

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**Université Saad Dahlab BLIDA1**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**Laboratoire de recherche : Biotechnologies, Environnement et Santé**

**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Option : Microbiologie**

**Thème**

**Isolement et sélection de *Pseudomonas* spp. fluorescents performante  
résistante aux stress biotique et abiotique.**

**Soutenu le : 09/07/2019**

**Présenté par :**

**M<sup>lle</sup>. BOULARAS Hasna. M<sup>lle</sup>. SELMANE Djamila.**

**Devant le jury :**

<b>M<sup>me</sup> TOBAL S.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> AIT SAADI N.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>me</sup> MATMORAA.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> M<sup>ed</sup> Mahmoud F.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB</b>	<b>Invité</b>

**Année universitaire :**

**2018-2019**

## **Remerciements**

*Avant tous nous remercions **Dieu** pour tout puissant de nous avoir guidés toutes ces années d'étude car il nous a donné la volonté, la patience, la santé et le courage pour terminer ce travail.*

*Tout d'abord, nous remercions chaleureusement notre promotrice **Mme AIT SAADI.N**, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour, pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, de nous avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants, ainsi que ses suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, pour tous ses conseils et ses encouragements, pour la disponibilité aux moments les plus difficiles, sa sympathie, sa simplicité et sa patience et ces remarques pertinentes et éclairées. Soyez rassuré de notre profonde gratitude et notre respectueuse considération vos qualités scientifiques et humaines resteront à jamais pour nous l'exemple.*

*Nos vifs remerciements vont pour les membres du jury.*

*A **Mme TOBAL.S** de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ce travail.*

*A **Mme MATMORA.A**d'avoir accepté de participer d'examiner ce travail et de l'enrichir par ses propositions.*

*Nous leur témoignons toute notre gratitude.*

*Nous tient également à remercier **Mme MOUHAMED MAHMOUD**, un grand merci pour son aide scientifique et ces orientations qui nous ont permis de progresser dans la réalisation de cette étude, merci pour ses encouragements et son amitié.*

*Nous remercions tout le personnel du laboratoire particulièrement **Mme DAHNANE Hania** ingénieur du laboratoire Biologie et Physiologie Cellulaire, pour leur accueil, leur aide et leur accompagnement durant toute la durée de travail de laboratoire*

*Nous remercions infiniment et sans exceptions les ingénieurs des laboratoires de département d'agronomie et de biologie, particulièrement **Mme Djamila, Mme Karima, Mme Naziha** et **Mme Salma** pour leurs aides et leurs conseils.*

*Enfin, Nous n'oublions pas aussi d'exprimer nos remerciements à tous nos amis, nos collègues et à tous les personnes qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



## *Dédicace*

*Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :*

*A mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège*

*À ma sœur Naima et son mari Ibrahim, je vous souhaite tout le bonheur.  
À ma sœur Manel et son fiancé Sid Ahmed, je vous souhaite une longue vie pleine de joie et de bonheur.*

*À mes très chères sœurs : Amina, Nora, Meriem, Hanane, Ikram, Salima qui m'ont toujours encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*À ma princesse ma petite sœur Lina.*

*À mon grand-père et ma grande-mère que dieu les garde.*

*À toutes mes oncles et tantes.*

*À mes cousins et mes cousines et toute la famille Selmane.*

*Je dédie particulièrement à Hasna ma chère sœur et binôme avec qui j'ai partagé des moments inoubliables et à toute sa famille.*

*Et à tous mes amis Sabrina, Rima, Fadila, Soumia, Nawel, Zineb et Kholoud, pour avoir rendu mon quotidien récréatif et passionnant et pour les bons moments passer ensemble.*

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation ce projet.*

*À toutes la promotion de microbiologie 2018/2019.*

*Djamila*



## *Dédicace*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie.*

*Je dédie ce modeste travail*

*À mes très chers parents*

*Pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.*

*Veillez trouver dans ce manuscrit le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices, que dieu vous protège et garde en bon santé.*

*À mes très chers frères : Abdelslem, Ayoub et Abdelghani pour leur appui et leur encouragement.*

*À ma petite sœurma princesse Rouba.*

*À mon cher fiancéTakjeddinequi m'a soutenue tout au long de ce projet.*

*Àmes grand- père et mes grande- mère que dieu les garde.*

*À toutes mes oncles et tantes.*

*À toute mes cousins et mes cousines.*

*À toute la famille Boularas, Ghemati et Kerkar.*

*À ma chère binôme et sœur Djamila et à toutes sa famille, avec qui j'ai partagé les meilleures moments, qui m'a beaucoup aidé, à qui je dis bon courage et bon continuation.*

*À mes très chères amies Sabrina, Rima, Fadila, Meriem, Nesrine, Hadjer, Manel, Zinebe et Kholoude en souvenir de très bon moment passé ensemble.*

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour ce projet soit possible.*

*À tous mes enseignants et toutes la promotion de Master 2 microbiologie 2018/2019.*

*Hasna*



## ملخص

يهدف عملنا إلى عزل واختيار سلالات *Pseudomonas spp. fluorescents* المنتجة لبعض المركبات الثانوية في المختبر التي تشارك في عمليات مكافحة الحيوية، التخصيب الحيوي وتحفيز النبات (AIA)، انزيم الفوسفاتاز والإنزيمات المحللة لجدران الخلايا) وكذلك مقاومتها للإجهاد اللاأحيائي. تم عزل 28 سلالة من *Pseudomonas spp. fluorescents* من تربة الطماطم. اختيار هذه السلالات من خلال المساهمة في أنشطتها العدائية تجاه ثلاث عزلات من *Fusarium oxysporum (lycopersici, albedinis, lini)* سمحت لنا بالحصول على 22 سلالة بنشاط معادي قوي. تم الحصول على أفضل النتائج في الوسط KB مع معدلات تثبيط للنمو mycelial بين 37.71 و 81.86 % مقابل ثلاثة عزلات مرضية للنبات. استند تحديد 22 سلالة مختارة نظريا على الجانب المورفولوجي والثقافي بما في ذلك الفلوريسين الأصفر المخضر، وكذلك الاختبارات الكيميائية الحيوية سمحت لنا بالانضمام إلى مجموعة *Pseudomonas spp. fluorescents*. كشفت نتائج إنتاج المركبات الثانوية في المختبر أن 100 % من السلالات لديها القدرة على إنتاج AIA، 86.36 % ينتجون الفوسفاتيز والإنزيمات المحللة للبروتين، 72.72 % قادرون على إنتاج HCN، 77.27 % تنتج الإنزيمات الأميلازية، من ناحية أخرى، لاحظنا الغياب التام لإنتاج السليلاز والليباز. كشفت اختبارات مقاومة الإجهاد اللاأحيائي أن جميع سلالاتنا مقاومة (100%) لتركيزات من 0 إلى 7% كلوريد الصوديوم، في حين أن 50% من السلالات قاومت تركيزات بنسبة 8%. تظهر نتائج مقاومة الإجهاد الحراري أن جميع السلالات كانت قادرة على استئناف النمو الطبيعي عند 26 درجة مئوية بعد ارتفاع درجة الحرارة من 41 درجة مئوية. تظهر نتائج الإجهاد المائي أن جميع سلالات *Pseudomonas spp. fluorescents* تتحمل الإجهاد المائي بتركيزات مختلفة من 100.PEG % من السلالات مقاومة لتركيزات 20 و 50 ميكروغرام / مل من المضادات الحيوية الثلاثة التي تماختبارها. عند تركيز 100 ميكروغرام / مل، كانت السلالات أكثر مقاومة للستربتومييسين مقارنة بحامض الناليديكسيك (72.72%) والكلورامفينيكول (86.36%)

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas spp. fluorescents*، مكافحة الحيوية، الأسمدة الحيوية، الضغط الأحيائي

واللاأحيائي، *Fusarium oxysporum*

## Résumé

Notre travail a pour but d'isoler et sélectionner des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents productrices de quelques métabolites secondaires *in vitro* impliquées dans les processus de biocontrôle, biofertilisants et de phytostimulation (AIA, phosphatase, les enzymes dégradent les parois cellulaires), ainsi que leurs résistances au stress abiotique. 28 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été isolé à partir de la rhizosphère de la tomate. La sélection de ces souches par rapport à leurs activités antagonistes vis-à-vis de trois isolats de *Fusarium oxysporum* (*lycopersici*, *liniet albedinis*). Nous a permis d'obtenir 22 souches à fort pouvoir antagoniste. Les meilleurs résultats sont été obtenus sur le milieu King B avec des taux d'inhibition de la croissance mycélienne entre 37.71 et 81.86 % vis-à-vis de trois isolats phytopathogènes. L'identification des 22 souches sélectionnées a été basée phénotypiquement sur l'aspect morphologique et culturale notamment la fluorescens jaune –verdâtre, ainsi que des tests biochimiques ; ce qui nous a permis d'affilier nos souches au groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les résultats de production des métabolites secondaires *in vitro* ont révélé que 100% des souches ont le pouvoir de produire l'acide –indole-acétique (AIA), 86.36% produisent les phosphatases et les enzymes protéolytiques, 72.72% sont aptes à synthétiser l'HCN, 77.27% produisent les enzymes amylolytiques, par contre nous avons marqué une absence totale de production de cellulase et lipase. Les tests de la résistance au stress abiotique nous a permis de constater que la totalité de nos souches sont (100%) sont résistantes aux concentrations de 0 à 7% de Na Cl, alors que 50% des souches ont toléré des concentrations de 8%. Les résultats de la résistance au stress thermique montrent que toutes les souches ont pu reprendre une croissance normale à 26°C après un passage à la température de 41°C. Les résultats de stress hydrique montrent que toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont tolérantes au stress hydrique à différents concentrations de PEG. 100% des souches sont résistantes aux concentrations de 20 et 50 µg/ml des trois antibiotiques testés. A la concentration de 100 µg/ml, les souches se sont avérées plus résistantes à la streptomycine par rapport à l'acide nalidixique (72.72%) et chloramphénicol (86.36%).

**Mots clés :** *Pseudomonas* spp. fluorescents, biocontrôle, biofertilisants, stress biotique et abiotique, *Fusarium oxysporum*.

## Abstract

Our work aims to isolate and select strains of *Pseudomonas* spp. fluorescents producing some secondary metabolites *in vitro* involved in biocontrol, biofertilizing and phytostimulation processes (AIA, phosphatase, enzymes degrade cell walls), as well as their resistance to abiotic stress. 28 strains of *Pseudomonas* spp. fluorescents were isolated from the rhizosphere of tomato. The selection of these strains by contribution to their antagonistic activities against three isolates of *Fusarium oxysporum* (*lycopersici*, *liniandalbedinis*). We have obtained 22 strains with strong antagonistic power. The best results were obtained on King B medium with inhibition rates of mycelial growth between 37.71 and 81.86% against 3 phytopathogenic isolates. The identification of the 22 selected strains was based phenotypically on the morphological and cultural aspect including the yellow-green fluorescens, as well as biochemical tests allowed us to affiliate to the group of *Pseudomonas*. The results of production of the secondary metabolites *in vitro* revealed that 100% of the strains have the power to produce the acid -indole-acetic acid (AIA), 86.36% produce the phosphatases and the proteolytic enzymes, 72.72% are able to synthesize the HCN, 77.27% produce the amylolytic enzymes, on the other hand we have marked a total absence of production of cellulase and lipase. The abiotic stress resistance tests revealed that all of our strains are (100%) resistant to concentrations of 0 to 7% NaCl, whereas 50% of the strains tolerated concentrations of 8%. The results of heat stress resistance show that all strains were able to resume normal growth at 26 ° C after a temperature rise of 41 ° C. The results of water stress show that all strains of *Pseudomonas* spp. fluorescents are tolerant to water stress at different concentrations of PEG. 100% of the strains are resistant to concentrations of 20 and 50 µg / ml of the three antibiotics tested. At the concentration of 100 µg / ml, the strains were more resistant to streptomycin compared to nalidixic acid (72.72%) and chloramphenicol (86.36%).

**Key words:** *Pseudomonas* spp. fluorescents, biocontrol, biofertilizers, biotic and abiotic stress, *Fusarium oxysporum*.

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage.

**°C** : Celsius.

**µg** : Microgramme.

**ACC** : Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase.

**ADH** : Arginine dihydrolase.

**AIA** : Acide Indole Acétique.

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal.

**ATB** : Antibiotique.

**BN** : Bouillon Nutritive.

**Cl<sup>-</sup>** : Ion de chlore.

**CWDE**: Cell wall degrading enzymes.

**D.O**:Densitéoptique.

***F.o.a(G1)***:*Fusarium oxysporum f.sp. albedinis.*

***F.o.l (G2)***:*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici.*

***F.o.ln(F2)***:*Fusarium oxysporum f. sp. lini.*

**f.sp** : Forme Spécial.

**Fig** : Figure.

**GN** : Gélose nutritive.

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

**HCN** : Cyanure d'hydrogène.

**I%** : Pourcentage d'inhibition.

**ISR** : Résistance Systématique Induite.

**KB** : King B.

**LBT** :LuriaBertani enrichi du tryptophane.

**Na<sup>+</sup>** : Ion de sodium.

**NaCl** : Chlorure de sodium.

**Pb**:Plomb.

**PDA**: Potato Dextrose Agar.

**PEG**:Polyéthylène Glycol.

**PGPR**: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

**pH** : Potentiel Hydrogène.

**PVK** :Pikovskaya.

***R. solani***: *Rhizoctoniasolani*.

**Tab** : Tableau.

**TSA** :Tryptone Soya Agar.

**UV** : Ultra-violet.

**Zn** : Zinc.

**μl** : Microlitre.

## Liste des figures

<b>Figure01</b> :Schémade la rhizosphère.....	03
<b>Figure02</b> :Les mécanismes d'action des PGPR.....	07
<b>Figure03</b> :Les principaux mécanismes d'actiondes PGPR sur la croissance des plantes.....	11
<b>Figure04</b> : Représentation schématique des métabolites secondaires produits par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans la rhizosphère.....	14
<b>Figure 5</b> :(A) Zone d'échantillonnage ( <b>photo originale</b> ), (B) : Localisation géographique de la zone de prélèvement ( <b>Google Earth</b> ).....	21
<b>Figure 06</b> : Préparation des dilutions décimales.....	22
<b>Figure 07</b> : Ensemencement de dilution par étalement.....	23
<b>Figure 08</b> : Conservation des souches dans des tubes inclinés.....	23
<b>Figure 09</b> : Purification des souches de <i>Fusarium oxysporum</i> sur milieu PDA.....	24
<b>Figure 10</b> : Réalisation de test préliminaire. (A) : Préparation des boites. (B) : Ensemencement des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sous forme de spots.....	25
<b>Figure 11</b> :(A) : Prélèvement d'un disque fongique. (B) : Transplantation d'un disque fongique au centre de boite Pétri contient quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents.....	25
<b>Figure 12</b> : Ensemencement des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sous forme de deux stries parallèles.....	26
<b>Figure 13</b> : Transplantation d'un disque fongique au centre de boite de Pétri contient la souche de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents.....	26
<b>Figure 14</b> : Clé dichotomique d'identification des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	28
<b>Figure 15</b> : Ensemencement de culture bactérienne sur le milieu ADH.....	29
<b>Figure 16</b> : Ensemencement de culture bactérienne par pique centrale sur milieu gélatine.....	30
<b>Figure 17</b> : Ensemencement des souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents en spot sur milieu PKV.....	32
<b>Figure 18</b> : Ensemencement de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent sur une gélose additionnée d'amidon.....	33
<b>Figure 19</b> : Réalisation du test de production d'H <sub>2</sub> CN. (A) : Papier Whatman imbibé dans une solution de picrate de sodium. (B) : Dépôt de disque de papier Whatman au fond du couvercle de la boite.....	34
<b>Figure 20</b> : Ensemencement de la suspension bactérienne sur milieu Ayers.....	35

<b>Figure 21</b> :Test de stress thermique. (A) : Préparation de suspension bactérienne. (B) : Mesure de la densité optique.....	35
<b>Figure 22</b> : Test de la résistance aux antibiotiques. (A): Ensemencement MH liquide avec la culture bactérienne. (B) : Préparation des solutions d'antibiotiques.....	37
<b>Figure 23</b> : Ensemencement de BE sur gélose MH.....	37
<b>Figure 24</b> : Aspect des colonies sur milieu KB après 24h d'incubation.....	38
<b>Figure 25</b> : Résultats de purification sur milieu KB.....	38
<b>Figure 26</b> : Activité antagoniste de quelques souches de <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis de trois formes spéciale de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	39
<b>Figure 27</b> : Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Foa (G1) sur milieu PDA.....	40
<b>Figure 28</b> : Activité antagoniste des souches p2 et p14 vis-à-vis de Foa(G1) sur le milieu PDA.....	40
<b>Figure 29</b> : Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Fol (G2) sur milieu PDA.....	41
<b>Figure 30</b> : Activité antagoniste des souches p4 et p17 vis-à-vis de Fol (G2) sur le milieuPDA.....	41
<b>Figure 31</b> : Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Foln (F2) sur milieu PDA.....	42
<b>Figure 32</b> : Activité antagoniste des souches p2 et p5 vis-à-vis de Foln (F2) sur milieu PDA.....	42
<b>Figure 33</b> : Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Foa (G1) sur milieu KB.....	43
<b>Figure 34</b> : Activité antagoniste des souches p18 et p25 vis-à-vis de Foa (G1) sur le milieu KB.....	43
<b>Figure 35</b> : Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Fol (G2) sur milieu KB.....	44
<b>Figure 36</b> : Activité antagoniste des souches p4 et p17 vis-à-vis de Fol (G2) sur milieu KB.....	44
<b>Figure 37</b> : Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Foln (F2) sur milieu KB.....	45
<b>Figure 38</b> : Activité antagoniste des souches p2 et p13 vis-à-vis de Foln (F2) sur milieu KB.....	45
<b>Figure 39</b> : Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Foa (G1) sur milieu mixte.....	46

<b>Figure 40 :</b> Activité antagoniste des souches p18 et p25 vis-à-vis de Foa (G1) sur milieu mixte.....	46
<b>Figure 41 :</b> Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Fol (G2) sur milieu mixte.....	47
<b>Figure 42 :</b> Activité antagoniste des souches p9 et p19 vis-à-vis de Fol (G2) sur milieu Mixte.....	47
<b>Figure 43 :</b> Le taux d'activité antagoniste de 22 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents vis-à-vis de Foln (F2) sur milieu mixte.....	48
<b>Figure 44 :</b> Activité antagoniste des souches p15 et p18 vis-à-vis de Foln (F2) sur milieu mixte.....	48
<b>Figure 45 :</b> Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent sur gélose King B, isolé à partir du sol rhizosphérique.....	50
<b>Figure 46 :</b> Aspect microscopique de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents (X100).....	50
<b>Figure 47 :</b> Résultats du test de l'oxydase.....	51
<b>Figure 48 :</b> Résultats du test d'ADH.....	51
<b>Figure 49:</b> Résultats de test de gélatine .....	52
<b>Figure 50 :</b> Résultats de levane sucrase.....	52
<b>Figure 51 :</b> Résultats de dénitrification.....	52
<b>Figure 52 :</b> Production de l'acide –indole-acétique par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	54
<b>Figure 53 :</b> Production d'autres types d'acide –indole-acétique par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	54
<b>Figure 54 :</b> Production de phosphatase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents...55	55
<b>Figure 55 :</b> Production des enzymes protéolytiques par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	56
<b>Figure 56 :</b> Production des enzymes amylolytique par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	56
<b>Figure 57 :</b> Production d' HCN par les souches P5 et P6 de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	57
<b>Figure 58:</b> Résultats de stress salin aux concentrations 0%, 1% et 2%.....	57
<b>Figure 59:</b> Résultats de stress salin sur la croissance des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents aux concentrations de 3% à 8%.....	58
<b>Figure 60 :</b> Effet du stress thermique sur la croissance bactérienne.....	59
<b>Figure 61 :</b> Effet du stress hydrique sur les populations bactériennes.....	60

**Figure 62** : Effet de l'acide nalidixique sur les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents...61

**Figure 63** : Effet de la streptomycine sur les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.....61

**Figure 64** : Effet du chloramphénicol sur les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents....61



## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Classification des Pseudomonaceae .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau II:</b> Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau III :</b> Les résultats de production de protéase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	Annexe 04
<b>Tableau IV :</b> Utilisation des disques d'antibiotiques pour la préparation des solutions et des concentrations à réaliser. (A) : Acide nalidixique et chlortamphénicol, (B) : Streptomycine.....	Annexe 04
<b>Tableau V :</b> Spectres de réponses aux tests d'identification spécifique selon la clé dichotomique proposée par <b>Bossis(1995)</b> .....	49
<b>Tableau VI :</b> Nombre et taux des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents productrices de métabolites secondaires.....	53
<b>Tableau VII :</b> Production qualitative d'Acide Indole Acétique (AIA).....	54
<b>Tableau VIII :</b> L'indice de solubilisation de phosphatase par des souches de <i>Pseudomonas</i> .....	55
<b>Tableau IX :</b> Résultats de la croissance bactériennes à différentes concentrations de Na Cl .....	Annexe04
<b>Tableau X :</b> Densité optique du stress thermique.....	Annexe 04
<b>Tableau XI :</b> Densité optique du stress hydrique.....	Annexe 04
<b>Tableau XII :</b> Fréquences * (%) des souches résistantes aux antibiotique.....	60
<b>Tableau XIII :</b> Résultats des effets des antibiotiques sur les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	Annexe04



# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviation

Résumé

Abstract

ملخص

Sommaire

Introduction ..... 1

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

**I.1. La rhizosphère** ..... 3

I.1.1. Effet rhizosphère ..... 5

I.1.1.1. Conséquences de l'effet rhizosphère sur les microorganismes ..... 5

I.1.1.2. Conséquences de l'effet rhizosphère sur les plantes ..... 5

I.1.2. Les rhizobactéries ..... 5

I.1.3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes: Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ..... 6

**I.2. *Pseudomonas* spp. fluorescents** ..... 7

I.2.1. Taxonomie ..... 7

I.2.2. Généralité ..... 9

I.2.3. Caractérisation phénotypique ..... 10

I.2.4. Caractérisation génotypique ..... 10

**I.3. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes** ..... 11

I.3.1. Effet direct ..... 11

I.3.2. Effet indirect ..... 15

**I.4. Effet de stress abiotique et biotique sur l'efficacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents** ..... 17

I.4.1. Notion de stress ..... 17

I.4.1.1. Stress abiotique ..... 17

I.4.2. <i>Pseudomonas</i> spp. face aux stress abiotiques .....	18
I.4.2.1. Effet de la salinité sur la croissance bactérienne.....	18
I.4.2.2. Effets du stress hydrique.....	19
I.4.2.3. Effets de la température.....	20
I.4.2.4. Effets du pH.....	20

## **Chapitre II : Matériel et Méthode**

<b>II.1. Matériel</b> .....	21
II.1.1. Matériel non biologique.....	21
II.1.1 Matériel biologique.....	21
<b>II.2. Méthode</b> .....	22
<b>II.2.1. Isolement des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents à partir du sol</b> .....	22
<b>II.2.2. Test d'activité antagoniste <i>in vitro</i> des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents</b> .....	23
<b>II.2.3. Identification des souches antagonistes</b> .....	27
<b>II.2.4. Production des métabolites secondaires impliqués dans la phytostimulation et la lutte biologique</b> .....	31
II.2.4.1. Production de l'acide indole acétique (AIA) .....	31
II.2.4.2 Production d'enzymes .....	31
II.2.4.3. Synthèse des antibiotiques.....	33
<b>II.2.5. Résistance des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents performante au stress abiotique</b> .....	34
II.2.5.1. Stress salin.....	34
II.2.5.2. Stress thermique.....	34
II.2.5.3. Stress hydrique.....	35
II.2.5.4. Résistance aux antibiotiques.....	36

## **Chapitre III : Résultats et discussions**

<b>III.1. Résultats</b> .....	38
<b>III.2. Discussion</b> .....	62
<b>Conclusion</b> .....	71

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

## Introduction

---

Le sol est un réservoir important de microorganisme, il renferme une microflore complexe et variée qui joue des rôles essentiels pour l'écosystème tellurique et les organismes pluri cellulaires qui y vivent. Parmi les organismes supérieurs du sol, les plantes bénéficient des effets directs et/ou indirects des microorganismes en particulier ceux de la flore rhizosphérique. Une flore bactérienne rhizosphérique hétérogène influence favorablement la croissance des plantes, et connue sous l'acronyme PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria, ou rhizobactéries stimulatrice de la croissance des plantes (**Munees et Mulugeta, 2014**).

Les rhizobactéries du groupe PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ont été utilisées pour lutter contre les maladies d'origine telluriques. Plusieurs études ont montré la capacité des PGPR d'améliorer la croissance des plantes et d'intervenir dans le biocontrôle des agents phytopathogènes telluriques (**Lemanceau, 1992**). Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été rapportés à la fois comme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéria) et comme souches de biocontrôle (**De Salmone et al., 2001**).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs phytopathogènes (**Haas et Défago, 2005**). Elles exercent leur activité antagoniste au moyen de différents mécanismes incluant l'antibiose. (**Haas et Défago, 2005**).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent un intérêt scientifique majeur, ils se caractérisent par une diversité génétique et phénotypique en relation avec leur impact positif sur le fonctionnement de la rhizosphère, en exerçant des actions directes et/ou indirectes sur le développement de la plante ; de plus ils représentent un modèle d'étude pour la compréhension des interactions avec les microorganismes d'une part (*Pseudomonas* – champignons et bactéries pathogènes), et avec la plante (eucaryote- procaryote) d'autre part (**Van Lonn et Glick, 2004**). En plus, ces rhizobactéries sont caractérisées par un arsenal métabolique, s'exprimant par la synthèse de divers métabolites secondaires impliqués dans les aspects trophiques, nutritionnels et de compétition avec les autres microorganismes (**Lemanceau, 1992 ; Weller, 2007 ; Van Lonn, 2007 ; Loper et al., 2011 ; Figueroa- Lopez et al., 2016**).

Les PGPR utilisées comme biofertilisant et/ou antagoniste contre les phytopathogènes constituent une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides. Toutefois, la capacité de ces bactéries de coloniser les racines et de survivre dans le sol est souvent limitée (**Normander et Prosser, 2000**). La sélection et l'utilisation des PGPR devrait tenir compte de

## Introduction

---

l'adaptation de l'inoculant à une plante et à un écosystème particulier. L'élaboration de mesures efficaces pour les inoculants microbiens demeure un défi scientifique majeur **(Richardson, 2001)**. En outre, la sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale. **(Cattelanet *al.*, 1999)**. Ces propriétés sont le plus souvent la production d'auxines, la fixation d'azote, l'antagonisme phytopathogène, la cyanogénèse (HCN), la solubilisation du phosphate, la production des sidérophores et l'activité ACC désaminase **(Cattelanet *al.*,1999)**.

Plusieurs paramètres biotiques et abiotiques interviennent pour modéliser la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère tant en termes de diversité que d'effectifs **(Marschner et *al.*, 2001)**. Plusieurs études, ont permis d'identifier certains facteurs présentant une influence marquée sur la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère (Température, salinité, humidité et antibiotiques).

Les objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont :

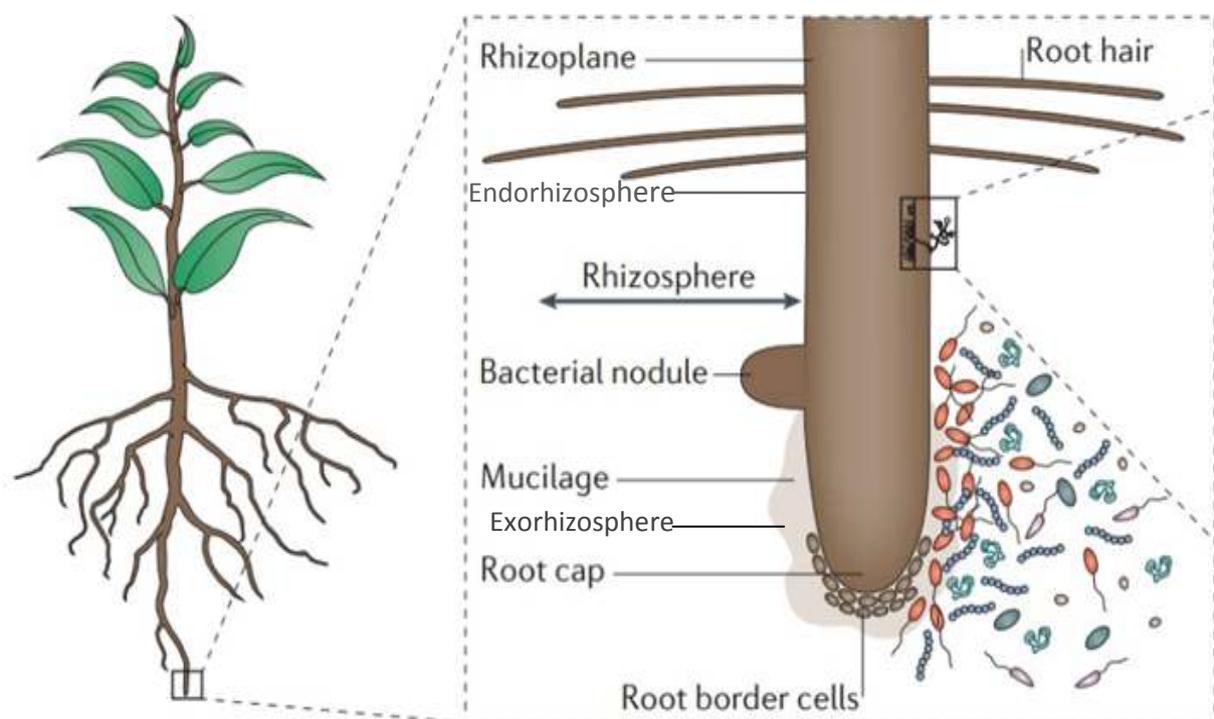
- I. Isolement des *Pseudomonasspp.* fluorescents à partir de la rhizosphère de la tomate.
- II. Sélection des souches de *Pseudomonasspp.* fluorescents à fort pouvoir antagoniste vis-à-vis de trois formes spéciales de *F. oxysporum* (*lycopersici*, *liniet albedinis*).
- III. Identification des souches de *Pseudomonasspp.* fluorescents antagonistes sélectionnées.
- IV. Etude de l'efficacité des souches de *Pseudomonasspp.* fluorescentssélectionnées par :
  - Mise en évidence de la production de quelques métabolites secondaires impliqués dans le biocontrôle, biofertilisants et phytostimulation.
  - Mise en évidence de la résistance des souches de *Pseudomonasspp.* fluorescentssélectionnées aux facteurs abiotiques (Salinité, stress thermique et hydrique et les antibiotiques).



## I.1 La rhizosphère

La rhizosphère est la région de sol étroite adjacente au système racinaire de la plante. C'est une zone très complexe et riche en nutriments, fortement peuplée par un grand nombre de microorganismes comprenant des bactéries, des champignons, invertébrés, nématodes et protistes (Venturi et Keel., 2016)

La rhizosphère peut contenir jusqu'à  $10^{11}$  cellules microbiennes par gramme de racine (Egamberdieva *et al.*, 2008 ; Berendsen *et al.*, 2012 ) et plus de 30000 espèces procaryotes (Mendes *et al.*, 2011 ; Berendsen *et al.*, 2012 ). Le terme rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner, "rhizo" vient du grec "rhiza" signifiant "racine" et "sphère" est le champ d'action ou d'influence. La rhizosphère se décompose en trois zones : l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'exorhizosphère (sol adhérent aux racines c'est-à-dire sol rhizosphérique) (Lynch et Wipps, 1990 ; Hamza *et al.*, 2018)(fig.01).



**Figure 01** : Schéma de la rhizosphère (Philippot *et al.*, 2013).

Elle est le lieu des échanges entre sol, racines, microorganismes et faune associés. Ces échanges, intenses, se traduisent par des flux bi-directionnels d'eau et de nutriments (Lynch, 1990). Elle en résulte une abondance de microorganismes (procaryotes et eucaryotes) et une

stimulation de nombreuses activités métaboliques. C'est ainsi que plusieurs chercheurs ont indiqué que les bactéries sont 5 à 50 fois plus abondantes dans la rhizosphère que dans le reste du sol (**Lynch et Whipps, 1990 ; Hamza et al., 2018**). Elle s'agit de «l'effet rhizosphère» (**Lemanceau, 1992 ; Whipps, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009**).

La rhizosphère est le site micro actif le plus important sur le plan chimique, biologique et écologique dans le sol (**Toal et al., 2000**). C'est la voie obligatoire de tous les minéraux du sol aux plantes, et un lieu d'interactions fortes entre les plantes et les microorganismes du sol (**Walter et al., 2005**).

C'est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (**Bell-Perkins et Lynch, 2002**). Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (**Kennedy et de Luna, 2004**). Les racines exercent à la fois des influences physique, telles que la structure des racines, et des influences chimiques, telles que la sécrétion d'une grande variété de métabolites d'origine végétale (**Sugiyama, 2019**).

La rhizosphère est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micro et macronutriments du sol présent en quantité limitée (**Gholami et al., 2012**). Les communautés distinctes des micro-organismes sont associées aux systèmes racinaires de toutes les plantes supérieures (**Khalid et al., 2006**). Ces êtres vivants sont requis dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère (**Germida et al., 1998**).

Par ailleurs, la communauté microbienne joue un rôle notable dans l'amélioration et la stabilisation de la structure du sol. Plusieurs études ont montré que l'agrégation et la stabilité d'un sol dépendent de sa nature et de sa contenance en matière organique (**Elustondo et al., 1990**). La matière organique produite par les racines a un effet direct sur la stabilisation des agrégats du sol et indirect sur la stimulation des activités microbiennes de la rhizosphère (**Angers et Mehuys, 1989**). Les communautés microbiennes jouent aussi un rôle significatif dans l'état de santé des plantes, certaines sont nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certaines ne semblent avoir aucun effet. De nombreuses interactions, bénéfiques (symbioses) ou non, voire délétères (pathogénie) sont observées entre plantes, bactéries et champignons du sol (**Dommergues, 1978**).

### **I.1.1.Effet rhizosphère**

Des études portant sur les communautés microbiennes montrent une augmentation de l'effectif des microorganismes présents dans la rhizosphère, à proximité des racines. Ce phénomène est communément désigné sous le terme «d'effet rhizosphère» (**Lynch et Whipps, 1990 ; Merbach et al., 1999 ; Whipps, 2001 ; Arif, 2015**). Plusieurs paramètres influencent ce phénomène tel le type de sol, le taux d'humidité et l'âge de la plante (**Manoharachy et Mukerji, 2006 ; Arif, 2015**). Une grande quantité de composés organiques est libérée par les racines dans le sol environnant. Ces composés peuvent être utilisés par des microorganismes comme source de carbone et d'énergie. En plus de l'effet sélectif dû à l'enrichissement du sol en composés organiques par des exsudats racinaires, les plantes exercent un autre effet sélectif sur la communauté bactérienne par la sécrétion de composés spécifiques inhibant la croissance bactérienne (**Latour et al., 1996 ; Whipps, 2001 ; Hinsinger, 2010**).

#### **I.1.1.1. Conséquences de l'effet rhizosphère sur les microorganismes**

L'effet rhizosphère est déterminé en grande partie par la libération de rhizodéposition (**Stengel et Gelin, 1998**). En conséquence les sources organiques d'azote, de carbone, de phosphore disponible stimulent le développement de la communauté bactérienne (**Latour et al., 1996**). Néanmoins, la compétition pour les minéraux solubles est intense, et les richesses de la rhizosphère ne sont pas réparties équitablement entre tous les microorganismes du sol. Malgré cela ces microorganismes ont une activité métabolique élevée et se multiplient rapidement. (**Davet, 1996**).

#### **I.1.1.2. Conséquences de l'effet rhizosphère sur les plantes**

L'activité rhizosphérique entraîne une meilleure assimilation des éléments minéraux par les plantes. Ainsi, l'énergie fournie par la rhizodéposition permet l'accroissement de la biomasse microbienne, puis la prolifération des prédateurs. Ce qui induit une activité enzymatique qui facilite la lyse des cellules desquamées des racines et la biodégradation de la matière organique du sol, en composées assimilables par la plante après minéralisation des éléments tels que le phosphore (**Davet, 1996**).

### **I.1.2. Les rhizobactéries :**

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol. On compte les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues (**Paul et Clark, 1996**). Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne  $6 \cdot 10^8$  cellules par gramme

de sol et un poids de 10000 kg/ha équivalant à 5% du poids sec des composés organiques du sol. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (**Kloepper, 1993**). Si la plante libère des composés organiques, à l'inverse elle prélève de l'eau et des éléments minéraux indispensables à son métabolisme. Les échanges entre la plante et le sol sont influencés par les rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont élevées.

Ces rhizobactéries sont considérées comme des concurrents microbiens efficaces dans la zone racinaire. L'effet visible des associations plante-microbe sur la croissance de plantes peut être positif, neutre, ou négatif. Certaines bactéries inhibent la croissance alors que d'autres la stimulent. Ces dernières sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR) (**Kloepper et al., 1989; Zahir et al., 2004**).

### **I.1.3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes : Les PGPR (Plant Growth–Promoting Rhizobacteria)**

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) sont un groupe de bactéries que l'on trouve dans la rhizosphère en association avec des racines (**Sundaram et Murali, 2018**). L'utilisation des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) est une stratégie de gestion éprouvée pour améliorer la croissance des plantes (**Erice et al., 2017**).

Les PGPR sont des microorganismes non pathogènes et bénéfiques pour la santé et la nutrition des plantes (**Kloepper et al., 1980**). En 1978, **Kloepper** et **Schroth** sont les premiers qui définissent les PGPR comme des bactéries qui colonisent les racines des plantes (**Siddiqui, 2006 ; Stanzin et al., 2017**).

De façon générale, les PGPR augmentent la surface d'échange par un développement global du système racinaire. Plus précisément, elles stimulent l'élongation des poils racinaires, augmentent le nombre et la taille des racines secondaires, mais peuvent réduire la taille de la racine primaire (**Bresson, 2013**).

Les PGPR sont des bactéries du sol capables de coloniser la rhizosphère et de favoriser la croissance des plantes grâce à une grande variété de mécanismes comme la minéralisation de la matière organique, la lutte biologique contre les agents pathogènes du sol, la fixation

biologique de l'azote. Une caractéristique très intéressante de PGPR est leur capacité à améliorer la biodisponibilité des nutriments (Pii *et al.*, 2015)(fig. 02).

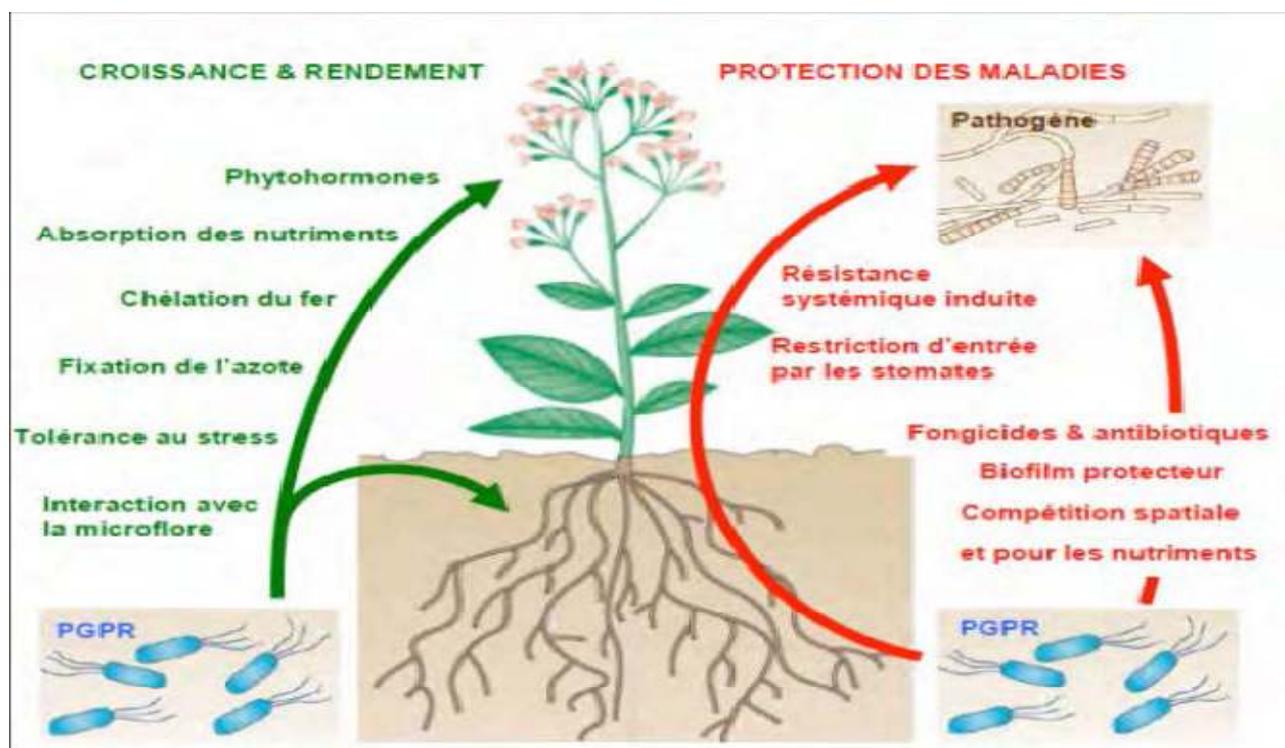


Figure 02: Les mécanismes d'action des PGPR (Ramos *et al.*, 2009).

Les PGPR utilisées comme biofertilisant et/ou antagoniste contre les phytopathogènes constituent une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides. Toutefois, la capacité de ces bactéries de coloniser les racines et de survivre dans le sol est souvent limitée (Normander et Prosser, 2000 ; Cherif, 2014).

## I.2. *Pseudomonas* spp. fluorescents

### I.2.1. Taxonomie

Le genre *Pseudomonas* est décrit par Migula en 1894 et inclut de nombreux bacilles à Gram négatif non fermentant, aérobies stricts à flagellation polaire (Anzai *et al.*, 2000). Les *Pseudomonas* ont été regroupés en cinq groupes en fonction de la parenté de leurs gènes ARNr (I, II, III, IV, V) (Maheshwari, 2013). Actuellement, seuls les représentants du groupe I (Tab. I), sont inclus dans le genre *Pseudomonas* et jusqu'à maintenant 128 espèces

ont été valablement décrites pour ce genre, y compris les *Pseudomonas* fluorescents (**Hofte et Altier, 2010**).

**Tableau I:** Classification des *Pseudomonaceae*.

Groupe d'ARN	Genres
<b>Groupe I</b>	<i>Pseudomonas stricto sensu</i>
<b>Groupe II</b>	<i>Burkholderia, Pandoraea, Ralstonia</i>
<b>Groupe III</b>	<i>Acidovorax, Comamonas, Delftia</i>
<b>Groupe IV</b>	<i>Brevundimonas</i>
<b>Groupe V</b>	<i>Stenotrophomonas</i>

(**Brenner et al., 2005 ; Palleroni, 2010**).

Le genre *Pseudomonas stricto sensu* appartient au :

Phylum. ....Protéobactéria.

Classe .....Gammaprotéobactéria.

Ordre .....Pseudomonadales.

Famille.....*Pseudomonadaceae*.

D'autres genres sont inclus dans cette famille comme les genres *Azomonas*, *Azotobacter*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Rhizobacter* (**Tournus, 2016**).

Selon **King et al.,(1954)**, le genre *Pseudomonas* est classé en deux groupes sur la base de la production des pigments fluorescents sur des milieux spécifiques, tel que le milieu King B.

- 1. Les *Pseudomonas* spp.fluorescents** à l'exemple de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. Putida*...
- 2. Les *Pseudomonas* spp.non-fluorescents** à l'exemple de *P. fragi*, *P. alcaligenes*, *P. mendoeina*....

Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine, les espèces pigmentées sont par exemple :

- *P. aeruginosa* : pyocyanine + pyoverdine, il possède l'un ou l'autre ou les deux, mais pouvant être perdus par mutation. Il existe des variétés mélanogènes ou érythrogènes produisant un pigment noir ou un pigment rouge.

- *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, et *P. cichorii* produisent un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme, mais certaines souches sont parfois apigmentées.
- *P. aureofaciens* : pigment jaune orange ou pourpre (Singleton et Sainsbury, 2006).

### I.2.2. Généralité

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Palleroni, 2008). Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires. Ils sont fréquemment présents dans l'eau, dans les sols et particulier dans la rhizosphère des plantes (Bossis et al., 2000). Elles peuvent se développer dans un milieu de base riche en éléments organiques ; à pH neutre et à une température comprise entre 4 et 43° (Palleroni, 1984).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol. Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été rapportés à la fois comme PGPR, et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes (Mezaache, 2012).

Les *Pseudomonas* appartiennent au groupe de bactéries appelées PGRP (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et Schroth, 1978). Ce sont des bactéries capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et /ou en la protégeant contre des infections par des agents Phytopathogènes (Weller, 1988). Ces bactéries sont caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques (Meliani, 2012).

Les cellules de *Pseudomonas* spp. fluorescents se divisent en moyenne toutes les 5 h dans la rhizosphère de *Pinus radiata* et uniquement toutes les 77 h dans le sol non rhizosphérique (Bowen et Rovira, 1976). Cette différence conduit à un développement des *Pseudomonas* spp. fluorescents significativement plus élevé dans la rhizosphère que dans le sol nu. Ces microorganismes sont donc considérés comme des rhizobactéries (Schroth et al., 1992).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été étudiés depuis des décennies pour leurs effets bénéfiques sur la stimulation de la croissance et la suppression efficace des maladies

telluriques des plantes (**Bakker et al., 2007**). Ces rhizobactéries possèdent de nombreuses caractéristiques qui permettent leur utilisation dans la protection des cultures agricoles (**Weller, 2007**).

Le groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents représente selon **Botelho et Mendonça. (2006)** :

- 1) Les espèces phytopathogènes à cytochrome c oxydase-positive, comme *P. cichorii*, *P. marginalis* et *P. tolaasii*.
- 2) Les *Pseudomonas* spp. fluorescent phytopathogènes nécrogènes sans cytochrome c oxydase : *P. syringae* et *P. viridiflava*.
- 3) Les non-phytopathogènes, des souches non-nécrogènes, tels que *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et *P. aeruginosa* espèce type.

### I.2.3. Caractérisation phénotypique

Différents critères ont été utilisés pour l'élaboration d'un système de classification des espèces de *Pseudomonas*. Ces bactéries ont été caractérisées phénotypiquement en se basant sur plusieurs caractéristiques : la morphologie, la pigmentation, la réaction aux colorants et les exigences nutritionnelles (**Jonhson et Palleroni, 1989; Palleroni, 1993**).

### I.2.4. Caractérisation génotypique

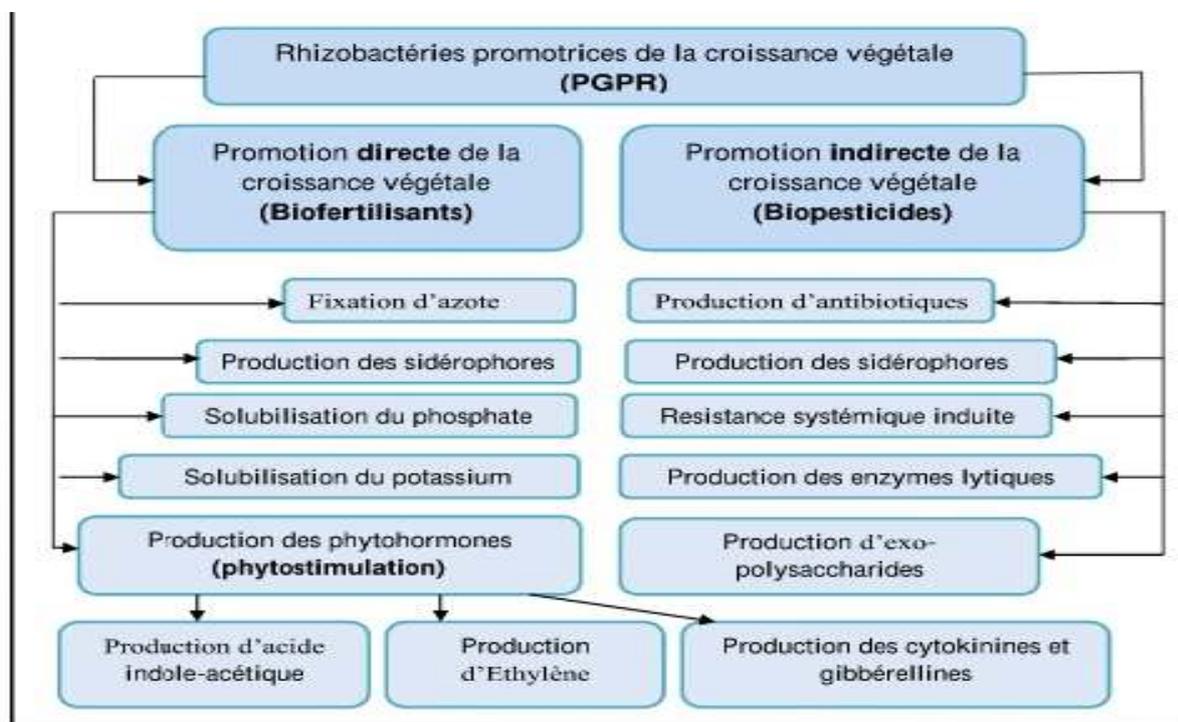
Le genre *Pseudomonas* englobe un groupe des bactéries très diversifié et représente un degré remarquable de capacité d'adaptation physiologique et génétique (**Spiers et al., 2000**).

Le génome de *Pseudomonas* varie de taille entre 6 et 7 Mpb par rapport à plus d'une centaine de génomes bactériens séquencés, seulement une partie d'entre eux sont plus grands que les génomes de *Pseudomonas* (**Jensen et al., 2004**). Le pourcentage G+C compris entre 58 et 70 (**Meliani, 2012**).

L'espèce *P. fluorescens* compte parmi les espèces qui présentent une forte hétérogénéité phénotypique et génotypique. En **2000**, **Bossis et al.**, ont rassemblé des informations concernant les différentes études taxonomiques entreprises au sein de l'espèce *P. fluorescens*. L'espèce comprend maintenant 7 biovars, dont l'appartenance repose sur l'assimilation de différents éléments carbonés. L'utilisation de clé dichotomique (**Bossis et al., 2000**), ainsi que le sidérotypage permettent de déterminer avec précision l'appartenance d'une souche bactérienne à un biovar donné.

### I.3. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Streptomyces* spp sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (**Rabhi, 2011**)(fig.03).



**Figure 03** : Les principaux mécanismes d'action des PGPR sur la croissance des plantes (Gupta., et al. 2015).

#### I.3.1. Effet direct

- **Stimulation de la croissance des plantes**

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la fixation d'azote et la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines (**Lemanceau, 1992**).

**a. Fixation d'azote**

L'azote (N) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes. Bien qu'il y ait environ 78 % de N<sub>2</sub> dans l'atmosphère, il n'est pas disponible pour les plantes en croissance (Muness, 2013).

Le processus de la fixation biologique d'azote par des interactions symbiotique ou non symbiotique entre le microbe et les plantes relève uniquement du domaine procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Rabhi, 2011 ; Sushantoet al.,2017).

**b. Solubilisation du phosphate**

Le phosphore et le deuxième nutriment important limitant la croissance des plantes après l'azote, il est largement disponible dans le sol sous deux forme organique et inorganique (khan et al., 2009). Il joue un rôle pratiquement important dans tous les processus métaboliques majeurs dans les plantes, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (Khan et al., 2010). Malgré son abondance dans le sol il n'est assimilable par les plantes qu'une fois solubilisé. La solubilisation des phosphates est la capacité des microorganismes de convertir le phosphate insoluble à une forme accessible. (Chaiharn et lummyong,2009).

**c. Production de sidérophores**

Le fer est un élément capital aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer (Fe<sup>3+</sup>), mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance des bactéries et des plantes. La plupart des microorganismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores(Compant et al., 2005).

Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes. Ils jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphérique ayant une faible disponibilité pour les plantes tels le Zn et Pb (Rabhi, 2011).

**• 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

cytokines, les gibbérellines et l'éthylène peuvent affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture racinaire par la surproduction de racines latérales et de racines avec un accroissement subséquent de l'apport d'éléments nutritifs et d'eau (Arora , 2013).

#### a. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)

Cette phytohormone est impliquée dans l'initiation de la division des cellules au niveau des racines, et de leurs élargissements. Communément produite par les rhizobactéries. Les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante (Mezaache, 2012). Patten et Glick, (2002) ont rapporté le rôle de l'AIA produit par *P. putida*, chez la plante hôte, dans le développement de son système racinaire.

#### b. L'éthylène

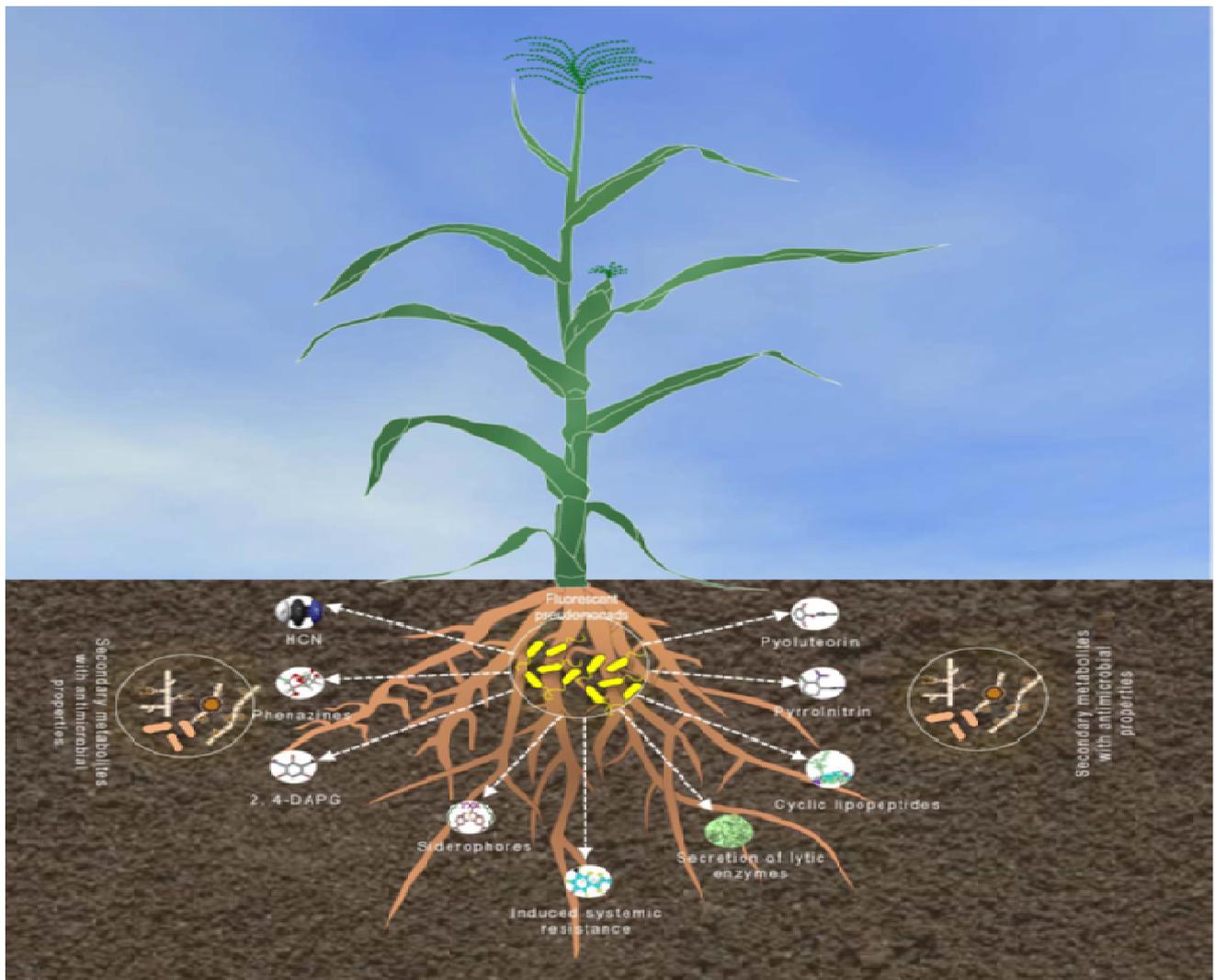
L'éthylène est une phytohormone clé qui a une large gamme d'activités biologiques peut affecter la croissance et le développement des plantes dans un grand nombre de façons différentes, y compris la promotion de l'initiation des racines, l'inhibition de l'allongement des racines, la promotion de la maturation des fruits, la promotion du flétrissement inférieur, la stimulation de la germination des graines, la promotion de l'abscission des feuilles, Activation de la synthèse d'autres hormones végétales (Glick et al., 2007).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs d'ACC-désaminase. La transformation des *Pseudomonas* spp. fluorescents par des gènes codant cette enzyme, permet à celles-ci de croître sur un milieu dont la seule source de carbone et d'azote est l'ACC, et de stimuler l'élongation des racines. Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations, ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Mezaache, 2012).

- **Induction de la résistance systémique des plantes (ISR)**

Certaines bactéries peuvent avoir un effet protecteur en induisant elles aussi, des mécanismes de défense des plantes via la résistance systémique induite (ISR) permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes (Van Loon,2007).

Le phénomène d'induction de la résistance se traduit par une augmentation de la capacité de se défendre contre un large spectre d'agents pathogène (fongiques, bactéries et viraux) (Pieterse et al., 2002). Certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent intervenir dans l'induction systémique de la résistance des plantes (Induced Systemic Resistance, ISR) (Kloepper et al., 1992) (fig.04).



**Figure 04** : Représentation schématique des métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas* fluorescents dans la rhizosphère (Mishra et Arora, 2017).

### I.3.2. Effet indirect

Elle concerne la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère (Kloepper et Schroth, 1981). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent des propriétés prometteuses dans la lutte contre les agents phytopathogènes et la

préservation de l'environnement tellurique, ils peuvent même être une source de gènes d'intérêt dans la transgénèse végétale. **(Van Loon et Glick, 2004).**

Un des mécanismes des effets bénéfiques de certaines souches de *Pseudomonas* fluorescents repose sur l'activité antagoniste qu'ils exercent à l'encontre de microorganismes pathogènes responsables de maladies et d'altération de la physiologie et de la croissance végétale **(Benchabane, 2005).**

- **La compétition trophique**

Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie **(Rabhi, 2011).**

La compétition peut s'instaurer pour l'espace et pour les nutriments. Même si le rôle de la compétition pour l'espace ne peut pas être complètement exclu, l'essentiel des travaux relatifs à la compétition exercée par les *Pseudomonas* spp. fluorescents porte en particulier sur la compétition trophique pour le fer **(Heming, 1986; Leong, 1986; Loper et Buyer, 1991).** Celle-ci s'exerce principalement par le biais des sidérophores qui peuvent stimuler directement la croissance des plantes par l'augmentation de la disponibilité du fer aux environs des racines ou indirectement en privant les phytopathogènes de ces ions indispensables à leur activité biologique ; privés de fer, ils voient leur croissance inhibée **(Leong, 1986; Seong et Shin, 1996 ; Guetterson, 1990; Cook et al., 1995).**

- **L'antibiose**

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines... **(Defago, 1993).** Ces métabolites produits à faibles concentrations peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes **(Montesinos et al., 2009).**

Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels  $\beta$ -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases **(Rabhi, 2011).** Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs phytopathogènes **(Haas et Defago, 2005).**

### a. Enzymes dégradent les parois fongiques

L'excrétion d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliqué dans les attaques des champignons phytopathogènes (**Picard et al., 2000**). La lyse des parois cellulaires, par les enzymes dégradatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue, la chitinase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives des parois cellulaires tels que : la chitine, et les ponts glucosidiques (**Schroth et Hancock, 1981**). Les microorganismes excréant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (**Ordentlich et al., 1988**). **Nielsen et al., (1998)** ont rapporté que dans la rhizosphère de la betterave à sucre, les *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibaient *R. solanipar* production d'endochitinase (**Tab.II**)

**Tableau II:** Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Agent de contrôle	Plante	Pathogènes à contrôler	Références
<i>P. fluorescens</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>	Slusarski (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp	Aubergine	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ramesh et al. 2009
<i>P. putida</i> <i>PCL1760</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Validov et al (2009)
<i>P. putida</i> strain P9	Pomme de terre	Phytophthora infestans	Andreote et al. (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp	Plusieurs plantes	Divers champignon	Verma et al. (2007)
<i>P. fluorescens</i>	Riz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Anitha et Arun-Das (2011)
<i>P. fluorescens</i>	Concombre	<i>Phytophthora drechsleri</i>	Maleki et al. (2011)

(Amkraz, 2013).

#### I.4. Effet de stress abiotique sur l'efficacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents

### I.4.1. Notion de stress

Selon **Dutuit et al., (1994)**, le stress est le dysfonctionnement (rupture d'un équilibre fonctionnel) produit dans un organisme ou dans un système vivant, par exemple par une carence. Le stress est un ensemble de conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques résultant éventuellement en dégâts, dommages, blessures, inhibition décroissance ou de développement. D'après **Jones et al., (1989)**, c'est une force ou influence hostile qui tend à empêcher un système normal de fonctionner. Au niveau cellulaire, un stress est causé par la variation d'un paramètre environnemental qui entraîne la mise en place des mécanismes de régulation de l'homéostasie. Les organismes sont généralement soumis à deux types de stress : les stress biotiques (dus à une agression par un autre organisme) et les stress abiotiques (qui sont dus principalement à des facteurs environnementaux) (**Bouزيد, 2010**).

Plusieurs facteurs influencent la croissance et l'activité des populations bactériennes dans le sol (**Jensen et Nybroe, 1999; Smalla et al., 2001**). Il s'agit essentiellement de la température, de l'humidité, de la taille des pores des particules de sol, de la qualité et de la disponibilité des nutriments et les types de stress (**Josephson et al., 2000**).

#### I.4.1.1. Stress abiotique

Les structures des communautés microbiennes de la rhizosphère sont variables et dépendent de nombreux facteurs abiotiques (**Noguez, 2005; Colares et Melo, 2013**). Plusieurs études suggèrent que les caractéristiques des sols (**Marschner et al., 2001; Valé et al., 2005; Singh et al., 2007; Tian et al., 2009; Xu et al., 2009; Raynaud, 2010; Sanaullah et al., 2011; McGahan et al., 2014**), sont les facteurs les plus importants dans le modelage des structures des communautés microbiennes de la rhizosphère. Par exemple, le pH est l'un des forts prédicateurs de la composition des communautés bactériennes et de la diversité mais suivant le type de sol et d'autres facteurs peuvent agir sur la structure des communautés comme la disponibilité des nutriments, la solubilité des métaux et le contenu en carbone (**Asuming-Brempong et al., 2008; Sul et al., 2013**) et en azote (**Fierer et al., 2003**), l'humidité des sols, la salinité (**Nelson et Mele, 2007; Rajendhran et Gunasekaran, 2008; Buyer et al., 2010**) et les variations climatiques (**Lauber et al., 2009**). Au cours du temps, le sol subit des changements, qui augmentent la complexité globale de l'environnement de sol (**Zhou et al., 2014**). Comme exemple, **Buyer et al., (2010)**, rapportent que la température, humidité, pH et texture de sol contrôlent la biomasse et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère de tomate.

#### **I.4.2. *Pseudomonas* spp. fluorescents face aux stress abiotique**

Divers rhizobactéries, regroupées sous le terme PGPR, ont une capacité à promouvoir la croissance de leur plante hôte par des effets sur : la nutrition, l'architecture racinaire ou la santé de leur partenaire végétal (**Grover *et al.*, 2010**). Ils peuvent aussi déclencher l'expression des mécanismes de la tolérance systémique induite (TSI) vis-à-vis de différents facteurs de stress abiotiques tels la sécheresse, la salinité et les métaux lourds (**Yang *et al.*, 2009**).

##### **I.4.2.1. Effet de la salinité sur la croissance bactérienne**

L'augmentation des concentrations externes en sel pose un problème sérieux pour toutes les cellules vivantes dû à la perméabilité des membranes provoquant ainsi une perte d'eau suite à l'augmentation des teneurs en sel et ceci, se terminera par la mort des cellules (**Saum et Müller, 2007**). Les effets du stress salin sur l'activité microbienne dans un sol donné sont complexes et imprévisibles du fait des interactions possibles entre les ions, les bactéries et les particules du sol. De façon générale, les taux élevés de salinité inhibent la croissance de nombreuses bactéries du sol (**Polonenko *et al.*, 1986 ; Rai, 2017**). Une corrélation négative existe entre le nombre de la flore microbienne et la concentration des sels solubles (**Ragab, 1993; Rai, 2017**).

Selon **Moradi *et al.*, (2011)**, la salinité du sol est considérée un facteur de stress réduisant la diversité des microbes en affectant leurs fonctions et leurs activités. Le Na Cl affecte considérablement la croissance des microorganismes. Les populations fongiques, bactériennes (et actinomycétales) diminuent significativement en présence de 5% de Na Cl). (**Omar et al., 1994**). Il a été rapporté que les chlorures sont plus toxiques que les sulfates (**Elhilali, 2006**).

En présence de concentrations élevées de Na Cl, la synthèse des enzymes, des ribosomes, des protéines (**Kushner *et al.*, 1983**) et également celle des antibiotiques est inhibée (**Ng et al., 2014**). L'activité des nitrogénases, l'infection mycorhizale ainsi que la nitrification diminuent à des taux variant de 50%-70% (**Nelson et Mele, 2007**). Le Na Cl peut limiter la symbiose par la réduction de la prolifération et la survie de *Rhizobium* sp. par exemple en ralentissant les processus de colonisation bactérienne et par le mauvais fonctionnement des nodules au niveau des racines (**Singleton *et al.*, 1982**).

Dans leur habitat naturel, les micro-organismes sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. En effet, la salinité élevée du sol peut interférer avec la croissance et l'activité des bactéries. Une diminution de celle-ci dans les sols salins conduit à une accumulation de la matière organique non dégradée, ce qui agit

négalement sur la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance végétale (**Zahran, 1997**). Une augmentation brusque de l'osmolarité du sol modifie la disponibilité de l'eau à la cellule. L'abaissement de l'activité de l'eau extérieure a pour conséquence de modifier le volume cellulaire. Elle modifie aussi la pression de turgescence qui constitue la force mécanique nécessaire à l'élongation de la cellule durant la croissance (**Csonka, 1989**). La membrane cytoplasmique des bactéries est perméable à l'eau mais constitue une barrière efficace vis-à-vis des solutés du milieu et des métabolites présents dans le cytoplasme (**Csonka, 1989**). La circulation des molécules d'eau à travers cette bicouche lipidique est accélérée par la présence de canaux dits aqueux (**Kempf et Bremer, 1998**). Si les bactéries n'ont aucun moyen de répondre ou de s'adapter à l'augmentation de la force ionique ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) dans le sol, le flux rapide de l'eau vers l'extérieur conduira à la plasmolyse cellulaire (**Le Rudulier et al., 2002**).

#### I.4.2.2. Effets du stress hydrique

La sécheresse influence le mouvement des bactéries mobiles comme les rhizobiums et la distribution de la microflore du sol, ce facteur affecte également la diversité des populations

Rhizobiales (**Hussain et al., 2010**). La modification des cellules rhizobiennes par le stress hydrique mène à une réduction dans l'infection et la nodulation (**Zahran, 1999**).

Les espèces de *Pseudomonas* ont un métabolisme très diversifié, ce qui signifie son pouvoir d'habiter une grande variété d'écosystèmes à partir des eaux douces jusqu'aux milieux hypersalins (**D'Souza-Auletal., 1993 ; Pocardetal., 1994**). Les espèces fluorescentes de *Pseudomonas* sont dominantes dans les régions à faible concentration de sel, tandis que les régions salées sont occupées par des espèces halotolérantes représentées par *Pseudomonas alcaligenes* et *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (**Rangarajanetal., 2001**). L'adaptation d'espèces de *Pseudomonas* à l'osmolarité du milieu extérieur passe, notamment, par l'accumulation des solutés compatibles à l'intérieur du cytosol (**Rabhi, 2011**).

Il existe deux différentes stratégies utilisées par les microorganismes halophiles afin de balancer la pression osmotique du cytoplasme avec celle du milieu externe. La première consiste à l'accumulation du potassium et du chlore. Cette stratégie exige une adaptation extensive de la machinerie enzymatique intracellulaire au sel, de plus, les protéines doivent maintenir leurs propres conformations et activités. Pour la plupart des groupes halophiles, cette stratégie n'est pas largement utilisée. La deuxième stratégie, plus répandue, consiste en l'accumulation de solutés organiques afin de contrôler les activités hydriques internes, de

maintenir le volume cellulaire approprié et de protéger les macromolécules intracellulaires des microorganismes soumis aux conditions salines (da Costa *et al.*, 1998 ; Lamosaet *al.*, 1998).

#### **I.4.2.3. Effets de la température**

La température est un facteur qui détermine la nature et les conséquences des interactions rhizobactéries – plantes (Digat, 1994). Les températures élevées peuvent donc affecter *in situ* les populations microbiennes et leurs activités physiologiques (Benchabane, 2005). Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries, par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation, parfois irréversible des enzymes (Cloutier *et al.*, 1992). Kulkarni et Nautiyal, (1999) ont rapporté que la température optimale pour la plupart des rhizobiums est entre 25 et 30°C.

#### **I.4.2.4. Effets du pH**

L'acidité affecte la croissance et la survie des rhizobia à l'état libre dans le sol. De même, leur multiplication dans la rhizosphère, l'infection de la racine, la formation des nodules ainsi que la croissance de la plante sont très touchées par l'acidité par les facteurs qui lui sont associés (Zerhahi, 2000).

Notre travail qui porteur sur l'isolement, sélection et l'identification de *Pseudomonas* spp. fluorescents performante résistante aux stress biotique et abiotique a été réalisée au niveau de laboratoire de projet de fin d'étude (PFE) de département de biologie et physiologie cellulaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Saad Dahlab Blida sur une période de 4 mois allant de février jusqu' au mai .

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique représenté par, la verrerie, l'appareillage et les milieux de culture est consigné en annexe 01 et 02.

### II.1.2. Matériel biologique

#### II.1.2.1. Le sol

Le sol utilisé pour l'isolement des *Pseudomonas* a été prélevé en février 2019 à partir de la rhizosphère de tomate situé à Sidi Ali dans la région de l'Arbâa, au Nord-Est de la wilaya de Blida (Fig.05). Les échantillons du sol sont prélevés aseptiquement à partir de la couche sous-jacente (rhizoplan) à une profondeur de 10 -15 cm, après avoir écarté la couche superficielle du sol, les échantillons ont été prélevés dans trois endroits, puis mélangés pour obtenir un échantillon de terre représentatif, ensuite séchés à l'aire libre et tamisés à travers un tamis de 2 mm de diamètre. Il est transporté au laboratoire et maintenu à 4 °C (fig.05)



**Figure 05 : (A) Zone d'échantillonnage.**

**(B) : Localisation géographique de la zone de prélèvement (Google Earth).**

### II.1.2.2. Les souches fongiques

Pour évaluer l'activité antagoniste des souches bactériennes, nous avons utilisé trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum* f. *splycopersici*, *F. oxysporum* f. *splinet*, *F. oxysporum* f. *spalbedinis*). Ces souches fongiques appartiennent à la collection du laboratoire de mycologie (département de biotechnologie l'université Blida1).

## II.2. Méthode

### II.2.1. Isolement des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir du sol

#### II.2.1.1. Préparation des dilutions

A l'aide d'une micropipette de 1000 µl une série de dilution décimale ( $10^{-1}$  à  $10^{-10}$ ) a été préparée pour l'échantillon du sol rhizosphérique. 1g du sol adhérant aux racines a été introduit dans 9 ml d'eau distillée stérile. La dilution de  $10^{-1}$  est ainsi obtenue et soumise à une agitation continue pendant 10 minutes. Par la suite une série de dilution décimale a été réalisée jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-10}$  (fig.06).



**Figure 06 :** Préparation des dilutions décimales.

#### II.2.1.2. Mise en culture

100 µl de chaque dilution ont été prélevés puis étalés sur le milieu King B (Annexe 01). Chaque dilution est ensemencée en triplicat. Les boîtes de pétri portant les indications nécessaires (dilution, la date) ont été incubées à 30°C pendant 24 à 48h.

Après incubation, les colonies d'aspects différents, fluorescentes sous UV (365nm), ont fait l'objet d'une purification sur le milieu King B (**King et al., 1954**) (Annexe 01) puis désignées par un numéro de code (fig.07).



**Figure 07 :**Ensemencement de dilution par étalement.

### II.2.1.3. Purification des souches :

La pureté des souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été vérifiée sur le milieu King B (**King et al.,1954**) (Annexe01) en réalisant plusieurs repiquages successifs jusqu'à l'obtention des souches pures.

### II.2.1.4. Conservation des souches :

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents pures sont conservées en milieux KB sur des tubes inclinés à -20°C (fig.08).



**Figure 08:** Conservation des souches dans des tubes inclinés.

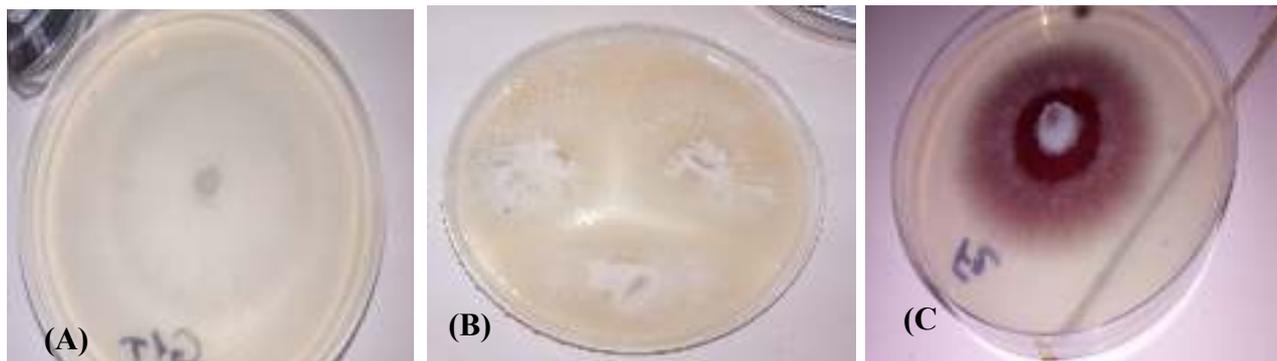
### II.2.2. Test d'activité antagoniste *in vitro* des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Le pouvoir antagoniste des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été déterminé par l'inhibition de la croissance mycélienne de champignon phytopathogène. La détermination de l'activité antagoniste *in vitro* des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de trois souches fongiques de *Fusarium oxysporum* (G1, G2 et F2) a été réalisé sur trois milieux différents (PDA, King B et Mixte) (Annexe01) par la méthode de confrontation direct. Cet essai a été réalisé en deux étapes :

- 1) Une première étape préliminaire où l'isolat fongique a été confronté aux quatre souches de *Pseudomonas* en même temps. Les observations ont porté sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne.
- 2) Dans la deuxième étape, chaque souche bactérienne ayant montré une activité antagoniste notable a été confrontée seule avec l'isolat fongique, dans une disposition en deux lignes parallèles bactériennes aux extrémités opposées de la boîte et l'isolat fongique au centre.

### II.2.2.1. Purification des souches fongiques

La vérification de la pureté des souches fongiques a été réalisée après plusieurs repiquages par transplantation successive des disques de champignons de 7 jours dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe01) (Johnston et Booth, 1983) (fig.09). Ces derniers ont été incubés à 28°C pendant 7 jours. Les souches purifiées ont été conservées à 4°C.



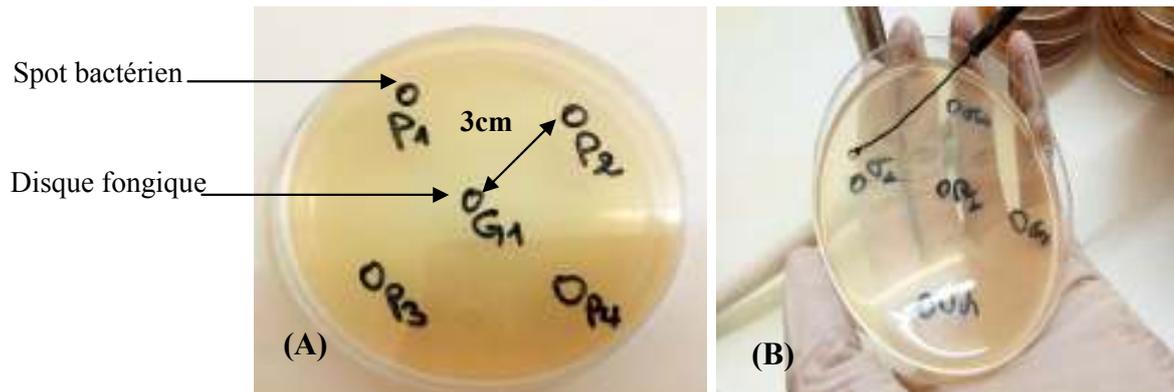
**Figure 09:** Purification des souches de *Fusarium oxysporum* sur milieu PDA.

- (A) : G1, *Fusarium oxysporum* sp. *albedinis* (Foa).  
 (B) : G2, *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* (Fol).  
 (C) : F2, *Fusarium oxysporum* sp. *lini* (Foln).

### II.2.2.2. Test préliminaire de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

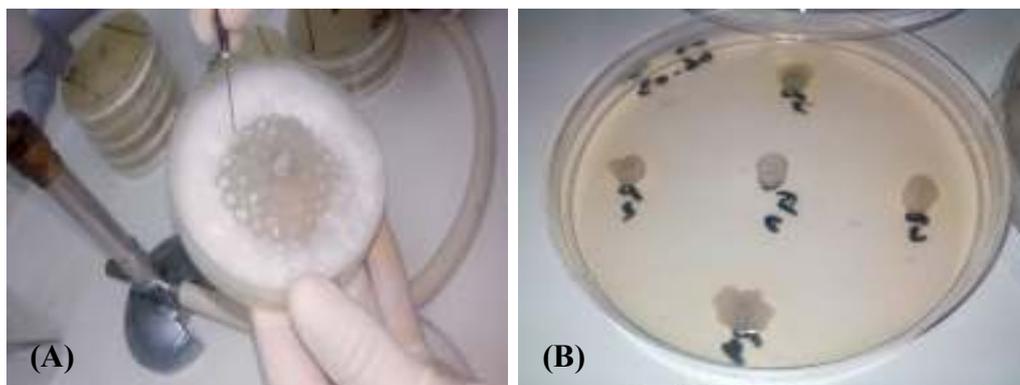
Le test préliminaire a été étudié en utilisant la méthode de diffusion sur gélose (Sagahon et al., 2011), dans le but de sélectionner les souches ayant présentées un pouvoir antagoniste vis-à-vis des isolats fongiques (G1, G2 et F2).

Chaque culture bactérienne est ensemencée en spot à 3 cm du centre de la boîte de Pétri (4 spots bactériens par boîte) (fig.10) contenant le milieu KB (Annexe 01). Ces derniers ont été incubés à 28°C pendant 18 à 24 h. Un disque de gélose de 6 mm de diamètre de la culture de chaque champignon est déposé sur la gélose KB au centre de la boîte de Pétri (fig.11). Un témoin négatif de la souche fongique est testé en absence de bactéries. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.



**Figure 10:**Réalisation de test préliminaire.

(A) : Préparation des boîtes.(B) :Ensemencement des souches de *Pseudomonas* spp.fluorescentssous forme de spots.



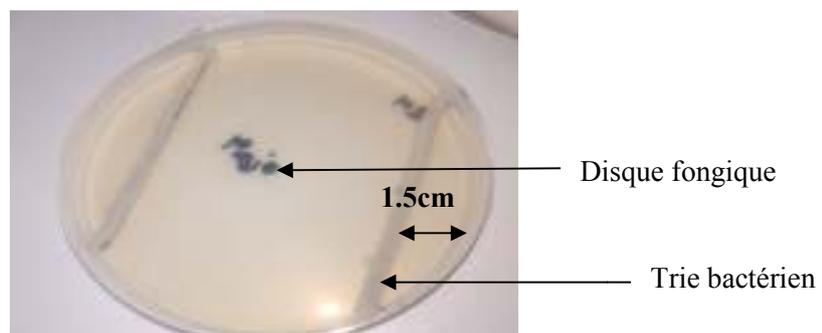
**Figure 11:(A) :** Prélèvement d'un disque fongique.

(B) : Transplantation d'un disque fongique au centre de boîte Pétri contenant quatre souches de *Pseudomonas* spp.fluorescents.

### II.2.2.3. Test d'antagonisme *in vitro* des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents

Pour évaluer le degré d'inhibition de la croissance mycélienne des trois formats spéciaux de *F. oxysporum*, nous avons confronté un isolat de *F. oxysporum* aux souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents. Cette évaluation de l'inhibition de la croissance mycélienne a été réalisée sur trois milieux différents : le milieu PDA (favorable au développement des champignons), le milieu KB (favorable au développement de *Pseudomonas*) et le milieu mixte composé de parts égale des deux milieux.

Le test d'antagonisme fongique a été réalisé selon la méthode décrite par **vincentet al. (1991)**. Les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1.5 cm à partir des deux bords d'une boîte de Pétri contenant du milieu gélosé (fig. 12). Après 24 h d'incubation à 28°C, un disque fongique de 6mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte (fig.13). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.



**Figure 12 :** Ensemencement des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents sous forme de deux stries parallèles.



**Figure 13:** Transplantation d'un disque fongique au centre de boîte de Pétri contenant la souche de *Pseudomonas spp.* fluorescents.

La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogène en présence des souches de *Pseudomonas* spp.fluorescents comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste ou non. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante (Wang *etal.*,2012) :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{R témoin} - \text{R test}) / \text{R témoin} \times 100$$

**R<sub>témoin</sub>** : Distance radicale max de la croissance du champignon.

**R<sub>test</sub>** : Distance radicale sur ligne en direction de l'antagoniste.

### II.2.3. Identification des souches antagonistes

L'identification a concerné que les isolats ayant sélectionné sur la base de leur activité antagoniste

#### II.2.3.1. Examens macro et microscopique

##### a. Examen macroscopique

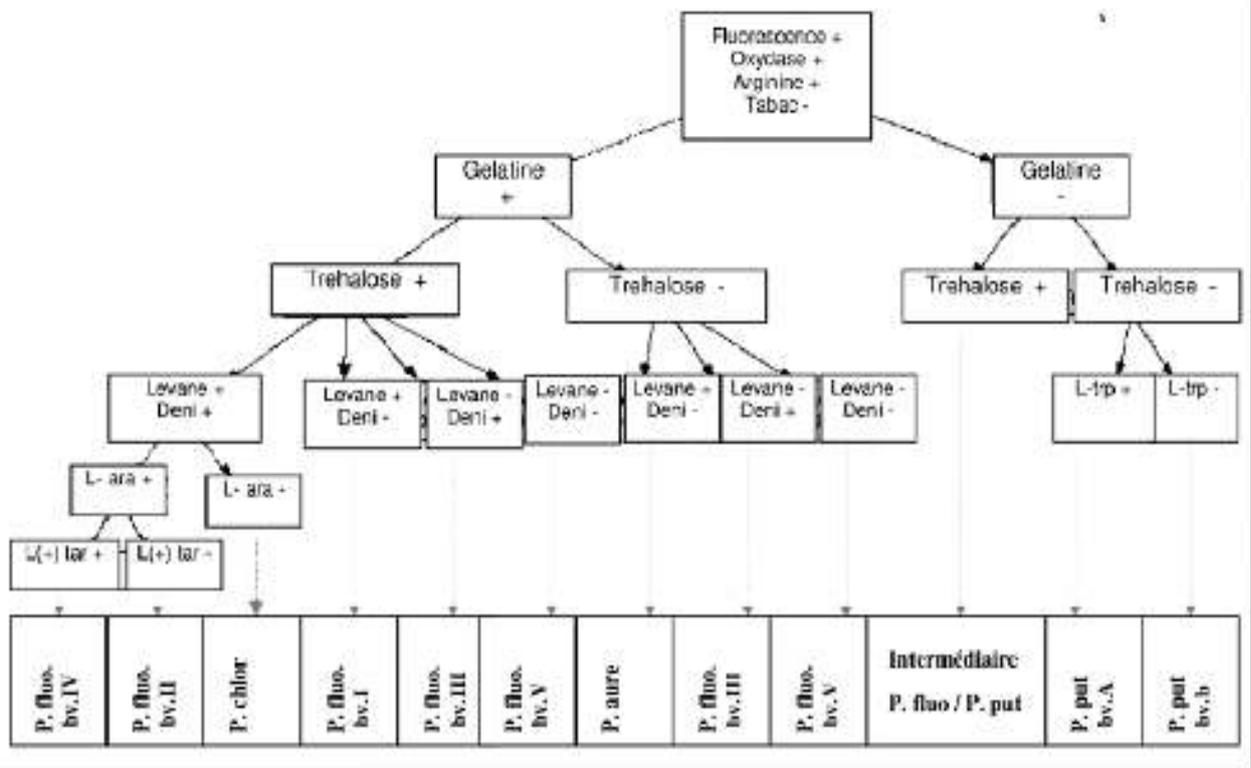
L'examen macroscopique consiste à étudier à l'œil nu l'aspect, la taille, la forme et la couleur des colonies.

##### b. Examen microscopique

L'observation microscopique permet d'étudier l'aspect morphologique de la cellule microbienne, donc examiner les bactéries à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivante) et après la coloration de Gram (Annexe 01).

#### II.2.3.2. Caractérisation physiologiques et biochimique

Pour identifier nos souches nous avons utilisé la clé dichotomique pour l'identification de *Pseudomonas* spp.fluorescents proposé par **Bossis (1995)**(fig.14).



**P** : *Pseudomonas*; **fluor**:*fluorescens*; **chlor**:*chlororaphis*; **aure**: *aureofaciens*; **put**:*putida*, **bv**:biovar **Trp** : tryptophane, **Deni** : dénitrification, **tar** : tartrate ; **ara** : arabinose.   
 + : réaction positive,- : réaction négative.

**Figure 14:** Clé dichotomique d’identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents(**Bossis, 1995**).

**a. Test de fluorescence**

La production du pigment fluorescent a été recherchée sur le milieu King B (**King et al.,1954**)(Annexe 01).Après incubation de 24 à 96 heures à 26°C, le développement du pigment fluorescent a été révélé sous UV(350-400nm), ou à l’œil nu dans le cas d’intensité élevée en comparaison avec un témoin non ensemencé.

**b. Test d’argininedi Hydrolase (ADH)**

Le système enzymatique di Hydrolase de l’arginine permet à certains *Pseudomonas* de se développer sous des conditions anaérobiques, selon deux réactions enzymatiques ; dégradation de l’arginine en citrulline +NH<sub>3</sub> par l’argininedesmidase et transformation de la citrulline en ornithine + CO<sub>2</sub>+NH<sub>3</sub> par citrullineureidase , l’hydrolyse de l’arginine a été testée sur le milieu Moller arginine (ADH5%), les tubes inoculés ont été recouverts par une légère couche de vaseline (fig.15) et incubés à 26°C pendant 5 jours. La réaction positive se

traduit par l'apparition d'une coloration violette suite à l'alcanisation du milieu due à la présence de  $\text{NH}_3$ .



**Figure 15:** Ensemencement de culture bactérienne sur le milieu ADH.

### c. Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à coloration de Gram négative. Il consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxydés un réactif incolore (NN-diméthyle - paraphylène diamine) en un dérivé rose violacé.

Le test est réalisé par mise en contact d'une crème bactérienne jeune de 24h avec un disque d'oxydase. La réponse indique la présence de cytochrome oxydase se manifeste par l'apparition d'une coloration violette après 10 secondes. La réponse est positive tardive lorsque elle apparaît en retard (10 à 60 secondes) au-delà de 60 secondes la réponse est négative (Hildebrand et al., 1988).

### d. Test de gélatine

L'hydrolyse de la gélatine sous l'action d'une enzyme extracellulaire conduit à la libération des acides aminés. Cette réaction se traduit par une transformation du milieu à l'état liquide (Gardan et Luisetti, 1981).

Dans des tubes à essai contenant le milieu gélatine (Annexe 01), on ensemence par piqure centrale une crème bactérienne âgée de 24h (fig. 16). Les tubes à essai sont ensuite incubés à 25°C pendant 7 à 15 jours. Après incubation, les tubes ensemencés ainsi que les témoins non ensemencés sont déposés au réfrigérateur à 4°C pendant 10 minutes pour favoriser la prise du gel. La gélatinolyse traduit par la liquéfaction du milieu.



**Figure 16:** Ensemencement de culture bactérienne par pique centrale sur milieu gélatine.

#### **e. Test de levane sucrase**

Ce test est réalisé selon la technique décrite par **Hildebrand et al. (1988)**. Il consiste à ensemer une culture jeune âgée de 24h sur un milieu levane(Annexe 01). Après une incubation de 3 jours à 27°C, la présence de la levane sucrase est indiquée par l'apparition d'une culture bombée muqueuse et brillante.

#### **f. Test de dénitrification**

Pour certaines bactéries, la réduction des nitrates aboutit à la formation de nitrate ou bien d'azote ammoniacal. La réduction des nitrates est testée sur le milieu eau péptoné nitraté (Annexe01).

Des tubes à essais sont ensemencés avec une crème bactérienne âgée de 24h et incubés à 27°C pendant 5 jours. Après incubation, deux réactifs spécifiques et révélateurs de nitrate ont été additionnés. Si le milieu vire au rose, la souche possède le nitrate réductase, si par contre il reste incolore même après l'ajoute d'une pincée de zinc, il s'agit d'une dénitrification des nitrates (**Hildebrand et al.,1988**).

#### **g. Test d'utilisation de L-tryptophane**

Pour réaliser ce test,les tubes à essais contenant le milieu péptoné exempté d'indole (riche en tryptophane) ont été ensemencés par des cultures bactériennes de 24h. La transformation du tryptophane en indole se traduit après addition de quelques gouttes de réactif de Kovacs par l'apparition d'un anneau rouge(**Bortolatti et al., 2016**).

## II.2.4. Production des métabolites secondaires impliqués dans la phytostimulation et la lutte biologique

### II.2.4.1. Production de l'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA est déterminée selon la méthode standard de **Bricet *al.* (1991)**. Une colonie isolée est étalée sur gélose Luria-Bertani additionnée de : 5 mM de L-tryptophane. La gélose est recouverte de papier Whatman n° 1 (80mm de diamètre), puis incubée à 28°C. Le papier est récupéré, puis traité avec le réactif de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique) (Annexe01). Les disques de papier filtre sont saturées dans une boîte de Pétri en les plongeant directement dans le réactif, après 10 à 30 min, la production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies, et pour les souches productrices d'autres types d'indoles la coloration est jaune à jaune brune (**Naik et Sakthivel, 2006**).

### II.2.4.2 Production d'enzymes

#### a. Phosphatase

La solubilisation des phosphates a été évaluée qualitativement sur milieu Pikovskaya(PKV)(Annexe 01) (**Ahmad *et al.*, 2008**), selon la méthode décrite par **Mehta et Nautiyal.(2001)**. Cette méthode est basée sur la décoloration du Bromo-Phenol-Bleu (BPB) suite à un abaissement du pH du milieu par production de phosphatases.

Des aliquotes de 100µl de cultures fraîches sont déposées sur la gélose de Pikovskaya, soit :

Par la méthode d'ensemencement de la culture sur la boîte de Pétri. La réaction positive se traduit par la décoloration du milieu de culture,

Par la méthode de spot (fig.17). Cependant l'apparition d'un halo autour de spot indique la réaction positive après 96h d'incubation à 28°C. Trois répétitions ont été effectuées. L'indice de solubilisation a été calculé par la formule suivante :

$$\text{IS\%} = [(\text{Diamètre de l'halo (mm)} - \text{Diamètre de la colonie (mm)}) / \text{Diamètre de la colonie (mm)}] \times 100$$



**Figure 17 :** Ensemencement des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents en spot sur milieu PKV.

### **b. Lipases**

La recherche de lipase a été effectuée par la mise en culture des isolats sur le milieu TSA additionné de 1% d'acide oléique (Annexe 01). Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo autour des colonies après 07 jours d'incubation à 28°C (Degrootetal.,1991).

### **c. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)**

- **Enzymes protéolytiques**

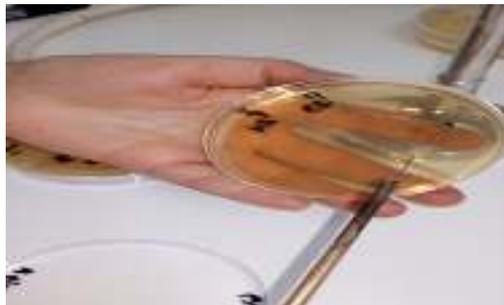
L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode de **Smibert et Krieg (1994)**, par la mise en culture pendant deux jours d'incubation à 28°C des isolats sur gélose au lait écrémé (Annexe 01). Le développement d'un halo autour des colonies indique une réaction positive (**Naik et Sakthivel, 2006**). Le diamètre de la colonie et de l'halo qui l'entourent ont été mesurés (TabIII, Annexe 04).

- **Cellulase**

La production de cellulases est déterminée selon la méthode décrite par **Cattelanetal.,(1999)**. La gélose M9 (**Miller, 1974**) supplémentée de 10g de cellulose et 1.2g d'extrait de levures(Annexes01), est utilisée pour tester le pouvoir hydrolytique par production de cellulases. Les isolats sont étalés puis incubés pendant 8 jours à 28°C. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (**Vermaetal.,2007**).

- **Activité amylolytique**

Des cultures jeunes sont déposées sur gélose nutritif additionnée d'amidon(Annexe01) par ensemencement par stries au centre de la boîte de Pétri (fig.18). Après incubation à 30°C pendant 48h, une solution de lugol préalablement préparée sera dispersée sur toute la surface de milieu. La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre. Ceci implique une absence d'activité amylasique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire (un halo) apparaîtrait au tour de la crème bactérienne. Ce qui traduit une présence d'activité amylolytique chez les isolats. (Vinoth Raj et al., 2009)

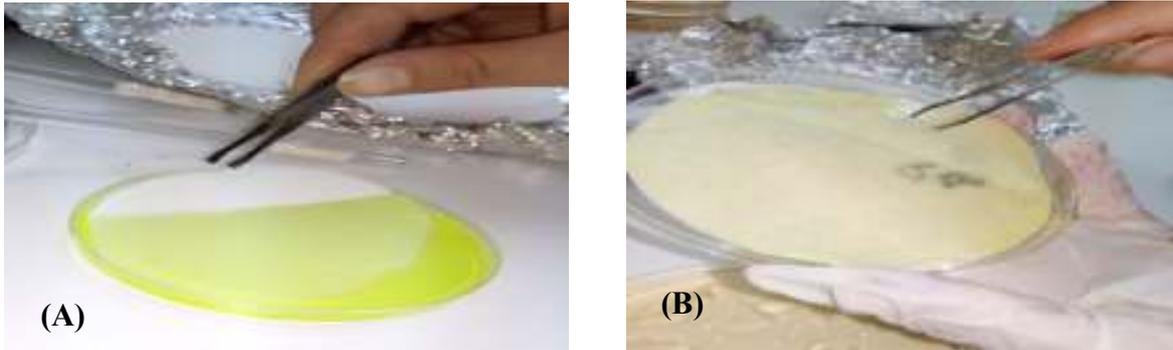


**Figure 18:**Ensemencement de *Pseudomonas spp.* fluorescents sur une gélose additionnée d'amidon.

#### II.2.4.3.Synthèse des antibiotiques

- **Production d'acide cyanhydrique (HCN)**

La capacité à produire l'HCN par les souches de *Pseudomonas* est étudiée selon la méthode de **Bakker et Schippers (1987)**. Une culture bactérienne jeune de 24h de *Pseudomonas spp.* fluorescents a été ensemencée, à l'aide d'une anse, sur le milieu TSA (Tryptone Soya Agar) (Annexe 01) supplémenté avec 4.4 g/l de glycine. Un disque de papier Whatman N°1 de 8 cm de diamètre est imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) (Annexe01) et déposé au fond du couvercle de la boîte (fig.19). La boîte est fermée avec du parafilm et incubée à 28°C pendant 96h. Un résultat positif est traduit par un virage de papier Whatman de la couleur jaune à une couleur orange ou marron, indiquant la production d'HCN par les souches testées.



**Figure 19:**Réalisation du test de production d'HCN.

(A) : Papier Whatman imbibé dans une solution de picrate de sodium.

(B) : Dépôt de disque de papier Whatman au fond du couvercle de la boîte.

### II.2.5. Résistance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents permanente au stress abiotique

Le but des tests de l'effet du stress abiotique sur la croissance des souches est de mettre en évidence l'aptitude des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à réinitier une croissance normale dans les conditions optimales, après avoir subi un stress abiotique.

#### II.2.5.1. Stress salin

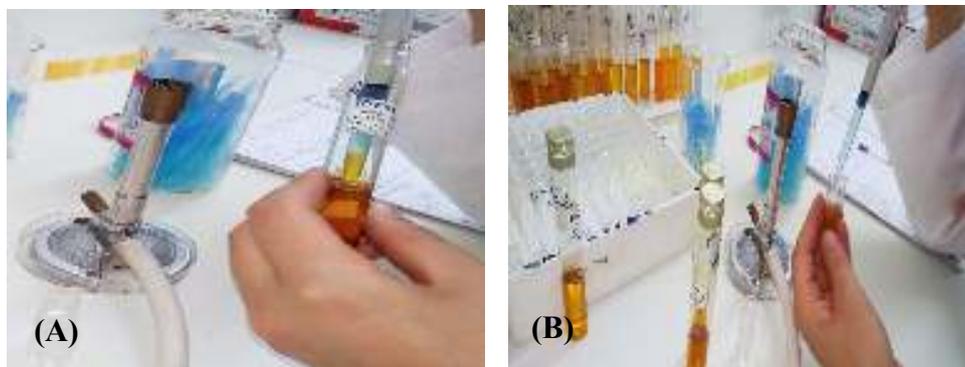
La tolérance au chlorure de sodium (Na Cl) des souches a été testée sur le milieu NGA (Nutrient gélose Agar) (Annexe 01) additionné de Na Cl aux concentrations de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8%. On note la croissance bactérienne après incubation à 26° C pendant 3 à 5 jours (Benchabane, 2005).

#### II.2.5.2. Stress thermique

La résistance au stress thermique a été évaluée par la capacité des souches à reprendre une croissance normale à 26° C après un passage de 48 heures à la température de 41° C (Mattar, 1993). Un volume de 1ml d'une suspension bactérienne (108 ufc/ml) a servi à ensemercer 9 ml du milieu liquide Ayers en tube (Annexe 01) (fig.20). La culture a été incubée pendant 48 heures à 41° C, puis à 26° C pendant 24 heures sous agitation. La croissance bactérienne a été évaluée par la mesure de la densité optique à 620 nm (fig.21) après 48 heures (juste après stress) et 72 heures (24 h après le stress), en comparaison avec les concentrations des témoins incubés uniquement à 26° C sous agitation (Benchabane, 2005).



**Figure 20:** Ensemencement de la suspension bactérienne sur milieu Ayers.



**Figure 21 :** Test de stress thermique.

**(A) :** Préparation de suspension bactérienne.

**(B) :** Mesure de la densité optique.

### II.2.5.3. Stress hydrique

En utilisant le polyéthylène glycol(PEG) pour préparer les différents niveaux de stress hydrique osmotique. Un bouillon nutritif additionné de différentes concentrations de PEG à 800M (0%, 20%, 40% et 60%) a été utilisé pour étudier l'effet de stress osmotique sur les souches sélectionnées. Un volume de 100µl de suspension bactérienne des souches est inoculé dans 5 ml de bouillon nutritif (Annexe 01) avec une concentration de PEG préparé en tube à essai, trois répétitions pour chaque souche.

Un témoin négatif correspond à l'inoculation de 100µl d'eau distillé stérile avec un bouillon nutritif à 0% de PEG. Les tubes ont été disposés sur un secoueur horizontal réglé à une vitesse moyenne à une température ambiante du laboratoire. Après 72h d'incubation, la croissance des souches sur différents concentrations de PEG a été déterminée en mesurons

l'absorbance à une longueur d'onde de 300nm en utilisant un spectrophotomètre (Manjunatha, 2017).

#### II.2.5.4.Résistance aux antibiotiques

##### A. Principe

Ce test consiste à tester la résistance ou la sensibilité à la streptomycine, au chloramphénicol et à l'acide nalidixique aux concentrations de 20, 50 et 100µg/ml sur milieu MH liquide et solide (Annexe01) (Courvalin et Leclercq, 2012).

##### B. Mode opératoire

- **Premier jour**

A partir d'une culture bactérienne pure, 2 à 3 colonies sont échantillonnées à l'aide d'une anse de platine, inoculées dans 5 ml d'un bouillon nutritif et incubées pendant 18 à 24 h à 26 à 28°C. C'est le bouillon incubé (BI).

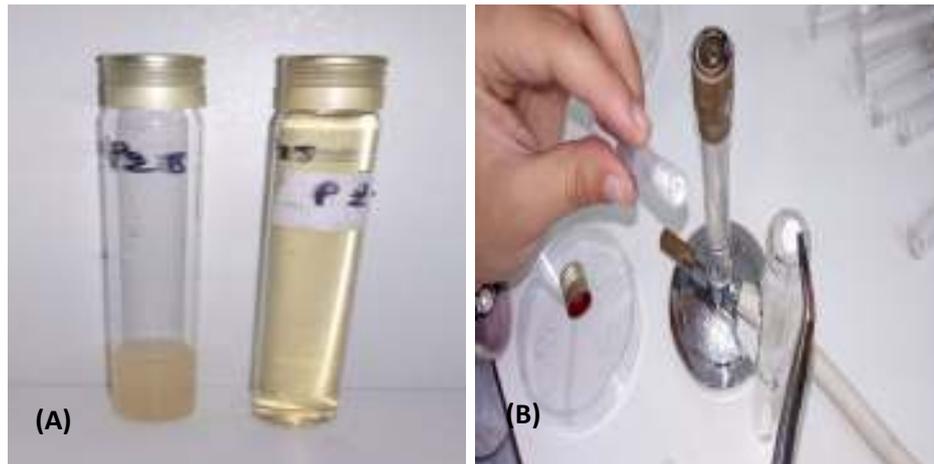
- **Deuxième jour**

- 25 ml de Muller-Hinton liquide a étéensemencé avec 0.1 ml de la culture bactérienne (BI), c'est le bouillonensemencé (BE).
- Préparation des solutions d'antibiotiques

- Les disques d'antibiotiques ont été préalablement préparés aux concentrations désirées on va les découper si nécessaire à l'aide d'un bistouri stérile. On a réalisé la répartition à l'aide d'une pince stérile dans chaque tube.

- Ces différents disques d'ATB, ainsi que leur charge et la concentration finale sont illustrés dans le tableau IV (annexe04)

- 2 ml du BE sont distribués dans chaque tube contenant les ATB. Après agitation les tubes sont incubés à 18 à 24 h à 26°C (fig.22).



**Figure 22:** Test de la résistance aux antibiotiques.

(A) : Ensemencement MH liquide avec la culture bactérienne.

(B) : Préparation des solutions d'antibiotiques.

- **Troisième jour**

Sur une boîte de MH, 3 stries parallèles de 5 cm sont tracés au verso (correspondant aux concentrations d'ATB). A l'aide d'une anse calibré à partir des bouillons contenant les disques d'antibiotique sont prélevés et ensemencés au niveau de stries tracées (fig.23). L'incubation a été réalisée à 28°C pendant 18 à 24 h.



**Figure 23:** Ensemencement de BE sur gélose MH.

- **Quatrième jour**

Lecture de la boîte ensemencée avec les bouillons contenant les antibiotiques. La lecture se fait par la présence ou pas d'une croissance bactérienne (des colonies) au niveau de chaque strie.

### III.2. Discussion

La rhizosphère des plantes est connue pour être une niche écologique privilégiée pour les différents types de micro-organismes du sol en raison de la disponibilité des nutriments riches. Les rhizo-dépôts stimulent et sélectionnent la communauté microbienne associée à la rhizosphère des plantes, où la communauté bactérienne est la plus influencée (**Lynch, 1990**).

*Pseudomonas* spp. fluorescents sont parmi les espèces bactériennes les plus étudiées à l'échelle mondiale grâce à leur très vaste distribution dans les niches écologiques et aux méthodes simples de culture. Ces bactéries sont présentes dans presque tous les écosystèmes mêmes les habitats extrêmes. Cette abondance reflète le caractère adaptatif de ces souches qui a été déjà mis en évidence par **Latouretal.,(1996)** concernant les souches *P.fluorescens*.

Cette étude consiste à isoler des rhizobactéries à partir d'un échantillon de sol de la tomate prélevé de la région du l'ArbaaBlida. 28 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été isolées en se basant sur la présence d'un pigment jaune verdâtre fluorescent sous UV.

Concernant l'activité antagoniste, les résultats obtenus ont montré que le degré d'antagonisme varie d'une souche à l'autre. Nos résultats sont intéressants par le fait qu'ils rendent compte du potentiel antifongique des rhizobactéries antagonistes très important. Parmi les 28 souches isolées, 22 souches ont manifestées une action inhibitrice vis-à-vis le champignon phytopathogène : *F.oxysporum*.

Le diamètre des colonies mycéliennes de *F. oxysporum* a été réduit fortement en présence des souches antagonistes de *Pseudomonas*, comparé au témoin non inoculé. L'action inhibitrice la plus forte est estimée à 83.88% pour la souche P17 vis-à-vis de *Foa* (G1) sur le milieu PDA, 81.86% pour la souche P8 vis-à-vis de *Foln* (F2) sur le milieu KB. La souche P14 montre la plus faible action inhibitrice avec un pourcentage d'inhibition de 6.4% vis-à-vis de *Fol* (G2) sur le milieu mixte. Les résultats obtenus, dans nos essais d'antagonisme *in vitro*, montrent que l'effet antagoniste exercé n'est pas spécifique, les spectres d'action des souches de *Pseudomonas* sont variables.

Le test de sélection des souches PGPR *in vitro*, est une étape indispensable pour la sélection de souches phytobénéfiques intéressantes avant de passer aux tests *in vivo* pour éviter les risques d'avoir des souches non intéressantes qui peuvent être phytopathogènes.

L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces et souches testées, mais aussi de la composition du milieu de culture (**Digat, 1992 ;Benchabane, 2005**). Etant

donné que la sélection *in vitro* des souches bénéfiques œuvre dans une perspective de localiser celles réunissant le maximum de mécanismes d'inhibition des pathogènes, l'antagonisme *in vitro* ne peut pas à lui seul s'imposer comme le critère fondamental de sélection. Ceci pourrait suggérer la présence chez une même souche de nombreux métabolites, variables selon le milieu de culture utilisé (Meyer et Abdallah, 1978; Leong, 1986).

La différence dans l'activité antagoniste exercée par ces bactéries peut être expliquée par la production d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes. Cela dépend de l'espèce, de la nature du métabolite ainsi que la quantité libérée dans le milieu utilisé (Kamilova et al. 2005).

Sur le milieu KB, le principal mécanisme mis en cause de l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents pourrait liée à la synthèse des sidérophores qui chélatent les ions de fer, suit à la production des pigments fluorescents (Hassal et al., 1991 ; Digat, 1992 ; Weller et Thomashow, 1993).

Sur les milieux PDA et mixte, ces résultats suggèrent que l'activité antagoniste sur les deux milieux, n'est pas due à l'action de sidérophore, car ces deux milieux ne favorisent pas la production des pigments fluorescents. Alors nous pouvons suggérer que l'activité antagoniste a été liée à la production d'autres métabolites secondaires.

Parmi les mécanismes avec lesquels *Pseudomonas* empêche la croissance des phytopathogènes sont la synthèse des métabolites secondaires tels que les antibiotiques. Ces métabolites ont montré leur efficacité *in vitro* à l'égard des organismes pathogènes (Dahah, 2017).

Les *Pseudomonas* antagonistes sont en effet connues pour être productrices d'une panoplie de molécules inhibitrices tel que les sidérophores, l'HCN et la protéase, qui leur confèrent leurs caractères d'agents potentiels de contrôle biologique de plusieurs phytopathogènes et agents délétères des cultures (Haas et Défago, 2005).

Howell et Stipanovic (1979), ont été les premiers qui ont montré que *Pseudomonas* produit un antibiotique pour le contrôle contre les agents phytopathogènes. Yuan et al., (2012) ont noté que les composés volatils produits par les bactéries a réduit la croissance du mycélium et inhibé la germination des spores de *F. oxysporum*. Les substances volatiles produites par les antagonistes pourraient diffuser facilement et inhiber la croissance de l'agent pathogène *in vitro* et même dans le sol, elles diffusent facilement à travers les pores du sol et

inhibent les pathogènes. La variabilité dans l'inhibition observée entre les souches, s'expliquerait par la quantité d'antibiotique produite (Wheatley, 2002).

Haas et Defago (2005) ; Weller (2007) ont suggéré la production de nombreux métabolites antifongiques chez le genre *Pseudomonas* notamment les phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) Le pouvoir inhibiteur des composés phénaziques est due à la capacité oxydo-réductrice de ces métabolites qui induise l'accumulation de peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres qui entraînent la mort de la cellule en attaquant les membranes et le matériel génétique (Mavrodi, et al. 2006).

Par ailleurs, ce genre bactérien est également capable de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines (Lemanceau et al., 2009). Lee et al., (2010), ont rapporté sur l'isolement des souches PGPR appartenant au genre *Pseudomonas* manifestant un excellent pouvoir d'inhibition des champignons.

Plusieurs travaux ont également démontré le rôle de rhizobactéries dans l'inhibition de *F. oxysporum* et les mécanismes avec lesquels ils provoquent l'effet bénéfique (Landa et al., 1997; Landa et al., 2004 ; Karimi et al., 2012). En outre, l'efficacité d'un agent de contrôle biologique donne des résultats pour la plupart, non seulement d'un mécanisme unique, mais d'une combinaison de différents modes d'actions (Alabouvette et al., 1993).

Dans notre étude, les isollements effectués ont permis de sélectionner 28 souches de *Pseudomonas* dont 22 souches étant des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes. La caractérisation phénotypique a été utilisée pour identifier et classer les isolats selon certains critères. Cependant ces propriétés nutritionnelles n'ont pas permis de réaliser une identification totale et précise. Les caractérisations phénotypiques utilisées (morphologiques, pigmentaires, la réaction avec certains colorants et les exigences nutritionnelles) n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique totale et précise (Mezaache, 2012). Il est admis, chez bactéries rhizosphériques, l'existence d'une très grande diversité spécifique et écologique, ainsi les méthodes phénotypiques utilisées pour leur taxonomie restent insuffisantes.

Les études réalisées depuis plus d'un siècle sur ce genre bactérien ont mis en évidence une complexité dans ses caractéristiques taxonomiques. La majorité des études taxonomiques sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents a révélé la complexité de la variabilité au niveau des différentes espèces appartenant à ce groupe (Palleroni, 1993 ; Digat et Gardan, 1987; Bossiset et al., 2000 ; Palleroni, 2015). En effet, il est souvent difficile de réaliser une

identification précise et de faire la distinction entre les différentes espèces (**Benchabane, 2005; Garrido-Sanz et al., 2016**).

Concernant la production des métabolites secondaire, la mise en évidence de la production d'AIA *in vitro* par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnées, nous a permis de constater que la totalité des souches étudiées sont capable de synthétiser cet phytohormone en présence de tryptophane. Nos résultats sont en accord avec celles de **Naik et Sakthivel, (2006)** et de **Mezaache, (2012)**, qui avaient suggéré l'induction de la production d'AIA en phase stationnaire de croissance, probablement due à l'induction d'enzymes clé impliquées dans la biosynthèse d'AIA (**Oberhansli et al., 1991; Garcia de Salmone et al., 2001**). L'AIA est un régulateur clé de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes, notamment la division et l'élongation cellulaires, la différenciation, les tropismes, la dominance apicale, la sénescence, l'abscission et la floraison (**Ahemad et Kibret, 2014**).

La biosynthèse de l'AIA est largement répandue chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, d'une manière prédominante à partir du tryptophane. Le L- tryptophane est considéré comme le précurseur de l'AIA, son addition au milieu favorise et augmente la synthèse de cette hormone (**Ali et al., 2009**). Cependant, les exsudats racinaires sont une source naturelle de L- tryptophane pour la microflore rhizosphérique (**Kamilova et al., 2006 ; Dastager et al., 2010 ; Ziam, 2016 ; David et al., 2018**).

Par rapport la production d'HCN, Les résultats de notre étude, sur la production de substances volatile (HCN), ont montré que parmi les 22 souches antagonistes, 16 souches (72.72%) ont montré une cyanogénèse positive. Une différence existe entre les souches en termes d'intensité de production de l'HCN, celle-ci revient à la variabilité d'expression des gènes (*hcnB* et *hcnC*) présentés chez les *Pseudomonas* producteurs. Cette variabilité permettant de les classer en deux groupes : faibles (P2, P3, P5, P6, P9, P10, P11, P12, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P26 et P27) et forts producteurs (P1 et P5). L'absence de production chez certaines souches (P4, P8, P13, P14, P25 et P28) serait due à la perte des gènes responsable de la biosynthèse (**Ramette et al., 2003**).

Nos résultats corrélerent avec les travaux de plusieurs auteurs (**Fremane et al., 1975 ; Askeland et Morrison, 1983 ; Siddiqui et al., 2005 ; Frydenlund et al., 2012 ; Reetha et al., 2014**), qui ont montré la capacité des différentes souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à produire de l'HCN. Toutefois, nos résultats semblent indiquer l'existence d'une corrélation entre l'HCN et l'activité antagoniste. L'HCN détectés peut être impliqué dans

l'inhibition de la croissance mycélienne de *Foa*, *Fol* et *Foln* détectés dans les essais Précédents par confrontation à distance avec les rhizobactéries antagonistes. Les travaux *invitro* de **Blumer et Haas (2000)**, confirment notre hypothèse où la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes a été inhibée suite à la production de HCN via la phase gazeuse. La production de l'HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression de différents agents pathogènes, en agissant directement sur les cellules en bloquant les cytochromes oxydases dans la chaîne respiratoire. Il contribue également à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci (**Blumer et Haas, 2000**).

Le test de la solubilisation du phosphore *in vitro* a révélé que nos souches de *Pseudomonas*, à l'exception de P1, P4 et P8 ont la capacité de solubiliser le phosphore. Cette solubilisation est indiquée par la formation d'un halo de solubilisation, la variation du diamètre de ce halo montre qu'il y a une variabilité entre les isolats testés avec un IS allant de 19.04 % à 92.30 % ou par changement de la couleur du milieu de culture.

La solubilisation n'est pas due à une production d'acides organiques, mais plutôt à une production d'enzymes (phosphatases). Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation concordent avec plusieurs travaux qui ont démontré la capacité des bactéries rhizosphériques à solubiliser les phosphates (**Rodriguez et Fraga, 1999 ; Verma et al., 2001 ; Mezaache, 2012 ; Alemu, 2015 ; Paul et Narayan Sinha, 2016**).

Elles peuvent être considérées comme des biofertilisants car ces bactéries sont capables de libérer une quantité de phosphore supérieure à celle nécessaire à leur métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus (**Kloepper et al., 1989**). Les PGPR solubilisent et minéralisent directement le phosphore inorganique ou facilitent la mobilité du phosphore organique par le renouvellement microbien et/ou augmentent le système racinaire (**Richardson et Simpson, 2011**). Le phosphore est impliqué dans les processus métaboliques des plantes, tels que la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (**Khan et al., 2010**).

Les résultats de la synthèse de protéase montrent que 86.36% des souches sont positivement protéolytiques, ce qui concorde avec les résultats de nombreux travaux qui confirment la production d'enzyme de protéase par les souches de *Pseudomonas* (**Koka et Weimer, 2000 ; Rjamohan et al., 2002 ; Kalaiarasi et Sunitha, 2009**).

Les protéases sont les enzymes industrielles les plus importantes exécuter une grande variété de fonctions et avoir diverses applications biotechnologique importantes (**Kalaiarasiet Sunitha, 2009**). Ils sont des enzymes extracellulaires sécrétées par les bactéries, principalement les espèces de *Pseudomonas*(**Rajmohan et al., 2002 ;Mezaache, 2012**). Ils jouent un rôle dans la dégradation des parois cellulaires fongiques (**Stanier et al., 1966 ; Mezaache, 2012**).

D'après nos résultats, la production de cellulases est négative chez toutes les souches de *Pseudomonas*. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la dégradation de la cellulose est complexe. Elle nécessite l'action synergique de trois catégories d'enzymes. En effet, seuls quelques organismes ont la capacité de produire de grandes quantités d'enzymes de dégradation de la cellulose insoluble, en sucres solubles *in vitro*. Les trois groupes enzymatiques du complexe de cellulase sont respectivement : endo- $\beta$  (1-4) glucanases, exo- $\beta$  (1-4) glucanases et  $\beta$ -glucosidases(**Mandels, 1981**).

La mise en évidence de la synthèse d'amylase montre que 17 souches (77.27%) sont positivement amylolytique. Nos résultats sont concordés avec travaux de ces auteurs (**SunderAlariya et al., 2013 ; Khannous et al., 2014**).

Le genre de *Pseudomonas* est un producteur prolifique d'un certain nombre d'enzymes extracellulaire telle que l'amylase (**Khannous et al., 2014**). Les amylases sont parmi les plus importantes enzymes dans l'industrie actuelle. Les bactéries dégradants l'amidon sont les plus importants pour l'industrie telle que l'alimentation, la fermentation, le textile et le papier (**SunderAlariya et al., 2013**).

Concernant la synthèse de lipase, nos résultats montrent que tous les souches testées sont incapables de produire le lipase, ses résultats sont en contradiction avec plusieurs travaux prédictifs qui ont démontré la production de lipase par les *Pseudomonas*(**Eijkman, 1901 ;Munimbazi et Bullerman,1998 ;Fickers et al.,2007**). Les lipases ont été mises en évidence en 1901 chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*(**Eijkman, 1901 ;Fickers et al.,2007**).

Sous des conditions de stress abiotique, les PGPR synthétisent ou accumulent certaines molécules dites « solutés compatibles », car compatibles avec le fonctionnement physiologique de la cellule entière. Ces molécules permettent à la cellule de s'adapter aux conditions sévères de stress salin, thermique, nutritionnel, oxydatif etc. (**Caldas et al., 1999 ;**

**Oren, 2003 ; Rai, 2017**), de même, le stress abiotique active chez les PGPR la synthèse de biomolécules actives jouant un rôle dans le captage des nutriments et l'adaptation de ces microorganismes et des plantes co-environnantes aux conditions inhabituelles.

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnées à la base de l'activité antagoniste et la production des métabolite secondaire ont été analysées pour leur capacités à résister aux stress abiotique. Nos résultats montrent que La totalité des 22 souches testées sont résistées au déférent paramètre abiotique.

La mise en évidence de la résistance au stress salin montre que toutes les souches se développent aux concentrations de 0 à 7 % en Na Cl. La concentration de 8 % en Na Cl a été tolérée par 11 souches. La totalité de nos souches ont montré une halotolérance appréciable aux concentrations de 0 à 8% en Na Cl, Cela se rapproche de l'étude de **Benchabane, (2005) ; Diaw et al.,(2018)**. Par contre, ces résultats sont contradictoires avec ceux de **Deshwal et Kumar, (2013)** qui ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* ont une tolérance au sel pour des teneurs ne dépassant pas 1.17%.

La rhizosphère de la plante de tomate, abritent plusieurs espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Cependant, le comportement des *Pseudomonas* spp. fluorescents peut être directement influencé par la salinité. Il existe une limite de tolérance vis à vis du Na Cl (8%) et au-delà de cette concentration, on a une baisse significative du nombre de colonies. Les concentrations supérieures entraînent une réduction du nombre de colonies pour tous les isolats. Il existe un seuil de tolérance au sel pour chaque souche de *Pseudomonas*. Ces isolats de *Pseudomonas* pourraient être utilisés dans les sols salés afin d'améliorer les rendements des cultures (**Diaw et al., 2018**).

La concentration des sels peut être élevée dans les sols irrigués, surtout en situation de mauvais drainage ou de sols lourds et les échanges ioniques sont intenses entre les racines, le sol et la microflore tellurique ; ainsi, l'accumulation de sels peut exercer un effet sélectif positif sur les microorganismes halotolérants (**Benchabane, 2005**).

L'activité de ces microorganismes peut être influencée par plusieurs facteurs parmi lesquels la salinisation des sols qui est l'un des facteurs limitant la productivité végétale et le rendement agricole (**Baatour et al., 2004 ; Ly et al., 2014 ; Diaw et al., 2018**)

Le développement des *Pseudomonas* spp. fluorescents peut être influencé par la salinité. Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de la rhizosphère de tomate a montré une variabilité du nombre de colonies en fonction des différentes concentrations en NaCl. Toutes les souches tolèrent le sel jusqu'à la concentration 8%. Ces résultats sont en

accord avec ceux de **Deshwal et Kumar, (2012)** qui ont montré que la plupart des microorganismes ont des besoins limités en sels. Les teneurs en NaCl de 8% ralentissent fortement la croissance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ce phénomène est dû au fait que les teneurs en NaCl supérieures à 8% entraînent un choc hyper-osmotique pour les cellules vivantes du fait de la perméabilité des membranes cellulaires provoquant une plasmolyse suite à une augmentation de la teneur en sel. Cette plasmolyse aboutit à l'inhibition de certaines fonctions cellulaires comme l'absorption des nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse de macromolécules, ce qui provoque la mort des cellules (**Saum et Müller, 2007**). La tolérance vis-à-vis du sel est donc un caractère propre à chaque souche de *Pseudomonas*. Ces isolats de *Pseudomonas* pourraient être utilisés dans les sols salés afin d'améliorer les rendements des cultures dans ces zones.

Les résultats de la résistance au stress thermique et hydrique montrent que nos souches ont été insensibles aux stress thermique et hydrique. La température est un facteur qui détermine la nature et les conséquences des interactions rhizobactéries – plantes (**Digat, 1994**). Ce qui concorde avec les travaux de plusieurs auteurs (**Digat, 1991 ; Benchabane, 2005**).

Les résultats obtenus par le test du stress hydrique montrent que tous les souches sont tolérantes au stress d'osmolarité ce qui concorde avec les résultats de **Manjunatha et al., (2017)**.

Par rapport la résistance au antibiotique, les résultats de nos études montrent que les souches sélectionnées possèdent une résistance de haut niveau aux 3 antibiotiques testés. Toutes les souches sont résistantes à la streptomycine alors que 86.36% sont résistantes au chloramphénicol à 100µg/ml et 72.72% sont résistantes à l'acide nalidixique. Le choix de ces molécules d'antibiotiques est lié au fait que les *Pseudomonas* spp. fluorescents en sont communément résistants et elles sont représentatives de l'état de résistance globale de ces rhizobactéries aux substances antibactériennes.

De nombreux travaux ont signalé des fréquences élevées de souches bactériennes rhizosphériques résistantes à divers antibiotiques. Les travaux de **Digat et Gardan (1987)**, réalisés sur 252 souches de *P. fluorescens* et de *P. putida* ont révélé des fréquences de résistance de 92,4 % vis à vis du chloramphénicol et de 54,59 % vis-à-vis de l'acide nalidixique. Avec les sulfamides, les  $\beta$ -lactamines et la clindamycine, les fréquences de souches résistantes ont dépassé le seuil de 90 %. **Alvarez et al., (1995)** ont montré sur une collection de bactéries de la rhizosphère de tomate que 68 % des souches étaient résistantes à

la streptomycine (100 µg/ml), 44,90 % au chloramphénicol et 90,48 % à l'oxytétracycline. La fréquence de souches résistantes aux antibiotiques est élevée parmi les souches rhizosphériques par rapport à celles du sol non cultivé. La résistance aux concentrations élevées d'antibiotiques a été corrélée chez les rhizobactéries à la survie et l'adaptation des inoculums microbiens aux conditions de la rhizosphère (**Döbereiner et Baldani, 1979**).

Les résultats obtenus démontrent l'efficacité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescens comme de agents de biocontrôle, biofertilisant et phytostimulateurs. Ceci laisse envisager la possibilité de les exploiter comme des inoculas bactériens dans les prochaines études expérimentales en agriculture dans l'objectif de produire des biopesticides. Ce qui s'impose comme une alternative aux produits chimiques, tant nuisibles pour l'environnement que pour la santé publique.

## Conclusion

---

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. L'étude du rôle de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur.

Ce travail a eu pour objectifs d'isoler et sélectionner des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents performantes pour leurs propriétés de biocontrôle, biofertilisants et phytostimulations des maladies des plantes et leurs résistances au stress abiotique.

La première étape qui consistait à isoler des souches bactériennes à partir de la rhizosphère de tomate a permis de retenir 28 souches fluorescentes.

La sélection que nous avons menée sur les 28 souches isolées nous a permis de retenir 22 souches (78.57%) de *Pseudomonas* antagoniste contre *F.oxysporum*.

Les 22 souches de *Pseudomonas* sélectionnées ont été identifiées phénotypiquement par des tests morphologiques, culturels (l'aspect de la fluorescence : jaune-verdâtre) et biochimiques afin de les rapprocher aux trois espèces fluorescentes possibles : *P. chlororaphis*, *P.fluorescens* et *P.putida*. Nos résultats montrent que 22 souches testées appartiennent au groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les isolats maintenus testés pour leurs pouvoirs promoteurs de la croissance végétale ont pour la plupart manifesté des propriétés phytostimulatrices à travers la synthèse d'AIA et / ou biofertilisant par la capacité de solubilisation des phosphates. Le caractère de biocontrôle est traduit par l'inhibition de phytopathogènes suite à la production d'HCN et / ou des enzymes lytiques dégradant la paroi fongique.

A travers nos résultats, il ressort que les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont la capacité de s'adapter aux conditions environnementales. Nos résultats montrent que toutes les souches sont résistantes aux effets de salinité, température, stress hydrique et aux antibiotiques.

Les résultats obtenus jusque-là démontrent l'efficacité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents comme agents de biocontrôle, biofertilisant et phytostimulateurs. Ceci laisse envisager la possibilité de les exploiter comme des inoculants bactériens dans les prochaines études expérimentales en agriculture dans l'objectif de produire des biopesticides.

## *Conclusion*

---

Ce qui s'impose comme une alternative aux produits chimiques, tant nuisibles pour l'environnement que pour la santé publique.

Enfin, ce travail constitue une initiation prometteuse visant le développement d'une procédure de formulation d'engrais biologiques et de sélection de bactéries utiles en agriculture. Les résultats de cette étude encouragent le passage vers une « bio-agriculture » saine et bénéfique à la santé humaine et à l'économie nationale.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses et multiples :

- ❖ Effectuer une identification plus poussée et fiable par des moyens moléculaires tels que le PCR et le séquençage complet ou partiel pour mieux caractériser les isolats les plus actifs.
- ❖ L'étude de l'effet de pH sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents.
- ❖ La recherche d'autres métabolites secondaires à l'origine de ces effets bénéfiques.
- ❖ L'extraction et la purification des métabolites secondaires responsables de l'activité inhibitrice des *Pseudomonas*.
- ❖ La recherche des gènes impliqués dans la production des métabolites secondaires.
- ❖ Etudier l'effet de la salinité sur les activités promotrices de la croissance végétale (solubilisation des phosphates, production d'HCN, activité antifongique,...).
- ❖ L'introduction de ces souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents comme agent de biocontrôle dans de nouvelles rhizosphères à grande échelle.

## *Conclusion*

---

## *Conclusion*

---

# *Introduction*

*Chapitre I*  
*Synthèse*  
*Bibliographique*



*Chapitre II*  
*Matériels et*  
*Méthodes*

*Chapitre III*

*Résultats et*

*Discussion*

*Références  
bibliographique*

*Conclusion*

# *Annexes*

## Références bibliographique

### A

- **Ahemad M. et Kibre M., 2014.** Mecanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria :current perspective. *Journal of King Saud University Science*. Vol, 26, 1–20.
- **Alabouvette C., Lemanceau P., Steinberg C., 1993.** Recent advances in biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticide Sciences*. Vol, 37: 365–373.
- **Alemu F., 2015.** Isolation of *Pseudomonas fluorescens* from rhizospheric soil of faba bean and assessment of their phosphate solubility in vitro, Ethiopia. *Dilla University. Sch. Acad. J. Biosci.* Vol, 1(17) :346-351.
- **Ali S. k. Z., Sandhya V., Grover M., Kishore N., Rao L.V. et Venkateswarlu B., 2009.** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils*. Vol, 46: 45–55.
- **Alvarez M. B., Gagné. S. et Antoun H., 1995.** Effect of compost on rhizospheremiroflora of the tomato and on the incidence of plant growth – promoting rhizobacteria. *Appl. Envir. Microb.* Vol, 61 (1) :194-199.
- **Ameur H., 2014.** Effet d’osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de Streptomyces et de plantes d’intérêt agricole sur sol salé ou aride. Université Ferhat Abbas Sétif 1, Faculté des Sciences de la nature et de la vie. Thèse de doctorat. 120p.
- **Amir H.G., Shamsuddin Z.H., Halimi M.S., Marziah M. et MF. Ramlan., 2005.** Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. *Commun SoilSci Plant Anal* 36:2059–2066.
- **Amkraz Nadiya., 2013.** Utilisation Des *Pseudomonas* spp. fluorescents et Des Plantes Aromatiques et Médicinales contre *Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Michiganensis*, Agent Du Chancre Bactérien De La Tomate, Thèse Doctorat, Faculté Des Sciences, Agadir.
- **Angers, D. A et G. R. Mehuys., 1989.** Effects of cropping on carbohydrate content and water stable aggregation of a clay soil. *Can. J. SoilSci.* 69: 373- 380.
- **Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H. et Oyaizu H., 2000.** Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1563–1589.
- **Arango M. et S. Tarnawski S., 2002.** La plante: une intermédiaire essentiel de Pédologie. 26: 5-9

- **Arif F., 2015.** Effets du stress salin et d'osmoprotecteurs naturels sur la germination de blé dur (*Triticum durum*) inoculé par *Pseudomonas fluorescens*. Thèse Doctorat en Sciences microbiologique. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 155p.
- **Askeland A.T. et Morrison M., 1983.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied And Environment Microbiology*, Vol.45, No.6.
- **Asuming-Brempong S., Gantner S., Adiku S.G.K., Archer G., Edusei V. et Tiedje J.M., 2008.** Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 2811–2818.

## B

- **Baatour O, M'rah S, Ben Brahim N, Boulesnem F, Lachaal M., 2004.** Réponse physiologique de la gesse (*Lathyrus sativus*) à la salinité du milieu. *Revue des Régions Arides*, 1 (N° Spécial) : 346-358.
- **Bakker A. W. et P. Schippers., 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 451- 457.
- **Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J. et Van Loon L. C., 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97: 239-243.
- **Bashan Y. et De-Bashan L. E., 2005.** Bacteria. *Elsevier, Oxford, U.K. Basis for a disease control system*, pp. 340-349.
- **Bashan Y. et Holguin G., 1997.** Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Can. J. Microbiol.* 43:103–121.
- **Bell-Perkins L. J. et Lynch J.M., 2002.** Rhizosphere microbiology. *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada. p. 2713-2728
- **Benchabane M., 2005.** Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Thèse Doctorat d'état*, FSB-USTHB, Alger, 235 p.
- **Berendsen R.L., Pieterse C.M. et Bakker A.H.M., 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. V:17, NO.8:478-486.
- **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp.141-171.

- **Bhattacharjee S., Lee L.Y., Oltmanns H., Cao H., Veena J. et Cuperus et Gelvin S.B., 2008.** AtImpa-4, an Arabidopsis importin I isoform, is preferentially involved in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Cell*, 20: 2661-2680
- **Blumer C. et Haas D., 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173: 170-177.
- **Bossis E., Lemanceau P., Latour X. et Gardan L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20, 51-63.
- **Botelho G.R. et Mendonça-Hagler L. C., 2006.** Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops - an overview. *Braz. J. Microbiol.* 37: (4):401- 416.
- **Boukerma L., 2012.** Effet des PGPR (*Pseudomonas* spp. fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. Thèse de Magister, Univ. Saad Dahlab, Blida, Algérie, p202.
- **Bouzid S., 2010.** Étude de l'effet de la salinité et de la présence du molybdène Sur le comportement écophysologique de deux variétés de plantes de l'espèce *Phaseolus vulgaris* L. Université Mentouri Constantine FSNV N° d'ordre : 081/ mag/ 2010 N° de série : 004/ SN/ 2010. □
- **Bowen G.D. et Rovira A.D., 1976.** Microbial Colonization of Plant Roots. *Annuel. Revue. Phytopathol* 14 : 121-144.
- **Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. et Garrity G.M., 2005.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria). Springer, New York.
- **Bresson J., 2013.** Interaction plante micro- organisme : implication de la rhizobactérie *Phyllobacterium Brassicacearum* dans les réponses d'*Arabidopsis thaliana* au stress hydrique. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II. 220.
- **Bric, J. M., Bostock, R. M., And Silverstone, S. E. 1991.** Rapid In Situ Assay For Indoleacetic Acid Production By Bacteria Immobilized On Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 535-538.
- **Buyer J.S., Teasdale J.R., Roberts D.P., Zasada I.A. et Maul J.E., 2010.** Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems, *Soil Biol. Biochem.*, 42: 831-841.

## C

- **Caldas T., Demont-Caulet N., Ghazi A. et Richarme G., 1999.** Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiol.* 145: 2543-2548.
- **Castric P., 1977.** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen cyanides biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 130: 826-831.
- **Cattelan A. J., Hartel P.G. et Fuhrmann J.J., 1999.** Screening for Plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63: 1670-1680 .
- **Chaihran M. et Lumyong S., 2009.** Phosphatase Solubilization Potential And Stress Tolerance Of Rhizobacteria From Rice Soil In Northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25 : 305-314.
- **Cherif H., 2012.** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et Pantoea agglomerans isolées de sols arides. Thèse Doctorat en Sciences. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 162p.
- **Colares G.B. et Melo V.M.M., 2013.** Relating microbial community structure and environmental variables in mangrove sediments in side *Rhizophora mangle* L. habitats, *Appl. Soil Ecology*, 64: 171–177.
- **Compant S., Duffy S., Nowak J., Clement C. et Barka E.A., 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principales, mechanisms of action, and and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9):4951-4959.
- **Courvalin P. et Lecercro R., 2012.** AntibioGramme. 3eme édition, Edition ESK, P800.
- **Csonka L.N., 1989.** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53:121-147.

## D

- **Da Costa M. S., Santos H. et Galinski E.A., 1998.** On overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and Archeae, p. 118-153. In G. Antranikian (ed.), biotechnology of extremophiles. *Springer-verlage*, Berlin, Heidelberg.
- **Dahah H., 2017.** Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires secrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Doctorat Abdelhamid Ibn-Badis De Mostaganem.
- **Dastager S. G., Deepa C. K. et Petey A., 2010.** Potential plant growth-promoting activity of Serratia nematophila NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27 (2): 259-265.

- **Davet P.,1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. *INRA*. (eds.), Paris.
- **David B. V., Chandrasehar G. et Selvam P. N.,2018.** *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium(pgpr) with potential role in biocontrol of pests of crops international institute of biotechnology and toxicology (iibat), *Padappai*, India.
- **De Salamone G.I.E., Hynes R.K. et Nelson L.N., 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.*, 47: 103-113.
- **De Souza J. T., De Boer M., DeWaard P., Van Beek T.A., et Raaijmakers J.M.,2003.**Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*69: 7161-7172.
- **Defago G., 1993.** 2,4-Diacetylphloroglucinol, A Promising Compound In Biocontrol. *Plant Pathol.* 42 : 311-312.
- **Degroot A., Filloux A. et Tommassen J., 1991.**Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 229 : 278-284.
- **Deshwal V. K.,2012.***Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *Sclerotinasclerotiorum*. *Int. J. Plant Animal Env. Sci.*, 2 (1): 14-17.
- **Diaw D., Fall-Ndiaye A., YoussoufaAliO., SareI., Diop T.A.,2018.**Effet de la salinité sur la densité des isolats de *Pseudomonas* spp fluorescents de rhizosphère de plants de tomate, d'aubergine et d'oignon au Sénégal. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 12(4): 1914-1919.
- **Digat B. et Gardan L., 1987.** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fuorescens* et *Pseudomonas putida*.*Bulletin OEPP.*, 17, 559-568.
- **Digat B.,1991.** Anew encapsulation technology for bacterial inoculants and seed bacterization. In *Plant GrowthPromotingrhizobacteria. Progress and Prospects* (eds.), IOB/*WPRS Bulletin XIV /8* , 383-391.
- **Digat B.,1992.** Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. *Phytoma .Défense des végétau x.* 441, 34-38.
- **Digat B.,1994.** Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : Le cas des *Pseudomonas* .The plant growthpromotingrhizobacteria. An example with *Pseudomonas*..*C.R. Acad. Agric. Fr.* 80(2) ,125-140.
- **Digat B. et Gardan L., 1987.**Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida*.*EPPO Bulletin* 17(4): 559-568.

- **Döbereiner J. et Baldani V.L.D.,1979.**Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria . *Can. J. Microbiol.* 25, 1264-1269.
- **Dommergues Y.,1978.** Mycorrhizes et fixation d'azote. *O.R.S.T.O.M.*
- **D'Souza-Ault M.R., Smith L.T. et Smith G.M.,1993.**Roles of NAcetylglutaminyglutamine Amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to Osmotic Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 473- 478.
- **Dutuit P., Pourrat Y. et Dutuit J .M., 1994.**La notion de stress de la cellule à l'écosystème. *Sécheresse*, Vol. 5, N°. 1: 23- 31.

#### E

- **Egamberdieva D.,2008.** High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ.Microbiol.* 10, 1–9 6
- **Elhassa G.A., Abdelgani, M.E., Osman A.G., Mohamed S.S. et Abdelgadir B.S.,2010.**Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan. *J.Nutr*, 9: 926-934.
- **Elustondo J., Anger D.A., Laverdière MR. et N'Dayegamiye A.,1990.** Etude comparative de l'agrégation et de la matière organique associée aux fractions granulométriques et sept sols sous culture de maïs en prairie. *Can. J. SoilSci.* 70: 395- 402
- **Erice G., Manuel Ru J. et Aroca R.,2017.**Transcriptomic analysis reveals the importance of JA-Ile turnover in the response of Arabidopsis plants to plant growth promoting rhizobacteria and salinity., Universidad de Navarra, Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain.

#### F

- **Fierer N., Schimel J.P., et Holden P.A.,2003.** Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.*, 35: 165-176.
- **Freeman L.R., Angelini P., Silverman G.J.et Merritt J.R.,1975.** Production of Hydrogen Cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. *American Society for Microbiology*. Vol.29, No.4.
- **Frydenlund Michelsen C. et Stougaard P., 2012.** Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* in 5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Canadian Journal of Microbiology*.

#### G

- **Garcia de Salamone I. E., Hynes R. K. et Nelson L. M.,2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.*, 47, 404-411.
- **Garrido-Sanz D., Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Martín M., Rivilla R. et Redondo-Nieto M., 2016.** Correction: Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS One* 11, e0150183.
- **Germida, J .J., S. D. Siciliano, R. de Freitas et A. M. Seib., 1998.**Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticumaestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26:43–50.
- **Gholami A., Biyari A., Gholipoor M. et Rahmani H.A.,2012.**Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions. *Communications.Soil Science And Plant Analysis*, 43: 1263-1272.
- **Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M.N., van Tuinen D., Redecker D. et Wipf D.,2010.** Agroecology: the key role of Arbuscular mycorrhizas in ecosystem services.*Mycorrhiza*, 20(8):519-30
- **Glick B.R.,Cheng Z., Czarny J.et Duan J., 2007.** Promotion of plant growth by ACC-deaminase producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:329–339.
- **Grover M.S., Ali k.Z., Sandhya V., Rasul A. et Venkateswarlu B.,2010.**Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Doi: 10.1007/s11274-010-0572-7.
- **Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K., Snehi S.K. et Singh V., 2015.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J MicrobBiochemTechnol* 7(2): 096-102.
- **Gutterson N., 1990.** Microbial fungicides: Recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10** ,69-91

## H

- **Haas D. et Défago G.,2005.**Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319.
- **Haas D., KeeLaville L., Maurhofer M., Oberkanoli T., Schneider., Voisard C., Wuthrich B. et Défago G., 1991.**Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO involved in suppression of root diseases pp.450-556. In H. HenneckeetD.P.S.Verma.ed., *Advances in molecular genetics of plante-microbe interactions. Kluwer Academic Dordrecht*, Netherlands.

- **Hallman J., Quadt-Hallman A., Mahaffeeet W.F., Kloepper J.W., 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*,43: 895-914.
- **Hamza K., Bouali H., Bouras N., Bouallala M., Badji B., Klenk H.P. et Sabaou N., 2018.**Effets des monosaccharides sur la croissance et la production de chloramphénicol chez deux souches de *Saccharothorax longispora*.*African Review of Science, Technology and Development* V 03, N.01.pp.38-50
- **Heming BC.,1986.** Microbial-iron interactions in the plant rhizosphere. An overview. *J Plant Nutr* **9**, 505-521.
- **Hinsinger P., 2001.** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil*.237:173–195.
- **Höfte M. et Altier N., 2010.**Fluorescent *pseudomonads* as biocontrol agents for sustainable agricultural systems.*ResMicrobiol.* 161(6):464-71.
- **Howell C. R.etStipanovic R. D., 1980.** Suppression of *Pythiumultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, 70, 712-715.
- **Howell C.R. et Stipanovic R.D.,1979.** Control of *Rhizoctoniasolani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacteria. *Phytopathology* 69, 480-482
- **Hussain N., Ali A., Khan A.G., Rehman O.U. et Tahir M.,2003.** Selectivity of ions absorption as mechanism of salt tolerance in rice (variety Shaheen Basmati). *Asian J. Plant Sci.*, 2: 445-448.
- **Hussain N., Alghanim G. A. R., Ahmed M., El-Shariefet O. A. et Waheed R.,2010.** Salinity management in Oman and in the region. Proceeding of the international conference on soil and groundwater salinization in arid countries. 37-49.

## J

- **Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K., et Barea J. M.,2003.**The contribution of Arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37:1–16.
- **Jensen L. E. et Nybroe O.,1999.** Nitrogen availability to *Pseudomonas fluorescens* DF5F is limited during decomposition of barley straw in bulk soil land in the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4320-4328.

- **Johnsen K., Andersen S. et Jacobsen C.S., 1996.** Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3818–3825.
- **Johnston A. et Booth C., 1983.** Plant Pathologist's Pocketbook. 2<sup>nd</sup> Ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute.
- **Jones H.G., Flowers T.J. et Jones M. B., 1989.** Plants under stress. Cambridge, Cambridge University Press.
- **Josephson K. L., Gebra C. P. et Pepper I. L., 2000.** Cultural methods.. In Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba (ed.), *Environmental microbiology. Academic Press*, London. pp: 213- 217

## K

- **Kalaiarasi K. et Sunitha P.U., 2009.** Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. University for Women, Coibatore 641043, Tamil Nadu, India. *African Journal of Biotechnology* Vol.8(24), pp.7035-4041.
- **Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I. et Lugtenberg B., 2005.** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology* 7(11): 1809-1817.
- **Kempf B. et Bremer E., 1998.** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170: 319–330.
- **Kennedy A. C. et de Luna L.Z., 2004.** Rhizosphere. In D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment*. Vol03. Columbia University, USA p. 399-409
- **Khalid A., Arshad M. et Zahir Z.A., 2006.** Phytohormones: microbial production and applications. In: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. (Eds.): N. Uphoff, A.S. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga and J. Thies. *Taylor & Francis/CRC, Boca Raton, Florida*. p. 207-220.
- **Khan Md S., Zaidi A. et Ahmad E., 2010.** Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing *Microorganisms*. DOI 10.1007/978-3-319-08216-5\_2, © Springer International Publishing Switzerland.
- **Khan A.A., Jilani G., Akhtar M.S., Naqvi S. M. S. et Rasheed M., 2009.** Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *J. agric. biol. sci.* 11: 48-58.

- **Khan M., Zaidi A. et Javed M., 2009.** Microbial Strategies for Crop Improvement. pp: 1-371. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- **Khannous L., Jrad M., Dammak M., Miladi R., Chaaben N., khemakhem B., Gharsallah N. et Fendri I., 2014.** Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain : study of amylase production conditions. *Lipids in Health and Disease*, 13 :9.
- **King E. O., Ward M. K. et Raney D. E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 301-307.
- **Kloepper J. W. et Schroth M. N., 1978.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria on radishes, In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. *Angers, France*, pp. 879-882.
- **Kloepper J. W. et Schroth M. N., 1981.** Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 71, 642-664.
- **Kloepper J. W., Schroth M. N. et Miller T. D., 1980.** Effects of rhizosphere colonization by Plant Growth Promoting Rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70: 1078-1082.
- **Kloepper J. W., 1992.** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: FB Metting Jr, ed, *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc., New York, pp 255-274.
- **Kloepper J. W., Litshitz R. et Zablotowicz R. M., 1989.** Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-43.
- **Knowles C. J. et Bunch A. W., 1986.** Microbial cyanide metabolism. *Adv Microb Physiol* .27 , 73-111.
- **Koka R. et Weimer B. C., 2000.** Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. Utah State University, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 280-288.
- **Kulkarni S., Surange S. et Nautiyal C. S., 2000.** Crossing the limits of Rhizobium existence in extreme conditions. *Current. Microbiol.* 41: 402-409.
- **Kushner D. J., Hamaide F. et MacLeod R. A., 1983.** Development of salt-resistant active transport in a moderately halophilic bacterium. *J. Bacteriol.* 153(3): 1163-1171.

## L

- **Lamosa P., Martins L. O., da Costa M. S. et Santos H., 1998.** Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10): 3591-3598.
- **Landa B. B., Hervás A., Bethiol W., Jiménez-Díaz R. M., 1997.** Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25 (4): 305–318.
- **Landa B. B., Navas-Cortés J. A., et Jiménez-Díaz R. M., 2004.** Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94:946-960.
- **Latour X. et Lemanceau P., 1997.** Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp. Fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie.*, 17, 427-443.
- **Latour X., Corberand T., Laguerre G., Allard F. et Lemanceau P., 1996.** The composition of fluorescent Pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2449-2456.
- **Latour X., Corberand T., 1996.** "The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type." *Appl Environ Microbiol* 62(7): 2449-2456.
- **Lauber C.L., Hamady M., Knight R., et Fierer N., 2009** Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of soil bacterial community structure at the continental scale:, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 5111-5120.
- **Le Rudulier D., Mandon K., Dupont L., Trinchant J.C., 2002.** Salinity effects on physiology of soil microorganisms, p. 2774-2789. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*. A Wiley-Interscience Publication. Canada.
- **Lee H., Damsz B., Woloshuk C. P., Bressan R. A. et Narasimhan M. L., 2010.** Use of the plant defense protein osmotin to identify *Fusarium oxysporum* genes that control cell wall properties. *Eukaryot. Cell.*, 9 (4), 558-568.
- **Lemanceau P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : Exemples des *Pseudomonas* spp. Fluorescents. *Agronomie* 12 , 413-437.
- **Leong J., 1986.** Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev Phytopathol* 24 , 187-208.
- **Loper J.E., Buyer J.S., 1991.** Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol Plant-Microbe Interac* 4, 5- 13

- **Loper J.E., Hassan K.H., Davis E.W., Mavrodi D., Lim C. et Liam E., 2011.** Genomic diversity of *Pseudomonas* spp. isolated from aerial or root surfaces of plants. *Pseudomonas* 2011. 13th International Conference abstract book. pp. 10.
- **Lugtenberg B. et Kamilova F., 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56
- **Ly MO, Kumar D., Diouf M., Nautiyal S., Diop T., 2014.** Effet de la salinité sur la croissance et la production de biomasse de deux provenances de *Jatropha curcas* L. cultivés en serre. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 8(1): 46-56.
- **Lynch J.M., Wipps J.M., 1990** - Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil.* 129, 1-10.
- **Lynch J.M., 1990.** The Rhizosphere. Lynch JM, (ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

## M

- **Mandels M., 1981.** Cellulases, In D. Perlman (ed.), *Annual reports on fermentation processes*, vol. 5. Academic Press, Inc., New York. P.3 : 977-991.
- **Manjunatha B.S., Bandeppa., Paul S., Aggarwal C et Rathi M.S., 2017.** Characterisation of osmo tolerant rhizobacteria for plant growth promoting activities in vitro and during plant-microbe association under osmotic stress. *Indian Journal Of Experimental Biology*. Vol,56, pp:582-589.
- **Manoharachary C. et K.G. Mukerji., 2006.** Rhizosphere Biology – an Overview. pp: 3-8. In: *Microbial activity in the rhizosphere*. Mukerji, K. G., C. Manoharachary et J. Singh (Eds.). SpringerVerlag, Berlin.
- **Marschner P., Yang C.H., Lieberei R., et Crowley D.E., 2001.** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere, *Soil Biology & Biochem.*, 33: 1437–1445.
- **Mavrodi D. V., Blankenfeldt W., 2006.** "Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation." *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 417-445.
- **McGahan D.G., Southard R.J., et Zasoski R.J., 2014.** Rhizosphere effects on soil solution composition and mineral stability, *Geoderma*, 226–227: 340–347.
- **Meliani A, Belaouni H A, Bensoltane A., 2012.** Comparative studies of plant growth promotion and IAA secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Quirama ,Medellín – Colombia, 94

- **Meliani A., 2012.** Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens* Doctorat université d'Oran
- **Mendes R. et al., 2011.** Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332, 1097–1100. The rhizosphere microbiome and plant health Roeland L. Berendsen<sup>1</sup>, Corne´ M.J. Pieterse<sup>1,2</sup> and Peter A.H.M. Bakker<sup>1</sup> <sup>1</sup> Plant–Microbe Interactions, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands <sup>2</sup> Centre for BioSystems Genomics, PO Box 98, 6700 AB Wageningen, The Netherlands
- **Meyer J.M., Abdallah., M.A., 1978.** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* : biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107 :319-328.
- **Mezaache S., 2012.** Localisation des Déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. Thèse Doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif (Algérie). p.
- **Migula W. 1894.** Uber ein neues system de bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* 1: 235-238.
- **Mishra J. et Arora N K., 2017.** Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*
- **Montesino E., Bonaterra A. Et Moselio, S., 2009.** Pesticides, Microbial. Dans : *Encyclopedia Of Microbiology* (Moselio, S.), Academic Press, Oxford, UK. Pp.110-120.
- **Moradi A., Tahmourespour A., Hoodaji M., Khorsandi F., 2011.** Effect of salinity on free living-diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. *Afr. J. Microbiol. Res.* 05(2): 144-148.
- **Morrison C. K., Arseneault T., Novinscak A et Filion M., 2017.** Phenazine-1Carboxylic Acid production by *Pseudomonas fluorescens* LBUM636 alters phytophthorainfestans growth and late blight development. *American Phytopathological Society.* Vol107, N°3.pp273-279.
- **Munees Ahemad, Mulugeta Kibret .,2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University*, 20-26.
- **Munns R., 2013.** Strategies for Crop improvement in Saline Soils. Chapter 11. *In* M. Ashraf, M. Ozturk, H.R. Athar (ed.), *Salinity and water stress, improving crop efficiency*, Springer Science. Business Media B.V.

- **Naik P. R. et Sakthivel N., 2006.** Functional characterization of a novel hydro carbon clastic *Pseudomonas* sp.strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* 157: 538–546.
- **Nelson D.R., et Mele P.M., 2007.** Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations, *Soil Biol. & Biochem.*, 39: 340–351.
- **Ng Y.K., Hodson M. P., Hewavitharana A.K., Bose U., Shaw P. N. et Fuerst J. A., 2014.** Effect of salinity on antibiotic production in sponge-derived *Salinispora* actinobacteria. *J. Appl. Microbiol.*
- **Nielsen M.N., Sorensen J., Fels J., Pedersen H.C., 1998.** Secondary Metabolite- And Endochitinase-Dependent Antagonism Toward Plant-Pathogenic Microfungi Of *Pseudomonas Fluorescens* Isolates From Sugar Beet Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3563-3569.
- **Noguez A.M., Arita H.T., Escalante A.E., Forney L.J., Garcia-Oliva F. et Souza V., 2005.** Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest, *Global. Ecol. Biogeog.*, 14: 241–248.
- **Normander B. et Prosser JI., 2000.** Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Applied Environ. Microbiol.*, 66: 4372-4377.

## O

- **Oberhänsli T., Défago G. et Haas D., 1991.** Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Microbiol.*, 137, 2273-2279.
- **Omar S. A., Abdel-Sater M. A. et Abd-Alla M. H., 1994.** Growth and enzyme activities of fungi and bacteria in soil salinized with sodium chloride. *Folia Microbiologica.* 39: 23-28.
- **Oren A., 2003.** Organic compatible solutes. In: Oren, A. (ed). *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats*, volume 5: Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 279-305.

## P

- **Palleroni N. J., 1984.** Gram-negative aerobic rods and cocci : family I Pseudomonadaceae, 141-168. Krieg, Holt, William and Wilkings .Eds., In *Bergey's manual of bacteriology*, 1, William & Wilkins, Baltimore.

- **Palleroni N. J., Ballard R. W., Ralston E. et Doudoroff M., 1973.** Desoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.*, 110, 1-11.
- **Palleroni N. J., 1984.** Genus I. *pseudomonas* Migula 1894. In : Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds),
- **Palleroni N.J., 2015.** *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc. in association with *Bergey's Manual* Trust, pp.1-105. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01210.
- **Palleroni N.J., 1993.** *Pseudomonas* classification .A new case history in the taxonomy of Gram negative bacteria. *Antonie van leewenhoeh*, 64(3-4), pp231-251.
- **Parejko J A., Mavrodi D V., Mavrodi OV., Weller., David M. et Thomashow LS., 2013.** Taxonomy and Distribution of Phenazine-Producing *Pseudomonas* spp. in the DrylandAgrobecosystem of the Inland Pacific Northwest, United States. Ncbi. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>consulter 13/06/2019.
- **Patten C.L. et Bélanger R.R., 2001.**Regulation Of Indoleacetic Acid Production In *Pseudomonas Putida* GR12-2 By Tryptophan And The Stationary Phase Sigma Factor Rpos. *Can. J. Microbiol.* 48 : 635-642.
- **Paul D et Narayan Sinha S., 2016.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. University of Kalyani. *Annals of agrarian science* 15 :130-136.
- **Paul EA., Clark FE., 1989.** Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego, p 234
- **Peix A., Ramírez-Bahena M.H., Velázquez E., 2018.** The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update.*Infection, Genetics and Evolution* 57, 106-116
- **Petti C., Reiber K., Ali S.S., Berney, M. et Doohan F.M., 2012.** Auxin as a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC Plant Biol.* 12(224): 1-9.
- **Philippot L., Raaijmakers J. M ., Lemanceau Wim P. H. et Putten V., 2013.**Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*.V:11.789-791.
- **Pii Y., Mimmo T., Tomasi N., Terzano R., Cesco S., Crecchio C., 2015.** Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting

rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *BiolFertilSoils*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- **Pikovaskya R. E., 1948.** Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species: *Microbiologia*.17: 362-370.
- **Pocard J. A., Smith L. T., Smith G. M. et Le Rudulier D., 1994.** A prominent role of glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bacteriol.*, 176: 6877- 688.
- **Polonenko D. R., Mayfield C. I.,Dumbroff E. B., 1986.** Microbial responses to salt-induced osmotic stress. E ffects of salinity on growth and displacement of soil bacteria. *Plant Soil*. 92: 417-425.

## R

- **Rabhi N., 2011.** Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé.Effet d'osmoprotecteurs naturels. Memoire de Magister,Univ.FERHAT ABBAS SETIF.121p
- **Ragab.,1993.** Distribution pattern of soil microbial population in salt-affected soils, In: H. Lieth and A. Al-Masoom (eds). Towards the rational use of high salinity tolerant plants. Vol. 1. Kluwer AcademicPublishers, *Netherlands*. pp. 467-472.
- **RAI A., 2017.** Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin, Université Ferhat Abbas Sétif.
- **Rajendhran J. et Gunasekaran P., 2008.**Strategies for accessing soil metagenome for desired applications, *Biotechnol. Adv.*, 26: 576-90.
- **Rajmohan S., Dodd C.E.R. et Waites W.M., 2002.**Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. University of Nottingham, *Journal of Applied Microbiology*, 93,205-213.
- **Ramette A., Frapolli M., Defago G.et Moenne-Loccoz Y., 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcn BC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16: 525-535.
- **Ramos-Solano B., Barriuso-Maicas J., Gutierrez-Mañero J., 2009.** Biotechnology of the Rhizosphere. In: Kirakosyan A, Kaufman PB (eds.) *Recent Advances in Plant Biotechnology*. 137, Springer Science & Business Media. pp. 137-162.
- **Rangarajan S., Saleena L.M. et Nair S., 2002.** Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants in coastal agri-ecosystems. *Microb. Ecol.*, 44: 271-277.

- **Raynaud X., 2010.** Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model, *Soil Biol. & Biochem.*, 42: 210–219.
- **Reetha S.G., Selvakumar G., Bhuvaneshwari P., Thamizhiniyan et Ravimycin T., 2014.** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences* P: 75-80
- **Rijavec T. et Lapanje A., 2017.** Cyanogenic *Pseudomonas* spp. strains are concentrated in the rhizosphere of alpine pioneer plants. *Microbiol. Res.* 194, 20–28.

## S

- **Sagahón I.P., Anducho-Reyes M.A., Silva-Rojas H.V., Arana-Cuenca A., TellezJurado A.A., Cárdenas-Álvarez I.O. et Mercado-Flores Y., 2011.** Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpellamaydis* and *Stenocarpellamacrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 5522-5537.
- **Sanaullah M., Blagodatskaya E., Chabbi A., Rumpel C., and Kuzyakov Y., 2011** Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition, *Appl. Soil Ecology*, 48: 38–44.
- **Sandhya V., Ali S.K.Z., Grover M., Reddy G., Venkateswarlu B., 2009.** Alleviation of Drought Stress Effects In Sunflower Seedlings By The Exopolysaccharides Producing *Pseudomonas Putida* Strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils.* 46: 17-26.
- **Saum S. H. V. et Müller., 2007.** Salinity-dependant switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: Glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J. Bacteriol.* 189 (19): 6968-6975.
- **Schroth M. N., Hildebrand D. C. et Panopoulos N., 1992.** Phytopathogenic *Pseudomonads* and related plant-associated *Pseudomonads*, 3104-3131. Balows .Eds., *In The Prokaryotes, Springer Verlag.*
- **Seong, KY., and Shin, P.G. 1996.** Effect of siderophore on biological control of plant pathogens and promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* Ps 88. *Agr. Chem Biotech*, 39 , 20-24.
- **Siddiqui I A., Shaikat S., Hussain Sheikh I. et Khan A., 2005.** Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. Soil Biology and Ecology Laboratory, Department of Botany, University of Karachi, 75270, Karachi, Pakistan.
- **Siddiqui Z A., 2006.** PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. India, 300.

- **Singh B.K., Munro S., Potts J.M., et Millard P., 2007.** Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils, *Appl. Soil Ecol.*, 36: 147–155.
- **Singleton P. W., Swaify S. A. et Bohlool B. B., 1982.** Effect of salinity on Rhizobium growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (4): 884-890.
- **Smalla K., Wieland G., Buchner A., Znock A., Parzy J., Kaiser S., Rooskot N., Heueret H., Berg G., 2001.** Bulk and rhizosphere soil bacteria communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis; plant- dependantenrichement and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 47442-4751.
- **Smibert R.M. et Krieg N.R., 1994.** Phenotypic Characterization. In : *Methods For General And Molecular Bacteriology*. P. Gerhardt, R. G.E. Murray, W. A. Wood, And N.R. Krieg(Ed.), American Sociaty For microbiology, Washington, D.C. Pp.607.654.
- **Spiers A.J., Buckling A. et Rainey P.B., 2000.** The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol.* 146: 2345–2350.
- **Stanier R.Y., Palleroni N.J. et Doudoroff M., 1966.** The aerobic Pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43 : 159-271.
- **Stanzin D., Disket D., Richa Sh., 2017.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*.
- **Sugiyama A ., 2019.** The soybenrhizosphere : metabolites,microbes, and bayond, *Journal of Advanced Research*
- **Sundaram N. M et Murali S. R., 2018.** Isolation and characterization of bacteria from rhizospheric soils of curcuma longa for different plant growth promotion (pgpr) activities. Tamil Nadu 624 005, India.
- **Sunder Alariya S., Sethi S., Gupta S. et Gupta B., 2013.** Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. *Archives of Applied Science Research*, 5 (1) :15-24.

## T

- **Thomashow L.S. et Weller M.D.,1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of gaeumannomycesgraminis var. tricitii. Washington State University. *Journal of Bacteriology*, Vol. 170, No. 8, P. 3499-3508.

- **Tian Y., Zhang X., Liu J., Chen Q., et Gao L., 2009.** Microbial properties of rhizosphere soils as affected by rotation, grafting, and soil sterilization in intensive vegetable production systems, *Scientia Horticulturae*, 123: 139–147.
- **Toal M.E., Yeomans C., Killham K. et Meharg A.A., 2000.** A review of rhizosphere carbon flow modeling. In: *Plant and Soil*, 222, p. 263-281.
- **Toumi M., Barris S., Aid F., 2014.** Effets des stress hydrique et osmotique sur l'accumulation de proline et de malondialdehyde (MDA) chez deux variétés de colza (*Brassica napus* L.). Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie, 2014, n° 36, 17-24. USTHB, LBPO, Faculté des Sciences Biologiques, Bab Ezzouar, Algérie.
- **Tournus C., 2016.** Validation de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDITOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques Th. D. Pharm., Rouen, 155 p.

## V

- **Valé M., Nguyen C., Dambrine E., et Dupouey J.L., 2005.** Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations, *Soil Biol. Biochem.*, 37: 2329–2333.
- **Van Loon L. C., 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol.* 119:243–254.
- **Van Loon L. C. et Glick B. R., 2004.** Increased Plant Fitness by Rhizobacteria. *Mol. Ecotoxicol. of Plants*, 170, 177-205.
- **Venturi V., Keel C., 2016.** Signaling in the rhizosphere, *Trends Plant Sci* 21(3):187–198.
- **Vincent Edith ; Shackleton., Nicholas J ; Hall Michael. A ., 1991.** State oxygen and carbon isotope composition of miocene planktonic foraminifera from the tropical Indian Ocean. *Pangaea*.
- **Vincent J., 1947.** "Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors." *Nature* 159(4051): 850.
- **Vincent M. N., Harrison L., et al., 1991.** "Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain." *Appl Environ Microbiol* 57(10): 2928-2934.
- **Vincent M.N., Harrison L.A., Brackin J.M., Kovacevich P.A., Mukerji P. et Weller D.M., 1991.** Genetic Analysis Of The Antifungal Activity Of A Soilborne *Pseudomonas Aureofaciens* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 2928-2934.

- **Vinoth Raj S., Kanikkay Raja A., Manoj G., Tyagi, NamanHirenkumar Shah, Johnson Amama Justin N.A., Infant Santhos B, et Sathiyaseelan K., 2009.** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent research in science and technology* 1 (1) : 08-13.

#### W

- **Walter C., Lana W.N. et Grotehus M.J., 2005.** Longevity of seeds stored in genebank. Species characteristics. In : Seed SC. Res., p. 1-20.
- **Wang Y., Kern S. E., et al., 2010.** "Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer." *Journal of bacteriology* 192(1): 365-369.
- **Weller D. M., 2007.** *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. Symposium : The nature and application of biocontrol microbes III: *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97:250-256.
- **Weller DM., Howie WJ., Cook RJ., 1988.** Relationships between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* and suppression of take ail wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 78, 1094-1100.
- **Weller D.M., Thomashow L.S., 1993.** Microbial metabolites with biological activity against plant pathogen. In : Pest management : Biologically based technologies (Lundsden, Rd., Vanghan, J.L, eds), Am ChemSoc, Washington, DC, 67-89.
- **Wheatley R. E., 2002.** The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Anton Leeuw J Microb* 81:357–364.
- **Whippes J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52 :487-511.

#### X

- **Xu Y., Wang G., Jin J., Liu J., Zhang Q. et Liu X., 2009** Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage, *Soil Biol. Biochem.*, 41: 919–925.

#### Y

- **Yang J., Kloepper J. W. et Ryu, C. M., 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Sci.* 14(1): 1-4.

- **Yuan J., RazaW., Shen Q.et HuangQ., 2012.**Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 5942– 5944.

### Z

- **Zahir Z.A., Arshad M. et Frankenberger W.T.,2004.** Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *In Advances in Agronomy*, pp. 97-168.
- **Zahran H.H., 1997.** Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in Salineenvironments. *Biol. Fertil. Soils.*25: 211-223.
- **Zaim S., 2016.** Essai de lutte biologique contre le *Fusarium oxysporum* f.sp.cicerisà l'aide desmicroorganismes de la rhizosphèrede la culture dupois chiche. Thesede doctorat en sciences agronomiques. Universiteabdelhamid ibn badis de mostaganemfaculte des sciences de la nature et de la vie département d'agronomie.201p.
- **Zhou X.G., Wu F.Z., et Xiang W.S.,2014** Syringic acid inhibited cucumber seedling growth and changed rhizosphere microbial communities, *Plant soil Environ.*, 60: 158– 164.

## Annexes

### Annexe 03

**Tableau :** Résultat de confrontation des souches de *Pseudomonas* spp.fluorescents vis-à-vis les trois souches de *Fusarium oxysporum*.

		<i>Foa</i> (G1)			<i>Fol</i> (G2)			<i>Foln</i> (F2)			
<b>P1</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.2	3.5	3.7	3.5	3.4	3.5	3.8	3.5	3.6
		Ecart type	0.251			0.057			0.152		
		PI(%)	52.6			50.57			51.6		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	3	3.2	3.1	/	/	/	/	/	/
		Ecart type	0.1			0			0		
		PI(%)	63.52			0			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	4.1	3.9	4.2	4.5	4.7	4.3	3	3.1	2.8
		Ecart type	0.15			0.2			0.15		
		PI(%)	32.33			10			50.66		
<b>P2</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3	3.1	2.8	3.5	3.6	3.6	2	2.2	1.7
		Ecart type	0.152			0.057			0.251		
		PI(%)	59.45			49.14			73.83		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	2.1	2	2.4	/	/	/	4	4.2	4
		Ecart type	0.208			0			0.115		
		PI(%)	74.47			0			52.23		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	4.5	4.3	4.7	4.8	4.5	4.3	3.2	3	3.1
		Ecart type	0.2			0.25			0.1		
		PI(%)	32.23			9.4			48.33		
<b>P3</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3	3	3.1	4	4.1	4	3.6	3.7	3.6
		Ecart type	0.057			0.057			0.057		
		PI(%)	58.49			42.42			51.6		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	2.5	2.3	2	4.7	3.9	4.2	3.4	4	3.7
		Ecart type	0.251			0.404			0.3		
		PI(%)	73.29			49.76			56.47		
	MIX	Moyenne de pathogène (cm)	2.9	3	2.8	4.6	4.7	4.6	4.2	4	4
		Ecart type	0.1			0.05			0.11		
		PI(%)	51.66			7.4			32.23		

*Annexes*

		<i>Foa</i> (G1)			<i>Fol</i> (G2)			<i>Foln</i> (F2)			
<b>P4</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.2	3.1	3.4	4	3.8	4.1	3.6	4	3.8
		Ecart type	0.152			0.152			0.2		
		PI(%)	55.75			43.42			50.26		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	1.8	1	1.5	5.1	5.5	4.8	3	3.1	3.5
		Ecart type	0.404			0.351			0.264		
		PI(%)	83.17			39.64			62.35		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	4.2	4	4	4.6	4.4	4.5	3.9	4	3.7
		Ecart type	0.11			0.1			0.15		
		PI(%)	31.16			10			35.66		
<b>P5</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.5	3.8	3.1	4	3.8	4	3.1	3	2.8
		Ecart type	0.351			0.115			0.152		
		PI(%)	52.6			43.85			60.53		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	2.7	2.9	3	4	4.4	3.5	2.8	3	2.6
		Ecart type	0.152			0.450			0.2		
		PI(%)	66.23			53.29			67.05		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3.7	3.5	3.7	4.1	4.4	3.8	4.1	4.1	4
		Ecart type	0.11			0.3			0.05		
		PI(%)	39.5			18			32.33		
<b>P6</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.8	3.5	4	2.5	2.6	2.5	3.6	3.5	3.6
		Ecart type	0.251			0.057			0.057		
		PI(%)	48.49			63.85			52.53		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	1.3	1.6	1.5	1.6	2	1.9	3.2	3.6	2.9
		Ecart type	0.152			0.208			0.351		
		PI(%)	82.7			78.47			62		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	2.5	2.4	2.5	3.3	3	3.2	2.9	3	2.9
		Ecart type	0.057			0.152			0.057		
		PI(%)	59			36.8			51.16		
<b>P8</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3	2.7	2.9	2.1	2	1.8	1.2	1.5	1.4
		Ecart type	0.152			0.152			0.152		
		PI(%)	60.82			72			81.86		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4.2	4.3	3.9	/	/	/	/	/	/
		Ecart type	0.208			0			0		
		PI(%)	51.41			0			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3.4	3.3	3.5	4.1	4.2	4	3.5	3.4	3.5
		Ecart type	0.1			0.1			0.057		
		PI(%)	43.33			18			42.33		

*Annexes*

		<i>Foa</i> (G1)			<i>Fol</i> (G2)			<i>Foln</i> (F2)			
<b>P9</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3	2.9	3	3	2.9	3	2.5	2.4	2.8
		Ecart type	0.057			0.057			0.208		
		PI(%)	59.45			57.71			56.86		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	3.5	3	3.3	4.1	4.5	3.8	/	/	/
		Ecart type	0.251			0.351			0		
		PI(%)	62.35			51.41			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	2.7	2.5	2.5	4	4	4	3.1	3	3.2
		Ecart type	0.115			0.057			0.1		
		PI(%)	57.33			20.8			48.33		
<b>P10</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.2	2.9	3.1	4.2	4.5	4.4	3.4	3.6	3.4
		Ecart type	0.152			0.152			0.115		
		PI(%)	58.08			37.71			53.86		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	2.1	2	1.9	3.8	4	3.5	/	/	/
		Ecart type	0.1			0.251			0		
		PI(%)	76.47			50.58			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3.4	3.1	3.5	2.7	3	2.6	3.7	3.5	3.4
		Ecart type	0.208			0.208			0.152		
		PI(%)	44.5			44.8			41.16		
<b>P11</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	4.2	3.7	4	3.5	3.5	3.6	3	2.8	3
		Ecart type	0.251			0.152			0.115		
		PI(%)	45.75			48.14			60.93		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4	4.2	3.9	4.1	4	4.5	4.1	3.8	3.7
		Ecart type	0.152			0.264			0.208		
		PI(%)	52.58			50.58			54.47		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	2.8	3	2.9	4	4.2	4.4	3	3.2	2.9
		Ecart type	0.1			0.2			0.152		
		PI(%)	51.66			16			49.5		
<b>P12</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	4	4.1	4	4.2	4	4	4.3	4.1	4
		Ecart type	0.057			0.115			0.152		
		PI(%)	44.79			42			44.93		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4.2	4.5	4.3	2.2	3	2.9	4.5	4.7	4
		Ecart type	0.152			0.435			0.360		
		PI(%)	49.05			68.23			48.23		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3.4	3.2	3	3.5	3.6	3.4	4	3.8	4.1
		Ecart type	0.2			0.1			0.152		
		PI(%)	46.66			30			34		

*Annexes*

		<i>Foa</i> (G1)			<i>Fol</i> (G2)			<i>Foln</i> (F2)			
<b>P13</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.3	2.9	3	3.6	3.5	3.6	4	4.1	4
		Ecart type	0.208			0.057			0.057		
		PI(%)	58.08			49.14			46.26		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	3.6	4	3.7	4.5	4.2	3.9	2.4	2.5	3
		Ecart type	0.208			0.3			0.321		
		PI(%)	56.47			50.58			69.05		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3.2	3.5	3.4	4.5	4.3	4.2	3.7	3.5	3.5
		Ecart type	0.152			0.152			0.115		
		PI(%)	44			13.4			40.66		
<b>P14</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	2.6	3	3.2	3.5	3.8	3.5	3.6	3.8	3.6
		Ecart type	0.305			0.173			0.115		
		PI(%)	59.86			48.57			51.2		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4	4.3	4.1	3.6	4	3.4	/	/	/
		Ecart type	0.152			0.305			0		
		PI(%)	51.41			56.82			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3	3.1	3.2	4.7	4.7	4.6	4	4.2	4
		Ecart type	0.1			0.057			0.115		
		PI(%)	48.33			6.8			32.33		
<b>P15</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3	3	3.1	3	3.1	2.9	2.5	2.6	2.4
		Ecart type	0.057			0.1			0.1		
		PI(%)	58.49			57.14			60		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4.2	3.9	4	3.7	3.4	4	3.6	3.3	3.1
		Ecart type	0.152			0.3			0.251		
		PI(%)	52.58			56.47			63.52		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3.1	3.2	2.9	3.7	3.5	3.8	4.2	4.5	4.1
		Ecart type	0.152			0.351			0.208		
		PI(%)	49			23.4			29		
<b>P16</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.4	3.5	3.1	3.4	3.4	4	3.5	3.5	3.4
		Ecart type	0.208			0.346			0.057		
		PI(%)	54.38			48.57			53.86		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4	4	4	4.3	4	3.9	4.4	4.2	4.8
		Ecart type	0			0.208			0.305		
		PI(%)	52.94			52.23			47.41		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	4.2	4.1	4.2	4.2	4.24	4.3	3.5	3.6	3.3
		Ecart type	0.057			0.057			0.152		
		PI(%)	30.66			15.4			42.33		

*Annexes*

		Foa (G1)			Fol (G2)			Foln (F2)			
<b>P17</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.5	3.5	3.3	2.5	2.6	2.9	2.6	2.6	2.4
		Ecart type	0.115			0.208			0.115		
		PI(%)	53.01			62			66.26		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	1.7	1.4	1	4.3	4.9	5	3.7	4	3.8
		Ecart type	0.351			0.378			0.152		
		PI(%)	83.88			44.35			54.94		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	2.8	2.5	2.6	2.7	2.5	2.6	3.7	3.7	3.6
		Ecart type	0.152			0.1			0.057		
		PI(%)	56.16			48			39		
<b>P18</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	2.5	2.7	2.4	3.9	4	3.9	4	3.9	3.8
		Ecart type	0.152			0.057			0.1		
		PI(%)	65.34			43.85			66.26		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	2.3	3.8	2.6	/	/	/	/	/	/
		Ecart type	0.793			0			0		
		PI(%)	65.88			0			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	4	4	4.1	3.9	3.8	3.8	4.2	4.4	4
		Ecart type	0.057			0.057			0.2		
		PI(%)	32.83			23.4			30		
<b>P19</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	2.7	2.6	2.6	3.9	4	4.1	2.5	2.5	2.4
		Ecart type	0.057			0.1			0.057		
		PI(%)	63.97			42.85			67.2		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	2.7	2.7	2.8	3.8	3.7	3.8	3.5	3.5	3.4
		Ecart type	0.057			0.057			0.057		
		PI(%)	67.88			55.64			59.17		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3	3.1	3.1	3.7	3.5	3.5	4.1	4.2	4
		Ecart type	0.057			0.115			0.1		
		PI(%)	49			28.8			31.66		
<b>P25</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	2.5	2.5	2.4	2.5	2.2	2.5	3.8	3.7	3.8
		Ecart type	0.057			0.173			0.057		
		PI(%)	66.3			65.71			49.86		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	3	2.5	2.7	3.5	3.4	4	4.7	4.2	4.3
		Ecart type	0.251			0.321			0.264		
		PI(%)	67.88			57.29			48.23		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	2.5	3	2.8	3.7	3.6	3.2	4.4	4.5	4.1
		Ecart type	0.251			0.264			0.208		
		PI(%)	54			30			27.83		

*Annexes*

		<i>Foa (G1)</i>			<i>Fol (G2)</i>			<i>Foln (F2)</i>			
<b>P26</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.5	3.5	3.4	3.4	3.5	3.1	3	3	2.9
		Ecart type	0.057			0.208			0.057		
		PI(%)	52.6			52.42			60.53		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4.6	4.4	4.5	/	/	/	/	/	/
		Ecart type	0.1			0			0		
		PI(%)	55.64			0			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	2.4	3	2.8	4.1	4	3.7	3.3	3.2	3
		Ecart type	0.305			0.208			0.1527		
		PI(%)	54.5			21.4			47.33		
<b>P27</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.5	3.3	3.6	3	2.8	3	3.3	3.3	3.2
		Ecart type	0.152			0.115			0.057		
		PI(%)	52.6			58.14			56.53		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4	3.5	3.8	4.3	4.5	4.2	/	/	/
		Ecart type	0.251			0.152			0		
		PI(%)	55.64			49.05			0		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3	2.8	3.1	2.6	2.9	3.1	4	4.2	4.3
		Ecart type	0.1527			0.2516			0.1527		
		PI(%)	50.66			42.8			30.66		
<b>P28</b>	KB	Moyenne de pathogène(cm)	3.5	3.6	3.5	4.1	4.3	4	2.2	2	2.5
		Ecart type	0.057			0.152			0.251		
		PI(%)	51.64			41			70.26		
	PDA	Moyenne de pathogène(cm)	4.3	4.5	4.7	/	/	/	3.6	3.7	3.4
		Ecart type	0.2			0			0.152		
		PI(%)	47.05			0			58		
	MIX	Moyenne de pathogène(cm)	3	3.3	3.1	4.1	4.2	3.9	3.6	3.7	3.4
		Ecart type	0.1527			0.1527			0.1527		
		PI(%)	47.83			18.8			40.66		

## *Annexes*

---

## *Annexes*

---

## Annexes

**Tableau VIII : L'indice de solubilisation de phosphatase par des souches de *Pseudomonas*.**

Souches	Diamètre de l'halo (cm)	Diamètre de la colonie (cm)	IS%
P1	0	0	0
P2	2.3	1.7	35.29
P3	3.5	1.9	46.66
P4	0	0	0
P5	2.2	1.2	83.33
P6	2	1.2	66.66
P8	2.1	1.8	16.66
P9	2.5	2.1	19.04
P10	1.5	0.9	44.44
P11	2.5	1.3	92.30
P12	1.7	0.9	88.88
P13	2.7	1.8	50
P14	1	0.6	66.66
P15	0.8	0.6	33.33
P16	2	1.5	33.33
P17	1.8	1	80
P18	0.9	0.6	50
P19	1.6	0.9	77.77
P25	1.9	1.2	58.33
P26	2.2	1.3	69.23
P27	2	1.5	33.33
P28	1.4	0.8	75

## *Annexes*

**Tableau XI:** Densité optique du stress hydrique.

	<b>0%</b>	<b>20%</b>	<b>40%</b>	<b>60%</b>
<b>p1</b>	1,79	0,689	0,15	0,113
<b>p2</b>	1,78	0,709	0,115	0,109
<b>p3</b>	1,776	0,598	0,21	0,108
<b>p4</b>	1,755	0,849	0,165	0,108
<b>p5</b>	1,171	0,885	0,142	0,124
<b>p6</b>	1,79	0,69	0,141	0,081
<b>p8</b>	1,716	0,333	0,116	0,108
<b>p9</b>	1,725	0,633	0,165	0,15
<b>p10</b>	1,747	0,684	0,169	0,153
<b>p11</b>	1,788	0,526	0,15	0,075
<b>p12</b>	1,767	0,788	0,36	0,131
<b>p13</b>	1,769	0,495	0,391	0,086
<b>p14</b>	1,77	0,122	0,065	0,074
<b>p15</b>	1,776	0,909	0,108	0,098
<b>p16</b>	1,717	0,548	0,118	0,095
<b>p17</b>	1,761	0,751	0,206	0,079
<b>p18</b>	1,766	0,835	0,159	0,135
<b>p19</b>	1,74	0,728	0,107	0,079
<b>p25</b>	1,772	0,76	0,117	0,111
<b>p26</b>	1,815	0,813	0,09	0,083
<b>p27</b>	1,603	0,792	0,123	0,083
<b>p28</b>	1,589	0,761	0,17	0,085

## Annexes

**Tableau IV :** Utilisation des disques d'antibiotiques pour la préparation des solutions et des concentrations à réaliser.

**(A) :** Acide nalidixique et chlortamphénicol.

**(B) :** Streptomycine.

Rôle des disques d'antibiotiques

Tableau I. Utilisations des disques d'antibiotiques pour la préparation des solutions et des concentrations à réaliser\*

Antibiotique	Charge du disque (µg)	Nb de disques dans 2 ml de bouillon M-H	Concentration à réaliser (mg/l)
<u>Ac. fusidone</u>	10	2	10
Ac. nalidixique	50	1	5
Amikacine	30	1	15
			14 Enterobactéries, P. aeruginosa, Streptocoques
Ampicilline	30	1	7,5
			5 Staphylocoques
Amoxicilline +	20	1/4	5
Ac. clavulanique	10	1/2	1,25
			6,25 Entérobactéries
Azithromine	25	1/2	18,75
Moxifloxiline	22	2	75
Aztreonam	30	2	7,5
Ceftazidime	30	2	30
Céfotaxime	30	1	15
Céfuroxime	30	1/3	5
			Staphylocoques Streptocoques
Céfopérazone	30	1	15
Céfotaxime	30	1/4	3,75
Ceftriaxone	30	1/4	3,75
Cefsulodine	30	2	30
Céfuroxime	30	1	15
Cotrimazole			
Ceforan			
<u>Chlortamphénicol</u>	30	1/2	7,5
Clindamycine	15	1/3	2,5
Colistymone	50	1/4	6,25
Erythromycine			
Spiramycine	100	1/4	12,5
Fucidamycine	50	1/2	12,5
Gentamicine	15	2,3	5
			Enterobactéries, P. aeruginosa, Streptocoques
Streptomycine		Solution	1,5
			Staphylocoques
Imipénème	10	1/2	2,5
Kanamycine	30	1	15
Latanoprost	70	1/4	1,25
Néthamicine	30	1/3	5
			Entérobactéries P. aeruginosa Streptocoques
		Solution	0,5
Neofloxacine	10	1/2	2,5
Novofloxacine	10	2	10
Oxacilline, Métriciiline	5	2	5
Pipéracilone, Ciprifloxacine	2	1	2,5
Pénicilline G	6	1/2	1,5

753

## Annexes

Utilisation des disques d'antibiotiques pour la préparation des solutions et des concentrations à réaliser

(B) Antibiotique	Charge du disque (µg)	Nb de disques dans 2 ml de bouillon M-H	Concentration à réaliser (mg/L)	
Pipéracilline	100	1/4	12,5	Entérobactéries
Pristinamycine, Virginiamycine	15	2	100	<i>P. aeruginosa</i>
Rifampicine	30	1/3	2,5	
		1/3	5	Entérobactéries
		Solution	0,5	Staphylocoques Streptocoques
Streptomycine	10	3	15	
Sulfamides	200	4	400	
Tétracycline, Minocycline	30	1/4	3,2	
Ticarcilline	75	1/2	18,7	Entérobactéries
Ticarcilline+ Ac.clavunalinique	75	3	11,2	<i>P. aeruginosa</i>
Tobramycine	10	1	5	Entérobactéries <i>P. aeruginosa</i> Streptocoques
		solution	0,5	Staphylocoques
Triméthoprime	5	1	2,5	
Vancomycine	30	1/2	7,5	

### • **Coloration de Gram**

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mis au point le protocole en 1884. Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues. L'organisation de cette paroi permet de les classer soit dans les Gram+ ou les Gram-. Cette information est importante car elle est utilisée dans la taxonomie. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologie et le mode de groupement des bactéries de renseigner sur l'ordre dont fait partie les bactéries étudiées.

**1. Réalisation d'un frottis** à partir d'une suspension bactérienne puis en faisant des rotations jusqu'à séchage.

**2. Fixation :** soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.

**3. La coloration au violet de Gentiane (colorant basique):** la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau distillée.

**4. Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) :** étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

**5. Décoloration à l'alcool :** verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

**6. Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine :** laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

## *Annexes*

### **Annexe 04**

**Tableau III** :Les résultats de production de protéase par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

<b>Souches</b>	<b>Réaction</b>	<b>Diamètre de halo (cm)</b>
P1	Positive	1.4
P2	Positive	3.7
P3	Positive	4.2
P4	Négative	/
P5	Positive	4.9
P6	Positive	7.3
P8	Positive	1.2
P9	Positive	4.7
P10	Positive	1.4
P11	Négative	/
P12	Positive	5
P13	Positive	4.4
P14	Négative	/
P15	Positive	3
P16	Positive	2.2
P17	Négative	/
P18	Positive	6
P19	Positive	3.1
P25	Positive	2.6
P26	Négative	/
P27	Positive	8
P28	Positive	6.4

## *Annexes*

**Tableau X:** Densité optique du stress thermique.

<b>souches</b>	<b>DO à 41°C</b>	<b>DO à 26°C</b>	<b>DO témoin à 26°C</b>
<b>p1</b>	0,166	0,251	0,316
<b>p2</b>	0,205	0,21	0,229
<b>p3</b>	0,226	0,256	0,379
<b>p4</b>	0,185	0,174	0,207
<b>p5</b>	0,276	0,29	0,31
<b>p6</b>	0,15	0,346	0,386
<b>p8</b>	0,184	0,309	0,33
<b>p9</b>	0,223	0,249	0,314
<b>p10</b>	0,334	0,342	0,35
<b>p11</b>	0,379	0,398	0,4
<b>p12</b>	0,295	0,368	0,395
<b>p13</b>	0,278	0,305	0,357
<b>p14</b>	0,248	0,303	0,324
<b>p15</b>	0,228	0,265	0,385
<b>p16</b>	0,221	0,297	0,352
<b>p17</b>	0,161	0,293	0,331
<b>p18</b>	0,195	0,225	0,267
<b>p19</b>	0,13	0,247	0,269
<b>p25</b>	0,243	0,259	0,3
<b>p26</b>	0,296	0,388	0,392
<b>p27</b>	0,186	0,246	0,364
<b>p28</b>	0,258	0,35	0,391





## *Annexes*

---

## Annexes

### Annexe 01

#### I. Milieu de culture

Le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes, à une température d'environ 120 °C. Ces ingrédients sont pour 1 litre d'eau distillée.

Il est ensuite placé à température ambiante afin de le refroidir pour le manipuler plus facilement et surtout afin d'éviter la condensation sur les couvercles des boîtes de Pétri.

<p><b>Milieu King B (KB) (King <i>et al.</i>, 1954)</b></p> <p>Peptone.....20 g            Glycérol.....15 ml            K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1,5 g            MgSO<sub>4</sub>.....1,5 g            Agar.....20 g            pH = 7,2</p>	<p><b>Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthorpe et Booth, 1983)</b></p> <p>Pomme de terre.....200 g            Dextrose.....20 g            Agar.....20g            pH = 7</p>
<p><b>Milieu gélatine (Lelliott et Stead, 1987)</b></p> <p>Extrait de levure.....3 g            Peptone.....5 g            Gélatine.....120 g            pH = 7</p>	<p><b>Milieu Ayers "Ayers <i>et al.</i>, 1919" (Schaad, 1988)</b></p> <p>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1 g            KCl.....0,2 g            MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,2 g            Bleu de bromothymol (1,6 % "w/v") 1 ml            pH = 7</p>
<p><b>Milieu Levane (Hildebrand <i>et al.</i>, 1988)</b></p> <p>Extrait de levure.....2 g            Bactopeptone.....5 g            NaCl.....5 g            Saccharose.....50 g            Agar.....20g            pH= 7,2</p>	<p><b>Milieu LBT (LuriaBertani enrichi du tryptophane) (Gardan et Luisetti, 1981)</b></p> <p>Bactotryptone.....10g            Extrait de levure.....5 g            NaCl.....5 g            Agar.....20 g            L-tryptophane.....5g            pH = 7</p>
<p><b>Eau péptoné nitraté</b></p> <p>Bactopeptone .....10g            Nitrate de potassium.....1g</p>	<p><b>Milieu Trypticase de soja (TSA)</b></p> <p>Peptone trypsique de caséine.....17g            Peptone papainique de soja.....5g            Glucose.....2.5g</p>

## Annexes

	Na Cl.....5g Phosphate dipotasique.....2.5g Glycine.....4.4g Agar-agar..... 15g
<b>Milieu mixte (50% PDA+ 50% King B)</b> Pomme de terre .....100g Glucose .....10g Peptone.....10 g Agar .....20 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....0.75g MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....0.75g Glycérol .....7.5 ml	<b>Gélose M9</b> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....6g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....3g NH <sub>4</sub> CL.....1g Na Cl.....0.5g Agar .....17g Autoclavage puis additionné: Cellulose.....10g + extrait de levure...1.2g
<b>Milieu TSA additionné de 1% d'acide oléique</b> Peptone tryptique de caséine.....17g Peptone papainique de soja.....5g Glucose.....2.5g Na Cl.....5g Phosphate dipotasique.....2.5g Glycine.....4.4g Agar-agar..... 15g Acideoléique.....10ml	<b>Gélose au lait écrémé</b> Peptone .....5g Extrait de levure .....2.5g Poudre de lait .....1g Glucose .....1g Agar .....15g
<b>Gélose nutritif additionné d'amidon</b> Extrait de viande .....1g Extraie de levure .....2.5g Peptone .....5g Na Cl.....5g Amidon .....2g Agar .....15g	<b>Milieu NGA (Nutrient Gélose Agar)</b> Extrait de bœuf .....3g Peptone .....5g Agar .....15g
<b>Bouillon Mueller-Hinton</b> Peptone .....17.5g Extrait de viande ..... 2g Amidon.....1.5g pH =7.3	<b>Mueller-Hinton</b> Peptone.....3g Hydrolysate de caséine.....17.5g Agar .....15g Ca <sup>2+</sup> .....20-25mg Mg <sup>2+</sup> .....10-12.5mg

## *Annexes*

---

	pH = 7.4
<b>Bouillon nutritif</b> Tryptone.....10g Extrait de viande.....5g Na Cl.....5g	<b>Moller-arginine(Gardan et aLuisetti, 1981)</b> Arginine monoHcl.....10g Bactopeptone .....1g Na Cl.....5g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....0.3g Rouge de phénol.....0.01g Gélose .....3g pH = 7.2

### **II. Réactifs**

- ❖ Nitrate Reductase1.
- ❖ Nitrate Reductase2.
- ❖ Poudre de zinc.
- ❖ Kovacs.
- ❖ Picrate de sodium (5% acide picrique et de 2% de carbonate de sodium).
- ❖ Salkowski (2% de Fe Cl<sub>3</sub> à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique).

## Annexes

### Annexe 02

#### I. Appareillage

Nom de l'appareil	Photo (originale)	Marque
Etuve		BINDER
Autoclave		AESCULAP
Agitateur magnétique		VELP

*Annexes*

<p><b>Lampe UV</b></p>		<p><b>CAUTION</b></p>
<p><b>Plaque chauffante</b></p>		<p><b>BANTE</b></p>
<p><b>Distillateur</b></p>		<p><b>Lab Tech</b></p>
<p><b>Microscope</b></p>		<p><b>Motis</b></p>

*Annexes*

<p><b>PH mètre</b></p>		<p><b>Hanna</b></p>
<p><b>Balance</b></p>		<p><b>KERN</b></p>
<p><b>Réfrigérateur</b></p>		<p><b>CONDOR</b></p>
<p><b>Spectrophotomètre</b></p>		<p><b>SHIMADZU</b></p>

*Annexes*

<p><b>Secoueur horizontal</b></p>		<p><b>INNOVA</b></p>
<p><b>Bec Bunsen</b></p>		
<p><b>Micropipette</b></p>		<p><b>SCI LOGEX</b></p>

## II. Verrerie et Accessoires

- ❖ Anse de platine.
- ❖ Barreau magnétique.
- ❖ Becher graduée de 100ml et 500ml.
- ❖ Bistouri stérile.
- ❖ Embout bleu.
- ❖ Embout jaune.
- ❖ Entonnoir.
- ❖ Eprouvette graduée de 10ml, 20ml et 250ml.
- ❖ Erlenmeyer de 1000ml et 2000ml.
- ❖ Fiole conique graduée de 250ml.
- ❖ Flacons stérile de 250ml.
- ❖ Lame en verre.
- ❖ Lamelle en verre.
- ❖ Portoir.
- ❖ Papier Wattman.
- ❖ Pipette Pasteur.
- ❖ Seringue stérile.
- ❖ Spatule.
- ❖ Tubes à essai.



## *Annexes*

---