
Total	74	61417,7			

Phosphate liquide :

Analyse de la variance

<u>Source</u>	<u>DL</u>	<u>SomCar ajust</u>	<u>CM ajust</u>	<u>Valeur F</u>	<u>Valeur de p</u>
souches	24	10870651	452944	31171,69	0,000
Erreur	50	727	15		
Total	74	10871378			

AIA :

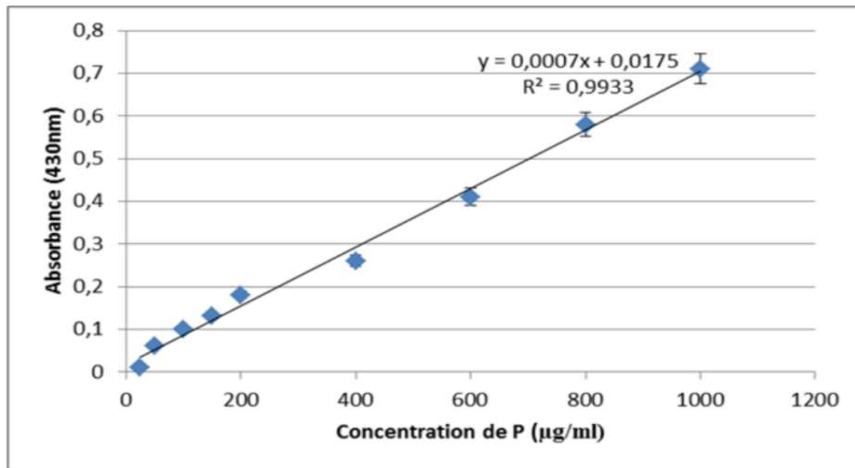
Analyse de la variance

<u>Source</u>	<u>DL</u>	<u>SomCar ajust</u>	<u>CM ajust</u>	<u>Valeur F</u>	<u>Valeur de p</u>
souches	24	4286,22	178,593	124398,17	0,000
Erreur	50	0,07	0,001		
Total	74	4286,30			

Annexe 4 : Courbes d'étalonnage

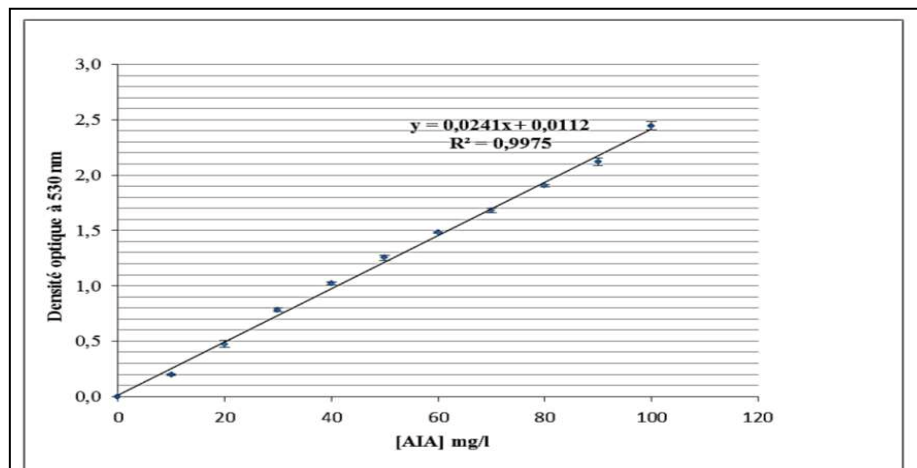
Phosphate:

Annexes



Courbe d'étalonnage de phosphate (Hamoum, 2017)

AIA :



Courbe d'étalonnage de l'AIA (Hamoum, 2017).