

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{me} MEDJAHED Saadia

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER ENSCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

Contribution à l'Amélioration de quelques activités PGP par mutagénèse

JURY

Président :	<i>Mékhaldi A</i>	<i>Professeur</i>	U. Mostaganem
Encadreur :	<i>Hamoum.H</i>	<i>MCB</i>	U. Mostaganem
Examineur :	<i>Chibani A</i>	<i>Professeur</i>	U. Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire Pédagogique de Microbiologie 1

Année Universitaire 2021/2022

Remerciements

*Avant toute chose, Je tiens à remercier **Allah** le tout puissant, qui m'a donné la force et le courage afin d'élaborer ce modeste travail.*

*Je tiens, dans un premier lieu, à remercier mon encadreur **Mr HAMOUM H.** pour la confiance qu'elle m'a accordé durant la réalisation de ce travail, Pour son aide, sa patience, sa disponibilité ainsi que pour ses précieux conseils.*

*Mes remerciements vont également à **Mr. MEKHALDI A** et **Mr. CHIBANI.A** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté de faire partie du jury.*

*Je remercie les responsables des laboratoires **Mm. Hafida, Mr. ABAIDI, Mr. AMRAN et Mm. TAHLAITI** qui nous ont fourni les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail*

*Je tiens à remercier **Melle. CHIBANI Hiba Rahman** pour son aide tout au long de ce travail*

Enfin, un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

À mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

À mon époux pour son appui et son encouragement,

À mes chers enfants

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

À tous mes amis chacun en son nom

Sommaire

Remerciements	i
Dédicace	ii
Sommaire.....	iii
Liste des abréviations.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Résumé.....	viii
Introduction.....	01
Chapitre 1 : Revue bibliographique	
I.1. Communauté microbienne de la rhizosphère.....	5
I.1.1. Les bactéries promotrice de la croissance des plantes.....	6
I.1.2. Mécanismes d'action des PGPR	6
I.1.2.1. Mécanismes directs.....	7
I.1.2.1.1. Fixation d'azote.....	7
I.1.2.1.2. Solubilisation des phosphates.....	7
I.1.2.1.3. Production des régulateurs de croissance.....	8
I.1.2.1.3.1. Production d'acide indole acétique.....	10
I.1.2.1.3.2. Cytokinines et gibbérellines.....	11
I.1.2.1.3.3. Acide abscisique.....	11
I.1.2.1.3.4. Régulation du taux de l'éthylène.....	11
I.1.2.2. Mécanismes indirectes.....	12
I.1.2.2.1. Production des sidérophores.....	12
I.1.2.2.2. Compétition pour l'espace et les nutriments.....	12
I.1.2.2.3. Antibioses.....	13
I.1.2.2.4. Résistance Systémique Induite (ISR).....	13
I.2. Diversité microbienne de la rhizosphère.....	14
I.2.1. <i>Sténotropomonas maltophilia</i>	15
I.2.1.1. Historique et classification.....	15
I.2.1.2. Environnement.....	15
I.2.1.3. <i>Sténotropomonas maltophilia</i> comme PGPR	15
I.3. L'amélioration des souches.....	16
Chapitre II : Matériels et méthodes	
II.1. Contribution à l'Amélioration de quelques activités PGP par mutagenèse.....	19
II.1.1. Matériel biologique	19
II.1.2. Réactivation des isolats.....	19
II.1.3. Préparation de la suspension bactérienne.....	20
II.1.4. Mutagenèse par UV.....	20
II.1.5. Criblage des mutants.....	21
II.1.6. Evaluation de la production de l'acide indole acétique.....	21
II.1.6.1. Dosage de l'AIA au spectrophotomètre.....	22
II.1.7. Solubilisation des phosphates.....	22
Chapitre III : Résultats et Discussion	
III.1. Détermination des taux de survie et le temps de mutation.....	25
III.2. Production de l'acide 3-indole acétique.....	27
III.2.1. Les mutantes de La souche NHA68.....	27
III.2.2. Les mutantes de La souche NHA78.....	29
III.3. Solubilisation du phosphate tricalcique.....	31
III.3.1. Les mutants de La souche NHA68.....	32
III.3.1. Les mutants de La souche NHA78.....	33

Conclusion.....	37
Références bibliographiques.....	39
Annexe	

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole -3- Acétique

BSP : Bactéries solubilisant le phosphate

BN : Bouillon nutritif.

DO : Densité optique

LB : Milieux Luria-Bertani

µg: microgramme

MSP : Microorganisme solubilisant le phosphate

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

Nm : Nanomètre

P : Phosphore.

PGP : De l'anglais "plant growth promonte"

PGPB : De l'anglais "Plant Growth Promonting bacteria "

PGPR : De l'anglais "Plant growth promoting rhizobacteria"

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PI : Phosphore inorganique

PO : Phosphore organique

RSI : Résistance systémique induite

PVK : Pikovskaya

Tr/min : Tour par minute

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violets

Liste des tableaux

Tableau III.1	viabilité de NHA68 après différent temps d'exposition (UFC).....	25
Tableau III.2	viabilité de NHA78 après différent temps d'exposition (UFC).....	26

Liste des figures

Figure I.1 : Illustration schématique des mécanismes importants connus pour l'amélioration de la croissance des plantes avec les PGPR.....	05
Figure I.2 : Interactions entre plantes et bactéries coopératives (ici PGPR) dans la rhizosphère.....	06
Figure I.3: Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates	08
Figure I.4: Phytohormones produits par les PGPR aidant les plantes à tolérer le stress abiotique Cytokinine (CK), Gibbérelline (GB), Acide indole-3-acétique (IAA), Acide salicylique (SA) et Acide abscisique (ABA).....	09
Figure I.5 : Rôle de l'IAA dans le développement des plantes	10
Figure I.6 : Les étapes de la résistance systémique induite chez les plantes par les PGPR	14
Figure II.1: La réactivation des souches.....	19
Figure II.2 : Mutagenèse par UV.....	21
Figure II.3: la production d'acide indole acétique par les souches mutantes.....	22
Figure II.4 : la solubilisation du phosphate par les souches mutantes.....	23
Figure III.1: Taux de survie de NHA68 après différents temps d'exposition au rayon UV.....	26
Figure III.2 : Taux de survie de NHA78 après différents temps d'exposition au rayon UV.	26
Figure III.3: Production d'AIA par les souches bactériennes mutantes...	28
Figure III.4 : Taux de l'AIA produit par les souches mutantes (La souche NHA68).....	28
Figure III.5 : Pourcentage d'amélioration de l'AIA produit par les ..souches mutantes (La souche NHA68).....	29
Figure III.6 : Taux de l'AIA produit par les souches mutantes (la souche NHA78).....	30
Figure III.7 : Pourcentage d'amélioration de la production d'AIA par les souches mutantes (la souche NHA78).....	30
Figure III.8 : solubilisation du phosphate tricalcique en milieu NBRIP .par les souches mutantes.....	32
Figure III.9 : Taux de solubilisation du phosphate tricalcique en milieu NBRIP par les souches mutantes (La souche NHA68).....	33
Figure III.10 : Pourcentage d'amélioration de solubilisation du .phosphate tricalcique par les souches mutantes (la souche NHA68).....	33
Figure III.11 : Taux de solubilisation du phosphate tricalcique en milieu NBRIP par les souches mutantes (La souche NHA78).....	34
Figure III.12 : Pourcentage d'amélioration de solubilisation du phosphate tricalcique par les souches mutantes (la souche NHA78).....	34

Résumé

Les bactéries rhizosphériques qualifiées de PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) forment des symbioses associatives avec les plantes, stimulant la croissance de ces dernières. Les PGPR présentent différents mécanismes phytobénéfiques (production de phytohormones, fixation non symbiotique de l'azote, etc.). L'objectif de la présente étude est l'amélioration de quelques activités PGP chez les deux souches de *Sténotrophomonas maltophilia* NHA68 et NHA78 par mutagenèse physique au rayons UV à des différents temps d'exposition (0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 min). Après mutation, une amélioration élevée de la production de l'AIA a été observée chez les souches mutantes NHA68-m18 et NHA78-m5, et une forte amélioration de la solubilisation de phosphate chez les souches mutantes NHA68-m18, NHA68-m20, NHA68-m17, NHA78-m14, NHA78-m4, NHA78-m12 et NHA78-m19

Mots clefs : PGPR, *Sténotrophomonas maltophilia*, amélioration, mutation, UV

Abstract

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) can form an associative symbiosis with plants, which results in stimulation of plant growth. PGPR harbour different phytobeneficial mechanisms (non-symbiotic nitrogen fixation, phytohormone synthesis, etc.). The objective of the present study is the improvement of some PGP activities in the two strains of *Stenotrophomonas maltophilia* NHA68 and NHA78 by physical mutagenesis with UV rays at different exposure times (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 mins). After mutation, a high improvement in AIA production was observed in mutant strains NHA68-m18 and NHA78-m5, and a strong improvement in phosphate solubilization in mutant strains NHA68-m18, NHA68-m20, NHA68 -m17, NHA78-m14, NHA78-m4, NHA78-m12 and NHA78-m19

Keywords: PGPR, *Stenotrophomonas maltophilia*, enhancement, mutation, UV

الملخص

تشكل بكتيريا ريزوسفير المؤهلة كـ PGPR (البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات) تكافلاً ترابطياً مع النباتات ، مما يحفز نموها. تملك بكتيريا PGPR عدة آليات مفيدة للنبات (إنتاج الهرمونات النباتية ، تثبيت النيتروجين غير التكافلي ، إلخ).الهدف من هذه الدراسة هو تحسين بعض أنشطة PGP لسلاستي *Stenotrophomonas maltophilia* السلالة NHA68 والسلالة NHA78 عن طريق الطفرات الفيزيائية بالأشعة فوق البنفسجية في فترات زمنية مختلفة (0 ، 5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25 و 30 دقيقة). بعد الطفرة ، لوحظ تحسن كبير في إنتاج AIA في السلالات الطافرة NHA68-m18 وNHA78-m5 ، وتحسن قوي في إذابة الفوسفات في السلالات الطافرة NHA68-m18 ، NHA68-m20 ، NHA68-m17 ، NHA78-m14 ، NHA78-m4 وNHA78-m12 وNHA78-m19

الكلمات المفتاحية: PGPR ، *Stenotrophomonas maltophilia* ، تعزيز ، طفرة ، الأشعة فوق البنفسجية

Introduction

Introduction

Les bactéries symbiotiques dans la rhizosphère exerçant des effets bénéfiques sur la plante hôte sont appelées Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (**Raza et al., 2016**). Les PGPR sont impliqués dans diverses activités biotiques du sol pour le rendre dynamique et durable à la production agricole. Ces rhizobactéries colonisent de manière compétitive le système racinaire des plantes et améliorent leur croissance par différents mécanismes, y compris la solubilisation des phosphates (**Ahemad et Khan, 2012**), la fixation d'azote (**Glick, 2012**), la production de l'acide indole-3-acétique (AIA), la production de sidérophores (**Jahanian et al., 2012**), la production de l'amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, et le cyanure d'hydrogène ; la synthèse des phytohormones et des antibiotiques ou des enzymes lytiques (**Xie et al., 2016**). En outre, certains PGPR peuvent également présenter d'autres caractéristiques favorisant la croissance des plantes, telles que la détoxification des métaux lourds, la tolérance à la salinité et le contrôle biologique des insectes phytopathogènes (**Egamberdieva et Lugtenberg, 2014**).

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. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genre et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phylums suivants : Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (**Hugenholtz, 2002**).

Les PGPR comme *Sténotrophomonas sp* peuvent favoriser la croissance racinaire des plantes par la production de phytohormones promoteurs de croissance tels que l'auxine, l'acide abscissique et les gibbérellines (**Khamna et al., 2010**). Dans une étude s'intéressant à *S. maltophilia* a démontré qu'il peut être utilisé comme un bioinoculant efficace pour la promotion de la croissance des plantes et le contrôle biologique contre les champignons phytopathogènes et, par conséquent, a un grand potentiel pour les applications biotechnologiques (**Ryan et al., 2009; Berg et al., 2010**).

Généralement les souches sauvages produisent des quantités limitées de phytohormone, l'amélioration génétique des isolats microbiens joue un rôle clé dans le développement du processus de fermentation microbienne. La mutagenèse induite est largement utilisée pour la sélection de microorganismes produisant des substances

biologiquement actives et l'amélioration de leurs activités. L'amélioration des souches se fait généralement par mutagenèse classique, qui consiste à exposer les microbes à des agents mutagènes physiques tels que les rayons ultraviolets (Goodarzi, 2016). L'emploi de la mutation par les rayonnements ultraviolet est l'un des techniques les plus connus et les plus couramment utilisés dans ce contexte (**Javed *et al.*, 2013**).

Au cours de ce présent travail, un traitement par un mutagène aux rayons ultraviolets a été appliqué afin d'augmenter la diversité génétique de la souche sauvage et d'améliorer quelques activités PGP.

*Revue
bibliographique*

I. Revue bibliographique

I.1. Communauté microbienne de la rhizosphère

Le sol héberge une grande diversité microbienne (virus, bactéries, champignons protozoaires etc.). Les interactions entre ces microorganismes entre eux, et avec les autres composants du sol sont très complexes. La rhizosphère, qui contient plus d'un million de micro-organismes par gramme de sol, les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones... Certains de ces micro-organismes, principalement des 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. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Figure I.1). Ces bactéries vivantes librement et colonisant les racines, améliorent la croissance de la plante, réduisent les dommages causés par les phytopathogènes et confèrent une résistance contre le stress abiotique (Kloepper *et al.*, 1991).

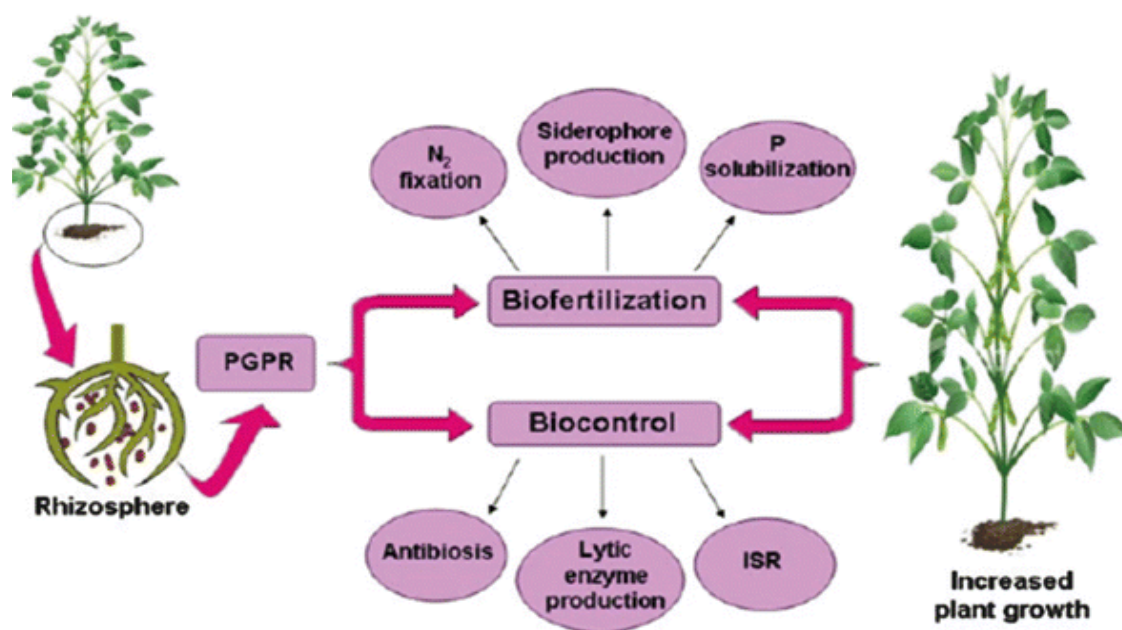


Figure I.1 : Illustration schématique des mécanismes importants connus pour l'amélioration de la croissance des plantes avec les PGPR (Kumar *et al.*, 2011).

I.1.1. Les bactéries promotrice de la croissance des plantes

Le terme PGPR a été utilisé pour la première fois par Kloepper et Schroth pour désigner les micro-organismes étroitement associés à la région de la rhizosphère et ayant le pouvoir d'affecter bénéfiquement la croissance d'une plante et sa santé (**Bakthavatchalu et al., 2012 ; Sivasakhiet al., 2014 ; Alabouvette et Cordier, 2018**).

Les PGPR jouent donc un rôle important comme agents de lutte contre les infections des plantes par des agents phytopathogènes (**Beneduziet al., 2012**). Cette fonction est assurée, en grande partie, par la capacité inhérente à ces bactéries de produire des substances antifongiques et des phytohormones, de fixer l'azote atmosphérique et de réguler de la production d'éthylène par les plantes. Également, la solubilisation du phosphate vers des formes assimilables par les plantes et la production des chélateurs de Fer sont également des attributs des PGPR (**Prasad et al., 2005**).

Parmi la grande diversité des PGPR, celles appartenant aux genres *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* sont prédominantes, mais jamais exclusives (**Sivasakhi et al., 2014**).

I.1.2. Mécanismes d'action des PGPR

Les effets bénéfiques des PGPR sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes dont les modes d'action sont directs ou indirects. En général, les mécanismes indirects se produisent en dehors de la plante, par contre les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur des tissus de la plante, affectant directement son métabolisme (**Gupta et al., 2000 ; Cherif, 2014**) (Figure I.2).

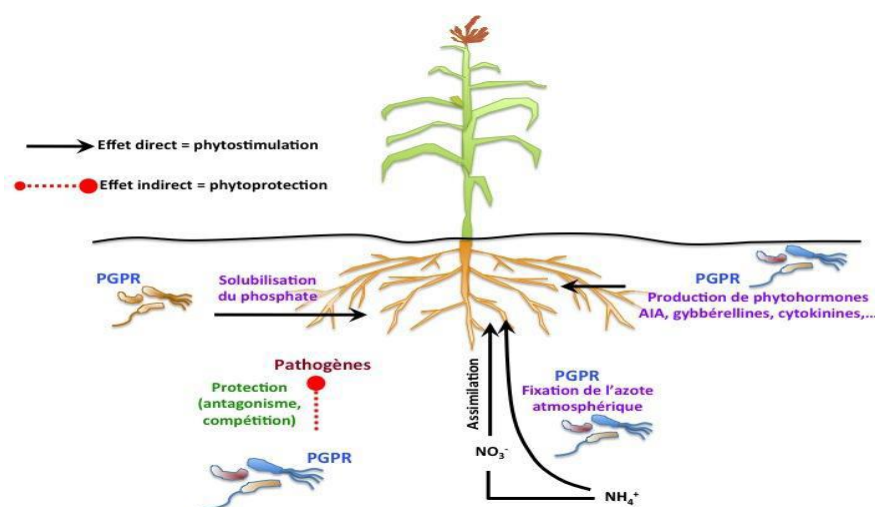


Figure I.2 : Interactions entre plantes et bactéries coopératives (ici PGPR) dans la rhizosphère (**Khan et al, 2009**)

I.1.2.1. Mécanismes directs

I.1.2.1.1. Fixation d'azote

La majeure partie de l'azote se trouve sous forme d'azote gazeux (N₂) inaccessible aux animaux et aux plantes (**Pujic et Normand, 2009**). Sa fixation biologique existe uniquement chez les procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (**Weyens et al., 2010**). La fixation d'azote est effectuée par des interactions symbiotiques ou non-symbiotiques entre les microorganismes et les plantes.

Parmi les PGPR symbiotiques qui fixent fréquemment le N₂ atmosphérique dans le sol: *Rhizobium* sp., *Azoarcus* sp., *Beijerinckia* sp., *Pantoea* agglomerans et *K. pneumoniae*. D'autres sont libres dans la rhizosphère (e.g., *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*) (**Tilak et al., 2005**).

La fixation de N₂ est réalisée par un gène particulier appelé nif, qui est impliqué dans l'activation des protéines, le don des électrons, la biosynthèse de cofacteurs et dans de nombreux autres gènes régulateurs pour la synthèse et l'activité des enzymes (**Reed et al., 2011**). L'inoculation par des PGPR fixatrices d'azote permet d'améliorer la croissance végétale, et de maintenir un niveau élevé d'azote dans les sols agricoles (**Damam et al., 2016**). Les PGPR favorisent directement la croissance de leur plante hôte en fixant l'azote atmosphérique (**Nadeem et al., 2014**).

I.1.2.1.2. Solubilisation des phosphates

Le phosphore (P), deuxième élément nutritif important pour la croissance des plantes après l'azote, est abondamment disponible dans les sols sous une forme organique et inorganique (**Ahemad et Kibret, 2014**). En effet, le phosphore joue un rôle clé dans la photosynthèse, la respiration, le développement des racines, le transfert d'énergie, la biosynthèse des macromolécules (**Çakmakçi et al., 2017**).

Les PGPR permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités (**Kucey et al., 1989**; **Pradhan et Sukla, 2005**). La capacité de quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture (**Sharma et al., 2007**) (Figure I.3).

Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* *Pseudomonas* spp. (Subbarao, 1988 ; Kucey et al., 1989). *B. megaterium*, *polymyxa*, *circulans*, *coagulans*, *subtilis*, *sircalmoussont* les plus performantes (Podile et Kishore, 2006) dans lasolubilisation des phosphates. Celle-ci permet à *B. megaterium*, par exemple, d'améliorer le nombre et le poids sec de nodules, le rendement des composants, la disponibilité et l'absorption des nutriments des cultures du soja (Son et al., 2006 ; Sharma et al., 2007) .

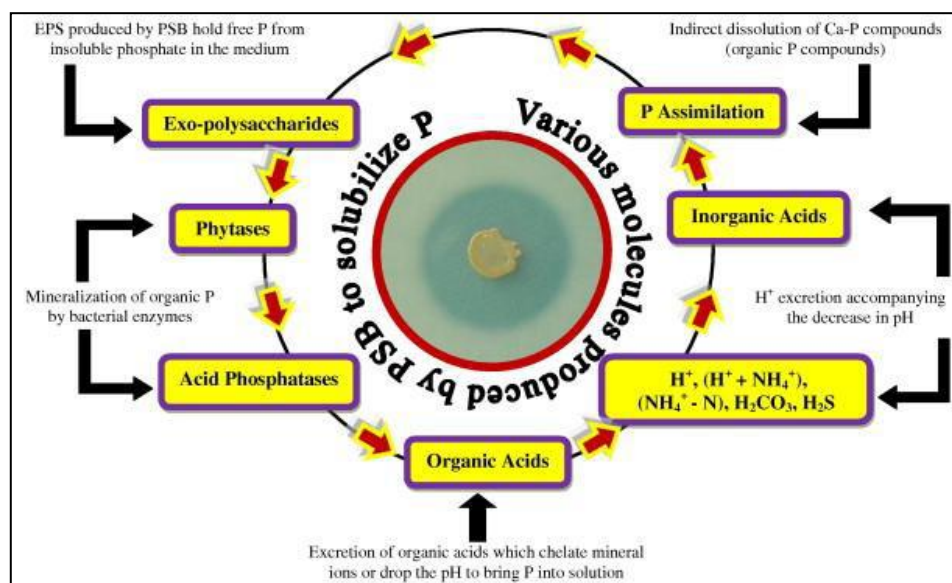


Figure I.3: Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates (Khan et al., 2009)

I.1.2.1.3. Production des régulateurs de croissance

Les régulateurs de la croissance des plantes sont des substances qui peuvent, à de très faibles concentrations, influencer les processus physiologiques de la plante et modifier ou contrôler un ou plusieurs événements métaboliques de la plante en accélérant ou en retardant son taux de croissance ou de maturation. Ces substances sont aussi appelées phytohormones (Khan et al., 2009 ; Hayat et al., 2010).

De nombreux travaux ont indiqué que l'utilisation des hormones en tant que molécule signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres microorganismes tels que le « quorum sensing » ou la résistance systémique induite ISR (Spaepen et al., 2007). Il existe cinq principaux groupes d'hormones:

Les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique. L'acide indole acétique(AIA) est le plus important du groupe des auxines (Silini, 2013 ; Hayat et al., 2010) (Figure I.4).

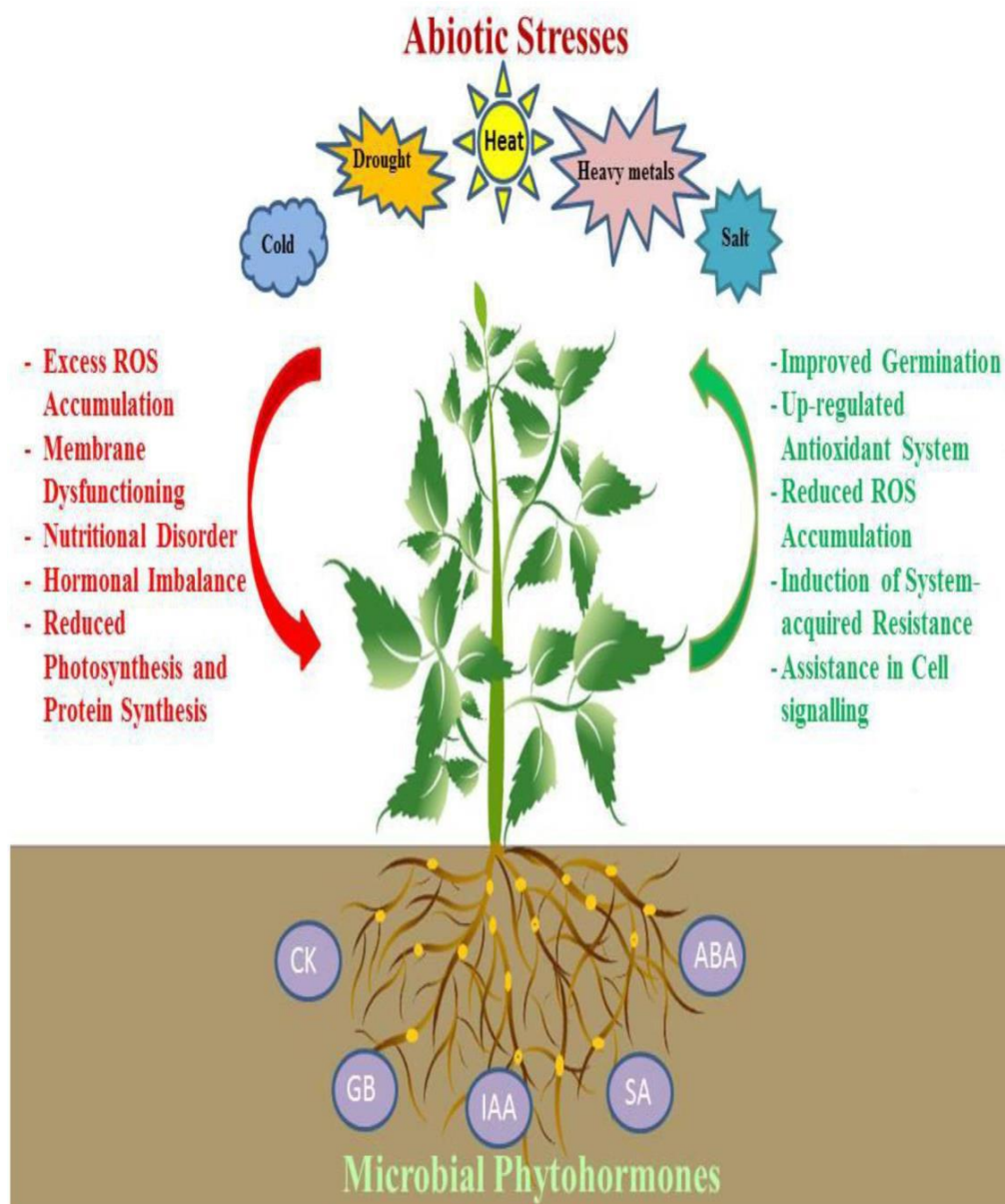


Figure I.4: Phytohormones produits par les PGPR aidant les plantes à tolérer le stress abiotique (Egamberdieva et al., 2017). Cytokinine (CK), Gibbérelline (GB), Acide indole-3-acétique (IAA), Acide salicylique (SA) et Acide abscissique (ABA).

I.1.2.1.3.1. Production d'acide indole acétique

L'acide indole acétique (AIA), l'auxine active chez les plantes est la phytohormone la plus répandue et la mieux caractérisée. Il intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse et contrôle l'organisation du méristème apical (phyllotaxie), la ramification des parties aériennes de la plante (dominance apicale), la formation de la racine principale et l'initiation des racines latérales et adventives (rhizogénèse). Ces multiples effets sur les différents stades de la croissance de la plante résultent du contrôle que cette phytohormone exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation (Figure I.5) (Silini, 2013).

Diverses espèces bactériennes sont capables de produire l'acide indole acétique ou ses précurseurs. En effet, il n'est estimé que 80% des bactéries isolées de la rhizosphère des plantes sont capables de produire l'AIA (Hayat *et al.*, 2010), c'est le cas de *Aeromonas veronii*, *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes piechaudii*, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium*, *Comamonas acidovorans* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium*, *Rhizobium leguminosarum* et *Xantomonas*, (Weyens *et al.*, 2010). Le tryptophane est le principal précurseur pour la biosynthèse d'AIA. Les exsudats racinaires sont la ressource principale de tryptophane dans le sol (Spaepen *et al.*, 2007). Les PGPR utilisent les exsudats racinaires pour la biosynthèse de l'AIA, libèrent cette auxine dans la rhizosphère comme métabolite secondaire (Khan *et al.*, 2009), une partie de l'AIA est reprise par la plante qui s'ajoute à l'AIA endogène de la plante pour stimuler la prolifération cellulaire des plantes et l'allongement racinaire.

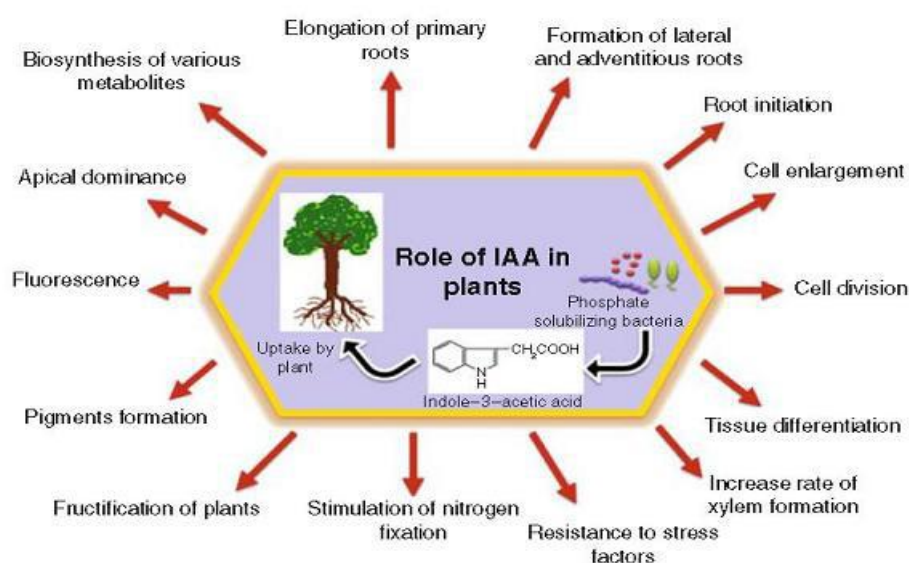


Figure I.5 : Rôle de l'IAA dans le développement des plantes (Khan *et al.*, 2009).

I.1.2.1.3.2. Cytokinines et gibbérellines

Diverses bactéries PGPR telles que *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* et *Paenibacillus polymyxa* peuvent produire des cytokinines et/ou des gibbérellines pour promouvoir la croissance des plantes (Gupta et al., 2015).

L'inoculation de graines avec des bactéries productrices de cytokinines et/ou des gibbérellines conduit généralement à l'augmentation du contenu en cytokinines et/ou en gibbérellines chez les plantes influençant ainsi simultanément la croissance et le développement des plantes (Arkhipova et al., 2005 ; Pliego et al., 2011 ; Gamalero et Glick, 2011).

I.1.2.1.3.3. Acide abscisique

L'acide abscisique est synthétisé dans les chloroplastes des feuilles. Sa production est accentuée sous contraintes environnementales tels les déficits en eau et les températures basses. La biosynthèse de l'acide abscisique se produit, indirectement, à travers la production de caroténoïdes. Le transport de l'acide abscisique peut se faire dans le xylème et les tissus du phloème. L'acide abscisique stimule la fermeture stomatique, favorise la croissance des racines et induit la transcription génétique des protéinases. Il peut, aussi, agir contre les pathogènes (Davies, 1995). Certaines PGPR, telles *Rhizobium* sp. et *B. japonicum* sont capables de produire cet phytohormone (Dobbelaere et al., 2003).

I.1.2.1.3.4. Régulation du taux de l'éthylène

L'éthylène synthétisé par de nombreuses espèces bactériennes est un puissant régulateur de la croissance des plantes, impliqué dans leur système de défense et leur réponse aux stress et peut affecter plusieurs aspects de la croissance des plantes, leur développement et sénescence (Ahmad et al., 2008). Outre, son rôle d'hormone de maturation, l'éthylène favorise le développement des racines adventives et des poils absorbants, stimule la germination, et permet la levée de la dormance des graines (Ahmad et al., 2008 ; Couillerot, 2009 ; Hayat et al., 2010 ; Gupta et al., 2015).

Toutefois, la persistance des concentrations élevées d'éthylène après germination provoque l'inhibition de l'élongation des racines et de la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses. Les PGPR favorisent la croissance des plantes en réduisant le taux d'éthylène dans les plantes, ceci est attribué à l'activité de l'enzyme 1- aminocyclopropane -1- carboxylate (ACC) désaminase, qui hydrolyse le ACC, le précurseur direct de la biosynthèse de l'éthylène dans les plantes. Les produits de cette hydrolyse, l'ammonium et l'alpha ketobutyrate, peuvent être utilisés par les bactéries comme source d'azote et de

carbone (Ahmad *et al.*, 2008 ; Hayat *et al.*, 2010). Iqbal *et al.*(2012), ont rapporté une amélioration du nombre de nodule, du poids sec des nodules, de la biomasse fraîche, du rendement en graine et en pailles et du contenu en azote des graines de lentille inoculées par une souche de *Pseudomonas sp.* contenant une activité ACC désaminase.

I.1.2.2.Mécanismes indirectes

I.1.2.2.1. Production des sidérophores

Le fer est un nutriment vital pour tous les êtres vivants. Dans l'environnement aérobie, le fer se présente principalement sous forme de Fe_{3+} et est susceptible de former des hydroxydes et des oxyhydroxydes insolubles, le rendant ainsi généralement inaccessible aux plantes et aux micro-organismes (Rajkumar *et al.*, 2010). Les sidérophores sont de petits chélateurs de haute affinité qui sont produits par de nombreux micro-organismes pour séquestrer le fer (Sharma *et al.*, 2013).

Chez les rhizobactéries à Gram négatif et à Gram positif, le fer (Fe_{3+}) dans le complexe de Fe_{3+} -sidérophore sur la membrane bactérienne est réduit en Fe_{2+} qui est ensuite libéré (Ahmad *et Kibret*, 2014). Ainsi, les sidérophores agissent comme agents de solubilisation de fer à partir de minéraux ou de composés organiques dans des conditions limitantes de fer, et accélèrent la mobilité de Fe_{3+} dans la rhizosphère en le rendant disponible aux plantes, entraînant ainsi une augmentation indirecte de la croissance des plantes (Indiragandhi *et al.*,2008; Ma *et al.*, 2009).

En plus de favoriser la croissance des plantes, la production de ces chélateurs du fer peut également exercer un rôle de biocontrôle, de biocapteur et de bioremédiation en formant des complexes stables avec les métaux lourds (Ahmad *et Kibret*, 2014; Ahmed *et Holmström*,2014).

I.1.2.2.2. Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997; Reyes *et al.*,2004). Cependant, 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.

Une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas *et*

Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (**Jofre et al., 2004**), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (**Berggren et al., 2001; Gupta et al., 2003**).

I.1.2.2.3. Antibioses

La production d'antibiotiques par les PGPR contre les phytopathogènes devient l'un des mécanismes de biocontrôle les plus efficaces et les plus étudiés (**Ulloa-Ogaz et al., 2015 ; Goudaa et al., 2018**). Les PGPR, comme *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp., jouent un rôle majeur dans l'inhibition des micro-organismes pathogènes à travers la production des antibiotiques. La plupart des espèces de *Pseudomonas* produisent une grande variété d'antibiotiques tels : l'amphisine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, la tropolone et lipopeptides cycliques (**Souza et Raaijmakers 2003; Nielsen et Sorensen 2003**) d'autres composés comprenant l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine A et la xanthobaccine sont produits par *Bacillus*, *Streptomyces* et *Sténotrophomonas* spp. (**Kim et al., 1999**). La production de ces antibiotiques est étroitement liée à l'état métabolique de la cellule qui est influencée par la disponibilité des éléments nutritifs et d'autres facteurs abiotiques (Duffy et De'fago 2000). En outre, le stade de développement des plantes peut aussi influencer la production des antibiotiques. Au fait, la production de ces molécules n'est pas induite par les exsudats racinaires de jeunes plantes, mais plutôt par les exsudats de plantes les plus âgées. Ceci entraîne une pression sélective entre les microorganismes de la rhizosphère (Picard et al., 2000). Le génotype de l'hôte végétal peut jouer, aussi, un rôle important dans l'interaction entre l'agent de biocontrôle et la plante (**Parray et al., 2016**)

I.1.2.2.4. Résistance Systémique Induite (ISR)

D'autre part, certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (**Van Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2002**). Les PGPR peuvent induire une résistance systémique dans de nombreuses plantes contre plusieurs facteurs de stress environnementaux. Au cours de l'invasion des pathogènes, des signaux sont produits et un mécanisme de défense est activé via le système vasculaire. Les signaux produits entraînent la voie de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) (**Henry et al., 2012 ; Parray et al.,**

2016). Ceci conduit à l'activation d'un grand nombre d'enzymes de défense, telles la chitinase, la β -1, 3- glucanase, la phénylalanine ammonia lyase, la polyphénol oxydase, la peroxydase, la lipoxygénase, SOD, CAT et APX et certaines protéinases. La résistance systémique induite n'est pas spécifique contre un pathogène particulier, mais elle aide la plante à contrôler de nombreuses maladies (Kamal et al., 2014). D'un autre coté, différents composants bactériens peuvent induire l'ISR, y compris les lipopolysaccharides, les lipopeptides cycliques, les sidérophores, le 2, 4- diacétylphloroglucinol, l'homosérine lactones, et les gaz volatiles, comme 2, 3- le butanediol et l'acétoïne. (Goudaa et al., 2018) (Figure I.6)

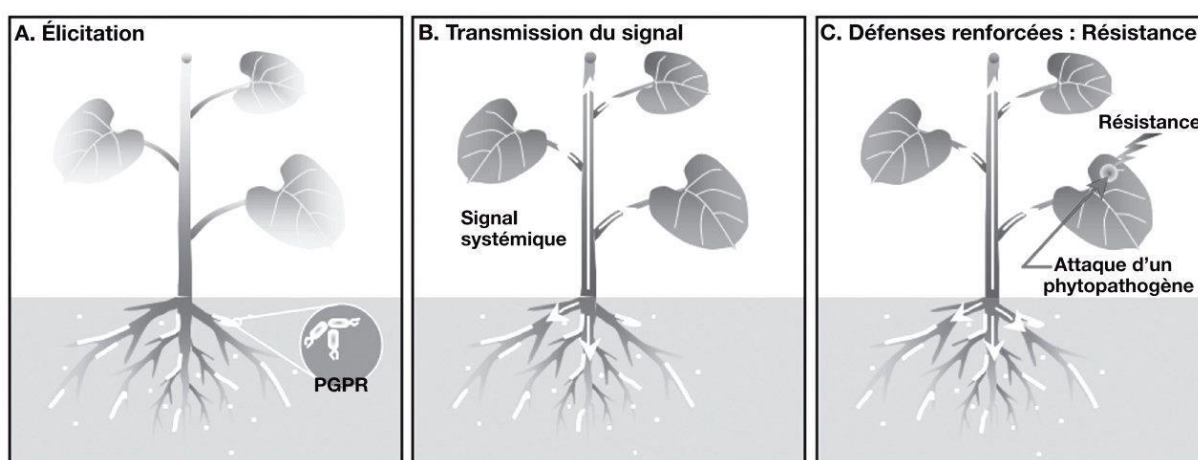


Figure I.6 : Les étapes de la résistance systémique induite chez les plantes par les PGPR (Jourdan et al., 2008)

I .2. Diversité microbienne de la rhizosphère

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. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genre et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants : Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002). De nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers. 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 (10^8 bactéries/g des racines) (Weller, 1988; Lugtenberg et al., 2001).

I .2.1. *Sténotrophomonas maltophilia*

I .2.1.1. Historique et classification

Le *Sténotrophomonas maltophilia* est un bacille gram négatif non fermentant isolé pour la première fois en 1943 (**Denton M, et Kerr KG.1998**), puis classé dans le genre *Pseudomonas maltophilia* en 1961 puis reclassé en *Xanthomonas maltophilia*. En 1993, il fut baptisé *Sténotrophomonas maltophilia*. Il fait partie des huit espèces du genre *Sténotrophomonas* au même titre que : *Sténotrophomonas acidaminiphila*, *Sténotrophomonas chelatiphaga*, *Sténotrophomonas humi*, *Sténotrophomonas koreenzi*, *Sténotrophomonas rhizophila*, *Sténotrophomonas terrae* et *Sténotrophomonas nitritireducens*.

I .2.1.2. Environnement

Le *Sténotrophomonas maltophilia* est une bactérie ubiquitaire. Elle est isolée dans différents types d'environnements, aussi bien intra qu'extra-hospitaliers. Elle est présente notamment dans le sol, sur des plantes (blé, betterave, canne à sucre...), au sein de milieux aquatiques (rivières, puits, eau en bouteille), mais également dans des aliments (poissons congelés, lait).

I .2.1.3. *Sténotrophomonas maltophilia* comme PGPR

Parmi les PGPR, la promotion de la croissance des plantes et le potentiel de lutte biologique de *Sténotrophomonas sp.* a été rapporté dans des études antérieures qui ont démontré qu'il peut être utilisé comme un bioinoculant efficace pour la promotion de la croissance des plantes et le contrôle du large éventail de champignons phytopathogènes et, par conséquent, a un grand potentiel pour les applications biotechnologiques (**Ryan et al., 2009; Berg et al., 2010**). La capacité de promotion de la croissance des plantes de la souche DSM14405T de *Sténotrophomonas rhizophila* a été observée dans les sols riches en sel de l'Ouzbékistan à des niveaux allant jusqu'à 180% (**Egamberdieva et al., 2011**). De même, Singh et al. (**2013**) ont montré l'activité d'extinction de quorum (QQ) contre *Chromobacterium violaceum* CV026 et les activités anti-biofilm d'une rhizobactérie *Sténotrophomonas maltophilia* BJ01. Brooke et al. (**2017**) ont également rencontré l'approche multiforme de la bactérie *S. maltophilia*.

Un rapport précédent (**Alavi et al., 2013**) a suggéré que *S. rhizophila* possède certains gènes responsables de l'interaction plante-microbe bénéfique, du transport des osmoprotecteurs, de l'activité de lutte biologique et de la colonisation. Cependant, la

caractérisation détaillée et le mécanisme de croissance des plantes stimulés par *Sténotropomonas sp.* dans des conditions de stress de salinité fait encore défaut.

En outre, il a également été rapporté que les inoculants rhizobiens suppriment la maladie en suscitant la résistance systémique induite (ISR) contre un certain nombre de maladies des plantes (**Kumari et Srivastava, 1999**). L'induction et la production accrue d'enzymes liées à la défense pendant l'ISR sont connues pour jouer un rôle crucial dans la résistance de l'hôte (**Chen et al., 2000**; **Ramamoorthy et al., 2002**)

Les bactéries appartenant à des genres comme *Pseudomonas sp* et *Bacillus sp.* sont connus pour induire une résistance aux pathogènes bactériens et fongiques. Cependant, le déclenchement de l'ISR par *S. maltophilia* dans le blé est encore inconnu. Une étude récente a montré le comportement de lutte biologique de *S. maltophilia* (PD4560) contre *Ralstonia solanacearum* par la production d'enzymes protéolytiques et par l'induction de gènes liés à la pathogénèse (PR) (**Elhalag et al., 2016**). Le rôle des protéines PR pour aider les plantes à contrer la condition de stress a été abordé dans une autre étude (**Koike et al., 2002**). Cependant, la caractérisation détaillée et son effet d'amorçage contre les agents pathogènes fongiques sont au niveau primaire.

I.3. L'amélioration des souches

Les stratégies d'amélioration visent à accroître la concentration finale en produit, à réduire la production de co-métabolites indésirables. Des considérations telles que le mode d'utilisation des souches productrices sont aussi prises en compte. Deux grandes catégories d'approches sont utilisées pour l'amélioration : la mutagenèse aléatoire et le génie métabolique.

La mutagenèse aléatoire ne nécessite pas de connaissance préalable, ni du génome ni de la physiologie des souches traitées. La mutagenèse induit des modifications génétiques au sein du génome sans que la localisation de ces dernières puisse a priori être connue, la mutagenèse au rayant ultraviolet est un mutagène le plus couramment utilisé. Il donne un haut proposition de gradateurs de pyrimidine et comprend tous les types des substitutions de paires de bases (Javedet al., 2013).

Le génie métabolique peut être défini comme l'amélioration des potentialités d'une cellule par la manipulation de fonctions enzymatiques bien ciblées, grâce à l'emploi de la

technologie de l'ADN recombiné ; il repose sur une connaissance précise des fonctions cellulaires à modifier ainsi que des gènes qui leur sont associés.

Bien que le génie métabolique ait tendance à être considéré comme la méthodologie de pointe, la mutagenèse aléatoire, qui a permis à ce jour l'obtention de la quasi-totalité des améliorations de la production industrielle des antibiotiques, continue à être utilisée dans les laboratoires de développement des procédés.

*Matériels et
méthodes*

II.1. Contribution à l'Amélioration de quelques activités PGP

Un protocole adapté aux souches de *Sténotrophomonas maltophilia* a été mis au point au laboratoire afin de développer un caractère hyper-producteur dans le but d'optimiser la concentration d'AIA produite et du phosphate solubilisé

II.1.1. Matériel biologique

Les souches employées dans cette étude (NHA68 et NHA78) ont été identifiées par le séquençage de l'ADNr 16S,

L'identification des isolats s'est basée sur le séquençage partiel de l'ADNr 16S. L'ARN ribosomal (ARNr) 16S est le constituant ARN de la petite sous-unité ribosomale 30S des procaryotes. Le gène codant pour cet ARNr est le gène ARNr 16S (Clarridge, 2004), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Petti, 2007). Il est composé d'environ 1500 nucléotides, et la séquence obtenue permet théoriquement la détection et l'identification de toute espèce bactérienne (Chakravorty *et al.*, 2007).

II.1.2. Réactivation des isolats

Les isolats préalablement conservés dans du glycérol (20%) à - 80 °C, ont été ensemencés dans des tubes à essai contenant le bouillon nutritif, puis incubés à 30°C pendant 24 heures. Ensuite ensemencés dans la gélose nutritive dans les mêmes conditions

II.1.3. Préparation de la suspension bactérienne

Après réactivation des 2 souches de *Sténotrophomonas maltophilia* NHA68 et NHA78, une suspension bactérienne a été préparée en transférant les colonies dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de bouillon LB. L'Erlenmeyer a été incubé dans une étuve agitée à 30°C /160 rpm pendant 18 heures. Après incubation, la densité optique a été ajustée pour atteindre une densité optique de 0.8 à 600nm (correspondant à environ 10^9 - 10^{10} ufc/ml) (Chibani *et al.*, 2017). Cette suspension a été utilisée comme source cellulaire pour l'irradiation UV.

II.1.5. Criblage des mutants

Les isolats appartenant au traitement ayant un taux de survie entre 0,1 et 10 % ont été sélectionnés pour l'isolement des mutants (**Hopwood et al., 1985**).

Les isolats ont été sélectionnés sur la base de caractéristiques différentielles macroscopiques. (**Solaiman et al., 2005**).

II.1.6. Evaluation de la production de l'acide indole acétique

L'analyse quantitative (dosage colorimétrique) de la production de l'acide indole acétique a été effectuée suivant la méthode décrite par Loper et Schroth (**1986**). Un Erlenmeyer de 250ml contenant 50 ml du milieu de culture Luria Bertani additionné de 100mg/l de tryptophane a étéensemencé par 1 ml de la culture bactérienne (sauvage et mutants) dont la densité optique a été réglée à 0.8. Après incubation à 30°C pendant 96 h à l'obscurité dans une étuve agitée à 180 rpm, 5ml de la culture ont été centrifugés à 6000tr/min pendant 20 min, ensuite 1 ml de surnageant a été additionné de 2 ml du réactif de Salkowski (Annexe II) (figure II.3).

II.1.6.1. Dosage de l'AIA au spectrophotomètre

La coloration rose-rouge après 30 min d'incubation à température ambiante dans l'obscurité révèle la présence de l'AIA. La densité optique a été lue à 530 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (Rabhi, 2012) (spectrophotomètre *JENWAY 6715*). Les taux de l'AIA libérés ont été calculés à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage et exprimés en µg/ml (Annexe III).

II.1.7. Solubilisation des phosphates

La capacité de la solubilisation du phosphate par les isolats mutants a été testés sur bouillon NBRIP (National Botanical Research Institut's Phosphate) (Annexe I)

Tous les isolats mutants ont été utilisé pour inoculer des Erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu NBRIP avec le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore. Les milieux inoculés ont été incubés à 30°C sous agitation permanente à 180 rpm. Après 7 jours d'incubation, 5 ml de chaque Erlenmeyer a été centrifugé à 6000 rpm pendant 20 minutes.

La quantité de phosphate soluble dans surnageant a été déterminé par la méthode Spectrophotométrique du jaune de vanado-molybdate (**Jackson, 1958**). Pour ceci 1ml du surnageant a été ajouté à 2,5 ml de réactif de Barton (Annexe II), ce volume a été complété à 50 ml avec l'eau distillée. Le développement d'une couleur jaune indique la production de phosphate soluble. Après 10 min, la concentration du phosphate a été déterminée par la mesure de la densité optique à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. La quantité de phosphore libéré a été exprimée en $\mu\text{g/ml}$ par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage (Annexe III) (Figure II.4).

*Résultats et
discussion*

III. Résultats et discussion

III.1. Détermination des taux de survie et le temps de mutation

Cette étape permettra d'obtenir une population de mutants avec une variabilité génétique, potentiellement capable d'optimiser quelques activités PGP.

L'un des buts attendus de cette expérience est d'obtenir un pourcentage de survie adéquat compris entre 1 et 10%, (Hopwood *et al.*, 1985). Attestant d'un effet optimal de cet agent mutagène. Après dénombrement des UFC à la suite du différent traitement testé, les taux de survie ont été calculés (Figure III.1, Tableau III.1),

On observe sur les figures III.1 et III.2 que l'augmentation du temps d'exposition au rayon UV diminue le nombre de cellules viables. En effet, le taux de survie atteint 10% après 30 min de traitement pour les deux souches testées.

Ces résultats correspondent aux effets attendus de l'exposition au rayon UV provoquant une diminution de la viabilité cellulaire par des mutations touchant des fonctions essentielles au développement cellulaire (Lawrence 1991).

Dans les travaux de Chibani *et al.*, (2017), le taux de survie atteint 3,38 % après 6 min d'exposition au rayon UV chez *Bacillus sp* et 4,31% après 9 min de traitement chez *Micrococcus sp*, par contre dans la présente étude, le taux de survie atteint 7% et 8% chez NHA68 et NHA78 respectivement après 30 min. ces résultats sont en accord avec les travaux de Rashida *et al* la mutagenèse de *Sténotrophomonas maltophilia* qui ont constaté que les rayons UV sont incapables d'altérer le génome en raison de la présence d'une couche épaisse d'EPS au niveau de la paroi cellulaire de *Sténotrophomonas maltophilia*.

Après mutation, 48 souches mutantes ont été sélectionnées selon leurs caractéristiques macroscopiques pour évaluer toute amélioration de la production d'AIA et la solubilisation du phosphate

III.2. Production de l'acide 3-indole acétique

III.2.1. Les mutantes de La souche NHA68

La production de l'AIA est une caractéristique commune chez les PGPR. Les 29 souches bactériennes mutantes sélectionnées ont montré une réaction positive avec le réactif de Salkowski, l'apparition d'une coloration rose reflète la présence de l'AIA (Figure III.3). Ce pouvoir de production d'AIA varie de 16,22 à 28,95 µg/ml (Figure III.4).

La souche sauvage a montré une production d'AIA de 23,31 µg/ml, 5 souches ont montrées une amélioration de la production de l'AIA, parmi elle la souche NHA68-m18 a

montré une importante amélioration de 24.21%, une faible amélioration a été observé chez les souches : NHA68-m24, NHA68-m12, NHA68-m8, et NHA68-m17, avec des taux d'amélioration de : 4.09, 3.74, 2.31 et 1.78% respectivement. Par contre, 23 isolats ont montré une diminution de la production du métabolite (Figure III.5).



Figure III.3: Production d'AIA par les souches bactériennes mutantes.

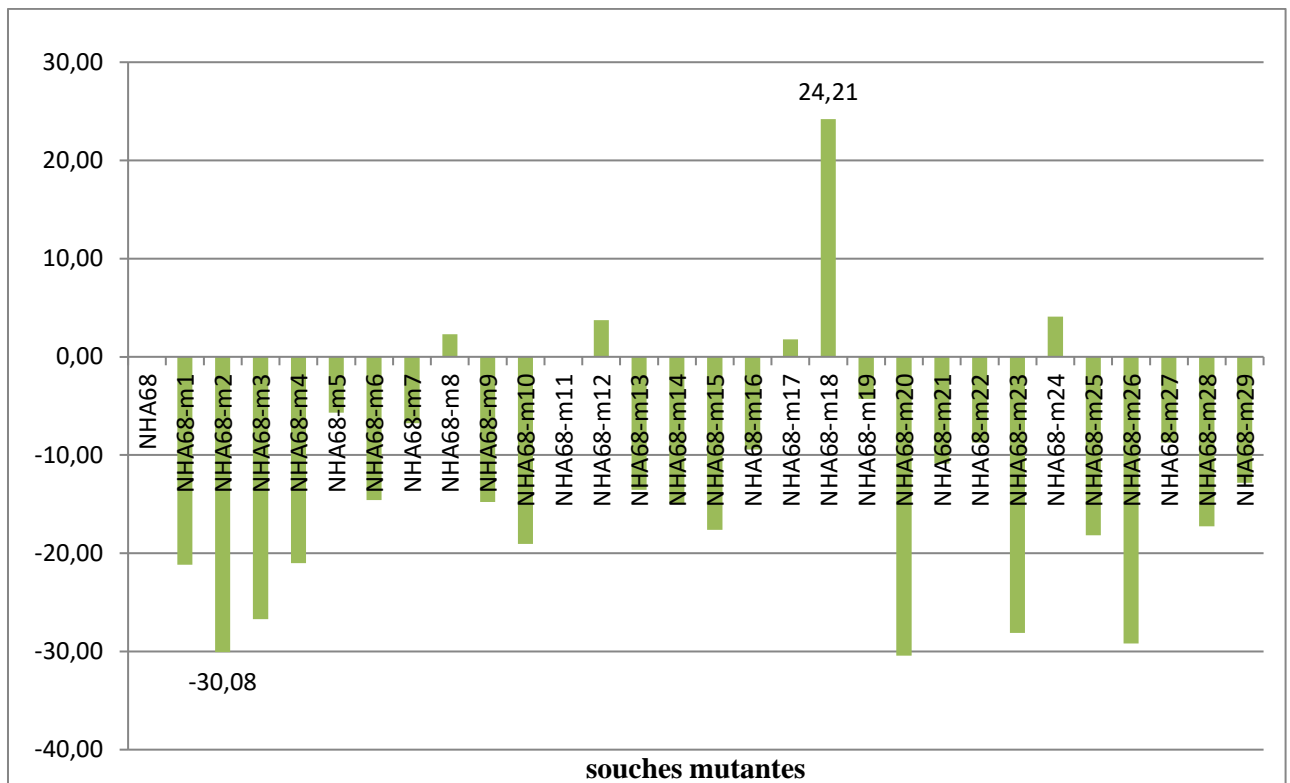


Figure III.5 : Pourcentage d’amélioration de l’AIA produit par les souches mutantes (La souche NHA68)

III.2.2. Les mutantes de La souche NHA78

Les taux de production d’AIA observés chez les mutantes de NHA78 vont de 12.98 jusqu’à 24.64 µg/ml (Figure III.6). La souche sauvage a montré une production d’AIA de 17.79 µg/ml, 14 souches mutants ont montrées une amélioration de la production de l’AIA, parmi-elles 7 souches ont montrées une importante amélioration allant de 22.62% à 38.48% par les souches : NHA78-m4, NHA78-m5, NHA78-m6, NHA78-m10, NHA78-m12, NHA78-m13, et NHA78-m19 , une amélioration moyenne a été observé chez les souches : NHA78-m14, NHA78-m15 et NHA78-m18 avec des taux d’amélioration de 13.6, 13.76 et 11.90% respectivement, et une diminution des taux de production d’AIA pour les souches NHA78-m8, NHA78-m16 et NHA78-m17 (Figure III.7).

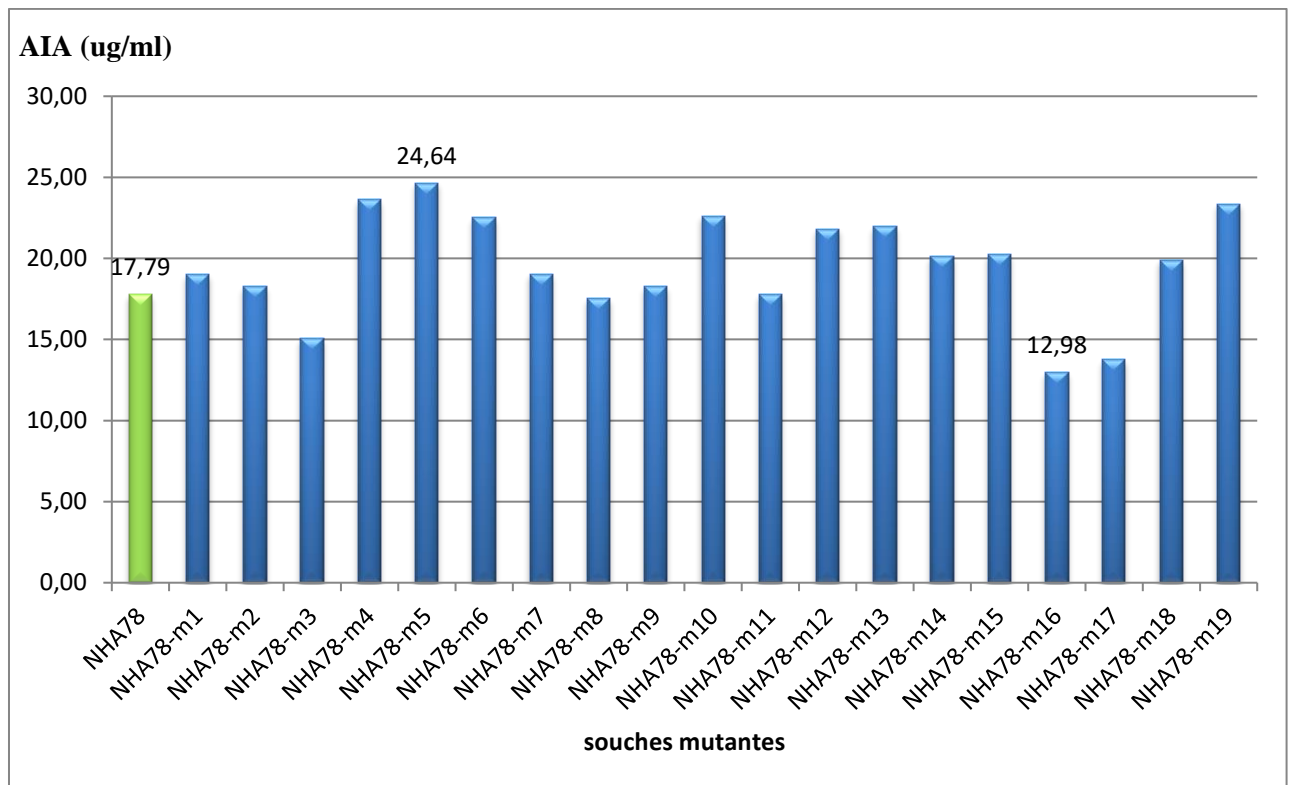


Figure III.6 : Taux de l'AIA produit par les souches mutantes
(la souche NHA78)

L'estimation du niveau d'AIA produit par les souches sauvages et mutantes a révélé que toutes les mutantes sélectionnées sont capables de produire cette phytohormone lorsque le milieu est additionné de L-tryptophane, comme observé par d'autres chercheurs (Fatnassi *et al.*, 2013; Rajendran *et al.*, 2012). En effet, la production d'AIA a été rapportée pour nombreuses bactéries (Marasco *et al.*, 2013; Mohite, 2013). Cependant, Khalid *et al.* (2004) ont suggéré que 80% des bactéries isolées de la rhizosphère sont capables de synthétiser l'acide indole 3-acétique, ce qui améliore la croissance des plantes et favorise une augmentation de la surface racinaire, facilitant ainsi l'absorption des nutriments du sol par les végétaux (Ahmad *et al.*, 2008). Dans cette étude, une amélioration de la production d'AIA par l'utilisation des rayons UV a été effectuée sur les des souches de *Sténotrophomonas maltophilia*, l'utilisation des UV est plus efficace par rapport à des agents mutagènes chimiques (Prabakaran *et al.*, 2009; Nashima *et al.*, 2012).

III.3. Solubilisation du phosphate tricalcique

Les bactéries mutantes sélectionnées ont été testées pour leurs capacités à solubiliser le phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sous sa forme assimilable par la plante.

Le pouvoir de la solubilisation est basé sur la mesure du phosphore soluble sous forme d'orthophosphate libérée en milieu liquide contenant un composé de phosphate minéral insoluble comme seule source de phosphore. La capacité des isolats étudiés à solubiliser le phosphate inorganique a été testée en utilisant le milieu liquide NBRIP. L'intensité de la couleur jaune indiquent la quantité de phosphore libérée après l'addition de réactif Barton aux surnagent (Figure III.8). Le phosphore soluble a été calculé à partir de l'équation de régression d'après la courbe d'étalonnage.

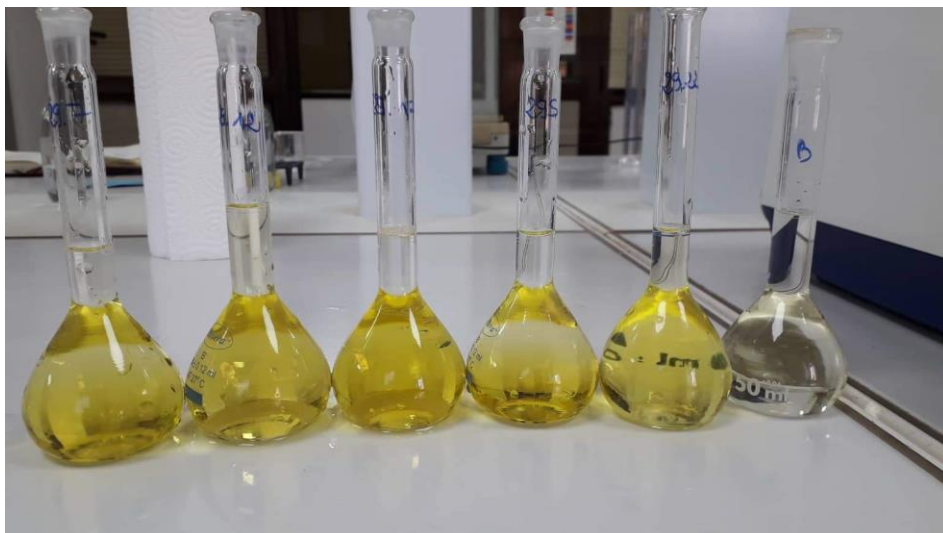


Figure III.8 : solubilisation du phosphate tricalcique en milieu NBRIP par les souches mutantes.

III.3.1. Les mutants de La souche NHA68

Les résultats obtenus ont montré que La capacité des isolats à solubiliser le phosphate varie entre 230.71 à 635 µg/ml. La solubilisation maximale a été observée chez la souche NHA68-m18 suivie par la souche NHA68-m20 et la souche NHA68-m17 avec une solubilisation de 635, 620.71 et 606.43 µg/ml. La souche sauvage a montrée une solubilisation de phosphate de 392.14 µg/ml (Figure III.9). En parallèle le pourcentage d'amélioration a été calculé, Une amélioration maximale a été constatée chez la souche mutante NHA68-m18 avec un taux d'amélioration de 61.93%. 13 souches mutant ont montrées une faible amélioration de la solubilisation de phosphate et une diminution des taux de solubilisation de phosphate pour les 13 souches restantes. (Figure III.10)

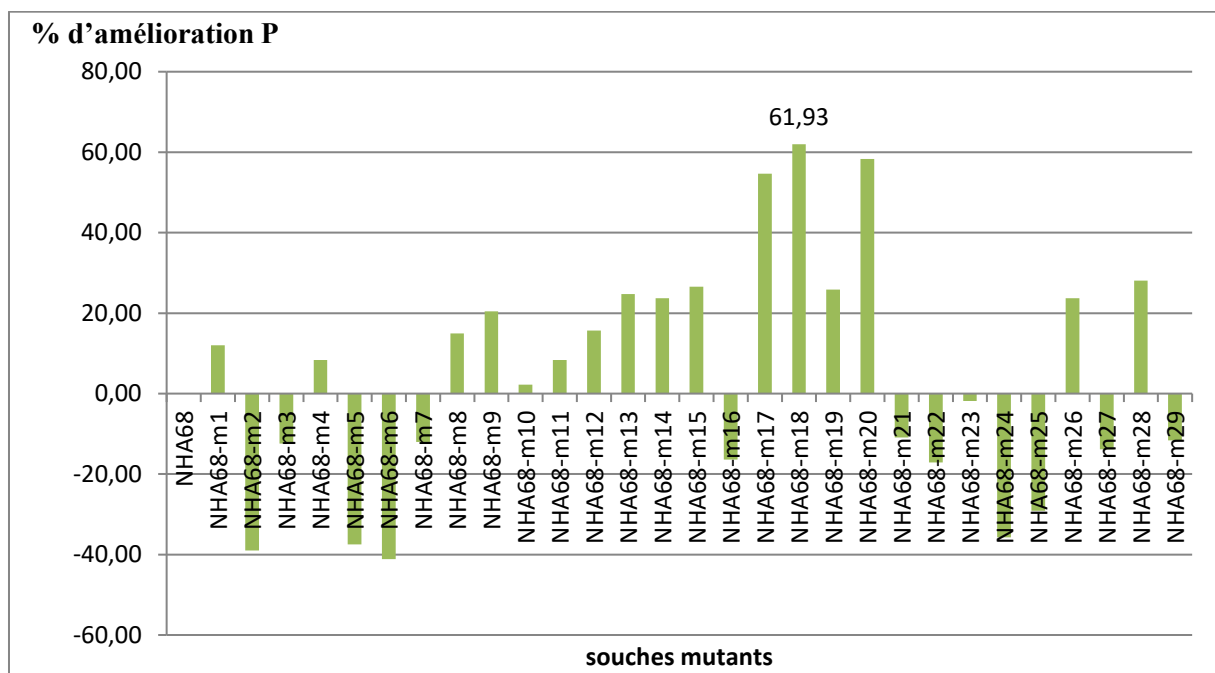


Figure III.10 : Pourcentage d'amélioration de solubilisation du phosphate tricalcique par les souches mutantes (la souche NHA68)

III.3.1. Les mutants de La souche NHA78

Pour les souches mutantes de NHA78 une solubilisation maximal de phosphate a été observé chez les souches NHA78-m14, NHA78-m4, NHA78-m12 et NHA78-m19 avec des taux de solubilisation de 392.14, 366.43, 360.71 et 379.29 respectivement. 12 souches ont montrée une solubilisation moyenne de phosphate allant de 275 jusqu'à 353.57 $\mu\text{g/ml}$.

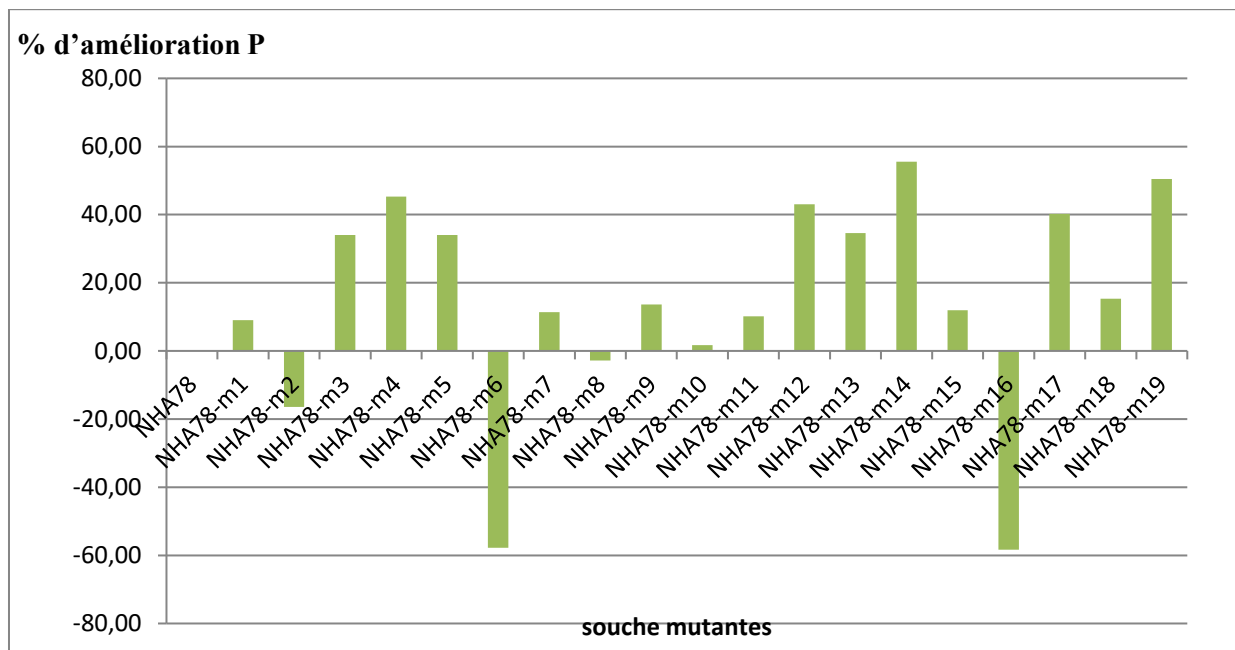


Figure III.12 : Pourcentage d'amélioration de solubilisation du phosphate tricalcique par les souches mutantes (la souche NHA78)

Le phosphore est le deuxième nutriment le plus important pour les plantes après l'azote. Il représente environ 0,2% du poids sec des plantes, en outre il est considéré comme un constituant essentiel des acides nucléiques et des phospholipides (Nisha *et al.*, 2014). Des études sur les genres *Sténotrophomonas* se sont révélés être de bons solubilisant de phosphate et biofertilisants. (de-Freitas *et al.* 1997; Suckstorff et Berg 2003).

Dutta et Banerjee (2006) ont rapporté l'utilisation de la mutation par UV pour améliorer la solubilisation du phosphate de l'isolat *Pseudomonas rugulosum* par, les mutantes de cette souche ont augmenté l'absorption de phosphate et ont stimulé la croissance de plants de maïs (Reyes *et al.*, 2001). D'autre résultats de l'amélioration la solubilisation de phosphore par UV d'une souche mutantes de *Pseudomonas corrugate* ont été rapporté par Trivedi et Sa (2008)

Certaines souches mutantes testés ci-dessus pourraient présenter plus de deux ou trois caractères PGP, ce qui pourrait favoriser la croissance des plantes directement ou indirectement ou en synergie (Gupta *et al.*, 2000).

Conclusion

Conclusion

Les PGPR jouent donc un rôle important comme agents de lutte contre les infections des plantes par des agents phytopathogènes Cette fonction est assurée, en grande partie, par la capacité de ces bactéries a produire des substances antifongiques et des phytohormones, de fixer l'azote atmosphérique et de réguler de la production d'éthylène par les plantes. Également, la solubilisation du phosphate vers des formes assimilables par les plantes et la production des chélateurs de Fer.

L'objectif de ce travail est basé sur l'amélioration de quelques activités PGP chez deux souche de *Sténotrophomonas maltophilia* NHA68 et NHA78 par mutagenèse physique au rayon UV, cette étape permettra d'obtenir une population de mutants avec une variabilité génétique, potentiellement capable d'optimisé la production de l'Acide Indole Acétique et la solubilisation de phosphate

Après mutation, 48 souches mutantes ont été sélectionnées selon leurs caractéristiques macroscopiques pour évaluer toute amélioration de la production d'AIA et la solubilisation du phosphate

Pour les mutantes de la souche NHA68, 5 souches ont montrées une amélioration de la production de l'AIA avec un taux d'amélioration maximal de 24.21%,et 7 souches ont montrées une importante amélioration allant de 22.62% à 38.48% pour les mutantes de la souche NHA78.

Concernant la solubilisation de phosphate, Une amélioration maximale a été constatée chez la souche mutante NHA68-m18 avec un taux d'amélioration de 61.93%, et Pour les souches mutantes de NHA78 la solubilisation maximal de phosphate a été observé chez les souches NHA78-m14, NHA78-m4, NHA78-m12 et NHA78-m19 avec un taux d'amélioration maximale de 55,52%

On peut conclure que la mutation induite aux rayons UV peut provoquer une bonne amélioration des activités PGP.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- **Ahemad, M. and Kibret, M. 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science* 26: 1–20.
- **Alabouvette, C. et Cordier, C. (2018).** Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes. *Innovation Agronomiques*. 69, 61-70.
- **Alavi, P., Starcher, M. R., Zachow, C., Muller, H., and Berg, G. (2013).** Rootmicrobe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405. *Front. Plant Sci.* 4:141. doi: 10.3389/fpls.2013.00141
- **Bakthavatchalu, S., Shivakumar, S. et Shanker, S.B. (2012).** Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluation of their potential as biocontrol agents. *Acta Biol. Indica*. 1 (1), 61-67.
- **Beneduzi, A., Ambrosini, A. et Passaglia, L.M.P. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35 (4), 1044-1051.
- **Berg, G., Egamberdieva, D., Lugtenberg, B., and Hagemann, M. (2010).** “Symbiotic plant-microbe interactions: stress protection, plant growth promotion and biocontrol by *Stenotrophomonas*,” in *Symbiosis and Stress*, eds J. M. G. Seckbach and M. Grube (Dordrecht: Springer), 445–460.
- **Brooke, J., Bonaventura, G. D., Berg, G., and Martinez, J. L. (2017).** Editorial: a multidisciplinary look at *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging multi-drug-resistant global opportunistic pathogen. *Front. Microbiol.* 8:1511. doi: 10.3389/fmicb.2017.01511
- **Çakmakçı, R., Turan, M., Kıtır, N., Güneş, A., Nikerel, E., Özdemir, B.S., Yıldırım, E., Olgun, M., Topçu, B., Tüfenkçi, Ş., Karaman, M.R.L.T. and Mokhtari, N.E.P. 2017.** The role of soil beneficial bacteria in wheat production: A review. In: Wanyera, R. and Owuoche, J. (eds.) *Wheat Improvement, Management and Utilization*.

- **Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. (2007).** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 330-339.
- **Chen, C., Belanger, R. R., Benhamou, N., and Paulitz, T. C. (2000).** Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56, 13–23. doi: 10.1006/pmpp.1999.0243
- **Cherif, H. (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse doctorat de l'Université de Sétif, pp 19-30.
- **Chibani Hiba Rahman, Fellahi Soltana, Chibani Abdelwaheb. (2017).** "Enhancement of protease production by *Bacillus* sp. and *Micrococcus varians* induced by UV-mutagenesis". *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology* (ISSN: 2456- 1878).2(5):2348-2353.Doi:10.22161/ijeab/2.5.10
- **Clarridge, J. E. (2004).** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
- **Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B., Kausar, R. (2016).** Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev.* 37: 130–136
- **De-Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ. (1997).** Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of Canola *Brassica napus* L. *Biol Fert Soils.* 24:358–364
- **Denton M, Kerr KG. (1998)** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* janv;11(1):57-80.
- **Dutta, J. R., & Banerjee, R. (2006).** Isolation and characterization of a newly isolated *Pseudomonas* mutant for protease production. *Brazilian archives of biology and technology*, 49, 37-47.
- **Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T., et al. (2011).** Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. *Biol. Fertil. Soils* 47, 197–205. doi: 10.1007/s00374-010-0523-3

- **Egamberdieva, D., Wirth, J.S., Shurigin, V.V., Hashem, A. and Abd_Allah, E.F. (2017).** Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under Salt Stress. *Frontiers in Microbiology* 8: 1887.
- **Elhalag, K.M., Messiha, N. A., Emara, H.M., and Abdallah, S. A. (2016).** Evaluation of antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* against *Ralstonia solanacearum* under different application conditions. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1629–1645. doi: 10.1111/jam.13097
- **Glick, B.R., Liu, C., Ghosh, S., Dumbrof, E.B. (1997).** Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil. Biol. Bioch.* 29:1233–1239.
- **Gupta, A., Gopal, M. et Tilak, K.V.B. (2000).** Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V. (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microbiol. Biochem.* 7: 96–102.
- **Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010).** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Ann. Microbiol.* 60: 579–598.
- **Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H. 1985.** Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual, John Innes Foundation Norwich, pp, 356.
- **Hugenholtz, P. (2002).** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), 1-8.
- **Jackson, M.L. (1958).** Soil Chemical Analysis. *Prentice Hall of Englewood cliffs*, New Jersey, USA. 500p.
- **Jourdan, E., Ongenara, M. et Thonart, p. (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *fBiotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 (4), 437-449.
- **Justin, C., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O. and Hanawalt, P.C. (2001).** Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics.*, 158: 41-64.

- **Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Saqlan, S.M. and Rasheed, M. 2009.** Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *American journal of Agricultural and Biological Sciences* 1: 48–58.
- **Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M. (2009).** Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7:1–19
- **Kloepper J.W., Zablotowicz R.M., Tipping E.M., and Lifshitz R. (1991).** Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In *The rhizosphere and plant growth*. Keister, D.L., Cregan, B.P. (Eds.). Springer, Netherlands. 315- 326.
- **Koike, M., Okamoto, T., Tsuda, S., and Imai, R. (2002).** A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 46–53. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02391-4
- **Kucey, R.M.N., Janzen, H.H. et Legget, M.E. (1989).** Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.*, 42:199–228.
- **Kumar, A., Prakash, A. and Johri B.N. 2011.** *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. In: D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. in *Agrobiolgy: Crop Productivity*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- **Kumari, V., and Srivastava, J. S. (1999).** Molecular and biochemical aspects of rhizobacterial ecology with special emphasis on biological control. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 535–543. doi: 10.1023/A:1008958912647.
- **Lawrence, CHRISTOPHER W. 1991.** « [I8] Classical Mutagenesis Techniques », mai, 9.
- **Loper, J. E., Schroth, M. N. (1986).** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76(4), 386-389.
- **Lugtenberg, B. J., Dekkers, L., & Bloemberg, G. V. (2001).** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 461-490.
- **Nadeem, S.M., Ahmad, M., Zahir, Z.A., Javaid, A. 2014.** The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429–48.
- **Nashima, K., Santhiya, P., & Palanisamy, A. (2012).** Production and optimization of lipase from wild and mutant strains of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. *J. Acad. Indus. Res*, 1(2), 97-100.

- **Nautiyal, C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- **Nisha, K., Padma Devi, S. N., Vasandha, S. Sunitha kumari K (2014).** Role of Phosphorous Solubilizing Microorganisms to Eradicate P-Deficiency in Plants: A Review. *International Journal of Science and Research*, 4, 1-5.
- **Petti, C. A. (2007).** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 44, 1108- 1114.
- **Podile, AR. et Kishore, GK. (2006).** Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS (ed) Plant-associated bacteria: rhizosphere bacteria. Springer, Netherlands, 195–230.
- **Prabakaran, M., Thennarasu, V., Mangala, R. A., Bharathidasan, R., Chandrakala, N., & Mohan, N. (2009).** Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. *Indian J Sci Technol*, 2(11), 46-49.
- **Pradhan, N. et Sukla, L.B. (2005).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol.*, 5(10): 850-854.
- **Prasad, S., Kumar, M. et Varma, A. (2015).** Role of PGPR in soil fertility and plant health. *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Soil Biol.* 42, 247-260.
- **Pujic, P., Normand, P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*. **298**: 26-29.
- **Ramamoorthy, V., Raguchander, T., and Samiyappan, R. (2002).** Enhancing resistance of tomato and hot pepper to phythium diseases by seed treatment with fluorescent Pseudomonas. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 429–441. doi: 10.1023/A:1016062702102
- **Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R. (2011).** Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annu. Rev. Ecol. Environ. Syst.* **42** : 489–512.
- **Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., & Antoun, H. (2001).** Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1741-1747.

- **Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., et al. (2009).** Versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Microbiol. Rev.* 7, 514–525. doi: 10.1038/nrmicro2163
- **Sharma, K., Dak, G., Agrawal, A., Bhatnagar, M. et Sharma, R. (2007).** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed and seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, 1: 61-63.
- **Silini, A., Cherif-Silini, H. Yahiaoui, B. (2013).** Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *African J. Microbiol. Res.* 10 : 387-399.
- **Singh, V. K., Kavita, K., Prabhakaran, R., and Jha, B. (2013).** Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling* 29, 855–867. doi: 10.1080/08927014.2013.807914
- **Sivasakhi, S., Usharani, G. et Saranraj, P. (2014).** Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Agric. Res.* 9 (16), 1265-1277.
- **Solaiman, E.A.M., Hegazy, W.K. and Moharam, M.E. 2005.** Induction of overproducing alkaline protease *Bacillus* mutants through UV irradiation. *Arab J. Biotech.*, 8 (1): 49-60.
- **Son, T.T.N., Diep, C.N. et Giang, T.T.M. (2006).** Effect of bradyrhizobia and phosphate solubilizing Bacteria application on Soybean in rotational system in the Mekong delta. *Omonrice*, 14:48–57.
- **Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007.** Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 425–448.
- **Subbarao, N.S. (1988).** Phosphate solubilizing micro-organism. *In: Biofertilizer in agriculture and forestry.* Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, 133–142.
- **Suckstorff I, Berg G. (2003).** Evidence for dose dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *J Appl Microbiol.* 95:656–663.
- **Tilak, K.V., Ranganayaki, K. K., Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Nautiyal, C. S., Mittal, S., Tripathi, A.K., Johri, B. N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science.* 89 : 136-150.

- **Trivedi, P., & Sa, T. (2008).** *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Current Microbiology*, 56(2), 140-144.
- **Weller, D. M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- **Weyens, N., S. Monchy, J. Vangronsveld, S. Taghavi, et D. Vander Lelie. (2010).** Plant- microbe Partnerships, p. 012- 0172 . *In: Timmis K.N. (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Annexe

Annexe I: composition des milieux de cultures**1. Gélose nutritif (par litre)**

Peptone	10g
NaCl.....	5g
Extrait de levure.....	3g
Extrait de viande	3g
Agar agar.....	20g

PH = 7± 0,2.

2. Bouillon nutritif (par litre):

Peptone.....	10g
NaCl.....	5g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure.....	3g
Eau distillée.....	1000ml

PH = 7± 0,2.

3. Bouillon NBRIP (par litre)

Glucose.....	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	
0.1g	
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	
0.25g	
KCl.....	0.2g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	
5.0g	
Ca ₃ (PO ₄) ₅	
5.0g	

PH = 7± 0,2.

4. **Luria bertani** (par litre)

Peptone 10g

Na Cl 5g

Extrait de levure 5g

PH = $7 \pm 0,2$.

5. **Eau physiologique** :

Eau distillée stérile 1000ml

Na CL 9g

PH = $7 \pm 0,2$.

Annexe II : Réactifs

1. Réactifs de Salkowski :

FeCl₃..... (0.5M)1ml

Acide perchlorique50 ml, (35%)

50 ml d'acide perchlorique à 35% + 1ml de fecl₃ à 0.5M.

2. Réactifs de Barton

Solution A : Ammonium molybdate

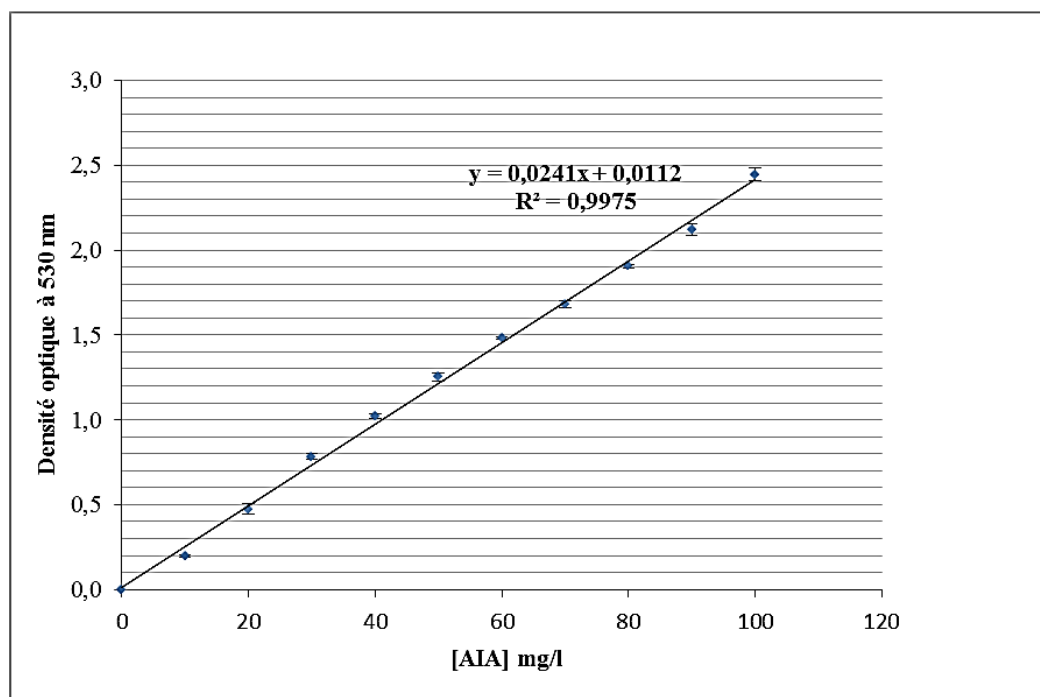
Dissoudre 12,5g d'ammonium molybdate (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, dans 200 ml d'eau distillée.

Solution B: Ammonium Vanadate

Dissoudre 0,625g d'ammonium Vanadate (NH₄) VO₃, 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 distillée

Annexe III : Courbes d'étalonnages**1. Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA**

Courbe étalon pour la détermination de la concentration du phosphate libre

