

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB – BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biotechnologie et agro écologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Science Biologique
Option : Biotechnologie microbienne

Thème

Contribution à l'étude de la microflore bactérienne isolée
à partir de la rhizosphère de la région de Biskra

Présenté par :

Date de soutenance : 24/07/2023

M^{lle} Belkacem Fella

M^{lle} Mayouf Yasmine

Devant le jury

Mme DJELLOUT.H	MAB	Université de Blida 1	Presidente
Mme BENSAID.F	MAA	Université de Blida 1	Examinatrice
Mme TOUA.D	MAA	Université de Blida 1	Promotrice

Année Universitaire : 2022-2023

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la force, la volonté et la patience d'accomplir tout le long de nos études.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre encadrante Mme TOUA.D pour nous avoir encadré et dirigé ce travail ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils et pour son soutien et sa patience.

Nous tenons à gratifier aussi les membres de Jerry : Mme DJELLOUT.H et Mme BENSAID.F de l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer ce travail et de l'enrichir par leurs propositions et leurs conseils.

Nos remerciements s'adressent également aux : Enseignants et ingénieurs de laboratoires du département SNV de l'université SAAD DAHLEB Blida 1 pour leurs qualités scientifiques et pédagogiques.

A .Mr KHACHANA.Y le DAP de ITDAS ; Mr HADJOUJ.R ;Mr ABDERRAHMAN; A Mme Ihssen lingenieur de laboratoires PFE duniversité de saad dahleb blida 1

A Mr bousbici . A Mr bellouti. A

On ne pourrait pas terminer ces remerciements sans une énorme pensée pour nos parents.

Dedicace

Tout d'abord je remercie le bon dieu pour m'a aide et m'a donné la sante, la force nécessaire le courage et la volonté pour mener a réalisé cet humble travail.

Je dédie ce modeste travail avec une énorme joie et un infini plaisir a la merveilleuse personne qui m'a aidé et guidé vers la voie de la réussite :

A ma tres chère grand-mère « Melhout Aicha » pour sa attention et ses sacrifices son soutien ses prières tout au long de mon parcourt académique

Que DIEU m'aide à la honorer et exprimer ma profonde reconnaissance pour tout ce qu'elle m'a offert d'amour, de d'encouragements je la souhaite une longue vie et une bonne santé .

A ma tres chere grand mere « mima chrifa » pour ses douaas ses prieres son amour elle nous a quitté tres tot mais elle restera toujours presente dans mon cœur et un model pour moi une etoile qui ne me quittera jamais et qui continue a eclaircir ma vie je la souhaite quelle repose en paix, hommage a son ame angelique

A mes chers parents « Nadji et Chahinez » pour leur soutiens, leur aide, et leur sacrifice leur conseils ; instructions et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance, ma gratitude et tout mon amour. je suis tres chanceuse de les avoir jespere qu'ils serait aujourd'hui fieres de moi puisse dieu les garde toujours a mes cotés

A tout mes frères et sœurs pour leur amour et encouragement

A toute ma famille surtout mes chères tantes ,mes cousins et cousines

et à tout mes chers amis qui m'ont toujours entouré et soutenu

A ma chère binôme « Yasmine » et sa famille merci de m'avoir soutenu et encouragé pendant tout les moments difficiles vécus merci du fond du cœur que dieu vous apporte ce que vous désirez

A toute la promotion «biotechnologie microbienne » « 2022-2023».

A toute A personne qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos voeux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible

6. Fella

Dédicace

Tout d'abord je remercie le bon dieu pour m'a aidé et m'a donné la sante, la force nécessaire le courage et la volonté pour mener a réalisé cet humble travail.

Je dédie ce modeste travail avec une énorme joie et un infini plaisir à.

A mes chers parents pour leur soutien, leur aide, et leur sacrifice leur conseils ; instructions et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance, ma gratitude et tout mon amour. Je suis très chanceuse de les avoir j'espère qu'ils seraient aujourd'hui fiers de moi puisse dieu les garde toujours à mes cotés

A mes frères et sœurs et belles sœurs pour leur amour et encouragement

A toute ma famille et à tous mes chers amis qui m'ont toujours entouré et soutenu

A ma chère binôme « Fella » et sa famille merci de m'avoir soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus merci du fond du cœur que dieu vous apporte ce que vous désirez

A toute la promotion « biotechnologie microbienne » « 2022-2023 ».

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de
votre soutien infailible

M. Yasmine

Résumé

Notre travail porte sur l'isolement de la microflore bactériennes bénéfique à partir des rhizosphères de trois plantes cultivées (colza, moringa, olivier variété sigoise) au niveau de la région de Biskra (Ain Ben Noui, EL Outaya) Pour but de sélectionner des bactéries qui peuvent avoir un potentiel intéressant en bio contrôle et bio stimulation des plantes pour les intégrées dans la formulation des bio pesticides ou bio fertilisants. Après la purification, 33 souches bactériennes ont été isolées. Ces dernières ont subi le test d'hypersensibilités au tabac. 32 isolats été non pathogènes (n'ont pas présentés de nécrose). Sur ces bactéries on a réalisé le test d'antagonisme in vitro vis-à-vis 04 souches phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia amylovor* ; *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis I7* et *Fusarium oxysporum f.sp.albidinisIB3*),pour l'antagonisme vis-à-vis des champignons phytopathogènes .seuls 4 isolats S14 CZ ,S33 OS ,S3 OS et S6 OS ont donné une activité antifongique avec un taux d'inhibition allant de 80% à 85% .Pour l'antagonisme vis-à-vis des bactéries phytopathogènes ,22 isolats ont donné une activité antibactérienne avec une zone d'inhibition varie entre 10 à 40 mm .Et pour le test de biostimulation de la germination sur la semence de tomate var Marmande, les résultats ont montré un taux de levée varie entre 80% et 100% au bout du 4éme jour pour la majorité des souches sauf le témoin négatif (non bactérisé) ,mais on a constaté que la vitesse de germination des semences bactérisées avec l'isolat 33 OS été plus rapide par rapport au témoin non bactérisé et les autres isolats testées. Les 32 isolats qui ont montré soit une activité antagoniste ou une levé la germination ont subi une caractérisation générique par le test de Gram – KOH – oxydase – catalase – mannitol mobilité. Seule l'isolat S33OS a donné des résultats positives dans les deux tests d'antagonismes (vis-à-vis les deux champignons et bactéries phytopathogènes) et le levé de germination, présente des caractéristiques morphologiques et physiologique proche à celle du genre de Bacillus sp.

Mots clés : le Sol, la rhizosphère, la microflore bactérienne, PGPR, antagonisme, activité antibactérienne, activité antifongique

Abstract

Our work focuses on the isolation of beneficial bacterial microflora from the rhizospheres of three cultivated plants (rapeseed, moringa, Sigoise olive variety) in the Biskra region (Ain Ben Noui, EL Outaya) for the purpose of selecting bacteria which may have interesting potential in biocontrol and biostimulation of plants for integration into the formulation of biopesticides or biofertilizers. After purification, 33 bacterial strains were isolated. The latter underwent the tobacco hypersensitivity test. 32 isolates were non-pathogenic (did not show necrosis). On these bacteria we carried out the in vitro antagonism test against 04 phytopathogenic strains (*Agrobacterium tumefaciens* and *Erwinia amylovora*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* I7 and *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* IB3), for antagonism against phytopathogenic fungi. Only 4 isolates S14 CZ, S33 OS, S3 OS and S6 OS gave antifungal activity with an inhibition rate ranging from 80% to 85%. For antagonism against phytopathogenic bacteria, 22 isolates gave antibacterial activity with a zone of inhibition varying between 10 to 40 mm. And for the biostimulation test of germination on tomato seed var Marmande, the results showed a emergence rate varies between 80% and 100% after the 4th day for the majority of strains except the negative control (non-bacterized), but it was noted that the speed of germination of seeds bacterized with isolate 33 OS was faster compared to the non-bacterial control and the other isolates tested. The 32 isolates that showed either antagonistic activity or increased germination underwent generic characterization by the Gram–KOH–oxidase–catalase–mannitol mobility test. Only the S33OS isolate gave positive results in the two antagonism tests (against the two phytopathogenic fungi and bacteria) and the germination survey, presents morphological and physiological characteristics close to those of the genus of *Bacillus* sp. .

Keywords: Soil, rhizosphere, bacterial microflora, PGPR, antagonism, antibacterial activity, antifungal activity

ملخص

يركز عملنا على عزل البكتيريا الجذرية المفيدة من ثلاث نباتات مزروعة (الكولزا والمورينجا وصنف الزيتون) في منطقة بسكرة (الوطاية وعين بن نوي) لاختيار البكتيريا التي يمكن أن يكون لها إمكانات مثيرة للاهتمام في التحكم البيولوجي والتحفيز البيولوجي للنباتات لدمجها في تركيبة المبيدات الحيوية أو الأسمدة الحيوية وبعد التنقية، تم عزل 33 سلالة بكتيرية وتعريضها لاختبار فرط الحساسية للتبغ. 32 عزلة كانت غير ممرضة (لم تظهر نخر في الورقة). تم إجراء اختبار للبكتيريا المعزولة ضد أربع سلالات مسببة للأمراض النباتية (*Agrobacterium tumefaciens* *Erwinia amylovora* ; *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis*) 17 او *Fusarium oxysporum* f.sp.*albidinis* حيث اعطى النشاط المضاد للفطريات نتيجة إيجابية بالنسبة لأربعة بكتيريا S14 CZ , S33 OS , S3 OS et S6 OS بمعدل تثبيط يتراوح من 80% إلى 85%. بالنسبة للعداء مع البكتيريا المسببة للأمراض النباتية، أعطت 22 عزلة نشاطاً مضاداً للبكتيريا نتيجة إيجابية تتمثل في منع انتشارها بمسافة تتراوح من 10 إلى 40 ملم ومن أجل اختبار التحفيز البيولوجي للإنبات على بذور الطماطم، أظهرت النتائج أن معدل النمو يختلف بين 80% و 100% بعد اليوم الرابع لغالبية السلالات باستثناء الشاهد ولكن وجد أن معدل إنبات البذور البكتيرية مع عزل S33 OS كان أسرع مقارنة بالتحكم غير البكتيري والعزلات البكتيرية الأخرى التي تم اختبارها خضعت العزلات الـ 32 التي أظهرت إما نشاطاً إيجابياً ضد سلالات مسببة للأمراض النباتية أو لسرعة الانبات اختبار *Gram - KOH - oxidase – catalase Mobilité - mannitol* فقط S33OS. المعزولة أعطت نتائج إيجابية في كل التجارب، فهذه الأخيرة لديها خصائص مورفولوجية وفسولوجية القريبة من النوع *Bacillus sp*.

الكلمات المفتاحية: التربة، الريزوسفير، البكتيريا الدقيقة، العداء، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات

Liste des abréviations

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

AIA : Acide indole acétique.

P : Phosphore.

N : Azote.

UFC : Unité format colonie

PVRAB : Labo de protection et valorisation des ressources agro biotechnologique

ITCMI : Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles

P.F.E : Laboratoire Projet Fin d'étude

EDS : L'eau distillée stérile

GN : Gélose nutritive

KB :Gélose King B

PDA : Potato Dextrose Agar

LPGA : Levure peptone glucose agar

KOH :Hydroxyde de potassium

FOA : *fusarium oxysporium albidinis f.sp*

Liste des figures

Figure1	Situation géographique de la ferme de démonstration et production des semences d'AIN BEN NOUI Biskra (Google earth 2023).	5
Figure2	Situation géographique de l'annexe de la ferme de démonstration et production des semence EL OUTAYA (google earth)	6
Figure3	La méthode d'échantillonnage à partir de la rhizosphère. (Original,2023)	7
Figure4	Les étapes de l'isolement (Original,2023)	8
Figure5	Réalisation du test d'hypersensibilité (Originale, 2023)	10
Figure6	Confrontation entre les agents phytopathogène FOAI7 et FOAIB3 et les isolats bactériens à tester	11
Figure7	Schématisation du protocole de confrontation diphasé établi dans le test d'antagonisme	12
Figure8	Désinfection des graines (Original,2023)	12
Figure9	La bactérisation des graines (original,2023)	13
Figure10	La mise en germination (original,2023)	13
Figure 11	Boites issues de l'isolement de quelques échantillons (Original 2023)	18
Figure 12	Boites issu de la purification dans les deux milieu kb et GN(original 2023)	18
Figure 13	Résultats de la réaction d'hypersensibilité causée par les isolats bactériens testés (Originale, 2023).	19
Figure 14	Pouvoir antagoniste des bactéries isolées vis-à-vis les deux bactéries phytopathogènes <i>Erwinia Amylovora et Agrobacterium Tumefaciens</i> .(original 2023)	21
Figure 15	Histogramme de pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne FOA I7 et FOA IB3 vis-à-vis des isolats antagonistes	22
Figure16	Pouvoir antagonistes des souches bactérienne vis-à-vis les deux bactéries phytopathogène (original 2023)	24
Figure 17	La levé de germination des semences de la tomates varieté Marmande (original 2023)	26
Figure 18	résultats de coloration de Gram de quelques souche bactérienne (original 2023)	29
Figure19	Test de catalase positive (original2023)	31
Figure 20	Test d'oxydase positif (original 2023)	31

Listes des tableaux

Tableau 1	Les souches de référence phytopathogènes	4
Tableau2	Le nombre de souche isolés dans les milieux de cultures gn et kb avec différentes méthodes d'encemencement	18
Tableau3	Résultats de réactions d'hypersensibilité inoculé par les isolats bactérienne	20
Tableau4	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne	21
Tableau5	Moyenne de zone d'inhibition par la confrontation déphasé des souches bactériennes a tester	24
Tableau6	Taux de germination des graines des tomates variété marmande exprimé en pourcentage	26
Tableau7	Résultats de l'examen macroscopiques des souches bactériennes isolées à partir du sol de moringa olivier et colza après cultures sur milieux gélose nutritive (gn) et king b	27
Tableau8	Résultats de coloration de gram et test KOH	29
Tableau9	Résultats des testes d'enzymes respiratoire	32

Tables des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

	Introduction.....	1
Matériels et methods		
1	Matériels.....	4
1.1	Matériels non biologiques	4
1.2	Matériels végétaux.....	4
1.3	Matériels biologiques.....	4
2	Méthode	5
2.1	Présentation de la région d'étude.....	5
2.2	Prélèvement des échantillons.....	6
2.3	Isolement des souches.....	7
2.3.1	Préparation des suspensions.....	8
2.3.2	Ensemencement.....	8
2.4	La purification et la conservation des isolats.....	9
2.5	Réaction d'hypersensibilité sur tabac.....	9
2.6	Le test d'antagonisme anti microbien.....	10
2.6.1	Activité antifongique.....	10
2.6.2	Activité antibactérienne.....	11
2.7	La levé de germination.....	12
2.7.1	Désinfection des graines.....	12
2.7.2	Préparation des suspensions bactériennes.....	13
2.7.3	Bactérisation des graines.....	13

2.7.4	Mise en germination.....	13
2.7.5	Paramètre étudier.....	14
2.7.5.1	Le taux de germination.....	14
2.8	Caractérisation générique.....	14
2.8.1	Caractérisation morphologique.....	14
2.8.1.1	Caractérisation macroscopique.....	14
2.8.1.2	Caractérisation micro morphologique.....	14
2.8.1.3	Test de KOH.....	15
2.9	Caractérisation biochimique.....	15
2.9.1	Caractérisation des enzymes respiratoire.....	15
2.9.1.1	Test de catalase.....	15
2.9.1.2	Test d'oxydase.....	15
2.9.1.3	Test mannitol-mobilité.....	16

Résultats et discussion

1	Isolement et purification des isolats.....	17
2	Test d'hypersensibilité au tabac.....	19
3	Test d'antagonisme antimicrobien	20
3.1	Activité antifongique.....	20
3.1	Activité antibactérienne.....	23
4	Test de levé de germination.....	25
5	Caractérisation génétique.....	27
5.1	Caractérisation macroscopique.....	27
5.2	Caractérisation micro morphologique.....	29
6	Caractérisation biochimique.....	30
6.1	Test de catalase.....	30
6.2	Test d'oxydase.....	31

6.3	Test de mannitol mobilité.....	31
	Conclusion.....	34
	Référence	
	Annexe	

Introduction

Introduction

Introduction

La production agricole mondiale a connu une augmentation importante sur les plans quantitative et qualitative suite à la demande exigée par la population mondiale qui ne cesse pas d'augmenter dans le temps (**FAO 2010**) ce qui a obligé les agriculteurs à pratiquer l'agriculture intensive, cette dernière a engendrée beaucoup de conséquences tels que l'altération de la qualité des sols, la perte de leurs fertilité et l'apparition des maladies causée par les ravageurs et les agents phytopathogènes . D'ailleurs les estimations de la production agricole mondiale ont montré que 50 % de cultures végétales sont perdues avant ou après la récolte à cause de ces maladies (**Choudhary et al., 2009**) ce qui a influencé le rendement agricole. Pour faire face à ces conséquences, les agriculteurs ont eu recours à l'utilisation des molécules chimiques fertilisants et pesticides comme moyen relativement fiables pour résoudre ces problèmes (**Becard, G et al 2006**). Effectivement ces derniers constituent des solutions assez approprier en raison de leur performance, rapidité et, leur efficacité a court terme et leurs facilité d'applications ce qui les a rendus assez sollicité par l'agriculteur (**Sharga et Lyon, 1998**).

L'utilisation abusive dans le temps et non contrôlé molécules de synthèse a entraîné beaucoup de problèmes liée à :

- L'environnement tels que la pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques par lessivage des engrais nitrates (**Hilliard, C. et al 2000**), l'accumulation des métaux lourds dans le sol, (**Becard, G et al 2006**), déséquilibre des écosystèmes naturels et la réduction de la biodiversité (**Bourdais, J 2001**), (**Boiteau G et al, 2007**).
- La santé du consommateur : tels que l'apparition de certaines maladies assez dangereuses et parfois mortelles (les maladies cancéreuses, les perturbations hormonales...) causé par la présence des résidus toxiques sur les fruits et les légumes consommés (**Hilliard, C. et al 2000**).
- L'émergence et le développement du facteur de résistance chez les agents phytopathogènes vis-à-vis à un ou plusieurs pesticides suite à leur applications répétées et continues (**Nasraoui B, 2006**).

En raison de l'aggravation de ces problèmes, les spécialistes tirent la sonnette d'alarme et les agriculteurs sont soumis à une forte pression pour réduire ou éliminer l'application des produits chimiques (**Bautista- Banos, 2014**), ce qui rend plus urgent de chercher de nouvelles méthodes alternatives qui seront respectueuses à l'environnement et non nuisible à la santé de l'Homme et qui pourront limiter leurs apports, afin de préserver les végétaux de tous ces fléaux. (**Aouar L, 2012**). C'est dans cette optique que « le Biologique » est devenue une des solutions prometteuses qui inspire les chercheurs à travers le monde et qui était à l'origine de la nouvelle discipline appelée « la Biotechnologie ».

Un des domaines à qui s'est intéressé à la biotechnologie ; c'est l'agriculture. Effectivement et afin de produire des biopesticides et des biofertilisants cette discipline s'est intéressé à la potentialité des microorganismes particulièrement ceux qui vivent au niveau de la mince couche du sol qui entoure les racines c'est « la rhizosphère » (**Campbell et Greaves, 1990**), et

Introduction

qui ont un rôle dans la fertilisation des sols, la stimulation de la croissance des plantes et leurs protection vis-à-vis les bio-agresseurs c'est « les PGPR » (**HAAS et DEFAGO., 2005**). Cette communauté bactérienne est la plus représentative qualitativement et quantitativement et la plus diversifiée au niveau de la rhizosphère c'est pour cela qu'elle est appelée rhizobactéries (**Glick, 1995**). celles-ci sont très connus pour leur pouvoir compétitif et leur pouvoir de coloniser le système racinaire des plantes car elles ont les potentialités de produire une grande quantité et une diversité d'enzymes capable de dégrader les différents rhizodépôts tels que les sucres, les acides aminés et organiques, les vitamines, les mucilages qui sont produits par les systèmes racinaires des plantes. Également les cellules corticales épidermales détachées (**Campbell et Greaves, 1990**) qui sont produites par les systèmes racinaires des plantes ce qui leur permet de se nourrir et de se diviser et les rend dominants dans la rhizosphère c'est « la colonisation rhizosphérique » (**Kloepper, J W. 1993**).

Le groupe des PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) présente une diversité de genres tels que *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia rhizobium*. (**Kloepper et al., 1980 ; Bakker et al., 1991 ; Choudhary et al., 2009**) qui peuvent avoir différents mécanismes d'actions complexes qui favorisent la croissance de la plante, son développement et sa protection (**Antoun et Prévost, 2005**). Les modes directs incluent la fixation d'azote atmosphérique, du phosphate et potassium, production de régulateurs de croissance végétale tels que les sidérophores, les phytohormones, l'acide auxine, les cytokinines, les gibbérellines et l'acide éthylène et la répression de la synthèse d'éthylène (**Hassen et Labuschagne., 2010**) et les mécanismes indirectes sont les éliminations des agents phytopathogènes à travers la compétition pour l'espace et les nutriments, l'antibiose qui consiste à produire des antibiotiques efficaces qui agissent contre l'agent pathogène, ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire tels que les antibiotiques comme l'ampicilline, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), cyanure d'hydrogène (HCN) et la phénazine. (**CORBAZ, 1990 ; BABALOLA, 2010 ; SHAMEER et PRASAD, 2017**), le deuxième mécanisme est le parasitisme qui s'effectue par la production des enzymes lytiques telles que les glucanases, les chitinases et les lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène (**CORBAZ, 1990**). Ensuite la Résistance systémique induite ISR (Induced Systemic Resistance), ce mécanisme rend la plante plus résistante contre les bio-agresseurs composants bactériens tel que les lipopolysaccharides (LPS), sidérophores, lipopeptides cycliques, peuvent induire une résistance systémique des plantes (**GUPTA et al., 2015 ; SHAMEER et PRASAD., 2017**). L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (**Jijakli, 2003**).

L'étude des mécanismes de l'activité bénéfique des PGPR leur association avec les plantes suite à leur formulation en bioproduits (bio-pesticide ; bio-fertilisant) (**Ramamoorthy et al., 2001**). et leur inoculation dans un sol brut est une étape très nécessaire car elle peut être limitée par plusieurs facteurs, les plus essentiels est la faible compétence rhizosphérique des bactéries introduites et l'effet des facteurs biotiques et abiotiques du sol sur la dynamique de ces populations. Une espèce bactérienne introduite dans un sol stérile se développe rapidement pouvant atteindre des densités élevées, alors que l'inoculation de la même

Introduction

espèce dans un sol non stérile est généralement suivie par une chute de la population introduite pouvant aller jusqu'à la disparition de celle-ci (**Danso et al., 1975**) par exemple le groupe des PGPR le plus étudié *Pseudomonas* mais malgré qu'il a grandement contribué à la compréhension des mécanismes qui sont impliqués dans la suppression de la maladie, ce dernier présentent un inconvénient du point de vue application (elles perdent généralement leur viabilité lorsqu'elles sont conservées pendant une période de plusieurs semaines) (**Haas & Defago, 2005**). Par contre, les bacilles en raison de leurs capacités à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu offrent un avantage par rapport aux autres bactéries pour la formulation du produit (**Cavaglieri et al., 2005**). Malgré cela, il existe peu d'exemples d'application réussie d'inoculants microbiens. Essentiellement, un manque de rendement constant dans différentes conditions environnementales sur le terrain a empêché leur utilisation plus large (**Richardson et al., 2009**).

Dans ce contexte l'objectif de cette étude préliminaire consiste à rechercher des bactéries bénéfiques isolées à partir des rhizosphères de trois plantes cultivées (colza, moringa, olivier variété sigoise) dans la région de Biskra. Pour but de sélectionner des bactéries qui peuvent avoir un potentiel intéressant en bio contrôle et bio stimulation des plantes pour les intégrer dans la formulation des bio pesticides ou bio fertilisants.

La première étape consiste à faire l'isolement, la purification des isolats obtenus à partir de la région d'étude.

La deuxième partie consiste à sélectionner les souches qui donnent de meilleurs résultats dans les tests d'antagonisme avec les agents phytopathogènes et le test de levée de germination des semences de tomate.

Caractérisation générique des souches bactériennes.

:

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie et PFE au de département biotechnologie et agro écologie, faculté science de la nature et de la vie Université Blida 1, et au niveau de Direction de la santé et de la population de la wilaya de Blida « laboratoire d'hygiène de référence de la wilaya de Blida », pendant la période allant de mois de mars à la fin de mois de juin 2023.

1. Matériels

1.1 Matériel non biologique :

Le matériel utilisé durant notre étude est composé du matériel non biologique tel que le grand et le petit appareillage, le petit matériel, la verrerie, les solutions et les réactifs, les milieux de cultures,

1.2 Matériel végétal :

- La plante de tabac (*Nicotina tabacum*) de la variété (Xanthi) au stade de 9 feuilles de laboratoire de protection et valorisation des ressources agrobiologique université Saad Dahleb Blida-1-.

- La variété de semence de la tomate : On a utilisé la variété Marmande certifier et non traiter récolte 2022 de l'institut technique des cultures maraichères et industrielle ITCMI Staouali.

1.3 Matériels biologiques :

Le matériel biologique est composé de souches microbiennes phytopathogène (**voir tableau1**)

Tableau 1 : les souches de référence phytopathogène utiliser décrit ci-dessus

Les souches phytopathogènes	Le code	Plante hôte	La source
<i>Fusarium oxysporium f.sp albidinis</i>	I7	Palmier dattier. Adrar	Laboratoire de mycologie UB1
<i>Fusarium oxysporium f.sp albidinis</i>	IB3	Palmier dattier. Adrar	Laboratoire de mycologie UB1
<i>Agrobacterium tumefasciens</i>	C58.3	Pommier	Laboratoire PVRAB. UB1
<i>Erwina amylovora</i>	EMEA	Néflier	Laboratoire PVRAB.UB1

2.Méthodes

2.1 Présentation de la région d'étude :

Notre étude à porter sur la rhizosphère de La région de Biskra qui est située au Sud- Est de l'Algérie. S'étend sur une surface de 22.379, 95 km² et se trouve à une altitude moyenne de 124 m, une altitude comprise entre 34°39' et 35° 24' (N.) et une longitude entre 4°99' et 6°79' (E.) (A.N.A.T, 2003). L'enregistrement des données climatiques par l'O.N.M. de Biskra (Office National de Météorologie) nous révèle que cette région a un climat chaud de type aride. La pluviométrie annuelle est très faible et irrégulières. Les températures moyennes de cette zone sont très élevées et des périodes de sécheresse prolongées favorisant une évaporation très intense et une luminosité importante et un taux d'humidité faible. Concernant la pédologie, des études réalisées par **Khechai, (2001)** Au niveau de la Wilaya de Biskra, montrent qu'il y a une hétérogénéité des sols dans cette région : argileux, sableux et limoneux.

Ces dernières années l'agriculture a été développer dans les régions de sud parmi eux la région de Biskra qui est considéré comme étant un des pôles le plus important dans la production agricole (**Belhadi et al, 2011**).

Notre travail a porté sur le prélèvement des échantillons à partir des parcelles de Moringa, Colza et Olivier (variété sigoise) appartenant à l'institut technique de développement de l'agronomie saharienne (ITDAS).

- 1^{er} parcelle :la ferme de démonstration et production de semences D'AIN BEN NOUI (BISKRA)c'est une station couvre une superficie de 11 ha et se trouve sur la route nationale reliant la ville de TOLGA, à environ 07 kms de la ville de BISKRA. Ou on a prélevé les échantillons de Moringa et Colza.



Figure1 : situation géographique de la ferme de démonstration et production des semences d'AIN BEN NOUI Biskra (**Google earth 2023**)

Matériels et méthodes

- 2^{ème} parcelle : Annexe la ferme de démonstration et production de semences d'el-OUTAYA (BISKRA) : est un site expérimental qui couvre une superficie de 40 ha et se trouve sur la route nationale reliant la ville de BATNA, à environ 12 kms au Nord-est de BISKRA. Ou on a prélevé les échantillons de l'olivier



Figure 2 : situation géographique de l'annexe de la ferme de démonstration et production des semences el OUTAYA (BISKRA) (Google earth 2023)

2.2 Prélèvements des échantillons.

Les prélèvements ont été effectués le 16 Mars 2023. Nous avons prélevé nos échantillons à partir de la rhizosphère de certaines plantes cultivées Moringa, Colza et Olivier variété (sigoise). Pour que nos échantillons soient représentatifs les prélèvements ont été effectués au hasard., ces derniers ont été pris à partir de 5 points différents pour les 3 échantillons .Après avoir écarté la couche superficielle, nous avons creuser profondément 15 à 20 cm(**Pepper et al., 2000**) et nous avons prélevé aseptiquement à l'aide d'une spatule stérilisée une petite quantité du sol et on la verser dans des boites stériles pour l'analyse microbiologique Les échantillons ont été mis dans une glacière puis transportés au laboratoire et conservés à 4 C° avant l'analyse .

Matériels et méthodes



Figures 3 : les étapes d'échantillonnage à partir de la rhizosphère. (Original 2023)

2.3 Isolement des souches :

Vue le manque de moyens, les cinq échantillons prélevés de la même parcelle pour chaque plante ont été mélangés aléatoirement pour avoir un échantillon représentatif qui était pris pour un éventuel isolement.

Pour faciliter l'observation des colonies dans les boîtes de pétri, on procède à la préparation des suspensions-dilutions avant de procéder à l'isolement selon le protocole suivant

Matériels et méthodes

2.3.1 préparation des suspensions :

Dans des conditions aseptiques on pèse à l'aide d'une balance de précision 10g de chaque échantillon à analyser et on le transfère dans un flacon contenant 90 ml d'eau distillée stérile (EDS), C'est la dilution 10^{-1} (la suspension mère). (**Figure A**) Le mélange est agité manuellement pendant 10 à 15 minutes afin de mettre les microorganismes contenus dans le sol en suspension (**figure. B**) 1ml DE 10^{-1} est prélevé à l'aide de micropipette puis transféré dans un tube contenant 9ml d' EDS c'est la dilution 10^{-2} . On a poursuivi les dilutions jusqu'à la dilution 10^{-6} (**figure C**) (**Vidhyasekaran et al.1997**).

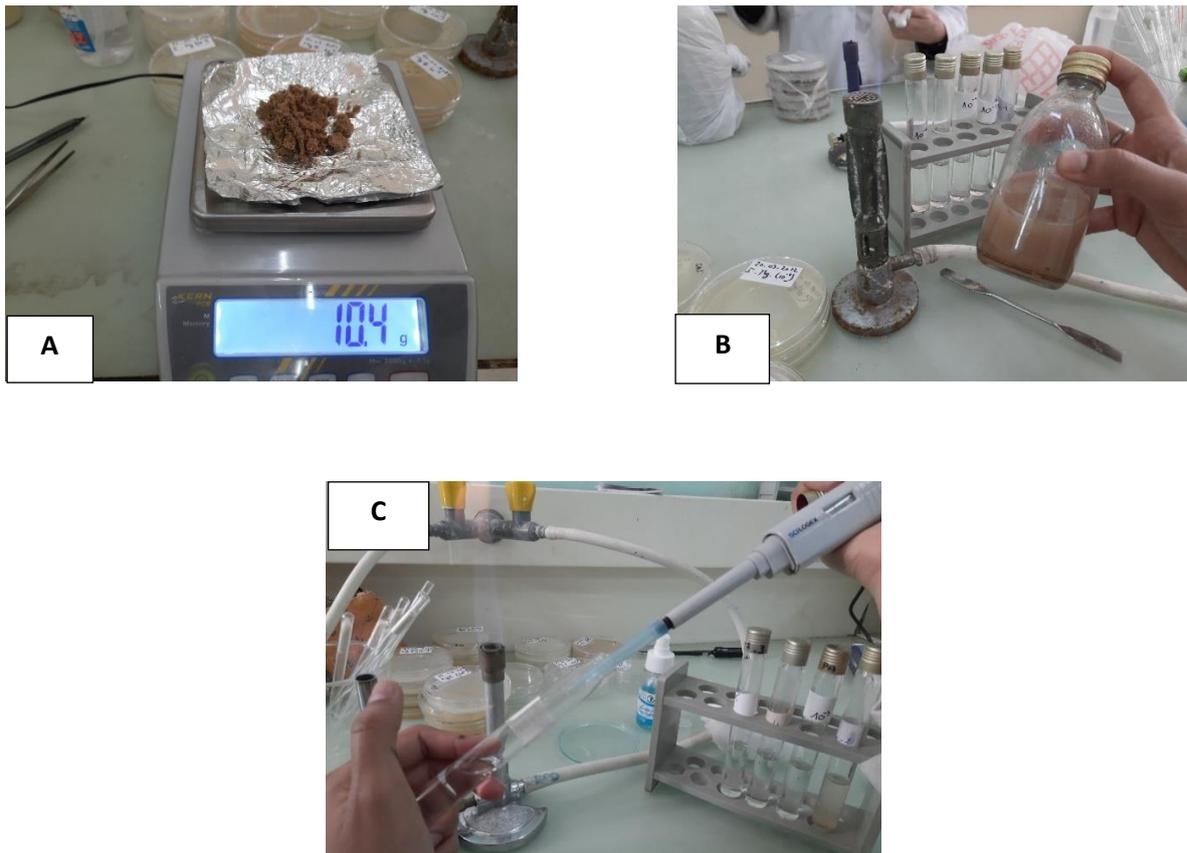


Figure 4 : les étapes de l'isolement (original .2023)

2.3.2 Ensemencement :

Pour l'ensemencement on a utilisé deux milieux de culture :

-le milieu gélose nutritive (GN) : est un milieu d'isolement non sélectif d'un usage général pour la croissance d'une grande variété des micro-organismes, sa composition (**voir annexe**)

- le milieu King b (KB) : pour l'isolement des bactéries fluorescentes tel quel groupe des Pseudomonas fluorescentes Sa composition (**voir annexe**)

Pour l'ensemencement sur milieu GN :

- Ensemencement dans la masse pour cela on a choisi les dilutions : 10^{-2} , 10^{-4} et 10^{-6} un volume de 1ml prélevé de chaque dilution est déposés dans une boîte de pétri vide et

Matériels et méthodes

stérile, puis on a coulé le milieu GN en surfusion. On a agité en forme de huit et on a laissé solidifier. (**Belmessikh et Mergoud., 2017**).

- Ensemencement a la surface des dilutions après traitement thermique : sert à éliminer toutes les Formes végétatives et à récupérer la flore sporulée et les bactéries thermorésistantes telles que les Bacillus. 10^{-3} , 10^{-5} qui ont mise dans un bécher contenu de l'eau sur une plaque chauffante à 80° pendant 20 min puis on les met dans un autre bécher contenu de l'eau froid jusqu'a le refroidissement des suspensions, puis on a prélevé un volume de 1ml de chaque dilution et le déposés dans une boîte de pétri couler précédemment par le milieu GN. (**Seldin et al., 1983**).

Pour l'ensemencement sur milieu KB :

- Ensemencement a la surface : A l'aide d'un râteau on étale un volume de 1ml prélève de chaque dilution : 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} sur toute la surface de la boîte. (**KING E., 1957**).

NB. Deux répétitions réaliser pour chaque dilution.

Toutes les boites ont été codifier et incubé à 30°C pendant 24 à 48h.

2.4 la purification et la conservation des isolats :

La purification des souches consiste à transférer aseptiquement chaque colonie bactérienne d'aspect différent selon la macromorphologie est ensemencée à part dans le milieu de culture d'origine par stries d'épuisement méthode des cadrans (3 cadrans) jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri des colonies identiques sur la base des caractères macroscopiques, Les boites ensemencées ont été incubés pendant 24h à 37°C (**Botton et al.,1990**).

Après ensemencement des souches purifiées sur les milieux GN et KB inclinée, ils ont été incubés à 37°C pendant 24 heures puis conservé directement au réfrigérateur à 4°C . (**King EO et al., 1954**).

2.5 Réaction d'hypersensibilité sur tabac :

Le test d'hypersensibilité sur tabac met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par l'apparition des nécroses au niveau de la zone inoculées sur les feuilles de tabac. Dans un tube de 2 ml EDS une suspension bactérienne préparé à partir d'une culture jeune et pure est ajusté à 10^7 CFU/ml (qui correspond à une densité optique de 0.6) à une longueur d'onde de 600 nm déterminée par spectrophotométrie (**Haddane, 2013**), Puis infiltré par une injection sous épidermique à l'aide d'une seringue stérile de 5 ml, Sur les feuilles d'un plant de tabac (*Nicotina tabacum*) de la variété (Xanthi) au stade de 9 feuilles, les feuilles de tabac ont été inoculées et codifiées. Le témoin négatif consiste à injecter de l'eau distillée stérile au niveau du limbe foliaire. (**Figure**)



Figure 5 : Réalisation du test d'hypersensibilité (originale, 2023)

La lecture des résultats a été effectuée de 24 à 72 h après inoculation, un résultat positif se traduit par la présence d'une zone nécrotique mettant en évidence le pouvoir pathogène de la souche bactérienne testée, un résultat négatif se traduit par l'absence de la zone nécrotique (Yabuuchi et Smith, 1999)

2.6 Le test de l'antagonisme antimicrobien

2.6.1 Activité antifongique

Les souches isolées et saprophytes ont été confrontées à deux champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum f.sp albidinis* IB3 et I7 sur le milieu PDA pour voir si elles présentent une activité antagoniste. Un cylindre de 3 mm de diamètre de la culture jeune (6 jours) de chaque champignon phytopathogène (dont on a vérifié la purification sur milieu PDA) a été prélevé par un emporte-pièce stérile et déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu d'origine (voir Annexe) puis on a déposé à l'aide d'une anse aseptique la crème bactérienne jeune et pure (sous forme de spots à une distance approximative de 2,5cm de la souche fongique). Le témoin négatif étant inoculé avec le champignon seul. Après incubation des boîtes inoculées à 25°C ou 28°C (selon la température optimale de croissance de chaque espèce fongique) pendant 10 jours, l'inhibition de la croissance mycélienne est calculée selon la formule établie par Kumar et al., (2002)

$$I (\%) = [(T-C)/T] \times 100$$

Où : I : pourcentage d'inhibition du champignon (%)

T : diamètre moyen du mycélium (mm)

C : diamètre moyen du mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries.

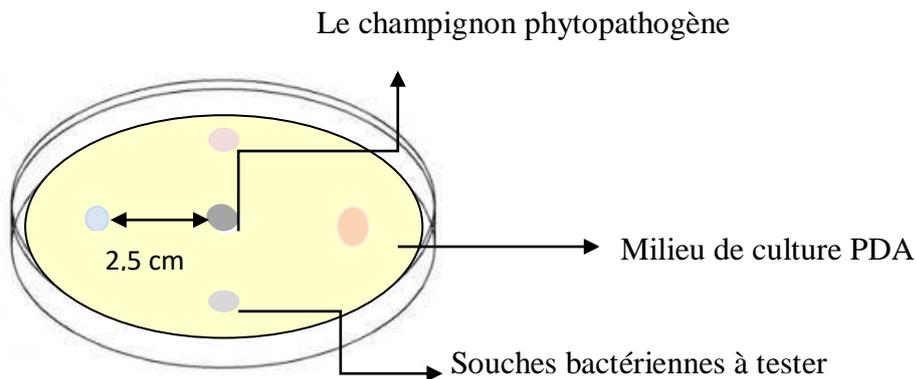


Figure 6 : confrontation entre les agents phytopathogène FOAI7 et FOAIB3 et les isolats bactériens à tester

2.6.2 Activité antibactérienne

Pour voir l'activité antagoniste des bactéries s'saprophytes isolé vis-à-vis les bactéries phytopathogènes nous avons utilisé la méthode La confrontation déphasée in vitro réalisée selon la méthode décrite par **Stonier L. (1960)**. Et modifiée par **Moore et al. (1988)**. Cette méthode consiste à ensemencer les bactéries isolé et s'saprophyte sur le milieu LPGA et mise en culture pendant 48h à 28°C. Chaque souche a été cultivé pendant 24h sur le milieu LPGA avant d'être mise en suspension dans (EDS) à une concentration de (10⁶ UFC/mL), déterminée par spectrophotométrie.

Un volume de 1mL de chaque suspension bactérienne a été ensemencé à l'aide de micropipette sous forme d'un spot (3 bactéries par boîte) sur la surface des boîtes de pétri contenue le milieu LPGA puis ont été incubées par la suite pendant 24 h à 28°C, au même temps, les bactéries phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens* et *Erwina amylovora*) ont été ensemencées sur le milieu LPGA et cultivées dans les mêmes conditions décrites que la souche a testées. Après incubation, les suspensions des bactéries pathogènes (10⁶ UFC/mL) préparées comme décrit ci-dessus, sont pulvérisées à l'aide d'un pulvérisateur stérile sur la surface des boîtes de Pétri contenant les souches bactériennes ensemencées auparavant en spot. Les boîtes de Pétri ont été incubées de nouveau pendant 48 h à 28°C.

Le résultat positif est représenté l'apparition d'une zone d'inhibition (arrêt de la croissance de l'agent pathogène) entourant la colonie mise en spot et le résultat négative est représenté par l'absence de la zone d'inhibition, l'efficacité d'inhibition relative des différentes souches a été évaluée par la mesure du diamètre de chaque colonie en plus de la zone d'inhibition

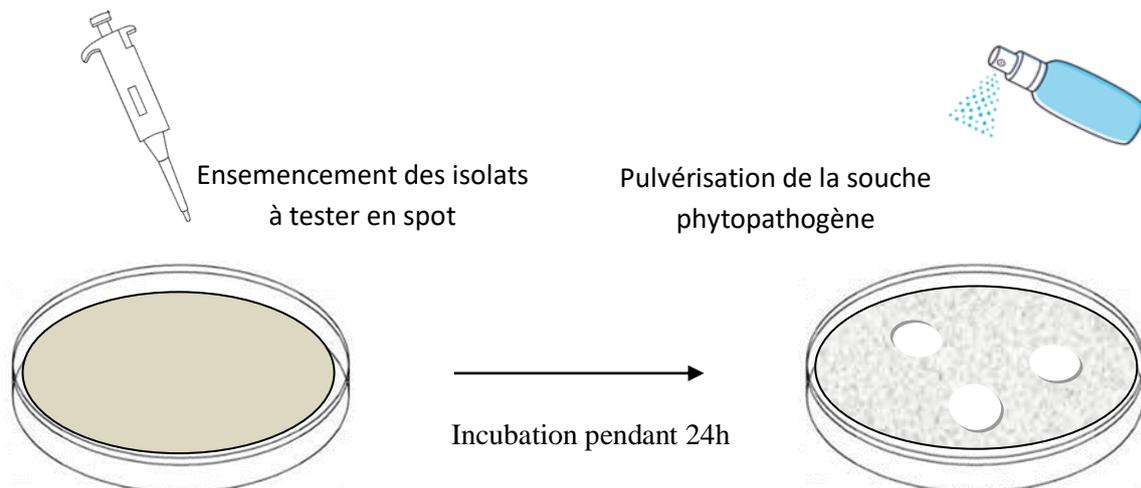


Figure7 : schématisation du protocole de confrontation diphasé établi dans le test d'antagonisme

2.7 La levé de germination :

Afin d'évaluer les potentialités des souches isolés s'saprophytes à stimuler le levé de germination les semences de tomates variété Marmande non traité et certifiée par l'ITCMI Staoueli. Ont été bactérisé après avoir été désinfecter. Pour la lecture des résultats été évalué par le levé de germination pendant 10 jours puis un taux de germination en pourcent (%) selon la formule donnée par :

2.7.1 Désinfection des graines :

Les graines de la tomates variété Marmande sont immergée dans une boite pétri stérile contenue de l'eau de javel NaClO 6° pendant 5 minutes afin d'éliminer toutes agents externes d'origine fongique ou bactérienne ensuit ils ont trompé dans une boite pétri stériles contenue de l'eau distillé stériles et rincer plusieurs fois afin d'éliminer l'excès de désinfectant. Ensuite les semences désinfecter sont recueillies délicatement et déposer dans une boite pétri stérile sur un papier buvard afin de sécher les semences. Cette manipulation est faite dans des conditions aseptique



Figure 8 : Désinfection des graines (Original,2023)

Matériels et méthodes

2.7.2 Préparation des suspensions bactériennes :

On a préparé à partir des culture pures et jeunes des suspensions bactériennes a une concentration d`environ 10^6 , 10^8 UFC/ml et ajustée à une longueur d`onde 600nm. (Messaoudi. H., 2015)

2.7.3. Bactérisassions des graines :

Après désinfection selon la procédure décrite ci-dessus les graines de la tomate sont immergées dans les suspension bactériennes préparer pendant 2h à une température de 28°C avec agitation pour une bonne bactérisassions des graines. Le de témoins consiste à immerger les graines uniquement dans de l`eau distillée stérile.



Figure9 : la bactérisassions des graines (original,2023)

2.7.4 Mise en germination :

On dispose dans chaque boite de pétrie 10 graines désinfectées et bactérisées ainsi le témoin non bactérisée sur papier filtre Whatman (8,5 cm de diamètre) stérile recouvrir par coton disque stériles. Trois répétitions par ont été réalisées. Les boites ont été maintenues humides et mises à incubation à 22°C pendant 72 heures. Le pourcentage de germination a été calculés et les données ont été analysées statistiquement pour déterminer les souches stimulatrices de la croissance.

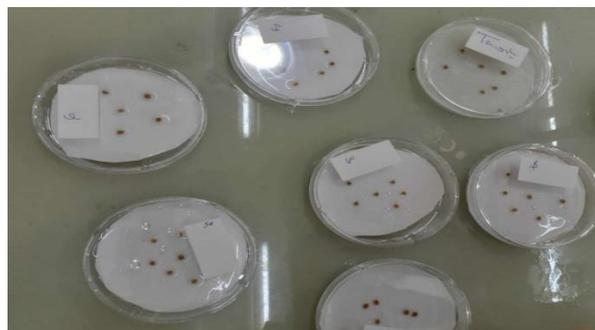


Figure 10 : la mise en germination (original,2023)

2.7.5 Paramètres étudiés

2.7.5.1 Le taux de germination (TG)

Le taux de germination selon **COME (1970)** correspond au pourcentage maximal de graines germées par rapport au total des graines semis. Le taux de germination est calculé par La formule suivante :

$$\text{TG (\%)} = \text{nombre de graines germés/nombre total mis en germination} \times 100$$

2.8 Caractérisation générique

Les souches ayant donné des résultats intéressent après criblage par antagonisme et levé de germination ont été sujet à une caractérisation

2.8.1 Caractérisations morphologiques

2.8.1.1 Caractérisation macroscopique

C'est une description directe faite sur boites d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres afin de les purifier. D'après (**Rebbouh, 2016**), l'examen macroscopique est l'un des critères essentiels d'identification, permettent respectivement la détermination de la colonie elle précède l'étude d'aspect macroscopique des boites s'effectue à l'œil nu dans un endroit bien éclairé, en vérifiant que toutes les colonies soient identiques, il faut noter : La couleur, la taille, la forme du contour, l'aspect de la surface, opacité.

2.8.1.2 Caractérisation micro morphologique

Pour la caractérisation macromorphologique on a procédé à la coloration de Gram, Elle a été réalisée sur des cultures jeunes et pures. Cette coloration différentielle de Gram à un rôle très important dans la classification bactérienne. Elle permet de séparer 2 grand groupe de bactéries à Gram positif colorées en violet et bactéries à Gram négatif colorée en rose Cette distinction fondamentale, base de toute la taxonomie bactérienne, repose sur des différences de structures pariétales des bactéries. Le protocole est le suivant :

- préparation de frotti : à partir d'une culture pure et jeune on a prélevé une petite quantité de la crème bactérienne on la dépose sur une lame propre contenue une goutte de l'eau distille stérile sur pour diminuer la charge des cellules, homogénéiser le tous et fixer la lame par éthanol sur flamme.de bec benzène.

-Coloration par le violet de Gentiane : on verse le colorant sur toute la surface de la lame, laisser la solution agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée.

-Mordantage : verser du Lugol et laisser agir deux fois 45 secondes, rincer à l'eau distillée.

Matériels et méthodes

-Décoloration : consiste à faire un jet d'alcool 96° jusqu'à la disparition de la couleur violette, ensuite bien laver abondamment à l'eau distillée pour stopper son action.

-Recoloration : laisser la solution de Fuchsine pendant 1 minute, bien laver à l'eau et sécher.

L'observation se fait sous microscope photonique au grossissement $\times 10$. $\times 40$. $\times 100$ avec une goutte d'huile à immersion (Singleton, 2005)

2.8.1.3 Test de KOH :

C'est un test qui permet de confirmer le Gram, Il se base sur le fait que la paroi des bactéries à Gram négatif est lysée par le KOH alors que la paroi des bactéries à Gram positif n'est pas détruite. À l'aide d'un cure dent stérile, les bactéries sont prélevées à partir d'une culture pure de 24-48 heures et frottées rapidement dans une goutte d'une solution aqueuse de 3% de KOH préalablement déposée sur une lame de verre. Au bout de quelques secondes, on soulève le cure dent de quelques cm au-dessus de la lame.

Les bactérie Gram négatif :S'elles se forment un filet visqueux.

Les bactéries Gram positif ne produisent pas de filet. (Lelliott, R.A. and Stead, D.E. (1987)

2.9 Caractérisation biochimique

Pour compléter l'identification morphologique, nous avons été amenés à déterminer l'activité biochimique des souches bactériennes. En recherchant les modifications apportées aux milieux de culture par le métabolisme bactérien.

2.9.1 Caractérisation des enzymes respiratoire :

2.9.1.1 Test de catalase :

La catalase est une enzyme de chaîne respiratoire qui empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H_2O_2), dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



La technique consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame, et à y associer un peu de la culture bactérienne à étudier prélevée à partir d'un milieu solide. Si la souche examinée possède une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses. (Marchal et Bourdon, 1982)

2.9.1.2 Test d'oxydase :

L'oxydase est une enzyme qui catalyse la fixation d'hydrogène et des électrons sur une molécule d'oxygène. Elle est présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes (Leveau et Bouix, 1991).

Matériels et méthodes

Ce test est réalisé comme suit On dépose sur une lame en verre stérile un disque d'oxydase sur le quel on dépose une colonie bactérienne stérile imprégner le disque avec une goutte d'eau physiologique stérile et déposer au-dessus une colonie bactérienne avec une Pipette Pasteur stérile La lecture de résultats se fait immédiatement, une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur violette. **(Delarras, 2007)** sont interprétés comme suit :

10 secondes : une réponse positive rapide.

Entre 10 à 60 seconde : une réponse positive tardive.

Après 60 secondes : une réponse négative.

Test mannitol mobilité :

Ce milieu est semi solide permettant de mettre en évidence la mobilité et la dégradation de Mannitol. Ce fait par encemencemnt des souches bactériennes jeunes et pures sont par piqûre centrale dans le milieu mannitol- mobilité **(Gardan et Luisitti, 1981)**. Après 24h à 48h d'incubation à 37°C les résultats obtenus représentée comme suit :

Mannitol positive. : Virage du milieu du rouge au jaune

Mannitol négative : Le milieu ne change pas de coloration

Mobilité positive : trouble du milieu, développement et diffusion des bactéries à partir de la piqure d'ensemencement.

Mobilité négative : croissance des bactéries tout au long de la piqure d'ensemencement uniquement. **(Marchal et Bourdon, 1982)**

Résultats et discussion

Résultats et discussions

1. Isolement et purification des souches bactériennes

Les boîtes issus des isolements des différents échantillons (Mg, Cz et Os) prélevés au niveau des trois sites situés dans la région de Biskra ont montré une diversité des caractères macromorphologiques particulièrement la couleur, l'aspect, la forme...etc, également on a constaté la présence et dominance des colonies bactériennes alors que les colonies fongiques étaient inexistantes malgré que l'isolement a été réalisé sur un milieu standard (milieu GN).

D'après **Dari, 2013**. Le groupe majeur des microorganismes isolés à partir de la rhizosphère est formé particulièrement de bactéries car cette dernière est riche en éléments nutritionnels sous formes d'exsudats racinaires libérés par la plante qui sont nécessaires au développement des bactéries.

L'opération de la purification nous a permis de sélectionner toujours sur la base de la macromorphologie 60 isolats mais malheureusement presque la moitié a été contaminée et on n'a pas pu les récupérer donc seuls 33 isolats ont été purifiés et conservés.

Sur les 33 isolats sélectionnés, 21 isolats se sont développés sur milieu GN dont 10 isolats issus d'un traitement thermique ce qui montre que ces bactéries sont capables de résister aux températures élevées connues dans cette région, par leurs capacités de sporulation et leur potentialité de thermorésistance ce qui les rend plus performantes à s'adapter au climat des régions arides (**KILLIAN et FEHER, 1939**). Parmi les genres bactériens telluriques connus pour leur thermorésistance et leur dominance de ces rhizosphères on a le genre *Bacillus* (**VINTER, 1987**).

Alors que le reste (11 isolats) provient de l'ensemencement dans la masse ces isolats englobent la microflore aérobie et anaérobie facultative.

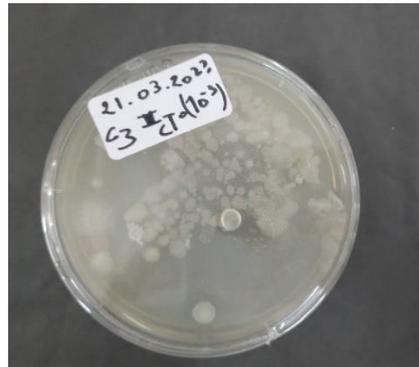
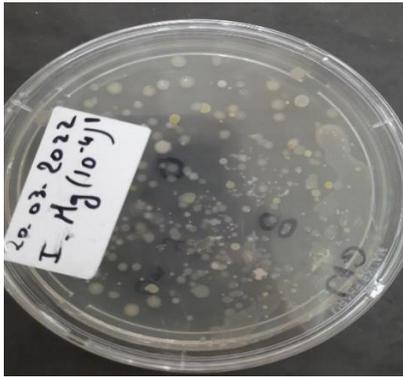
Alors que sur milieu KB 12 souches ont été sélectionnées, il est à signaler après vérification sous la lampe à UV 1 seule souche a donné la fluorescence couleur jaune verdâtre est due à la production par cette souche d'un pigment appelé pyoverdine. (**PALLERONI et al., 1973**) Selon **KING et al., (1954)** le milieu KB est un milieu qui facilite la mise en évidence du pigment sidérophore nommé : Pyoverdine. Ce pigment est synthétisé par quelques espèces du genre *Pseudomonas* fluorescents. (**Figure 14**) (**TOURKYA et al., 2009**).

Également on a constaté que sur les 33 souches isolées et purifiées sont divisées par rapport à la plante hôte comme suit : 11 souches bactériennes à partir de la rhizosphère de moringa et 13 souches bactériennes à partir de la rhizosphère de colza et 9 souches bactériennes à partir de la rhizosphère d'olivier. Dans toutes les rhizosphères on a la présence de rhizobactéries ce qui indique qu'on est en présence d'une activité microbienne car ces dernières sont proches des exsudats sécrétés par les racines des différentes plantes. De point de vue quantitative et selon les résultats qu'on a obtenus suite aux fortes contaminations on ne peut pas se prononcer sur l'abondance des bactéries colonisateurs de la rhizosphère ce que dans ces rhizosphères on a un grand nombre de bactéries qui sont capables de coloniser et d'interagir avec la plante.

Résultats et discussions

Tableau 2: le nombre des isolats dans les milieux de cultures GN et KB avec différents méthodes d'ensemencement.

Plante hôte	Ensemencement sur KB	Ensemencement sur GN	
		Choque thermique	Dans la masse
Olivier	1	4	4
Colza	6	5	2
Moringa	5	1	5



Figures11 :boite issu des l'isolement de quelques échantillons (Original 2023)

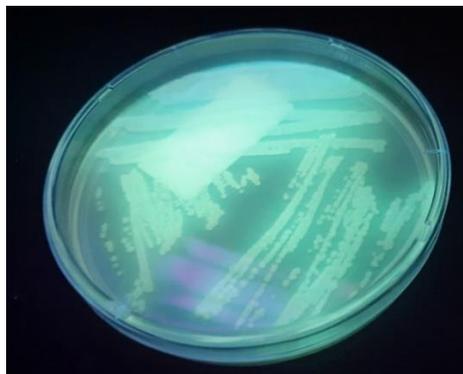


Figure :isolat bacterienne fluorescente sur KB sous la lampe a UV(original 2023)

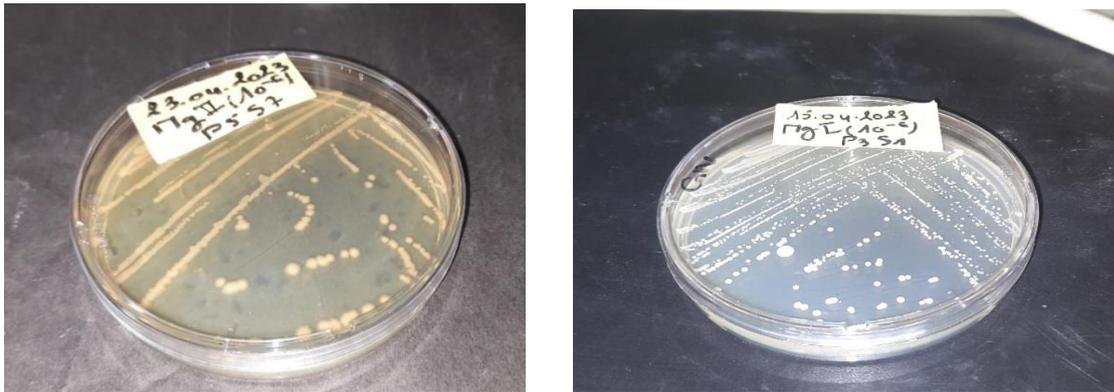


Figure12 : boites issu de la purification dans les deux milieu kb et GN (**original2023**)

2.test d'hypersensibilité au tabac

Pour l'hypersensibilité au tabac sur 33 isolats les résultats obtenus sont comme suit :1 isolat provoqué la réaction d'hypersensibilité sur tabac sous forme de nécrose localisé au niveau de la partie infiltré ce qui représente une réponse positive. Alors que 32 isolats bactériennes ont répondu négativement au test d'hypersensibilité au tabac. Donc elles sont non pathogènes.

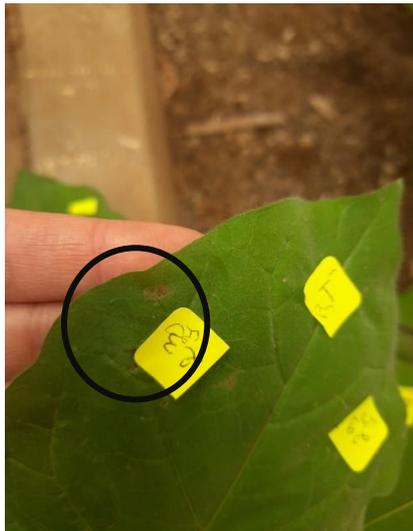


Figure13 : résultats de la réaction d'hypersensibilité causée par les isolats bactériens testés (**Originale, 2023**).

Résultats et discussions

Tableau 3: résultats de la réaction d'hypersensibilité inoculée par les isolats bactériens testés.

Isolats testes	Réponse
S23 MG	+
S1 MG; S2 OS; S3 OS; S4 CZ; S6 OS; S7 CZ ;S8 MG ;S10 MG ;S11 MG ;S12 MG; S13 OS ; S14 CZ ;S15 CZ; S16 CZ; S18 MG., S19 CZ, S20 OS; S21 CZ ; S22 CZ;S24 OS ; S25 OS ; S26 OS ; S27 CZ ; S28 CZ ; S29 CZ ; S30 CZ ; S31 OS ; S32 OS ;S33 OS ;S34 OS ;S35 OS; S36 OS	-

(-) : Réponse négative.

(+) : Réponse positive.

Ces résultats du test de pouvoir pathogène confirment qu'une des souches isolées est pathogène due à la formation d'une nécrose issu d'une réaction de défense locale caractérisée par un mécanisme de mort cellulaire programmée (PCD, programmed cell death) au point de pénétration de l'agent pathogène (**Jones et Dangl, 2006**). Alors que, les 32 souches inoculées sur tabac ne causent pas une réaction d'hypersensibilité, sont des bactéries non pathogène (saprophytes) donc elles vont subir les tests de criblage (antagonismes microbiens et levée de germination) pour les sélectionner comme un biopesticide et biofertilisant (**SELLAMI et al., 2015**).

3. Teste d'antagonisme in vitro :

Le test de confrontation in vitro est très important dans le criblage de rhizobactérie ayant de potentialité de biocontrôle et de protection vis-à-vis des bios agresseurs.

3.1 Activité antifongique

Sur 32 isolats issus des rhizosphères des différentes plantes cultivées jeunes, pures et saprophytes ont subi les tests d'antagonismes in vitro vis-à-vis deux isolats fongiques phytopathogènes FOA IB3 et FOA I7 seulement 4 ont présenté une activité antifongique en inhibant la croissance mycélienne de l'agent pathogène et en formant les zones d'inhibitions.

Le diamètre de la croissance mycéliennes de I7 et IB3 a été réduit en présence de ces quatre souches antagonistes comparée aux témoins non inoculés.

Résultats et discussions

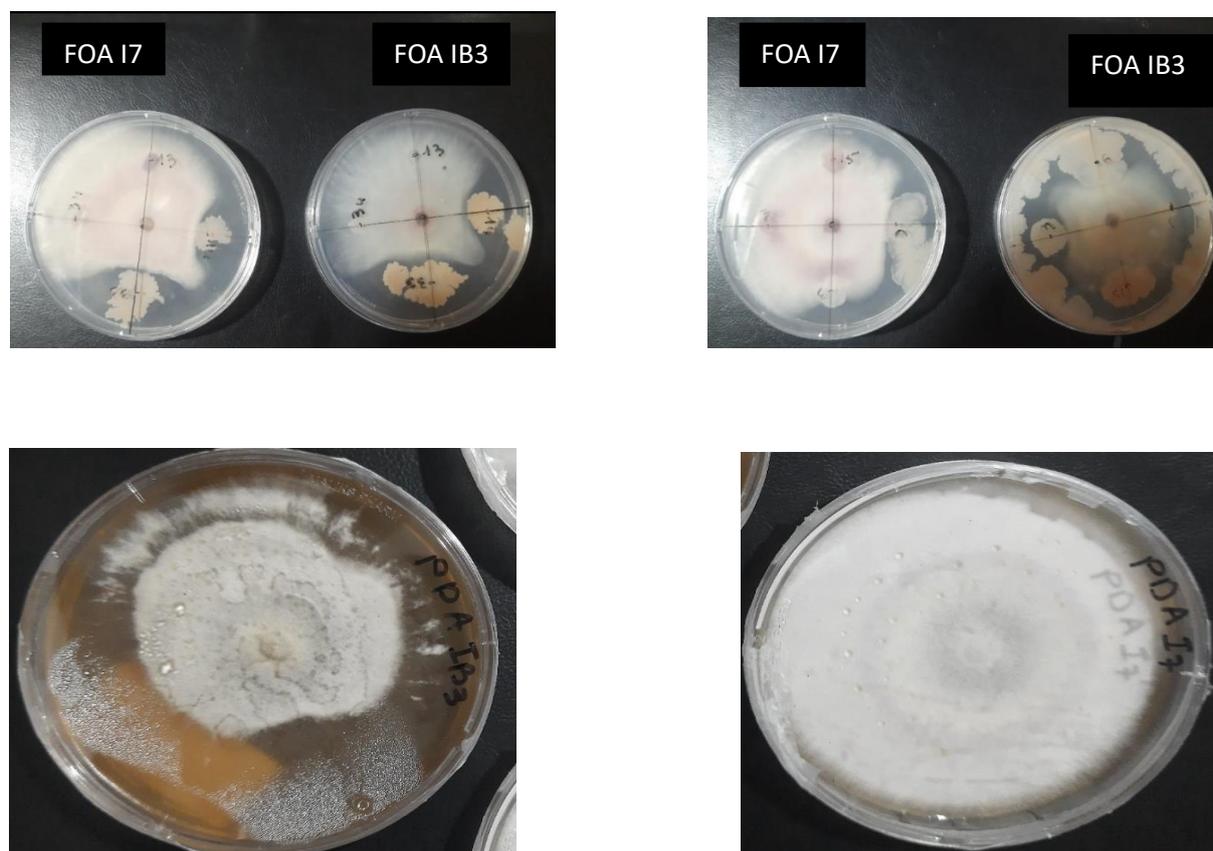


Figure 14: Pouvoir antagoniste des bactéries isolées vis-à-vis les deux bactéries phytopathogènes FOA IB3 , FOA I7 (**original 2023**)

L'activité antagoniste vis à vis de deux agents varie selon la souche bactérienne, Le calcul de pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI%) nous a permis l'obtention des résultats présenter dans le tableau si dessous :

Tableau 4: le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne exprimé

Les souches	Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%)	
	FOA IB3	FOA I7
S3 OS	81,25	0
S6 OS	80	83,75
S33 OS	87,5	85
S14 CZ	83,75	81,25

Parmi les 32 isolats bactériens tester on a 3 isolats : S6 OS S33 OS et S14 CZ qui ont montré un effet antagoniste et manifestent une action inhibitrice vis-à-vis les deux isolats fongiques phytopathogènes FOA I7 et FOA IB3.

Résultats et discussions

Le meilleur pourcentage d'inhibition a été obtenue par l'isolat S33 OS isolé à partir de la rhizosphère d'olivier estimé par 87,5% vis-à-vis de (IB3) et par 85% vis-à-vis (I7).

Le plus faible pourcentage d'inhibition a été obtenue par la souche S6 vis-à-vis (I7) avec un taux de 80% et la souche S14 vis-à-vis (IB3) avec un taux de 81,25%.

Les 29 isolats bactérienne n'ont pas montrée une activité inhibitrice vis-à-vis les deux champignons (I7) et (IB3). Avec un pourcentage d'inhibition varie entre 5 à 10 %.on a supposé que ces bactéries ont un rôle dans la biostimulation des plantes par la production des métabolites tels que les phytohormones , les sédérophore ...etc

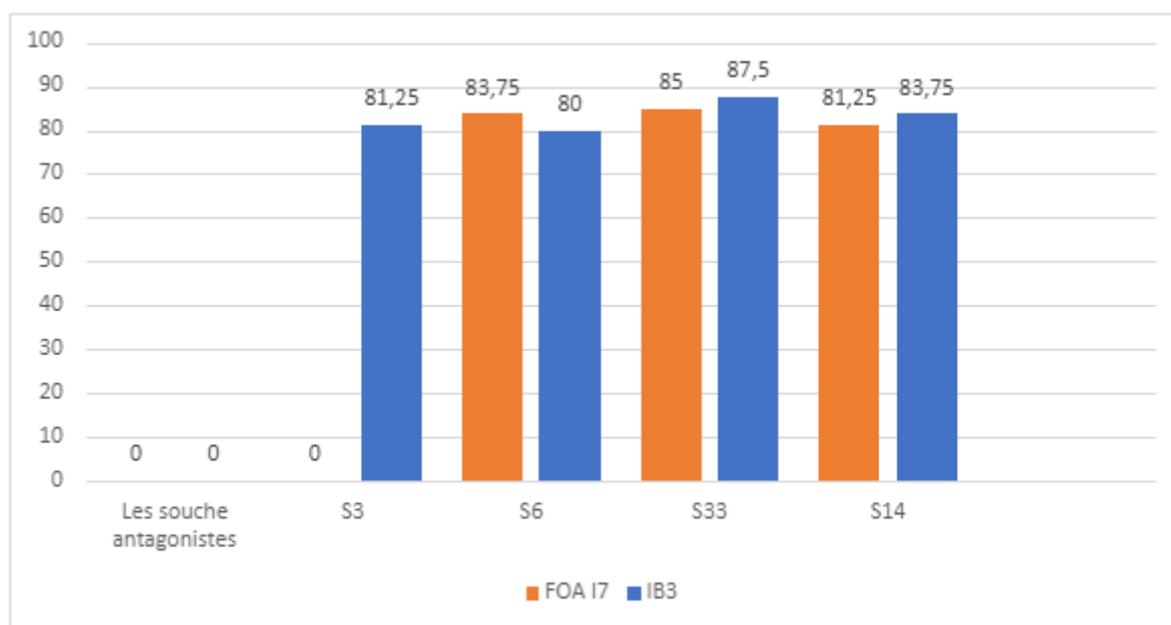


Figure 15 : Histogramme de pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne FOA I7 et FOA IB3 vis-à-vis des isolats antagonistes

D'après l'histogramme représenté dans la figure, on constate que les quatre isolats bactériennes qui ont une activité antagoniste présentent différents taux d'inhibitions exprimées en pourcentage vis-à-vis les deux champignons testés FOA I7 et FOA IB3.

Das et al, (2015) ont montré que la différence d'intensité du pouvoir inhibiteur des bactéries antagonistes vis-à-vis le champignon phytopathogène FAO pourrait être liée à la nature et la quantité de substances produites par les bactéries antagonistes, comme elle pourrait être liée aux conditions de production des métabolites antifongiques (composition de milieu de culture, pH, température d'incubation, temps d'incubation).

Les rhizobactéries sont connues par leur effet antagoniste comme agents de biocontrôle, de type PGPR qui représentent le groupe de bactéries rhizosphériques promotrice de la croissance des plantes. (**Lodewyckxal et al, 2002**). Ces derniers emploient plusieurs

Résultats et discussions

mécanismes d'action dans leur lutte contre les ravageurs de cultures par action direct ou indirecte.

La production de métabolites antifongique dont le rôle principale est de ralentir ou bloquer la croissance de l'agent pathogène en agissant sur une étape essentielle de leur cycle de développement (Corbaz, 1990) ces molécules bioactives comme les phénazines et les DAPG (2,4 diacétyl phluroglucinol) (Weller, 2007), et des composés bioactifs volatiles comme le cyanure d'hydrogène, l'ammoniac, 2,3-butanediol et l'acétoïne (Ahmed et al., 2008). Des enzymes hydrolytiques qui peuvent hydrolyser une grande variété de composés polymère, notamment la chitine, les protéines et la cellulose qui sont des constituants de la paroi cellulaire de nombreux champignons phytopathogènes. (Pal et Gardener, 2006 ; Vega et Kalkum, 2012).

Ces agents impliquent également d'autres mécanismes pour contrôler les organismes phytopathogène, comme la compétition des bactéries près des spores du pathogène pour l'obtention d'éléments nutritifs, peut entraîner une inhibition accrue de la germination des spores de ce dernier (Elad et Stewart, 2004 ; Haidar et al., 2016).

Le mode d'action de ces substances toxiques est très variable, on distingue en général :

- Un effet ou fongistatique, se traduisant par un arrêt de la croissance du champignon
- Un effet fongicide, se traduisant par la mort définitive du champignon.
- Un effet fongilytique, se traduisant par la désintégration ou la lyse des cellules fongiques. (Dommergues et Mangenot, 1970).

3.2 Activité antibactérien :

Le test de pouvoir antagoniste in vitro montré une activité antagoniste des bactéries à tester vis-à-vis des souches bactériennes phytopathogène EMEA et C58.3. Les différentes souches antagonistes présentent un effet inhibiteur se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies des bactéries testées (Figure 16). Dont le diamètre est variable selon la souche pathogène. (Tableau 5)



Résultats et discussions

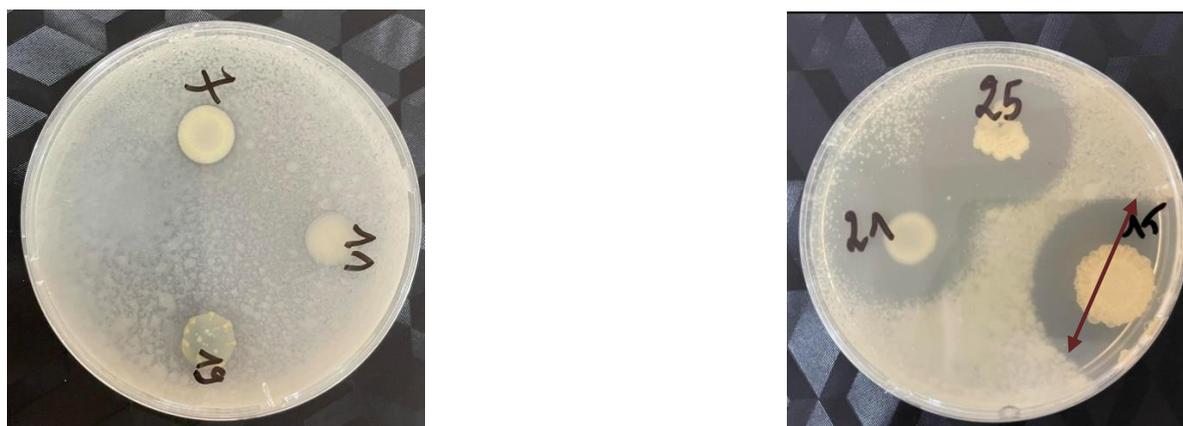


Figure 16 : pouvoir antagonistes des souches bactérienne vis-à-vis les deux bactéries phytopathogène (original 2023)

Parmi les 32 isolats tester, 16 isolats bactériennes ont montré une activité antagoniste vis-à-vis les deux bactéries phytopathogène C58.3 et EMEA exprimée des zone d'inhibition variable et de valeurs importantes. Voir **tableau 5**.

5 isolats ont montré une activité antagoniste vis-à-vis la bactérie phytopathogène EMEA ont formé des zones d'inhibition dont le diamètre varient allant de 10mm à 40 mm .

10 isolats n'ont pas montré une activité antagoniste vis avis les deux bactéries phytopathogènes C58.3 et EMEA.

L'isolat 33 OS a exercé une activité antagoniste assez important vis-à-vis C58.3 exprimée d'une zone d'inhibition de 40mm.

Tableau5 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation déphasée in vitro des bactéries à tester envers les deux souches phytopathogènes.

Souche	C58	EMEA
1 MG	30	22
2 OS	19	20
3 OS	/	20
4 CZ	22	27
6 OS	32	35
7 CZ	/	27
8 MG	23	20
10 MG	23	35
11 MG	/	20
12 MG	/	32
13 CZ	/	/
14 CZ	30	31
15 CZ	35	29
16 CZ	/	/
18 MG	/	/

Résultats et discussions

19 CZ	/	19
20 OS	/	/
21 CZ	25	21
22 CZ	/	/
24 OS	24	22
25 OS	31	23
26 OS	15	10
27 CZ	/	/
28 CZ	11	28
29 CZ	/	23
30 CZ	/	/
31 OS	/	/
32 OS	/	/
33 OS	32	40
34 OS	24	27
35 OS	/	/
36 OS	23	20

L'activité antagonistes quelque isolats testés montrent une activité antagoniste vis-à-vis la souche pathogène C58.3 et EMEA. Les différentes souches antagonistes présentent un effet inhibiteur variable. 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**).

L'activités antimicrobienne présentées par les rhizobactéries isolées montrent les potentialités de ces derniers à contrôler la microflore délétère (**LODEWICKICKY C et al., 2002**), qui cohabite dans la même rhizosphère par des mécanismes d'actions tel que la compétition, à la production d'antibiotiques, qui ont des actions antibactériennes puissantes impliquées dans le bio contrôle tel que : acide phénazine-1-carboxylique et l'oomecineA (**FERNANDO et al., 2005**), l'acide sianidrique, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphoroglucinol (DAPG), pyrrolnitrine (**DEFAGO., 1993 ; HAAS et DEFAGO, 2005**).

4. Test du levé de germination :

Parmi les 32 isolats qui ont été utilisés pour le test du levé de germination :

16 isolats ont entraîné un taux de germination assez important comprise entre 80% et 100% par rapport au témoin non inoculée dont le taux de germination est estimé à 5% durant les 4 jours après la mise en germination.

- 9 isolats ont entraîné un taux de germination faible comprise entre 45% et 75%.

- L'isolat 33 OS a entraîné un taux de germination plus élevé durant les 4 premiers jours estimée par 100% .

Résultats et discussions



Figure 17 : la levé de germination des semences de la tomates variété Marmande (**original 2023**)

Tableau 6: taux de germination des grains de la tomate variété Marmande exprimée en pourcentage.

Souches	Jour4	Jour6	Jour8	Jour10
22 CZ	55%	60%	75%	90%
25 OS	75%	75%	85%	90%
24 OS	45%	70%	100%	100%
8 MG	75%	85%	100%	100%
7 CZ	85%	90%	95%	100%
11 MG	75%	100%	100%	100%
3 OS	90%	95%	95%	100%
19 CZ	90%	95%	95%	95%
1 MG	45%	90%	100%	100%
6 OS	5%	100%	100%	100%
3 OS	5%	95%	95%	100%
28 CZ	95%	100%	100%	100%
12 MG	90%	100%	100%	100%
18 MG	90%	95%	95%	100%
16 CZ	95%	95%	95%	95%
33 OS	100%	95%	95%	95%
32 OS	75%	95%	100%	100%
14 CZ	80%	100%	100%	100%
36 OS	90%	95%	95%	95%
15 CZ	90%	95%	100%	100%
35 OS	85%	100%	100%	100%
34 OS	80%	100%	100%	100%
10 MG	50%	95%	100%	100%
30 CZ	15%	100%	100%	100%
29 CZ	65%	0%	95%	95%
20 OS	90%	95%	95%	95%

Résultats et discussions

21 CZ	90%	100%	100%	100%
T négatif	5%	50%	80%	100%

Les PGPR peuvent être utilisées comme biofertilisants efficaces pour l'amélioration des rendements des cultures (**Biswas et al, 2000**), (**Asghar et al 2002**), (**Bashan et al., 2004**) en améliorant les paramètres de rendement notamment le taux de germination des semences tel qu'il a été démontré chez des souches d'*Azospirillum*, *Pseudomonas* et *Azotobacter* (**Shaukat et al., 2006**).

5. Caractérisation générique

Les 32 isolats ayant présenté une activité antagoniste et un bon taux de levée de germination après bactérisation ont subi une caractérisation générique .

5.1 Caractérisation macroscopique :

Après purification la purification colonies isolés à partir des différents rhizosphères des plantes cultivées ont été sautés à la description macromorphologique qui porte sur la forme et le contour des colonies, la couleur, le relief, la taille, l'opacité, et la production ou absence de pigment fluorescent pour les isolats cultivés sur KB

Tableau 7: Résultats de l'examen macroscopiques des isolats bactériennes isolées à partir du sol de moringa olivier et colza après cultures sur milieux gélose nutritive (GN) et king B (KB) à 37°C pendant 72 heures.

Echantillons	Forme	Élévation	Bord	Aspect de surface	Opacité	Consistance	Taille	Couleur
1 MG	Circulaire	Convexe	Régulier	Lisse	Opaque	Crémeuse	Petite	Blanc nacré
2 OS	Circulaire	Plane	Dentelé	Lisse	Opaque	Crémeuse	Petite	Beige
3 OS	Irreguliere	Plane	Dentelé	Brillant	Opaque	Crémeuse	Petite	Blanc nacré
4 CZ	Punctiforme	Plane	Irrégulier	Lisse	Opaque	Crémeuse	Petite	Blanc nacré
6 OS	Fusifforme	Plane	Régulier	Lisse	Opaque	Muqueuse	5mm	Blanc nacré
7 CZ	Circulaire	Elevé	Régulier	Rugeux	Opaque	Crémeuse	2mm	Beige
8 MG	Circulaire	Plane	Irrégulier	Brillant	opaque	Crémeuse	2mm	Blanc nacré
10 MG	Punctiforme	Plane	Régulier	Lisse	Translucide	Crémeuse	1mm	Beige
11 MG	Circulaire	Plane	Régulier	Lisse	Translucide	Crémeuse	1mm	Jaune
12 MG	Circulaire	Plane	Régulier	Lisse	Translucide	Crémeuse	2mm	Blanc nacré

Résultats et discussions

13 OS	Punctiforme	Plane	Régulier	Lisse	translucide	Crémeuse	1mm	Beige
14 CZ	Fusifforme	Plane	Régulier	Rugueux	Opaque	Muqueuse	3mm	Blanc nacré
15 CZ	Fusifforme	Elevé	Dentelé	Rugueux	Opaque	Crémeuse	3mm	Saumon
16 CZ	Circulaire	Aplatie	Régulier	Lisse	Opaque	Crémeuse	2mm	Jaune
17 MG	Circulaire	Convexe	Irrégulier	Lisse	opaque	Crémeuse	3mm	Blanc nacré
18 MG	Circulaire	Aplatie	Irrégulier	Lisse	Translucide	Crémeuse	3mm	Beige centre foncé
19 CZ	Fusifforme	Plane	Régulier	Lisse	Translucide	Muqueuse	3mm	Beige jaune
20 OS	Circulaire	Convexe	Régulier	Lisse	Opaque	Crémeuse	2mm	Beige
21 CZ	Circulaire	Convexe	Régulier	Brillant	Opaque	Crémeuse	2mm	Blanc nacré
22 CZ	fusiforme	Elevé	Régulier	Lisse	Opaque	Muqueuse	3mm	Saumon
24 OS	Fusifforme	Elevé	Dentelé	Rugueux	opaque	Muqueuse	4mm	Grisâtre
26 OS	Circulaire	Plane	Régulier	Lisse	translucide	Crémeuse	3mm	Centre foncé jaune bord Claire
27 CZ	Circulaire	Plane	Irregulier	Lisse	Opaque	Cremeuse	2mm	Blanc nacré
25 OS	Circulaire	Plane	Regulier	Lisse	Translucide	Cremeuse	1mm	Centre foncé orange bord Claire
28 CZ	Circulaire	Plane	Regulier	Lisse	Translucide	Cremeuse	1mm	Beige
29 CZ	Fusifforme	Plane	Dentelé	Lisse	Opaque	Cremeuse	Petite	Blanc nacré
30 CZ	Punctiforme	Plane	Dentelé	Brillant	Opaque	Cremeuse	Petite	Blanc nacré
31 OS	Circulaire	Plane	Regulier	Lisse	Opaque	Cremeuse	Petite	Jaune
32 OS	Circulaire	Plane	Regulier	Lisse	Translucide	Cremeuse	2mm	Beige
33 OS	Fusifforme	Plane	Régulier	Rugueux	Opaque	Muqueuse	3mm	Blanc nacré
34 OS	Fusifforme	Plane	Régulier	Rugueux	Opaque	Muqueuse	3mm	Blanc nacré

Résultats et discussions

35 OS	Circulaire	Convexe	Régulier	Lisse	Opaque	Crémeuse	3mm	Blanc nacré
36 OS	Punctiforme	Plane	Régulier	Lisse	Opaque	Crémeuse	1mm	Blanc

5.2 Caractérisation micro morphologie :

Après avoir effectué la coloration différentielle de Gram, nous avons observé les frottis colorés au microscope optique au grossissement 1000×. Cette technique nous a révélé des bactéries Gram négatif et des bactéries Gram positif de tailles différentes. L'examen microscopique des 32 isolats bactériennes isolées à partir du sol de moringa, colza et olivier et a révélé 12 isolats à Gram négatif et 19 isolats à Gram positif. La plupart des isolats à Gram positif étaient de formes différentes : bacilles, cocci. Par contre les isolats bactériennes à Gram négatif étaient des coccobacilles et cocci de petite taille et parfois moyenne. Les isolats bactériennes étaient différentes d'une espèce à une autre ainsi les bactéries à Gram négatif était soit : isolées, en palissades, en diplobacilles. Les bactéries à Gram positif était soit : isolées, en chainettes, en amas ou en diplobacilles. Les résultats sont présentés dans le tableau 8:

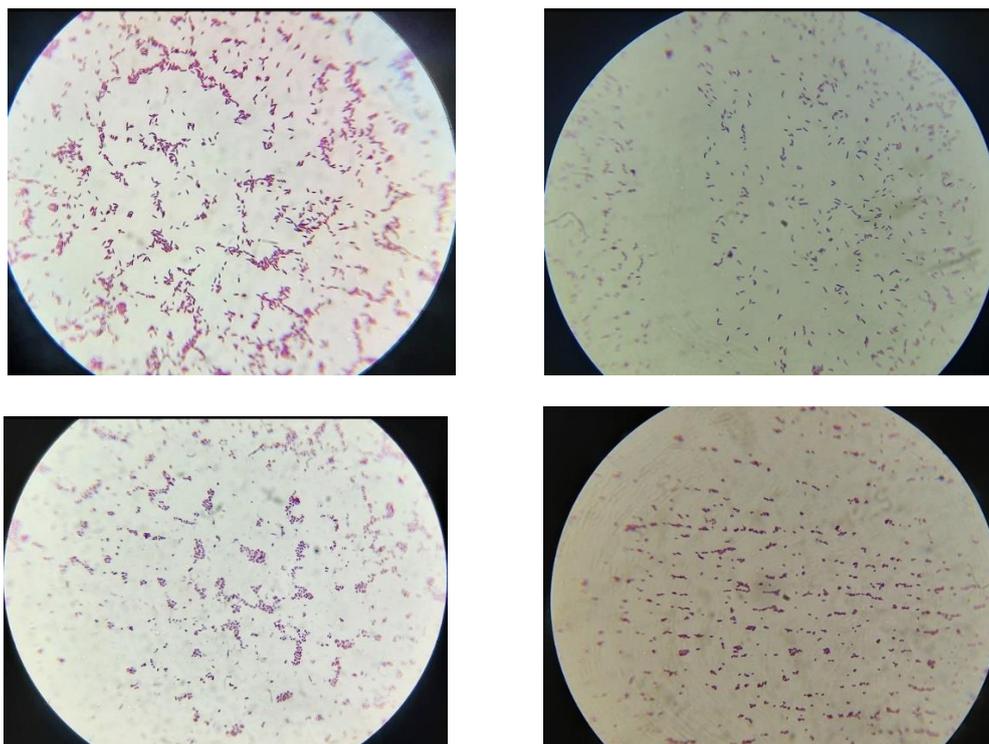


Figure : résultats de coloration de Gram de quelques isolats bactériennes (original 2023)

Tableau 8 : les résultats de coloration de Gram et le test de KOH

Isolat	Forme	Gram	Agencement	Test de KOH
1	Cocci	Positif	En amas	Négatif
2 OS	Bacille	Positif	Isolée	Négatif
3 OS	Coccobacille	Négatif	Isolée	Positif

Résultats et discussions

4 CZ	Bacille	Positif		Négatif
6 OS	Bacille	Positif		Négatif
7 CZ	Bacille	Positif		Négatif
8 MG	Bacille	Positif		Négatif
10 MG	Cocci	Négatif		Positif
11 MG	Cocci	Négatif	En amat	Positif
12 MG	Cocci	Négatif		Positif
13 OS	Bacille	Positif		Négatif
14 CZ	Bacille	Positif	En amat	Négatif
15 CZ	Bacille	Positif		Négatif
16CZ	Cocci	Positif		Négatif
18 MG	Bacille	Negatif	Isolées	Positif
19 CZ	Bacille	Negatif		Positif
20 OS	Bacille	Positif	En amat	Négatif
21 CZ	Bacille	Positif		Négatif
22 CZ	Cocci	Positif	Isolées	Négatif
24 OS	Bacille	Positif	En chaînette	Négatif
25 OS	Bacille	Positif		Négatif
26 OS	Bacille	Positif		Négatif
27 CZ	Bacille	Negatif	Isolées	Positif
28 CZ	Coccobacille	Positif	En amat	Négatif
29 CZ	Bacille	Négatif	En chaînette	Positif
30 CZ	Bacile	Négatif	Isolées	Positif
31 OS	Bacille	Positif	Isolées	Négatif
32 OS	Cocci	Négatif	En amat	Positif
33 OS	Bacille	Positif	Isolées	Négatif
34 OS	Coccobacille	Négatif	En amat	Positif
35 OS	Coccobacille	Négatif	En amat	Positif
36 OS	Cocci	Positif		Négatif

6. Caractérisation biochimique :

6.1 Test de catalase :

Le test de la catalase permet de vérifier si une bactérie possède l'enzyme de la catalase ayant comme utilité de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau. En effet 22 isolats bactériennes sont capables de produire la catalase et 10 isolats n'ont pas la capacité de produire la catalase.



Figure 19 : test de catalase positive (original2023)

6.2 Test oxydase :

Sur les 32 isolats testés pour l'oxydase, 22 ont présentées une coloration violette avant 60 secondes donc c'est des oxydases positives et les 10 autres sont à catalase négatif. La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique IV : cytochrome-oxydase (Tableau 06).



Figure20 : test d'oxydase positif (original 2023)

6.3 Test de mannitol-mobilité :

Le milieu de mannitol mobilité permet l'étude de la fermentation de mannitol et la mobilité des isolats bactériens a testées. La lecture de ce test est possible grâce à la présence d'un indicateur de Ph le rouge de phénol, l'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune) (**Tableau8**).

Résultats et discussions

Le test de mannitol mobilité a révélé que 31 isolats bactériennes sont capables de dégrader le mannitol donc ces bactéries sont mannitol (+), et 1 souche bactérienne n'a pas la capacité de dégrader le mannitol donc est mannitol (-)

Et concernant la mobilité : 24 isolats sont mobiles et 8 souches sont immobiles

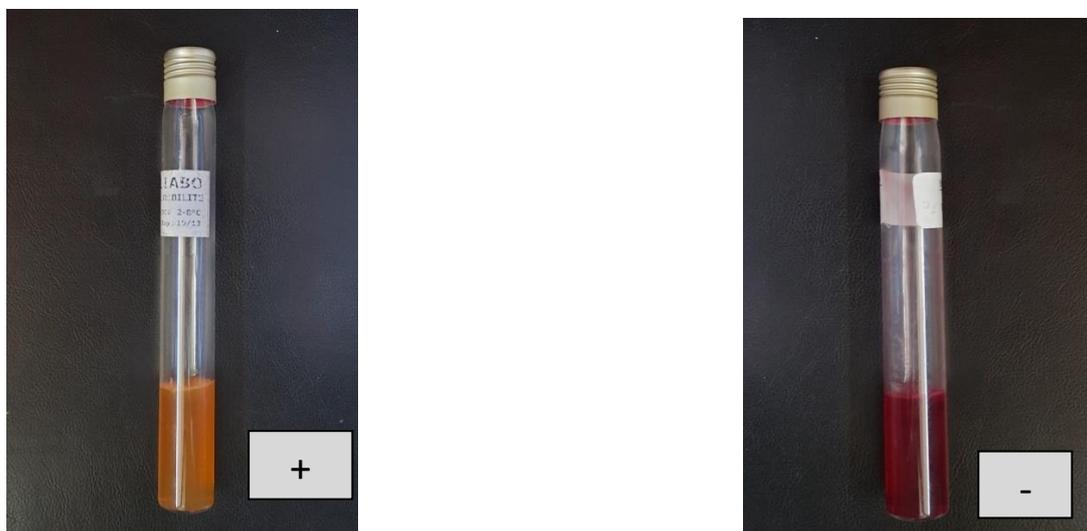


Figure 21 : résultats de test de mannitol mobilité (original 2023)

Tableau 8: résultats des tests des enzymes respiratoires pour la caractérisation biochimique.

Isolat	Catalase	Oxydase	Mannitol	Mobilité
1 MG	+	+	+	Immobile
2 OS	+	-	+	Mobile
3 OS	+	+	+	Immobile
4 CZ	+	-	+	Mobile
6 OS	+	+	+	Immobile
7 CZ	+	-	+	Mobile
8 MG	+	+	+	Mobile
10 MG	-	-	+	Mobile
11 MG	+	+	+	Immobile
12 MG	-	-	+	Mobile
13 OS	+	+	+	Mobile
14 CZ	+	+	+	Mobile
15 CZ	+	+	+	Mobile
16 CZ	+	+	+	Mobile
18 MG	-	+	+	Immobile
19 CZ	-	+	+	Immobile
20 OS	-	+	-	Mobile
21 CZ	-	+	+	Mobile
22 CZ	+	-	+	Mobile
24 OS	-	+	+	Mobile
25 OS	-	-	+	Mobile

Résultats et discussions

26 OS	+	-	+	Mobile
27 CZ	+	-	+	Mobile
28 CZ	+	+	+	Mobile
29 CZ	-	-	+	Mobile
30 CZ	+	-	+	Mobile
31 OS	-	-	+	Mobile
32 OS	+	-	+	Immobile
33 OS	+	+	+	Mobile
34 OS	+	+	+	Mobile
35 OS	+	+	+	Immobile
36 OS	+	+	+	Mobile

Après l'études des caractères cultureux et morphologique primaire effectué sur bactéries isolées nous avons pu les rapprocher que l'isolat 33 OS présente des caractéristiques morphologiques et biochimique du genre de *Bacillus sp* parmi eux une réaction positive de la coloration de Gram de forme bacillaire de taille variable entre 1 à 2mm, présence d'endospore ovale, catalase, oxydase positive et mannitol-mobilité positif.

Conclusion

Pour conclure nous pouvons noter que les PGPR peuvent contrôler la propagation des agents phytopathogènes par des mécanismes directs et indirects c'est le bio contrôle. Aussi ils ont la capacité de stimuler et d'augmenter la vitesse de croissance de la plante(biostimulation), ce qui a encouragé et stimulé les recherches dans le domaine de la biotechnologie pour les exploiter dans la production des biopesticides et biofertilisants ceci dans le but de limiter l'utilisation abusive et non contrôlée des produits chimiques agricoles et pour protéger les végétaux d' une part, tout en respectant l'espace environnementale et la sante du consommateur.

Dans cette optique, notre travail préliminaire a été porté sur l'isolement et le criblage des souches bactériennes rhizosphériques à la fois stimulatrices des plantes cultivés à grand intérêt agronomique, et ayant un pouvoir antagoniste contre les espèces phytopathogènes fongiques et bactériens.

L'isolement et la purification des souches rhizobactériennes de différents échantillons provenant des rhizosphères de trois plantes cultivées au niveau de la région de Biskra ce qui nous a conduits à l'obtention de 33 souches.

Le premier test effectué est celui de l'hypersensibilité qui a permis d'éliminer une 01 souche phytopathogène .

L'évaluation d'antagonisme in vitro bactérie-champignon phytopathogene et bactérie-phytopathogene et la levée de germination ont montré d' autre part que :

- 16 souches exercent un effet antagoniste sur les bactéries phytopathogènes(*Agrobacterium tumefaciens* - *Erwinia amylovora*).
- 4 souches exercent un effet antagoniste vis-à-vis le chamoignons phytopathogène(*Fusarium oxysporum* f.sp *Albedinis* T7 et IB3).
- 15 souches ont montré une activité stimulatrice de la germination des grains de tomate de variété Marmande assez important non bactérisé en espace de 10 jours.

Après les tests de bio contrôle et de bio stimulation, les souches recueillies ont subi une caractérisation générique par le test de Gram ,KOH , oxydase catalase ,mannitol mobilité ...

Cette étude préliminaire nous a permis de mettre en évidence quelques potentialités de bactéries isolées à partir de quelques rhizosphères de la région de Biskra à avoir une action anti fongique et antibactérienne .Antagonisme microbienne) et à stimuler dans un temps assez court la levée de germination des semences les souches.

Toutefois on n'a pas pu faire la caractérisation en raison de manque de moyen d'utilisation de plus de milieux de cultures sélectives afin d'isoler et d'étudier d'autres bactéries en occurrence :

1 Faire les études sur l'agent microbien et sur ses capacités de résister à certaines conditions de l'environnement tel que celle qui existe dans les régions arides stress hydrique, thermique et salin.

2 Essayer de faire une étude approfondie de formulation de ces micro organismes pour faciliter leur application sur le terrain.

3- De refaire et approfondir la caractérisation des souches génériques et spécifiques.

4- l'identification des souches par les méthodes de biologie moléculaire.

5- extraction et purification des molécules bioactives les antifongiques et antibactériennes produites par les souches bactériennes et déterminer leur structure.

6- Approfondir l'étude des divers mécanismes d'action mis en pratique par ces souches afin d'avoir un rôle dans la bio stimulation et le bio contrôle.

7- Elargir les études sur l'effet antagoniste en utilisant un Spectre plus important d'agent pathogène.

8- Tester ces souches bactériennes vis-à-vis des stress abiotiques tel que le stress salin, thermique, hydrique, pour voir la résistance et l'adaptation de ces souches dans les différents climats et les différents sols.

9- Evaluer l'efficacité de ces agents biologiques vis-à-vis de bio contrôle et la phytostimulation en faisant des tests in vivo afin de préserver les écosystèmes et le sol.

Référence bibliographique

A

Adam A., 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non pathogènes. Thèse de Doctorat, Université de Liège. Belgique. 165p

Adesina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K, (2007). Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* : site dependent composition and diversity revealed. *Soil biology and Biochemistry*. 39:2818_2828.

Amann R.I., Ludwig W & Schleifer K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol.*, 59: 143-169.

Antoun H. and Prévost D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.

Aouar, L. (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine.

Atwood, D., Paisley-Jones, C., 2017. Pesticides industry sales and usage. 2008- 2012 Market estimates. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage>

B

Babalola, O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570

Bashir, O.; Khan, K.; Hakeem, K.R.; Mir, N.A.; Rather, G.H.; Mohiuddin, R. 2016 Soil Microbe Diversity and Root Exudates as Important Aspects of Rhizosphere Ecosystem. Chapter · From book *Interaction Among Rhizospheric Microbes, Soil, and Plant Roots: Influence on Micronutrient Uptake and Bioavailability*. January, DOI: 10.1007/978-3-319-29573-2_15

Bautista-Baños, S. (Ed.). (2014). *Postharvest decay: Control strategies*. Elsevier.

Becard, G. et Journet, E.P., « L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais »>> *Symbioses racinaires*, INRA, France, 2006. 5.

Belhadi. A., Djoudi. M., Berredjough. D., & Baazizi K., 2011 - Des insectes auxiliaires autochtones à protéger et à valoriser pour une agriculture saine dans des régions à agro écosystèmes vulnérables. *Actes du Séminaire International sur la Biodiversité Faunistique en Zones Arides et Semi-arides*, Ouargla.

Benchabane, M.; Toua, D.; Ameur, D. 2012 Exploitation et valorisation des rhizobactéries En biotechnologie végétale : Phytostimulation et amélioration de la nutrition des plantes. Revue Agrobiologia 217- 20.

Benhamou, N. et Picard, K., « La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes », Phytoprotection, n° 80, 2000, pp.137-168.

Benzina, F.; Sahir-Halouane, F.; Hamed, K.2016 Algerian isolates of fluorescent Pseudomonas spp. as potential biological control against wilt pathogen (*Verticillium dahliae*). Plant Omics journal 9(1) 48 -60.

Boiteau, G., Lynch, D., Berthéléme, C. and Beavers, R., «< Évaluation de solutions en matière de lutte contre le doryphore et de fertilisation azotée en production de pommes de terre biologiques >>. Réseau du savoir biologique, Centre d'agriculture biologique du Canada OACC, Rapport de recherche final, n° 10, 2007, pp.4.

BOTTON B.; BRETON A. FEVRE M., GAUTHIER S GUX PH., LARPENT J P., REYMOND P., SANGLIER JJ., VAYSSIER Y, VEAU P., (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. Paris Milan Barcelone Mexico. Deuxième édition. PP .93, 139- 191.

Bourdais, J.L., « L'agrobiologie respecte-t-elle l'environnement ? », Cemagref - Info Médias, n° 46, 2001. 4.

Bourgeois L.(2009),Chronique.[Enligne],http://www.agrobiosciences.org/article.php3?id_article=2756, consulté le 4 avril 2016.

Buckley, D.H. et Schmidt, T.M. (2002) Exploring the biodiversity of soil – a microbial rain forest. Biodiversity of microbial life 183-208

C

Campbell, R.,et M.P. Greaves (1990). Anatomy and community structure of the rhizosphere in The Rhizosphere (ed. J.M. Lynch), John Wiley & Sons, Ltd, Essex, pp. 11–34.

Choudhary DK, Johri BN, (2009). Interactions of *Bacillus* sp. and plants-With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiology Research. 164: 493513.

Come D., (1970): Les obstacles à la germination. Ed. Masson et Cie, Paris, P :162

CONFAIS J. (2004). Etude de la résistance de *Venturia inaequalis*. Fongicides à différentes familles chimiques de fongicide. Mémoire d'école pratique des hautes études en science de la vie et de la terre. Lyon, 26p

Corbaz R. (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes.

D

Das MP, Vennila Devi P, Yasmine Y, (2015) A study on antagonistic potential of bacteria against phytopathogenic fungi. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research .34: 191-193.

DELARRAS C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'Analyse ou de contrôle sanitaire. Edition. Lavoisier, Paris.

Drouinj., « Pleins feux sur la recherche 2001-2002 », Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC), Direction générale de la recherche, 2002.www.agr.gc.ca/science/research-recherche/ann-dir/

Duval, J., Grenier, S., La France, D., Legault, C., Raby, L., Ricquart, M., Scholz, M. and Dubé, S., Guide de transition en agriculture biologique », la Fédération d'agriculture biologique du Québec (FABQ), Agro Expert Inc, Québec, Canada, 2003, pp.43.
www.fababio.ca

E

Elnahal, A. S., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., ... & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. European Journal of Plant Pathology, 1-34.

Elnahal, A. S., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., ... & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. European Journal of Plant Pathology, 1-34.

Emmert E.A.B. et Handelsman J, .(1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS. Microbiol. Lett. P.171, 1-9.

F

Faugier, A. (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires “ the rare biosphere ”. Sciences du Vivant [q-bio]. Thèse de doctorat. Ecole Centrale de Lyon,

G

Gardan N, Luisetti G.,1981.Ethode d'isolement et identification des bactérie phythopathogens . Station de Pathologie INRA.Angers, 32.

Giller, K. E., Beare, M. H, Lavelle P., Izac A. M. N., Swift, M. J. Agricultural, soil biodiversity and agroecosystem function. Applied Soil Ecoloav., 1997, 1 3-16.

Glick, B.R. (1995).The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol., 41: 109-117

Grzegorzcyk M, Żarowska B, Restuccia C, Cirvilleri G, (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fruticola* on stone fruit. *Food Microbiol.* 61: 93-101.

Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol.* Volume 7(2), 96-102.

H

Haas D.& Defago G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319. 1999. La lutte contre *Ralstonia solanacearum*, 1-34p.

Haas, D; Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microb.* 1129..

Haddane R. 2013. Détection et identification des principaux genres bactériens isolés de quelques variétés de pomme de terre dans différentes régions de l'Algérie. Université de Blida.

Hilliard, C. et Reedyk, S., « Les meilleures pratiques des gestions agricoles », Agriculture and agri-Food Canada, Water quality Unit, n° 97, 2000, pp.4. 3.

I

Islam M. T et Hossain M.M, 2013. Biological Control of Perono sporomycete Phytopathogen by Bacterial Antagonist. Maheshwari D.K. (eds.), *Bacteria in Agrobiology: Disease Management*, 2013, p. 176-218

J

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.

K

Kamilova. F., S. Validov, T. Azarova, I. Mulders, et B. Lugtenberg., 2005. Enrichment forenhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809–1817 .

Khechai S., (2001): Contribution à l'étude du comportement hydrophysique des sols du périmètre irrigué de l'ITDAS, dans la plaine de l'Outaya (Biskra). Thès. Mag. Univ. Batna, 178 p

King EO., Wark MK. & Raney DE. (1954). Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal Laboratory and Chemical medicine*, 44:301-307.

Kloepper, J W. (1993). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, In: Soil nMicrobial Ecology, (Ed.) F.B. Jr., Metting . Marcel Dekker inc., N.Y. p. 255-273.

Kumar, N. R., V. T. Arasu et P. Gunasekaran. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Sci.*, 82: 1463- 1466.

L

Lelliott, R.A. and Stead, D.E. (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

LEVEAU J.Y., BOUIX M., DE ROISSART H. (1991). La flore lactique ; in : « Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires » Ed., Lavoisier, Paris.

Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Taghavi S, Mezgeay M, Der lelie DV, (2002).Endophytic Bacteria at Their Application .Critical Reviews in Plant Sciences.21:583-606.

Lugtenberg B et Kamilova F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Annu. Rev. Microbiol.*63, 541-556.

M

Magunr., << Usages industriels non alimentaires des produits agricoles au Canada: système de gestion des marchés stratégiques biopesticides ». Agriculture et Agroalimentaire Canada AAC, 2002

MARCHAL N., BOURDON J.L. (1982). Les milieux de cultures pour isolement et l'identification biochimique des bactéries. DOIN éditeur, Paris, 442.

Moore L.W., Kado C.I. and Bouzar H. (1988). *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. New York, APS, Minnesota, USA. 158 p.

Morgan, J.A.; Bending, G.D.; White, P.J. 2005 Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56:1729–1739.

Moricourt, G., << Agriculture et santé ; l'impact des pratiques agricoles sur la qualité de vos aliments >>, Dangles, France, 2006, pp.320, <http://www.notre-planete.info/actualites/actu> 1176 6.

N

Nasraoui B., (2006): Les Champignons Parasites Des Plantes Cultivées, Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Chapitre 4 : Maladies. 363-427. Centre de Publication Universitaire, Tunis

Nautiyal, C.S 2001. Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Upadhyay, R.K.; Mukerji, K.G.; Chamola, B.P.; Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture, Vol.I: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes. Ed. Kluwer Academic, New York , 9-23.

Nollet, L. M., & Rathore, H. S. (2015). Biopesticides handbook: CRC Press.

O

Office National de Météorologie (O.N.M.), (2010): Les données climatiques de la période (1999 – 2009).

P

Pal KK, McSpadden Gardener B, (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor .1-25

Paulitz TC, Bélanger RR, (2001). Biological Control in greenhouse systems. Annual review of phytopathology. 39: 103-133.

Pepper, I. L., C. P. Gerba et R. M. Maier. 2000. Environmental sample collection and processing, p. 177- 194. In Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba (ed.), Environmental microbiology. Academic Press, London.

Pretty J. et Bharucha Z.P., 2015. Integrated pest management for sustainable intensification of agriculture in Asia and Africa. Insects 6, 152-182.

R

Raaijmakers J.M., Vlami M. & De Souza J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek, 81(1-4):537-547.

Ramamoorthy R., Viswanathan T., Raguchander T., Prakasam V. & Samiyappan R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection, 2: 1-11.

Richardson A., Barea J-M., McNeill A. & Prigent-Combaret C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil, 321: 305-339.

Romanazzi G. et Feliziani E. 2014. Botrytis cinerea (Gray Mold). In Postharvest decay Control Strategies. Ed. Academic Press. Waltham, USA. 383p.

S

Seldin, L., van Elsas, J.D., Penido, E.C.G., 1983. Bacillus nitrogen fixers from Brazilian soils. Plant Soil 70, 243–255.

SINGLETON P. (2005). Bactériologie : Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6ème édition. Dunod- Paris, p.480-490.

Stonier L. (1960). *Agrobacterium tumefaciens* (Conn II). Production of antibiotic substance. *Journal of Bacteriology*, 79: 880-898.

T

Tarlera, S.; Jangid, K.; Ivester, AH.; Whitman, WB.; Williams, MA.2008. Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *FEMS Microbiology Ecology* 64 129-140.

Tontou R, Giovanardi D, Ferrari M, Stefani E, (2016). Isolation of bacterial endophytes from *Actinidia chinensis* and preliminary studies on their possible use as antagonists against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Journal of Berry Research*. 6: 395-406.

V

Van Diepeningen, A.D., De Vos, O.J., Korthals, G.W. and Van Bruggen, A.H.C., « Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils », *Applied Soil Ecology*, 2005, pp.1-16.

Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. 2002, Prospects and challenges for practical application of rhizobacteriamediated induced systemic resistance ». In: *Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases* (A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds), *IOBC/WPRS Bulletin* 25(6) 75-82

Vidhyasekaran, P; Sethuraman, K; Rajappan, K ; and Vasumathi, K. (1997). Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Bio. Control*, 8: 166–171.

Vitullo D, Di Pietro A, Romano A, Lanzotti V et Lima G 2012. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusariumoxysporum*. *Plant Pathology*, , 61, 689-699.

W

Walia, A., Putatunda, C., Sharma, R., Sharma, S., & Thakur, A. (2021). *Biocontrol: A Sustainable Agricultural Solution for Management of Plant Diseases* *Microbial Biotechnology in Crop Protection* (pp. 1-54): Springer.

Weller, D.M. 2007 *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*; 97 250-6.

Y

Yabuuchi E et Smith J. Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M.I., Chulze S.& Etcheverry M., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in-vitro and at the maize root level. *Microbiol. Res.*, 156(5-6):748-754.

Annexe 1

materiels non biologique utilisés :

		Marque
Gros Appareils	Autoclave Incubateur Four pasteur Réfrigérateur Bain marie	AESULAP MEMMERT KOTTERMANN 2712 ENIEM SEB SIMPLY ONE
Petits Appareils	Microscope optique Spectrophotométrie Plaque chauffante et agitateur magnétique Balance Vortex	ZEISS WEST GERMANY BIOCHROM LIBRA S6® MAGNETIC STIRRER WITZ HOT PLATE 78-1 KERN PCB LABINCO
Petits matériel et les verreries	Boîtes Pétri stérile Bec benzine Pince Pipette pasteur Tube à essaia vice Lame et lamelle Ballon Eprouvette Becher Entonnoir Flacon Ance	REALLABO
Solution et réactifs	Huile à immersion Hydroxyde de potassium (KOH) Tween 20 L'eau distillée L'eau d'javel 12° Violet de Gentiane Fuchsine Iode lugol L'alcool 96° L'eau oxygénée	

ANNEXE 2

composition de milieux de cultures utilisées :

Composition King B	
Ingrédients	gramme/litre
Peptone de viande	10.00 g
Peptone de caséine	10.00g
Phosphate dipotassique	1.5 g
Sulfate de magnésium	15.0 g
Agar agar bactériologique	15,0 g
L'eau distillée	1000ml

Composition gélose nutritive	
Ingrédients	gramme/litre
Tryptone	5,0g
Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar agar bactériologique	12,0 g
L'eau distillée	1000ml

Composition PDA	
Ingrédients	gramme/litre
Pomme de terre	200g
Dextrose ou de sucre blanc de cannes	15.00g
Agar	20,0 g
L'eau distillée	1000ml

Composition LPGA	
Ingrédients	gramme/litre
Levure	07.00 g
Peptone	07.00g
Glucose	07.00g
NaOH, N	04.00 ml
Agar agar bactériologique	18,0 g
L'eau distillée	1000ml

