



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun-Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin D'études
En vue de L'obtention du Diplôme de Master Académique
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)
Filière : Microbiologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté Par :

Safa Khadidja

Yanallah Roumaissa

Thème

**Isolement et caractérisation des nouvelles souches PGPRet étude de leurs
effetssur les teneurs en métabolites secondaireschez *Ziziphus lotus***

Soutenu publiquement le : 22/09/2021

Jury:

Présidente :	M ^{me} ZAZOU LAARADJ Khaldia	M.C.B	Faculté SNV
Encadreur :	M ^{me} DAHLIA Fatima	M.C.A.	Faculté SNV
Co-encadreur :	M ^{me} BAROUAGUI Soria	M.C.B.	Faculté SNV
Examineur :	Mr RAHMOUNE Bilal	M.C.A.	Faculté SNV

مهما فتلت حاور من جرد
فالعالم خلق من أجد
العظمة فأرى من أفاض اليأس
فهما فعتت لرفع قلمك
والرسم أمل جرد
والخلق لنفسك القوة والعزم
فلا مجال للاستسلام

Remerciement

Sans le bon Dieu, l'être humain ne vaut rien, celui qui vie dans la bénédiction de Dieu et ne la valorise pas finira par perdre cette bénédiction sans se rendre compte, pour cela et avant tout, il faut remercier Dieu pour toutes les choses utiles à l'être humain et Qui nous rendent la vie agréable. Nous le remercions aussi pour le courage la force et la volonté avec lesquels nous avons pu surmonter les aléas de la vie.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et notre reconnaissance et remerciements à notre promotrice, Mme Dahlia Fatima, qui nous a guidé dans la réalisation et le succès de ce travail mais aussi pour la formation scientifique que nous avons acquise.

Nous remercions notre Co-promotrice Mme Barouagui Soria.

Avec tout le respect, nous adressons nos sincères remerciements à Mr Rahmoune Bilal qui nous a aidé par ses conseils utiles, ses orientations ainsi que son soutien moral et qui nous a donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail et aussi pour accepter d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier la présidente de jury Mme Laredj Zazou Khalida qui a accepté la présidence de ce jury.

Notre gratitude à toutes les équipes des laboratoires «Microbiologie, physiologie végétale, Biotechnologie, Eaux et sol et Technologie alimentaire» pour leurs aides et leurs conseils durant toute la période d'expérimentation.

Nous adressons nos remerciements à tous nos enseignants surtout Mr Hocine l'un des professeurs seniors et une personne responsable qui fait toujours son devoir, nous avons grandement apprécié votre soutien, votre expérience et tout au long notre cursus universitaire.

Un grand merci pour nos collègues de promotion ainsi qu'à toute personne qui a aidé de pré ou loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes **chers parents**, qui n'ont jamais cessé de m'encourager, ce travail c'est le fruit leurs sacrifices.*

Merci d'avoir consistés de mon éducation et ma formation.

*A mes **chers sœurs et frères** qui étaient toujours à côté de moi*

Al'épouse de mon frère.

*A toute **mes petits anges** et mon petite poussine **Roumaissa** que je les aime beaucoup.*

*A mes amis et surtout mes chères copines d'enfance **Meriem, Chahra et Saliha.***

*A ma cher amie et partenaire **Romi** et sa famille.*

Khadidja

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes **chers parents**, qui m'ont donné l'amour et la joie de vivre et qui ont toujours cru en moi, je souhaite qu'ils soient toujours fiers de moi.*

*A **mes chers frères**, qui me soutiennent toujours : **Amine, Ali, Adel**, ma belle-sœur **Khadidja** et ma nièce qui arrivera prochainement.*

*A ma deuxième famille, famille de **Mohamedi**, qui ont toujours donné moi l'amour et la tendresse familiale.*

*A ma chère copine d'enfance : **Lydia**.*

*A ma chère copine et binôme : **Khadidja**.*

*A mes chères copines : **Meriem, Salihayet Chahra**.*

A tous mes amis.

A toute ma famille.

Roumaissa

يشجع مجال الجذور على تطوير ونشاط مجتمع ميكروبي ضخم ومتنوع ، بما في ذلك الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تعزيز نمو النبات (PGPR). من بين هذه الأخيرة، تستعمر البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات، وتحسن نمو النبات من خلال آليات مباشرة وغير مباشرة ، وبالتالي هناك علاقة تكافلية بين الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تعزيز النمو والنباتات. من بين هذه النباتات التي اخترناها نباتات السدر ، وهو نبات طبي له آثار مفيدة على صحة الإنسان.

في سياق عملنا ، قمنا بتحليل نوعين من البيانات. النوع الأول من البيانات يعتمد على عزل والتوصيف المورفولوجي والكيميائي للبكتيريا الجذرية المعزولة من تراب جذور نبات السدر في منطقة بولاية تيارت تسمى مغيلة.

في النوع الثاني من البيانات، حاولنا دراسة آثار PGPR على النمو وتأثيرها على المستقلب الثانوي (البوليفينول الكلي، الفلافونويد و التانان) أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن جميع السلالات البكتيرية المعزولة من تراب جذور نبات السدر في منطقة مغيلة هي بكتيريا قادرة على تعزيز نمو النبات (PGPR) تنتمي إلى الأصناف التالية : Staphylococcus (R) و Acinetobacter (K) و Bacillus (S₆) و Pseudomonas (P) و Paenibacillus (B). للأسف بسبب تعفن السلالات البكتيرية بفطريات مختلفة في المختبر لم نتمكن من مواصلة العمل للحصول على باقي النتائج.

الكلمات المفتاحية: المنطقة حول الجذور، PGPR، السدر، العزل، التوصيف، الايض الثانوي.

Résumé

La rhizosphère favorise le développement et l'activité d'une communauté microbienne immense et diversifiée, dont des micro-organismes capables de favoriser la croissance des plantes. Parmi ces derniers, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) qui colonisent les racines des monocotylédones et des dicotylédones, et améliorent la croissance des plantes par des mécanismes directs et indirects donc il existe une relation entre les PGPR et les plantes. Parmi ces plantes on a choisie travailler sur le *Ziziphus lotus* qui est une plante médicinale qui a des effets bénéfiques sur la santé humaine.

Dans le cadre de notre travail, nous avons analysé deux types de données. Le premier type de données basé sur l'isolement et caractérisation morphologique et biochimique des rhizobactéries isolées à partir de la rhizosphère du *Ziziphus lotus* de la région Mghila de la wilaya de Tiaret.

Dans le deuxième type de données, nous avons essayé d'étudier les effets des PGPR sur la croissance et leur effet sur la production de métabolites secondaires (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) chez *Ziziphus lotus*.

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches bactériennes, isolées de la rhizosphère du jujubier spontané de la région de Mghila, sont des PGPR appartenant aux genres: Staphylococcus (R), Acinetobacter (K), Bacillus (S₆), Pseudomonas (P) et Paenibacillus (B). Malheureusement, à cause de problèmes de contamination des souches bactériennes par des champignons au laboratoire, on a pas pu achever l'essai.

Mots clé : Rhizosphère, PGPR, *Ziziphus lotus*, Isolement, Caractérisation ; Métabolites secondaires.

Abstract

The rhizosphere supports the development and activity of a huge and diverse microbial community, including microorganisms capable of promoting plant growth. Among these, the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) which colonize the roots of monocots and dicots, and improve plant growth by direct and indirect mechanisms, thus there is a relationship between PGPR and plants. Among these plants we chose *Ziziphus lotus*, which is a medicinal plant with beneficial effects on human health.

In our work, we analyzed two types of data. The first type of data based on the isolation and morphological and biochemical characterization of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of *Ziziphus lotus* of the region Mghila of the wilaya of Tiaret. In the second type of data, we tried to study the effects of PGPR on growth and their effect on secondary metabolite (total polyphenols, flavonoids and condensed tannin) in *Ziziphus lotus*.

The obtained results showed that all the bacterial strains isolated from the rhizosphere of spontaneous jujube of the region Mghila are PGPR which belong to the genus Staphylococcus (R), Acinetobacter (K), Bacillus (S₆), Pseudomonas (P) et Paenibacillus (B). Unfortunately, because of the contamination of bacterial strains by fungus, we were unable to continue the experiments.

Key words: Rhizosphere, Plant, PGPR, *Ziziphus lotus*, Isolation, Characterization, Secondary metabolites.

Liste des abréviations

AIA : acide indole-acétique.

CaCO₃ : carbonate de calcium.

CFU : colonie formant unité

DO : densité optique.

ED : eau distillé.

EDS : eau distillé stérile.

K₂HPO₄ : hydrogénophosphate de potassium.

K₂SO₄ : sulfate de potassium.

MgSO₄ : sulfate de magnium.

NPG:nodulating promoting rhizobacteria.

PGPR : plantgrowthpromotingrhizobacteria.

Liste des figures

Figure 1 : Zone d'étude prospectée pour la collecte des fruits, feuilles et racine du jujubier. ...	6
Figure 2 : Préparation des solutions.	7
Figure 3 : Ensemencement des souches bactériennes.	7
Figure 4 : Coloration de Gram.	9
Figure 5 : Test d'indole.	9
Figure 6 : Test de catalase.	10
Figure 7: Test fixation d'azote.	10
Figure 8 : Germination des graines de <i>Ziziphus lotus</i>	11
Figure 9: Inoculation bactérien des graines germées de <i>Ziziphus lotus</i>	12
Figure 10: Observation morphologique des souches bactériennes isolées après la purification sur le milieu King B..	15
Figure 11: Observation microscopique des isolats sous le microscope optique ($\times 100$)..	16
Figure 12: Réaction positif de test l'indole.	17
Figure 13 : Test positif de catalase chez toutes les souches bactériennes isolées.....	18
Figure 14 : Croissance des isolats dans le milieu Ashby avec mannitol. A: Sans sucre ; B: Avec mannitol avec le sucre.....	19
Figure 15: Réaction de la fixation de l'azote dans les deux milieux.....	19
Figure 16: Contamination par les champignons.....	20

Liste des tableaux

Tableau 1: Matériel, produits et réactifs utilisés aux laboratoires pour la réalisation des différentes expérimentations.	5
Tableau 2 : Caractères morphologiques des cinq souches isolées.	14
Tableau 3: Caractérisation biochimique des cinq souches bactériennes isolées.....	16

Table des matières

Remerciement.....	i
Dédicace.....	ii
Résumé.....	iv
Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Table des matières.....	viii
Introduction.....	1
Partie expérimentale.....	5
Chapitre 1 : Matériel et Méthodes.....	5
1. Objectif du travail.....	5
2. Matériel.....	5
2.1. Matériel utilisé aux laboratoires.....	5
2.2. Matériel microbiologique.....	5
2.3. Matériel végétal.....	6
3. Méthodes.....	6
3.1. Zone d'étude.....	6
3.2. Démarche expérimentale.....	6
3.2.1. Prélèvement et isolement des échantillons.....	6
3.2.2. Ensemencement et incubation.....	7
3.2.3. Sélections des souches bactériennes.....	7
3.2.4. Identification et caractérisation des PGPR.....	8
3.2.5. Effet de PGPR sur métabolite de <i>Ziziphus lotus</i>	11
Chapitre 2 : Résultats et discussions.....	14
1. Caractérisation et identification des PGPR.....	14
1.1. Identification phénotypique des souches bactériennes.....	14
1.2. Caractérisation biochimique des souches bactérienne isolées.....	16
1.2.1. Test d'indole.....	16
1.2.2. Test de catalase.....	17
1.2.3. Fixation de l'azote.....	18
1.2.4. Solubilisation du zinc.....	19
2. Identification des souches bactériennes.....	20

3. Test de l'efficacité des souches isolées	20
4. Discussion	21
Conclusion.....	24
Références Bibliographiques.....	26
Annexes	

Introduction

Les plants méritent qu'on s'intéresse à elles pour plusieurs raisons, en effet, ce sont des formes de vie surprenantes et fascinantes qui transforment et améliorent nos vies. Les plantes sont présentes dans tous les aspects de la civilisation humaine : les restes des photosynthétiques sont à l'origine de tous les combustibles fossiles ; les plantes permettent la production d'aliments et médicaments ; leurs fibres servent à la fabrication de vêtements ; le bois est une source d'énergie ainsi qu'un matériau de construction (Nabors, 2008).

En résumé, les plantes rendent la vie sur terre possible, à l'instar d'autres organismes synthétiques, les plantes sont des récepteurs solaires biologiques qui emprisonnent l'énergie solaire. Au cours de la photosynthèse, elles produisent la quasi-totalité de l'oxygène et des aliments de la planète Terre. Elles synthétisent toutes les molécules organiques de structure, qui sont modifiées et recyclées par des organismes non photosynthétiques dans tous les réseaux trophiques (Nabors, 2008).

Parmi les plantes, il y a celles qualifiées comme plantes médicinales et qui sont des plantes possédant une activité pharmacologique à usage thérapeutique. Cette activité est due à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain. Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie, ainsi que dans la confection des boissons, soit nature, soit en préparations galéniques, soit encore sous forme de principes actifs pour obtention de médicaments (Naghbiet *al.*, 2005).

Depuis l'aube de l'humanité, les plantes ont été les alliées des hommes pour leur nourriture et aussi pour se soigner, pour remédier aux diverses maladies. Les premières connaissances sur l'usage des plantes sauvages semblent avoir été inspirées par l'observation des comportements animaux : ceux-ci ayant recours à certaines plantes, seulement lorsqu'ils sont malades. Puis, la longue acquisition d'une bonne connaissance par les hommes des effets des plantes disponibles dans leur environnement s'est faite surtout de façon empirique, quelquefois par l'intuition de certains hommes-médecine (Coquert, 2017).

Les plantes médicinales ont fait l'objet de beaucoup d'étude grâce aux principes actifs qui diffèrent d'une plante à une autre créant ainsi une biodiversité remarquable. Plus de cinq mille substances médicinales naturelles différentes ont été identifiées (Farombi, 2003).

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent

une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Jay, 2005).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par des plants autotrophes, ils sont divisés principalement, en trois grandes familles : polyphénols, terpènes et alcaloïdes (Lutge 2002, Abderrazak et Joël 2007)

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires pour leur défense et leur survie (Tremblin, 2009) Le métabolisme secondaire joue un rôle écologique majeur dans les interactions des organismes avec leur environnement (Lvanisevic, 2011). Les métabolites secondaires jouent des rôles importants dans les réponses de défense des plantes aux agents pathogènes (Sinmon, 2009).

Parmi les plantes médicinales riches en métabolites secondaire, on a choisi de travailler sur le jujubier spontané (*Ziziphus lotus*) qui appartient au genre *Ziziphus* de la famille des Rhamnacées et l'ordre des Rhamnales. Le jujubier est décrit comme un arbuste épineux et sarmenteux, un buisson ou petit arbre de 1,5 à 2 m de haut. Le jujubier est utilisé en pharmacopée traditionnelle et dans l'alimentation des populations (Doumbia, 2008).

Les recherches actuelles sur les différentes activités pharmacologiques de *Ziziphus lotus* ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine moderne. Les flavonoïdes et les saponines de l'écorce des racines du *Ziziphus lotus* ont montré une activité anti-inflammatoire significative (Chouchane, 2006). Le *Ziziphus lotus* inhibe la production de monoxyde d'azote (No), cette activité apparait potentiellement avec l'extrait méthanolique de l'écorce des racines qui est la source possible de l'agent anti-inflammatoire dans la réaction de l'hypersensibilité retardée induite par oxazolone. Les feuilles du *Ziziphus lotus* possèdent des effets analgésiques attribués à leur contenu en principes actifs (les flavonoïdes et les saponines), toutes ces activités confirment l'usage traditionnel de cette plante dans certaines maladies inflammatoires et douloureuses (Borgi, 2007). Les feuilles, l'écorce des racines de *Ziziphus lotus* possède une importante activité antiulcérogénique attribuées à la présence des tanins et des flavonoïdes connus par leurs effets gastro protecteur (Borgi *et al*, 2007).

Le métabolisme secondaire est une exclusivité du monde végétal. Les produits qui en résultent ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante. Ils sont fournis en très faible quantité, pour avoir une meilleure quantité nous cherchons des méthodes permettant la stimulation de ces métabolites secondaires.

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des produits naturels et des métabolites secondaires, qui ont montré un grand potentiel dans le traitement des maladies humaines.

Les teneurs en ions nitrates et phosphate ont également une influence sur la production de métabolites secondaires par des cultures de cals ou des suspensions cellulaires (Cresswell et al., 1989) la biosynthèse des métabolites secondaires, bien que contrôlée génétiquement, est fortement affectée par des facteurs climatiques et environnementaux (Briakin, 2000). Certaines souches de rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes (PGPR) ont la capacité à déclencher le métabolisme défensif et donc le métabolisme secondaire (Javier *et al.*, 2012).

Les micro-organismes du sol se développent le plus souvent sur les surfaces des particules de sols, habituellement au niveau de la rhizosphère, plusieurs types de micro-organismes différents peuvent y être présents (Martinko., 2007).

Dans la rhizosphère les microorganismes peuvent être libres ou étroitement associés aux racines, l'association la plus stricte étant celle de la symbiose qui caractérise d'une part les relations entre les légumineuses et les rhizobiacées, bactéries fixatrices de l'azote et d'autre part les relations entre glomales, champignons formant des mycorhizes avec de très nombreuses espèces végétales. (Aladoubvette et Christelle, 2019).

On a souvent constaté que de nombreuses populations bactériennes de la rhizosphère exercent un effet positif sur la croissance des plantes, leur vigueur et leur résistance aux parasites. On les qualifie, d'une manière très générale, de « Rhizobactérie promotrice de la croissance végétale » ou PGPR (Matthey et Gobat, 2010). Ces bactéries apportent une contribution spécifique à l'agriculture en aidant à la protection de certains produits agricoles (Singleton, 2012). Leurs modes d'action sont très variés (Matthey et Gobat, 2007). Elles-mêmes sont très variées et elles appartiennent à plusieurs genres incluant *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Gluconacetobacter*.

Certaines PGPR produisent des effets bénéfiques sur la croissance des plantes en présence des pathogènes ou d'un rhizobium. Ces modes d'action indirects sont généralement attribuables à la compétition, à la production d'antibiotiques et à la détoxification de milieu. D'autres PGPR stimulent la croissance des plantes en l'absence de pathogènes. Ces effets directs regroupent les accroissements de la masse aérienne et racinaire, les elongations racinaires, et les levées accélérées des plantules. Ces augmentations s'expliquent

généralement par de meilleurs prélèvements et assimilation des éléments nutritifs par la plante, la protection de phytohormones et le développement de résistance induite chez les plantes(Beauchamp, 1993).

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

1. Objectif du travail

Cette étude contribue à isoler et identifier des nouvelles souches de PGPR et étudier leurs effets sur les teneurs de métabolites secondaires chez *Ziziphus lotus*.

Le travail a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie et de physiologie végétale de la faculté des sciences de la nature et de la vie-Tiaret, pendant une durée comprise entre le 12 Avril et le 15 juillet 2021.

2. Matériel

2.1. Matériel utilisé aux laboratoires

Le tableau suivant contient le matériel et appareillage nécessaire pour réaliser cette expérience.

Tableau 1: Matériel, produits et réactifs utilisés aux laboratoires pour la réalisation des différentes expérimentations.

Appareillage	Agitateur magnétique, agitateur secoueur, autoclave, bain Marie, balance, bec bunsen, chambre de culture, microscope, réfrigérateur, spectrophotomètre, étuve, pH mètre et vortex.
Verrerie	Barreau magnétique, Béchers, éprouvette graduée, flacons, lames et lamelles, mortier, pissette, boîtes de Pétri, micropipette, pince, pipettes Pasteur, spatule, tubes à essai, verre de montre
Produits chimiques	- Agar, alcool, carbonate de calcium (CaCO_3), chlorure de sodium (NaCl), eau de javel, eau distillée, glucose, H_2O_2 , hydrogènephosphate de potassium (K_2HPO_4), mannitol, peptone de caséine, oxyde de Zinc, réactif Kovac, sulfate de potassium (K_2SO_4), sulfates d'ammonium, sulfate de magnésium (MgSO_4).
Milieux de cultures	- Bouillon de Tryptone, milieu Ashby sans Azote, milieu spécifique pour la solubilisation de Zinc, King B.
Colorants	Fushine, violet de gentiane, lugol.

2.2. Matériel microbiologique

Cinq souches bactériennes (PGPR) ont été utilisées durant notre étude. Elles ont été isolées à partir de sol de la rhizosphère de Jujubier de Mghila-Tiaret.

2.3. Matériel végétal

Les grains de jujubier sauvage récolté au mois de septembre 2021 de la région de Mghila ont été utilisés pour l'obtention des jeunes plantules.

3. Méthodes

3.1. Zone d'étude

La région de Mghila est localisée au nord de la wilaya de Tiaret à une altitude de 463 m, une latitude de 1,4137 N et une longitude de 35,5964 N (Fig. 1). Elle est caractérisée par un climat méditerranéen avec un été chaud.

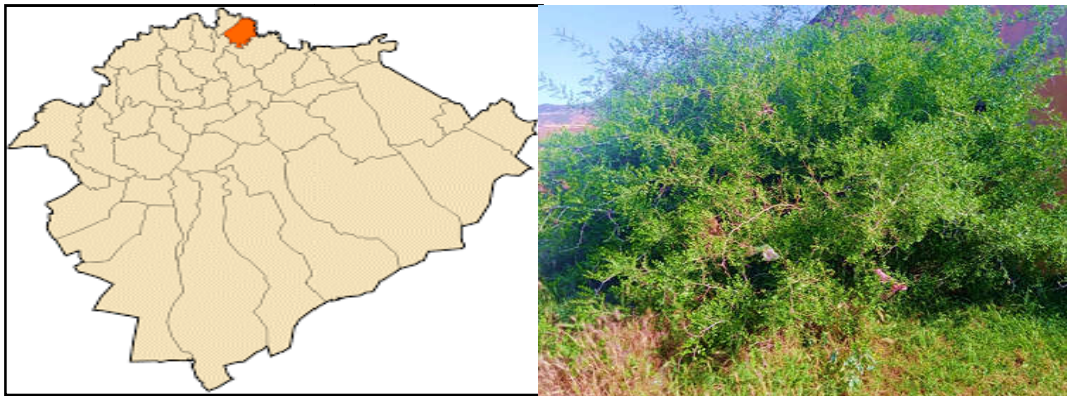


Figure 1 : Zone d'étude prospectée pour la collecte des fruits, feuilles et racine du jujubier.

(Sources : la carte: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Meghila>; b) l'arbuste de jujubier : photo originale prise le 22 Avril 2021).

3.2. Démarche expérimentale

3.2.1. Prélèvement et isolement des échantillons

L'échantillon est prélevé à partir du sol rhizosphérique du jujubier spontané (*Ziziphus lotus* L. Desf.). L'isolement et prélèvement a été effectué selon la méthode décrite par Kushwaha *et al.* (2013).

On a creusé d'abord la zone autour des racines du jujubier jusqu'à atteindre les racines. Tenant compte autant que possible de la précaution de toute contamination, on a prélevé une quantité du sol rhizosphérique avec des gants stérile et le mettre dans des pots stériles.

Les échantillons ont été transféré au laboratoire du science du sol où 10 g de chaque échantillon de sol rhizosphérique ont été dissous dans des flacons qui contient 90 ml d'eau distille stérile sous agitation rotative à 150 tr/min (tour par minute) pendant 20 minutes. Une série de dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7}) ont été effectués pour chaque échantillon.



Figure 2 : Préparation des solutions.

3.2.2. Ensemencement et incubation

Le milieu de culture qui a été utilisé pour permettre la croissance des isolats dans les différents tests décrit dans cette étude est le King B. C'est un milieu spécifique pour différenciation des bactéries..

Des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture King B ont été ensemencés avec 0,1 ml de chaque dilution (Fig. 3) puis incubés dans l'étuve pendant 72 heures à une température de 28 °C.

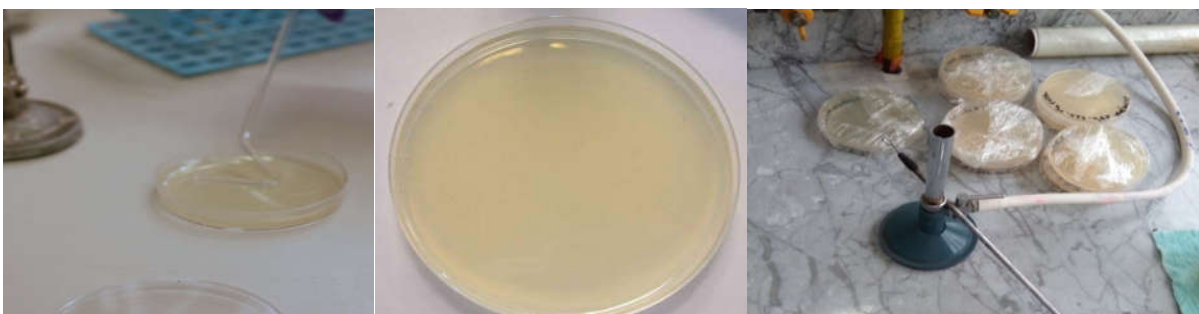


Figure 3 : Ensemencement des souches bactériennes.

3.2.3. Sélections des souches bactériennes.

Après 72 heures, la croissance bactérienne est remarquable cinq souches bactériennes ont été bien isolées, prélevée et ré-strie sur le milieu de culture King B de même méthode

comme précédemment. Les souches ont été nommées K, R, P, B et S₆. Pour assurer la pureté des souches, ce processus a été répété 5 fois.

3.2.4. Identification et caractérisation des PGPR

Après l'isolement des Cinq souches (B, K, R, P, S₆), des caractérisations macroscopiques, microscopiques et biochimiques ont été réalisées.

» Caractérisation macroscopique

Après 3 jours d'incubation des bactéries, les cinq isolats ont présenté des différences caractéristiques des colonies telles que la forme des colonies (rondes, irrégulières...), la chromogène (couleur de la colonie), la surface des colonies (lisse, rugueuse, sèche, ou dentelée).

» Caractérisation microscopique

La coloration de Gram est une coloration différentielle permet de diviser les bactéries en deux groupes : Gram+ (bien colorées en violet) et Gram- (colorées en rose). Avec la détermination de la forme (bacille, coccobacille, coque), la taille, et le mode de regroupement (en amas, en chaînette, isole, diplocoque ou diplobacille). L'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes (Denis *et al.*, 2007).

Un frottis bactérien a été réalisé par dépôt d'une goutte d'eau distillée sur une lame de verre, prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée et dissociation soigneuse de l'inoculum dans la goutte d'eau et laisser sécher.

La préparation a été fixée à la flamme, séchée soigneusement puis laissée refroidir. La lame a été immergée dans la solution de Cristal Violet pendant 1 min puis a été lavée avec l'eau. La lame a été, par la suite, immergée dans du Lugol pendant 1 min en agitant et puis elle a été lavée à nouveau avec de l'eau.

La préparation a été décolorée dans l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette et puis a été lavée avec de l'eau. A nouveau, la préparation a été colorée avec la solution de safranine diluée pendant 20 à 30 secondes, a été lavée avec l'eau et a été séchée à l'air (figure 07). L'ensemble, recouvert d'une lamelle, a été observé sous microscope optique à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile (Fig. 4).



Figure 4 : Coloration de Gram.

» **Caractérisation biochimique**

a) Test d'indole

Les isolats ont été inoculés dans des tubes à essai contenant un bouillon tryptone. Ensuite, les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 48 h. Après incubation, quelques gouttes de réactif Kovac ont été ajoutées aux tubes. L'apparition d'un anneau rouge cerise dans la couche supérieure indique que le test est positif alors que, son absence indique le que test est négatif (Fig. 5).



Figure 5 : Test d'indole.

b) Test de catalase

Les souches bactériennes ont été examinées pour leur activité catalase selon la méthode de Lévy et al. (1992). Des cultures bactériennes fraîches ont été transférées sur une lame en verre, puis une quantité appropriée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 3% a été ajouté sur les lames. La formation de bulles d'aires en 10 secondes confirme que la souche à une activité catalase (Fig. 6).



Figure 6 : Test de catalase.

c) Fixation d'azote

Afin de sélectionner les bactéries fixatrices d'azote, un test a été réalisé selon la méthode décrite par (Rodge, 2016), les isolats ont été striés sur le milieu gélosé Ashby stérile, sans mannitol (ne contient aucune source d'azote), et incubés dans l'étuve à 25 °C pendant 48 heures. La croissance des bactéries sur ce milieu de culture indique leurs capacités de fixer l'azote atmosphérique (Fig. 7).



Figure 7: Test fixation d'azote.

d) Solubilisation du zinc

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (Goteti *et al.*, 2013). Les isolats ont été striés sur le milieu gélosé stérile contenant l'Oxyde de zinc (ZnO) insoluble comme seule source de zinc, puis ils ont été incubés à 30°C pendant 72h. La formation d'une zone claire autour des colonies bactériennes indique la solubilisation du Zinc par ces bactéries.

3.2.5. Effet de PGPR sur *Ziziphus lotus*

» Germination

La surface des graines de jujubiera étéstériliséepar trempage des graines dans l'eau de javel pendant 4 minutes. Ces derniers ont été rincées abondamment avec l'eau distillée stérile 5 fois pendant 4 minutes à chaque fois.

Les graines désinfectées ont été dispersées dans les boites de Pétri contenant de papier filtre humidifié avec l'eau distillé. Les boites de Pétri contenant les graines de jujubier ont été par la suite incubées à 35°C (Fig. 8).

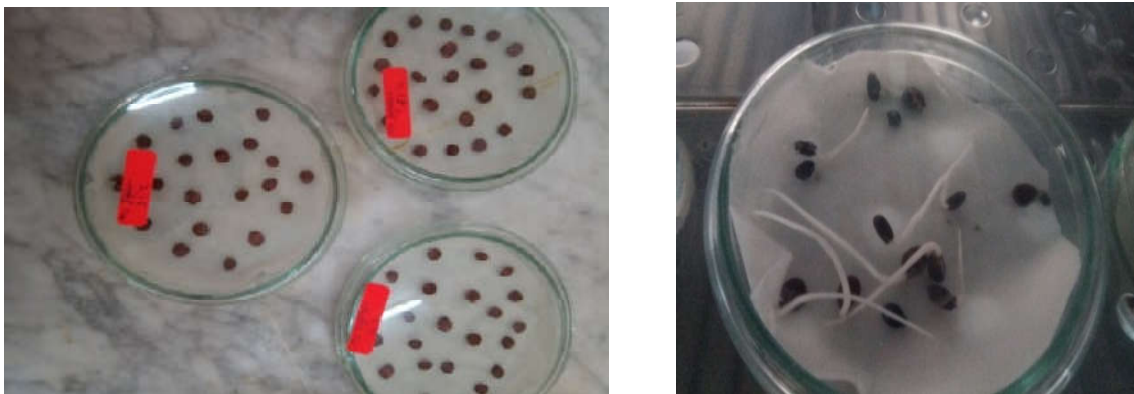


Figure 8 :Germination des graines de *Ziziphus lotus*.

» Préparation d'inoculum

Les souches rhizobactériennes isolées ont été cultivées individuellement sur le milieu deculture King B. Après 48h d'incubation à 22°C, les cultures bactériennes ont été collectées et chaque boite a été raclée à l'aide d'un étaleur stérile dans 10 ml d'eau distillée stérile. La densité optique des suspensions bactériennes initiales a été d'abord déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 360 nm, l'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible ou bien de milieu de culture liquide King B s'il est trop fort jusqu'à atteindre une concentration de 10^{-6} à 10^{-7} cfu/ml⁻¹

» Inoculation des graines de jujubier

Les graines germées ont été immergés dans cinq erlenmeyers de 200 ml contenant des suspensions bactériennes sélectionnées promotrices de la croissance (K, R, P, B et S₆), pendant 2 heures.

Le semis des graines a été ensuite réalisé dans des pots en plastique de 10 cm de hauteur, contenant du sol stérile humidifié. Les lots ont été organisés en six lot. Les cinq premiers, ont été inoculé chacun par une souche de PGPR (K, R, P, B et S₆) et le sixième lot est considéré comme témoin négatif ne contenant aucun inoculum (Fig. 9).

Les lots ont été ensuite incubés dans une chambre de culture à 35°C avec une photopériode de 16 heures de lumière par jour. Ils ont été arrosés quotidiennement avec de l'eau. 15 jours après le semis, un rappel bactérien sur les plants inoculés a été procédé, chaque pot a été arrosé avec un volume de 13 ml des suspensions bactériennes de chaque souche.



Figure 9: Inoculation bactérien des graines germées de *Ziziphus lotus*.

» **Paramètres mesurés**

Les paramètres qui devraient se mesurer portent sur des paramètres de croissance (Longueur des racines, hauteur des tiges, poids des biomasses aériennes et racinaires fraîches et sèches et le nombre des feuilles par plante) et des teneurs en certaines métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes et tanins condensées). Malheureusement, on n'a pas pu mesurer ces paramètres à cause de la contamination des souches bactériennes par des champignons phytopathogènes, principalement par *Rhizopus* sp. Dans la suite de cette partie matériel et méthode, on va présenter comment devrait se réaliser les protocoles expérimentaux qu'on n'a pas pu faire en réalité.

a) Paramètres de croissance

Toute la partie qui s'étale du collet jusqu'à la coiffe et toute la partie qui s'étale du collet jusqu'au sommet de la plantule devrait être mesurées à l'aide d'un double décimètre.

Les poids des biomasses aériennes et racinaires fraîches et sèches des feuilles et des racines devraient être déterminés par une balance de précision.

Les feuilles développées devraient être comptées.

b) Détermination des teneurs en composés phénoliques**» Préparation des extraits aqueux**

Les extraits aqueux se préparent selon la méthode décrite par Younesi et Zadah(2002) à partir des feuilles et des racines sèches et broyées de *Ziziphus lotus*.

Une macération aqueuse s'effectue à partir 50g de poudre des feuilles ou de racines du *Ziziphus lotus* mélangés avec 500 ml d'eau distillé et placés sur un agitateur magnétique pendant 72 h. Après filtration sur papier filtre, le filtrat se prête aux dosages.

» Dosage de polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Ziziphus lotus* s'effectue selon la méthode basée sur l'utilisation du Folin-ciocalteu (Wong *et al.*, 2006). 200 µl de l'extrait s'ajoute à 1 ml du réactif de Folin-ciocalteu, après 4 min, 800 µl de Na₂CO₃ s'ajoutent avec agitation. A la fin, l'ensemble est incubé à l'ombre pendant 2h et à la température ambiante. L'absorbance est lue à 765 nm par un spectrophotomètre.

» Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes se fait selon la méthode décrite par (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1978). 1ml d'échantillon est ajouté à 1ml de la solution d'AlCl₃. Après 10min, à longueur d'onde égal 430nm l'absorbance est lue.

» Dosage de tanins condensés

La méthode à la vanilline décrite par (Deshpande *et al.*, 1986) est utilisée pour le dosage des tanins condensés. Pour 400 µl de l'échantillon, 3ml d'une solution de vanilline et 1.5ml d'acide hydrochlorique concentré sont ajoutés. Après incubation pendant 15min, l'absorbance est lue à 500nm.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

Les bactéries du sol sont très importantes dans les cycles biogéochimiques et sont utilisées pour la production végétale depuis des décennies. Les interactions plantes-bactéries dans la rhizosphère sont les déterminants de la santé des plantes et de la fertilité du sol. Les bactéries du sol vivant librement et bénéfiques à la croissance des plantes, généralement appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), sont capables de favoriser la croissance des plantes en colonisant leurs racines. Les PGPR sont également appelées rhizobactéries favorisant la santé des plantes (PHPR) ou rhizobactéries favorisant les nodules (NPR). Elles sont associées à la rhizosphère, qui est un environnement écologique important du sol pour les interactions plantes-microbes (Rifate *et al.*, 2010).

1. Caractérisation et identification des PGPR

L'objectif de cette étude est de caractériser des rhizobactéries potentiellement promotrice de la croissance végétative à travers des tests morphologiques, biochimiques et culturelles des souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de *Ziziphus lotus* en provenance de la région Mghila -Tiaret. Cinq souches ont été isolées et ont été nommées K, R, B, P et S₆.

1.1. Identification phénotypique des souches bactériennes

Les méthodes macroscopique et microscopique comprennent des techniques standardisées permettant la détermination des caractéristiques morphologiques des bactéries. Les tests effectués sont basés sur les critères classiques utilisés dans les schémas d'identification pratiques dans la plupart des laboratoires microbiologie (Denis *et al.*, 2007). Le tableau 2 résume tous les caractères morphologiques des cinq souches isolées.

Tableau 2 : Caractères morphologiques des cinq souches isolées.

Isolats	Marge	Couleur	Forme	Odeur	Réaction de gram	Mode de regroupement
Souche K	Lisse	Blanche	Coccobacille	-	Négative	Irréguliers
Souche R	Lisse	Orange	Coque	+++	Positive	Irréguliers et régulière
Souche B	Lisse	Blanche	Bacille	-	Positive	Irréguliers
Souche P	Lisse	Crème	Bacille	-	Négative	Régulières
Souche S ₆	Lisse	Crème	Bacille	+++	Positive	Irrégulières

L'observation macroscopie des colonies bactériennes isolées à partir de rhizosphère de *Zizyphus lotus* à révéler différents types de colonies aux caractéristiques similaires pour quelques-unes et relativement variables pour d'autres.

Tous les isolats présentent des colonies bactériennes d'une surface lisse (Fig. 10), cependant nous avons observé une variation dans la taille des colonies (petites ou moyennes) et dans leurs couleurs (blanche, crème ou orange).

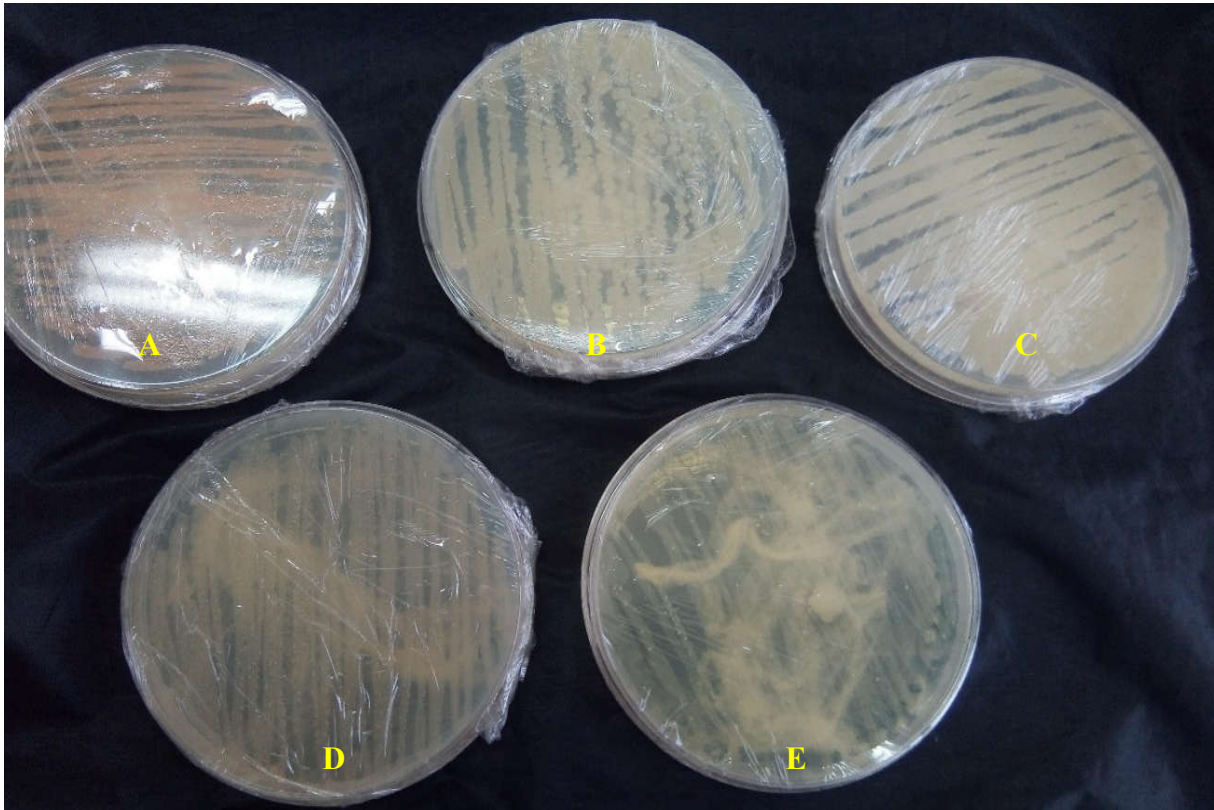


Figure 10: Observation morphologique des souches bactériennes isolées après la purification sur le milieu King B. (A) : La souche R, (B) : la souche K, (C) : La souche B, (D) : la souche S₆ et (E) : La souche P.

L'odeur et l'aspect des colonies observées sur la boîte de culture permettent dans certains cas d'orienter l'identification vers un groupe de bactérie.

L'observation microscopique, à partir de la coloration de Gram, nous a permis de différencier les bactéries selon leurs formes (bacille, coccobacille, coque), et leur affinité pour les colorants (Fig.11). Les bactéries à Gram positif se caractérisent par une couleur violette. Quant aux bactéries à Gram négatif, elles sont identifiées par une couleur rose.

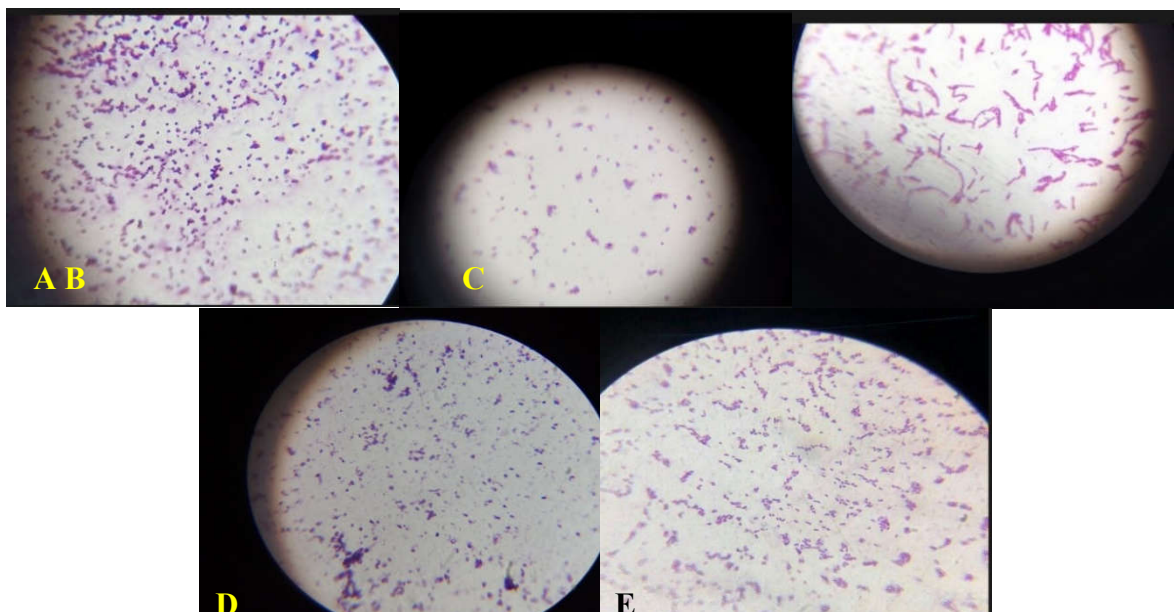


Figure 11: Observation microscopique des isolats sous le microscope optique ($\times 100$). (A) : La souche R, (B) : La souche K, (C) : La souche B, (D) : La souche S_6 , (E) : La souche P.

1.2. Caractérisation biochimique des souches bactérienne isolées

Les résultats de la caractérisation biochimique, obtenus pour les cinq souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de *Ziziphus lotus* de la région de Mghila-Tiaret, sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3: Caractérisation biochimique des cinq souches bactériennes isolées.

La souche bactérienne	Teste Indole	Teste de catalase	Fixation d'azote	Solubilisation de zinc
Souche R	+	+	+	Contamination par champions.
Souche K	+	+	+	Contamination par champion.
Souche B	+	+	+	Contamination par champions.
Souche S_6	+	+	-	Contamination par champions.
Souche P	+	+	-	Contamination par champions.

1.2.1. Test d'indole

Les PGPR peuvent contribuer à l'amélioration du développement des végétaux, avec la production de différentes phytohormones dont l'auxine (Kloepper, 1978). Cette hormone représentée principalement par l'acide indole-acétique (AIA), est une hormone de nature acide faible commune, mais aussi, un produit du métabolisme L-tryptophane qui stimule l'élongation cellulaire et la dominance apicale, favorise l'initiation des racines

adventives, favorise la fructification et la germination des graines et prévient l'abscission des feuilles (Labidi, 2017)

La production de l'acide indole-acétique a été détectée chez plus de 80% des bactéries en provenance de la rhizosphère. Cependant, la documentation de la production de l'acide indole-acétique par les bactéries Gram positive est rare (Shahab, 2011). Parmi les espèces bactériennes capables de produire l'acide indole-acétique, on retrouve les genres *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, Entérobactérie et *Bacillus* (Yuan *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus dans notre essai ont montré que toutes les souches bactériennes, isolées de la rhizosphère du *Ziziphus lotus* de la région Mghila-Tiaret, ont réagi positivement avec ce test par la formation des anneaux rouges après l'ajout de réactif Kovac (Fig. 12)

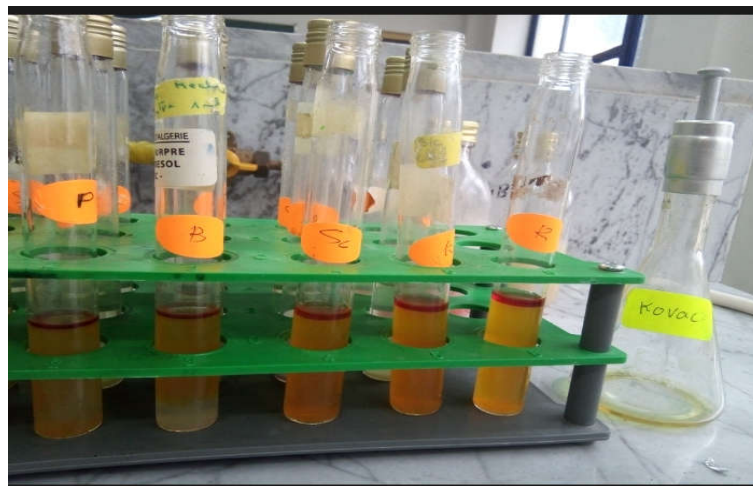


Figure 12: Réaction positif de test l'indole.

1.2.2. Test de catalase

L'activité catalase est un trait important des bactéries car elle les aide à se protéger contre le peroxyde d'hydrogène, un composé toxique pour les bactéries et les racines des plantes. Par conséquent, les PGPR ayant une activité catalase survivront dans la rhizosphère et favoriseront indirectement la croissance des plantes (Olubukola et Wihkochoombom, 2014).

Un test de catalase jugé comme étant positif est observable si des bulles d'air apparaissent après le contact des bactéries avec le peroxyde d'oxygène. Dans le cas contraire, un test négatif ne permet pas de distinguer des réactions provoquant le dégagement d'oxygène.

Dans notre étude, tous les isolats (R, K, B, S₆ et P) présentent une réponse nettement positive à ce test, puisque des bulles d'air sont observées dans la goutte de peroxyde d'oxygène ajouté (Fig. 13).

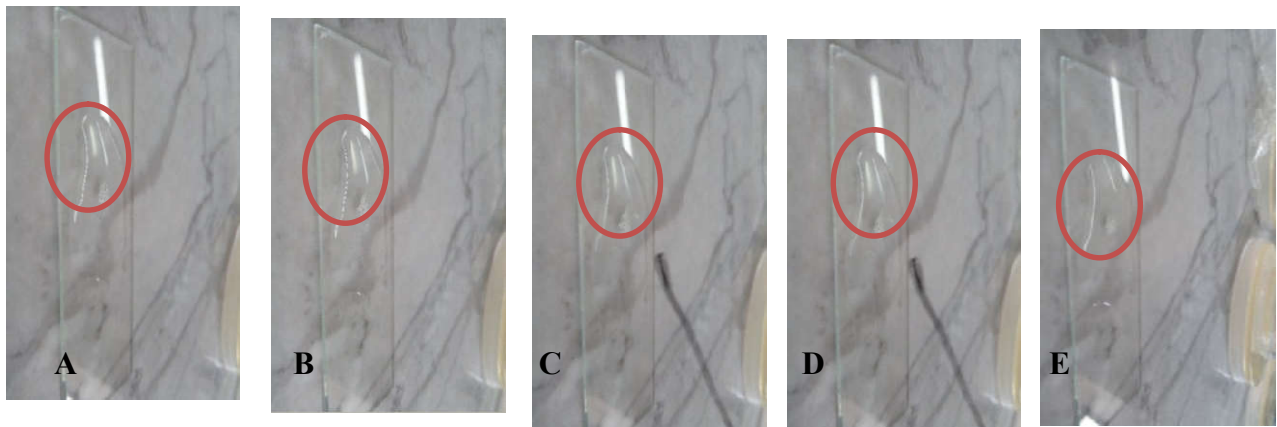


Figure 13 : Test positif de catalase chez toutes les souches bactériennes isolées, (A) : La souche R, (B) : LA souche K, (C) : La souche B, (D) : La souche S₆ et (E) : La souche P.

1.2.3. Fixation de l'azote

L'azote est un nutriment important pour plusieurs activités chez la plante et est souvent un facteur limitant pour leur croissance. La fixation de l'azote par les micro-organismes vivant librement, en association avec les plantes ou vivant en symbiose représente la source la plus importante d'azote dans les écosystèmes naturels (Burgman *et al.*, 2004). Les plantes peuvent acquérir l'azote sous deux formes minérales, soit le nitrate (NO₃) ou l'ammonium (NO₄⁺) (Mantelin et Touraine, 2004). Les micro-organismes diazotrophes peuvent permettre à la plante d'acquérir l'azote nécessaire sous forme minérale. Plusieurs espèces de micro-organisme tel que *Paenibacillus azotofixans*, *Bacillus sp.*, *Paenibacillus polymyxa*, ... etc. ont été caractérisées comme fixatrices d'azotes (Ding *et al.*, 2005).

Dans notre étude, nous avons utilisé deux différents milieux Ashby qui diffèrent par la composition du mannitol (présence ou absence du sucre). La comparaison des résultats obtenus dans chaque milieu Ashby a montré que toutes les souches ont les mêmes réactions dans les deux milieux (Fig.14).



Figure 14 : Croissance des isolats dans le milieu Ashby avec mannitol. A: Sans sucre ; B: Avec mannitol avec le sucre.

Les souches bactérienne R, K, B ont réagi positivement dans les deux milieux (croissance bactérienne), par contre, les souches S₆ et P ont réagi négativement dans les deux milieux (pas de croissance bactérienne) (Fig.15).

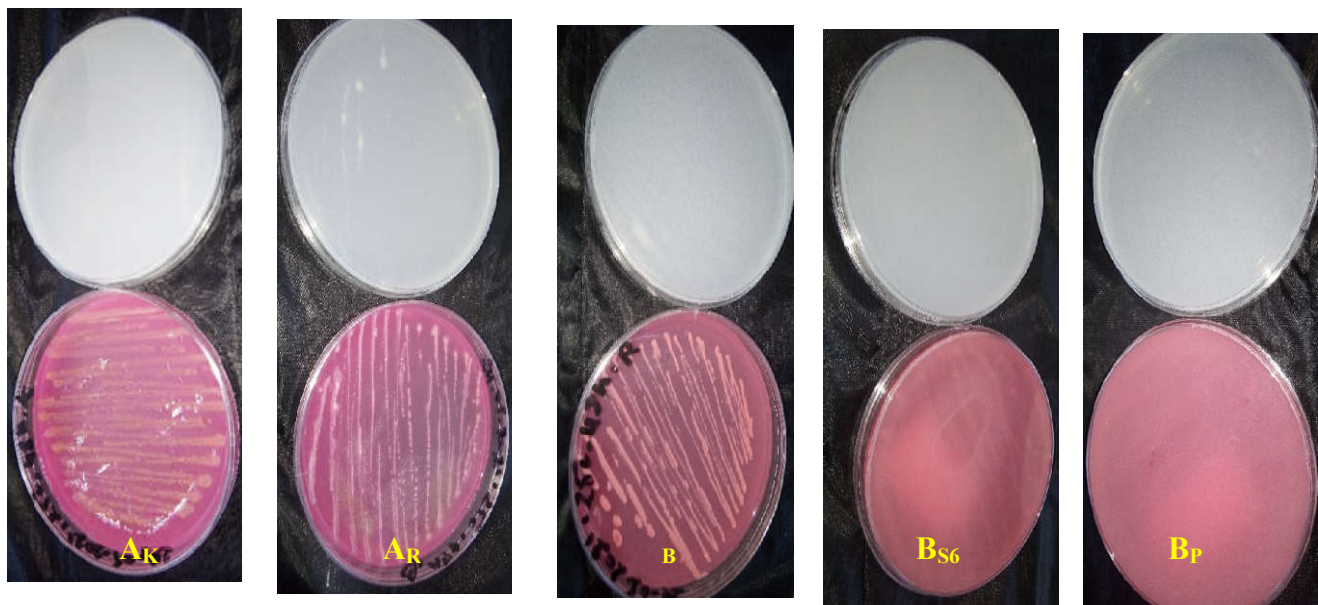


Figure 15: Réaction de la fixation de l'azote dans les deux milieux. A: Réaction positive chez les souches K, R et B dans les deux milieux ; B : Réaction négative chez les souches S₆ et P.

1.2.4. Solubilisation du zinc

Les PGPR favorisent la croissance des plantes en solubilisant et en facilitant l'acquisition des nutriments. Plusieurs PGPR se sont révélées être des solubilisateurs de zinc efficace. Ces bactéries améliorent la croissance et le développement des plantes en colonisant

la rhizosphère et en solubilisant les composés complexes du zinc en composés plus simples, rendant ainsi le zinc disponible pour les plantes (Sana *et al.*, 2017).

Les résultats obtenus et illustrés dans la figure16 ne montre par la réaction des bactéries avec leur milieu de culture à cause des contaminations des boites par des champignons.L'essai a été répété plusieurs fois, mais malheureusement, à chaque fois, toutes les boites ont été contaminées par des champignons.

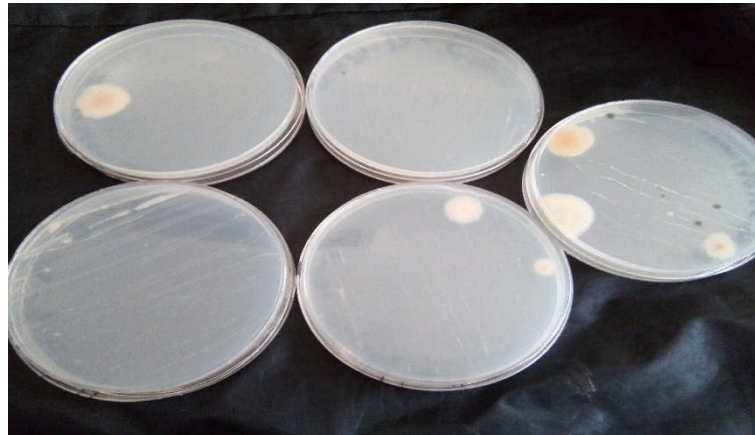


Figure 16: Contamination par les champignons.

2. Identification des souches bactériennes

Les résultats de caractérisation morphologique et biochimique des cinq souches bactérienne isolées de la rhizosphère du *Ziziphus lotus* de la région Mghila-Tiaret, ont permet l'orientation des cinq souches vers cinq genres principaux : *Staphylococcus* (R), *Acinetobacter* (K), *Bacillus* (S₆), *Pseudomonas* (P)et*Paenibacillus*(B).

3. Test de l'efficacité des souches isolées

L'objectif visé après l'isolement et la caractérisation des souches, isolées à partir de la rhizosphère du jujubier spontané de la région de Mghila, était de tester l'efficacité de ces souches sur les paramètres de croissance (hauteur de la tige, longueur des racines, poids frais et secs des biomasses aériennes et racinaires, le nombre de feuilles et la surface foliaire) et la production de certaines métabolites secondaires (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) d'une culture jeune de jujubier spontané (*Ziziphus lotus*).

Malheureusement les souches bactériennes ont été contaminées par plusieurs champignons, principalement le *Rhizopus sp.*Qui a conduit à la mortalité des jeunes plantules du jujubier spontané.

Les essais des efficacités des souches bactériennes ont été répété plusieurs fois, depuis le début de juin jusqu'au mi-juillet (période de fermeture des laboratoires), mais après chaque

purification des souches, ces dernières se sont contaminées par des champignons durant la période d'incubation. Ces champignons ont provoqué la mortalité de plus de 200 plantules de jujubier spontanées préalablement préparées.

4. Discussion

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont bien connues pour leur application dans une large gamme de cultures agricoles et de plantes médicinales importantes pour l'amélioration de la croissance, le rendement de la récolte, la valeur ajoutée aux plantes, etc. Ces divers attributs sont le résultat de mécanismes variés dont certains sont la fixation d'azote, la détection de quorum, l'interférence de signaux, la production de phytohormones, la solubilisation de phosphate, la production de composés organiques volatils, la production de sidérophores, etc. La capacité à remplacer les engrais chimiques a potentiellement augmenté la demande de PGPR (Rifate *et al.*, 2010).

L'objectif de cette étude est de caractériser des rhizobactéries potentiellement promotrice de la croissance végétative à travers des tests morphologiques, biochimiques et culturelles des souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de *Ziziphus lotus* en provenance de la région Mghila -Tiaret. Cinq souches ont été isolées et ont été nommées K, R, B, P et S₆. Les résultats de caractérisation morphologique et biochimique des cinq souches bactérienne isolées ont permis l'orientation des cinq souches vers cinq genres principaux : *Staphylococcus* (R), *Acinetobacter* (K), *Bacillus* (S₆), *Pseudomonas*(P)et *Paenibacillus*(B).

Parmi les Cocci gram positive, il a été noté une nette prédominance (41%) des staphylocoques. Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des firmicutes (bactéries à gram positif) à la classe des Bacili et à l'ordre des Bacillales (Robert, 2003). Les staphylocoques sont des coques immobiles, non sporulées, isolées ou groupées en diplocoques, ou les plus souvent, en amas plan de plusieurs éléments (du grec staphylo, grappe de raisin), de diamètre moyen de 0,8 à 1µm. On y trouve chez peu de souches la présence de capsule visible en microscope optique en présence d'encre de chine. Mais les souches peuvent perdre leur capsule après culture (Robert, 2003).

Le genre *Acinetobacter* est caractérisé par des coccobacilles à Gram négative, immobiles et non sporulées. En phase d'exponentielle de la croissance, ils ont des bacilles de diamètre de 0,9 à 1,6 µm et de longueur et de 1,5 à 2,5 µm souvent associés en paires ou en chaînes de longueurs variables (Doughari et al, 2011). Ces bactéries sont aérobies strictes, à oxydase négative, à catalase positive et non fermentaires. C'est le test de l'oxydase négative qui sert de test rapide et présomptif pour distinguer l'*Acinetobacter* et des autres bactéries non fermentaires (Bergogne et Towne, 1996).

Le genre bacillus représente un groupe hétérogène de bactérie en forme bâtonnets droits ou légèrement incurvés, à gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres de *Bacillus cereus* qui possèdent des extrémités carrées, d'une longueur de 0,9 à 10 µm. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par flagelle péritriches aérobies ou anaérobies facultatifs mais certaines espèces peuvent être anaérobies stricts (Devos et al., 2005). Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chaînette. Elles ont une catalase positive, capables de croître sur des milieux ordinaires comme la gélose nutritive. La morphologie des colonies est très variable entre et au sein des espèces. La composition de milieu de culture et les conditions d'incubation influent sur cette morphologie. Mais malgré cette diversité, le genre de Bacillus n'est pas difficile à identifier (Devos *et al.*, 2009).

Les Pseudomonas sont des bactéries à Gram négatif, à oxydase positive, à catalase positive, non fermentaires, mobiles par ciliature polaire monotriche. Elles ont un métabolisme strictement respiratoire avec, comme accepteur terminal d'électrons, l'oxygène pour aérobie et pour certains espèces le nitrate en anaérobie (respiration des nitrates) (Monteil, 2006).

Les Paenibacillus sont des bactéries en forme de bâtonnets, à Gram positif, mobiles, anaérobies facultatives ou strictement aérobies, qui se développent le plus souvent de façon optimale à un pH neutre et à une température comprise entre 28 et 40°C. Les membres de Paenibacillus, initialement inclus dans Bacillus, ont été signalés comme participant à la fixation de l'azote atmosphérique, à la solubilisation du phosphate et du potassium, à la production de phytohormones et de métabolites antimicrobiens, et à l'absorption de micronutriments par les plantes. En outre, plusieurs espèces de Paenibacillus isolées de divers environnements ont également été signalées comme possédant un potentiel pour la biorémediation des xénobiotiques dans des conditions environnementales (Amaresan *et al.*, 2020)

Dans notre travail, les résultats obtenus ont montré que les cinq souches bactériennes isolées (R, K, B, S₆ et P) ont produit l'acide indolique acétique. Cette réaction positive explique l'aptitude de la bactérie à métaboliser L-tryptophane en acide indolique acétique ou en d'autres composés analogues (Atiqur *et al.*, 2010). L'acide indole-acétique (AIA) est le plus important du groupe des auxines et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008). Le rôle de l'acide indole-acétique dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par

l'application direct de l'acide indole-acétique sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère (Narula *et al.*, 2006).

Le test de catalase est utile pour différencier entre les bactéries aérobies et anaérobies obligatoires. Dans notre résultat, nous avons trouvé que l'activité de la catalase est présente chez toutes les souches bactériennes isolées. Des études antérieures réalisées par Malleswari et Bagyanarayana (2013) ont rapporté que les bactéries manifestant une activité de la catalase sont hautement résistantes aux stress environnementaux.

Les bactéries fixatrices de l'azote ont la capacité de récupérer l'azote atmosphérique et de la fournir aux plantes par deux mécanismes : symbiotiques et non symbiotiques. (Munees et Mulugeta, 2014). Notre test de fixation de l'azote, réalisé sur une gélose du Ashby, a montré que les souches bactériennes R, K et B sont les seules bactéries fixatrices de l'azote. Certaines PGPR ont la capacité de fixer l'azote et sont aptes former une interaction libre (non obligatoire et non durable) avec la plante hôte (Munees et Mulugeta, 2014).

Le zinc est un micronutriment crucial pour toutes les formes de vie. Chez les plantes, il est impliqué dans un large éventail de processus métaboliques tels que la synthèse et la dégradation des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Le zinc est structurellement lié à certaines enzymes végétales importantes, comme l'anhydrase carbonique et le superoxyde dismutase, dont les activités sont négativement affectées dans des conditions de carence en zinc. La carence en zinc est fréquemment rencontrée chez les plantes poussant dans des sols calcaires et sodiques en raison de la formation de carbonate de zinc insoluble qui diminue la disponibilité de ce métal. Les principales cultures touchées par la carence en zinc sont le blé, le riz, le maïs, le coton et les agrumes (Sirohi *et al.*, 2014).

Dans notre travail, nous avons trouvé un résultat négatif à cause de la contamination de la gélose par des champignons principalement le *Rhizopus sp.*

Conclusion

Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes et connues sous le terme PGPR, stimulent directement la croissance de celles-ci en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Les PGPR stimulent indirectement la croissance des végétaux par leur effet antagoniste sur la microflore qui leur est néfaste, en transformant les métabolites toxiques et en stimulant la nodulation des légumineuses par les rhizobactéries.

A travers ce présent travail et les expériences réalisées, nous avons affirmé la présence, dans la rhizosphère de la plante *Ziziphus lotus*, de certaines rhizobactéries PGP, capable de fixer l'azote atmosphérique et produire l'auxine.

Nos isolats bactériens se caractérisent, en grande partie des variations entre souches bactériennes.

La souche (R) est une bactérie à surface lisse, avec une odeur forte, sa couleur est orange, sa forme est en coques, à Gram positive, à catalase positive avec un test d'indole positif et un test de fixation d'azote positif. De ce fait elle appartient au genre *Staphylocoques*.

La souche (K) est une bactérie à surface lisse, avec absence d'odeur, sa couleur est blanchâtre, sa forme est coccobacille, à Gram négative, à catalase positive, avec un test d'indole positif et avec un test de fixation d'azote positif. De ce fait, elle appartient au genre *Acinetobacter*.

La souche (B) est une bactérie à surface lisse, avec une absence d'odeur, sa couleur est blanchâtre, sa forme est bacille, à Gram positive, à catalase positive, avec un test d'indole positif et un test fixation d'azote positif. De ce fait, elle appartient au genre *Bacillus*.

La souche (S₆) est une bactérie à surface lisse, avec une odeur forte, sa couleur est crème, sa forme est bacille, à Gram positive, à catalase positive, un test d'indole positif avec un test fixation d'azote négatif. De ce fait, elle appartient au genre *Paenibacillus*.

La souche (P) est une bactérie à surface lisse, avec une absence d'odeur, sa couleur est crème, sa forme est bacille, à Gram négative, à catalase positive, avec un test d'indole positif et un teste fixation d'azote négatif. De ce fait elle, appartient au genre *Pseudomonas*.

Ainsi, dans la perspective d'approfondir ce travail et afin d'optimiser la production des métabolites secondaires chez les plantes médicinales, il serait judicieux de :

- » Tester d'autres types des éliciteurs biotiques et/ou abiotiques tel que : la température, l'hypoxie, la lumière, les métaux lourds, les champignons et les combinaisons de ces éliciteurs avec les PGPR ;
- » Améliorer les conditions de culture des plantes médicinales, en utilisant surtout des systèmes hydroponiques moderne et sophistiqués dans des serres contrôlées.

Références Bibliographiques

- Abderrazak K et Joel R. (2007). *la botanique de A à Z*. Paris: Dunod.
- Aladoubvette, A et Christelle, C. (2019, mars 5). Fertilité biologique des sols: les microorganismes utiles à la croissance des plantes. 63.
- Amaresan N., Senthil Kumar M., Annapurna K., Krishma Kumar A., et Sankaranan A. (2020). *Beneficial microbes in agro-ecology: Bacteria and fungi*.
- Atiqur R., I.-y. (2010). Sakowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Biosci. biotechnol.*, 2208.
- Beauchamp, C. J. (1993). Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. (s. d.
- Bergogne B et Townm K. (1996). Acinetobacter spp as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*, 148.
- Borgi W., Ghedira K et Chouchane G. (2007). *Anti-inflammatory and analgesic activities of Ziziphus lotus root barks. Fitoterapia*.
- Borgi W et Chouchane G. (2006). *Anti-inflammatory and analgesic activities of Ziziphus lotus roots barks. Fitoterapia*.
- Briakin, D. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *plant physiology.*, 507.
- Burgman H., Widmer F., Von sigler W et Zeyer J. (2004). New molecular screening tools for analisis of free living diazotrophsin soil. *environ Microbiol*, 240-247.
- Chouchane, B W. (2006). *avtivité anti-inflammatoire des saponosides et des flavonoides des écorces des racines de Ziziphus lotus*. revue des régions arides.
- Coquert D. (2017). l'interet d'avoir recours aux plantes médicinales. *Bienfaits des plantes médicinales*.
- Cresswell R., Fowler M W., Stafford A et Stephan S. (1989). Inputs and outputs: primary substrates and secondary metabolism. *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures.*, 14.

- Denis F., Poly M., Martin C., Bingen E et Quentin R.(2007). *Bactériologie médicale. Technique usuelles*. Elsevier Masson.
- Deshpande S., Ceryan M., Salinnhe D et Luh B S. (1986). Tannin analysis of food products. *Critical reviews in food science et nutrition*.
- Devos A., Garrity G M., Jones D., Krieg N R., Ludwig W., Rainey A., Schleifer K H et Whitman W B. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (éd. 2, Vol. 3). new york.
- Devos M., Vanoosten V R., Vanpelt J., Pozo M J., Muller M J., Buchala A J et Métraux J P. (2005). Signal signature and transcriptome changes of arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol.plant microbe interact*, 923.
- Ding Y., Wang J., Liu Y., Chen S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region . *Appl.Microbiol*, 1271.
- Doughari H J.,Ndakidemi P A., Human I S et Benade S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of acinetobacter spp. *Microbes and environments*, 101.
- Doumbia, B. k. (2008). *la culture du jujubie: un manuel pour l'horticulteur sahélien*.Mali: world Agroforestry centre (ICRAF).
- Farombi. (2003). african indigenous plants with chemotherapeutic potntials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *african journal of biotechnology*, 662-671.
- Goteti P K., Emmanuel D A., Desai S., Shaaik M H. (2013). Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (Zea mays L). *International journal of microbiology*.
- Javier F., Elena A., Maria S., Martin G., Dolores S et Beatriz S. (2012). Elicitation of secondary metabolism in hypericum perforatum by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. *Pharmaceutical biology*.
- Jay, A.J. (2005). *les composés phénoliques des végétaux une exemple de métabolites secondaires d'importance économique*.Italie: presses polytechniques et universitaires romandes.

- Kloepper, J. W. (1978). *Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes*. Dans *proceeding of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria* (Vol. 2). Angers France: Institut national de la recherche agronomique (INRA).
- Kushwaha, A. B. (2013). Isolation and characterization of PGPR associated with cauliflower roots and its effect on plant growth. *The Bioscan*, 95.
- Labidi, S. (2017). *les auxines et leurs effets sur les végétaux*. *Agronomic*. Récupéré sur <http://www.agrimatroc.ma/les-auxines-et-leurs-effets-su-les-vegetaux>.
- Lévy, E. E. (1992). Résistance mechanisms of septoria tritici to antifungal products of pseudomonas. *Physiol. Mol. Plant pathol*, 163.
- Lutge, U. K. (2002). *botanique: technique et documentation* (éd. 3). Paris: Lavoisier.
- Lvanisevic, J. (2011). *métabolites secondaires des éponges homoscleromorpha: diversité et fluctuation de son expression en fonction des facteurs biotique et abiotique*.
- Mantelin, A. et Touraine, B. (2004). plant growth-promoting bacteria and nitrate availability : impacts on root development and nitrate uptake. *Exp. Bot*, 27-34.
- Martinko, M. M. (2007). *biologie des micro-organismes*. (éd. 11). France.: Pearson education.
- Matthey et Gobat, A. (2007). *Le sol vivant bases de pédologie-biologie des sols* (éd. 3).
- Matthey et Gobat, A. (2010). *Le sol vivants base de pédologie-biologie des sols* (éd. 3). Italie.
- Monteil, H. (2006). Bacilles à gram négatif non fermentants. *encyclopédie médico-biologique*, 90-05-0020.
- Munees, A. et Mulugeta, K. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud university-science*.
- Nabors, M. (2008). *biologie végétale structures, fonctionnement, écologie, biotechnologies*. Paris: Pearson Education France.
- Naghbi, S., Mohammadi, M. et Ghorbani, S. A. (2005). Medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 2, 63-79.

- Narula N., Deubt A., Gans W., Behl R K et Merbach W. (2006). Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil . *Plant soil environ*, 129.
- Olubukola M et Wihkochoombom, O. (2014). Characterization of rhizobacteria from field grown genetically modified (GM) and non-GM maizes. *Agriculture agribusiness and biotechnologie*.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud M., Ribéreau-Gayon P et Sudraud P. (1978). *Science et techniques de vin*. Paris: ed.Dunod.
- Rifate H., Safdar A., Ummay A. Rabia K et Iftikhar A.(2010). soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotrion. *Annals of microbiology*, 579-598.
- Robert, G. (2003). *la drépanocytose* (Vol. 321).
- Ryu R et Patten, C. (2008). Aromatic amino acid- dependent expression of indole -3- pyruvate decarboxylase is regulated by 4TyrR enterobacter cloacae UW5. *Am.soc.microbiol*, 35.
- Sana K., Izzah S., Deeba N., Muhammad R., Kauser K et Samina M. (2017). Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat.
- Schleifer, K. (2009). *Phylum firmicute Gibbons and Murray* (Vol. 1317). Nex York.
- Shahab, S. (2011). Growth promotion of chic pea by native phosphate solubilizing and auxin producing bacteria. *the internet journal of microbiology*, 9, 1.
- Singleton, P. (2012). *Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologie* (éd. 6). France.
- Sinmon, C. (2009). *UGT7B3 et UGT73B5, deux glycosyltransférases du métabolisme secondaire : role dans la résistance d'arabidopsisthaliana à la bactérie pseudomonas syringae pv tomato*. paris: Université de Paris Sud Faculté des sciences d'Orsay.
- Sirohi G., Upadhyay A., Srivastava P S et Srivastave S.(2014). PGPR mediated Zinc biofertilization of soil and its impact on growth and productivity of wheat. *journal of soil science and plant nutrition*
- Tremblin, A. M. (2009). *Abrégé de biochimie appliqué*. en france.

Wong S P., Leong L et William Koh J H. (2006). Antioxidant activities of extracts of selected plants. *Food chemistry*.

Younesi H., et Zadah., H. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effect of corcus sativas L. *Stigma and petrol extracts in mice. BMC pharmacology*.

Yuan C L., Mou C X., Wu L et Guo Y B. (2011). Effects of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *Soils sediments, 11*, 322-329.

Annexes

Composition de milieux de culture :**1-Composition de milieu de culture King B (g/l) :**

Composant	Quantité
Peptone de caséine	20g
Glycérol	15ml
K ₂ HPO ₄	1,5g
MgSO ₄	1,15g
Agar	15g
ED	1000ml

2-Composition du Ashby sans azote en (g/l) :

Composant	Quantité
Mannitol	20g
K ₂ HPO ₄	0.20g
MgSO ₄	0.20g
NaCl	0.20g
K ₂ SO ₄	0.10g
CaCO ₃	5g
Agar	15g
ED	1000ml

3-Composition du tryptone sel pour 500ml :

Composant	quantité
Peptone de caséine	5g
NaCL	2,5g
ED	500ml

Annexe

4-Composition de milieu gélosé stérile spécifique pour le test de solubilisation de zinc(g/l^{-1}) :

Composant	Quantité
NH_2SO_4	1g
KCl	0,2g
K_2HPO_4	0.2g
MgSO_4	0.2
Agar	15g
ED	1000ml
Dextrose	10g
ZnO et ZnCO_3	0.1%