



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : *Biotechnologie et Génomique Végétale*

## Intitulé :

---

**Isolement et caractérisation des *Rhizobia* nodulant la fève (*Vicia faba*) dans trois régions de Constantine et étude de leurs mécanismes d'action en tant que PGPR.**

---

Présenté et soutenu par : BOUGHABA AMIRA

Le : 17/07/2019

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Dr. MAOUGAL R. T. (M.C.B – INATAA UFM Constantine 1).

Encadrant : Dr. KECHID M (M.C.B – INATAA UFM Constantine 1).

Examineur : Dr. TEMAGOULT M. (M.A.A – SNV UFM Constantine 1).

*Année universitaire*  
*2018 – 2019*

# **REMERCIEMENTS**

*Tout d'abord, je remercie **Dieu** le tout puissant pour la force et la volonté qu'il m'a donné pour mener à bien ce modeste travail.*

*J'aimerais exprimer mes plus sincères remerciements à mon encadrant, Madame **KECHID M**, qui m'a guidée tout au long de la réalisation de ce travail, Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*Je remercie infiniment Madame **MAUGAL R.T.** d'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'elle me permet de lui exprimer dans ces lignes mon profond respect.*

*Je remercie également Mr **TEMAGOULT M.** maitre assistant à l'Université Mentouri-Constantine I, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

*Nous tenons à remercier toute l'équipe des laboratoires de « Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales », en particulier, Mr. **Nadir BELBEKRI** pour son assistance et ses conseils, ainsi que Mme **ZAHRAOUI Chafika** et Mme **Bouldjedj Rima** qui ont été très patiente et bienveillante avec nous.*

*Nous n'oublions pas de remercier tous **nos enseignants** qui ont contribué à notre formation durant tous nos études.*

*Enfin, on remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

# ***DEDICACE***

*Je dédie ce travail*

*A ma très chère mère Fadila qui est la lumière de ma vie, et qui a attendu avec Patience le fruit de sa bonne éducation.*

*A mon très cher père Abdelhak qui m'a éclairé mon chemin et qui m'a encouragé et m'a soutenu tout au long de mes études.*

*Que le dieu leur présente une bonne santé et une longue vie.*

*A mon frère Amir et mes sœurs Chahra, Sara et Abir et leurs enfants: Loulou, Djawed et Ayoub.*

*À toute ma famille.*

*A tous mes enseignants et collègues de BTGV*

*Egalement je dédie ce travail à mes adorables amies: Aida, Nessrine, Chaima...*

*A tous ceux qui m'aiment et j'aime, merci pour tous.*

***AMIRA***



# Table des matières

*Résumés*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Liste des abréviations*

INTRODUCTION ..... 1

## Partie Bibliographique

### Chapitre 1: Généralités sur la Fève

**1. FABACEAE..... 3**

    1.1. PAPILIONOIDEAE..... 3

    1.2. MIMOSOIDEAE..... 4

    1.3. CAESALPINOIDEAE..... 4

**2. ORIGINE ET HISTORIQUE DE LA FEVE ..... 4**

**3. DESCRIPTION DE LA PLANTE (*VICIA FABA* L.)..... 4**

**4. POSITION SYSTEMATIQUE..... 7**

**5. INTERET DE LA FEVE..... 7**

    5.1. INTERET ALIMENTAIRE .....7

    5.2. INTERET AGRONOMIQUE..... 8

    5.3. INTERET ECONOMIQUE ET ECOLOGIQUE ..... 9

**2. RHIZOBIA ..... 9**

**3. SYMBIOSE LEGUMINEUSE-*RHIZOBIUM*..... 10**

    3.1. GENERALITES ..... 10

    3.2. NODULATION ..... 11

        3.2.1. Etape de la nodulation ..... 11

## Partie Bibliographique

### Chapitre 2: PGPR

**1. GENERALITES SUR LES RHIZOBACTERIES PROMOTRICES DE LA CROISSANCE DES PLANTES ..... 14**

**2. MODE D’ACTION DES PGPR.....15**

    2.1. MODE DIRECT .....16

        2.1.1. Acquisition des ressources.....16

    2.2. MODE INDIRECT ..... 20

        2.2.1. Compétition pour l’espace et les nutriments.....20

2.2.2. Production des sidérophores.....	20
2.2.3. Productions des antibiotiques (l'antibiose) .....	21
<b>3. GENRES DE BACTERIES PGPR .....</b>	<b>21</b>
3.1. GENRE AZOSPIRILLUM.....	21
3.2. GENRE RHIZOBIUM.....	22
3.3. GENRE BACILLUS .....	22
3.4. GENRE PSEUDOMONAS.....	23

## **Partie Matériel et Méthodes**

<b>1. DESCRIPTION DE LA ZONE D'ETUDE.....</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIEL BIOLOGIQUE .....</b>	<b>24</b>
<b>3. RECOLTE DES PLANTES DE FEVE.....</b>	<b>25</b>
<b>4. ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DES NODOSITES .....</b>	<b>25</b>
4.1. PRELEVEMENT DES NODOSITES.....	25
4.2. CONSERVATION DES NODOSITES.....	26
4.3. DESINFECTION DES NODOSITES .....	27
4.4. ECRASEMENT DES NODOSITES ET ISOLEMENT DES BACTERIES .....	27
4.5. PURIFICATION DES ISOLATS .....	28
<b>5. CARACTERISATION DES ISOLATS .....</b>	<b>28</b>
5.1. EXAMEN MICROSCOPIQUE PAR COLORATION DE GRAM.....	28
5.2. ETUDE DES ENZYMES RESPIRATOIRES.....	29
5.2.1. Recherche de la Catalase.....	29
5.2.2. Recherche de l'Oxydase.....	29
5.3. UTILISATION DES SUCRES COMME SEULE SOURCE DE CARBONE .....	30
5.4. RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES .....	30
<b>6. ANALYSE DE QUELQUES MODES D'ACTION DES PGPR .....</b>	<b>30</b>
6.1. SOLUBILISATION DU PHYTATE.....	30
6.2. DOSAGE DE L'ACIDE INDOLE ACETIQUE.....	31
6.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE.....	31
<b>7. CONSERVATION DES ISOLATS .....</b>	<b>32</b>
<b>8. EVALUATION STATISTIQUE.....</b>	<b>32</b>

## **Partie Résultats et Discussion**

<b>1. MESURE DE POIDS FRAIS ET SEC DE LA PLANTE VICIA FABA L. 34</b>	<b>34</b>
<b>2. CARACTERE MORPHOLOGIQUE DES ISOLATS .....</b>	<b>35</b>
2.1. CROISSANCE SUR MILIEU YMA+ROUGE DE CONGO .....	35
2.2. PURIFICATION DES ISOLATS ET COLORATION DE GRAM .....	36

<b>3. ETUDE DES ENZYMES RESPIRATOIRE.....</b>	<b>39</b>
3.1. RECHERCHE DE LA CATALASE.....	39
3.2 RECHERCHE DE L'OXYDASE .....	42
<b>4. UTILISATION DES SUCRES COMME SEULE SOURCE DE CARBONE</b> <b>.....</b>	<b>43</b>
<b>5. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>47</b>
<b>6. ANALYSE DES CARACTERES PGPR.....</b>	<b>50</b>
6.1. SOLUBILISATION DU PHYTATE.....	50
6.2. DOSAGE DE L'ACIDE INDOLE ACETIQUE	
.....503	
6.3 ACTIVITE NITRATE REDUCTASE.....	55
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>63</b>

*Annexes*

## ***Résumé***

Dans cette étude, les bactéries ont été isolées à partir des nodosités racinaires de la fève (*Vicia faba* L.) cultivée dans trois régions du nord de Constantine (Hamma Bouziane, Didouche Mourad et Beni H'midene) qui a pour but d'une part d'étudier les *Rhizobia* des nodosités de cette plante et d'une autre part la détermination de quelques modes d'action des PGPR sur ces isolats.

Notre travail pratique débute par une mesure de poids frais et sec des plantes, suivi d'une caractérisation de cinquante-quatre isolats, le travail débute par une étude morphologique sur milieu YMA + Rouge de Congo (RC) et un test de coloration de Gram. Puis une caractérisation des différents isolats a été réalisée, qui regroupe certains tests biochimiques sur la recherche de la catalase et de l'oxydase, la capacité des isolats à assimiler les sucres comme source de carbone, la résistance aux antibiotiques et la capacité des isolats à solubiliser le phytate. À partir des cinquante-quatre isolats de départ, quarante-deux isolats sont sélectionnés, pour faire l'objet de la caractérisation de deux modes d'action des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), qui sont: la production de l'Acide Indole Acétiques et l'activité Nitrate Réductase. Cette étude a montré que la majorité des isolats testés sont des bactéries à Gram négative. L'étude des enzymes respiratoire indique la présence de la Catalase pour la majorité des isolats, par contres, elles ne possèdent pas l'enzyme respiratoire Cytochrome Oxydase, les différents isolats présentent une variabilité dans l'assimilation des différents sucres. De même, la plupart des isolats ont montré leur sensibilité aux antibiotiques utilisés surtout la Gentamicine. De plus, ils ont la capacité de pousser sur milieu NBRIP en solubilisant le phytate. Les résultats obtenus correspondent avec les caractéristiques taxonomiques des *Rhizobia*. Ces mêmes isolats ont montré leur capacité à produire l'auxine et à dégrader le nitrate.

**Mots clés :** Fève (*Vicia faba* L.), Nodosités, *Rhizobia*, PGPR.

## ***Abstract***

In this study, the bacteria were isolated from the root nodules of the bean (*Vicia faba* L.) grown in three regions of northern Constantine (Hamma Bouziane, Didouche Mourad and Beni H'midene) which aims to It is also necessary to study the Rhizobia nodules of this plant and also to determine some modes of action of PGPR on these isolates.

Our practical work begins with a measurement of the fresh and dry weight of the plants, followed by a characterization of fifty-four isolates, the work begins with a morphological study on the YMA-Red Congo (RC) environment and a Gram test. Then a characterization of the different isolates was carried out, which includes some biochemical tests on the search for catalase and oxidase, the ability of isolates to assimilate sugars as a source of carbon, antibiotic resistance and the ability of isolates to solubilize phytate. From the fifty-four initial isolates, forty-two isolates are selected, to be the subject of the characterization of two modes of action of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), which are: the production of Indole Acetic Acid and Nitrate Reductase Activity. This study showed that the majority of isolates tested are Gram-negative bacteria. The study of respiratory enzymes indicates the presence of Catalase for the majority of isolates, on the other hand, they do not possess the respiratory enzyme Cytochrome Oxidase, the different isolates exhibit variability in the assimilation of different sugars. Similarly, most isolates have shown sensitivity to antibiotics used especially Gentamicin. In addition, they have the ability to grow on NBRIP medium by solubilizing the phytate. The results obtained correspond with the taxonomic characteristics of *Rhizobia*. These same isolates have shown their ability to produce auxin and degrade nitrate.

**Keywords:** Bean (*Vicia faba* L.), Nodules, Rhizobia, PGPR



في هذه الدراسة، تم عزل البكتيريا من العقد الجذرية للقول التي نمت في ثلاث مناطق شمالية من قسنطينة (حامة بوزيان، ديدوش مراد وبني حميدان). و التي تهدف من جهة الى دراسة عقيدات نبات الفول و من جهة أخرى الى تحديد بعض خصائص العقيدات

يبدأ عملنا بقياس الوزن الطبيعي والجاف للنباتات، يليه توصيف لأربعة وخمسين سلالة معزولة، و يبدأ العمل واختبار ألوان غرام. ثم تم إجراء توصيف للعزلات المختلفة، والتي تشمل بعض الاختبارات بدراسة مورفولوجية و البيوكيميائية البحث عن الكاتالاز و الاوكسيداز، والقدرة على استيعاب السكريات كمصدر للكربون، ومقاومة المضادات الحيوية و قدرة العزلات على الذوبان في الفيتات.

من بين أربعة و خمسين عزلة تم انتقاء اثنين و أربعين عزلة لدراسة عمل و نمو و نشاط النبات حيث تشير دراسة أنزيمات الجهاز التنفسي لوجود الكاتالاز بالنسبة لمعظم العزلات و لكن تفتقر الى انزيم الاوكسيداز، وتظهر العزلات المختلف تباينا في استيعاب السكريات المختلفة و قد اظهرت معظم العزلات حساسيتها للمضادات الحيوية المستعملة بالإضافة إلى قدرتها على تذويب الفيتات وبالمثل، أظهرت معظم العزلات حساسيتها للمضادات الحيوية التي تستخدم بشكل رئيسي الجنتاميسين وبالإضافة إلى ذلك تتوافق النتائج التي تم الحصول عليها مع خصائص الريزوبيا وقد أظهرت هذه العزلات نفسها قدرتها على إنتاج الأوكسين والنترات

الكلمات المفتاحية الفول – PGPR - ريزوبيا – العقد

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 01:</b>	Composition chimique pour 100g net de fève .....	<b>08</b>
<b>Tableau 02:</b>	Exemples d'associations entre Rhizobia et Légumineuses .....	<b>11</b>
<b>Tableau 03:</b>	Les bactéries utilisées dans cette étude.....	<b>31</b>
<b>Tableau 04:</b>	Test morphologique des bactéries isolées du site Hamma Bouziane .....	<b>35</b>
<b>Tableau 05:</b>	Test morphologique des bactéries isolées du site Didouche Mourad .....	<b>36</b>
<b>Tableau 06:</b>	Test morphologique des bactéries isolées du site Beni H'midene .....	<b>37</b>
<b>Tableau 07:</b>	Test catalase des bactéries du site Hamma Bouziane .....	<b>38</b>
<b>Tableau 08:</b>	Test catalase des bactéries du site Didouche Mourad .....	<b>39</b>
<b>Tableau 09 :</b>	Test catalase des bactéries du site Beni H'midene .....	<b>39</b>
<b>Tableau 10 :</b>	Test oxydase des bactéries du site Hamma Bouziane .....	<b>40</b>
<b>Tableau 11:</b>	Test oxydase des bactéries du site Didouche Mourad .....	<b>40</b>
<b>Tableau 12:</b>	Test oxydase des bactéries du site Beni h'midene .....	<b>41</b>
<b>Tableau 13:</b>	Assimilation des sucres par les isolats du site Hamma Bouziane .....	<b>42</b>
<b>Tableau 14:</b>	Assimilation des sucres par les isolats du site Didouche Mourad .....	<b>43</b>
<b>Tableau 15:</b>	Assimilation des sucres par les isolats du site Beni hmidene .....	<b>44</b>
<b>Tableau 16:</b>	Résistance aux antibiotiques pour le site Hamma Bouziane .....	<b>46</b>
<b>Tableau 17:</b>	Résistance des antibiotiques pour le site Didouche Mourad .....	<b>47</b>
<b>Tableau 18:</b>	Résistance des antibiotiques pour le site Beni H'midene .....	<b>48</b>
<b>Tableau 19:</b>	Test qualitatif des bactéries solubilisant la phytate de la région Hamma bouziane .....	<b>49</b>
<b>Tableau 20:</b>	Test qualitatif des bactéries solubilisant la phytate de la région Didouche Mourad .....	<b>50</b>
<b>Tableau 21:</b>	Test qualitatif des bactéries solubilisant la phytate de la région Beni H'midene .....	<b>51</b>

**Liste des figures**

<b>Figure 01:</b>	Phylogénie des <i>Légumineuses</i> .....	<b>03</b>
<b>Figure 02:</b>	Les différentes parties de la fève <i>Vicia faba</i> L.....	<b>05</b>
<b>Figure 03:</b>	Les racines de la fève.....	<b>05</b>
<b>Figure 04:</b>	Aspect morphologique de <i>Vicia faba</i> .....	<b>06</b>
<b>Figure 05:</b>	Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote .....	<b>12</b>
<b>Figure 06:</b>	L'effet biofertilisant des PGPR sur la croissance et la vigueur des plantes de poivrons .....	<b>15</b>
<b>Figure 07:</b>	Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère.....	<b>15</b>
<b>Figure 08:</b>	Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale .....	<b>18</b>
<b>Figure 09:</b>	Fonctions biologiques des sidérophores .....	<b>20</b>
<b>Figure 10 :</b>	Localisation géographique des trois sites de prélèvement de l'espèce étudiée <i>Vicia faba</i> L.....	<b>23</b>
<b>Figure 11:</b>	Racine nodulée de la fève de quelques sites de prélèvements.....	<b>25</b>
<b>Figure 12:</b>	Conservation des nodosités.....	<b>26</b>
<b>Figure 13:</b>	Isolement par la méthode des quatre quadrants.....	<b>27</b>
<b>Figure 14:</b>	Mesure de poids sec et poids frais des plantes de l'espèce <i>Vicia faba</i> pour les trois sites.....	<b>32</b>
<b>Figure 15 :</b>	Résultats de la croissance de quelques isolats sur milieu YMA+RC .....	<b>33</b>
<b>Figure 16:</b>	Purification des isolats.....	<b>34</b>
<b>Figure 17:</b>	Observation microscopique des bactéries isolées (G×100).....	<b>34</b>
<b>Figure 18:</b>	Réaction de la catalase positive .....	<b>38</b>

<b>Figure 19:</b>	Assimilation des sucres pour quelques isolats étudiés.....	<b>41</b>
<b>Figure 20:</b>	Résultat du quelques isolats pour les antibiotiques étudiées.....	<b>45</b>
<b>Figure 21:</b>	Solubilisation du phosphate inorganique sur le milieu «NBRIP» par les Rhizobactéries.....	<b>49</b>
<b>Figure 22:</b>	Production de l'AIA par les Rhizobactéries sur milieu LB liquide.....	<b>52</b>
<b>Figure 23:</b>	Concentration de nitrate produite par les bactéries de trois sites étudiés par une absorbance bactérienne égale à 1.....	<b>58</b>

*Liste d'abréviations*

**%: pourcentage**

**°C : Degré Celsius**

**µm: Micro mètre**

**AIA: Acide indole 3-acétique**

**ANOVA: Analysis of variance**

**BNL: Bactérie Nodulant Légumineuse.**

**CaCl<sub>2</sub>: Chlorure de Calcium**

**Cal: Calories**

**Cm: Centimètre**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxyde d'hydrogène**

**KNO<sub>3</sub>: Nitrate de potassium**

**LB: Lysogeny broth**

**N<sub>2</sub>: Diazote**

**NBRIP: National Botanical Research Institut's Phosphate**

**NFB: Nitrogen Free Broth**

**NR : Nitrate Réductase**

**PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria**

**PH : potentiel hydrique**

**RC: Rouge de Congo**

**RFCP: Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes**

**Rpm: Rotation par minutes**

**YMA: Yeast Manitol Agar**

### **Introduction**

La famille des légumineuses est une des plus importantes familles parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales.

L'espèce *Vicia faba* L. est l'une des légumineuses alimentaires qui fait partie de nos systèmes agraires depuis longtemps. C'est une culture importante considérée comme une source de protéines pour les humains et les animaux (Crépon *et al.*, 2010). Elle joue aussi un rôle dans la rotation des cultures. De même, la fixation d'azote atmosphérique par les biais des *Rhizobia* symbiotiques avec les cultures des légumineuses, a un impact important dans la fertilité des sols (wang *et al.*, 2012).

Les bactéries telle que *Rhizobium*, sont d'une importance considérable en agriculture, à cause de leur capacité à former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses (Somasegaran et Hoben, 1994).

Dans l'interaction plante – *Rhizobium*, on note un haut degré de spécificité. Une légumineuse entre en symbiose avec un nombre limité d'espèces de *Rhizobium*. En revanche, certains microsymbiotes s'associent avec plusieurs partenaires, alors que d'autres ont une gamme d'hôtes étroite. Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques (El hillali, 2006). Vu cette spécificité, il est utile d'étudier cette relation et de l'adapter à certains environnements.

Les Rhizobactéries qui exercent des effets bénéfiques sur le développement des plantes sont appelés rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Ces bactéries facilitent la croissance des plantes directement en aidant à l'acquisition des ressources nutritives (azote, phosphore, fer et les minéraux essentiels) et la production de phytohormones (auxines, gibbérellines---) (Munees et Mulugeta, 2014). Indirectement, les PGPR participent aussi dans la protection des plantes contre les agents phytopathogènes (Mehmood U., 2018).

Notre travail consiste à étudier des bactéries nodulant les racines de la fève (*Vicia faba* L.). L'échantillonnage a été réalisé au niveau de trois régions du nord de Constantine. On a commencé par mesurer le poids frais et sec des plantes, puis, les bactéries isolées à

partir des nodosités des ces plantes ont fait l'objet d'une étude microscopique (coloration de Gram) et une caractérisation des isolats, comprenant une série de tests :

- ✓ Nutritionnels (sucres comme source de carbone),
- ✓ Biochimiques (recherche de la catalase et l'oxydase),
- ✓ Physiologique (résistance au antibiotiques)
- ✓ Caractéristiques spécifiques aux PGPR.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres: D'abord, le premier chapitre est une étude bibliographique ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique, il comporte une partie sur les légumineuses et précisément sur la plante *Vicia faba L* et les *Rhizobia* associés à cette plante, et une seconde partie sur les *rhizobactéries* promotrices de la croissance des plantes. Ensuite, le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes suivies pour la réalisation de ce travail, après, nous présentons le troisième chapitre qui est consacré à la présentation des résultats et leurs discussions et enfin, nous terminons ce travail par une conclusion et quelques perspectives.

## 1. Fabaceae

Les *Fabaceae* représentent une large famille chez les Angiospermes, comprenant plus de 650 genres et 18000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les *Poaceae* en termes de diversité (Cronket *al.*, 2006).

Les *Fabaceae* sont divisées en trois sous-familles (Fig.01): les *Mimosoideae*, les *Caesalpinoideae* et les *Papilionoideae*(Dekak, 2010).

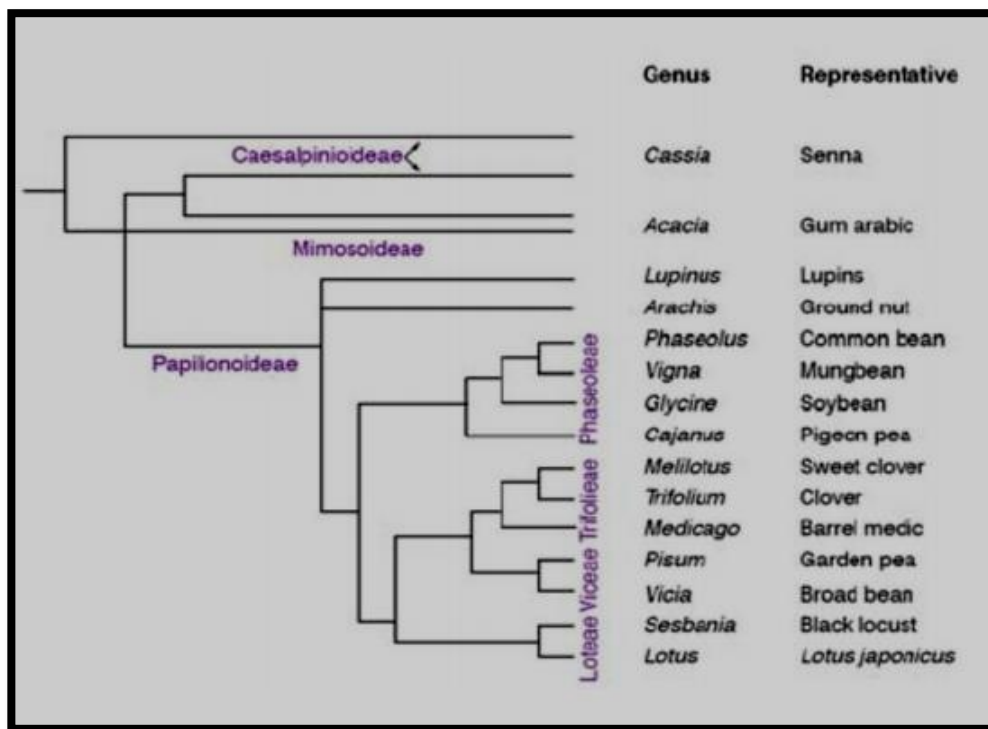


Figure 01:Phylogénie des Légumineuses (Selami, 2017).

### 1.1. Papilionoideae

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de papillon (Guignard et Dupont, 2005). C’est la sous-famille la plus diverse avec environ 430 genres et plus de 12000 espèces. Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes, mais comprenant aussi des arbres et des arbustes, présents en régions tempérées et tropicales (Crété, 1965).



## **1.2. Mimosoideae**

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.*, 2001).

## **1.3. Caesalpinoideae**

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Judd *et al.*, 2001).

L'exemple étudié parmi les espèces des légumineuses est: la fève (*Vicia faba* L.)

## **2. Origine et historique de la fève**

La fève a été domestiquée très tôt dans le monde. Bien que son origine ne soit pas encore claire, il a été longtemps pensé qu'elle était originaire de la méditerranée ou de l'Asie de l'Ouest. D'autres auteurs comme Nuessly *et al.* (2004) et Mikic (2011), la considèrent originaire d'Asie centrale.

L'homme a probablement utilisé *Vicia faba* L. dans sa nourriture dès le néolithique (Boyeldieu, 1991). Elle est essentiellement cultivée dans le bassin méditerranéen, en Amérique du sud et en Asie du Sud-est, cultivée aussi en Europe occidentale et du nord (Gallais et Bannerol, 1992).

## **3. Description de la plante (*Vicia faba* L.)**

La fève (*Vicia faba* L.) est l'une des légumineuses les plus anciennement cultivées dans le monde. La croissance de cette plante est naturellement indéterminée. Cela signifie qu'elle n'est pas limitée par une fleur au sommet qui bloque sa croissance végétative (Sjodin, 1971).

La figure 02 représente l'aspect des feuilles, fleurs et fruits de *Vicia faba* L. Il s'agit d'une plante annuelle, herbacée, robuste et grimpante, qui peut atteindre plus d'un mètre.



**Figure 02:** Les différentes parties de la fève *Vicia faba* L.(Mezani, 2016).

Les racines (Fig.03) sont pivotantes parfois, superficielles plus généralement, portant des nodosités renfermant les bactéries spécifiques fixatrices d'azote atmosphérique : *Rhizobium léguminosarum* (Mouafek, 2010).



**Figure 03:** Les racines de la fève.

Les tiges (Fig.04-a) sont simples, dressées, creuses et de section quadrangulaire, sans ramifications dressant à plus d'un mètre de haut, quant aux feuilles (Fig.04-a), elles comportent deux folioles à la base de la tige puis 3 ou 4 par la suite, de couleur vert glauque ou grisâtre, elles sont grandes, ovales, entières et succulentes (Boyeldieu, 1991).

Les fleurs de la fève (Fig .04-b) sont hermaphrodites, pennées et terminées par une pointe, les fleurs sont de 2 à 3 cm de long, prennent naissance en position axillaire, elles sont de type papilionacé, blanches maculées de noir ou de violet, formées en petites grappes (Boyeldieu, 1991). L'inflorescence est en grappe axillaire de 1 à 6 fleurs, sont constituées d'un calice, d'une corolle blanche ou rosée avec des taches noires sur les ailes. L'ovaire est supère et sessile avec 2 à 4 ovules allant parfois jusqu'à 9 (Boyeldieu, 1991). Très mince, comprimé, d'environ 1,5 cm de long (Brink et Belay, 2006).

Les fruits (Fig.04-c) sont des gousses charnues de 25 à 30 cm de longueur, de couleur verte, épaisses, et contiennent un nombre variable de graines grosses et de forme ovale (3 à 9) (Boyeldieu, 1991).

Les graines (Fig.04-d) sont charnues, vertes et tendres à l'état immature. À complète maturité elles développent un tégument épais et coriace de couleur brun-rouge, à blanc verdâtre et prend une forme aplatie à couleur presque circulaire (Brink et Belay, 2006).



**Figure 04:** Aspect morphologique de *Vicia faba*.

a: Tige et feuilles ; b: Fleurs ; c: fruit (gousses); d: Graines (Mezani S., 2016).

La fève est une espèce diploïde ( $2n=2x= 14$  chromosomes), leur mode de reproduction est partiellement allogame. L'allogamie est réalisée par les insectes pollinisateurs qui interviennent principalement comme vecteur de pollen entre fleurs de la même plante ou entre fleurs de plantes différentes) (Cheriefi et Amrane, 2016).

#### **4. Position systématique**

D'après Dajoz (2000): la fève est classée botaniquement comme suit :

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Dialypétales
Série	Caliciflores
Ordre	Rosales
Famille	Fabacées (légumineuses)
Sous-famille	Papilionacées
Genre	<i>Vicia</i>
Espèce	<i>faba</i>

#### **5. Intérêt de la fève**

##### **5.1. Intérêt alimentaire**

La fève constitue avec les autres légumineuses, la seconde source protéique pour l'alimentation humaine et animale après les céréales. Elle offre de grandes possibilités pour l'alimentation des animaux d'élevage (ruminants et volailles) grâce à son excellente valeur nutritive, à son appétibilité universelle et à sa préparation facile (Daines M., 2018).

Elle renferme un taux élevé en protéine, tout en restant un aliment énergétique (55% de glucides; 340 cal/100g) et peut efficacement remplacer les protéines animales dans les pays pauvres (Fachmann et Kraut, 2006).

Cette légumineuse est également une excellente source de fibres solubles et insolubles, de vitamines de groupe B en particulier (B3, B5, B9 ou acide folique) et de vitamine C, de

minéraux tel que : le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc (Mezani S., 2016). Elles sont aussi une bonne source de glucides (50-60% d'amidon)et considérée parmi les cultures les plus riches en matières nutritives (Mouafek A., 2010). La composition chimique moyenne pour 100 g net est présentée dans le tableau suivant :

**Tableau 01:** Composition chimique moyenne pour 100 g net de fève (Fachmann et Kraut, 2006).

<b>Compositions (g)</b>	<b>Vitamine (mg)</b>
Glucides .....10,0	Acide ascorbique.....82,00
Protides .....5,40	Provitamine A(carotène)..... 0,100
Lipides .....0,30	B1 (thiamine).....0,300
Eau .....82,0	B2 (riboflavine).....0,200
Fibres alimentaire .....6,50	B3 (nicotamide).....1,800
<b>Minéraux (mg)</b>	<b>Apports énergétiques</b>
Potassium .....210,0	K calories.....64,00
Phosphore .....105,0	K joules.....268, 0
Calcium.....24,0	
Magnésium .....18,00	
Soufre .....27,00	
Sodium .....4,00	
Chlore .....14,00	

**5.2. Intérêt agronomique**

Comme toutes les légumineuses, l'espèce *Vicia faba* L. assure sa nutrition azotée par deux voix: l'assimilation de l'azote minéral du sol et la fixation symbiotique de l'azote

atmosphérique. Cette aptitude à fixer l'azote atmosphérique limite l'utilisation des engrais azotés qui sont coûteux pour l'agriculteur et néfastes pour la santé humaine et l'environnement (Nouri, 2012).

Cette culture permet aussi de renforcer la structure du sol grâce à son système racinaire puissant et dense, et enfin les résidus de récolte enrichissent le sol en matière organique (Mezani, 2011).

### **5.3. Intérêt économique et écologique**

Parmi les légumineuses, la fève (*Vicia faba* L.) est aujourd'hui parmi les plantes légumières les plus cultivées dans le monde. Sa superficie mondiale est estimée à 3 millions d'hectares dont plus de 50% se situent en Chine, 20% en Afrique du Nord et moins de 10% en Europe (Nouri, 2012).

La fève reste la plus importante et occupe toujours la première place parmi les légumes secs (Benachour *et al.*, 2007). Elle préfère les sols profonds, silice argileux riches en matière nutritives et en humus. Cette plante est capable de s'adapter à des sols très pauvres et très dégradés, donc elle a un rôle améliorateur des sols, en plus d'un intérêt alimentaire (Beraud, 2007).

La fève est très sensible à la pollution du sol, ce qui en fait un modèle végétatif utilisé en écotoxicologie dans un grand nombre d'étude (Nouri, 2012). La fève est aussi employée pour étudier les réponses des marqueurs au stress oxydant et d'autres mécanismes de défenses antitoxiques de la plante comme les phytochélatines (Beraud, 2007).

## **2. Rhizobia**

Par convention, on nomme « Rhizobium » toute bactérie, quel que soit son genre, capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec une légumineuse (Vincent, 1970). Les *Rhizobia* sont d'abord définis par leur aptitude à induire la formation de nodosités fixatrices d'azote sur les racines ou les tiges des légumineuses et à réduire l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante (Andrews M. & Andrews M. E., 2017).

Les *Rhizobia* sont des bâtonnets mobiles de 0,5 à 0,9 sur 1,2 à 3,0  $\mu\text{m}$  à Gram négatif aérobies, non sporulantes. Ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose (Grama, 2008). Leur croissance est optimale à une température de 28-30C° et à un pH situé entre 6 et 7 (Vincent, 1970)

### **3. Symbiose légumineuse-*Rhizobium***

#### **3.1. Généralités**

La symbiose BNL-Légumineuse, décrite pour la première fois par Frank (1889), présente un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote, elle présente un intérêt agronomique considérable (Selami, 2017).

L'une des caractéristiques majeures de la symbiose rhizobium-légumineuse est sa spécificité. Cette association symbiotique est souvent construite autour d'un grand partenaire appelé hôte et de plus petits partenaires appelés symbiontes.

La symbiose permet l'enrichissement naturel du sol en azote et la réduction des apports d'engrais. L'azote fixé par la symbiose est restitué au sol après la décomposition de la matière végétale (racines, nodosité, parties aériennes) (Selami,2017).

Une caractéristique des légumineuses alimentaires tropicales, est leur association avec les bactéries *Rhizobium* pour former les nodosités des racines, le site de la fixation symbiotique d'azote. A l'intérieur duquel la bactérie intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium.

La symbiose est à bénéfices réciproques: la bactérie fournit à la plante le  $\text{N}_2$  fixé; en retour, la plante apporte l'énergie nécessaire à la synthèse des nodosités et à leur fonctionnement, l'association symbiotique entre les *Rhizobiums* et les légumineuses est très diverse et implique de nombreuses espèces chez les deux partenaires, végétal et bactérien. (Cherni A. E, 2019).

**Tableau 02** : Exemples d'associations entre *Rhizobia* et Légumineuses (Selami,2017)

<b>Rhizobia</b>	<b>Plantes hôtes</b>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Luzerne ( <i>Medicago</i> sp)
<i>Mesohizobium loti</i>	Lotier ( <i>Lotus</i> )
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Pisum, Vicia, Trifolium, Phaseolus</i>
<i>Sinohizobium fredii</i>	Soja ( <i>Glycine</i> )
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Large spectre et <i>Parasponia</i> (non légumineuse)
<i>Rhizobium tropicii</i>	<i>Phaseolus</i> , Faux Mimosa ( <i>Leucaena</i> )
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja ( <i>Glycine</i> )
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

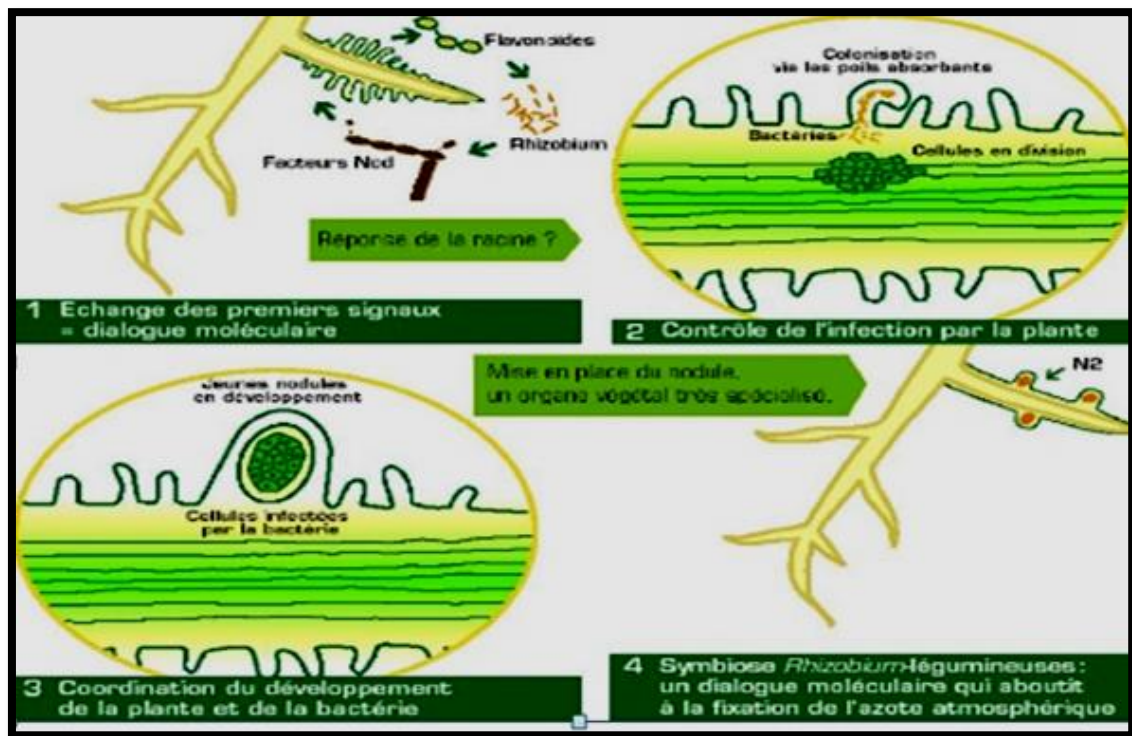
### 3.2. Nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Journet, 2004).

#### 3.2.1. Etape de la nodulation

La formation des nodosités est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Fig.05).





**Figure 05:** Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).

#### a-Echange de signal d'infection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des substances qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Certaines d'entre elles appartiennent au groupe des flavonoïdes (Rasanen, 2002). Ce signal, une fois perçu par le *Rhizobium*, induit la production des facteurs Nod. Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca *et al.*, 2004).

#### b-Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques localisées à la surface des cellules (Perry *et al.*, 2004). Les facteurs Nod émis par les *Rhizobia*, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette étape se poursuit par une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire

des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger » qui enferme les *Rhizobia*.

L'infection qui s'accompagne d'une digestion de la paroi cellulaire du poil racinaire peut avoir lieu à travers les poils absorbants, les blessures, ou l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002).

### **c-Développement de la nodosité et maturation des bactéroïdes**

Au niveau du cortex, commence la déformation de cordons d'infections chez certaines plantes, la division cellulaire entraîne la formation d'un primordium nodulaire. Les cordons d'infection traversent les couches cellulaires pour atteindre le primordium nodulaire, à l'intérieur duquel sont reléguées les bactéries (Gage et Margolin, 2000). Le primordium se développe ensuite en nodule, alors que les *Rhizobia* se différencient en bactéroïdes, séparés du cytoplasme des cellules végétales par une membrane péribactérienne. L'unité fixatrice d'azote formée par le bactéroïde, l'espace et la membrane péribactéroïdiens, appelé symbiosome (Cermola *et al.*, 2000).

Deux types de nodosités (allongés ou ronds) sont définis en fonction de la localisation du système vasculaire (racine ou tige) et du niveau de persistance d'une zone méristématique; la forme allongée (nodosité indéterminée) étant liée au maintien d'un méristème apical et la ronde (nodosité déterminée) en une absence de méristème apical (Domergue, 2006). Le nombre de nodosités et leurs masses sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004). Au sein des nodosités, une protéine spécifique appelée la légghémoglobine est formée par synthèse de globine par la plante et d'hème par le *Rhizobium*. La fonction de la légghémoglobine est de maintenir une pression en oxygène à un niveau assez bas dans l'environnement de la nitrogénase compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote (Domergue, 2006).

## **1. Généralités sur les Rhizobactéries Promotrices de la Croissance des Plantes**

Les PGPR ou « *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* » sont des bactéries libres qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont un effet positif sur la croissance de la plante (Kloepper *et al.*, 2004).

Ces bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires, mais à la différence des autres bactéries *Rhizosphériques*, environ 2 à 5% des *Rhizobactéries* exerce un effet bénéfique sur la croissance des plantes. Cet effet bénéfique peut être direct, ou indirect (Hrynkiewicz et Baum, 2011).

La promotion directe de la croissance est le résultat du pouvoir d'acquisition des nutriments ou de la stimulation par des hormones de la plante. Les mécanismes indirects impliquent un antagonisme contre les phytopathogènes : production des sidérophores, production d'antibiotiques et le parasitisme (Shamsul *et al.*, 2008).

Dans la littérature, on peut rencontrer d'autres appellations des PGPR tels que EPR « *Emergence Promoting Rhizobacteria* » (Kloepper *et al.*, 1992), voir même YIB « *Yield-Increased Bacteria* » (Chen *et al.*, 1996).

D'après Jay Shankar Singh (2003), les PGPR est un groupe de bactéries qui améliorent la croissance de la plante et le rendement via diverses substances ainsi que les biofertilisants qui sert à augmenter la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère (Fig.06),aussi comme agents de biocontrôle et de bioremédiation en dégradant les polluants organiques et en luttant contre les maladies.

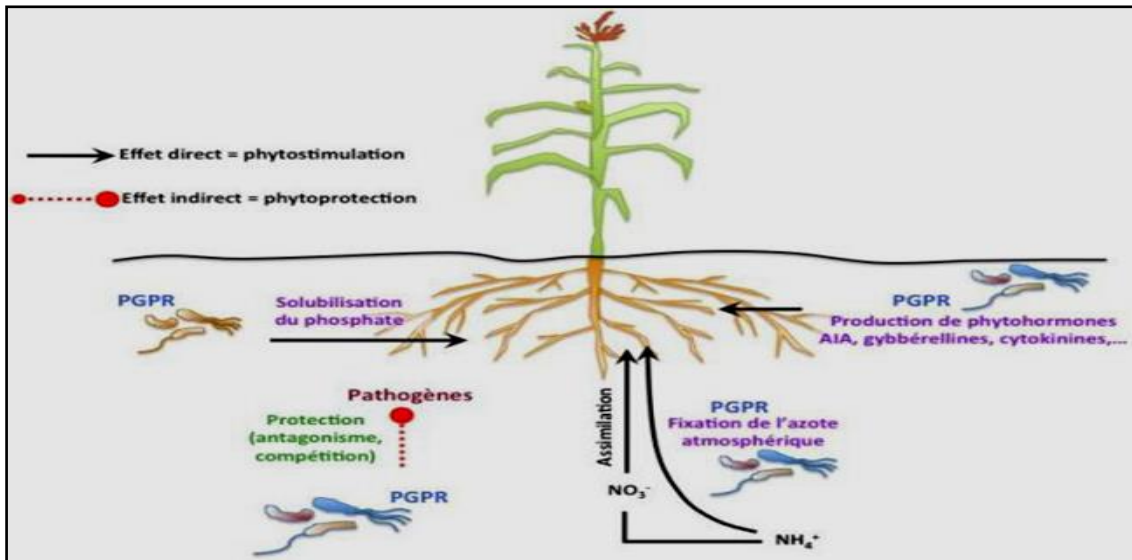


**Figure 06:** L'effet biofertilisant des PGPR (*Bacillus subtilis* et *B. amyloliquefaciens*) sur la croissance et la vigueur des plantes de poivrons (Roskopf *et al.*, 2005).

A: Plantes témoins non-inoculées ; B: Plantes inoculées.

## **2. Mode d'action des PGPR**

Les PGPR favorisent la croissance des plantes directement en facilitant l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou en modulant les niveaux d'hormones des plantes, ou indirectement en diminuant les effets inhibiteurs de divers agents pathogènes sur la croissance et le développement des plantes sous la forme d'agents de lutte biologique (Glick, 2012) (Fig.07).



**Figure 07:** Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère (Khan *et al.*, 2009).

## 2.1. Mode direct

Les bactéries PGPR facilitent la croissance des plantes directement en aidant à l'acquisition des ressources (Azote, Phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétales (Munees et Mulugeta, 2014).

### 2.1.1. Acquisition des ressources

#### ✓ Fixation d'azote

L'azote est un élément essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes. Cependant, aucune espèce végétale n'est capable de fixer l'azote atmosphérique, le convertir en ammoniacque et le dépenser directement pour sa croissance, donc la fixation de l'azote est un processus exclusivement procaryotes (Glick, 2012; Prescott *et al.*, 2008).

La fixation biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne.

L'azote gazeux ( $N_2$ ) est abondant dans l'atmosphère, cependant un nombre limité de microorganismes peuvent coloniser typiquement les racines de certaines plantes. Parmi les associations symbiotiques plantes-bactéries les plus connues est celle des légumineuses

et des *Rhizobia*, cette association permet à la plante de bénéficier de l'azote atmosphérique en le fixant biologiquement afin de le réduire en ammoniacque (NH<sub>3</sub>), cette forme est assimilée par la plante directement pour produire des acides aminés et des protéines. La fixation biologique est assurée par les *Rhizobia* au moyen d'un système enzymatique complexe appelé Nitrogénase (Kim et Rees, 1994).

Les bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques ne fournissent qu'une petite quantité de l'azote fixé nécessaire à la plante hôte associée à une bactérie (Glick, 2012).

#### ✓ **Solubilisation du phosphate**

Le phosphore (P) : deuxième nutriment important pour la croissance des plantes après l'azote, il est extrêmement insoluble et indisponible pour les plantes (Jyoti, 2003), c'est un élément qu'on trouve dans le sol, les plantes et les micro-organismes (Plassard *et al.*, 2015).

La solubilisation des phosphates est la capacité des microorganismes de convertir le phosphate insoluble à une forme accessible. Ce processus permet de réduire l'utilisation d'engrais phosphatés (Chaiharn et Lumyong, 2009).

Les bactéries solubilisant le phosphate jouent un rôle important dans la nutrition des plantes et constituent une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture (Greiner et Larsson, 2001).

#### ✓ **Solubilisation du potassium**

C'est le troisième nutriment majeur important pour les plantes. En raison de l'application déséquilibrée des engrais, la carence en potassium devient l'une des principales contraintes dans la production végétale. Sans potassium adéquat, les plantes ont des racines mal développées, poussent lentement, produisent de petites graines et ont des rendements plus faibles (Mahendra *et al.*; 2019).

Kumar et Dubey (2012) ont signalé que les microorganismes des sols jouaient un rôle clé dans le cycle K naturel et par conséquent, les microorganismes solubilisant le potassium présent dans le sol pourraient fournir une technologie alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes.

**✓ Production des phytohormones**

Une large gamme de microorganismes trouvés dans la rhizosphère est capable de produire des substances qui régulent la croissance et le développement des plantes. Les *Rhizobactéries* favorisant la croissance des plantes produisent des phytohormones telles que les auxines, les cytokinines, les gibbérellines et l'éthylène (Arora, 2013).

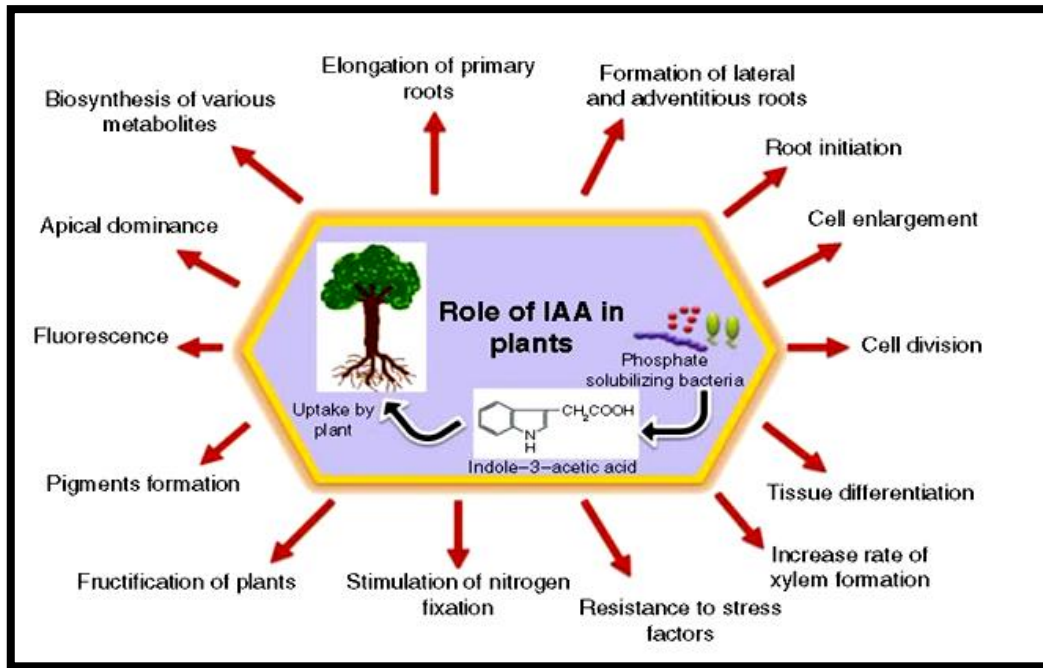
**a. Acide Indole Acétique (IAA)**

L'acide indole acétique (AIA) est une auxine primaire active dans la majorité des plantes et représente l'une des hormones végétales les plus importantes (Spaenpen *et al.*, 2007).

Généralement, l'IAA affecte la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales ; Stimule la germination des semences et des tubercules; augmente le taux de développement du xylème et des racines; contrôle les processus de croissance végétative; initie la formation de racines latérales et accidentelles; affecte la photosynthèse et la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites et la résistance à des conditions stressantes (Deepmala, 2016) (Fig.08).

L'auxine fonctionne comme une molécule-signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes. Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère (Abdesselam et Latrache, 2017).





**Figure 08:** Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan *et al.*, 2009).

### b. Production des cytokinines et gibbérellines

Les cytokinines et les gibbérellines sont aussi des phytohormones impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et la stimulation de la croissance de la partie aérienne (Van Loon, 2007).

Les cytokinines sont des dérivés de la purine et qui sont retrouvées dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines, mais une forte évidence indique que la racine est le site principal de la biosynthèse de cytokinines. Ils favorisent et maintiennent la division des cellules végétales dans les cultures et sont également impliqués dans divers processus de différenciation, croissance des racines primaires (Chaitanya et Meenu, 2015).

Les gibbérellines représentent une classe d'hormones qui affectent de nombreux aspects du développement chez les plantes. Elles favorisent la germination des grains et la croissance des bourgeons, ce sont une des catégories d'hormones impliquées dans l'élongation des tiges et la croissance des feuilles (Bottini *et al.*, 2004).

La capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérellines a été initialement décrite chez les *Rhizobia* qui ont une influence sur le taux de cette hormone présent dans les nodosités (Nabors, 2008).



## **2.2. Mode indirect**

### **2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments**

L'idée qu'une *Rhizobactérie* à croissance rapide pourrait éliminer les microorganismes pathogènes par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie fut beaucoup discutée. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique et être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Ces PGPR sont capable de lutter efficacement contre les agents pathogènes pour obtenir des nutriments ou des niches spécifiques à la racine, et la capacité à induire une résistance systémique. un autre aspect important de la compétitivité d'une PGPR est sa capacité à persister et à proliférer (Glick *et al.*, 2007).

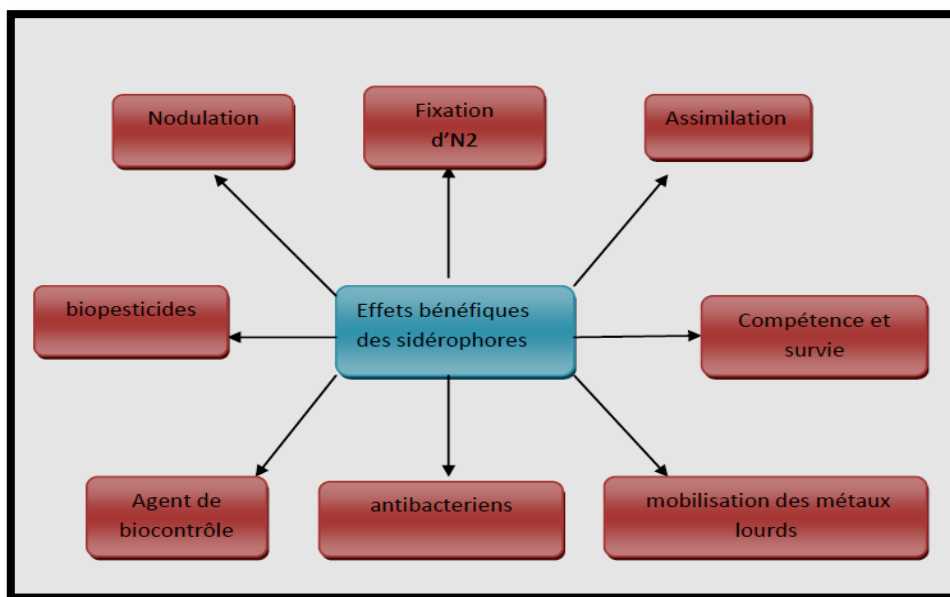
Cependant, il est souvent difficile de prédire le comportement d'un PGPR dans l'environnement et sa persistance dans le sol peut être influencée par un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques, notamment la composition du sol, la température et la présence de prédateurs (Glick, 1995).

### **2.2.2. Production des sidérophores**

Les PGPR, notamment du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Azotobacter* sont connues pour leur faculté à produire des sidérophores dans le milieu.

Bien que le fer soit l'un des minéraux les plus abondants sur terre. Elles améliorent sa disponibilité à leur profit en cas de carence du sol et rendent difficile son assimilation aux autres populations microbiennes déficientes en fer, ce phénomène est un aspect de compétition qui participe efficacement à l'antagonisme contre les agents phytopathogènes en réduisant leurs effectifs dans le sol (Fig.09) (kirdi, 2011).

Ces bactéries fixent le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Ils sont également utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes en s'appropriant des ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent non disponibles aux champignons pathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance (Adouane et Adjaoute, 2018).



**Figure 09:** Fonctions biologiques des sidérophores (Khan *et al.*, 2009).

### 2.2.3. Productions des antibiotiques (l'antibiose)

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes de biocontrôle les plus puissants et les plus étudiés chez les PGPR (Shilev, 2013), pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte *via* la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Yang *et al.*, 2009) ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines (Whipps, 2001).

## 3. Genres de bactéries PGPR

### 3.1. Genre *Azospirillum*

Les bactéries du genre *Azospirillum* appartiennent à la sous-division  $\alpha$  des Protéobactéries (Olivier, 2003), sont des habitants primaires du sol, Gram négatif, mobiles et associées avec les racines des monocotylédones. Plusieurs souches d'*Azospirillum* ont montré des effets bénéfiques sur la croissance des plantes et sur le rendement des cultures (Bashan *et al.*, 2002).

L'association entre *Azospirillum* et la plante produit des changements morphologiques et physiologiques dans les racines. La bactérie produit des hormones de croissance, l'acide indole-3 acétique (AIA), qui favorise l'augmentation de la surface des

racines, entraînant une augmentation de l'absorption de l'eau et des minéraux. De plus cette association permet la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique ce qui favorise la croissance et le rendement des cultures (Bashan *et al.*, 1991).

En dehors de la fixation de l'azote, la production de substances de croissance, la résistance aux maladies et la tolérance à la sécheresse sont quelques avantages supplémentaires favorisés par l'inoculation des plants avec *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 2002).

### **3.2. Genre *Rhizobium***

Les *Rhizobium* sont des bactéries à Gram négatif, aérobies du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Sahgal et Johri, 2006). Ces bactéries sont capables d'établir une association symbiotique avec des plantes de la famille des légumineuses pour fixer l'azote moléculaire N<sub>2</sub>. Cette symbiose se traduit par la formation sur les racines de la plante hôte des nodules (nodosités), qui sont le lieu d'une activité symbiotique.

Dans cette relation bénéfique la plante fournit les substances carbonées aux bactéries, et ces dernières fournissent à la plante les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique (Downie, 2005). Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote.

Akhtar et Siddiqui (2009) ont montré que l'inoculation par *Rhizobium* sp. entraîne une augmentation dans la croissance, le rendement et le nombre de nodosités formés au niveau des racines par rapport aux plantes sans inoculation. En plus de leur activité bénéfique de fixation d'azote chez les légumineuses, les *Rhizobium* peuvent améliorer la nutrition des plantes par la mobilisation du phosphate organiques et inorganiques.

### **3.3. Genre *Bacillus***

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à Gram positif, appartenant à la famille des *bacillacées* (*Bacillaceae*). Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables.

C'est le genre le plus abondant dans la rhizosphère, l'activité PGPR de certaines de ces souches a été connue depuis plusieurs années (Probanza *et al.*, 2002). Elles sont

potentiellement utiles comme agents de lutte biologique (Nagórska *et al.*, 2007) et capables de solubiliser le phosphate, produire de l'AIA, séderophore et des antifongiques (Charest *et al.*, 2005). Ces bactéries sont fréquemment retrouvées au voisinage des racines des plantes où certaines espèces ont un rôle dans la fixation d'azote.

### **3.4. Genre *Pseudomonas***

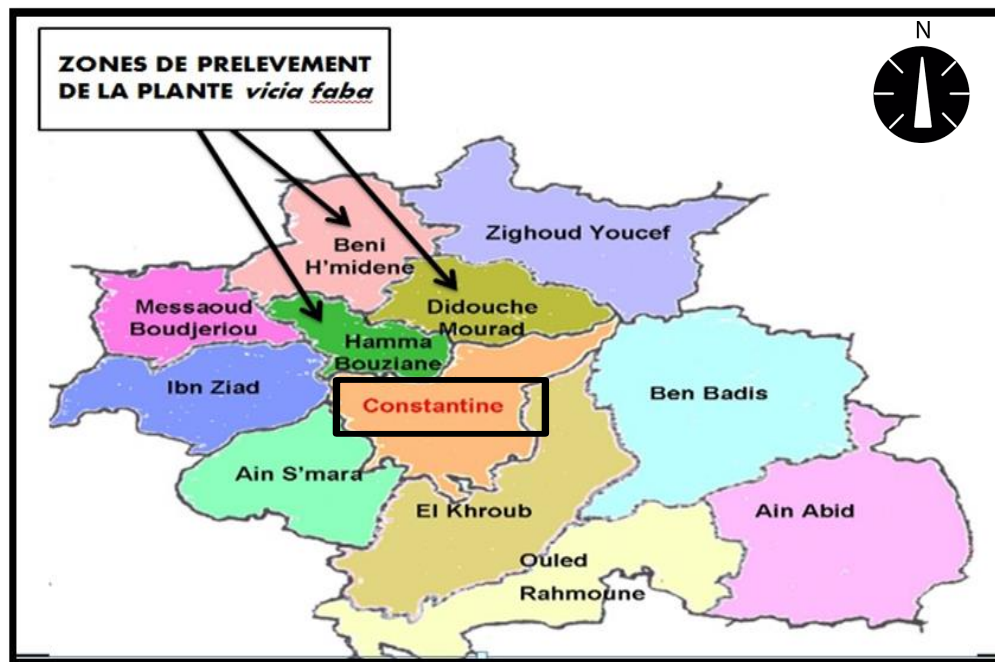
Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5  $\mu\text{m}$  (Palleroni, 1984).

Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche, elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et former des associations intimes avec leurs hôtes (Höfte et Vos, 2006), ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent leur croissance (Reyes *et al.*, 2004).

Notre travail pratique a été réalisé au niveau du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV), Université Frères Mentouri (Constantine 1), durant la période de 8 avril au 30 mai 2019.

## 1. Description de la zone d'étude

Notre étude a été faite sur 3 sites du nord de Constantine :Hamma Bouziane-Didouche Mourad et Beni H'midene (Fig.10) où un prélèvement des échantillons de la plante *Vicia faba* L. a été effectué.



**Figure 10:** Localisation géographique des trois sites de prélèvement de l'espèce étudiée *Vicia faba* L.

## 2. Matériel biologique

Cette expérimentation consiste à travailler sur les isolats bactériens isolés de la fève (*Vicia faba* L.).

### **3. Récolte des plantes de Fève**

La récolte de la plante entière de la fève (*Vicia faba*L.) est effectuée durant le mois d'Avril sur les trois régions, il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire, pour chaque région, nous avons récolté trois plantes.

Au laboratoire, nous avons d'abord pesée le poids frais et le poids sec des échantillons de notre expérimentation :

- ✓ **Poids frais** : Nous avons pesé chaque plante (partie aérienne et racinaire) pour chaque site juste après l'arrivée au laboratoire.
- ✓ **Poids sec** : Après les pesées de la matière fraîche, nos échantillons sont mis dans l'étuve à une température de 80°C pendant 72heures jusqu'à poids constant.

### **4. Isolement des bactéries à partir des nodosités**

#### **4.1. Prélèvement des nodosités**

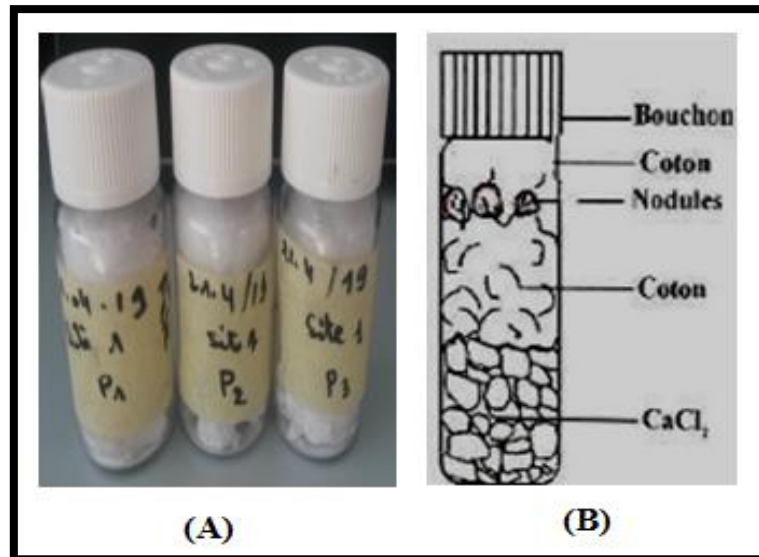
La partie aérienne est détachée de la partie racinaire puis les racines avec leurs nodosités sont délicatement lavées à l'eau de robinet, après les nodosités sont détachés 1 à 2mm du site d'attache à l'aide d'un couteau et séchés avec du papier absorbant avant leur conservation (Fig.11).



**Figure11:**Racine nodulée de la fève de quelques sites de prélèvements.

#### **4.2. Conservation des nodosités**

Les nodosités sont lavées et séchées, ensuite et pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, nous avons utilisé un dessiccateur qui est le Chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (Vincent, 1970), qui consiste à remplir la moitié des flacons par du  $\text{CaCl}_2$  (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodosités, sur chaque flacon sont mentionnés le nom de site, et la date de conservation (Fig.12).



**Figure12:** Conservation des nodosités (Vincent, 1970).**(A)** Flacons utilisés pour la conservation des nodosités, **(B)**Schéma explicatif.

### 4.3. Désinfection des nodosités

Au laboratoire, les nodosités récupérées auparavant sont rincées avec de l'eau de robinet pour enlever l'excès de terre, puis plongées dans de l'éthanol à 95% pendant 30 secondes, ils sont ensuite immergés dans une solution d'eau de Javel (5°) pendant 3 minutes, les nodosités sont ensuite rincées 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour les débarrasser de l'effet toxique de l'excès d'eau de Javel.

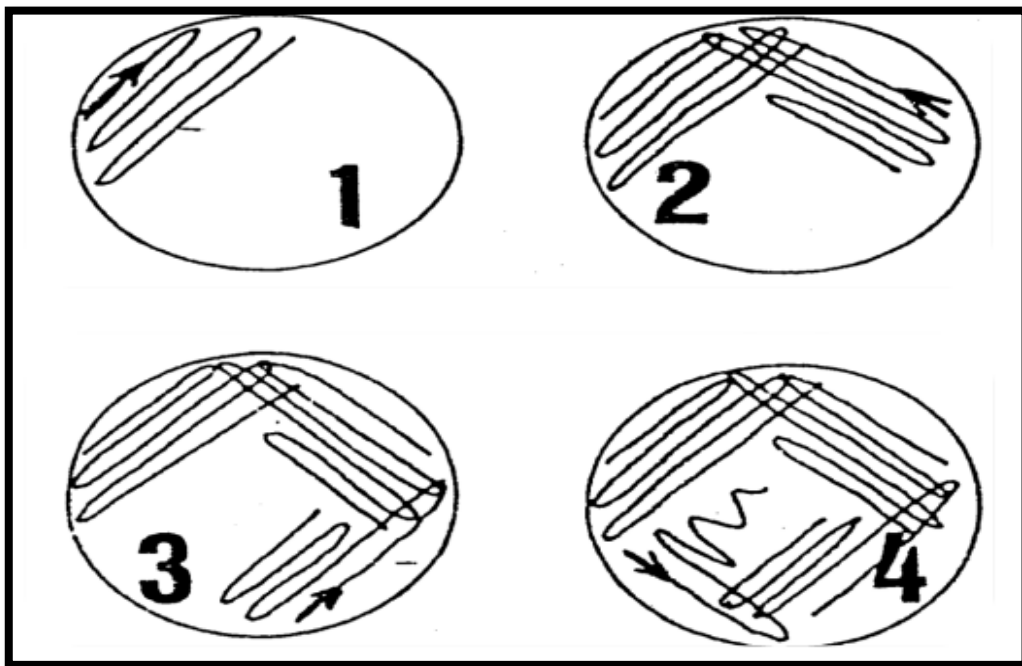
### 4.4. Ecrasement des nodosités et isolement des bactéries

L'isolement a été réalisé selon la méthode de Vincent (1970), dans des conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire comme suit :

- Déposer 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile.
- Une nodosité stérile est déposée dans chaque goutte d'eau, qu'on écrase à l'aide d'une pince préalablement stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen.
- A l'aide d'une anse de platine stérile on prélève une goutte de la suspension obtenue (jus de nodule) et qu'on ensemence directement sur le milieu : YMA+RC (Annexe 1.1).



L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre quadrants (Fig.13) de manière à isoler des simples colonies, les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 24 à 48heures.



**Figure 13:** Isolement par la méthode des quatre quadrants (Vincent, 1970).

#### **4.5. Purification des isolats**

Les colonies ont été repiquées plusieurs fois à l'aide d'une anse de platine stérile et dans des conditions totalement stériles puis étalées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA+RC jusqu'à l'obtention des colonies homogènes et faciles à caractériser.

### **5. Caractérisation des isolats**

#### **5.1. Examen microscopique par coloration de Gram**

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour distinguer les bactéries dites (Gram+)et des bactéries dites (Gram-).

La technique consiste à préparer un frottis sur une lame de verre stérile fixé à la chaleur, couvrir le frottis avec le violet de gentiane et laisser en contact pendant 2 minutes puis couvrir la lame avec la solution de lugol et laisser en contact pendant 30 secondes, on

soumit alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95% puis laver immédiatement à l'eau distillée et couvrir le frottis avec la fuchsine pendant 2 minutes, laver à l'eau distillée et sécher.

L'observation microscopique des échantillons a été faite au microscope optique à faible grossissement (mis en point) et au grossissement 100 (objectif à immersion) qui nécessite l'ajout d'une goutte d'huile de vaseline sur la lame du frottis préparé. Avec cette coloration double, les bactéries Gram positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatif sont colorées en rose.

## **5.2. Etude des enzymes respiratoires**

### **5.2.1. Recherche de la Catalase**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en dioxygène et eau selon l'équation bilan:  $H_2O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2 O_2$ , cette enzyme se trouve chez tous les organismes aérobies. Ce test est important pour la première orientation dans l'identification d'un isolat bactérien pure (Delarras, 2007).

Sur une lame propre et sèche, une goutte d'eau oxygénée est déposée puis la mettre en contact avec une suspension bactérienne. L'apparition d'une effervescence traduit la décomposition de dioxygène, et indique la présence d'une catalase. Donc le test catalase est positif.

### **5.2.2. Recherche de l'Oxydase**

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité qui possède la bactérie à oxyder un réactif incolore par une enzyme : la phénylène diamine oxydase.

A l'aide d'une pince stérile, on dépose un disque d'oxydase sur une lame propre puis on prélève une colonie à partir du milieu YMA+RC et on la dépose sur le disque d'oxydase en utilisant une pipette Pasteure stérile.

Une réaction oxydase positive se traduit par l'apparition d'une tache rose violette, si le disque reste incolore, c'est une réaction oxydase négative.

### **5.3. Utilisation des sucres comme seule source de carbone**

La mise en évidence de la capacité de différents isolats à utiliser différents substrats comme source de carbone a été réalisée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA ou le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Galactose, Fructose, Saccharose, Lactose.

Les boîtes ont étéensemencées en spot à partir des colonies prélevées sur milieu YMA+RC. L'assimilation des sucres est révélée par l'apparition de colonies sur le milieu après incubation pendant 24 à 48heuresà 28°C.

L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'évaluation de la croissance : (Croissance rapide, lente ou pas de croissance).

### **5.4. Résistances aux antibiotiques**

Le test est réalisé en ajoutant la quantité désirée d'antibiotique au milieu de culture YMA+RC. Après répartition du milieu sur les boîtes de Pétri, l'ensemencement est réalisé sous forme de spots. L'assimilation est révélée par l'apparition de colonies sur le milieu, l'incubation varie de 1 à 7 jours à 28 °C selon l'antibiotique. Nous avons utilisé les antibiotiques suivant : Pénicilline, Gentamicine, Amoxicilline et Céfazoline.

## **6. Analyse de quelques modes d'action des PGPR**

### **6.1. Solubilisation du phytate**

Les isolats bactériens ont été testés pour leur aptitude à solubiliser le phosphate selon la méthode décrite par Nautiyal (1999), chaque isolat estensemencé en strie sur le milieu NBRIP solide (Annexe2) puis incubé à 28°C pendant 1 à 7 jours. Ce test nous permet de sélectionner les bactéries capables de dégrader le phytate via la phytase.

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate dans le milieu est déterminé par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie correspondante après incubation (Appl et Biosci, 2018).

## **6.2. Dosage de l'acide indole acétique**

Les bactéries sont mises en culture pendant 48 heures dans le milieu LB liquide contenant 0,5g/L du tryptophane (Annexe 3), la croissance est assurée à une température de 28 °C sous agitation et en obscurité totale. Après croissance, l'absorbance des différentes cultures a été mesurée à une longueur d'onde de 620nm, les cultures sont centrifugées à 30000rpm pendant 5 minutes et le surnageant est récupéré. Un volume de celui-ci est mélangé avec un volume du réactif Salkowski déjà préparé (Annexe 4), ensuite les préparations sont mises à température ambiante à l'obscurité pendant 20 minutes. L'absorbance de la couleur rose résultante, qui indique la production de l'AIA, a été lue à 530nm avec un spectrophotomètre.

Les valeurs obtenues sont converties en taux d'auxine par le biais d'une courbe d'étalonnage préalablement établie à partir d'une série de solution de concentration en AIA. Une solution mère d'auxine a été préparée (Annexe 5), ensuite une série de dilution est réalisée dans un intervalle de 0 à 20µg/ml.

La courbe d'étalonnage a été réalisée par l'ajout de 1ml de chaque dilution de l'AIA et 1ml de solution de dosage pour chaque concentration. L'absorbance de ces solutions a été lue à 530nm après 20min d'incubation à l'obscurité.

## **6.3. Dosage de l'activité nitrate réductase**

L'activité nitrate réductase a été détectée par ensemencement des isolats en milieu liquide NFB (Nitrogen Free Broth) +KNO<sub>3</sub>, contenant une concentration de 1g/L de nitrate (Annexe 6) ainsi, des tubes contenant 10 ml du milieu de culture liquide ont été ensemencés avec une colonie bactérienne fraîche de chaque isolat. L'ensemble des tubes ont été incubés pendant 2 jours à 28 °C sous agitation. Après croissance l'absorbance des différentes cultures a été mesurée à une longueur d'onde de 620nm.

La révélation de la présence du nitrate réductase a été réalisée par addition des réactifs Griess 1 et 2 déjà préparé (Annexe 7-1 et 7-2).

L'apparition d'une coloration rose indique que les nitrates ont été réduits en nitrites, la coloration rose indique la présence de nitrite dans le milieu.

Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue. Après ajout du zinc, si le milieu ne change pas de coloration, nous disons que la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase ainsi que le nitrite réductase, par contre l'apparition d'une couleur rose confirme que la bactérie n'a pas la capacité de réduire le nitrate en nitrite donc ne possède pas la nitrate réductase (Beringer, 1974).

Le dosage de nitrite réductase est réalisé sur le surnageant des cultures bactériennes centrifugées à 30000 rpm pendant 5 minutes, nous avons pris 100µl de surnageant additionné à 1 ml de réactif Griess 1 et 1 ml de réactif Griess 2, le dosage de nitrite réduit est mesuré au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540nm, les concentrations finales de nitrite produite sont révélées par le biais d'une courbe d'étalonnage de nitrite qui varie de la concentration 0 à 200µM.

## **7. Conservation des isolats**

La conservation des isolats est faite sur solution de glycérol stérile à 30%, additionnés du bouillon bactérien de chaque isolat, les tubes contenant les bactéries sont déposés au congélateur à - 80°C.

## **8. Evaluation statistique**

Une analyse de la variance (ANOVA) des résultats obtenus sur le dosage d'auxine et la nitrate réductase a été réalisée, afin de valoriser les résultats obtenus, en utilisant le logiciel spécifique. Les groupes homogènes sont donnés par le logiciel Excel Stat 2019 en utilisant le test de Tukey à un seuil d'erreur =0,001.

Cette expérimentation consiste à travailler sur 54 isolats bactériens isolés des nodosités des racines de la Fève (*Vicia faba* L), prélevées de trois sites du nord de Constantine: 21 bactéries issues de la région de Hamma Bouziane, 15 bactéries issues de la région de Didouche Mourad et 18 bactéries issues de la région de Beni H'midene (Tableau 03).

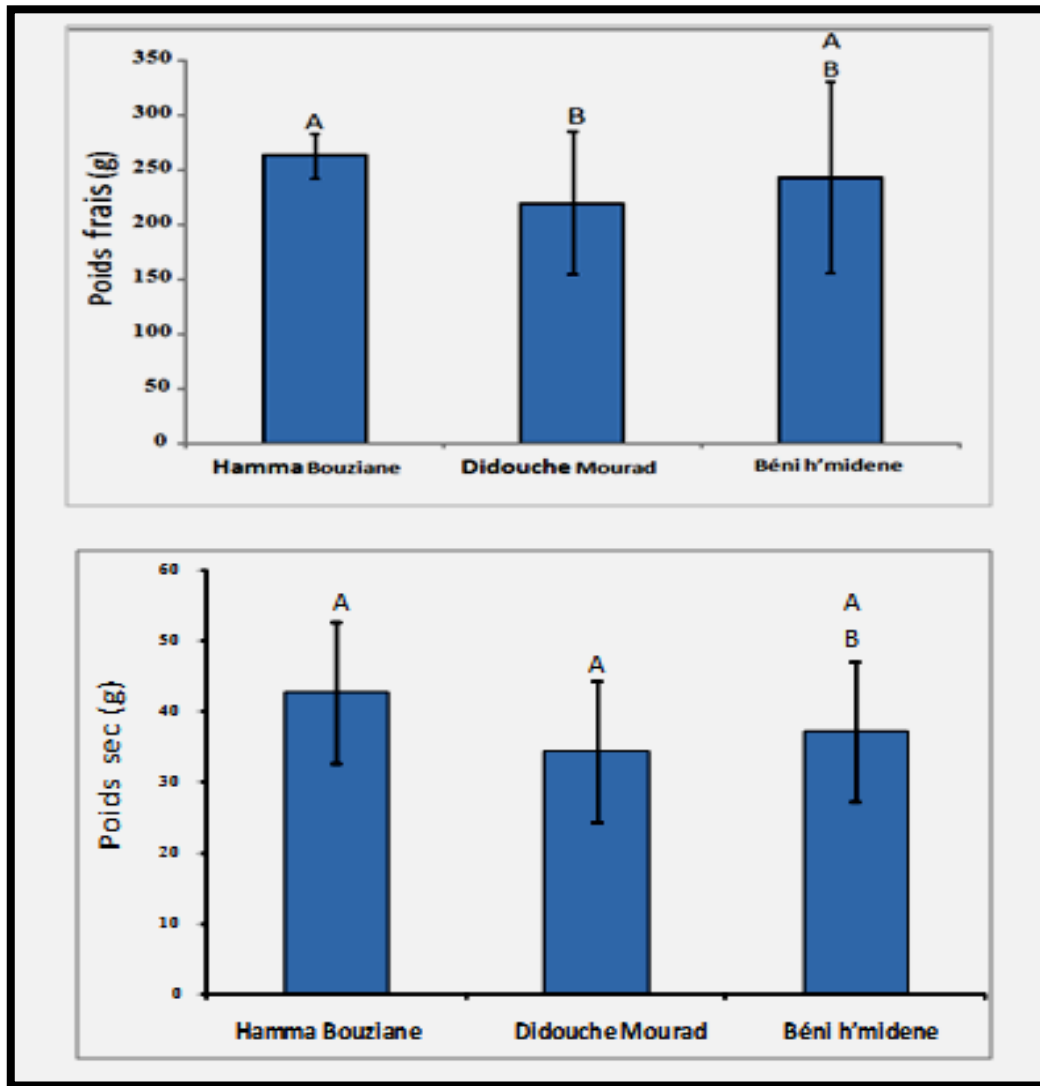
**Tableau 03:** Les bactéries utilisées dans cette étude.

<b>Sites</b>	<b>Isolats</b>		
	<b>Plante 1 (P1)</b>	<b>Plante (P2)</b>	<b>Plante (P3)</b>
<b>Hamma Bouziane (H)</b>	<b>H-P1-1</b>	<b>H-P2-1</b>	<b>H-P3-1</b>
	<b>H-P1-2</b>	<b>H-P2-2</b>	<b>H-P3-2</b>
	<b>H-P1-3</b>	<b>H-P2-3</b>	<b>H-P3-3</b>
	<b>H-P1-4</b>	<b>H-P2-4</b>	<b>H-P3-4</b>
	<b>H-P1-5</b>	<b>H-P2-5</b>	<b>H-P3-5</b>
	<b>H-P1-6</b>	<b>H-P2-6</b>	<b>H-P3-6</b>
	<b>H-P1-7</b>	<b>H-P2-7</b>	
		<b>H-P2-8</b>	
<b>Didouche Mourad (D)</b>	<b>D-P1-1</b>	<b>D-P2-1</b>	<b>D-P3-1</b>
	<b>D-P1-2</b>	<b>D-P2-2</b>	<b>D-P3-2</b>
	<b>D-P1-3</b>	<b>D-P2-3</b>	<b>D-P3-3</b>
	<b>D-P1-4</b>	<b>D-P2-4</b>	<b>D-P3-4</b>
	<b>D-P1-5</b>		<b>D-P3-5</b>
			<b>D-P3-6</b>
<b>Beni h'midene (B)</b>	<b>B-P1-1</b>	<b>B-P2-1</b>	<b>B-P3-1</b>
	<b>B-P1-2</b>	<b>B-P2-2</b>	<b>B-P3-2</b>
	<b>B-P1-3</b>	<b>B-P2-3</b>	<b>B-P3-3</b>
	<b>B-P1-4</b>	<b>B-P2-4</b>	<b>B-P3-4</b>
	<b>B-P1-5</b>	<b>B-P2-5</b>	<b>B-P3-5</b>
	<b>B-P1-6</b>	<b>B-P2-6</b>	<b>B-P3-6</b>

### 1. Mesure de poids frais et sec de la plante *Vicia faba* L.

Les résultats de mesure du poids sec et frais de la plante entière de fève (*Vicia faba*), montrent que les trois sites présentent des résultats significatifs, et presque similaires (Fig. 14).

L'analyse de la variance par le test tukey présente trois groupes pour la matière fraîche avec une valeur maximale égale à 263,4 g (groupe A) qui correspond au site Hamma Bouziane puis le site Beni h'midene (groupe AB) et le site Didouche Mourad (groupe B) et deux groupes pour les résultats de la matière sèche, le site Hamma Bouziane et Didouche Mourad appartient au même groupe (A), le site Beni h'midene (groupe B) (Fig.14), selon ces résultats le site de Hamma Bouziane donne les meilleurs résultats.

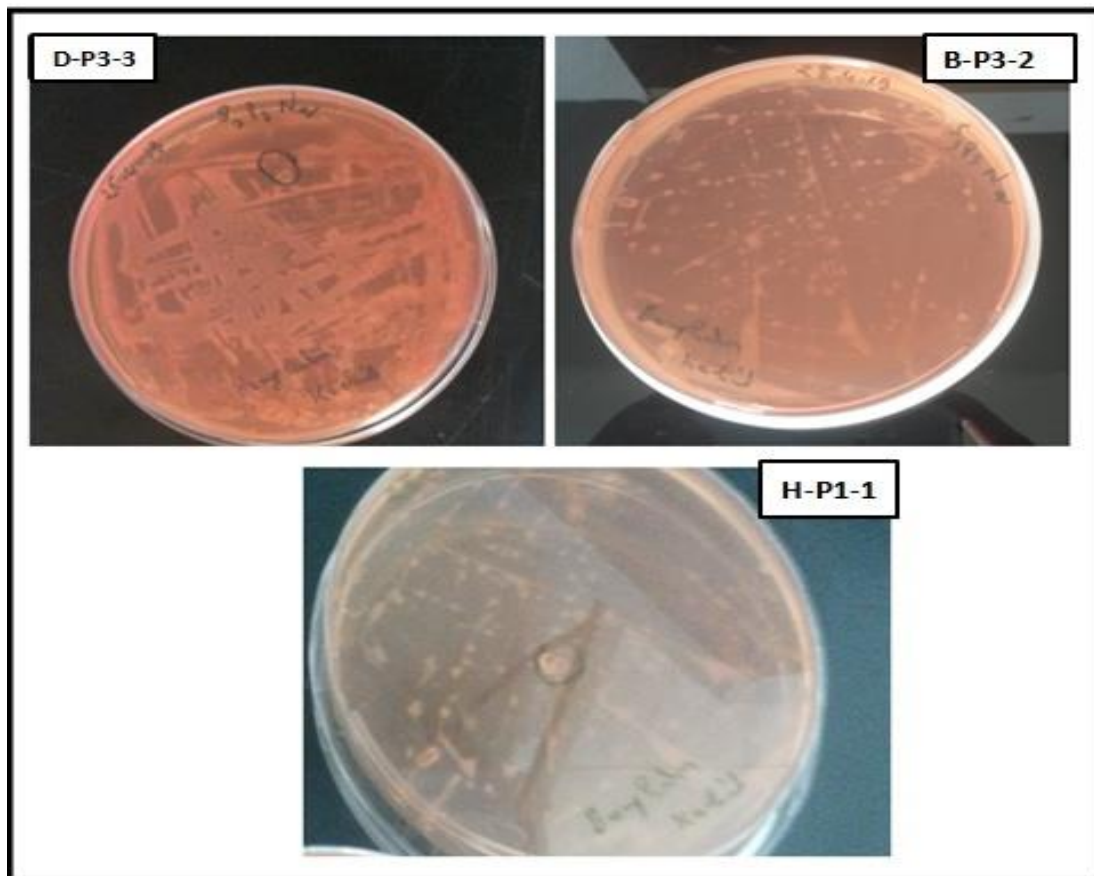


**Figure 14:** Mesure de poids sec et poids frais des plantes de l'espèce *Vicia faba* pour les trois sites.

## 2. Caractère morphologique des isolats

### 2.1. Croissance sur milieu YMA+Rouge de Congo

Au bout de 24h, nos isolats présentent une croissance très importante, rapide et détectable, les isolats que nous avonsensemencés n'absorbent pas le Rouge de Congo (RC) ou l'absorbent faiblement (Fig.15).



**Figure 15:** Résultats de la croissance de quelques isolats sur milieu YMA+ RC.

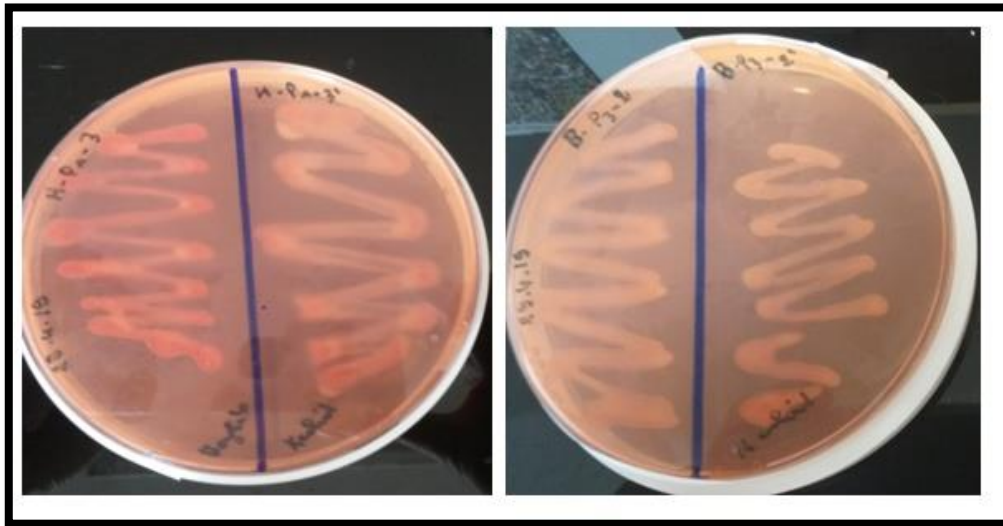
La croissance des colonies sur le milieu YMA+RC montrent des différences dans leurs absorbances du Rouge Congo, on trouve celles qui ne l'absorbent pas et garde leur couleur translucide, ou l'absorbent faiblement. Ceci confirme la pureté des colonies et prouve que les résultats obtenus sur nos isolats sont fiables. En présence des contaminants, ou des bactéries n'appartenant pas au genre *Rhizobium*, les colonies absorbent le Rouge Congo et apparaissent de couleur rouge.



La croissance dans le milieu YMA+RC figure parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des *Rhizobia* (Vincent, 1970).

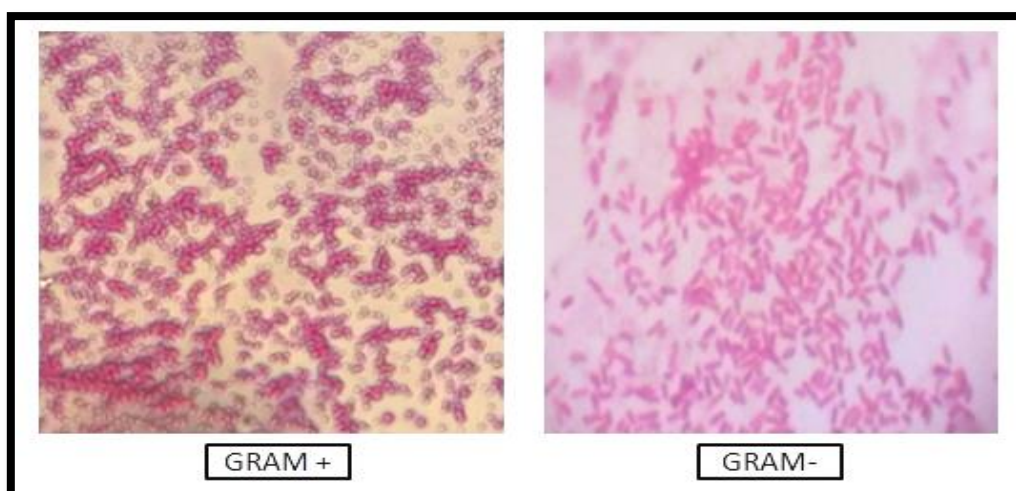
## 2.2. Purification des isolats et coloration de Gram

Après purification, les colonies apparaissent sur milieu YMA+RC avec un aspect homogène après 48 h d'incubation (Fig.16).



**Figure 16:** Purification des isolats.

La coloration de Gram nous a permis de différencier les bactéries d'après leur forme (bacille, coccobacille, cocci), et leur composition de paroi: les bactéries à Gram positif se caractérisent par une couleur violette. Pour les bactéries à Gram négatif, elles sont caractérisées par une couleur rose (Fig.17).



**Figure 17:** Observation microscopique des bactéries isolées (G×100).

Les résultats de la caractérisation préliminaire obtenue après la réalisation de la coloration de Gram, révèlent qu'il y'a une diversité assez remarquable au niveau de leur morphologie. En effet, l'observation au microscope optique (Grossissement 100) montre une diversité dans la forme et la taille des isolats (Tableaux 04, 05 et 06).

**Tableau 04:** Test morphologique des bactéries isolées du site Hamma Bouziane.

<b>Hamma Bouziane</b>		
<b>Isolats</b>	<b>Gram</b>	<b>Formes</b>
<b>H-P1-1</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P1-2</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P1-3</b>	<b>Gram -</b>	<b>Cocci</b>
<b>H-P1-4</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P1-5</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P1-6</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P1-7</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P2-1</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P2-2</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P2-3</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P2-4</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P2-5</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P2-6</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P2-7</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P2-8</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P3-1</b>	<b>Gram +</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P3-2</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P3-3</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P3-4</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>H-P3-5</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>
<b>H-P3-6</b>	<b>Gram -</b>	<b>Bacille</b>

D'après le tableau 4, tous les isolats sont des bactéries à Gram – et seulement l'isolat (H-P3-1) qui est une bactérie à Gram +, pour la majorité des isolats, ils sont de forme coccobacille et bacille. L'isolat avec le Gram + n'appartient pas au genre *Rhizobium*.

**Tableau 05:** Test morphologique des bactéries isolées du site Didouche Mourad.

<b>Didouche Mourad</b>		
<b>Isolats</b>	<b>Gram</b>	<b>Formes</b>
D-P1-1	Gram -	Bacille
D-P1-2	Gram -	Bacille
D-P1-3	Gram -	coccobacille
D-P1-4	Gram -	Bacille
D-P1-5	Gram -	coccobacille
D-P2-1	Gram -	Cocci
D-P2-2	Gram -	coccobacille
D-P2-3	Gram -	coccobacille
D-P2-4	Gram -	Bacille
D-P3-1	Gram -	Bacille
D-P3-2	Gram -	bacille en amas
D-P3-3	Gram -	Coccobacille
D-P3-4	Gram -	Bacille
D-P3-5	Gram -	Bacille
D-P3-6	Gram -	Bacille

Tous les isolats qui sont présentés dans la région de Didouche Mourad sont des bactéries à Gram – (15/15 isolats) et de forme coccobacille ou bacille sauf pour l’isolat (D-P2-1), qui présente une forme cocci (Tableau 05).

**Tableau 06:** Test morphologique des bactéries isolées du site Beni H’midene.

<b>Beni H’midene</b>		
<b>Isolats</b>	<b>Gram</b>	<b>Formes</b>
B-P1-1	Gram -	coccobacille
B-P1-2	Gram -	Bacille
B-P1-3	Gram -	Cocci
B-P1-4	Gram -	coccobacille
B-P1-5	Gram -	Cocci
B-P1-6	Gram -	coccobacille
B-P2-1	Gram -	Bacille
B-P2-2	Gram -	Cocci
B-P2-3	Gram -	coccobacille
B-P2-4	Gram -	Bacille

<b>B-P2-5</b>	<b>Gram -</b>	<b>Coccobacille</b>
<b>B-P2-6</b>	<b>Gram -</b>	<b>coccobacille</b>
<b>B-P3-1</b>	<b>Gram -</b>	<b>coccobacille</b>
<b>B-P3-2</b>	<b>Gram -</b>	<b>Cocci</b>
<b>B-P3-3</b>	<b>Gram -</b>	<b>coccobacille</b>
<b>B-P3-4</b>	<b>Gram -</b>	<b>coccobacille</b>
<b>B-P3-5</b>	<b>Gram -</b>	<b>coccobacille</b>
<b>B-P3-6</b>	<b>Gram +</b>	<b>coccobacille</b>

Les isolats présentés dans la région de Beni H'midene sont des bactéries à Gram – et seulement 1/18 (B-P3-6) qui est une bactérie à Gram +, donc pas une *Rhizobium* (Tableau 06).

L'ensemble des résultats obtenus dans les trois sites relatifs à l'aspect macroscopique et microscopique, suggèrent que la majorité des isolats ont la même description des *Rhizobia* (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984).

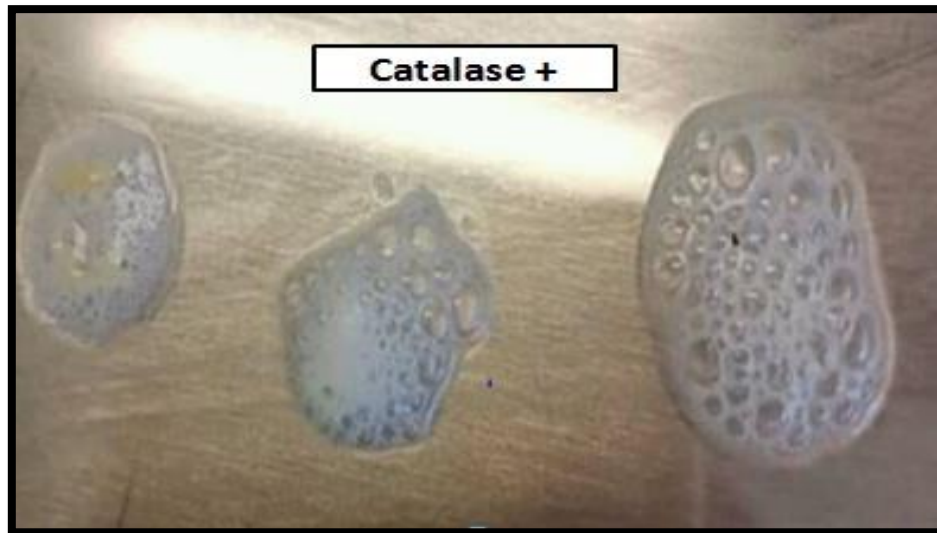
### **3. Etude des enzymes respiratoire**

Pour effectuer la caractérisation d'une bactérie il est préférable de connaître son type respiratoire.

#### **3.1. Recherche de la catalase**

La plupart des résultats présentés dans les tableaux 07, 08 et 09 montrent que la majorité de nos isolats produisent une effervescence au contact de l'eau oxygénée, donc elles sont catalase positive.

La figure 18 présente une réponse nettement positive à ce test, puisque des bulles d'air sont observables dans la goutte de peroxyde ajoutée (Photo prise au cours de notre étude).



**Figure 18:** Réaction de la catalase positive.

**Tableau 07:** Test catalase des bactéries du site Hamma Bouziane.

Hamma Bouziane			
Isolats	Résultats	Isolats	Résultats
H-P1-1	+	H-P2-5	+
H-P1-2	+	H-P2-6	-
H-P1-3	+	H-P2-7	+
H-P1-4	+	H-P2-8	+
H-P1-5	+	H-P3-1	+
H-P1-6	+	H-P3-2	+
H-P1-7	+	H-P3-3	+
H-P2-1	+	H-P3-4	+
H-P2-2	-	H-P3-5	+
H-P2-3	+	H-P3-6	+
H-P2-4	+		

Le tableau 07 montre que tous les isolats présentent une catalase positive à l'exception de deux isolats qui sont H-P2-2 et H-P2-6, qui présentent une absence de l'enzyme catalase, donc ne permet pas de voir une effervescence.

**Tableau 08:** Test catalase des bactéries du site Didouche Mourad.

<b>Didouche Mourad</b>			
<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>	<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>
<b>D-P1-1</b>	+	<b>D-P2-4</b>	-
<b>D-P1-2</b>	+	<b>D-P3-1</b>	+
<b>D-P1-3</b>	+	<b>D-P3-2</b>	+
<b>D-P1-4</b>	+	<b>D-P3-3</b>	+
<b>D-P1-5</b>	+	<b>D-P3-4</b>	+
<b>D-P2-1</b>	+	<b>D-P3-5</b>	+
<b>D-P2-2</b>	+	<b>D-P3-6</b>	+
<b>D-P2-3</b>	+		

Dans le tableau 08, 14/15 isolats issus de la région de Didouche Mourad ont une activité positive c'est-à-dire présence de l'enzyme de catalase sauf pour l'isolat D-P2-4 (catalase -).

**Tableau 09:** Test catalase des bactéries du site Beni H'midene.

<b>Beni H'midene</b>			
<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>	<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>
<b>B-P1-1</b>	+	<b>B-P2-4</b>	+
<b>B-P1-2</b>	+	<b>B-P2-5</b>	+
<b>B-P1-3</b>	+	<b>B-P2-6</b>	+
<b>B-P1-4</b>	+	<b>B-P3-1</b>	+
<b>B-P1-5</b>	+	<b>B-P3-2</b>	+
<b>B-P1-6</b>	+	<b>B-P3-3</b>	+
<b>B-P2-1</b>	+	<b>B-P3-4</b>	+
<b>B-P2-2</b>	+	<b>B-P3-5</b>	+
<b>B-P2-3</b>	+	<b>B-P3-6</b>	+

D'après le tableau 9, tous les résultats du test de catalase pour le site Beni h'midene sont positive.

Selon Vincent (1981), la présence de la catalase est l'une des caractéristiques principales des isolats de *Rhizobium*. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par Kravchenko *et al.* (2004) et Bumunang et Babalola (2014).

### 3.2 Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram négatif. Une réaction oxydase positive se matérialise par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée. 78% des isolats issus de trois sites sont oxydase négative (Tableaux 10,11 et 12).

**Tableau 10:** Test oxydase des bactéries du site Hamma Bouziane

<b>Hamma Bouziane</b>			
<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>	<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>
H-P1-1	-	H-P2-5	-
H-P1-2	-	H-P2-6	-
H-P1-3	+	H-P2-7	-
H-P1-4	+	H-P2-8	-
H-P1-5	-	H-P3-1	-
H-P1-6	-	H-P3-2	-
H-P1-7	-	H-P3-3	+
H-P2-1	-	H-P3-4	+
H-P2-2	-	H-P3-5	-
H-P2-3	-	H-P3-6	-
H-P2-4	-		

+ : Présence d'oxydase.

- : Absence d'oxydase.

**Tableau 11:** Test oxydase des bactéries du site Didouche Mourad.

<b>Didouche Mourad</b>			
<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>	<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>
D-P1-1	-	D-P2-4	-
D-P1-2	+	D-P3-1	-
D-P1-3	-	D-P3-2	-
D-P1-4	-	D-P3-3	+
D-P1-5	-	D-P3-4	+
D-P2-1	-	D-P3-5	+
D-P2-2	-	D-P3-6	+
D-P2-3	-		

+ : Présence d'oxydase.

- : Absence d'oxydase.

**Tableau 12:** Test oxydase des bactéries du site Beni h'midene

Beni hmidene			
Isolats	Résultats	Isolats	Résultats
B-P1-1	-	B-P2-4	-
B-P1-2	-	B-P2-5	+
B-P1-3	-	B-P2-6	+
B-P1-4	-	B-P3-1	-
B-P1-5	+	B-P3-2	-
B-P1-6	-	B-P3-3	-
B-P2-1	-	B-P3-4	-
B-P2-2	-	B-P3-5	-
B-P2-3	-	B-P3-6	-

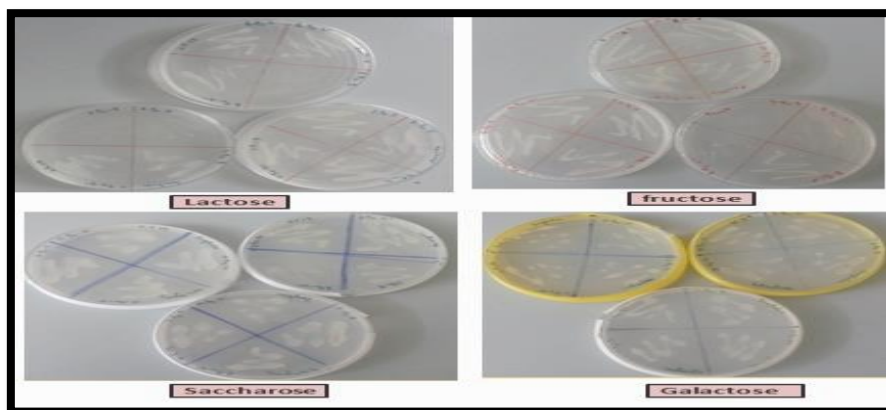
+ : Présence d'oxydase.

- : Absence d'oxydase.

Sur l'ensemble de 54 isolats, 17/21 isolats du site Hamma Bouziane, 10/15 isolats pour le site Didouche Mourad ainsi que 15/18 pour le site beni H'midene présentent une réaction négative pour le test d'oxydase (Tableaux 10, 11 et 12). Cela signifie que la majorité des isolats sur lesquelles nous travaillons ne possèdent pas l'enzyme respiratoire cytochrome oxydase.

#### 4. Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Les résultats indiqués dans les tableaux (13, 14 et 15) montrent que nos isolats différents dans leur aptitude à assimiler les différents sucres (Saccharose, Galactose, Lactose et Fructose), et présentent une croissance plus ou moins variable (Fig.19).



**Figure 19:** Assimilation des sucres pour quelques isolats étudiés.



**Tableau 13:** Assimilation des sucres par les isolats du site Hamma Bouziane.

<b>Hamma Bouziane</b>				
<b>Isolats</b>	<b>Saccharose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Lactose</b>	<b>Fructose</b>
<b>H-P1-1</b>	++	++	++	++
<b>H-P1-2</b>	++	++	++	++
<b>H-P1-3</b>	++	++	++	++
<b>H-P1-4</b>	++	++	++	++
<b>H-P1-5</b>	+	++	++	++
<b>H-P1-6</b>	++	++	++	++
<b>H-P1-7</b>	++	++	++	++
<b>H-P2-1</b>	+	+	++	+
<b>H-P2-2</b>	++	+	+	+
<b>H-P2-3</b>	++	++	++	++
<b>H-P2-4</b>	++	++	++	++
<b>H-P2-5</b>	++	++	++	++
<b>H-P2-6</b>	++	++	++	++
<b>H-P2-7</b>	++	++	++	++
<b>H-P2-8</b>	++	++	++	++
<b>H-P3-1</b>	+	++	+	++
<b>H-P3-2</b>	++	+	++	++
<b>H-P3-3</b>	++	++	+	++
<b>H-P3-4</b>	++	++	++	++
<b>H-P3-5</b>	++	++	++	++
<b>H-P3-6</b>	++	++	++	++

++ : Bonne croissance (après 24h d'incubation).

+ : croissance moyenne (après 48h d'incubation).

- : Pas de croissance.

Tous les isolats du site Hamma Bouziane (21/21) ont la capacité d'assimiler les quatre sucres comme source de carbone (Tableau 13).

**Tableau 14:** Assimilation des sucres par les isolats du site Didouche Mourad.

<b>Didouche Mourad</b>				
<b>Isolats</b>	<b>Saccharose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Lactose</b>	<b>Fructose</b>
<b>D-P1-1</b>	++	++	+	++
<b>D-P1-2</b>	++	++	++	++
<b>D-P1-3</b>	-	+	+	-
<b>D-P1-4</b>	+	++	+	+
<b>D-P1-5</b>	-	+	+	-
<b>D-P2-1</b>	++	++	++	+
<b>D-P2-2</b>	++	++	++	+
<b>D-P2-3</b>	+	+	+	+
<b>D-P2-4</b>	+	+	+	+
<b>D-P3-1</b>	+	+	++	++
<b>D-P3-2</b>	+	+	+	++
<b>D-P3-3</b>	+	++	++	+
<b>D-P3-4</b>	+	++	++	+
<b>D-P3-5</b>	++	++	++	++
<b>D-P3-6</b>	++	++	++	++

++ : Bonne croissance (après 24h d'incubation).  
+ : croissance moyenne (après 48h d'incubation).  
- : Pas de croissance.

Les isolats issus du site Didouche Mourad (Tableau 14), montrent une croissance variable en présence des différents sucres et seulement l'isolat D-P1-3 et D-P1-5 qui n'assimilent ni le saccharose ni le fructose.

**Tableau 15:** Assimilation des sucres par les isolats du site Beni hmidene.

<b>Beni hmidene</b>				
<b>Isolat</b>	<b>Saccharose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Lactose</b>	<b>Fructose</b>
<b>B-P1-1</b>	++	++	++	++
<b>B-P1-2</b>	++	++	++	++
<b>B-P1-3</b>	+	+	+	+
<b>B-P1-4</b>	++	++	++	++
<b>B-P1-5</b>	++	++	+	+
<b>B-P1-6</b>	+	+	+	+
<b>B-P2-1</b>	++	++	++	++
<b>B-P2-2</b>	++	++	++	++
<b>B-P2-3</b>	++	+	+	-
<b>B-P2-4</b>	+	++	++	+
<b>B-P2-5</b>	++	++	++	++
<b>B-P2-6</b>	++	++	++	++
<b>B-P3-1</b>	++	+	+	+
<b>B-P3-2</b>	++	++	+	-
<b>B-P3-3</b>	++	++	++	++
<b>B-P3-4</b>	++	++	++	++
<b>B-P3-5</b>	++	++	++	+
<b>B-P3-6</b>	++	++	++	+

++ : Bonne croissance (après 24h d'incubation)

+ : croissance moyenne (après 48h d'incubation)

- : Pas de croissance

Tous les isolats du site Beni H'midene montrent une croissance variable en présence des quatre sucres sauf pour les deux isolats (B-P2-3 et B-P3-2), qui n'ont pas la capacité d'assimiler le fructose et présentent une assimilation pour les autres sucres (Tableau 15).

D'après les trois tableaux, nous remarquons que le galactose est le seul sucre qui est assimilé par tous les isolats, le lactose et le saccharose sont assimilés par la plupart des isolats, tandis que le fructose est le substrat le moins assimilé.

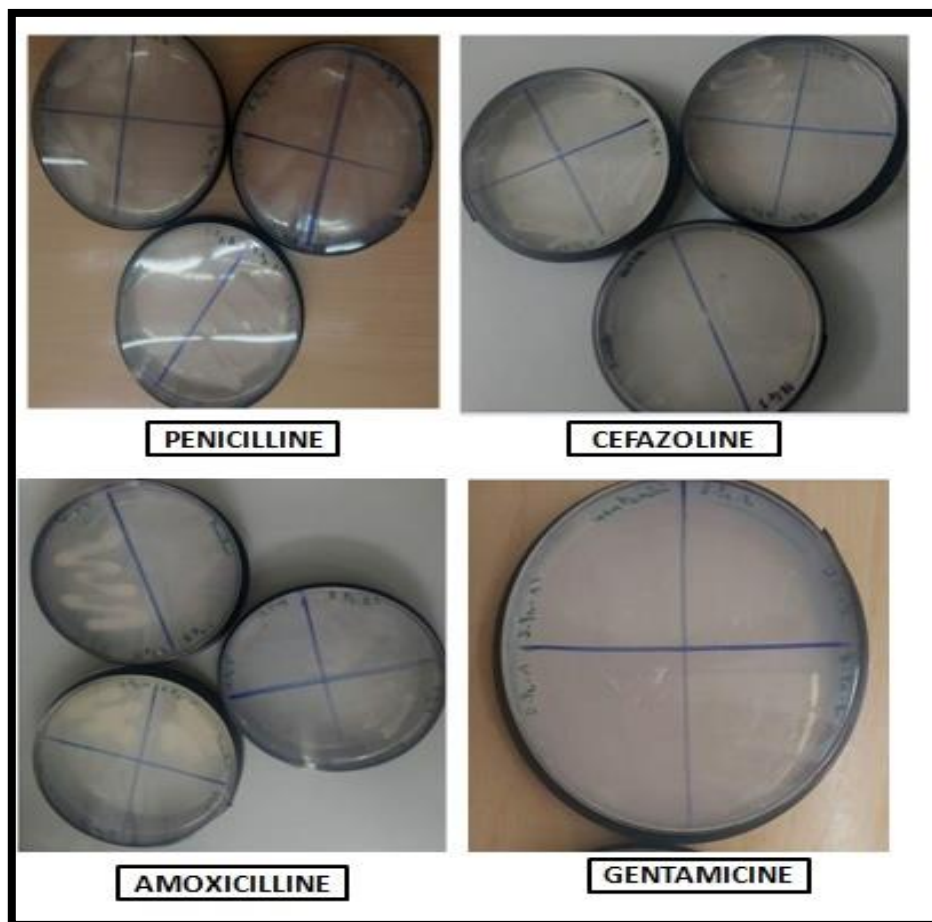
Selon Graham et parcker (1964), les bactéries à croissance rapide présentent une assimilation très large *vis-à-vis* des substrats carbonés par rapport aux bactéries à croissance lente. De même, Maatallah *et al.* (2002) a constaté que les *Rhizobia* à croissance rapide sont capable de se développer sur une grande variété de substrats carbonés, alors

que les *Rhizobia* à croissance lente sont limités dans leur capacité à assimiler les différentes sources de carbone.

Il a été montré que les isolats à croissance rapide possèdent une préférence pour les disaccharides (saccharose et lactose) (Stowers, 1985), ce qui est en accord avec nos résultats.

## 5. Résistance aux antibiotiques

Les résultats indiquent que nos isolats montrent des réponses variables aux différents antibiotiques testés (Fig.20).



**Figure 20:** Résultat de quelques isolats pour les antibiotiques étudiés.

D'après les tableaux 16, 17 et 18 de la résistance aux antibiotiques, on remarque qu'il y a une grande sensibilité pour les quatre antibiotiques. Nous avons remarqué que 48/54 isolats présentent une sensibilité à la Gentamicine, 41/54 isolats pour la Céfazoline, 40

isolats pour l'Amoxicilline et 30/54 isolats sont sensibles à la Pénicilline, donc l'antibiotique qui présente plus de résistance par nos isolat est la Pénicilline.

**Tableau 16:** Résistance aux antibiotiques pour le site Hamma Bouziane.

<b>Hamma Bouziane</b>				
<b>Isolats</b>	<b>Pénicilline</b>	<b>Gentamicine</b>	<b>Amoxiciline</b>	<b>Céfazoline</b>
<b>H-P1-1</b>	-	+	-	-
<b>H-P1-2</b>	+	-	-	-
<b>H-P1-3</b>	-	-	-	+
<b>H-P1-4</b>	+	-	-	-
<b>H-P1-5</b>	-	-	+	-
<b>H-P1-6</b>	-	-	+	-
<b>H-P1-7</b>	-	-	-	-
<b>H-P2-1</b>	-	-	-	-
<b>H-P2-2</b>	-	-	-	+
<b>H-P2-3</b>	+	-	-	-
<b>H-P2-4</b>	+	-	-	-
<b>H-P2-5</b>	-	-	+	+
<b>H-P2-7</b>	+	-	-	+
<b>H-P2-8</b>	-	-	-	+
<b>H-P3-1</b>	-	-	-	-
<b>H-P3-2</b>	-	-	-	-
<b>H-P3-3</b>	+	-	+	-
<b>H-P3-4</b>	-	-	+	-
<b>H-P3-5</b>	+	-	-	-
<b>H-P3-6</b>	+	-	-	-

++ Forte résistance  
+ Faible résistance  
- sensible

Les isolats présentés dans le tableau 16, montrent une résistance de 8/20 isolats pour la Pénicilline et 5/20 isolats pour l'Amoxicilline et la Céfazoline, alors que tous les isolats sont sensibles à la Gentamicine sauf (H-P1-1).

**Tableau 17:** Résistance des antibiotiques pour le site Didouche Mourad.

<b>Didouche Mourad</b>				
<b>Isolats</b>	<b>Pénicilline</b>	<b>Gentamicine</b>	<b>Amoxicilline</b>	<b>Céfazoline</b>
<b>D-P1-1</b>	-	-	+	-
<b>D-P1-2</b>	-	-	+	-
<b>D-P1-3</b>	+	-	++	-
<b>D-P1-4</b>	+	-	-	-
<b>D-P1-5</b>	+	-	-	-
<b>D-P2-1</b>	++	+	+	-
<b>D-P2-2</b>	++	+	-	-
<b>D-P2-3</b>	-	-	-	+
<b>D-P2-4</b>	++	-	+	+
<b>D-P3-1</b>	-	-	-	-
<b>D-P3-2</b>	-	-	-	-
<b>D-P3-3</b>	+	-	+	-
<b>D-P3-4</b>	+	-	+	-
<b>D-P3-5</b>	+	-	-	+
<b>D-P3-6</b>	+	-	-	+

++ Forte résistance  
 + Faible résistance  
 - sensible

Le tableau 17 montre une résistance pour la majorité des isolats pour la Pénicilline et l'Amoxicilline et 4/15 isolats résistent contre la Céfazoline, alors que tous les isolats sont sensibles à la Gentamicine sauf (D-P2-1 et D-P2-2).

**Tableau 18:** Résistance des antibiotiques pour le site Beni H'midene.

<b>Beni Hmidene</b>				
<b>Isolats</b>	<b>Pénicilline</b>	<b>Gentamicine</b>	<b>Amoxiciline</b>	<b>Céfazoline</b>
<b>B-P1-1</b>	+	-	+	+
<b>B-P1-2</b>	-	-	+	+
<b>B-P1-3</b>	-	-	-	-
<b>B-P1-4</b>	-	+	-	-
<b>B-P1-5</b>	-	-	-	-
<b>B-P1-6</b>	-	-	-	-
<b>B-P2-1</b>	-	-	-	-
<b>B-P2-2</b>	-	-	-	-
<b>B-P2-3</b>	-	+	-	-

<b>B-P2-4</b>	+	+	-	-
<b>B-P2-5</b>	-	-	-	-
<b>B-P2-6</b>	-	-	-	-
<b>B-P3-1</b>	+	-	-	-
<b>B-P3-2</b>	+	-	-	++
<b>B-P3-3</b>	+	-	-	+
<b>B-P3-4</b>	+	-	-	-
<b>B-P3-5</b>	-	-	-	-
<b>B-P3-6</b>	-	-	-	-

++ Forte résistance  
+ Faible résistance  
- sensible

Le tableau du site Beni H'midene (Tableau 18) montre une sensibilité des isolats pour les quatre antibiotiques étudiés.

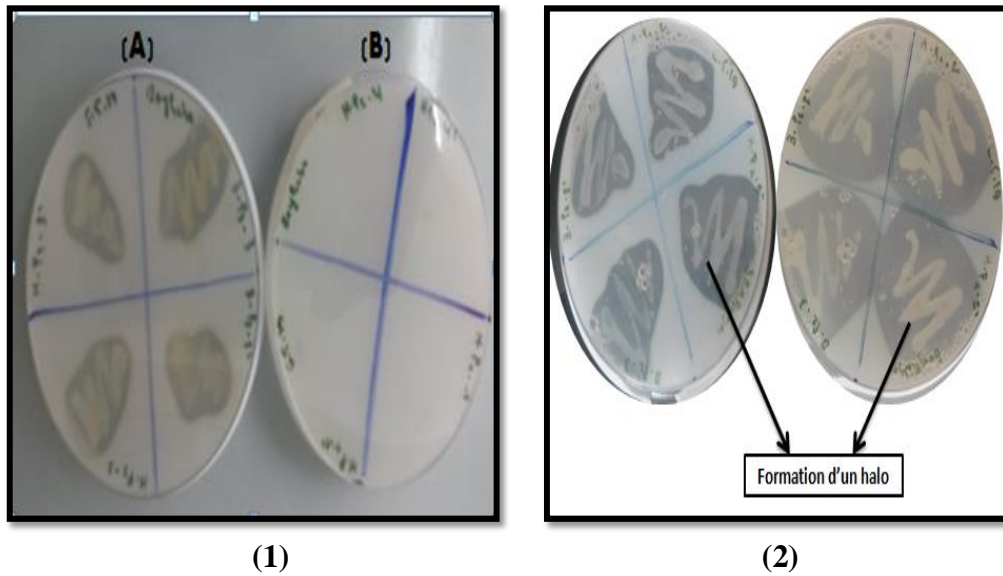
Les résultats des trois sites sont en accord avec ceux d'Elkan (1992) qui a montré que les *Rhizobia* à croissance rapide sont plus sensibles aux antibiotiques que les *Rhizobia* à croissance lente. De plus, Beck *et al.* (1993) insistent sur l'utilisation de la résistance aux antibiotiques dans les études sur les *Rhizobia* en tant que moyen d'identification et comparaison des isolats.

## **6. Analyse des caractères PGPR**

### **6.1. Solubilisation du phytate**

L'étude de la capacité des isolats bactériens à libérer le phosphate minérale a été réalisée avec un test qualitatif sur milieu solide (NBRIP).

Sur l'ensemble des 54 isolats testés, 45 isolats ont été capables de solubiliser la source de phosphore utilisé qui est le phytate (Tableaux 19, 20 et 21), cette solubilisation est traduite par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne (Fig.21). Ce résultat ne peut être confirmé que par le dosage de l'activité de l'enzyme phytase, ce est en accord avec les résultats du Appl. Biosci (2018).



**Figure 21:** Solubilisation du phytate sur le milieu «NBRIP» par les rhizobactéries.

(1): (A) : Solubilisation, (B) : Pas de solubilisation ; (2) : Formation d'un halo indiquant la solubilisation du phytate.

**Tableau 19:** Test qualitatif des bactéries solubilisant la phytate de la région Hamma Bouziane

Hamma Bouziane			
Isolats	Résultats	Isolats	Résultats
H-P1-1	++	H-P2-5	-
H-P1-2	++	H-P2-6	-
H-P1-3	++	H-P2-7	++
H-P1-4	++	H-P2-8	++
H-P1-5	++	H-P3-1	-
H-P1-6	++	H-P3-2	++
H-P1-7	++	H-P3-3	++
H-P2-1	++	H-P3-4	++
H-P2-2	-	H-P3-5	++
H-P2-3	-	H-P3-6	++
H-P2-4	-		

++ : Solubilisation rapide ; + : Solubilisation moyenne, - : pas de solubilisation du phytate.

Les résultats du site Hamma Bouziane, montrent que les majorités des isolats (15/21) sont capable de solubiliser le phytate (tableau 19).



**Tableau 20:** Test qualitatif des bactéries solubilisant le phytate de la région Didouche Mourad.

<b>Didouche Mourad</b>			
<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>	<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>
<b>D P1 1</b>	++	<b>D P2 2+</b>	+
<b>D P1 1+</b>	++	<b>D P3 1</b>	++
<b>D P1 2</b>	++	<b>D P3 1+</b>	++
<b>D P1 2+</b>	-	<b>D P3 2</b>	++
<b>D P1 3</b>	-	<b>D P3 2+</b>	++
<b>D P2 1</b>	++	<b>D P3 3</b>	++
<b>D P2 1+</b>	+	<b>D P3 3+</b>	++
<b>D P2 2</b>	+		

++ : Solubilisation rapide ; + : Solubilisation moyenne, - : pas de solubilisation du phytate.

Parmi les bactéries de la région de Didouche Mourad (Tableau 20), il y a 13 sur 15 isolats qui ont pu pousser sur un milieu contenant que le phytate comme source de phosphore.

**Tableau 21:** Test qualitatif des bactéries solubilisant le phytate de la région Beni H'midene.

<b>Beni hmidene</b>			
<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>	<b>Isolats</b>	<b>Résultats</b>
<b>B-P1-1</b>	++	<b>B-P2-4</b>	++
<b>B-P1-2</b>	++	<b>B-P2-5</b>	++
<b>B-P1-3</b>	-	<b>B-P2-6</b>	++
<b>B-P1-4</b>	++	<b>B-P3-1</b>	+
<b>B-P1-5</b>	++	<b>B-P3-2</b>	++
<b>B-P1-6</b>	+	<b>B-P3-3</b>	++
<b>B-P2-1</b>	+	<b>B-P3-4</b>	++
<b>B-P2-2</b>	++	<b>B-P3-5</b>	++
<b>B-P2-3</b>	++	<b>B-P3-6</b>	++

++ : Solubilisation rapide ; + : Solubilisation moyenne, - : pas de solubilisation du phytate.

Tous les isolats de la région de Beni h'midene présentent un résultat positive pour le test de phytate sauf pour l'isolat B-P1-3 qui n'a pas pu pousser sur milieu NBRIP.

À partir de cinquante-quatre isolats de départ quarante-deux isolats ont été sélectionnés pour étudier les deux mécanismes PGPR : Production de l'acide Indole Acétique (AIA) et l'activité nitrate réductase, on a éliminé le reste des isolats qui présentent les mêmes réponses.

## **6.2. Dosage de l'acide indole acétique**

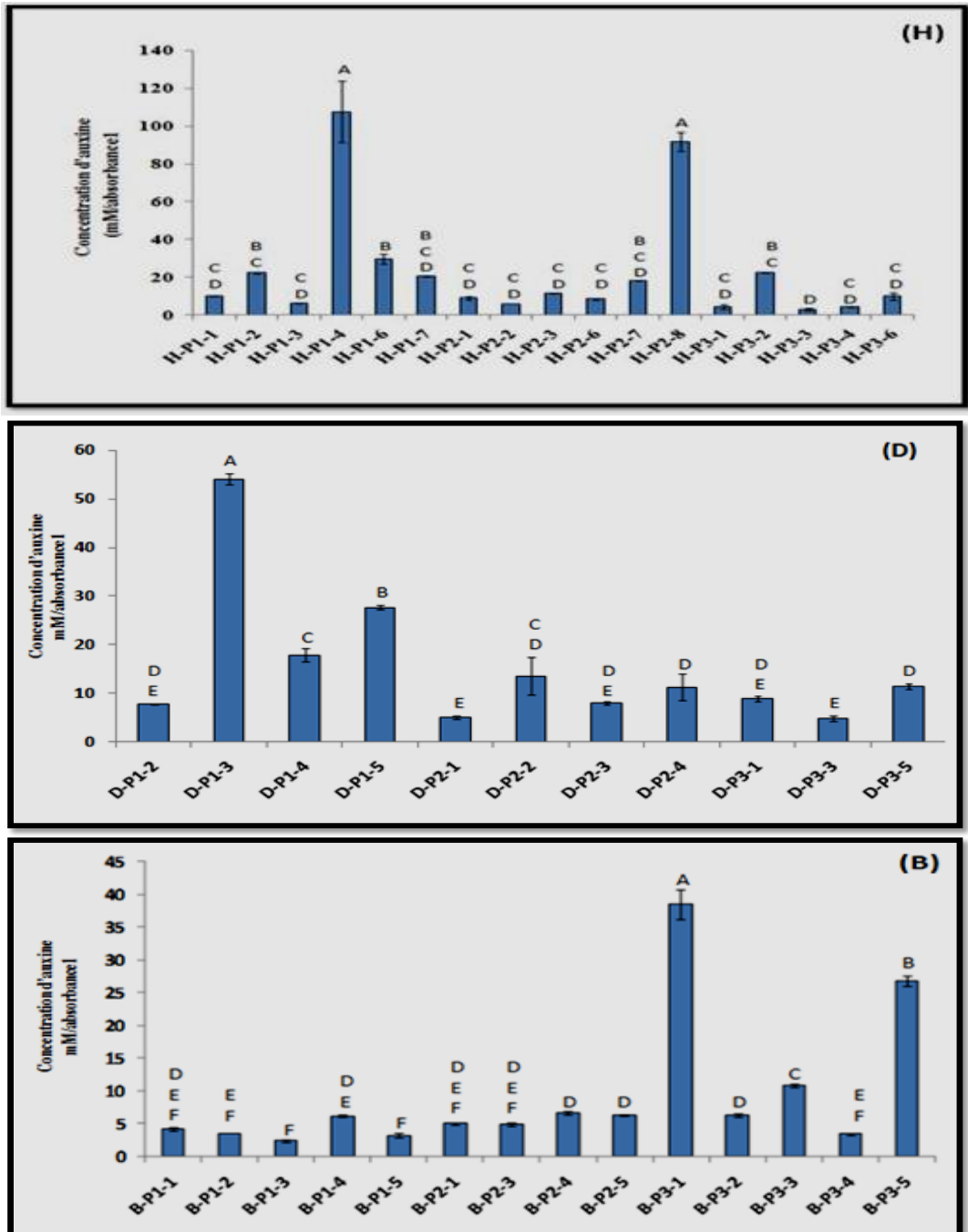
Les PGPR peuvent contribuer à l'amélioration du développement des végétaux avec la production de différentes phytohormones, dont l'auxine (Kloepper *et al.*, 2007). Cette hormone représenté principalement par l'acide indole-acétique (AIA), qui fonctionne comme une molécule-signal importante dans la régulation du développement des plantes (Spaenpen *et al.*, 2007).

L'ensemble des isolats ont été testés pour leur capacité à produire cette hormone. La production d'auxines dans le milieu LB se traduit par une coloration rose à rouge après l'ajout du réactif Salkowski aux surnagent (Fig.22). L'intensité de la couleur varie selon le taux d'AIA produite. La densité optique a été mesurée à 530 nm et les concentrations de l'AIA ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Annexe 8).



**Figure 22:** Production de l'AIA par les rhizobactéries sur milieu LB liquide.

Les résultats obtenus ont montré que les quantités d'auxine produites par les isolats bactériens varient de 119,09 à 2.38  $\mu\text{g}/\text{Absorbance } 1$  de bactéries pour le site Hamma Bouziane (Fig. 23-H), de 54,91 à 4,73  $\mu\text{g}/\text{Absorbance } 1$  de bactéries pour le site Didouche Mourad (Fig. 23-D) et de 27,35 à 2,29  $\mu\text{g}/\text{Absorbance } 1$  de bactéries pour le site Beni H'midene (Fig. 23-B).



**Figure 23:** Concentration d'auxine produite par les bactéries isolées des nodosités des trois sites. H : Hamma Bouziane, D : Didouche Mourad, B : Beni H'midene.

Les résultats obtenus de trois sites (Fig. 23), montrent que tous les isolats ont produit de l'AIA, mais à des quantités variables.

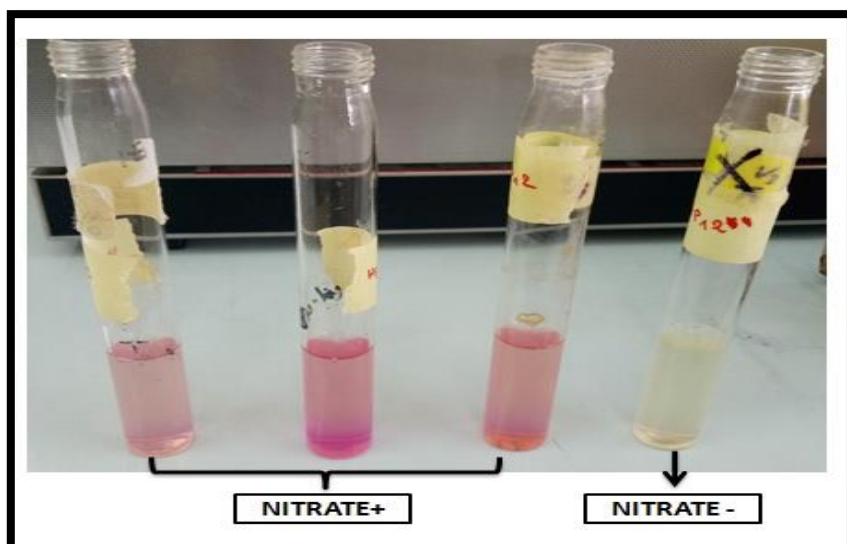
L'analyse de la variance confirme cette observation, marquant une différence significative ( $P < 0,0001$ ) pour tous les isolats. En effet, le test de Tukey de la comparaison des moyennes permet de mentionner sept groupes pour le site Hamma Bouziane avec une valeur maximale pour deux isolats qui sont H-P1-4 et H-P2-8 qui appartiennent au groupe A (Fig. 23H), six groupes pour le site Didouche Mourad avec une valeur maximale pour l'isolat D-P1-3 (Fig. 23D) et huit groupes pour le site Beni H'midene à une valeur maximale pour l'isolat B-P3-1 (Fig. 23B).

D'après les trois graphes (Fig. 23), on remarque que les isolats du site Hamma Bouziane sont les plus producteurs d'AIA, qui présentent le taux le plus élevé par rapport aux autres sites, l'AIA est généralement synthétisée par des rhizobactéries à partir de la dégradation du tryptophane, qui se trouve à différentes concentrations dans les exsudats racinaires selon le génotype de la plante (Kamilova *et al.*, 2006) et le mode d'expression (constitutive ou induite) (Ahemad et Kibret 2013).

Plusieurs microorganismes ont aussi la capacité de produire des auxines, des gibbérellines et des substances de type kinétines *in vitro*. Selon certains auteurs, les régulateurs de croissance qui sont produits dans la rhizosphère peuvent être prélevés directement par les racines et stimuler la croissance de la plante. Les quantités produites varient avec le microorganisme impliqué et la présence des précurseurs métaboliques des régulateurs de croissance. La L-tryptophane est le précurseur des auxines chez les microorganismes, dont des *Azotobacter*, des *Azospirillum*, des *Rhizobium*, des *Pseudomonas* et des *Bacillus spp* (Beauchamp, 1993).

### **6.3 Activité nitrate réductase**

Après l'addition de volume des réactifs nitrates 1 et 2, 14 isolats donnent une couleur rose qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites, la couleur rose indique la présence des nitrites réduite à partir du nitrate, une réaction négative présente des tubes incolore (Fig.24).



**Figure 24:** Résultats de l'activité nitrate réductase après l'ajout des réactifs 1 et 2.

La coloration rose traduit la décomposition de nitrate en nitrite selon la réaction suivante :  
 $\text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .

De plus la densité optique a été mesurée à 620 nm et les concentrations de nitrate ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Annexe 9).

Les résultats du test qualitatif montrent que 34% des isolats testés possèdent l'enzyme nitrate réductase (NR+). 28/42 isolats restent incolore (Tableau 22).

**Tableau 22:** Test qualitatif de l'activité nitrate réductase après l'ajout des réactifs Griess 1 et Griess 2.

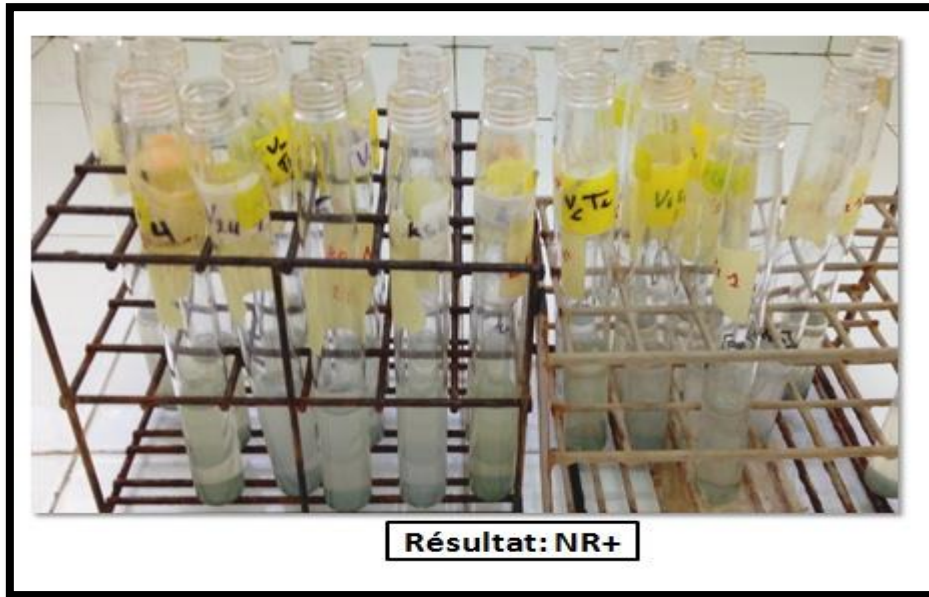
Isolat	Résultat	Isolat	Résultat
H-P1-1	++	D-P2-1	-
H-P1-2	+++	D-P2-2	-
H-P1-3	++	D-P2-3	-
H-P1-4	-	D-P2-4	-
H-P1-6	-	D-P3-1	+
H-P1-7	-	D-P3-3	-
H-P2-1	-	D-P3-5	-
H-P2-2	+	B-P1-1	-
H-P2-3	+	B-P1-2	-
H-P2-6	-	B-P1-3	-

<b>H-P2-7</b>	-	<b>B-P1-4</b>	-
<b>H-P2-8</b>	-	<b>B-P1-5</b>	++
<b>H-P3-1</b>	-	<b>B-P2-1</b>	-
<b>H-P3-2</b>	-	<b>B-P2-3</b>	-
<b>H-P3-3</b>	+	<b>B-P2-4</b>	+++
<b>H-P3-4</b>	++	<b>B-P2-5</b>	+
<b>H-P3-6</b>	-	<b>B-P3-1</b>	++
<b>D-P1-2</b>	+	<b>B-P3-2</b>	+
<b>D-P1-3</b>	+	<b>B-P3-3</b>	-
<b>D-P1-4</b>	+	<b>B-P3-4</b>	+++
<b>D-P1-5</b>	-	<b>B-P3-5</b>	-

(+++ : Rose foncé, ++ : Rose moyen, + : Rose clair - : incolore)

Une réaction négative ne signifie pas automatiquement qu'il n'y a pas de Nitrate réductase (NR), mais ceci peut aussi signifier que la bactérie possède une autre enzyme, qui est la Nitrite Réductase (NiR), et que le nitrite produit par l'action de la Nitrate Réductase a été réduit lui-même en ammonium par l'action de la NiR. A cet effet et a fin de vérifier la présence de nitrate dans le milieu ou non pour les résultats qui sont négatives, on ajoute la poudre de Zinc qui joue le même rôle que la Nitrate Réductase vis à vis des nitrates pour les tubes incolore (NR-), donc le Zinc induit une réaction chimique en présence de nitrate et grâce à cette réaction, il y aura production de nitrite. Après quelques minutes: une apparition de la couleur rose signifiant la présence des ions nitrite dans le milieu, donc le nitrate qui était dans les tubes n'a pas été réduit par la NR et la NiR. Donc la bactérie ne possédait pas cette enzyme: c'est un résultat négatif (NR-). Par contre, l'absence de la coloration, et donc l'absence des ions nitrite dans le milieu et par conséquent l'absence aussi du nitrate, ce qui indique un résultat positif pour les deux enzymes (NR+) et (NiR+).

L'ensemble de nos isolats qui ont présenté un résultat presque négatif après l'ajout des deux réactifs de la NR, restent incolore après l'addition de poudre de Zinc (Fig. 25). Cela signifie que les nitrates du milieu ont été réduits par les bactéries et l'addition de poudre de Zinc ne peut produire de nitrites, la Nitrate Réductase et donc positive (NR+), ainsi que la Nitrite Réductase (NiR) (Fig.25).



**Figure 25:** Résultats du nitrate réductase après ajout de poudre de zinc.

Dans les milieux biologiques, la transformation des ions  $\text{NO}_3^-$  en ions  $\text{NO}_2^-$  ne peut s'effectuer que sous l'action d'une enzyme : la nitrate réductase qui est présente dans tous les organismes susceptibles de métaboliser le nitrate tels que les plantes, les champignons ainsi que quelques espèces de levures et bactéries (Idrissi, 2006).

Les résultats de dosage du nitrate réductase sont présentés sur les graphes ci-dessous (Fig.26).

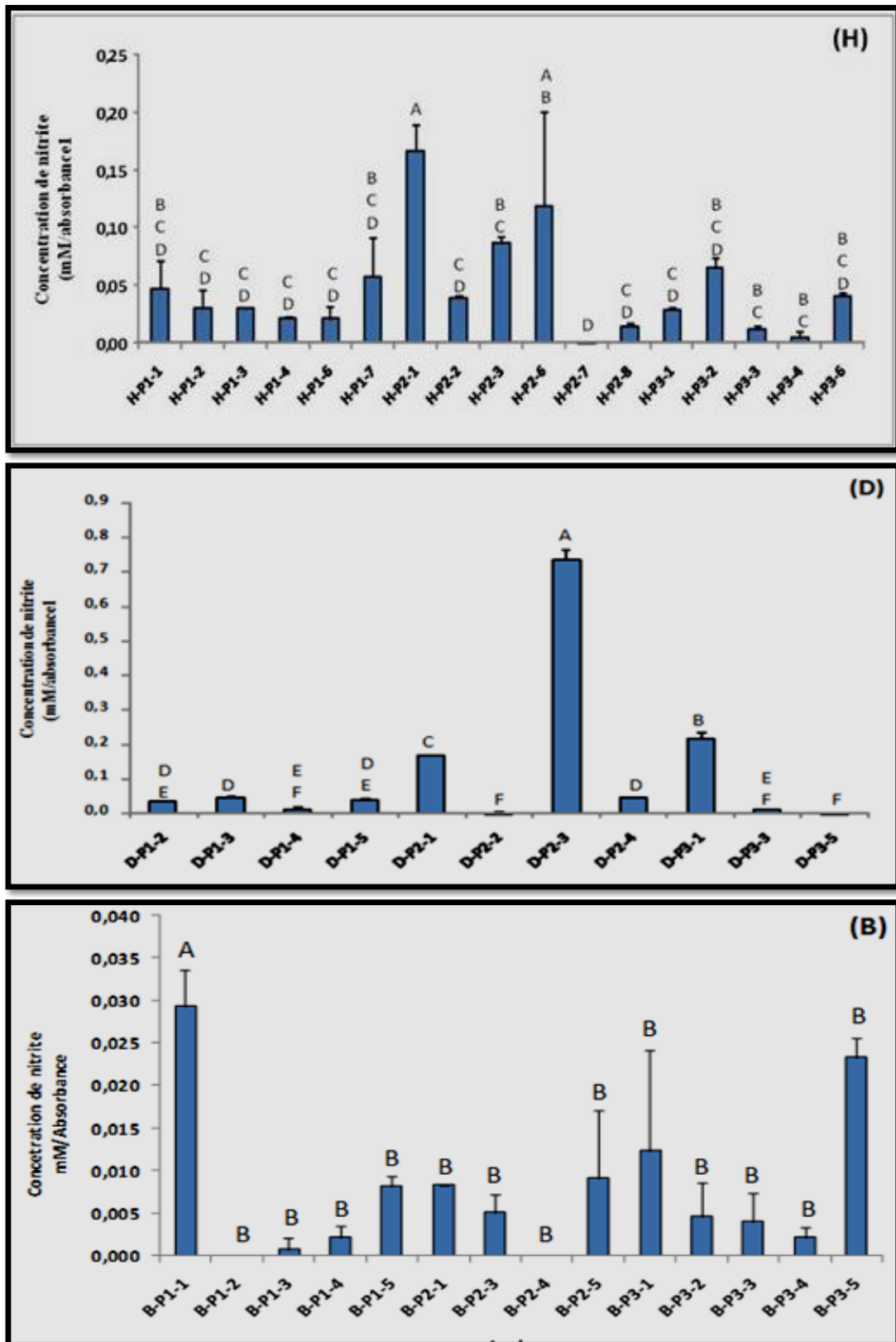


Figure 26: Concentration de nitrate produite par les bactéries de trois sites étudiés par une absorbance bactérienne égale à 1.



Les résultats présentés dans la figure 26 ont montré que les quantités de nitrate produites par les isolats bactériens ont été faibles voir même absente pour quelques isolats de trois sites.

Le test de tukey de la comparaison des moyennes ( $P < 0,0001$ ) permet de mentionner des résultats significatifs pour les 42 isolats testés. Le site Hamma Bouziane (Fig. 26H), montre des quantités faibles entre 0 et 0,194 avec 6 groupes, la valeur maximale présente le groupe (A), alors que les restes des isolats sont presque proches pour les isolats du même groupe (Fig. 26H). Pour le site Didouche Mourad (Fig.26D) les résultats obtenus sont de 0 à 0,752 et avec 7 groupes. De même, le site Beni H'midene (Fig. 26B) présente que 2 groupes (A et B) avec des quantités très faible par rapport aux deux autre sites.

D'après les graphes ci-dessus (Fig.26) on a estimé que seule l'isolat D-P2-3 qui a une activité nitrate réductase assez élevée (0,752 mM/absorbance1) par rapport aux autres isolats qui ont une faible activité ou presque n'ont pas d'activité (H-P2-7,D-P1-4,D-P2-2,D-P3-5,B-P1-2,B-P1-3,B-P2-2 et B-P2-4), cela est référant à la croissance des bactéries qui n'ont pas pu pousser dès le début en présence de nitrate, ce résultat peut être expliqué aussi, par la présence de la NiR qui a réduit la quantité de nitrite dans le milieu. Afin de mieux évaluer l'activité Nitrate Réductase et Nitrite Réductase, il faut réaliser des cinétiques de ces deux activités enzymatiques.

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin *et al.*, 2006). De plus, la variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents *Rhizobia* (Zahran, 1991). En plus, Munns (1968) a indiqué que la présence du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des *Rhizobia* aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective.

## **Conclusion**

Cette recherche a pour but d'une part d'étudier les *Rhizobia* des nodosités de la fève et d'une autre part la détermination de quelques modes d'action des PGPR sur ces isolats.

La première étude consiste à isoler des bactéries symbiotiques isolées des nodosités de la racine de la Fève (*Vicia faba* L.), de trois sites du nord de Constantine qui sont : Hamma Bouziane (H), Didouche Mourad (D) et Beni H'midène (H).

Au terme de cette étude, nous retiendrons que:

-La plupart des isolats sont des bactéries à Gram négatives de différentes formes, et qui présentent une croissance rapide et détectable sur le milieu de culture YMA+ Rouge de Congo (RC). Nos résultats montrent que la plupart des isolats étudiés ont l'enzyme catalase mais n'ont pas l'oxydase.

-Une gamme d'utilisation de substrats carbonés comme source de carbone, avec l'utilisation de quatre sucres dont : Saccharose, Galactose, Lactose et Fructose. L'observation de l'utilisation de ces sucres par les différents isolats a montré une variabilité d'assimilation qui diffère d'un site à l'autre et d'un sucre à un autre, la majorité des isolats ont bien assimilé les différents sucres, sauf pour le fructose qui a été mal assimilé.

-L'évaluation de la résistance des isolats étudiés aux antibiotiques montre une sensibilité vis-à-vis de quatre antibiotiques surtout pour la Gentamicine. Ces critères correspondent à la description des *Rhizobia*.

L'étude relative au rôle des rhizobactéries dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur. Pour cela, nous avons effectué une étude sur les caractères des PGPR.

-Les résultats obtenus pour le test de solubilisation de phytate montrent que les isolats testés ont la capacité de pousser sur milieu NBRIP ou seul source de phosphore est le phytate. Ensuite, les isolats sélectionnés montrent la capacité de produire de l'auxine et à dégrader le nitrate par le biais de la Nitrate Réductase.

-Une analyse statistiques sur la production de l'AIA et l'Activité Nitrate Réductase, montrent la présence des groupes significatifs et permet de faire une comparaison entre les trois sites étudiés.

Les résultats montrent que les isolats du site Hamma Bouziane sont les plus producteurs d'AIA, qui présentent le taux le plus élevé par rapport aux autres sites, pour l'activité nitrate réductase, les quantités de nitrate produites par les isolats bactériens ont été faibles voir même absente pour quelques isolats de trois sites. et seule l'isolats D-P2-3 qui a une activité nitrate réductase assez élevée par rapport aux autres isolats.

En perspective, il est souhaitable d'élargir cette étude par d'autres paramètres biochimiques et physiologiques, étude de l'effet des métaux lourds, l'effet de la salinité, du PH et de la température sur la croissance bactérienne, il est aussi important d'étudier le comportement de résistance des *Rhizobia* en présence d'autres antibiotiques (réaliser un antibiogramme) et d'autres sucres. Une identification des différents isolats par une analyse moléculaire et génotypique des *Rhizobia* étudiés est aussi nécessaire.

De même, il est important d'étudier d'autres modes d'action des PGPR avec l'évaluation de l'activité de certaines enzymes important dans l'amélioration de la croissance de la plante.

## Références

### A

- Adam, A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes Elicitation of induced systemic resistance in tomato and cucumber and activation of the lipoxygenase pathway by non-pathogenic *Rhizobacteria*. Thèse de doctorat en sciences. Université de Viège. P 23 - 28
- Ahemad, M et Kibret, M. (2013).** Mechanisms and applications of plant growth promoting *Rhizobacteria*: current perspective. Journal of King Saud University-Science 26(01): 1 - 20.
- Akhtar, M. S., & Siddiqui, Z. A. (2009). Use of plant growth-promoting rhizobacteria for the biocontrol of root-rot disease complex of chickpea. Australasian Plant Pathology, 38(1), 44-50.
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017).** Specificity in legume-rhizobia symbioses. International Journal of Molecular Sciences, 18(4): 705.
- Arora, N.K., Tewari, S., Singh, R. (2013).** Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. In: Arora NK (ed.)

### B

- Bashan, Y et de Bashan, L.E. (2002).** Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemothermal seed treatment. European Journal of Plant Pathology, 108(4): 821 - 829.
- Bashan, Y et Holguin, G. (1998).** Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biology and Biochemistry, 30(2): 1225 - 1228.
- Bashan, Y et Levanony, Y. (1991).** Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. Plant Soil. 137(21) : 99 - 103.

- 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.
- Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F. (1993).** Practical *Rhizobium*–Legume Technology Manual. Technical manual, No. 19, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria.
- Beringer, J.E. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 84(1): 188 - 198.
- Benachour, K., Louadik., Terzo, M. (2007).** Rôle des abeilles sauvages et domestiques dans la pollinisation de la fève (*Vicia faba* L.) en région de Constantine (Algérie). *J. Plant Physiol.* 152(1) : 213 - 219.
- Beraud. (2007).** Etude des effets écotoxiques et de l'induction des phytochélatines chez *Vicia faba* L. (*Fabaceae*) exposée au cadmium. Application de test Vicia – micronoyaux à des matrices. Thèse de doctorat. Université de Mets, p 107.
- Bottini, R., Cassan, F., Picolli, P. (2004).** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 : 497 -
- Boyeldieu, J. (1991).** La féverole. Chapitre VI in Produire des grains oléagineux et protéagineux edt Tec et Doc Lavosier. P185 - 198.
- Brink, M., & Belay, G. (2006).** Plant resources of tropical Africa 1: cereals and pulses. PROTA Foundation. Wageningen. Netherlands.
- Bumunang, E.W et Babalola, O.O. (2014).** Characterization of *Rhizobacteria* from field grown genetically modified GM and non-GM maizes. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57 : 1 - 8.

## C

- Cermola, M., Fedorova, E., Tate, R., Riccio, A., Favre, R., Patriarca, E.J. (2000).** Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium* et li-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 733 - 741.
- Chaitanya, K.J et Meenu, S. (2015).** Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR). Department of Microbiology, Government Science College. Vankal. Mangrol. Surat-394430. Gujarat University. Ahmed Abad. p32 - 36.

- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Lumyong, S. (2009).** Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11): 1919 - 1928.
- Charest, M.H., Beauchamp, C.J., Antoun, H. (2005).** Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 219 - 227.
- Chen, Y.P., Mei, R., Lu, S. (1996).** The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: *Management of Soil-Born Diseases* (Gupta V.K. and Utkhede R., eds). M/S Narosa. Kalayani Publisher. New Delhi. India. P 165 - 176.
- Cheriefi., & Amrane, F. (2016).** Effet du cuivre sur les paramètres physiologiques et morphologiques chez la fève (*Vicia faba* L).
- Crépon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Arese, P., Duc, G. (2010).** Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research*, 115: 329 - 339.
- Crété, P. (1965).** Précis de botanique. Systématique des angiospermes. Tome II. P 243.
- Cronk, Q., Ojeda, I., Pennington, R.T. (2006).** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Ed. Curr. Opin. Plant. Bio.*, 9: 99 - 103.
- Cherni, A. E. (2019).** Études écologiques et fonctionnelles de symbioses entre rhizobia et légumineuses (Doctoral dissertation, University of Geneva).

## D

- Daines, M.E.A. (2018).** Effet de l'uranium sur le comportement physiologique et chimique de la féverole (*Vicia faba* L. minor). Mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. P 40-46..
- Dajoz, R. (2000).** *Eléments d'écologie*. Ed. Bordas. Paris, 5ème édition. P 631.
- Dekak, A. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Thèse de magister. Université de Tébessa. P 06 - 18.

**Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier p 476.

**Domergue, O. (2006).** Diversité des *Rhizobia* associés à *Ononis* repens : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'école pratique des hautes études. P 78-91.

**Downie, J.A. (2005).** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. Curr Biol. P 15.

**Duhoux, E et Nicole, M. (2004).** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France. P1 - 20.

## **F**

**Fachman and Kraut. (1995)** « Composition des aliments d'après le répertoire général des aliments». Regal. Ed. Log Access. APRIFEL. 243

## **G**

**Gage, D.J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes» Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(2): 280 - 300.

**Gallais, A et Bannerol, H. (1992).** Amélioration des espèces cultivées : objectifs et critères de sélection. INRA édition. P 31 - 32.

**Glick, B.R. (2012).** Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications Hindawi Publishing Corporation, Scientifica vol 2012. Article ID963401. p 15.

**Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G et Penrose, D.M. (1995).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.

**Greiner, R et Larsson, A.M. (2001).** Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by phytate- degrading enzymes of cereals, J Food Biochem, 25: 229 - 248.

**Graham, P.H et Parker, C.A. (1964).** Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. Plant Soil, 20: 383 - 396.

**Gramma, B.S. (2008).** Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des *Rhizobiums* de quelques légumineuses. Mémoire de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri. Constantine. Algérie. P 93.

## H

**Haas, D et Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Natra. Rev. Microb.* P 1129.

**Henzell, E.F et Wallis, I. (1977).** Transfer of nitrogen between legumes and other crops. Ed. biological Nitrogén fixation in farming systems of the tropics. p 377.

**Hoft, M et Vos, P. (2006).** Plant pathogenic *Pseudomonas* species. Dans *Plant Association Bacteria PART 3*. Springer, Pays-Bas. P 507 - 533.

**Hrynkiewicz, K et Baum, C. (2012).** The potential of rhizosphere microorganisms to promote the plant growth in disturbed soils. In *Environmental protection strategies for sustainable developmen.* p 35-64. Springer, Dordrecht.

## I

**Ibekwe, A. M., Angle, J. S., Chaney, R. L., & Van Berkum, P. (1995).** Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. *Journal of Environmental Quality.* 24(6), 1199-1204.

## J

**Jay, S.S. (2003).** Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* Potential Microbes for Sustainable Agriculture. Department of Environment Microbiology School for Environmental Sciences. BB Ambedkar (Central) University.

**Journet, E.P. (2004).** Symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. [www.crdp-toulouse.fr](http://www.crdp-toulouse.fr).

**Jordan, D.C. (1984).** *Rhizobiaceae* In N.R. Krieg and J.G. Holt editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. 234 - 242.

**Judd, W.S., Campbell, C.S., Jules, B., Kellogg, E.A., Stevens, P. (2001).** Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.



**Jyoti, D.A., Manoj, K., Rajesh, K. (2003).** Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* (PGPR): An Alternative of Chemical Fertilizer for Sustainable, Environment Friendly Agriculture. Dept of Environmental Microbiology. School for Environmental Sciences, BBA (A Central) University, Lucknow, INDIA. P 205 - 226.

## K

**Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N., Lugtenberg, B. (2006).** Organic acids, sugars and L-tryptophane exudate of soil bacteria growing on stone wool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact*, 9: 250 - 256.

**Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P.A. (2009-a).** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Arch Agron Soil Sci*, 56: 73 - 98.

**Khan, M.S., Zaidi, A., Javed, M. (2009-b).** *Microbial Strategies for Crop Improvement.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

**Kim, J et Rees, D.C. (1994).** Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, 33(2): 389 - 97.

**Kirdi, B. (2011).** Rôle des PGPR « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites. Mémoire Magister en Sciences Agronomiques, Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach (Alger). p19 - 24.

**Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S.A. (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11): 1259 - 1266.

**Kloepper, J.W., Tuzun, S. Kuć, J.A. (1992).** Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 349 - 351.

**Kumar, P et Dubey, R.C. (2012).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of *Phaseolus vulgaris*. *J Curr sci*, 1: 6 - 38.

**Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Makarova, N.M., Tikhonovich, I.A. (2004).** The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of Rhizobacteria. *Microbiology*, 73: 156 - 158.

**M**

- Maatallah, J., Berraho, E., Sanjuan, J., Lluch, C. (2002).** Phenotypic characterization of Rhizobia isolated from *Chickpea* (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22: 321 - 329.
- Mezani, S. (2011).** Bioécologies de la fève *Bruchus rufimanus* boh. (coleoptera: bruchidae) dans les parcelles de variétés de fève différentes et de féverole dans la région de tizi-rached.
- Mikic, A. (2011).** Words denoting faba bean (*Vicia faba*) in European languages. *Ratar.povrt./field veg. crop Res.* 48. P 233 - 238.
- Mouafek, A. (2010).** La symbiose à *Rhizobia* chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra. Mémoire de magister. P 08.
- Munees, A et Mulugeta, K. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting Rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University–Science*, 26(1): 5.
- Munns, D.N. (1968).** Nodulation of medic ago sativa in solution culture: Iii. effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant and Soil*, 33 - 47.

**N**

- Nabors, M. (2008).** Biologie végétale structure, fonctionnement, écologie et biotechnologies. 3e ed. Pearson. Paris, France. P 614
- Nagórska, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007).** Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*. 54(3): 495.
- Nautiyal, C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett*, 170(2): 265 - 270.
- Nouri. (2012).** La réponse de la fève *Vici faba* L. au stress salin. Cas d'un sol sableux amendé en bentonite. Thèse de magister. Universités .Souk-Ahras. P 89.

**Nuessly, G.S., Hentz, M.G., Beiriger, R., Scully, B.T. (2004).** Insects associated with faba bean, *Vicia faba* (fabales: *Fabaceae*) in southern Florida. Florida entomologist. 87(2). P 204 - 211.

## O

**Olivier, C. (2003).** Compatibilité des bactéries phyto-bénéfiques *Azospirillum* et *Pseudomonas* dans la rhizosphère. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I. P 15 - 17.

## P

**Palleroni, N.J. (1984).** Family 1. *Pseudomonas*. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1. Biol. Technol, 33: 193 - 203.

**Parmar, P et Sindhu, S. (2019).** The novel and efficient method for isolating potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soil. Geomicrobiology journal, 36(2): 130 - 136.

**Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M. (2004).** Organogenesis of legume root nodules. Int. Rev. Cytol, 234: 201 - 62.

**Perry, J.J., Stalex, J.T., Lory, S. (2004).** Microbiologie cours et questions de revision. Edition Dunod. Paris. France.

**Plassard, C., Robin, A., Le Cadre, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L., Hinsinger, P. (2015).** Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol.

**Prescott, M.K., Kashikawa, N., Dey, A., Matsuda, Y. (2008).** The over dense environment of a large Ly $\alpha$  nebula at  $z \approx 2.7$ . The Astrophysical Journal Letters. 678, L77.

**Probanza, A et Lucas, G. (2002).** Pinus pineal seedling growth and bacterial *Pseudomonas*. Nat Rev Microbiol. P 307 - 319.

## R

**Rasanen, L. (2002).** Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between *Rhizobia* and the woody legumes *Acacia*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan Oldroyd. P 220.

**Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G., Paull, R.E. (2004).** Microbial antagonists control. Postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 33: 193 - 203.

**Roskopf, E. N., Chellemi, D. O., Kokalis-Burelle, N., & Church, G. T. (2005).** Alternatives to methyl bromide: A Florida perspective. *Plant health progress*, 6(1): 19.

## S

**Sahgal, M et Johri, B.N. (2006).** Taxonomy of *Rhizobia*: current status. *Current science*, 90: P 488.

**Selami, Nawel. (2017).** « Associations symbiotiques ». Polycopie. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf. P 02 - 05.

**Shilev, S. (2013).** Soil *Rhizobacteria* Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. Chapitre 5. *Plant microbe symbiosis fundamentals and advance* naveen. kumararora editor.

**Sjodin, J. (1971).** Induced morphological variation in *Vicia faba* L. *Hereditas*.11. P 67.

**Somasegaran, P et Hoben, H.J. (1994).** Handbook for *Rhizobia*. Springer-Verlag. Berlin.

**Stowers, M.D. (1985).** Carbon metabolism in *Rhizobium* species .*Ann. Rev Microbial*, 39: 89 - 108.

## V

**Vincent, J.M. (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.

## W

**Wang, H.F., Zong, X.X., Guan, J.P., Yang, T., Sun, X.L., Ma, Y., Redden, R. (2012).** Genetic diversity and relationship of global *Faba* bean (*Vicia faba* L.) germplasm revealed by ISSR markers. *Theor Appl Genet*, 124: 789 - 797.

## Z

**Zahran, H.H. (1991).** Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1): 73 - 80.

**Zennouhi, O., El Mderssa, M., Ibjibijen, J., & Nassiri, L. (2018).** Caractérisation génotypique de bactéries solubilisant le phosphate isolé de nodules racinaires d'*Adenocarpus boudyi* (Maire). endémique du Moyen Atlas central marocain. *Journal of Applied Biosciences*. 126, 12630-12637.

## *Annexes*

### Composition des milieux de cultures et réactifs utilisés

#### 1. Milieu YMA(Yeast Mannitol Agar)(1L)

Mannitol	10g
Extrait de levure	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2g
NaCl	0,1g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

-Le pH est ajusté à 7

-Stérilisé à 120°C pendant 20 min.

#### 1.1 Composition de milieu YMA+ Rouge Congo en g/l

YMA	1000 ml
Solution stock de Rouge Congo	10 ml

-Le pH est ajusté à 7

-Stérilisé à 120°C pendant 20 min.

#### 2. Milieu NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate)(1L)

Glucose	10 g
Mgcl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Kcl	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) SO <sub>4</sub>	1 g

Phytate	5 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
Agar	15 g

-Le pH est ajusté à 7

-Stérilisé à 120°C pendant 20 min.

### 3. Milieu LB (1 L)

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Nacl	5 g

-Rajouter 0,5 g de Tryptophane

-Le pH est ajusté à 7

-Stérilisé à 120°C pendant 20 min

### 4. Réactifs de Salkowski

Solution de 50 ml (Il faut préparer plus environ 150 ml)

Eau distillée	27.8 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22.2 ml
FeCl <sub>3</sub>	0.6 g

### 5. Solution d'auxine

Solution mère d'auxine

Eau distillée	50 ml
Auxine	0.01g

**6. Milieu NFB + KNO<sub>3</sub> (1L)**

Eau distillée	1000 ml
Acide malique	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,96 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,64 g
MgSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,026 g
Na <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,02 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,007 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
NaCl	0,1 g
Fe EDTA	0,065 g

-PH = 6,8

-Stérilisé à 120°C pendant 20 min.

**7- Solution de dosage de nitrite**

**7-1 Solution A (100ml)**

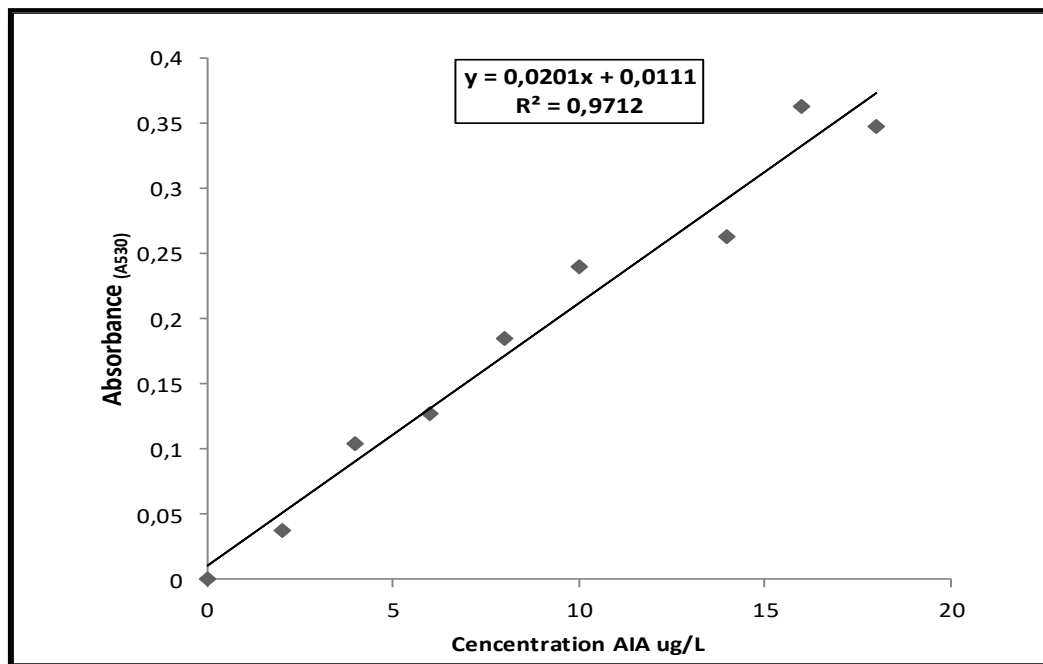
N-(1Naphthyle) ethylène diamine	0,02 g
Solution Hcl	12,5 ml
Eau distillée	87,5 ml

**7-2 Solution B (100ml)**

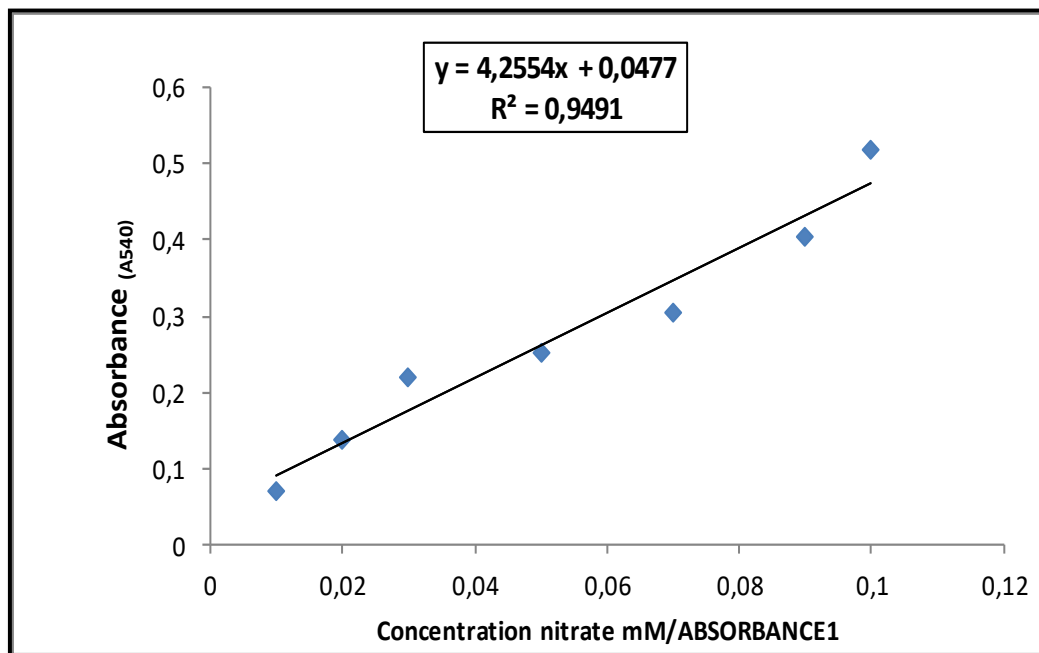
Acide sulfanique	1g
Solution Hcl	12,5 ml
Eau distillée	87,5 ml



### 8- Courbe d'étalonnage auxine



### 9- Courbe d'étalonnage nitrate



**Intitulé : Isolement et caractérisation des *Rhizobia* nodulant la fève (*Vicia faba*) dans trois régions de Constantine et étude de leurs mécanismes d'action en tant que PGPR.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Génomique Végétale

**Résumé :**

Dans cette étude, les bactéries ont été isolées à partir des nodosités racinaires de la fève (*Vicia faba* L.) cultivée dans trois régions du nord de Constantine (Hamma Bouziane, Didouche Mourad et Beni H'midene). Notre travail pratique débute par une mesure de poids frais et sec des plantes, suivi d'une caractérisation de cinquante-quatre isolats, le travail débute par une étude morphologique sur milieu YMA + Rouge de Congo (RC) et un test de coloration de Gram. Puis une caractérisation des différents isolats a été réalisée, qui regroupe certains tests biochimiques sur la recherche de la catalase et de l'oxydase, la capacité des isolats à assimiler les sucres comme source de carbone, la résistance aux antibiotiques et la capacité des isolats à solubiliser le phytate. À partir des cinquante-quatre isolats de départ, quarante-deux isolats sont sélectionnés, pour faire l'objet de la caractérisation de deux modes d'action des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), qui sont: la production de l'Acide Indole Acétiques et l'activité Nitrate Réductase. Cette étude a montré que la majorité des isolats testés sont des bactéries à Gram négative. L'étude des enzymes respiratoire indique la présence de la Catalase pour la majorité des isolats, par contres, elles ne possèdent pas l'enzyme respiratoire Cytochrome Oxydase, les différents isolats présentent une variabilité dans l'assimilation des différents sucres. De même, la plupart des isolats ont montré leur sensibilité aux antibiotiques utilisés surtout la Gentamicine. De plus, ils ont la capacité de pousser sur milieu NBRIP en solubilisant le phytate. Les résultats obtenus correspondent avec les caractéristiques taxonomiques des *Rhizobia*. Ces mêmes isolats ont montré leur capacité à produire l'auxine et à dégrader le nitrate.

**Mots clés :** Fève (*Vicia faba* L.), Nodosités, *Rhizobia*, PGPR.

**Laboratoire de recherche :** Biochimie, Génétique et Biotechnologies Végétales

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Dr. MAOUGAL R. T (M.C.B – INATAA UFM Constantine).

**Encadrant :** Dr. KECHID M (M.C.B – INATAA UFM Constantine).

**Examineur :** Dr. TEMAGOULT M. (M.A.A – SNV UFM Constantine)

**Date de soutenance :** 17/07/2019