

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université de 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 Académique**  
**Option : Biotechnologie Microbienne**

**Contribution à l'étude de la microflore bactérienne  
bénéfique isolée à partir de la rhizosphère des plantes  
cultivées**

Présenté par :

**AZIZANE Fayza**

**SEDIRA Amina**

Soutenu devant les membres de jury :

<b>Mme AMMAD.F</b>	<b>MCA</b>	<b>Présidente</b>	<b>Université de Blida 1</b>
<b>Mme BENSaid.F</b>	<b>MAA</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>Université de Blida 1</b>
<b>Mme TOUA.D</b>	<b>MAA</b>	<b>Promotrice</b>	<b>Université de Blida 1</b>

BLIDA. 24 / 07 /2023

## Remerciements

*Nous avons l'honneur de remercier sincèrement notre promotrice Mme.Toua D, qui a bien accepté de superviser et diriger ce travail. Merci pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, sa patience et sa confiance. Nous lui témoignons, notre gratitude et notre reconnaissance.*

*Nos vifs remerciements vont aussi aux membres du jury Mme Ammad F, et Mme Bensaid F qui nous ont fait l'honneur de présider et d'examiner ce travail, qu'elles trouvent ici le témoignage de notre haute considération et notre profond respect.*

*Un énorme merci aux ingénieurs de laboratoire du département de biotechnologie et agro-écologie Mme Ihcene, Mme Hayat et plus particulièrement Mme Salma à sa disponibilité, sa sympathie, sa patience qu'on a pu effectuer notre partie expérimentale dans des bonnes conditions.*

*On tient à exprimer notre grande considération et nos vifs remerciements à tous nos enseignants particulièrement les enseignants de spécialité biotechnologie microbienne.*

*Enfin on remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Amina et Fayza*

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail*

*A la mémoire de mon cher grand père qui m'a beaucoup encouragé  
tout au long de mes études.*

*À ma très chère mère **Fatna** qui a consacré tout son temps pour  
notre bien.*

*À Mon très cher père **Bachir** à qui je dois tout et que je ne rendrais  
jamais assez.*

*À mes chères sœurs **Zineb, Chaima et Maria**, et mes chers frères **Ali**  
et **Mohamed**, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mon  
parcours.*

*À mes grands-mères: Que Dieu vous accorde longue vie et bonne  
santé.*

*À toute ma famille, qui m'a toujours encouragé au cours de la  
réalisation de ce mémoire.*

*À mes meilleures amies, **Fatima et Doua**, à qui je souhaite  
beaucoup de réussite.*

*À mon cher binôme **Fayza**, celle qui a participé à cette  
réussite pour son soutien et son aide dans les moments  
difficiles.*

*A Mr Razog mohamed khan que je remercie pour son aide au  
cours de l'échantillonnage.*

*Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

**AMINA.**

## Dédicaces

*Je dédie ce présent travail...*

*A la lumière de ma route, l'incomparable, l'unique et  
L'irremplaçable source de tendresse, **ma mère** 'Fatma ' et À qui prit  
toujours soin de moi et de m'avoir couvert d'amour **mon père**  
'Messaoud ', pour Leur soutien moral et leur aide sont si précieuse.*

*Je te dis merci **mes parents** du fond de mon cœur pour votre tout  
éducation, vos sacrifice, vos assistance, vos patience, vos courage et  
pour ce vous m'aviez fait et qui m'a permis d'avoir cette réussite et ce  
bonheur.*

*Je dédie ce travail aussi :*

*À **mes sœurs et frères** et toute ma grande famille je vous aime.*

*À celui qui me soutient et me protège toujours ; qui se tient à mes  
côtés et me donne tout ce dont j'ai besoin, merci énormément.*

*À mon binôme **Amina**, elle m'a supporté tout le long de ce travail et à  
qui je souhaite tout le bonheur du monde et de la réussite.*

*À mes proches amies pour leur Conseils très précieux.*

*À tous ceux qui m'ont aidé.*

*À toute la promotion «biotechnologie microbienne «2022-2023».*

**FAYZA**

## Résumé :

### **Titre : Contribution à l'étude de la microflore bactérienne bénéfique isolée de plantes cultivées.**

Cette étude est portée sur un criblage après l'isolement de bactéries rhizosphériques à partir de la rhizosphère de deux plantes cultivées : le Moringa dans la région d'Adrar et le Colza dans la région de Ouamri, sur milieu GN et KB. 45 isolats bactériens ont été sélectionnés après purification et description macro-morphologique, et ils ont subi le test d'hypersensibilité sur tabac. Seuls les 30 isolats qui n'ont pas présenté de nécroses (saprophytes) ont été soumis à une confrontation vis-à-vis des champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, *Fusarium oxysporum f.sp. pisi* et *Fusarium oxysporum f.sp. lini*). Cette confrontation a révélé l'existence de 13 isolats performants présentant une action antifongique, avec des taux d'inhibition allant de 42.5% à 87%. Une deuxième confrontation vis-à-vis des bactéries phytopathogènes (*Erwinia amylovora* et *Agrobacterium tumefaciens*) nous a révélé l'effet antibactérien de 17 isolats, avec des zones d'inhibition variant entre 14 mm et 80 mm. Il est à signaler que les isolats antagonistes obtenus ont présenté une variabilité vis-à-vis des agents phytopathogènes (aucun isolat n'a présenté un antagonisme vis-à-vis de tous les agents phytopathogènes testés). Une autre étude a porté sur l'évaluation de la levée de germination des graines de tomate variété *Rio Grande* bactérisées avec les isolats saprophytes. Les résultats ont été variables, mais la majorité des isolats (AFI1, AFI4, AFI7, AFI8, AFI9, AFII1, AFII5, ASIIB, ASIG, ASIH, ASIJ, ASIL, ASIIB, ASIIG, ASIIH, ASIIN, ASIIP et ASI I) ont présenté un taux de germination allant jusqu'à 100%, par rapport au témoin non bactérisé. On a également remarqué que certains isolats n'ont montré aucune activité de stimulation de la germination (AFI2, AFII2 et ASIF) par rapport au témoin non bactérisé. Concernant la caractérisation générique, 21 isolats présentaient une réaction Gram négative, une forme bacille et un test de KOH positif (sauf les isolats AFI6 et AFI7 qui ont donné une réaction négative), tandis que seulement 09 isolats étaient Gram positifs, avec un test de KOH négatif et des formes variables. Pour le test de catalase, toutes les souches ont montré une réaction positive, à l'exception de deux souches (ASIB et ASID) qui ont donné une réaction négative. En ce qui concerne le test d'oxydase, 20 isolats ont présenté une réaction positive, tandis que 10 isolats ont présenté une réaction négative. Dans le cadre de l'identification des espèces et vu le manque de moyens, seuls les isolats AFII1 et AFI8 isolés de la rhizosphère de Moringa, ainsi que ASIIB qui a été isolé de la rhizosphère de Colza (qui ont présenté des résultats intéressants en termes d'antagonisme et de levée de germination et qui étaient Gram négatifs), ont été sélectionnés pour l'identification biochimique par galeries API (20E et 20NE). Ces tests ont révélé que AFII1 appartient à l'espèce *Pseudomonas spp* , que l'isolat AFI8 appartient à l'espèce *Aeromonas spp*, alors que ASIIB appartient à *Burkholderia spp*.

**Mots clés :** rhizosphère, Moringa, Colza, biocontrôle, biostimulation.

## **Abstract:**

### **Title : Contribution to the study of beneficial bacterial microflora isolated from cultivated plants.**

This study focused on a screening after the isolation of rhizospheric bacteria from the rhizosphere of two cultivated plants: Moringa in the Adrar region and Rapeseed in the Ouamri region, on GN and KB media. 45 bacterial isolates were selected after purification and macro-morphological description, and underwent the hypersensitivity test on tobacco. Only the 30 isolates that did not show necrosis (saprophytes) were tested against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*). This comparison revealed the existence of 13 effective isolates with antifungal action, with inhibition rates ranging from 42.5% to 87%. A second comparison with phytopathogenic bacteria (*Erwinia amylovora* and *Agrobacterium tumefaciens*) revealed the antibacterial effect of 17 isolates, with inhibition zones ranging from 14 mm to 80 mm. It should be noted that the antagonistic isolates obtained showed variability with respect to the phytopathogenic agents (no isolate showed antagonism with respect to all the phytopathogenic agents tested). Another study assessed the germination emergence of Rio Grande tomato seeds bacterised with saprophytic isolates. The results were variable, but the majority of isolates (AFI1, AFI4, AFI7, AFI8, AFI9, AFII1, AFII5, ASIIB, ASIG, ASIH, ASIJ, ASIL, ASIIB, ASIIG, ASIIH, ASIIN, ASIIP and ASI I) showed a germination rate of up to 100%, compared with the non-bacterised control. It was also noted that some isolates showed no germination stimulation activity (AFI2, AFII2 and ASIF) compared with the unbacterised control. With regard to generic characterisation, 21 isolates showed a Gram-negative reaction, a bacillus form and a positive KOH test (except for isolates AFI6 and AFI7, which gave a negative reaction), while only 09 isolates were Gram-positive, with a negative KOH test and variable forms. For the catalase test, all strains showed a positive reaction, with the exception of two strains (ASIB and ASID) which gave a negative reaction. For the oxidase test, 20 isolates showed a positive reaction, while 10 isolates showed a negative reaction. For the purposes of species identification, and given the lack of resources, only isolates AFII1 and AFI8 isolated from the rhizosphere of Moringa, and ASIIB which was isolated from the rhizosphere of Rapeseed (which showed interesting results in terms of antagonism and sprout emergence and which were Gram negative), were selected for biochemical identification by API galleries (20E and 20NE). These tests revealed that AFII1 belongs to the species *Pseudomonas spp*, that isolate AFI8 belongs to the species *Aeromonas spp*, while ASIIB belongs to *Burkholderia spp*.

**Key words:** rhizosphere, Moringa, Colza, biocontrol, biostimulation.

## ملخص

العنوان: المساهمة في دراسة البكتيريا النافعة البكتيرية المعزولة من النباتات المزروعة  
تركزت هذه الدراسة على الفحص بعد عزل البكتيريا الجذرية من جذور النباتات التالية : المورينغا المزروعة في  
منطقة أدرار والكولزا في منطقة وامري على الوسائط GN و KB. تم اختيار 45 عزلة بكتيرية بعد التنقية والوصف  
المورفولوجي الكلي وخضعت لاختبار الحساسية على التبغ. تم اختبار 30 عزلة فقط التي لم تظهر نخرًا (نباتات رمية)  
ضد الفطريات الممرضة للنبات ( *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ، *Fusarium oxysporum f.sp.* ، *Fusarium oxysporum f.sp. lini* و *pisi* )  
كشفت هذه المقارنة عن وجود 13 عزلة فعالة ذات تأثير مضاد  
للفطريات بمعدلات تثبيط تتراوح من 42.5% إلى 87%. أظهرت مقارنة ثانية مع بكتيريا ممرضة للنبات ( *Erwinia*  
*amylovora* و *Agrobacterium tumefaciens* ) التأثير المضاد للبكتيريا لـ 17 عزلة بمناطق تثبيط تتراوح من 14  
مم إلى 80 مم.

تجدد الإشارة إلى أن العزلات المضادة التي تم الحصول عليها أظهرت تباينًا فيما يتعلق بالعوامل الممرضة للنبات (لم  
تظهر أي عزلة عداء فيما يتعلق بجميع العوامل المسببة للأمراض النباتية التي تم اختبارها).  
قيمت دراسة أخرى ظهور إنبات بذور طماطم ريو غراندي المبرومة بعزلات رمية. كانت النتائج متغيرة ، ولكن غالبية  
العزلات ( *AFI1* ، *AFI4* ، *AFI7* ، *AFI8* ، *AFI9* ، *AFI11* ، *AFI15* ، *AFIIB* ، *ASIG* ، *ASIH* ، *ASIJ* ،  
*ASIL* ، *ASIIB* ، *ASIIG* ، *ASIIH* ، *ASIIN* ، *ASIIP* و *ASII* ) أظهرت معدل إنبات يصل إلى 100% مقارنة  
مع التحكم غير البكتيري.

كما لوحظ أن بعض العزلات لم تظهر أي نشاط تحفيزي للإنبات ( *2AFI* و *2AFII* و *ASIF* ) مقارنة مع الشاهد الغير  
المصاب بالبكتيريا. فيما يتعلق بالتوصيف العام ، أظهرت 21 عزلة تفاعلاً سالباً للجرام ، وشكل عصيات واختبار KOH  
إيجابياً (باستثناء العزلات *6AFI* و *7AFI* ، والتي أعطت تفاعلاً سلبياً) ، بينما كانت 09 عزلة فقط موجبة الجرام ، مع  
سلبية اختبار KOH والأشكال المتغيرة. أما فيما يتعلق باختبار الكاتلاز ، أظهرت جميع السلالات تفاعلاً إيجابياً ، باستثناء  
السلالتين ( *ASIB* و *ASID* ) التي أعطت تفاعلاً سلبياً. بالنسبة لاختبار أوكسيديز ، أظهرت 20 عزلة تفاعلاً إيجابياً ،  
بينما أظهرت 10 عزلات تفاعلاً سلبياً. لأغراض تحديد الأنواع ، وبالنظر إلى نقص الموارد ، فقط يعزل *1AFII* و  
*8AFI* المعزولان من رزوسفير المورينجا ، و *ASIIB* الذي تم عزله عن جذور اللفت (والذي أظهر نتائج مثيرة للاهتمام  
من حيث العداء وظهور البراعم والتي كانت سالبة الجرام) لتحديد الكيمياء الحيوية بواسطة معارض *API (20E)* و  
*NE20* . كشفت هذه الاختبارات أن *1AFII* ينتمي إلى نوع *Pseudomonas sp* ، الذي يعزل *8AFI* ينتمي إلى نوع  
*Aeromonas sp* ، بينما ينتمي *ASIIB* إلى *Burkholderia sp* .

الكلمات المفتاحية: ريزوسفير ، المورينجا ، كولزا ، المكافحة الحيوية ، التحفيز الحيوي

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Localisation géographique de la région de prélèvement .....	6
<b>Figure 02:</b> Localisation géographique de la wilaya de Médéa.....	7
<b>Figure 03:</b> La souche AFII 1 sous l'UV.....	16
<b>Figure 04:</b> Souche isolée sur GN.....	16
<b>Figure 05:</b> Souche isolée sur KB.....	16
<b>Figure 06:</b> Test d'hypersensibilité sur le tabac.....	17
<b>Figure 07:</b> Résultats d'antagonisme fongique <i>in vitro</i> .....	17
<b>Figure 08 :</b> Histogramme représentant le taux d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe.....	18
<b>Figure 09 :</b> résultats de confrontation bactérie bactérie.....	19
<b>Figure 10:</b> Résultat de la germination des grains de tomates.....	21
<b>Figure 11 :</b> Histogramme représentant le taux de germination des graines de tomates bactérisés par les souches isolés de la rhizosphère de <i>Moringa</i> .....	21
<b>Figure 12 :</b> Histogramme représentant le taux de germination des graines de tomates bactérisés par les souches isolés de la rhizosphère de <i>Colza</i> .....	22
<b>Figure 13:</b> Résultat du test KOH.....	24
<b>Figure 14 :</b> résultat de test catalase.....	25
<b>Figure 15:</b> résultat de test oxydase .....	25

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 01:</b> Matériel végétal.....	8
<b>Tableau 02:</b> Matériel microbien.....	8
<b>Tableau 03:</b> Tableau représentant les zones d'inhibition après confrontation direct avec les bactéries phytopathogènes.....	19
<b>Tableau 04 :</b> Résultats des Galerie API (20E et 20NE).....	26

## Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique  
AHL: N-acyl-homoserine lactone  
AIA : Acide Indole Acétique.  
B : bacillus  
al.: collaborateurs  
CFU: unité de colonie formée  
CRFA: centre de foresterie et de reboisement d'Adrar  
DAPG:2,4-diacétylphloroglucinol  
DO : la densité optique.  
DO: Densité optique  
EDS: eau distillé stérile  
FAO: Organisation  
des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture  
GN: gélose nutritive  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : l'eau hydrogénée  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: eau oxygéné  
HCN: cyanure d'hydrogène  
ISR : résistance systémique induite  
ITCMI: Institut technique des cultures maraîchères et industrielles  
KB: King B  
KOH: hydroxyde de potassium  
LPGA: levure peptone glucose agar  
LPS: Lipopolysaccharides  
PDA: Potato Dextrose Agar  
PGPR : plant growth promoting rhizobacteria  
PSB: bactérie solubilisateurs de phosphate  
PVRAB: laboratoire de protection et valorisation des  
ressources biologiques  
QS: Quorum Sensing  
UV: ultra-violet

## Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

- Introduction.....1

### **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

#### **CHAPITRE 01 : MATERIEL ET METHODES**

1) Objectif.....	6
2) Lieu et durée de travail.....	6
3) Site de prélèvement.....	6
a) Région d'Adrar.....	6
b) Région de Ouamri.....	7
<b>4) Matériels</b>	
1. Matériel non biologique.....	7
2. Matériel végétal.....	8
3. Matériel microbien.....	8
<b>5) Méthodes</b>	
1. Échantillonnage.....	8
2. Isolement des souches bactériennes.....	8
- Préparation des suspensions dilution.....	8
- Ensemencement.....	9
3. Purification et conservation.....	9
4. Test d'hypersensibilité.....	10
5. Antagonisme microbien.....	10
- Confrontation bactérie champignon.....	10
- Confrontation bactérie- bactérie.....	11
6. Test de germination des graines de tomates.....	11
7. Caractérisation générique des souches bactériennes.....	12
- Examen macroscopique.....	12
- Examen microscopique:.....	12
➤ Coloration de Gram.....	12
- Test d'hydroxyde de potassium (KOH).....	13
- Test de catalase.....	13
- Test d'oxydase.....	14
- Identification des souches par galeries API 20NE et API 20E.....	14
➤ La galerie API 20E.....	14
➤ La galerie API 20NE.....	14

#### **CHAPITRE 02 : RESULTATS ET DISCUSSION**

- |  |    |
|--|----|
| 1. Isolement des souches bactériennes..... | 16 |
|--|----|

2. Test d'hypersensibilité.....	17
3. Antagonisme microbien.....	17
- Confrontation bactérie champignon.....	17
- Confrontation bactérie- bactérie.....	19
- Test de germination des graines de tomates.....	20
4. Caractérisation générique des souches bactériennes	
- Caractérisation macromorphologique.....	23
- Coloration de Gram.....	23
- Test d'hydroxyde de potassium (KOH).....	23
5. Caractérisation générique des souches bactériennes.	
- Test de catalase.....	24
- Test d'oxydase.....	25
- Identification des souches par galeries API 20NE et API 20E	
➤ La galerie API 20E.....	25
➤ La galerie API 20NE.....	26
● Conclusion.....	28

### **Références bibliographiques.**

### **Annexes.**

# *Introduction*

Les systèmes de production alimentaire et agricole du monde entier, sont actuellement en face des défis sans précédent en raison de divers facteurs, tels que: l'augmentation de la demande d'aliments due à l'explosion démographique, les impacts négatifs due aux changements climatiques, la surexploitation des ressources naturelles et la diminution significative des terres agricoles à cause de l'urbanisation et l'industrialisation (**Niamat et al., 2019; FAOSTAT 2023**). Pour cela, il est devenu difficile d'augmenter la superficie disponible pour l'exploitation agricole, ce qui a obligé les agriculteurs à avoir recours à une agriculture intensive et une utilisation abusive de molécules chimiques tels que les engrais et les pesticides (**Godfray 2010; Qudsia et al., 2021**). Tout cela a engendré des effets indésirables (**Anthony et al., 2009**) sur l'environnement (**Elmholt, 1991**), la biodiversité (**Giller et al., 1997**) et la santé des consommateurs (**Huang et al., 2005**).

Afin de résoudre ces problèmes, il est crucial d'adopter des pratiques agricoles moins agressives et plus respectueuses à la nature et à l'environnement (**Qudsia et al., 2021**). Dans ce contexte, des approches biotechnologiques telles que l'exploitation des microorganismes et leurs biomolécules actives d'intérêts offrent des solutions alternatives stables et durables par rapport à l'utilisation des molécules chimiques (**Dobbelaere et al., 2003**). Ces dernières années, beaucoup de travaux ont porté sur l'exploitation des microorganismes tels que les bactéries qui colonisent la rhizosphère des plantes cultivées et sur leur activités bénéfiques vis à vis de la croissance et la protection de ces derniers. Tout cela afin d'arriver à augmenter la production quantitativement et qualitativement et assurer une sécurité alimentaire pour le consommateur (**Munees et al., 2013; Vittorio et al., 2016; Ansari et al., 2021; Abulfaraj et al., 2021; Mudasir et al., 2023**).

La rhizosphère, originalement définie par **Hiltner en 1904**, correspond à la zone du sol qui entoure les racines des plantes et qui est influencée par la présence d'une diversité de microorganismes notamment les micro-algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries (**Raaijmakers, 2009**). Pour cela, elle constitue un lieu d'interactions mutuelles entre le sol, les microorganismes et les racines des plantes (**Kridi 2011**). Effectivement, les systèmes racinaires ont la capacité de modifier à la fois leur environnement abiotique et biotique en libérant dans la rhizosphère des composés de différentes natures qui servent de sources d'énergie pour les communautés microbiennes (**Bias et al., 2004**).

Ce processus de libération de composés organiques est appelé rhizodéposition, tandis que les composés libérés sont connues sous le nom de rhizodépôts ou exsudats racinaires, on peut citer les sucres, les acides organiques, les acides aminés et d'autres résidus métaboliques ... (**Shamnot 1968; Cheng et al., 1994**). Elles ont un rôle dans la communication avec la microflore microbienne de la rhizosphère (**vettorio et al., 2016**) ce qui a été considéré comme un atout essentiel dans l'expression de diverses fonctions métaboliques et physiologiques, et à qui on a donné le nom de quorum sensing (QS). Généralement, les rhizobactéries utilisent ce mécanisme pour réguler la production de métabolites secondaires qui sont actifs dans le sol (**Hamdan et al., 1991; Mazzola et al., 1992; Wood et al., 1997; Chin-A-Woeng et al., 2003; Wang et al., 2005**). Ce qui permettra de coordonner leurs activités et de répondre de manière adaptative aux conditions environnementales, favorisant ainsi leur survie et leur compétitivité dans la rhizosphère. Effectivement, ce processus repose

sur la production et la sécrétion d'une molécule appelée acyl-homosérine lactone (AHL) particulièrement chez les bactéries à Gram négatif tels que *Aeromonas* et *Pseudomonas* (Fuqua et al., 1994; Salmond et al., 1995; Fuqua et al., 2001; Whitehead et al., 2001; Withers et al., 2001; Bassler 2002). Effectivement le genre *Pseudomonas* (bacille, aérobie et mobile) utilise le quorum sensing comme mécanisme de détection et de régulation de certaines caractéristiques qui peuvent influencer leur persistance et leur viabilité dans le sol car ces derniers sont connues comme étant très performante dans la compétence et la colonisation rhizosphérique (Bell-Perkins et Lynch, 2002; Fonseca 2003; Fonseca 2004). Ce qui permet de les considérer comme étant des bactéries ayant la capacité d'améliorer la croissance des plantes et font partie du groupe de bactéries connues sous le nom de bactéries stimulatrices de la croissance végétale, ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Goudaa et al., 2018; Umar 2020).

Selon Kloepper et al. (1989), les PGPR sont des bactéries bénéfiques pour les plantes, car en interagissent avec d'autres communautés microbiennes présentes dans la même zone rhizosphérique et avec les racines des plantes pour améliorer directement la croissance de la plante et indirectement la protection de cette dernière (Antoun et Prévost, 2005). Pour cela, elles sont considérées comme des biofertilisants et biopesticides efficaces pour améliorer et protéger les rendements des cultures (Biswas et al., 2000; Asghar et al., 2002; Bashan et al., 2004). Effectivement, des études ont montré que les bactéries Gram négatives d'*Azospirillum*, *Azotobacter* et *Pseudomonas*, par exemple, ont un impact positif sur la germination des semences (Shaukat et al., 2006); sur la physiologie des plantes, en favorisant la croissance et l'augmentation du nombre des racines et des poils absorbants ce qui va permettre la bonne nutrition de la plante et de ça augmenter le rendement de cette dernière (Glick, 1995; Journer et al., 2005). Ces microorganismes contribuent à l'augmentation de la disponibilité des nutriments tels que l'azote qui est l'un des éléments vitaux pour la croissance des plantes et pour d'autres activités métaboliques mais ce dernier est présente en quantité très faible dans le sol ce qui le rend indisponible pour la plante (Persello-Cartieaux et al., 2003; Dixon 2004). Pour satisfaire ces besoins, cette dernière fait appel à divers micro-organismes ayant le pouvoir de fixateur d'azote atmosphérique (grâce à la nitrogénase) et qui vivent dans la nature et leur capacité à fixer l'azote peut remplacer les engrais commerciaux (Ladha 1997; Raymond 2007). Les microorganismes fixateurs d'azote peuvent être regroupés en deux catégories : les symbiotiques, qui établissent une relation mutualiste avec les plantes tels que les espèces *Rhizobium* (Gram négatif, aérobie et mobile) et *Frankia* (Gram positive, non mobile et aérobie), et les non symbiotiques, qui sont des organismes indépendants tels que les *Azospirillum* (mobile et aérobie facultative), et les *Azotobacter* (mobile et aérobie stricte) (Zahran, 2001; Bhattacharyya, 2012; Ali, 2017; Umar, 2020). Le même problème se pose pour un autre oligo-élément chez la plante, c'est le phosphore : bien que ce dernier soit abondant dans la plupart des sols, il n'est pas disponible sous une forme utilisable pour les plantes (Sharma 2013). Les PGPR augmentent aussi la disponibilité du phosphore dans le sol en favorisant la minéralisation du phosphore organique dans le sol (Loper 1986). Ces micro-organismes modifient le pH du sol en produisant divers acides organiques et inorganiques ainsi que d'autres métabolites par un mécanisme connu sous le nom d'acidification de la rhizosphère. Certaines espèces de PGPR

comme les Gram négatives *Rhizobium*, *Pseudomonas* et les Gram positives telle que les espèces du genre *Bacillus* sont considérées comme des solubilisateurs de phosphate (PSB) (Persello-Cartieaux et al., 2003; Umar 2020). De plus, les PGPR peuvent produire des sidérophores lorsque le fer est limité, afin d'améliorer la capacité des plantes à absorber le fer (Saha 2016). La production de sidérophores par les PGPR entraîne une compétition pour le fer dans la zone rhizosphérique, ce qui a pour effet de réduire la croissance des pathogènes ce qui permet un bon développement de la plante (Reed 2015; Saha 2016). Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont les PGPR le plus connues par leur production des sidérophores appelés pyoverdine qui sont composés d'une chaîne peptidique d'acides aminés liée à un chromophore fluorescent, ce qui confère aux souches de *Pseudomonas* leur caractéristique de fluorescence distincte (Meyer et al., 1978; Maurer et al., 1982, Demange et al., 1987). Les PGPR stimulent également la production de phytohormones appelées aussi régulateurs de croissance des plantes. Ce sont des composés organiques favorisant la croissance des plantes (Persello-Cartieaux et al., 2003; Damam 2016) et qui sont produits par la plupart des espèces appartenant à ce groupe tels que les *Pseudomonas*, *Burkholderia* et de *Bacillus* qui sécrètent des cytokinines, des gibbérellines, des inhibiteurs de la production d'éthylène et d'acide indole-3-acétique (AIA). Ce dernier est une phytohormone bien connue pour son rôle dans l'initiation des racines, la division cellulaire et l'élargissement des cellules (Salisbury, 1994; Isaneli et al., 2022).

Les PGPR sont aussi considérés comme des agents de lutte biologique idéaux en raison de leur croissance rapide et de leur pouvoir colonisateur et compétitif au niveau de la rhizosphère (Weller, 1988). Ils ont été étudiés en tant qu'agents de biocontrôle vis-vis de divers bioagresseurs du sol par beaucoup de chercheurs tels que Haas et Defago, 2005; Berg et Smalla, 2009; Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Glick, 2012 ; Tariq et al., 2014. Les PGPR utilisent le mécanisme biologique de la compétition pour l'espace afin d'éliminer les phytopathogènes et continuer à la protection des plantes contre les maladies (Dommergues et Mangenot, 1970; Shameer et Prasad, 2017). Pour cela, Elles produisent des antibiotiques qui sont des composés organiques de faible poids moléculaire capable d'inhiber la croissance ou les activités métaboliques des bactéries et d'autres micro-organismes (Duffy 2003). Plusieurs souches de *Pseudomonas* produisent des antibiotiques, notamment le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'amphisine, le cyanure d'hydrogène (HCN), la phénazine, l'oomycine A, la tropolone, la pyolutéorine, la tensine, la pyrrolnitrine et les lipopeptides cycliques. D'autres bactéries à Gram positif telles que *Streptomyces* et *Bacillus* produisent également des antibiotiques tels que la kanosamine, l'oligomycine A, la xanthobaccine et la zwittermicine, qui ont des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et qui généralement ont des effets cytotoxiques, phytotoxiques et antioxydantes (Abbas., 2018). De plus, les agents de biocontrôle peuvent produire une diversité d'enzymes tels que la chitinase, la cellulase et la protéase qui peuvent avoir un rôle dans la lyse de la paroi cellulaire du pathogène (Kobayashi 2002, Sadfi 2001., Liu 2019 ). Les Bactéries Gram positives telles que *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, et *Bacillus thuringiensis* ont une activité chitinolytique et sont des candidats potentiels pour la lutte biologique contre les pathogènes des plantes ( Neindam., 1999). De plus, lorsqu'une plante interagit avec certaines rhizobactéries non pathogènes, elle peut induire l'expression de mécanismes de défense systémique, connus sous le nom de résistance systémique induite (ISR), qui renforcent sa

capacité à se défendre contre les agents phytopathogènes. Plusieurs composants bactériens tels que les lipopolysaccharides (LPS), les sidérophores et les lipopeptides cycliques ont la capacité d'induire cette résistance systémique chez les plantes (**Gupta et al., 2015; Shameer et Prasad., 2017**).

Ces dernières années, les rhizobactéries font partie des candidats les plus étudiés dans le domaine de la recherche agricole et biotechnologique et cela afin d'arriver à partir de bactéries isolées de rhizosphère et étudier profondément (différent mécanisme d'action résistance au différents stress hydrique thermique et salin) afin de formuler et produire des biofertilisants et biopesticides assez performantes et efficaces pouvant être des solutions alternatives et respectueuses de l'environnement. Dans ce même objectif, l'Algérie s'intéresse actuellement à ce domaine et encourage nos chercheurs à produire ce type de produit qui sera bien adapté au climat et aux sols algériens et qui permettra de réduire la facture en devise de l'importation des engrais et des pesticides et de préserver le patrimoine génétique de différents espèces autochtones en voie de disparition. Notre travail rentre dans cet objectif et porte sur une étude préliminaire pour isoler et sélectionner des bactéries ayant des potentialités de biofertilisation et de biocontrôle vis-à-vis des plantes et de leurs maladies. Pour cela, on a procédé aux étapes suivantes :

- Isolement de bactérie à partir de rhizosphère de Moringa (région d'Adrar) qui est connue sous le nom d'arbre de vie et qui présente une résistance à la sécheresse et de la rhizosphère de Colza (région de Ouamri – Médéa) qui est une plante annuelle appartenant à la famille des Brassicacées et est principalement cultivée pour ses graines, qui sont utilisées dans la production d'huiles alimentaires et industrielles.
- Réaliser une série de tests afin de faire un criblage préliminaire, pour cela, on a réalisé le test d'hypersensibilité au tabac, l'antagonisme in vitro vis-à-vis de cinq souches phytopathogènes et la levée de germination par bactérisation des semences de tomates.
- Une caractérisation générique et spécifique pour certaines souches (selon la disponibilité des produits) ayant des potentialités dans l'antagonisme et la levée de germination des semences.

# *Matériel et méthode*

### 1) Objectif:

L'objectif de ce travail est de faire une étude préliminaire sur des bactéries isolées de la rhizosphère des plantes cultivées (Moringa et Colza). Cette étude est réalisée pour voir l'effet antagoniste de ces bactéries vis-à-vis des agents phytopathogènes et de voir aussi leurs activités de la levée de germination des graines.

### 2) Lieu et durée de travail:

Ce travail a été réalisé durant la période allant du mois de février à la fin du mois de juin 2023, au niveau du Laboratoire de protection et valorisation des ressources agrobiologiques (PVRAB), Département de biotechnologie et agro-écologie, faculté de science de nature et de la vie (SNV), Université Saad Dahleb (Blida 1).

### 3) Sites de prélèvement:

Les échantillons ont été prélevés à partir deux principaux régions:

#### a) Région d'ADRAR:

Adrar est une région saharienne localisée dans le sud-ouest du pays à environ 1543 km de la capitale Alger. Elle couvre une superficie globale d'environ 427971 km<sup>2</sup> soit 19,97% du territoire national (Dubost.,2002). Elle se situe entre les coordonnées géographiques suivantes : une latitude de 0° 30' O à 0° 30' E, une longitude de 26° 30' N à 28° 00' N et une altitude de 280 m au-dessus du niveau de la mer Méditerranée (Bellal ., 2016). Elle est connue par l'aridité et la rareté des précipitations (Moussaoui ., 2016).

Dans les activités économiques, la région d'Adrar est connue surtout pour son exploitation à l'énergie fossile tels que des gisements de gaz et de pétrole, mais ces dernières années, elle a connu une grande exploitation dans le domaine agricole (Slimani .,2022). (Figure 01)

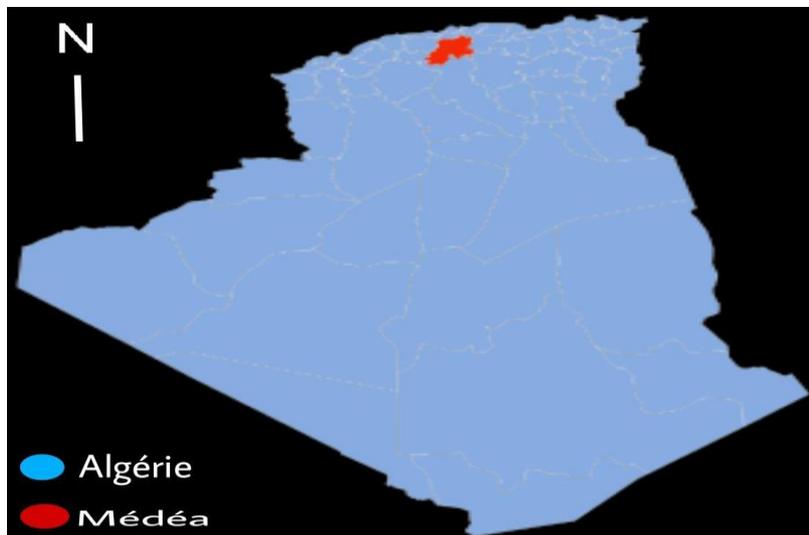


Figure 01 : Localisation géographique de la région de prélèvement (découpage administratif algérie)

Le prélèvement de notre échantillon de sol a été réalisé pendant la période de Février 2023 et a porté sur la rhizosphère de la plante *Moringa Oleifera* de 5 ans (voir annexe 01) étalée sur une surface d'un demi-hectare et situé au niveau du centre de foresterie et de reboisement de la wilaya d'Adrar (CFRA) qui situe entre les coordonnées géographiques suivants: 27°54'O2.2"N O°17'17.8"W.

**b) Région de OUAMRI (wilaya de Médéa):**

Ouamri est une petite ville située dans la wilaya de Médéa (**Figure 02**) sur les monts de Dahra, à environ 100 km de la capitale Alger; les coordonnées géographiques de Ouamri sont les suivantes: une latitude de 36°15'51" N, une longitude de 2°45'14" E, et une altitude de 910 m par rapport au niveau de la mer ([dateandtime.info](http://dateandtime.info)). La région est connue pour son climat méditerranéen caractérisé par des étés secs et chauds et des hivers doux et pluvieux (**ANIREF/Monographie de la wilaya de Médéa**).



**Figure 02:** localisation géographique de la wilaya de Médéa

Le prélèvement de notre échantillon de sol a été réalisé au niveau de la rhizosphère de la plante *Colza* de 5 mois (voir annexe 02) étalée sur une superficie de 2000m<sup>2</sup> situé dans la ferme El-Si Daoui qui est localisée dans la ville de Ouamri - Médéa.

**4) Matériels:**

- **Matériel non biologique:** le matériel non biologique utilisé concernant: l'appareillage, le petit matériel, la verrerie et les réactifs sont cités dans l'annexe 03.
- **Matériel végétal:** Le matériel végétal utilisé dans cette étude comprend une plante de tabac pour le test d'hypersensibilité et des graines de tomate pour évaluer la levée de germination. (tableau 01)

**Tableau 01: matériel végétal**

Matériel végétal	variété	source
Plante de tabac ( <i>Nicotiana tabacom</i> )	Xanthi	Laboratoire PVRAB, Université Blida 1.
les semences de tomate ( <i>lycopersicun esculentum</i> )	<i>Rio grande</i> (Certifié et non traitée)	ITCMI Staoueli

- **Matériel microbien:** pour avoir l'effet antagoniste des isolats, on a utilisé plusieurs souches phytopathogènes (tableau 02)

**Tableau 02: Matériel microbien**

Souches phytopathogènes	Plante hôte	Source
<i>Erwinia amylovora</i> (EMEA)	néflier	Laboratoire PVRAB, Université Blida 1.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58)	Pommier	//
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. lycopersici. (G2)	Les tomates	laboratoire de mycologie, Université Blida 1.
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. pisi (R2F42)	Les pois	//
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.lini (F2)	Le lin	//

## 5) Méthodes:

### 1. Echantillonnage

Pour que les prélèvements soient représentatifs, cinq échantillons du sol rhizosphérique des plantes cultivés (Moringa et Colza) de chaque parcelle ont été prélevés de façon aléatoire. Pour faire le prélèvement, une spatule stérile a été enfoncée à proximité des racines à une largeur et une profondeur allant de 15 à 20 cm (**chan 2018**). Ensuite, ils sont préservés dans des boîtes en plastique stériles et stockés à une température de 4 °C dans le réfrigérateur du laboratoire. Pour chaque échantillon réalisé la spatule est désinfectée pour assurer des conditions aseptiques

### 2. Isolement des souches bactériennes

Faute de manque de produits et de boîtes, les échantillons prélevés de chaque région ont été mélangés aléatoirement et un seul échantillon à été prélevé aléatoirement devant le bec bunsen afin de procéder à l'isolement.

#### - Préparation de suspensions - dilutions:

Pour le premier échantillon prélevé de la rhizosphère de Moringa à Adrar , 10g de sol a été prélevé à l'aide d'une spatule stérile et pesé sur une balance de précision, puis mis dans un flacon contenant 90 ml d'eau distillée (EDS), et on a ajusté à 100 ml de volume totale si nécessaire, c'est la première dilution qui correspond à la suspension mère (10<sup>-1</sup>). Le flacon

est ensuite agité manuellement pendant 10 à 15 minutes pour permettre aux microorganismes se trouvant dans les particules de sol d'être en suspension (**Gouzou., 1992**).

A partir de la suspension ( $10^{-1}$ ), un volume de 1 ml a été prélevé à l'aide d'une micropipette et ajouté à une tube à essai contenant 9 ml d'EDS, c'est la deuxième dilution ( $10^{-2}$ ) et on agit à l'aide d'un agitateur des tubes. On poursuit la dilution jusqu'à  $10^{-6}$  (**Daur et al., 2018**).

La même méthodologie a été réalisée pour l'échantillon prélevé à partir de la rhizosphère du colza à Ouamri.

#### - **Ensemencement**

Pour l'ensemencement, nos échantillons ont été ensemencée dans deux milieux: milieu gélose nutritive (GN) et le milieu king B (KB) (voir annexe 04).

a) **Sur milieu GN:** deux méthodes d'ensemencements ont été appliqué:

- Pour la première méthode, 0,1 ml de chaque dilution ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ ) ont été prélevés aseptiquement à l'aide d'une micropipette et déposés dans une boîte de pétri vide et stérile puis, on a coulé dessus le milieu GN liquéfier (en surfusion à  $45\text{ C}^\circ$ ) et on a fait des mouvements de huit pour homogénéiser la suspension avec le milieu, c'est: l'ensemencement dans la masse afin de favoriser l'apparition de la majorité des germes (aérobiques et anaérobiques). et on laisse solidifier.

- Pour le deuxième ensemencement, on a pris les tubes de  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  qu'on a mis dans un bain marie à  $80^\circ\text{C}$  pendant 15 à 20 min, puis on a mis sous un jet d'eau froide pendant quelque instant, c'est le choc thermique pour pouvoir isoler les germes thermorésistants. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, on a prélevé de chaque suspension un volume de 0,1 ml qu'on a étalé en surface du milieu et qu'on a étalée grâce à un étaloir, c'est l'ensemencement en surface afin de favoriser l'apparition des germes aérobies.

b) **Sur milieu King B:**

- Le milieu King B a été utilisé en raison de sa capacité à favoriser la formation de pigments et à induire la fluorescence des souches bactériennes telles que les Pseudomonas. Pour cela, à l'aide d'une micropipette on a prélevé à partir des dilutions ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ ) un volume de 0.1 ml qu'on a mis à la surface des boites qui contient ce milieu, puis on la étalé grâce à un étaloir désinfecté à l'alcool et flamber. Pour observer la production de la fluorescence, on a utilisé la lampe à UV.

Il est à noter que pour chaque dilution on a réalisé deux répétitions et que toutes les boîtes ont été incubées à  $30\text{ C}^\circ$  pendant 48 heures.

### **3. Purification et conservation:**

Après l'isolement, nous avons obtenu des boîtes hétérogènes pour cela on a procédé à l'étape de la purification, en effectuant des repiquages successifs pour chaque colonie qui nous intéresse. Ces derniers ont été réalisés par la méthode des stries en 3 quadrants. La

sélection est réalisée sur des critères macro-morphologiques (forme, bord, élévation, aspect, couleur et opacité).

Une fois que la purification est achevée (obtention de population homogène), on procède à la conservation. On repique les souches pures dans des tubes inclinés contenant les milieux d'isolement d'origine (KB et GN). Après incubation à 30 C°, les tubes ont été conservés à 4 C° dans le réfrigérateur car le froid ralentit la croissance.

#### **4. Test d'hypersensibilité:**

Ce test nous permet de différencier entre les bactéries phytopathogènes et les bactéries saprophytes. Pour cela, on utilise la plante de tabac (*Nicotiana tabacum*) variété *Xanthi*.

À l'aide d'une microseringue, une suspension bactérienne provenant d'une culture pure et jeune avec une concentration de 10<sup>8</sup> UFC/mL déterminée par spectrophotométrie à  $\lambda=600\text{nm}$ . Ensuite, elle a été prélevée et injectée dans l'espace intercellulaire du limbe d'une feuille de tabac et incubée à 28 C° pendant 72h. Un témoin négatif a été utilisé, il consiste à injecter de l'EDS dans la feuille de tabac. Pour la lecture des résultats, l'apparition des zones nécrotiques indique que la bactérie est phytopathogène alors que leur absence indique que la bactérie est saprophyte (Klement, 1963; Schaad et al., 2001 ; Oulebsir et al., 2017).

#### **5. Antagonisme microbien:**

Dans le but de faire la sélection et le criblage des microorganismes ayant un pouvoir antagoniste et vu le manque de moyens on a procédé cette étape en premier.

Parmi les mécanismes d'action présents chez les souches bactériennes rhizosphériques susceptibles d'être sélectionnées à effet dans le biocontrôle, on trouve l'antibiose. Dans le cadre de cette étude, des confrontations ont été réalisées entre les souches saprophytes isolées et des souches phytopathogènes provenant d'une collection de laboratoire d'université de (Blida 1) (voir tableau 2)

##### **- Confrontation Bactérie - Champignon:**

D'autres travaux ont consisté à utiliser les champignons phytopathogènes pour voir est ce que les souches isolées à tester ont un pouvoir antifongique. Pour cela, on a utilisé des isolats cryptogamiques à savoir *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, *Fusarium oxysporum f.sp. lini* et *Fusarium oxysporum f.sp. pisi*, responsables respectivement des fusarioses vasculaires du tomate, du lin et du palmier dattier. La pureté des isolats fongiques a été vérifiée après repiquage sur milieu gélosé potato dextrose agar PDA (voir annexe) et incubé pendant 7jrs.

La méthode utilisée est celle décrite par Vincent et al. (1991). Les souches à tester pure et jeune sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boîte de pétri contenant du milieu gélosé mixte (PDA+KB) pour les souches à tester isolés dans le milieu KB et milieu mixte (PDA+GN) pour les souches à tester isolés dans le milieu GN. Après 24h d'incubation, un disque fongique coupé à l'aide d'une pipette pasteur stérile venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte. L'ensemble est incubé à une température de 28°C pendant sept jours. La comparaison a été faite avec des cultures témoins ne contenant que l'agent fongique.

Deux répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

La croissance mycélienne a été estimée par la mesure du diamètre de la colonie fongique.

L'antagonisme des bactéries a été évalué par le taux d'inhibition de la croissance mycélienne selon l'équation suivante (**Rakotoarimanga et al., 2014**) :

$$PI = (Mo - Mi) / (Mo) \times 100 \quad (1)$$

- PI (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.
- Mo (cm) : Mesure de la croissance mycélienne normale du champignon témoin.
- Mi (mm) : Mesure de la croissance mycélienne en confrontation avec la bactérie.

- **Confrontation Bactérie - Bactérie:**

La confrontation a été réalisée en suivant la méthode décrite par **Stonier (1960)**, avec des modifications apportées par **Moore et al (1988)**. Toutes les bactéries isolées, purifiées et ayant une hypersensibilité négative ont été cultivées sur le milieu LPGA pendant 24h à 48 heures puis mis en suspension dans de l'EDS à une concentration connue de  $10^8$  UFC/mL qui a été déterminée par spectrophotométrie visible en mesurant la densité optique ( $DO = 0.6$ ) de chaque suspension à la longueur d'onde de 600 nm. Un volume de 20  $\mu$ L de chaque suspension bactérienne de la souche à tester a étéensemencé sous forme de spot à la surface des boîtes contenant le milieu LPGA, puis ces boîtes ont été incubées pendant 24 heures à une température de 28°C. Les souches phytopathogènes pure (C58 et EMEA) à pulvériser sur les boîtes contenant les spots, doivent avoir le même âge que les souches testées ; soit 24h à 48h.

Après l'incubation, des suspensions de bactéries phytopathogènes de concentration de  $10^8$  UFC/mL, a été préparées comme décrit précédemment, ont été pulvérisées à l'aide d'un pulvérisateur sur la surface des boîtes de Pétri contenant les spots des souches bactériennes à testés. Pour comparer la vitesse de croissance des souches phytopathogènes par rapport à celles confrontées aux souches à tester, des boîtes ont étéensemencées uniquement avec les souches phytopathogènes. Après incubation de 24h, si la souche est sensible à l'antagoniste, sa croissance sera inhibée autour du spot laissant apparaître une zone d'inhibition claire autour du spot bactérien. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant le diamètre en mm des zones d'inhibition à l'aide d'une règle. Par la suite, un calcul des valeurs moyennes des trois zones est effectué. Deux répétitions ont été réalisés pour chaque souche à tester

**6. Test de germination des semences de tomate:**

Comme c'est un travail préliminaire pour évaluer la potentialité des souches isolées à stimuler la levée et la germination des semences, nous avons réalisé ce test et mesuré le taux de germination.

Pour cela, des semences de tomate certifiées et non traitées ont été utilisées après avoir subi un traitement et une désinfection selon la méthode décrite par **Wuelff et al. (2003)**, les semences ont été immergées dans une solution d'hypochlorite de sodium de 7% pendant une période de deux minutes, après elles ont été soigneusement rincées à trois reprises avec de l'eau distillée stérile et elles ont subi un séchage. ensuite, les graines ont été immergées dans les suspensions des souches bactériennes provenant de cultures âgées de 48h et de concentration de  $10^8$  UFC/ml pendant 1 heure. Par la suite, 10 graines ont été déposées grâce

à une pince stérile dans chaque boîte de pétri tapissée d'une couche de papier whatman stérile humecté puis on les a couvertes par une coton disque stérile et humecté. Les boîtes ont été fermées et enveloppées avec du papier d'aluminium pour les abriter de la lumière et incubées à température ambiante pendant une durée de 4 jours. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Un témoin négatif a été réalisé en mettant les semences dans l'eau distillée stérile. Pour la lecture, on a estimé la levée à partir du 4ème jour et on compare avec le témoin, ainsi le nombre de graines ayant germé a été mesuré (**Lauriane 2015; Messaoudi 2015**).

Le taux de germination selon **Come (1970)** correspond au pourcentage maximum des graines germées par rapport au total des graines semis. Le taux de germination (TG) est calculé par la formule suivante :

$$\text{TG} = \frac{\text{nombre de graines germées}}{\text{nombre total mis en germination}} \times 100$$

### **7. Caractérisation générique des souches bactériennes:**

Nous avons réalisé un criblage de nos souches bactériennes pour évaluer leur potentiel d'antagonisme contre des agents pathogènes et la levée de germination. Cependant, faute de manque de moyens, nous avons effectué une caractérisation préliminaire des souches sélectionnées. Dans cette partie de notre étude, nous avons cherché à obtenir des informations initiales sur les caractéristiques génériques de ces souches.

#### **- Examen macroscopique :**

Un examen macroscopique a été effectué sur les colonies bactériennes jeunes et pures cultivées sur milieu GN et KB. Pour cela, en prenant en compte des critères tels que la forme, le bord, l'élévation, la taille, l'aspect, la couleur et l'opacité des colonies (**Joffin et Leyral, 2006**)

#### **- Examen microscopique:**

À partir de chaque culture pure et jeune, une petite quantité de bactéries a été prélevée sur une lame pour procéder à l'observation microscopique.

#### **➤ Coloration de Gram :**

##### **a) Principe :**

D'après **Larpen et Larpen (1990)**, La coloration de Gram différentielle est utilisée pour classer les bactéries en deux groupes ; les bactéries à Gram positif (colorées en violet par le violet de Gentiane) et les bactéries à Gram négatif (recolorées en rose par la fuchsine). Cette distinction fondamentale, qui est à la base de la taxonomie bactérienne, repose sur les différences de structure et l'épaisseur de la paroi cellulaire des bactéries. Cette coloration permet aussi d'observer la forme des bactéries (**Delarras, 2007**).

##### **b) Protocole:**

- **Préparation de frotti:** sur une lame propre, une petite quantité de crème bactérienne jeune et pure a été étalée avec une goutte de l'eau physiologique stérile, puis elle subit à un séchage et fixation sur flamme.

- **coloration par le violet de Gentiane** : laisser la solution agir pendant 1 minute ; rincer à l'eau distillée.
- **mordantage** : verser du Lugol et laisser agir 1 mn ; rincer à l'eau distillée.
- **décoloration** : on fait un jet d'alcool de 96° jusqu'à la disparition de la couleur violet, ont arrêté la décoloration avec l'eau.
- recoloration : laisser la solution de Fuchsine pendant 1 minute ; bien laver et sécher.

L'observation se fait sous microscope photonique au grossissement x10 , x40 puis x100 après avoir ajouté une goutte d'huile à immersion (**Singlton, 2005** ).

Pour la lecture, les bactéries à Gram positive présentent une coloration violette alors que les bactéries à Gram négatifs présentes une coloration rose. en plus de Gram, on peut observer la forme de la bactérie (bacille, cocci, coccobacille ...)

- **Test d'hydroxyde de potassium (KOH) :**

C'est un test de confirmation pour la coloration de Gram qui repose sur la différence de réaction entre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif à l'égard de la solution de KOH. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi qui est lysée par le KOH, entraînant la libération d'ADN qui forme une substance visqueuse. En revanche, les bactéries à Gram positif conservent leur paroi intacte et ne libèrent pas d'ADN visqueux en présence de KOH.. (**George et al., 1983**).

Le test de potasse (KOH) a été réalisé en suivant la méthode décrite par **Halebian et al. (1981)** Dans cette procédure, deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium à 3% ont été déposées sur une lame de verre. Une boucle contenant la crème bactérienne a été soigneusement agitée en mouvement circulaire dans la solution de KOH. Suite à cette manipulation, la solution de KOH est devenue notablement visqueuse et muqueuse, ce qui est attribué à la présence de bactéries Gram-négatives. L'absence de viscosité indique que c'est des Gram-positives.

- **Test de catalase:**

La catalase est une enzyme présente dans la chaîne respiratoire qui a pour fonction de prévenir l'accumulation d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dont l'effet serait potentiellement mortel pour la cellule bactérienne. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



Sur une lame qui contient une petite quantité de crème bactérienne jeune et pure, on ajoute une goutte d'eau oxygénée. Lorsque la souche bactérienne examinée contient de la catalase, on observe immédiatement une formation de bulles gazeuses (catalase positive), tandis que l'absence de bulles indique une absence de catalase (catalase négative).(**Marchal et Bourdon, 1982**)

- **Test d'oxydase:**

Le test d'oxydase est une méthode enzymatique utilisée afin de différencier et d'identifier les bactéries Gram négatives en se basant sur la détection de la présence de l'enzyme cytochrome oxydase (**Mohamed Azizi et al 2022**).

Une crème bactérienne pure et âgée de 24 heures est étalée sur un papier Whatman stérile à l'aide d'une pipette Pasteur, puis une goutte de réactif N-diméthyl paraphénylène diamine est ajoutée. La présence de l'enzyme cytochrome oxydase est indiquée par l'apparition d'une coloration violette après 10 secondes, la réponse est positive rapide. Elle est considérée comme tardive lorsque cette coloration apparaît après un délai (de 10 à 60 secondes), et au-delà de ce délai, la réponse est négative (**Klement et al., 1990**).

- **Identification des souches par galeries API 20NE et API 20E:**

➤ **La galerie API 20E:**

Le système API 20E représente une méthode normalisée et miniaturisée des techniques biochimiques classiques utilisées dans le processus d'identification bactérienne. Pour préparer la galerie, une suspension bactérienne a été préparée à partir d'une culture pure de 24 heures, en utilisant un tube contenant de l'eau physiologique stérile. Ensuite, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, cette suspension bactérienne a été répartie de manière précise dans les différentes alvéoles de la micro-galerie qui contiennent des substrats déshydratés. Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule, pour les autres tests remplir uniquement les tubes, et pour les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose, en remplissant leur cupule d'huile de vaseline stérile.

Les métabolites produits par les bactéries pendant la période d'incubation de 24 heures à une température de 37°C se manifestent par des changements de couleur spontanés ou qui deviennent apparents après l'ajout de réactifs spécifiques. Les résultats des réactions observées dans la galerie ont ensuite été interprétés en se référant au tableau de lecture principal (voir Annexe 04) (**Camille, 2007**).

➤ **la galerie API 20NE:**

La galerie API 20NE représente une version normalisée et réduite des tests biochimiques classiques, qui sont utilisés dans le but d'identifier les bacilles Gram-négatifs non entérobactéries. Selon l'étude réalisée par **Sobhani et al. (2000)**, l'utilisation de ce dispositif permet d'effectuer des tests spécifiques adaptés à chaque type de bactérie. Cette galerie se compose de 8 tests conventionnels (NO<sub>3</sub>, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) et de 12 tests d'assimilation (GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PAC). Pour les tests conventionnels, une suspension bactérienne jeune et saline (voir annexe 03) est inoculée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Quant aux tests d'assimilation, transférer 200ul (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente dans ampoule AUX medium (voir annexe 03), homogénéiser puis remplir les micro-cupules, des tests GLU à PAC à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Au cours de la période d'incubation de 24 heures à une température de 37 °C, diverses réactions se produisent, se manifestant par des changements de couleur spontanés ou révélés grâce à l'ajout de réactifs. L'interprétation des résultats se fait en utilisant un tableau de lecture (voir Annexe 05), tandis que l'identification précise des bactéries est réalisée à l'aide du logiciel d'identification (APIWEB TM).

# *Résultats et discussion*

### 1. Isolement des souches bactériennes:

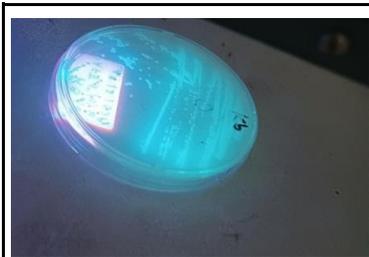
A partir des échantillons de Moringa et de Colza prélevés respectivement dans les régions d'Adrar et de Ouamri, nous avons isolé un total de 45 isolats bactériens. Parmi ces isolats, 20 provenaient de la rhizosphère de Moringa et 25 de la rhizosphère de Colza. Les isolats ont été sélectionnés en fonction de leurs caractéristiques macroscopiques.

Dans la rhizosphère de Moringa, nous avons isolé 12 isolats du milieu GN, dont 6 après un choc thermique, et 6 isolats par ensemencement dans la masse. Nous avons également obtenu 8 isolats sur le milieu King B, mais seulement un isolat (AFII1) a présenté une fluorescence lorsqu'elle a été exposée à la lampe UV. Cette absence de *Pseudomonas fluorescentes* peut être attribuée à des conditions environnementales spécifiques de la région (température élevée) et au fait que ces bactéries sont des mésophiles saprophytes ce qui laisse d'autres types de bactéries tels que les thermorésistants à dominés dans cette rhizosphère (Schmidt et al., 2004)

Dans la rhizosphère du Colza, nous avons isolé 15 isolats sur milieu GN, dont 8 après un choc thermique, et 7 isolats par ensemencement dans la masse. Également, 10 isolats non fluorescents après vérification sous lampe UV ont été obtenus sur le milieu King B. Cette absence de fluorescents peut être attribuée soit aux conditions climatiques de la région, cette dernière est connue par des températures très basses pendant la période hivernale ce qui fragilise ce type de communauté bactérienne. Soit au type de la plante cultivé qui peut être favorisé d'autres types de bactéries plutôt que les *Pseudomonas fluorescentes*. Il est important de noter que chaque plante possède une communauté microbienne spécifique dans sa rhizosphère (Fitzpatrick et al., 2018)

Ces résultats soulignent l'importance de comprendre la composition microbienne spécifique de chaque plante cultivée, ainsi que l'influence des facteurs environnementaux

Dans le cadre de recherches futures, il est intéressant de faire d'autres isolements en utilisant des milieux de culture sélectifs spécifiques à divers genres appartenant au PGPR tels que les azotobactères, les actinomycètes ... et cela afin d'explorer davantage la diversité microbienne dans ces rhizosphères et étudiés la spécificité des interactions qui se déroule entre eux et avec les racines des plantes



**Figure 03** : la fluorescence de la souche AFII 1 sous l'UV.  
(originale ,2023)



**Figure 04** : souche isolée sur GN  
(originale .2023)



**Figure 05** : souche isolée sur KB  
(originale, 2023)

## 2. Test d'hypersensibilité:

Parmi les 45 isolats sélectionnés après purification et subissant le test d'hypersensibilité au tabac, 15 ont présenté des nécroses suite à leurs agressivités vis-à-vis la plante de tabac et à la réaction immunitaire de cette dernière, ce qui signifie qu'elles sont des phytopathogènes. Les 30 autres isolats testés n'ont présenté aucune réaction immunitaire de la part de la plante de tabac de l'absence de nécroses. Même résultat observé par le témoin négatif (Klemmet 1963). Donc ces isolats sont des saprophytes et de cela ils sont sélectionnés pour la suite de notre travail qui consiste à faire un criblage en faisant l'antagonisme et la levée de germination. Effectivement les isolats sélectionnés pour la production de biopesticides et biofertilisants doivent être saprophytes.

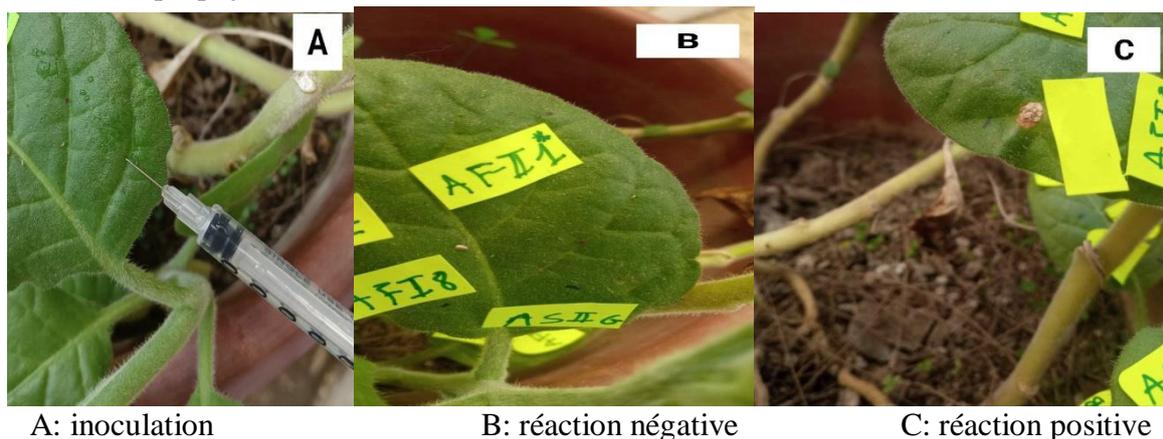


Figure 06 : Test d'hypersensibilité sur le tabac (original ,2023)

## 3. Antagonisme microbien

### - Confrontation Bactérie-Champignon:

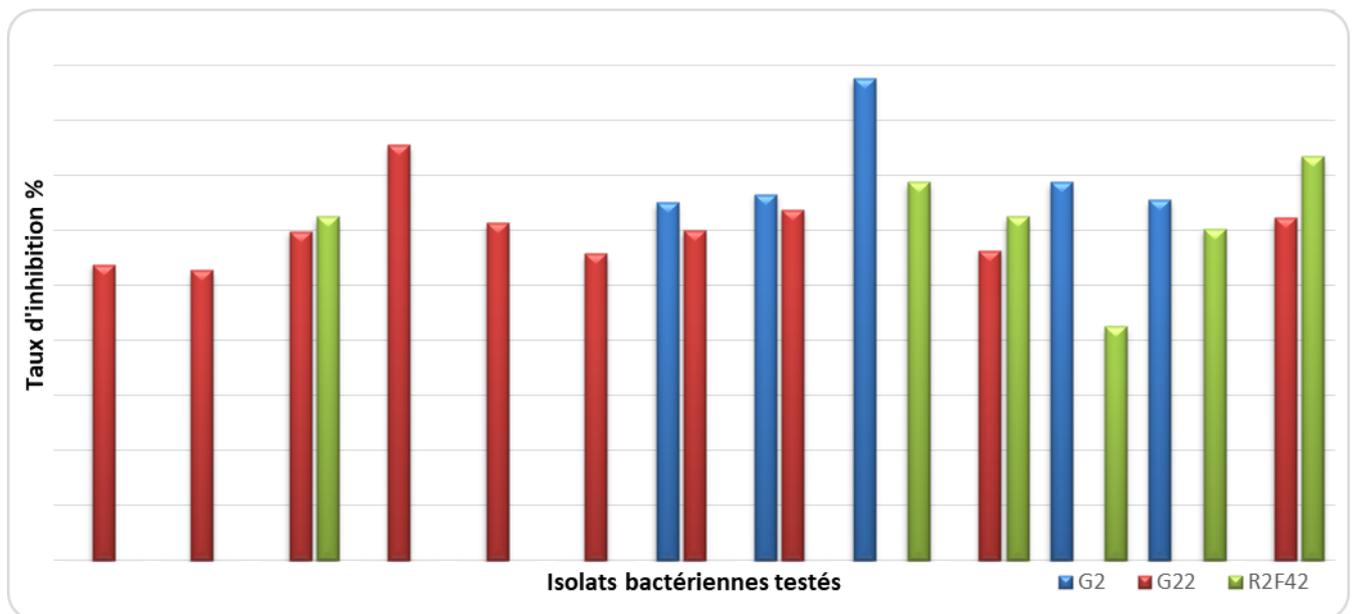
Lors de notre étude, nous avons réalisé un criblage de 30 souches bactériennes rhizosphériques vis-à-vis de 3 souches fongiques phytopathogènes (G2 ), (R2F42) et (F2) afin d'évaluer leur capacité à inhiber leurs croissance mycélienne qui se traduit par la réduction du diamètre des colonies fongiques par rapport au témoin représenté par le champignon phytopathogène seul ( Figure 07) .

Les résultats obtenus ont montré que seuls 13 souches ont présentés une zone d'inhibition de la croissance mycélienne donc un effet antagoniste soit vis-à-vis d'un seul champignon soit vis-à-vis des deux champignons phytopathogènes mais pas avec les trois au même temps, avec des taux d'inhibition variables.

Pour l'évaluation de cet antagonisme antifongique, on a procédé au calcul de pourcentage du taux d'inhibition selon la formule décrite par (Rakotoarimanga et al., 2014) puis représenté sous forme d'histogramme (Figure 08)



Figure 07: résultats d'antagonisme fongique *in vitro*. (original ,2023)



**Figure 08 :** Histogramme représentant le taux d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe.

Les résultats ont montré une variation des taux d'inhibitions en fonction des souches bactériennes testées. Seules les souches présentant un taux d'inhibition supérieur à 20% ont été considérées comme inhibitrices (**Dahoumane et al., 2015**). Pour la confrontation avec le champignon G2, 10 souches bactériennes ont montré des taux d'inhibition différents, allant de 52,75% pour la souche AFI9 à 75,5% pour la souche AFII1. De même, pour la confrontation avec le champignon F2, 5 souches bactériennes ont montré des taux d'inhibition différents, allant de 65% pour la souche ASIIA à 87% pour la souche ASID. Enfin, pour la confrontation avec le champignon R2F42, 6 souches bactériennes ont montré des taux d'inhibition différents, allant de 42,5% pour la souche ASIIP à 73,5% pour la souche ASIIB. Il a été observé que la plupart des souches ont manifesté une action inhibitrice vis-à-vis des trois isolats de *Fusarium oxysporum*.

En relation avec les résultats d'autres auteurs, il est noté que la différence dans l'activité antagoniste des bactéries peut être expliquée par la production de substances antimicrobiennes, telles que des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires ayant un effet d'antibiose (**Kamilova, Validov et al., 2005**). Les métabolites sécrétés par les bactéries peuvent agir sur les champignons phytopathogènes en inhibant leur germination, en lisant leur mycélium ou en compétitionnant pour les nutriments et l'espace (**Digat et Gardan, 1987 ; Lemanceau et al., 1988 ; Fuchs et Défago, 1991 ; Keel et Défago, 1991 ; Défago, 1993 ; Digat, 1992 ; Keel et al., 1992 ; Whipps et Lymssen, 2001 ; Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Jetyanon et Klopper, 2002 ; Persello-Cartieaux et al., 2003**).

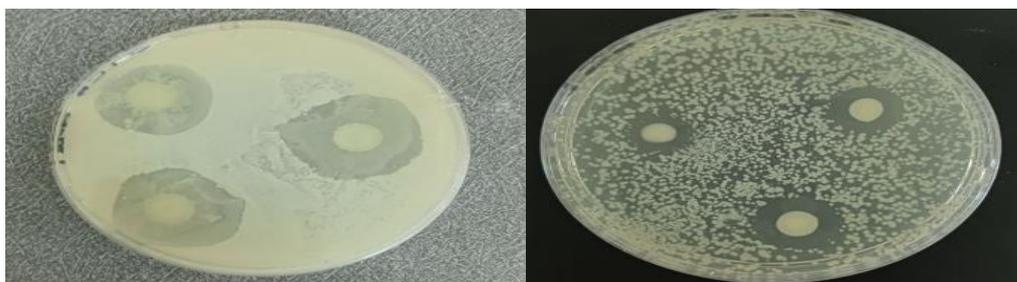
Par ailleurs, les résultats d'autres études corroborent nos observations. **Rakotoarimanga et al. (2014)** ont rapporté que parmi 87 isolats testés, 24 se sont révélés être antagonistes de *Fusarium oxysporum*, avec des taux d'inhibition variant de 14% à 60%. Ils ont souligné que l'inhibition de *Fusarium* était due à la production d'antibiotiques par l'antagonisme. **Bouznad**

et Bellahcene (2015) ont également montré que certaines souches isolées de la rhizosphère avaient un effet inhibiteur significatif sur la croissance de *Fusarium*, avec des taux d'inhibition variant de 0,23% à 77,78%. Dans leur étude, des espèces de *Bacillus* ont été identifiées comme étant particulièrement efficaces. De plus, les travaux de Syed Nabi et al. (2021) ont révélé que le PGPR *Bacillus aryabhatai* a été en mesure d'inhiber de manière significative la croissance de *Fusarium oxysporum*.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Yang et al. (2011), qui ont constaté que parmi 72 souches isolées de la rhizosphère de la tomate, 48 isolats présentaient un taux d'inhibition compris entre 50% et 78%. Des études antérieures, telles que celle d'Axelrod et Radley (1991), ont également démontré que 96 souches de PGPR étaient capables d'inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum* in vitro (Achbani et al., 2003).

**- Confrontation Bactérie-Bactérie:**

Parmi les 30 souches utilisées, 17 souches ont montré une activité antagoniste vis-à-vis des souches d'*Erwinia amylovora* et *Agrobacterium tumefaciens* (Figure 09)



**Figure 09 :** résultats de confrontation bactérie-bactérie (original 2023)

**Tableau 03:** Tableau représentant les zones d'inhibition après confrontation directe avec les bactéries phytopathogènes.

Souches testés	Zone d'inhibition vis-à-vis d'EMEA (mm)	Zone d'inhibition vis-à-vis de C58 (mm)
AFI 6	22	15
AFI 7	19	18
AFI 8	17	20
AFI 9	20	30
AFII 1	80	50
AFII 2	25	12
ASI B	32	20
ASI C	58	0
ASI D	38	0
ASI E	14	0
ASI G	0	22
ASI H	47	24

ASI J	37	29
ASII B	56	20
ASII G	20	15
ASII H	14	0
ASII P	73	20

- EMEA = *Erwinia amylovora* / C58= *Agrobacterium tumefaciens*

Les 17 souches testées pour l'antagonisme bactérien et ayant une activité inhibitrice vis-à-vis des souches bactériennes phytopathogènes de : EMEA et C58, ont présentés des résultats assez variables selon la souche pathogène. Pour la confrontation vis-à-vis d'EMEA, les diamètres des zones d'inhibition obtenus ont varié de 14 mm à 80 mm. La souche ASII H a présenté la sensibilité la plus faible avec des zones d'inhibition ne dépassant pas 14 mm, tandis que la souche AFII 1 s'est révélé la plus sensible avec une zone d'inhibition maximale de 80 mm, suivie de près par la souche ASII P avec 73 mm. Seule la souche ASI G n'a montré aucun effet antagoniste contre EMEA. En ce qui concerne l'agent pathogène C58, les diamètres des zones d'inhibition ont varié de 12 mm à 50 mm. La souche AFII 2 a démontré la sensibilité la plus faible avec des zones d'inhibition ne dépassant pas 12 mm, tandis que la souche AFII 1 a été la plus sensible avec une zone d'inhibition maximale de 50 mm, suivie de près par la souche AFI 9 avec 30 mm. Les souches ASIC, ASI D, ASIE et ASII H n'ont présenté aucun effet antagoniste contre C58.

Ces résultats mettent en évidence la diversité et la variabilité des potentialités antagonistes des souches testées, ce qui suggère l'implication de plusieurs substances antibactériennes dans le processus d'inhibition (**Djalout et al., 2019**). Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude menée par **Frikha-Gargour et al (2017)**, qui ont également observé une activité antibactérienne significative in vitro chez 32 souches rhizosphériques de genre *Bacillus* isolées à partir d'échantillons environnementaux contre la souche C58 d'*A. tumefaciens*.

L'inhibition observée peut être attribuée à plusieurs mécanismes, notamment la production d'un large éventail d'antibiotiques tels que l'acide phénazine-1-carboxylique et d'autres métabolites secondaires tels que la chitinase, la cellulase et la protéase qui peuvent avoir un rôle dans la lyse de la paroi cellulaire du pathogène (**Kobayashi 2002, Sadfi 2001., Liu 2019 ; Weller 2007; Sunich Kumar et al 2005**). Ces métabolites peuvent induire des mécanismes de défense chez la plante hôte (**Jourdan et al 2008**).

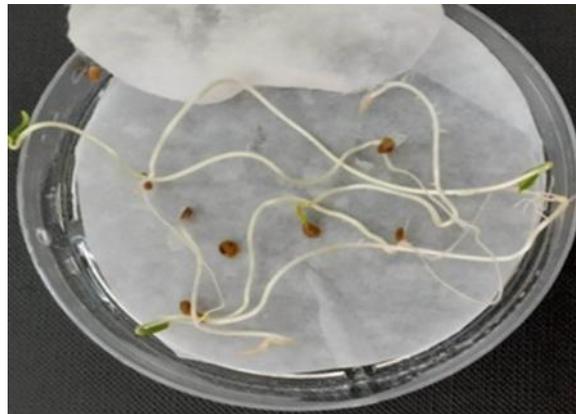
Les recherches menées par **Habbadi et al. (2017)** ont sélectionné 12 souches antagonistes appartenant aux genres *Pantoea*, *Bacillus* et *Acinetobacter*, démontrant une forte activité antibactérienne in vitro contre *A. vitis*. De nombreuses souches de *Pseudomonas* utilisées dans le biocontrôle des maladies des plantes ont démontré leur capacité à inhiber la croissance d'un large éventail d'agents phytopathogènes in vitro (**Habbadi et al., 2006**). Ces résultats peuvent s'expliquer par la capacité compétitive des souches isolées, qui leur permet de produire des métabolites antimicrobiens essentiels pour entraver la croissance du pathogène (**Lodewyckx et al., 2002**).

#### 4. Test de la levée germination :

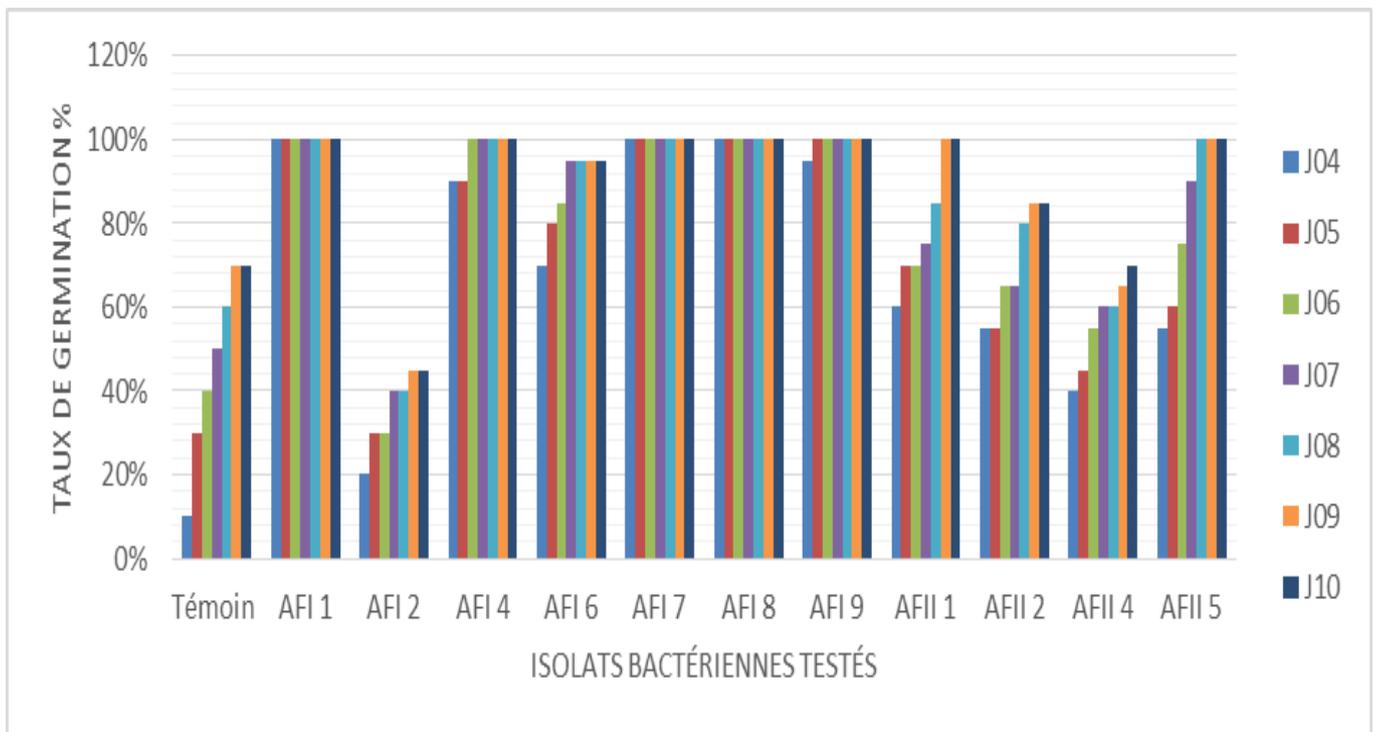
Ce test préliminaire est un indicateur pour vérifier et évaluer le potentiel stimulateur des 30 souches isolées saprophyte sur la levée de germination de nos semences.

Dans notre étude sur la germination des semences de tomate, nous avons bactérisé les semences avec des suspensions de 30 souches bactériennes sélectionnées au préalable, et réalisé une

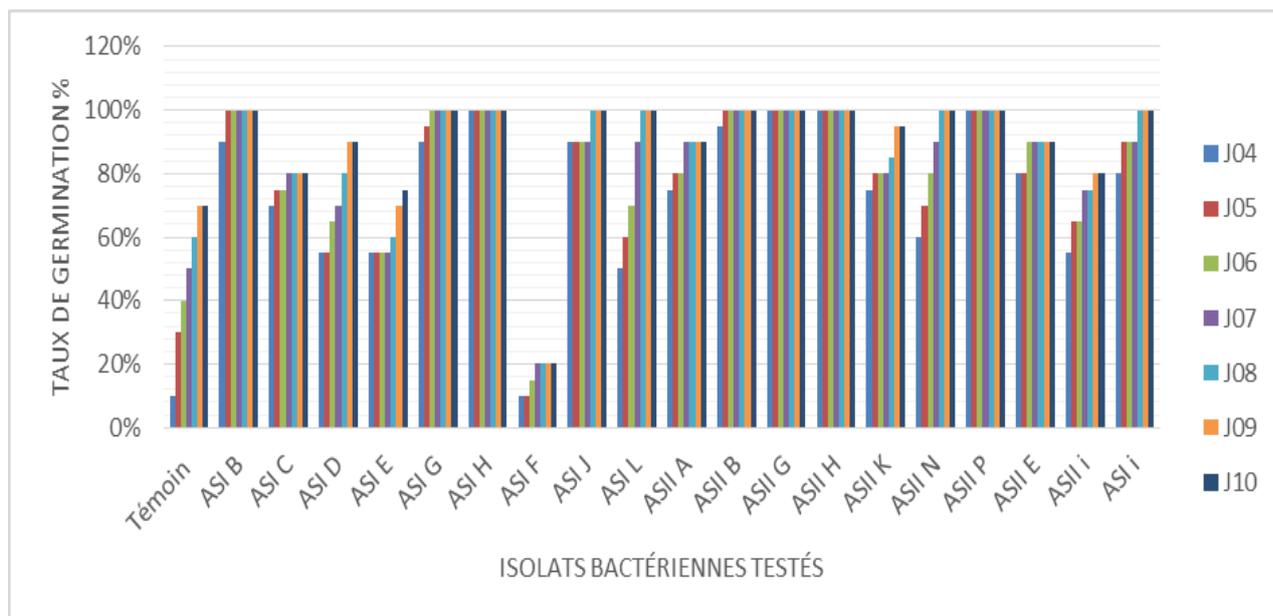
bactérisation uniquement avec l'EDS, c'est le témoin négatif non traité. La lecture de la levée de germination a commencé de 4<sup>ème</sup> jour au 10<sup>ème</sup> jour. Le pourcentage de taux de germination a été calculé selon la formule (voir partie matériel et méthode). (Figure 11, 12)



**Figure 10:** Résultat positive de la germination des grains de tomates (original 2023)



**Figure 11 :** Histogramme représentant le taux de germination des graines de tomates bactérisés par les souches isolés de la rhizosphère de *Moringa*



**Figure 12 :** Histogramme représentant le taux de germination des graines de tomates bactérisés par les souches isolés de la rhizosphère de *Colza*

Les résultats obtenus le 4<sup>ème</sup> jour ont révélé un faible taux de germination de 10% pour le témoin. En revanche, parmi les 30 souches testées, les souches AFI1, AFI7, AFI8, ASIH, ASIG et ASIP ont présenté un taux de germination de 100%, démontrant l'effet positif de ces souches bactériennes sur la vitesse de germination des graines. Cependant, il convient de noter que seulement les souches AFI2 et ASIF ont présenté des taux de germination relativement faibles, atteignant respectivement 20% et 10%.

Un suivi continu de la germination a été effectué jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour, et une augmentation importante du taux de germination a été observée pour toutes les souches testées par rapport au témoin qui a donné un taux de germination de 70%. La majorité des souches ont présenté un taux de germination compris entre 70% (AFII4) et 100% (AFI1, AFI4, AFI7, AFI8, AFI9, AFII1, AFII5, ASIIB, ASIG, ASIH, ASIJ, ASIL, ASIIB, ASIIG, ASIIH, ASIIN, ASIIP et ASI I). Cependant, il convient de noter que seulement les souches AFI2 et ASIF ont présenté des taux de germination relativement faibles par rapport au témoin négatif, atteignant respectivement 45% et 20%.

La germination est un processus physiologique et de développement permettant la transition de l'état de dormance des graines à celui de la plantule (Villegente, 2013). Des études antérieures ont reconnu que les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) ont la capacité d'exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes en augmentant le taux de germination (Barassi et al., 2006 ; Saima et al., 2018).

Des recherches sur le blé et le tournesol ont également montré que certains PGPR induisent une augmentation significative de l'émergence des graines, avec des améliorations pouvant atteindre jusqu'à 100% par rapport aux témoins (Shaukat et al., 2006a; Shaukat et al., 2006). Ces améliorations peuvent être attribuées à une augmentation de la synthèse d'hormones telles que les gibbérélines, qui stimulent l'activité d'enzymes spécifiques

favorisant la germination précoce, comme l'amylase, ce qui conduit à une augmentation de la disponibilité de l'assimilation de l'amidon. De plus, une amélioration significative de la vigueur des semis peut être attribuée à une meilleure synthèse des auxines (**Bharathi et al., 2004**). Nos résultats confirment les conclusions des études antérieures en démontrant l'effet bénéfique des souches bactériennes testées sur la germination des semences de tomate. Cependant, il est important de noter que certaines souches ont montré des effets variables, avec des taux de germination supérieurs ou inférieurs à ceux du témoin. Ces résultats soulignent ainsi l'importance de la sélection appropriée et de l'utilisation adéquate des souches bactériennes pour améliorer la germination des semences et la croissance des plantes.

### **5. Caractérisation générique des souches bactériennes:**

Les souches qui ont subi un criblage et montrés des résultats intéressants vis-à-vis soit de l'antagonisme et de la levée de germination ont été sujet à une caractérisation afin de déterminer le genre et même si possible l'espèce (selon la disponibilité des moyens)

#### **- Caractérisation macromorphologique :**

L'examen macroscopique des colonies bactériennes rhizosphériques jeunes et pures cultivées sur milieu GN et KB a permis de caractériser leur morphologie et leur apparence. Les différentes caractéristiques observées, telles que la forme, le bord, l'élévation, la taille, l'aspect, la couleur et l'opacité des colonies, fournissent des informations essentielles pour identifier et différencier les souches bactériennes. Cette caractérisation macroscopique peut aider à déterminer la diversité et la variabilité des bactéries présentes dans la rhizosphère des plantes étudiées, ou mettre en évidence des similitudes entre les isolats provenant de différentes sources (voir annexe). Ces observations visuelles constituent une étape importante pour sélectionner des souches potentiellement intéressantes en vue d'études plus approfondies sur leurs activités biologiques et leur potentiel d'utilisation en agriculture ou en biotechnologie.

#### **- Caractérisation micromorphologique :**

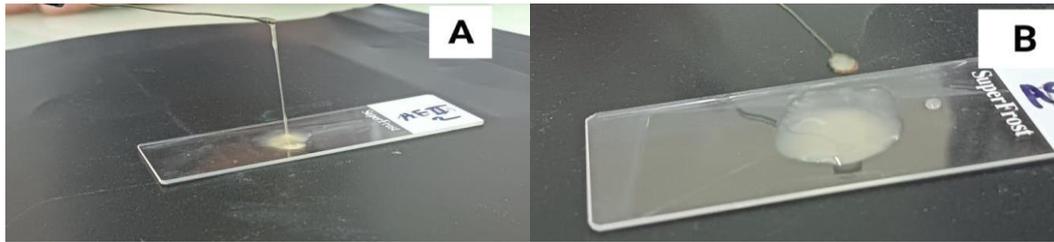
##### **➤ Coloration de Gram:**

Après avoir effectué la coloration différentielle de Gram, nous avons observé les frottis colorés au microscope optique au grossissement x10, x40, x100. Cette technique nous a révélé des bactéries Gram négatif et des bactéries Gram positif de tailles différentes. Les souches à étudier présentent des morphologies différentes : en bâtonnet et en coque.

L'examen microscopique des 30 souches bactériennes isolées à partir du sol de la Moringa et celui de Colza a révélé 21 isolats à Gram négatif et 09 isolats à Gram positif. La plupart des souches à Gram positif étaient de formes différentes : bacilles, cocci. Par contre les isolats bactériennes à Gram négatif étaient des bacilles de petite taille et parfois moyenne (voir annexe 08).

#### **- Test d'hydroxyde de potassium (KOH):**

Parmi les 30 isolats obtenues, la réaction de coloration de Gram a été correctement classée 21 souches comme Gram-négatives et 09 isolats comme Gram-positives. Les résultats obtenus par le test au KOH concordent généralement avec les résultats de la coloration de Gram, à une exception des souches Gram-négatives AFI 6 et AFI 7.



A: réaction KOH positive

B: réaction, négative

**Figure 13:** Résultat du test KOH (original ,2023)

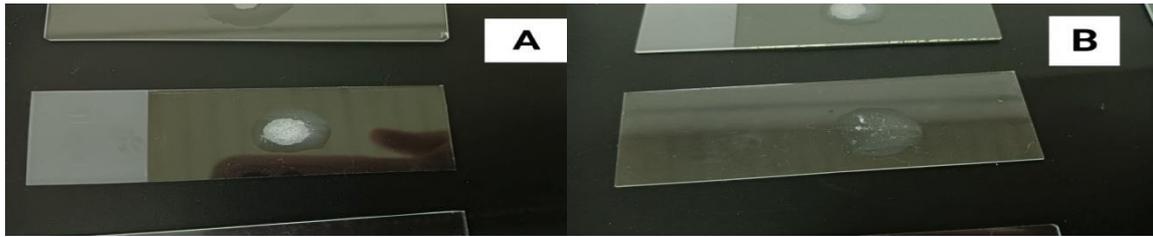
**D'autre part, Halebian et al.** Ont examiné 89 isolats gram-positifs et 109 gram-négatifs par le test KOH. Ils n'ont obtenu aucune réaction KOH faussement positive et 28,4 % de réactions KOH faussement négatives. Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que la réaction faussement négative au test du KOH observée chez certaines bactéries gram-négatives est attribuable à la résistance de leur paroi cellulaire au KOH. Cette étude démontre ainsi que le test du KOH constitue une méthode simple et rapide permettant de classer correctement les bactéries gram-positives, y compris les souches qui ont tendance à se décolorer plus facilement.

La coloration de Gram joue un rôle crucial dans la classification initiale et l'identification des bactéries inconnues et l'une des limitations majeures de cette technique réside dans la tendance de certaines bactéries gram-positives à se décolorer plus facilement que d'autres (**Anne marie et al. 1988**). D'après **Conn et al** Cette décoloration peut être influencée par différents facteurs tels que la composition du milieu de croissance et l'âge de la culture. En effet, plusieurs souches de bactéries peuvent présenter une coloration caractéristique gram-négatif ou gram-variable, ce qui complique encore davantage l'interprétation des résultats de la coloration de Gram (**Holdeman et al., Spengler et al**). Pour surmonter cette difficulté, une technique rapide peut aider à distinguer les organismes gram-positifs et gram-négatifs, c'est la réaction de solubilité KOH (**Halebian et al., 1981**).

#### - Test de catalase:

La majorité des souches bactériennes isolées dans cette étude ont présenté une réaction positive au test de catalase, indiquant ainsi la production de l'enzyme catalase. La catalase est une enzyme capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Un résultat positif est généralement observé par la formation de bulles ou de mousse lors de l'ajout de peroxyde d'hydrogène à la culture bactérienne. (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985**).

Cependant, seulement les souches ASID et ASI B, obtenues par un ensemencement dans la masse, ont montré une réaction négative au test de catalase, suggérant une absence ou une production très faible de l'enzyme catalase. Dans ce cas, aucun changement significatif n'a été observé lors de l'addition de peroxyde d'hydrogène à la culture bactérienne. Les résultats négatifs au test de catalase peuvent être observés chez les bactéries anaérobies et certaines bactéries facultatives anaérobies, car elles n'ont pas besoin de cette enzyme pour leur métabolisme. (**Marchal et Bourdon, 1982**) (Voir annexe 11).



A: réaction positive

Réaction Négatifs

**Figure 14** : Résultat de test catalase (original 2023)

- **Test d'oxydase:**

L'oxydase est largement utilisée comme critère discriminant dans l'identification des bactéries en raison de son caractère distinctif, qui se manifeste par l'apparition d'une coloration violette au site d'application de la réaction, en particulier pour les bactéries Gram négatif (**Bendoukhane et Djafer, 2016**). Les résultats obtenus montrent que la plupart des isolats sont oxydase positif ; une réaction positive a été indiquée par l'apparition de couleur violette dans quelques secondes, donc les isolats sélectionnées possèdent l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase) qui oxyde le N'-Tetraméthyl-p-phenylène-diamine dihydrochloride (substrat qui prend une coloration violette foncée) (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985**). En outre, les souches (AFI2, AFI 4, AFI 6, ASII E et ASII I) se sont révélées oxydase négative et ne possèdent pas l'enzyme respiratoire recherchée (voir annexe 11).



A: réaction positive

B: réaction négative

**Figure 15**: Résultat de test oxydase (original 2023)

- **Identification des souches par galeries API 20NE et API 20E:**

Vu le manque de produits et de moyens pour la caractérisation des espèces, on a utilisé ces galeries juste pour des 3 souches qui présentent des bons résultats dans les tests qui on a réalisés.

La caractérisation biochimique des isolats a été testée en utilisant les galeries API 20NE pour les souches AFII 1 et ASII B et API 20E pour la souche AFI 8, et l'identification a été faite grâce à un logiciel d'identification (APIWEBTM). AFI 1 a été identifié comme (*Pseudomonas sp*), ASII B comme (*Burkholderia sp*) et AFI 8 a été identifié comme (*Aeromonas sp*).

**Tableau 04** : Résultats des Galerie API (20E et 20NE) (original 2023)

<p>AFI11:<i>Pseudomonas spp</i></p>	
-------------------------------------	--

ASIIB: <i>Burkholderia spp</i>	
AFI8: <i>Aeromonas spp</i>	

La littérature scientifique a abondamment étudié le rôle des bactéries à Gram négatif en tant que promoteurs de la croissance des plantes, tandis que les bactéries à Gram positif ont été moins souvent mentionnées dans ce contexte (**Bashan et al., 2004 ; Christie, 2009 ; Akhtar et Siddiqui, 2009**). D'autres études ont examiné plusieurs espèces bactériennes, notamment *Pseudomonas sp* , *Aeromonas sp* et *Burkholderia sp* qui ont été identifiées comme des agents de biocontrôle et de biostimulation présents dans la rhizosphère des plantes cultivées ; Ces bactéries ont démontré leur capacité à favoriser la croissance des plantes, améliorer l'absorption des nutriments, stimuler la résistance aux maladies et accroître la tolérance aux stress environnementaux. Leur présence bénéfique dans la rhizosphère offre des perspectives prometteuses pour le développement de pratiques agricoles durables et respectueuses de l'environnement. (**Mehnaz et al., 2001 ; El-Sayed et al. 2002; Gull et al., 2004; Djibaoui et al., 2005; Sánchez-Matamoros et al., 2018; Safni et Antastia, 2018; Rajput et al., 2018; Bolivar-Anillo et al., 2021; Ghadamgahi et al., 2022** ).

# *Conclusion*

Dans le cadre de notre projet de fin d'études, nous avons procédé à l'isolement de bactéries rhizosphériques à partir de deux plantes cultivées. 45 souches ont été ensuite purifiées sur la base de la macromorphologie et ont subi de test d'hypersensibilité. Ce dernier a permis de sélectionner 30 souches non pathogènes qui ont été sujettes à une étude préliminaire afin de voir leur potentialité à avoir une action antimicrobienne vis-à-vis de quelques souches phytopathogènes testées et de déterminer leur capacité à améliorer la levée de germination des semences de tomate après bactérisation. Les résultats obtenus vis-à-vis de l'antagonisme fongique et bactérien ont révélé l'existence d'un pouvoir antimicrobien de 27 souches avec des résultats variables (selon l'agent auxiliaire et l'agent cible) et des performances assez importantes pour certains isolats tels que (AFII1, ASIIB).

Pour voir l'activité biostimulatrice des souches sélectionnées, on a procédé à la bactérisation des semences de tomates avec les 30 souches étudiées en plus de témoin et on a vérifié la levée de germination. Les résultats ont été variables mais la majorité (AFI1, AFI4, AFI7, AFI8, AFI9, AFII1, AFII5, ASIIB, ASIG, ASIH, ASIJ, ASIL, ASIIB, ASIIG, ASIIH, ASIIN, ASIIP et ASI I ) ont présentées un taux de germination allant jusqu'à 100% par rapport au témoin non bactérisé et on a remarqué également que certaines isolats n'ont aucune activité de stimulation de la germination (AFI2, AFII2 et ASIF) par rapport au témoin non bactérisé. Il est à constater que certaines souches ont présenté des résultats intéressants vis-à-vis de la vitesse de germination, c'est le cas des souches (AFI1, AFI7, AFI8, ASIH, ASIIG, ASIIH et ASIIP) qui ont atteint un taux de germination de 100% du 4<sup>ème</sup> jour. Pour ce qui est de la caractérisation générique, seuls certains tests ont été réalisés (vu le manque de moyens) ce qui ne nous a pas permis d'être affirmatifs vis-à-vis des genres à qui les isolats ayant présenté quelque performance dans le criblage appartiennent. L'utilisation de la galerie API 20<sup>E</sup> et 20NE qui est disponible nous a permis d'identifier biochimiquement 3 espèces appartenant aux Gram négatives et qui sont : AFII1 appartient à l'espèce *Pseudomonas spp*, que l'isolat AFI8 appartient à l'espèce *Aeromonas spp*, alors que ASIIB appartient à *Burkholderia spp*.

Cette étude préliminaire nous a permis d'obtenir des résultats assez encourageants mais très insuffisants pour pouvoir parler de biopesticides et biofertilisants. C'est pourquoi il est intéressant en perspective d'approfondir beaucoup de points tels que :

- Approfondir les études sur l'activité antimicrobienne des 27 souches, en évaluant leur efficacité contre un large éventail de souches phytopathogènes et autres pathogènes du sol, afin de mieux comprendre leur diversité et leur efficacité antagoniste.
- Étudier les mécanismes d'action des souches prometteuses pour mieux comprendre comment elles exercent leur activité antimicrobienne, notamment en identifiant les métabolites et les enzymes impliqués, ainsi que leur capacité à induire la résistance systémique chez les plantes.
- Réaliser une caractérisation génétique plus approfondie pour identifier avec précision toutes les souches isolées, mieux comprendre leur taxonomie et leur diversité.
- Effectuer des études *in vivo* et *in planta* pour évaluer l'efficacité des souches prometteuses dans des conditions réelles d'utilisation agricole, afin de mieux comprendre leur potentiel comme biofertilisants et biopesticides.
- Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre comment ces souches bactériennes interagissent avec les plantes dans des conditions de stress environnemental spécifiques, et comment elles peuvent être utilisées de manière optimale pour améliorer la résistance des cultures aux stress abiotiques et biotiques.

Ces recherches sont essentielles pour développer des solutions agricoles durables et respectueuses de l'environnement, en favorisant une agriculture durable face aux défis climatiques et aux pressions biotiques.

# *Références bibliographiques*

## Référence :

- Abbas, T.; Zahir, Z.A.; Naveed, M.; Kremer, R.J. Limitations of existing weed control practices necessitate development of alternative techniques based on biological approaches. *Adv. Agron.* 2018, 147, 239–280.
- Abulfaraj, A.A.; Jalal, R.S. Use of plant growth promoting bacteria to enhance salinity stress in soybean (*Glycine max L.*) plants. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021, 28, 3823–3834.
- Achbani, E.H., Azba, K., Samson, R. (2003). L'utilisation des bactéries " PGPR" dans la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes cultivées. *AL AWAMIA*, 108, 27- 46.
- Akhtar, M.S., Siddiqui, Z.A., 2009. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Rhizobium sp.* on the growth, nodulation, yield and root-rot disease complex of chickpea under field condition. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 3489–3496.
- Ali, M.A.; Naveed, M.; Mustafa, A.; Abbas, A. The good, the bad, and the ugly of rhizosphere microbiome. In *Probiotics and Plant Health*; Springer: Singapore, 2017; pp. 253–290.
- Anne-Marie, B; Francois, L; Evaluation of the KOH Test and the Antibiotic Disk Test in Routine Clinical Anaerobic Bacteriology; *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Oct. Vol. 26, No. 10. 1988, p. 2144-2146
- anonyme 01: (<http://decoupageadministratifalgerie.blogspot.com/>)
- anonyme02: (<https://dateandtime.info/>)
- Anonyme03: (ANIREF/Monographie de la wilaya de Médéa).
- Ansari, F.; Jabeen, M.; Ahmad, I. *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilmforming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2021, 18, 3855–3870. [CrossRef]
- Anthony O. Adesemoye & Joseph W. Kloepper. 2009. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* (2009) 85:1–12
- Antoun, H., Prévost, D., 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In : *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (ed.). Springer, TheNetherlands. pp : 16-39.
- Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M., Khaliq, A., 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in (*Brassica juncea L.*). *Biology and Fertility of Soils* 35, 231-237.
- Bais. H.P, Park. S.W, Weir. T.L, Callaway. R.M and Vivanco. J.M, «How plants communicate using the underground information superhighway», *Trends in Plant Science*, vol. 9, N° 1, January 2004, pp. 26 - 32.
- Barassi, C., Ayrault, G., Creus, C., Sueldo, R.J., Sobrero, M.T., 2006. Seed inoculation with *Azospirillum mitigates* NaCl effects on lettuce. *Sci. Hortic.* 109, 8–14.

- Bashan, Y., Holguin, G., de-Bashan, L.E., 2004. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50, 521–577
- Bashan, Y., Holguin, G., De-Bashan, L.E., 2004. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Canadian Journal of Microbiology* 50, 521-577.
- Bellal S, M. Hadeid, T. Ghodbani, and O. Dari, "Accès à l'eau souterraine et transformations de l'espace oasien: le cas d'Adrar (Sahara du Sud-ouest algérien)," *Cahiers de géographie du Québec*, vol. 60, pp. 29-56, 2016.
- Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch. 2002. Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- Bendoukhane, H. & Djafer, K. (2016). MALDI -TOF spectrométrie de masse : Un outil efficace pour l'identification rapide et fiable des souches bactériennes, *Microbiologie générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*, UMF Constantine 1, 45p.
- Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;68:1–13.
- Bharathi.,R.Vivekananthan.,S.Harish.,A.Ramanathan and R. Samiyappan, Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protec.*, vol.23, pp, 835–843. 2004
- Bhattacharyya, P.N.; Jha, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 28, 1327–1350.
- Biswas, J.C., Ladha, L.K., Dazzo, F.B., 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Journal of Soil Science* 64, 1644-1650.
- BLOEMBERG G. AND LUGTENBERG B., 2001. molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
- Bolivar-Anillo, H.J.; González-Rodríguez, V.E.; Cantoral, J.M.; García-Sánchez, D.; Collado, I.G.; Garrido, C. Endophytic bacteria *Bacillus subtilis*, isolated from *Zea mays*, as potential biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Biology* 2021, 10, 492.
- Bouznad, A and Bellahcene, M. (2015). Screening of free-living and endophytic rhizobacteria with potential antagonistic activity against *F. oxysporum* F. Sp lycopersici for their potential as plant growth promoters. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* 17 (1): 17-26.
- Camille, D. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier. P 128-129
- chan W.L, (2018) exploring growth enhancing rhizospheric microorganisms for silviculture of *eucalyptus pellita*. Swinburne university of tech

- Cheng, W., Coleman, D.C., Carroll, C.R., Hoffman, C.A., 1994. Investigating short term carbon flows in the rhizospheres of different plant species, using isotopic trapping. *Agronomy Journal* 86, 782-788.
- Chin-A-Woeng. T.F.C, Bloemberg. G.V, Lugtenberg. J.J, «Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria», *New phytologist*, N°157, 2003, pp. 503-523.
- Christie, P.J., 2009. *Agrobacterium* and Plant Cell Transformation, in: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 1–16.
- Come D., 1970. *Les obstacles à la germination*. Ed. Masson et Cie, Paris, 162.
- Conn, H. J., J. W. Bartholomew, and M. W. Jennison. 1957. Staining methods, p. 10-18. In H. J. Conn and M. W. Jennison (ed.), *Manual of microbiological methods*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Damam, M.; Kaloori, K.; Gaddam, B.; Kausar, R. Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev.* 2016
- Daur I , Saad M M, Eida A A, Shakeel A Zahid H , Muhammad Z. I, Yasir M , Sayed S, Heribert H.(2018) *Boosting Alfalfa (Medicago sativa L.) Production With Rhizobacteria from Various Plants in Saudi Arabia*, 2018
- DEFAGO G., 1993. 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312.
- DELARRAS C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'Analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition. Lavoisier, Paris.
- DELARRAS C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'Analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition. Lavoisier, Paris.
- Demange. P, Wendenbaum. S, Bateman. A, Dell. A and Abdallah. M.A, «Structure and physiochemical properties of pyoverdins and related compounds», In: «Iron transport in microbes, plants and animals», Weinheim ,VCH, 1987, pp. 167 - 187.
- DIGAT B., 1992. Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. *Phytoma-D Défense des végétaux* 441:34-38.
- DIGAT B., GARDEN L., 1987. Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas* fluorescents et putida. *Bull. OEPP/EPPO*.17 :559-568
- Dixon, R.; Kahn, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 621–631.
- Djellout H., Mekheldi D., Belkacem KK., Raio A et Krimi Z. (2019). Evaluation de potentiel de souche antagoniste de *Bacillus* spp. et de *pseudomonas* spp. Dans le contrôle d'*agrobacterium* spp. Pathogène impliqué dans la maladie de galle de collet. *Revue Agrobiologia* ; 9(1): 1267-1283
- Djibaoui, R.; Bensoltane, A. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.* 2005, 4, 697–702.
- Dobbeleare, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J., 2003. Effects of inoculation with wild type *Azospirillum*

*brasiliense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils* 36, 284-297.

- Dommergues Y, Mangenot G. 1970. Interaction between microorganisms in the rhizosphere. *Annals of Agronomy* 21: 23-47.
- Dos Santos Isaneli Batista dos Santos, Arthur Prudêncio de Araújo Pereira, Adijailton José de Souza, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, Flaviana Gonçalves da Silva, João Tiago Correia Oliveira, Maria Carolina Quecine Verdi 1 and Júlia Kuklinsky Sobral; Selection and Characterization of *Burkholderia* spp. for Their Plant-Growth Promoting Effects and Influence on Maize Seed Germination. *J Frontiers in Soil Science*, 2022, p 1.
- DUBOST D., 2002: *Ecologie, aménagement et développement agricole des Oasis Algériennes*. CRSTRA, 422 p.
- Duffy, B. Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003, 41, 501–538.
- Elmholt, S., 1991. Side effects of propiconazole (tilt 250 ECTM) on non-target soil fungi in a field trial compared with natural stress effects. *Microbial Ecology* 22, 99-108.
- El-Sayed El-SA, El-Didamony G, El-Sayed EF. 2002. Effects of mycorrhizae and chitin-hydrolysing microbes on *Vicia faba*. *World J Microb Biot* 18:505–515.
- *FAOSTAT*, 2023 *L'alimentation et l'agriculture (FAO)*. *FAOSTAT* <https://www.fao.org/agriculture-consumer-protection-department/fr/> consulté le 23/06/2023
- Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2018). Kotanen PM. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(6), E1157-E1165
- Fonseca. M.C.C, «Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)», Seropédica - RJ.,(PhD. Thesis. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). 2003. pp.136.
- Fonseca. M.C.C, Rumjanek. N.G, Xavier. G.R, «Quorum sensing: uma nova interpretação da incidência e controle de doenças de plantas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia». (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 170). 2004, p 37.
- Frikha-Gargouri O., Ben Abdallah D., Bhar I. and Tounsi S. (2017). Antibiosis and bmyB Gene Presence As Prevalent Traits for the Selection of Efficient *Bacillus* Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. *Frontiers in Plant Science*, 14 August 2017, Volume 8, Article 1363
- Fuchs J., Defago G., 1991. Protection of tomatoes against *Fusarium oxysporum* .sp. *Lycopersici* by combining a non pathogenic *Fusarium* with different bacteria in untreated soil. In *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Progress d Prospects*(eds keel C., Koller B and Defago G.), PP.51-56. *Bulletin OILB/SROP XIV/8*.
- Fuqua. C, Parsek. M.R and Greenberg. E.P, «Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing». *Annu. Rev. Genet.* N°35, 2001, pp. 439-468.

- Fuqua. W.C, Winans. S.C and Greenberg. E.P, «Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators». J. Bacteriol. N°176, 1994, pp. 269-275.
- George M. Carlone, Manuel J. Valadez, and M. John Pickett Methods for Distinguishing Gram - Positive from Gram - Negative Bacteria. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1983, p. 1157-1159.
- Giller, K. E., Beare, M. H, Lavelle P., Izac A. M. N., Swift, M. J., 1997. Agricultural, soil biodiversity and agroecosystem function. Applied Soil Ecology 1, 3-16.
- Glick BR. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, Waterloo.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41, 109-117.
- Godfray, H.C.J.; Beddington, J.R.; Crute, I.R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.F.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S.M.; Toulmin, C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. Science 2010, 327, 812–818.
- Goudaa, S.; Kerryb, R.G.; Dasc, G.; Paramithiotisd, S.; Shine, H.S.; Patra, J.K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiol. Res. 2018, 206, 131–140.
- Gouzou L.(1992). Devinir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante: Cas de Bacillus polymyxa, Université de l'Auraine, 176p.
- Gull, M.; Hafeez, F.Y.; Saleem, M.; Malik, K.A. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. Aust. J. Exp. Agric. 2004, 44, 623–628.
- 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.
- Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat Rev Microbiol 2005.,
- Habbadi Kh., Benkirane R., Benbouazza A., Bouaichi, A., Maafa I., Chapulliot D. and Achbani. E. (2015). Biological Control of Grapevine Crown Gall Caused by Allorhizobium vitis using Bacterial Antagonists. International Journal of Science and Research, Volume 6 Issue 6, June 2017.
- Halebian, S., B. Harris, S. M. Finegold, and R. D. Rolfe. 1981. Rapid method that aids in distinguishing gram-positive from gram-negative anaerobic bacteria. J. Clin. Microbiol. 13:444-448. 3. Holdeman, L. V., E. P. Cato, and W. E. C. Moore (ed.). 1977.
- Hamdan. H, Weller. D.M and Thomashow. L. S, «Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of Gaeumannomyces graminis var. tritici by Pseudomonas fluorescens 2–79 and M4- 80R». Appl. Environ. Microbiol. N°57, 1991, pp. 3270- 3277.

- Hiltner, L., 1904. Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brache. Arbeit und Deutsche Landwirtschaft Gesellschaft 98, 59-78.
- Holdeman, L. V., E. P. Cato, and W. E. C. Moore (ed.). 1977. Anaerobe laboratory manual, 4th ed. V.P.1. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- Huang, J.K., Hu, R.F., Rozelle, S., Pray, C., 2005. Insect resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. Science 308, 688-690.
- Jetiyanon J., Klopffer JW.,2002. Mixture of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Bilo. Control 24:285-291.
- Joffin J. N & Leyral G. (2006). Microbiologie technique, 2ème Éd, Collection Biologie technique. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux. 304p.
- Jourdan E., Ongena M. et Thonart P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnologie Agronomie Société et Environnement, 12(4): 437-449.
- Journet. E.P, El-Gachtouli. N, Vernoud. V, De Billy. F, Pichon. M, Dedieu. A, Arnould. C, Morandi. D, Barker. D.G, Gianinazzi-Pearson. V, «Medicago truncatula ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells». Mol Plant-Microbe Interact, N°14, 2001, pp. 737-748.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B., 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environ. Microbiol. 7: 1809-1817.
- KEEL C., SCHIUDER U., MAURHOFER M., VOISARD C., LAVILLE J., BURGERU., DÉFAGO, G., 1992. Suppression of Root Diseases by Pseudomonas fluorescens CHAO: Importance of the Bacterial Secondary Metabolite 2, 4-Diacetylphloroglucinol. Molecular Plant-Microbe Interactions, 5(1): 4-13.
- KEEL C.,MAURHOFER M., OBERLHANSLI T.H., VOISARD C., HAAS, D ET DEFAGO C. 1991.Role of 2,4- diacetylphloroglucinol in the suppression of take-all of wheat by strain of Pseudomonas fluorescens. In: Biotic interactions and soil borne diseases .Rev. Agric. Managed Forest Ecol 23, Elsevier, Amsterdam, 335-338. Symbiosis 9:327-341.
- KIRDI Billal, Rôle des PGPR « Plant Growth Promoting Rhizobacteria» dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites, 2011 38p
- Klement, J. F., Yip, T. T., & Cass, C. E. (1990). A rapid and sensitive assay for the detection of bacterial cytochrome oxidase. Journal of microbiological methods, 11(3), 235-242.
- Klement, Z., 1963. Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. Nature.199, 299-300.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M., 1989. Free living bacterial inocula for inhacing crop productivity. Trends in Biotechnology 7, 39-44.

- Kobayashi, D.Y.; Reedy, R.M.; Bick, J.; Oudemans, P.V. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 1047–1054.
- Ladha, J.K.; de Bruijn, F.J.; Malik, K.A. Introduction: Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice-a frontier project. *Plant Soil* 1997, 124, 1–10.
- Larpent J P., Larpent-Gourgaud M. 1985. Manuel pratique la microbiologie. Ed Hatmann, France, 230p .
- Lauriane, G. 2015, CARACTÉRISATION DE RHIZOBACTÉRIES DU GROUPE DES BACILLUS BÉNÉFIQUES À LA CROISSANCE DE LA TOMATE. UNIVERSITÉ DU QUÉBEC. p 39
- LEMANCEAU P., ALABOUVETTE C. AND ET COUTEAUDIER Y., 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies, modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, 8: 155-162.
- 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 E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. and Lelie D.V. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21:586–606.
- Loper, J.E.; Schroth, M.N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 1986, 76, 386–389
- Lu, L.; Zhang, J.; Peng, C. Shift of Soil Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) dissipation pattern and microbial community composition due to rhamnolipid supplementation. *Water Air Soil Pollut.* 2019, 230, 107.
- Lugtenberg B., Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556
- MARCHAL N., BOURDON J.L. (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. DOIN éditeur, Paris, 442.
- Maurer. B, Muller. A, Keller-Shierlein. W and Zähler. H, «mikrobiol», n° 60, (1968), 326 -339. In: Philson. S, et Llinàs. M, «Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*», the journal of Biological Chemistry, vol. 257, N° 14, July, 1982, pp. 8086 – 8090.
- Mazzola. M, Cook. J, Thomashow. L.S, Weller. D.M, Pierson III. L.S, «Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habits». *Appl. Environ. Microbiol*, vol.58, N°8, 1992, pp. 2616-2624.
- Mehnaz, S., Mirza, M. S., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Bano, A., et al. (2001). Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 47, 110–117. doi: 10.1139/w00-132
- MESSAOUDI, H., 2015.Effets de l'inoculation avec des bactéries rhizosphériques sur la croissance du blé et le développement de quelques bio-agresseurs qui lui sont associés.132 p

- Meyer. J.M, et Abdellah. A, «The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties», *J. Gen. Microbiol*, N° 107, 1978, pp. 319 - 328.
- 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.
- Munees, A., Mulugeta, K., 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. 28 Febr. 2013 1018–3647, 1–20.
- Neienam Nielsen, M.; Sørensen, J. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999, 30, 217–227.
- Niamat, B.; Naveed, M.; Ahmad, Z.; Yaseen, M.; Ditta, A.; Mustafa, A.; Rafique, M.; Bibi, R.; Sun, N.; Xu, M. Calcium-Enriched Animal Manure Alleviates the Adverse Effects of Salt Stress on Growth, Physiology and Nutrients Homeostasis of *Zea mays* L. *Plants* 2019, 8, 480.
- Olanrewaju, O.S.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 33, 197
- Ongena M. and Thonart P. (2006). Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. In: *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. 1st ed. Japan: Global Science Books, 447-463.
- OULEBSIR-MOHANDKACI , SELAMI , BENZINA., 2017. Détection de *Pseudomonas savastanoi*.pv agent causal de la tuberculose de l'olivier. Evaluation du pouvoir antagoniste de quelques substances végétales bioactives. Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara, p. 16-17.
- PERSELLO-CARTIEAUX F., NUSSAUMEL ET ROBAGLIA, C. 2003. Tales from underground : Molecular plant-rhizobacteria interaction .*Plant Cell Environ* 26 :189-199.
- Persello-Cartieaux, F, Nussaume, L, Robaglia, C. (2003). Tales from the underground, molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ* 26, 189–199.
- Qudsia S, Wang X, Fasih U, Jiří K, Muhammad Z , Jiri H, Munaza N, Antonin K , Mukkaram E , Muhammad N , Martin B and Adnan M. 2021. Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms. Ed.Vincent Arbona. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10529
- Raaijmakers, J.M., 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321, 341-361.
- Rajput, L., Imran, A., Mubeen, F., and Hafeez, F. Y. (2018). Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth promotion by halo-tolerant PGPR-consortium. *Soil Environ.* 37, 178–189.
- RAKOTOARIMANGA N., ZANANIRINA J., RAMAMONJISOA D., RAMANANKIERANA H. (2014). Lutte biologique antifongique : actinomycètes du

sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate pourri (*Solanum lycopersicum* L., 1753), *Afrique SCIENCE* 10(3) : 243 – 255.

- Rakotoarimanga, N., Zananirina, J., Ramamonjisoa, D., & Ramanankierana, H. (2014). Lutte biologique antifongique: actinomycètes du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* L., 1753) pourri. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences ET Technologie*, 10(3), 243-255.
- Raymond, J.; Siefert, J.L.; Staples, C.R.; Blankenship, R.E. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 2004, 21, 541–554.
- Reed, S.C.; Yang, X.; Thornton, P.E. Incorporating phosphorus cycling into global modeling efforts: A worthwhile, tractable endeavor. *New Phytol.* 2015, 208, 324–329.
- Sadfi, N.; Cherif, M.; Fliss, I.; Boudabbous, A.; Antoun, H. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *J. Plant Pathol.* 2001, 83, 101–117.
- Safni, I., and Antastia, W. (2018). In vitro antagonism of five rhizobacterial species against *Athelia rolfsii* collar rot disease in soybean. *Open Agric.* 3, 264–272.
- Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B.K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. Microbial siderophores and their potential applications: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016, 23, 3984–3999.
- Salmond, G.P, Bycroft, B.W, Stewart, G.S and Williams, P, «The bacterial “enigma”: cracking the code of cell-cell communication». *Mol. Microbiol.* N°16, 1995, pp. 615-624
- Sánchez-Matamoros, R. C., Gil-Serrano, A. M., Espuny, M. R., Ollero, F. J., Megías, M., and Rodríguez-Carvajal, M. A. (2018). Structure of surface polysaccharides from *Aeromonas* sp. AMG272, a plant-growth promoting rhizobacterium isolated from the rice rhizosphere. *Carbohydr. Res.* 462, 1–6.
- Schaad N. W, Jones J. B, Chun W., 2001. Initial identification of common genera. In: Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. (eds.). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, pp. 84–120.
- Schmidt C S , F. Agostini, C. Leifert, K. Killham, and C. E. Mullins, 2004, Influence of Soil Temperature and Matric Potential on Sugar Beet Seedling Colonization and Suppression of *Pythium* Damping-Off by the Antagonistic Bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*, *The American Phytopathological Society*, Vol. 94, No. 4, 351-361
- Shameer S, Prasad TNVKV. 2017. Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation* 83(2): 177-194.
- Shamoot. S, Mc Donald. L and Bartholomew. W. V, «Rhizo-deposition of organic debris in soil», *Soil Science Society of America Proceedings*, N° 32, 1968, pp. 817-820.

- Sharma, S.B.; Sayyed, R.Z.; Trivedi, M.H.; Gobi, T.A. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus 2013, 2, 587.
- Shaukat k., S.Affrasayab and S.Hasnain, Growth responses of Triticum aestivum to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. Res. J. Microbiol., vol.1(4),pp.330-338. 2006b
- Shaukat K.,S.Affrasayab and S.Hasnain, Growth responses of Helianthus annuus to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer., J.Agric.Res.,vol.1(6),pp.573-581. 2006a
- SINGLETON P. (2005). Bactériologie : Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Dunod- Paris, p.480-490
- Slimani S, "Étalonnage de différents systèmes traditionnels (Chekfa) de mesure de débits en vue d'une restitution du réseau hydraulique de distribution d'une foggara," Mémoire de magister, Ecole Nationale Polytechnique, Alger, Algerie 2011.
- Sobhani I., WYah J I. 2000.Histopathology of gastroduodenal inflammation : the impact of helicobacter pylori.Histopathology,Vol 26.pp1-15.
- Spengler, M. G., T. Rodheaver, L. Richter, M. T. Edgerton, and R. F. Edlich. 1978. The Gram stain the most important diagnostic test in infection. J. Am. Coll. Emergency Physicians 7:434-438.
- Stonier L. (1960). Agrobacterium tumefaciens (Conn II). Production of antibiotic substance. Journal of Bacteriology, 79: 880-898.
- Sunich Kumar R., Ayyadurai N., Pandiaraja P., Reddy A. V., Venkateswarlu Y., Prakash O. and Sakathivel N. (2005). Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain pseudomonas aeruginosa PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. Journal of applied microbiology, 98 (1) : 145-154.
- Syed Nabi, R. B., Shahzad, R., Tayade, R., Shahid, M., Hussain, A., Ali, M. W., Yun, B. W. (2021). Evaluation potential of PGPR to protect tomato against Fusarium wilt and promote plant growth. PeerJ, 9, e11194.
- Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Zahid M, et al. (2014) Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (Pisum sativum L.) World J Microbiol Biotechnol 30: 719-725.
- Umar, W.; Ayub, M.A.; ur Rehman, M.Z.; Ahmad, H.R.; Farooqi, Z.U.R.; Shahzad, A.; Rehman, U.; Mustafa, A.; Nadeem, M. Nitrogen and phosphorus use efficiency in agroecosystems. In Resources Use Efficiency in Agriculture; Springer: Singapore, 2020; pp. 213–257.
- Umar, W.; Ayub, M.A.; ur Rehman, M.Z.; Ahmad, H.R.; Farooqi, Z.U.R.; Shahzad, A.; Rehman, U.; Mustafa, A.; Nadeem, M. Nitrogen and phosphorus use efficiency in agroecosystems. In Resources Use Efficiency in Agriculture; Springer: Singapore, 2020; pp. 213–257.
- Villegente, M., 2013. Caractérisation biochimique et moléculaire de Mécanismes de la Germination d'Espèces Endémiques de Nouvelle-Calédonie.
- Vincent M. N., Harrison L. A., Brackin J.M., Kovacevich P. A., Mukerji P. et Weller D. M., 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne

*Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 57: 2928-2934.

- Vittorio V. and Christoph K. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, March 2016, Vol. 21, No. 3 187-188
- Wang. Y. J, Leadbetter. J.R, 2005. «Rapid Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signal Biodegradation in Diverse Soils». *Applied and environmental microbiology*, Mars 2005, pp. 1291-1299
- Weller D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97 (2): 250-256.
- Weller DM. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 1988;26:379–407.
- WHIPPS J.M., LUMSDEN R.D., 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N.(Eds.), *Fungi as Biocontrol agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 9-22
- Whitehead. N.A, Barnard. A.M, Slater. H, Simpson. N.J and Salmond. G. P, «Quorum-sensing in Gram-negative bacteria». *FEMS Microbiol. Rev.* N°25, 2001, pp. 365-404.
- Withers. H, Swift. S and Williams. P, «Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria». *Curr. Opin. Microbiol.* N°4, 2001, pp. 186-193. 337. Bassler. B.L, «Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria». *Cell* N°109, 2002, pp. 421-424.
- Wood. D. W, Gong. F, Daykin. M.M, Williams. P and Pierson III. L. S, «Nacyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 in the wheat rhizosphere». *J. Bacteriol.* N°, 179, 1997, pp.7663-7670.
- Wulff E.G., van Vuurde J.W.L. et Hockenhull J., 2003. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. *Plant and Soil*, vol. 255, p.p. : 463–474.
- Zahran, H.H. Rhizobia from wild legumes: Diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.* 2001, 91, 143–153.

# *Annexes*

## ➤ Annexe 01

### 1. *Moringa Oleifera*

Le *Moringa oleifera* est l'espèce la plus largement cultivée de la famille des Moringaceae, appartenant à l'ordre des Brassicales. Cette plante, également connue sous le nom d'arbre de vie, est adaptée aux conditions tropicales et subtropicales, et présente une résistance à la sécheresse, lui permettant de se développer dans des environnements arides. Originaire de l'Inde, elle est cultivée en Afrique depuis longtemps. (Fahey 2005)

Le *Moringa oleifera* est un arbre résineux dont le bois a une qualité médiocre, mais il est utilisé depuis des siècles dans des applications médicinales et industrielles traditionnelles. Toutes les parties de l'arbre, y compris les feuilles, les fleurs, les fruits et les racines, sont comestibles et ont été consommées par les populations humaines depuis longtemps (Fuglie, 1999). De plus, diverses parties du *Moringa* possèdent des propriétés pharmacologiques bénéfiques, telles que des effets stimulants sur le cœur et la circulation sanguine, des propriétés antitumorales, antipyrétiques, antiépileptiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses, antispasmodiques, diurétiques, antihypertensives, hypocholestérolémiantes, antioxydantes, antidiabétiques, hépatoprotectrices, antibactériennes et antifongiques (Tsaknis et al., 1999).

#### ● Description morphologique du *Moringa Oleifera*:

Le *Moringa oleifera* est un arbre pérenne qui peut atteindre une hauteur de 7 à 12 mètres. Son tronc, généralement droit à un diamètre variant entre 20 et 40 cm, atteignant parfois 3 mètres. Ce qui distingue le système racinaire du *Moringa oleifera* est sa structure tubulaire, composée d'un pivot central capable de pénétrer le sol jusqu'à une profondeur d'environ 1,30 mètre, ce qui lui confère une grande résistance à la sécheresse. À partir de ce pivot central, des racines secondaires se ramifient latéralement pour former une densité de racines importante (Olson, 2001).

#### ● Taxonomie:

*Moringa oleifera* est connue plus généralement dans le monde sous le nom de moringa et elle est appelée aussi Acacia blanc, Ben ailé, moringa ailé, Benzolive, pois quenique, neverdie, Mother's Best Friend, Ne meurt jamais et l'arbre de vie (Fuglie, 2001 ; Lim, 2012). La classification systématique de *Moringa oleifera* est comme suit (Arora et al., 2013) :

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Dillenida
- Ordre : Capparidales
- Famille : Moringaceae
- Genre : *Moringa*
- Espèce : *Moringa oleifera*



**Figure :** Arbre de Moringa Oleifera. (Behnas 2021).

➤ **Annexe 02**

**2. Le colza:**

Le *Brassica napus*, communément appelé colza, est une plante annuelle appartenant à la famille des Brassicacées et est principalement cultivée pour ses graines, qui sont utilisées dans la production d'huiles alimentaires et industrielles. Le tourteau protéique résiduel du colza est également utilisé comme aliment pour le bétail. Des études ont suggéré que le colza serait apparu il y a environ 7 500 ans suite à un croisement interspécifique spontané entre le chou (*Brassica oleracea*) et la navette (*Brassica rapa*) (Gupta et Pratap, 2007; Chalhoub et al., 2014).

L'huile de colza est considérée comme une huile alimentaire de haute qualité, largement recommandée par les nutritionnistes en raison de sa teneur élevée en acides gras insaturés (92 %), notamment en acides linoléiques oméga-3 et 6 (respectivement 9 % et 22 %), reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé (Foster et al., 2009).

● **Description morphologique de colza:**

*Brassica napus* est une espèce annuelle ou bisannuelle (Gulden et al., 2008), appartient à la famille des Brassicacées et est identifiable par ses fleurs jaune fluo qui donnent de petites graines noires riches en lipides (Emilie G, 2020). Ces plants sont relativement grands, allant de 120 à 180 centimètres, avec une racine pivotante longue et fine. Les tiges des plantes sont ramifiées, chaque branche se terminant par un épi allongé (Jack B et al., 2008).

● **Taxonomie:**

Napus est membre de la famille des Brassicacées, qui comprend environ 25 tribus, 338 genres et 3709 espèces (OCDE, 2012). Deux de ces genres, *Brassica* et *Raphanus*, sont largement

cultivés dans le monde pour leurs huiles comestibles, légumes, épices, fleurs ornementales et cultures fourragères (Kaneko et Bang, 2014).

- Règne : Plantes (règne végétal)
- Sous-règne : Trachéobiontes (plantes vasculaires)
- Super-embranchement : Spermatophytes (plantes à graines)
- Embranchement : Magnoliophytes (plantes à fleurs)
- Classe : Magnoliopsides (dicotylédones)
- Sous-classe : Dilléniidées
- Ordre : Capparales
- Famille : Brassicacées (famille de la moutarde)
- Tribu : Brassiceae
- Genre : Brassica L. (moutarde)
- Espèce : *Brassica napus* L. (canola et colza)

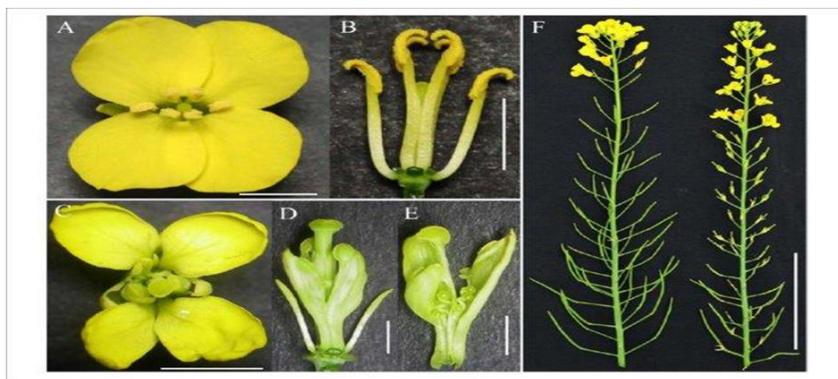


Figure 01 : Fleur de colza *Brassica napus*. (Kang et al., 2017)

annexe 03:

Tableau 01: Matériel non biologique

	type d'appareil	marque
<b>Gros appareils</b>	- Réfrigérateurs.	ENIEM
	- Incubateur (étuve)	memmert
	- micro-onde	Condor
	- four pasteur	memmert
	- autoclave	AESULAP
<b>petit appareils</b>	- microscope	OPTIKA
	- spectrophotomètre	SHIMADZU
	- bec bunsen	/
	- agitateur des tubes	Labinco
	- lampe à UV	Caution
	-balance	sartorius

<b>matériels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- spatule</li> <li>- pince</li> <li>- Anse en platine.</li> <li>- Pipette pasteur</li> <li>- étaloir en verre</li> <li>- Tubes à essai</li> <li>- Flacons en verre.</li> <li>- Bécher.</li> <li>- ballon 2L</li> <li>- Erlenmeyer.</li> <li>- Éprouvette graduée.</li> <li>- Boîtes pétries stériles en plastique</li> <li>- Papier Whatman.</li> <li>- lames et lamelles</li> <li>- microseringues</li> </ul>	
<b>Réactifs et solution</b>	Eau distillée; Alcool (éthanol de 96°) ; Violet de Gentiane ;Solution de Lugol; Fuchsine; Huile à immersion; Solution de KOH ; Eau oxygénée (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 10 volume; Solution de N-diméthyl paraphénylène diamine (oxydase) ;Hypochlorite de sodium 7%. eau physiologique.	

➤ **Annexe 04**

**Tableau06** : représente les milieux de cultures utilisées

<b>Milieu B de King (KB)</b>		<b>Gélose nutritive (GN)</b>	
Peptone (Difco)	20g	peptone	15g
Glycerol (Prolabo)	15ml	extrait de viande	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma)	1.5g	extrait de levure	02g
MgSO <sub>4</sub> (Sigma)	1.5g	Chlorure de sodium	05g
Eau distillée	1000ml	Agar	20g
pH=7.2 autoclavage 20 minutes à 120°C		Eau distillé	1000ml
		pH=7.2 autoclavage 20 minutes à 120°C	

<b>Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)</b>	<b>Milieu LPGA (levure peptone glucose agar)</b>
Pomme de terre                      200g Dextrose                                20g Agar                                        15g Eau distillée                            1000ml pH=7 autoclavage 20 minutes à120°C	Bacto-peptone                        5g Extrait de levure                      5g Glucose                                  10g Agar                                        15g pH=7 autoclavage 20 minutes    à120°C
<b>Milieu API AUX Medium 7 ml</b>	<b>La solution saline à 0.85%</b>
Sulfate d'ammonium                2 g Agar                                        1,5 g Solution de vitamines                10,5 ml Solution d'oligo-éléments        10ml Phosphate monosodique            6,24 g Chlorure de potassium              1,5 g Eau déminéralisée                  1000 ml pH final                                 7,0-7,2	Chlorure de sodium(NaCl)        8.5g Eau distillée                            1000mL  La solution est autoclavée à121°C pendant 15 minutes.

➤ **Annexe 05**

**Tableau 07:** tableau de lecture de la galerie API 20E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β-galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'α-naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

➤ **Annexe 06**

**Tableau 08:** Tableau de lecture de la galerie 20NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			réduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	Zn / 5 min	
				incolore	incolore
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	JAMES / immédiat	
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	bleu à vert	jaune
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase) (ESCuline)	jaune	orange / rose / rouge
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- $\beta$ D-galactopyranoside	0,22	$\beta$ -galactosidase (Para-NitroPhényl- $\beta$ D-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
[GLU]	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABinose)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-AcétYl-Glucosamine)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
[CAP]	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
[PAC]	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

□ Annexe 07 ;

**Tableau 09 :** Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes isolées sur milieu gélose nutritive (GN)

Echantillons	Forme	Contour	Relief	Taille	Aspect	Couleur	Opacité
AFI 1	Circulaire	Irrégulier	Plat	3 mm	Lisse brillante	Blanchâtre	Opaque
AFI 2	Circulaire	régulier	Plat	1 mm	Lisse sèche	Crémeuse	Opaque
AFI 4	Circulaire	régulier	Plat	3mm	Lisse	Crémeuse	Opaque
AFI 6	Circulaire	régulier	Plat	2mm	Rugueux	Blanc sale	Opaque
AFI 7	Circulaire	régulier	Légèrement convexe	1mm	Lisse brillante	Blanc sale	Opaque
AFI 8	Circulaire	irrégulier	Convexe	3mm	Lisse brillante	Blanchâtre	Opaque

AFI 9	Circulaire	irrégulier	Convexe	2 mm	Rugueux	Blanchâtre	Opaque
ASI I	Circulaire	irrégulier	Plat	1 mm	Lisse brillante	Blanc sale	Translucide
ASI B	Circulaire	régulier	Plat	2 mm	Lisse	Jaunâtre	Légèrement translucide
ASI C	Circulaire	régulier	Plat	3mm	Lisse brillante	Jaunâtre	Opaque
ASI D	Circulaire	régulier	Plat	2mm	Lisse brillante	Crémeuse	Opaque
ASI E	Circulaire	régulier	Plat	2 mm	Rugueux	Blanchâtre	Opaque
ASI G	Circulaire	irrégulier	Légèrement convexe	1 mm	Rugueux	Beige	Opaque
ASI H	Circulaire	régulier		2mm	Lisse	Blanchâtre	Opaque
ASI F	Circulaire	régulier	Plat	3mm	Rugueux	Blanc sale	Opaque
ASI J	Circulaire	régulier	Plat	1mm	Rugueux	Blanchâtre	Opaque
ASI L	Circulaire	Irrégulier filamenteux	Plat	1 mm	Lisse brillante	Blanchâtre	Opaque

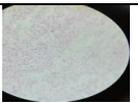
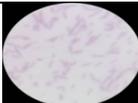
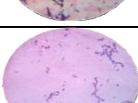
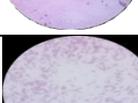
**Tableau 10 :** Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes isolées sur milieu King B.

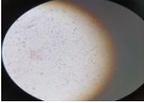
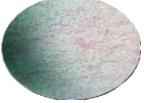
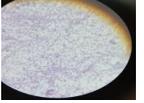
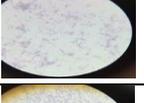
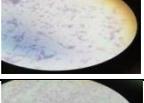
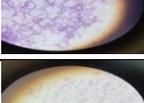
Echantillons	Forme	Contour	Relief	Taille	Aspect	Couleur	Opacité
ASII A	Circulaire	régulier	Légèrement convexe	2 mm	Lisse brillante	Beige	Opaque
ASII B	Circulaire	régulier	Plat	3 mm	Lisse brillante	Jaunâtre	Légèrement translucide
ASII G	Rhizoïde	irrégulier	Légèrement convexe	1 mm	Rugueux	Blanc sale	opaque
ASII H	Circulaire	régulier	Légèrement convexe	1 mm	Rugueux	Beige	Opaque
ASII K	Rhizoïde	régulier	Plat	2 mm	Rugueux	Beige	Légèrement opaque
ASII N	Circulaire	régulier	Plat	1.5 mm	Rugueux	Blanc sale	opaque

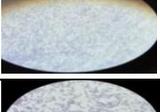
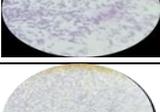
ASII P	Circulaire	régulier	Plat	1 mm	Rugueux	Blanc sale	Opaque
ASII E	Circulaire	régulier	Plat	2 mm	Rugueux	Jaunâtre	opaque
ASII I	Circulaire	régulier	Plat	1 mm	Lisse brillante	Beige	Opaque
AFII 1	Circulaire	régulier	Légèrement convexe	3 mm	Lisse sèche	Marron claire	Translucide
AFII 2	Circulaire	régulier	Légèrement convexe	2 mm	Lisse brillante	beige	opaque
AFII 4	Circulaire	régulier	Plat	2 mm	Lisse brillante	Marron claire	Opaque
AFII 5	Circulaire	régulier	Légèrement convexe	1 mm	Lisse brillante	Blanc sale	Opaque

➤ **Annexe 08**

**Tableau 11** : Résultats de l'examen microscopique des souches bactériennes étudiées après la coloration de gram.

Souches	Forme	Gram	Aspect microscopique
AFI 1	Coccobacille	-	
AFI 2	petite bacille	-	
AFI 4	Bacille	-	
AFI 6	Cocci	-	
AFI 7	Bacille droit	-	
AFI 8	bacille	-	
AFI 9	Petites bacilles isolés	-	
AFII 1	Coccobacille	-	

AFII 2	Petite bacille	-	
AFII 4	Bacilles moyens	-	
AFII 5	Petites bacilles	-	
ASI B	Petits bacilles	+	
ASI C	Bacille	+	
ASI D	Bacille	-	
ASI E	Bacille	+	
ASI G	Bacille	+	
ASI H	Bacilles moyen	-	
ASI F	Petites bacilles	-	
ASI J	Bacilles	-	
ASI L	Bacilles	+	
ASII A	Petites bacilles	-	
ASII B	Bacilles moyens	-	
ASII G	Bacilles moyens En amas ; En palissade.	+	
ASII H	Petites bacilles isolés	-	
ASII K	Colibacilles	-	

ASII N	Bacilles moyens	-	
ASII P	Petites bacilles en amas	-	
ASII E	Bacilles	+	
ASII I	cocci	+	
ASI I	Bacille	+	

➤ **Annexe 09 :**

**Tableau 12 :** Tableau représentant le taux d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe.

Souches	F2	G2	R2F42
AFI 8	0	61.25%	0
AFI 9	0	52.75%	0
AFII 1	0	75.5 %	0
ASI J	0	59.75%	62.5%
ASI B	0	53.75%	0
ASI I	0	55.75%	0
ASII A	65%	60%	0
ASII I	66.5%	63.75%	0
ASI D	87.5%	0	68.75%
ASI H	0	56.25%	62.5%
ASII P	68.75%	0	42.5%
ASII G	65.5%	0	60.25%
ASII B	0	62.25 %	73.5 %

➤ **Annexe 10**

**Tableau 13 :** Tableau représentant le taux de germination

SOUCHES	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10
Témoin	10%	30%	40%	50%	60%	70%	70%
AFI 1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
AFI 2	20%	30%	30%	40%	40%	45%	45%
AFI 4	90%	90%	100%	100%	100%	100%	100%
AFI 6	70%	80%	85%	95%	95%	95%	95%

AFI 7	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
AFI 8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
AFI 9	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
AFII 1	60%	70%	70%	75%	85%	100%	100%
AFII 2	55%	55%	65%	65%	80%	85%	85%
AFII 4	40%	45%	55%	60%	60%	65%	70%
AFII 5	55%	60%	75%	90%	100%	100%	100%
ASI B	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ASI C	70%	75%	75%	80%	80%	80%	80%
ASI D	55%	55%	65%	70%	80%	90%	90%
ASI E	55%	55%	55%	55%	60%	70%	75%
ASI G	90%	95%	100%	100%	100%	100%	100%
ASI H	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ASI F	10%	10%	15%	20%	20%	20%	20%
ASI J	90%	90%	90%	90%	100%	100%	100%
ASI L	50%	60%	70%	90%	100%	100%	100%
ASII A	75%	80%	80%	90%	90%	90%	90%
ASII B	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ASII G	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ASII H	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ASII K	75%	80%	80%	80%	85%	95%	95%
ASII N	60%	70%	80%	90%	100%	100%	100%
ASII P	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ASII E	80%	80%	90%	90%	90%	90%	90%
ASII i	55%	65%	65%	75%	75%	80%	80%
ASI i	80%	90%	90%	90%	100%	100%	100%

**annexe 11:**

**Tableau 14 :** Tableau d'identification biochimique de souches bactériennes isolées à partir du sol de la Moringa.

Souches	Tests	Forme	Catalase	Oxydase
AFI 1		Coccobacille	+	+
AFI 2, AFI 4		Bacille	+	-
AFI 6		Cocci	+	+
AFI 7		Bacille	+	-
AFI 8		bacille	+	+
AFI 9		bacilles	+	+
AFII 1		Coccobacille	+	+
AFII 2, AFII 5		bacille	+	+
AFII 4		Bacilles	+	+

+ est un réaction positive / - est un réaction négative

**Tableau 15 :** Tableau d'identification biochimique de souches bactériennes isolées à partir du sol de la Colza

Tests	Forme	Catalase	Oxydase
Souches			
ASI B	bacilles	-	+
ASI C, ASI G, ASI J, ASI L	Bacille	+	+
ASI D	Bacille	-	+
ASI E	Bacille	+	-
ASI F	bacilles	+	+
ASI H, ASII B, ASII N	Bacilles moyen	+	+
ASII A	bacilles	+	-
ASII G	Bacilles	+	-
ASII H	bacille	+	+
ASII K	Colibacilles	+	+
ASII P	bacille	+	-
ASII E	Bacilles	+	-
ASII I	cocci	+	-