



Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Activités enzymatiques et pouvoir solubilisateur du
phosphate chez les bactéries fixatrices d'azote nodulant
quatre espèces d'*Acacia***

Présenté par : **HATIM Sihame**

Encadré par : **Pr. FIKRI BENBRAHIM Kawtar**

Soutenu le : **22 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Pr. Naima El Ghachtouli
Pr. Saad Rachiq
Pr. Omar El Farricha
Pr. Kawtar Fikri Benbrahim

Année Universitaire : 2014-2015

Introduction

Sur terre, les microorganismes ont colonisé à peu près tous les écosystèmes. Certains microorganismes appelés rhizobactéries ont l'aptitude à coloniser les racines de façon intense. Il s'agit par exemple de : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* (Saharan et al., 2011).

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol-racine. En effet, le rhizoplan et la rhizosphère sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (Lugtenberg et al., 2002 ; Rawat et Mushtaq, 2015). L'ensemble des effets bénéfiques des rhizobactéries s'est élargi dans les dernières années. En effet, les bactéries colonisant les systèmes racinaires peuvent exercer leurs actions bénéfiques de plusieurs façons (Glick, 2001 ; Rawat et Mushtaq, 2015).

Les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* par exemple, ont la capacité d'interagir avec les plantes de la famille des légumineuses, par formation de nodosités lors d'une association symbiotique fixatrice d'azote. Les nodules représentent de véritables organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes. En effet, les bactéries " *Rhizobium*" fixent l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique (nitrogénase). Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez des procaryotes. (Weyens et al., 2010).

Ainsi, les bactéries convertissent l'azote moléculaire en azote minéral (NH_3) directement assimilables par les plantes, qui en retour fournissent l'énergie et les hydrates de carbone. Ce qui contribue à l'amélioration de la croissance des plantes et à la réduction de l'application des engrais chimiques à la fois coûteux et polluants.

De nombreuses bactéries rhizosphériques ont montré leur capacité à solubiliser et à mobiliser le phosphore d'une part. Ce qui pourra être une bonne solution pour diminuer l'usage excessif des engrais et des fertilisants chimiques dans les sols agricoles (Joseph et al., 2007 ; Behera et al., 2013) . Parmi les microorganismes à effets bénéfiques indirects, il existe notamment des bactéries dont l'effet global favorise la croissance de la plante (PGPR) (Kloepper, 1980) d'autre part. Certaines de ces bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculants pour améliorer le

développement des racines via la production de certaines phytohormones, telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (El-Hadad *et al.*, 2010).

C'est ainsi que, de très nombreuses activités enzymatiques peuvent être décelées dans le sol : cellulase, amylase, lipase, uréase Les rhizobactéries sont parmi les microorganismes qui ont montré un véritable potentiel de ces activités enzymatiques (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003).

Les rhizobactéries sont devenues dernièrement un sujet intéressant qui a pour objectif principal d'étudier les microorganismes présents dans la rhizosphère et d'exploiter leurs particularités qui offrent des perspectives biotechnologiques.

C'est donc dans le but d'étudier la biodiversité de certains écosystèmes que le présent travail a comme objectifs (i) la mise en évidence de l'activité enzymatique de certains isolats de rhizobiums. (ii) l'étude de la capacité des rhizobiums à solubiliser le phosphore et à produire de l'AIA et (iii) la réalisation d'une étude moléculaire: séquençage de l'ADNr 16S des rhizobiums pour étudier la biodiversité de ces bactéries rhizosphériques.

La première partie de ce travail est consacrée à l'analyse et la synthèse des données bibliographiques relatives à l'environnement rhizosphérique et aux rhizobactéries. La deuxième partie, s'est focalisée sur les différentes techniques utilisées qui ont été mises en œuvre pour étudier la diversité des activités enzymatiques des rhizobactéries et pour caractériser les souches les plus performantes sélectionnées et tenter de les identifier par une approche moléculaire. Dans la troisième partie les résultats des différentes analyses et tests sont analysés et discutés. Enfin la dernière partie a présenté la conclusion générale et les perspectives de recherche.

I. Diversité microbienne dans le sol

Le sol constitue un réservoir de biodiversité microbienne de grand intérêt sur la terre. En effet, il est considéré comme un support de la vie terrestre, où on trouve une large diversité d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) jouant des rôles primordiaux dans la biotransformation et le transfert des éléments ou des composés. Ces activités biologiques sont intimement liées à une large diversité fonctionnelle et à une importante variété d'interactions écologiques très complexes. L'ensemble de ces processus sont assurées par des organismes divers (bactéries, champignons, protozoaires, racines et faune).

Les organismes du sol ont un impact aussi sur la production végétale que ce soit de façon directe ou indirecte (modification des cycles de carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites et pathogènes).

Selon temps et espace, la répartition des processus biologiques, n'est ni homogène ni aléatoire. En effet on trouve généralement que les activités des organismes du sol sont plus abondantes dans les territoires où la disponibilité en substrats carbonés est satisfaisante. C'est ainsi que les milieux de vie des communautés microbiennes sont associés aux fractions organiques, aux agrégats, à la litière en décomposition, au sol influencé par les vers de terre et au contact étroit avec les racines des plantes (rhizosphère) (Lynch, 1990 ; Cherif, 2014).

1. La rhizosphère

La rhizosphère est définie comme étant le volume de sol influencé par les racines. Ainsi on différencie entre le rhizoplan qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique situé au voisinage immédiat de la racine et sous son influence. C'est le siège des échanges entre sol, racines, microorganismes et faune associés. Ces échanges, intenses, se manifestent sous forme des flux bidirectionnels d'eau et de nutriments (Lynch, 1990; Rabhi, 2012).

La plante par sa structure, son activité physiologique et son organisation fonctionnelle met en place des mécanismes pour la mobilisation de l'eau et des nutriments minéraux pour assurer la croissance et la survie du partenaire végétal. Au sein de la rhizosphère, jusqu'à 30% des produits photosynthétisés par la plante sont

dirigés vers les microorganismes qui y vivent par le biais d'un phénomène appelé exsudation racinaire.

Ces exsudats racinaires ont des compositions organiques variées et sont en grandes quantités. Ils sont riches en acides organiques et en sucres ainsi qu'en composés organiques complexes. Ainsi ils sont transformés en biomasse microbienne ou réoxydés en CO₂ (Rawat et Mushtaq, .2015).

Par sa richesse en sucres, en amino-acides, en acides organiques, en isoflavonoïdes, en régulateurs de croissances et en enzymes libérées par la plante, la rhizosphère est considérée parmi les microenvironnements les plus remarquables de point de vue activité biologique grâce à sa richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries (Paul et Clark, 1996).

La rhizosphère est l'un des sites écologiques les plus intéressants. Elle inclut une grande diversité de microorganismes qui sont organisés en communautés microbiennes variées, vivant en association avec les systèmes racinaires des plantes supérieures (Khalid *et al.*, 2006 ; El-Lithya *et al.*, 2014). Ces communautés microbiennes participent à des nombreux processus de décomposition et de recyclage des nutriments dans la rhizosphère (Germida *et al.*, 1998). Par ailleurs, ces êtres vivants présentent des avantages par leurs contributions que ce soit à l'amélioration de la fertilité ou à la stabilisation du sol.

Plusieurs recherches et travaux dans ce contexte ont montré que l'agrégation et la stabilité d'un sol dépend de sa nature et de sa composition en matière organique (Elustondo *et al.*, 1990). La matière organique libérée par les racines des plantes agit par un effet direct sur la stabilisation des agrégats du sol, ainsi que par effet indirect sur la stimulation des activités microbiennes de la rhizosphère (Angers et Mehuys, 1989). Les populations microbiennes occupant le sol présentent aussi un rôle crucial dans l'état de santé des plantes. Certaines sont néfastes, d'autres sont bénéfiques et d'autres encore ne semblent avoir aucun effet. Plusieurs interactions bénéfiques (symbiose) ou non, nuisibles (pathogénies) sont observées entre plantes, bactéries et champignons du sol. Des interactions bénéfiques pour la plante peuvent avoir lieu, dont on peut citer les symbioses fixatrices d'azote, les associations avec bactéries promotrices de croissance ou de santé (phénomène de suppression des maladies), ou bien les interactions avec les champignons mycorrhizogènes. L'origine des impacts

délétères semble être du à des phénomènes de parasitisme végétal qui présentent des problèmes majeurs pour certaines espèces végétales concernant le partage du milieu de vie et qui est l'espace sol (effet d'inhibition de croissance de l'un des deux sur l'autre). Les protozoaires et les nématodes qui se nourrissent sur les bactéries sont plus abondants au voisinage des racines. C'est ainsi que la plupart des cycles des nutriments et des phénomènes de prédation peuvent avoir lieu, ce qui rend la zone immédiatement adjacente aux racines, un véritable site où l'activité métabolique est à haut degré (Dommergues, 1978).

Cet environnement relativement particulier, qui héberge autant d'êtres vivants bénéfiques que de pathogènes, joue un rôle très important sur la croissance et le rendement des cultures végétales (Hinsinger, 1998). La variété et la prédominance des communautés microbiennes colonisant le plan rhizosphérique dépend d'un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques régnant dans une niche écologique particulière. D'une façon générale, la structure des racines et la composition des exsudats racinaires changent durant le développement de la plante et sous l'effet des conditions environnementales telles que la disponibilité de l'eau et la température. Par conséquent, la dynamique de la population microbienne rhizosphérique peut aussi changer. En effet, les plantes, grâce à l'émission des signaux spécifiques, exercent une pression sélective qui tend généralement à réduire la diversité microbienne et à favoriser des espèces ou des souches particulières (Bertrand *et al.*, 2000). En outre, la compétition entre les microorganismes pour les nutriments, la colonisation des sites, la production des antibiotiques et des bactériocines contribuent à cette dynamique microbienne dans la rhizosphère.

2. Les rhizobactéries

Le sol est un microenvironnement très riche en microorganismes tels les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues (Paul et Clark, 1996 ; Kechid *et al.* 2013). En effet, les bactéries sont les organismes les plus fréquents et représentent en moyenne $6 \cdot 10^8$ cellules par gramme du sol et un poids de 1000 Kg/ha équivalent à 5% du poids sec des composés organiques du sol. Elles sont considérées parmi les organismes qui se caractérisent par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie et

d'éléments nutritifs. Ceci explique clairement l'abondance de ces êtres vivants dans le sol (Glick, 1995).

Ainsi on appelle les bactéries colonisant le système racinaire des plantes par des rhizobactéries. Ces dernières sont caractérisées par leur compétitivité et leur grande capacité d'envahir le réseau racinaire riche en éléments nutritifs durant le cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993 ; Cherif, 2014).

De plus, entre la plante et le sol s'établit une sorte de coopération sous forme d'échanges bidirectionnels. Autrement dit si la plante libère des composés organiques, à l'inverse elle prélève de l'eau et des éléments minéraux indispensables à son métabolisme. L'ensemble de ces échanges effectués entre la plante et le sol sont soumis à l'influence des rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont plus élevés.

Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques qui ont besoin donc des composés organiques afin de combler leurs demandes énergétiques. Leurs nécessités sont complètement satisfaites à l'intérieur même de la rhizosphère. En effet, la plante secrète de nombreux substrats tels : les cellules corticales et épidermales qui se détachent des racines, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, et qui peuvent être utilisés par la suite par les rhizobactéries (Campbell et Greaves, 1990).

Les populations microbiennes rhizosphériques englobent les symbiotes (Rhizobia, actinobactéries et champignons mycorrhiziens) et les saprophytes libres. Les microorganismes rhizosphériques en général et les bactéries diazotrophiques en particulier agissent sur les plantes par des effets divers. Par ailleurs, la santé de la plante, la productivité, la fertilité et la qualité du sol sont influencés par les associations qui réunissent les bactéries avec les racines des végétaux (Konate, 2007).

La colonisation des racines par les bactéries est observée depuis longtemps, mais ce n'est que récemment que son importance pour la croissance et le développement des plantes est devenue claire (Glick, 2012). Parmi les paramètres qui contrôlent la nature des activités bactériennes on compte la qualité et la composition des exsudats racinaires. Ces activités résultent de la synthèse des métabolites tels que les antibiotiques, sidérophores, substances de croissance, acide cyanhydrique,

lipopolysaccharides (Voisard *et al.*, 1989; Van Peer *et al.*, 1991). Cette influence se manifeste par une modification de la croissance de la plante et de la fréquence des infections fongiques de la racine (Kloepper, 1993).

La zone racinaire est un site actif où la compétition microbienne est très efficace entre les rhizobactéries. L'association plante-microbe, exerce sur la croissance des plantes un effet qui peut être positif, neutre ou négatif. Certaines bactéries inhibent la croissance, tandis que d'autres la stimulent. Ces dernières sont alors reprises sous le terme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR) (Kloepper *et al.*, 1989; Zahir *et al.*, 2004). Ainsi, un nombre très important de ces bactéries ont montré leur capacité à améliorer la croissance des plantes (Kloepper, 1992 ; Glick, 1995).

3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les rhizobactéries connues sous le terme PGPR stimulent de façon directe la croissance de la plante tout en augmentant l'absorption des éléments nutritifs du sol, en induisant et conduisant à la production des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induits chez les végétaux. Ainsi elles stimulent de façon indirecte la croissance des végétaux tout en agissant par effet antagoniste sur la microflore délétère, en se débarrassant des métabolites toxiques et en stimulant le développement des nodules chez les légumineuses par les *Rhizobia*. L'établissement de l'association PGPR-plante est primordial pour l'expression des effets bénéfiques. Les rhizobactéries sont considérées parmi les communautés bactériennes les plus caractéristiques par leur capacité d'envahir et de se concentrer au voisinage des systèmes racinaires des végétaux.

Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent aux divers genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas fluorescens* (Hallmann *et al.*, 1997 ; Saharan *et al.*, 2011).

De nombreuses recherches portant sur la relation PGPR/amélioration de l'absorption des éléments nutritifs du sol ont tiré conclusion que l'inoculation avec les bactéries favorise considérablement le prélèvement du N, P et K. Aussi bien l'inoculation avec *Azospirillum* et *Bacillus* spp a donné une nette accumulation de ces

minéraux dans les tissus de la plante. D'après Dursun *et al.* (2008), *Burkholderia gladii*, *P. putida*, *B. subtilis*, *B. megaterium* ont montré des teneurs élevées en minéraux notamment N, K, P, Zn, Fe, Mn, Na, Ca et Mg dans les feuilles de la roquette (*Eruca sativa*) par rapport au témoin.

4. Etude taxonomique des PGPR

Le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative, principalement puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des PGPR ont été suffisamment étudiés. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genre et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants : Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholz, 2002). De nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers (Kloepper, 1992) :

4.1. Alphaproteobacteria

Les PGPR appartenant à cette classe sont les *Rhizobia* reconnues par leur capacité à fixer l'azote et à noduler les plantes. Ces souches peuvent se comporter comme PGPR quand elles colonisent les racines des plantes non légumineuses dans une relation non spécifique. En effet, le genre *Rhizobium* contient également des souches PGPR qui ont été considérées comme de nouveaux genres : *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* (Sawada *et al.*, 2003). Le genre *Gluconacetobacter* de la famille des Acetobacteraceae composé de bactéries endophytes obligatoires colonise les racines, la tige et les feuilles de la canne à sucre (Tejera *et al.*, 2003). Les espèces du genre *Azospirillum* décrites dans la famille de Rhodospirillaceae sont considérées comme promotrices de la croissance des plantes. Les souches appartenant à ce genre se reproduisent sous forme de cellules libres dans le sol ou associées aux racines, tiges, feuilles et graines principalement des céréales et des graminées fourragères (Baldani *et al.*, 2005) .

4.2. Betaproteobacteria

Dans la famille Burkholderiaceae, le genre *Burkholderia* forme un groupe monophylétique qui contient diverses espèces ayant des propriétés physiologiques et écologiques variées, elles sont isolées à partir des sols et des plantes. Quelques souches ont la capacité de fixer de façon symbiotique l'azote. *Ralstonia* est un genre

également attribué à la famille des Burkholderiaceae. Il est, comme le genre *Burkholderia*, omniprésent (Moulin *et al.*, 2001).

4.3. Actinobacteria

Le genre *Frankia* est fixateur symbiotique d'azote. Les bactéries de ce genre sont associées à des plantes actinorhiziennes pionnières de la colonisation des sols pauvres ou perturbés. D'autres Actinobacteria sont également des promoteurs de croissance des plantes mais ne participent pas à la symbiose. Ils appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Micrococcus* (Gray et Smith, 2005), *Curtobacterium* (Barriuso *et al.*, 2005) et *Streptomyces* (Siddiqui et Mahmood, 1999).

4.4. Gammaproteobacteria

Dans la famille des Pseudomonadaceae, le genre *Azotobacter* est composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes principalement à cause de sa capacité de fixer l'azote et sans noduler les plantes (Sturz et Christie, 2003). De plus, *Pseudomonas* est le genre le plus abondant dans la rhizosphère parmi les bactéries à Gram-négatif du sol, et l'activité PGPR de certaines de ces souches est connue depuis de nombreuses années, résultant d'une large connaissance des mécanismes impliqués. Par contre, les genres inclus dans la famille des Enterobacteriaceae assurant la fonction de PGPR sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* et *Serratia* (Garrity, 2005).

4.5. Firmicutes

Parmi les bactéries telluriques à Gram positif, les *Bacillus* sont les types les plus communs et les plus prédominants, ils représentent 95% de la flore isolée.

Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores. Depuis la découverte de la bactérie (1913), la possession d'une spore a été utilisée comme une clé dans la classification. Les caractéristiques distinctives entre les membres du genre *Bacillus* et les autres bacilles sporulant sont la nature aérobie stricte ou facultative, la forme bacillaire et la production de catalase. Le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables.

Les premières tentatives de classification des espèces de *Bacillus* sont fondées sur deux caractéristiques: la croissance aérobie et la formation d'endospores. De deux espèces formant des endospores, *Bacillus anthracis* et *B. subtilis*, le genre a atteint 146 espèces dans la cinquième édition du Bergey's Manuel (Bergey *et al.*, 1939). Ce

nombre est, cependant, limité à 22 espèces bien définies dans la huitième édition du Bergey's (Buchanan et Gibbons, 1974). Par la suite, le nombre de nouvelles espèces a augmenté régulièrement grâce à l'application de méthodes variées et efficaces pour l'enrichissement et l'isolement tenant compte de la diversité physiologique et des besoins nutritionnels et culturels de ces organismes et au développement de nouvelles méthodes plus sophistiquées pour la caractérisation et l'identification des souches bactériennes, en particulier sur le plan génétique telle que l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S.

Dans le Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (1ère éd., 1986), la teneur en G + C des espèces connues de *Bacillus* varie de 32 à 69%. Cette variabilité, ainsi que des tests d'hybridation d'ADN, ont révélé l'hétérogénéité génétique au niveau des genres et même d'une espèce à l'autre. Il y avait parfois de profondes différences du contenu G + C à l'intérieur des souches d'une même espèce. Ainsi, l'analyse des séquences des ARNr 16S de 51 espèces a permis à Ash *et al.* (1991) de caractériser cinq groupes phylogénétiques. La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant 3 espèces acidophiles et thermophiles. Ultérieurement, ont été proposés et validement publiés plusieurs genres qui rassemblent au moins une espèce initialement incluse dans le genre *Bacillus*. Dans la deuxième édition du Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (2ed, 2004), 37 nouveaux genres avec *Bacillus* sont inclus dans l'ordre des Bacillales et la famille des Bacillaceae.

L'approche phylogénétique de la taxonomie du *Bacillus* réalisée par l'analyse du séquençage des oligonucléotides des molécules d'ARNr 16S a révélé que les relations phylogénétiques des espèces de *Bacillus* ont une certaine parenté avec des espèces non sporulées, telles que *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. De plus, certains anciens membres du genre sont réunis en nouvelles familles, les *Acyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae* et *Planococcaceae*. Dans l'édition du Bergey's Manuel (2e ed, 2004) plus de 200 espèces de AEFB allouées à environ 25 genres sont validement publiés.

II. Intérêt des PGPR pour l'agriculture

Au cours des dernières années, plusieurs études et expériences menés à travers le monde aux champs ou sous serre ont montré des résultats favorables concernant l'inoculation des cultures végétales par les PGPR (Bresson, 2013). En se basant sur ces données, il apparaît clairement que l'inoculation peut être considérée comme une technologie émergente et écologiquement très intéressante vue les augmentations significatives des rendements de diverses cultures, même dans des conditions sévères. Elles peuvent affecter la croissance et le rendement d'une large gamme de cultures telles que les céréales ou les légumes. Les traitements avec les PGPR augmentent le pourcentage de germination, la vigueur des plantules, l'émergence, le développement des racines et des tiges, la biomasse totale des plantes, le poids des semences, la floraison précoce et les rendements de fruits et des graines (Van Loon *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Ainsi, l'inoculation des plantes par les PGPR a induit une modification coordonnée des mécanismes physiologiques allant tous dans le sens d'une optimisation du prélèvement de l'eau dans le sol et une réduction des pertes d'eau par les feuilles (Pantin, *et al.* 2013).

1. Rendement

L'application de la technologie microbienne des PGPR dans le domaine des cultures agricoles est qualifiée parmi les pratiques les plus fiables, vue l'augmentation et la qualité du rendement de la productivité agricole (Bhattacharyya *et al.*, 2012). Les souches *Pseudomonas* BA-8 et *Bacillus* OSU-142 appliquées sur les feuilles et les fleurs des pommiers ont considérablement amélioré le rendement de la superficie de la section transversale du tronc (de 13,3 à 118,5%), le poids des fruits (4,2 à 7,5%), la longueur des tiges (de 20,8 à 30,1 %), et le diamètre des tiges (9,0 à 19,8%) par rapport au témoin (Pirlak *et al.*, 2007). Ainsi, les combinaisons *Bacillus* M3 et/ou OSU-142 et/ou *Microbacterium* FS01 ont le potentiel d'accroître le rendement et la croissance des pommiers. En outre, *Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 et M3 ont également donné un effet bénéfique sur la longueur, le rendement des cultures et la qualité des fruits d'abricot, de cerise et de framboise (Esitken *et al.*, 2005 ; Orhan *et al.*, 2006). Le poids moyen des fruits de tomate par plante traitée avec *Rhodopseudomonas* sp KL9 (82,7 g) est supérieur par rapport au témoin non inoculé. La teneur en lycopène dans la tomate mûre a augmenté de 48,3% avec l'application de

Rhodopseudomonas sp. KL9 (Lee *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que *Burkholderia gladii* BA-7, *Pseudomonas* BA-8, et *Bacillus* OSU-142 ont un grand potentiel pour accroître les paramètres de croissance des plantes de *Eruca sativa* (Dursun *et al.*, 2008). Les espèces efficaces de *Bacillus*, comme OSU-142, RC07 et M-13, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *P. putida* RC06 et RC04 et *Rhodobacter capsulatus* peuvent être utilisées dans l'agriculture biologique et durable. De nombreux travaux ont prouvé le potentiel de ces bactéries dans la croissance et le rendement des plantes (De Freitas, 2000; Herman *et al.*, 2008).

2. Absorption des nutriments

Afin d'assurer leur survie et leur croissance, les plantes ont besoin de 16 éléments essentiels. Trois d'entre eux (carbone, hydrogène, et oxygène) proviennent essentiellement de l'air et de l'eau. Le reste est normalement absorbé par les racines des plantes. Chacun de ces éléments essentiels a au moins un rôle spécifiquement défini dans la croissance des plantes (Swaidner *et al.*, 1992; Decateau, 2000). Les PGPR sont considérées comme une composante pour le maintien de la nutrition adéquate des plantes. Les PGPR pourraient favoriser l'absorption des nutriments, réduire ainsi la nécessité de l'apport d'engrais et prévenir l'accumulation de nitrates et de phosphates dans les sols agricoles (Yang *et al.*, 2009 ; Bhattacharyya *et al.*, 2012). Parmi les éléments essentiels à la croissance des plantes, on compte le phosphore et l'azote. Ce sont les nutriments majeurs-clé limitant la survie du règne végétal. (Kumar et Narula, 1999; Sundara *et al.*, 2002; Podile et Kishore, 2006). En outre, certaines PGPR améliorent le prélèvement de ces ions minéraux en favorisant le développement des racines (Mantelin et Touraine, 2004) par la production de phytohormones (Kloepper *et al.*, 2007).

3. La solubilisation du phosphore

3.1. Le phosphore dans le sol

Le phosphore est un élément nutritif indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes (Rfaki *et al.*, 2014) . En effet, il joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des plantes. Dans les solutions du sol, le phosphore est généralement disponible sur sa forme triacide : l'acide phosphorique (H_3PO_4). Le pH du sol est un paramètre qui joue un rôle clé dans la disponibilité du phosphore. D'après Hopkins et Evrard, 2003, pour

un pH du sol inférieur à 6.8, la forme de phosphore prédominante est le monophosphate, un anion monovalent ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) qui est facilement prélevé par les racines des plantes.

Pour des pH entre 6.8 et 7.2, la forme qui prévaut est le HPO_4^{-1} , qui est absorbée plus difficilement. Dans les sols de nature alcaline ($\text{pH} > 7.2$), la forme prédominante est celle de l'ion trivalent PO_4^{3-} , que les plantes ne peuvent pratiquement pas absorber. La concentration réelle en phosphore du sol est relativement faible, pour plusieurs raisons. Dans les sols alcalins, le phosphore est précipité par les complexes calciques et magnésiens tandis qu'à pH neutre, le phosphore tend à former les complexes insolubles avec l'aluminium et le fer (Kuhad et al., 2011 ; Rfaki et al., 2014). Comme les phosphates insolubles sont relâchés lentement dans la solution du sol, le phosphore est toujours limitant dans les sols calcaires. Le phosphore sous ses formes organiques qui ne seront pas prélevés par les plantes, semblent avoir des qualités substantielles. Pour être absorbé, le phosphore organique doit tout d'abord être converti en phosphore inorganique sous l'action des microorganismes du sol. En outre, les plantes doivent entrer en compétition avec la microflore du sol pour le phosphore dont la disponibilité est par ailleurs très limitée (Aarab et al., 2009). Pour toutes ces raisons, le phosphore bien plus que l'azote est souvent l'élément limitant dans les écosystèmes naturels (Figure 1).

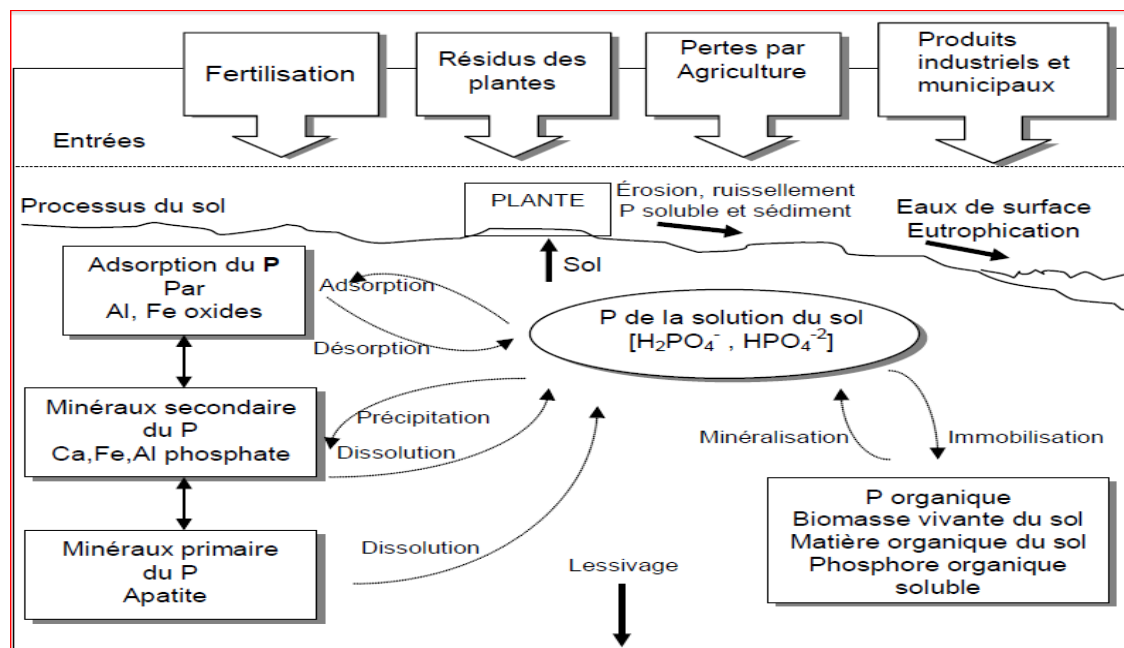


Figure 1. Cycle du phosphore dans le sol (adapté par Gachon, 1969) in Pierzynski et al., 1994.

3.2. Rôle du phosphore(P) pour la plante

Le phosphore (P) est l'un des constituants jouant un rôle-clé pour la plante (Rifat, et *al.*, 2010), il forme avec l'azote et le potassium un groupe de composé essentiels pour la survie des êtres vivants. Pour les cultures des sols des zones semi-arides de l'Afrique de l'ouest, le phosphore est considéré avec l'azote comme les deux premiers facteurs limitant les rendements de ces sols (Bado, 2002). En effet, sa déficience engendre un stress abiotique majeur qui agit sur la plante tout en limitant sa croissance y compris la productivité des cultures agricoles sur bon nombre de sols à travers le monde (Miao et *al.*, 2007 ; Nian et *al.*, 2007).

Le phosphore joue divers rôles vis-à-vis les plantes. En d'autre terme, il intervient dans le phénomène de photosynthèse en tant que fixateur et transporteur d'énergie et favorise également (Behera et *al.*, 2013) :

- Une bonne croissance.
- Un bon développement racinaire et un accroissement de la masse des racines, favorisant ainsi l'amélioration et la croissance de la plante.
- La rigidité des tissus, ainsi ils sont plus résistants à la verse et aux maladies dues à des champignons.
- La reproduction à travers une bonne fécondation et une bonne fructification.
- La qualité des produits (tissus riches en phosphore) pour l'alimentation des hommes et des animaux.

Finalement, une alimentation adéquate et convenable en P permet un développement harmonieux des plantes qui peuvent prélever les quantités nécessaires de nutriments dont elles ont besoin. Cependant, Une carence en phosphore des plantes ralentit la croissance et affaiblit la plante. Les feuilles âgées prennent une coloration violette, principalement sur la face du dessous et se dessèchent anormalement tôt. La floraison, les graines et les fruits sont significativement réduits (Khan, et *al.*, 2014).

3.3.Mécanisme de la solubilisation du phosphate

Dans les sols agricoles, la dissolution des phosphates est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol (Tardieux-Roche, 1966 ; Richardson, 2001 ; Behera et *al.*, 2013). En effet, la rhizosphère est riche en exsudats racinaires tels que les acides organiques et qui sont qualifiés d'excellentes sources d'éléments nutritifs possédant la

propriété de supporter la survie des microorganismes, ceci explique leur énorme intensité aussi bien au niveau du sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique (Hinsinger, 2001; Singh et Amberger, 1998). Cependant, il faut signaler que la population et la distribution des microorganismes intervenant dans la dissolution du phosphore au niveau de la microflore totale, varient de l'un à l'autre (Chabot, et *al.*, 1993; Zoysa, et *al.*, 1998). En plus, à l'inverse d'autres microorganismes, la majorité des bactéries perdent leur propriété de solubiliser les phosphates après plusieurs repiquages successifs (Kucey et *al.*, 1989).

Plusieurs chercheurs ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (Hedley et *al.*, 1990; Hinsinger, 2001). En effet, certaines souches bactériennes chimioautrophes tirent leur énergie de croissance de l'oxydation de certains éléments chimiques avec production d'acides (Pelmont, 1993; Swaby et Fedel, 1973). C'est ainsi que les souches thiooxydantes sont capables de produire de l'acide sulfurique par oxydation du soufre élémentaire et de certains sulfures présents dans les sols (Germida et Jansen, 1993; Wainwright et *al.*, 1984). De même, le genre *Nitrosomonas* peut produire de l'acide nitrique par oxydation de l'ammonium présent dans les sols (Reyes et *al.*, 1999b). Les acides ainsi produits vont faire baisser le pH du milieu et ainsi dissoudre les phosphates naturels, réalisant en quelque sorte une fabrication biologique du superphosphate (Narsian et Patel, 2000). La quantité d'acide produite par l'oxydation microbiologique et la baisse de pH varient en fonction du genre et de l'espèce microbienne considérée.

Les travaux de Illmer et Schinner (1992) ont montré que la dissolution des phosphates naturels n'est pas absolument liée à une baisse de pH. En effet, certains microorganismes libèrent dans leurs milieux des acides organiques capables d'extraire le phosphore dit 'assimilable' en séquestrant les cations métalliques intervenant dans l'adsorption du phosphore (Milagres et *al.*, 1999; Sayer et *al.*, 1995; Vasquez et *al.*, 2000) et en libérant le phosphore lié aux argiles et aux oxydes de fer et d'aluminium (Violante et *al.*, 1996; Asuming-Brempong, 2014). Goldstein (1986), a montré que l'acidification de l'espace péri plasmique par oxydation directe du glucose en acide gluconique, est le processus majeur utilisé par les bactéries Gram négatives pendant la dissolution des phosphates minéraux. Le pouvoir chélateur d'un acide organique donné par rapport à un métal donné, varie avec le pH. Par exemple Cline et *al.*,

(1982) ont montré que l'acide citrique chélate préférentiellement le fer à pH 6,0 alors qu'à un pH au-dessus de 6,0, apparaît une compétition entre le calcium et le fer. De même, l'acidification artificielle du milieu de culture par ajout d'acide minéral industriel, a provoqué une dissolution inférieure à celle obtenue en utilisant les microorganismes, ce qui suggère que les acides organiques sont plus efficaces dans la dissolution des phosphates inorganiques que les acides minéraux et permettent par conséquent une meilleure nutrition phosphatée des plantes à partir des phosphates inorganiques. Les acides organiques produits au niveau de la rhizosphère, le sont essentiellement par les microorganismes rhizosphériques et les racines de certaines plantes. Ainsi, tous les facteurs agissant sur les microorganismes rhizosphériques occasionnent des variations de la solubilisation des phosphates inorganiques.

III. Production des hormones de croissance

Au cours de sa croissance et son développement la plante passe par diverses étapes, parmi lesquelles on cite : l'élongation des racines primaires, la division cellulaire, la différenciation tissulaire et la dominance apicale. L'ensemble de ces étapes sont régulées par l'action des hormones qui peuvent jouer le rôle de régulateur de croissance. Ainsi on définit les régulateurs de croissance des plantes comme étant des substances qui agissent sur les fonctions physiologiques des végétaux à de très faibles concentrations et modifient ou contrôlent un ou plusieurs processus spécifiques du métabolisme d'une plante. Les hormones végétales sont des messagers chimiques affectant la capacité de la plante à réagir avec son environnement et à répondre aux stress biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent que l'utilisation des hormones en tant que molécules signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres micro-organismes (Spaepen et *al.*, 2007).

Les PGPR sont les microorganismes les plus connus comme étant des producteurs d'une grande variété de phytohormones. Malgré que le rôle de ces phytohormones synthétisées par les microorganismes, n'est pas encore bien élucidé, il est à signaler que les mécanismes d'action directs des PGPR sur la survie des espèces végétales englobent la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques ainsi que l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden 1995 ; Glick, 2012; Lucy et *al.*, 2004).

1. Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman et *al.*, 2009 ; Khan, 2014), et quantitativement le plus produit par les PGPR. En tant qu'une molécule de signal, il accomplit un rôle primordial dans le développement des plantes, tout en agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008 ; Chaiharn, et Lumyong, 2011). Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Sans oublier son appui au niveau rhizosphérique et qui se manifeste dans le maintien de la croissance des populations microbiennes. Ainsi, une étude antérieure a montré que son addition influence positivement le poids des tiges et des racines du blé (Narula et *al.*, 2006) (Figure 2). Chez le groupe des microorganismes plusieurs bactéries sont capables de produire de l'AIA. Selon les statistiques, une grande proportion (80%) de bactéries colonisant la rhizosphère le synthétise, les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices (Loper et Schroth, 1986 ; Khan, 2014). Néanmoins, la colonisation des racines avec des espèces de *Bacillus* et *Paenibacillus* productrices d'AIA afin d'améliorer la croissance des plantes est largement connue (Kloepper et *al.*, 2004 ; Idris et *al.*, 2007).

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter la biosynthèse de l'AIA. Notamment, un pH élevé et la présence de grandes quantités de tryptophane qui entraînent l'augmentation de sa production (Spaepen et *al.*, 2009 ; Küçük, 2013). De façon générale, l'AIA est considéré comme un métabolite secondaire, produit par les PGPR suite à l'emploi des substrats riches exsudés par les racines des plantes. L'AIA et ses analogues actifs dans la plupart des plantes sont synthétisés à partir du tryptophane comme principal précurseur. Les exsudats des racines des plantes sont la source principale du tryptophane dans le sol (Spaepen et *al.*, 2007). Pour le moment, le nombre des voies de biosynthèse est de six voies, dont cinq sont identifiées dépendantes du tryptophane, et une en est indépendante. Cette voie dépend de la présence d'indole-3-glycérolphosphate. Chez les plantes, la plupart de l'AIA se trouve sous une forme conjuguée ce qui permet son stockage et empêche sa dégradation (Spaepen et *al.*, 2007).

La capacité de biosynthèse de l'auxine peut être utilisée comme un outil pour le dépistage des souches PGPR efficaces (Khalid *et al.*, 2004). En particulier, la production de l'AIA semble être une propriété de la promotion de la croissance de la plante la plus répandue parmi les PGPR.

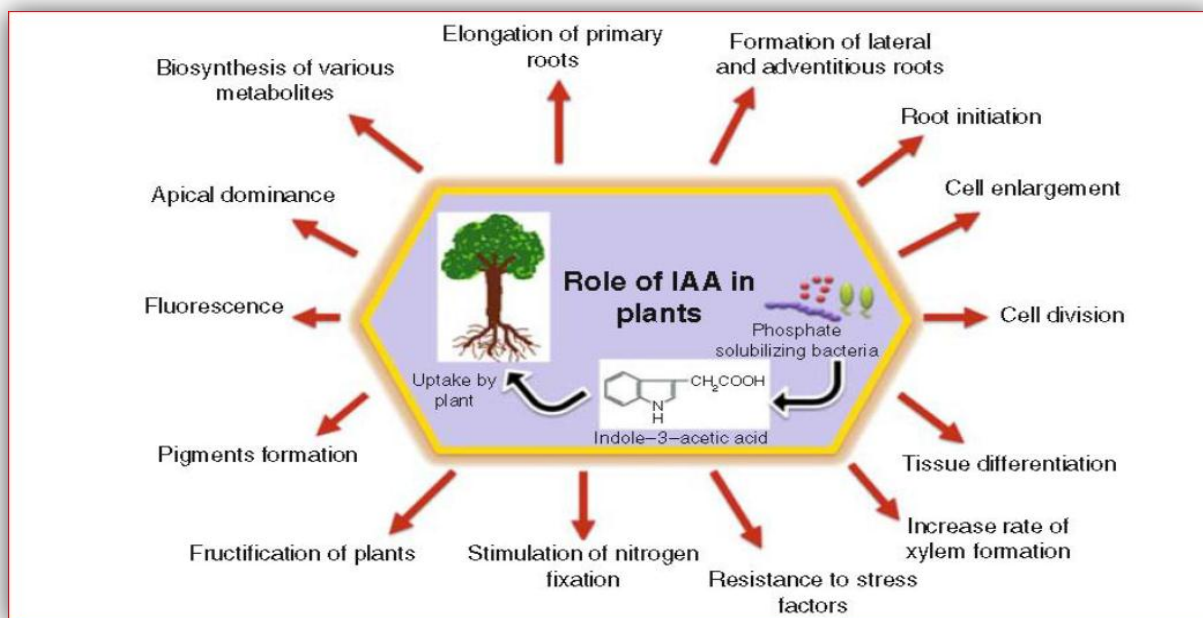


Figure 2 : Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan *et al.*, 2009).

2. Cytokinines et gibbérellines

Les cytokinines sont des aminopurines N6-substituées qui contribuent par leur rôle majeur-clé dans nombreux événements physiologiques dont on cite : la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Ferguson et Lessenger, 2006; Khan, 2014). En outre, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansine, protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes, la turgescence et l'expansion de la cellule végétale, ce qui a un impact à la fois sur la taille et la forme des cellules (Downes *et al.*, 2001).

Le gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse des cytokinines a été initialement caractérisée chez *Agrobacterium tumefaciens* (Nester *et al.*, 1984) et ensuite chez les bactéries méthylotrophes et méthanotrophes (Ivanova *et al.*, 2001).

Depuis, de nombreuses PGPR y compris *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas spp.* se sont révélées être productrices de cette hormone (Nieto et Frankenberger 1989; Timmusk et al., 1999).

Des expériences d'inoculation des graines avec des bactéries productrices de cytokinines ont prouvé une amélioration de la croissance et du développement des espèces végétales testées suite à une augmentation du taux de cytokinines chez ces dernières (Arkhipova et al., 2005). Divers stress environnementaux peuvent aussi engendrer l'accumulation des taux élevés de cytokinines végétales (Arkhipova et al., 2007). Une corrélation positive a été observée chez plusieurs espèces de légumineuses entre le taux de cytokinines chez les plantes et la capacité de *Rhizobium* de former des nodules sur les racines (Yahalom et al., 1990; Hirsch et Fang, 1994).

Les gibbérellines sont les produits de synthèse des plantes supérieures, les champignons et les bactéries ; ce sont des acides diterpéniques constitués de résidus isopréniques. L'identification et la caractérisation des composés gibbérellines a permis de différencier entre 136 gibbérellines différentes (MacMillan, 2002). Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (Guo et al., 2011 ; Khan, 2014). Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini et al., 2004). La production des gibbérellines a été signalée pour la première fois chez *A. brasilense* (Tien et al., 1979) et *Rhizobium* (Williams et Sicardi de Mallorca, 1982) puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Mitter et al., 2002; Tsakelova et al., 2006; Joo et al., 2009). Les PGPR productrices de gibbérellines et leur pouvoir promoteur de la croissance des plantes ont été mentionnés dans plusieurs recherches et travaux scientifiques de ce genre et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux (Atzhorn et al., 1988; Gutierrez-Manero et al., 2001; Joo et al., 2009).

IV. Facteurs affectant la solubilisation du phosphate

Le phosphate naturel est l'un des éléments essentiels pour assurer la croissance et la survie des plantes, tout en satisfaisant leurs besoins en source de phosphore. En effet, son utilisation directe ou sous forme acidulée nécessite des conditions pour favoriser sa solubilisation et pour garantir sa disponibilité dans le sol (Bationo et *al.*, 1998; Toro et *al.*, 1998). Ces conditions sont celles qui stimulent l'activité microbienne (Germida et Jansen, 1993). Elles peuvent être associées à la fois au sol et aux facteurs extérieurs au sol (Morel, 1996).

1. Facteurs liés à la source de phosphore

La dissolution de la phosphate roche est un caractère très important, qui renseigne sur son efficacité agronomique. Elle dépend en grande partie de la composition chimique et minéralogique de la roche considérée (Chien, 1977). Les résultats des études sur la solubilité des phosphates roches, ont confirmé que généralement la solubilité croît avec l'augmentation des structures de substitutions du carbonate pour le phosphore dans la structure de la phosphate roche. D'autres recherches similaires, ont annoncé que la solubilité des phosphates roches corrèle bien avec la réponse des cultures. Ainsi, Engelstad et *al.*, (1974) ont rapporté une variation du rendement du riz flottant en fonction de la solubilité du phosphate roche dans l'acide citrique. De même, Truong et *al.*, (1978) comparant des phosphates de solubilité différentes provenant d'Anecho au Togo, de Kodjari au Burkina Faso, de Tahoua au Niger, du Tilemsi au Mali et de Matam au Sénégal; ont trouvé que seuls les phosphates de Tahoua et de Tilemsi sont souhaitables pour une application directe. Ces deux phosphates ont une solubilité moyenne dans l'acide citrique variant de 3.2 à 5%.

2. Facteurs physiques

La structure et la texture du sol sont deux paramètres qui peuvent influencer soit de façon directe ou indirecte l'activité microbienne. Ainsi, au niveau d'un sol de nature sableux suffisamment humide, il apparait clairement que la propagation de l'activité microbienne est rapide. Alors que, dans un sol de nature argileux, l'argile tend à former avec les substances organiques des complexes organo-minéraux dans lesquels ces substances deviennent moins accessibles aux microorganismes entraînant

un ralentissement de l'activité microbienne dans ces sols (Morel, 1996). En plus, la nature et la concentration microbienne sont en relation avec la qualité structurale du sol (Morel, 1996). De même, la vie microbienne est intimement corrélée à la quantité d'eau présente dans le sol (Bationo et Mokwunye, 1991; Ssali et Gupta, 1990). Cette activité croît avec la teneur en eau, avec un maximum se situant au voisinage de 60%, les bactéries étant parmi les microorganismes les plus sensibles aux changements de l'humidité du sol (Morel, 1996). En plus, pour chaque espèce microbienne il existe un seuil de température au-dessous duquel son activité est nulle. Ainsi, la plupart des bactéries ont un optimum d'activité entre 25 et 40°C. Ainsi, il semble que l'étude des facteurs physiques est très importante pour l'intensité de la vie microbienne du sol, quoique Morel (1996), a annoncé que l'activité microbienne d'une saison donnée est principalement orientée par la combinaison humidité et température du sol.

3. Facteurs chimiques

Le pH est un paramètre très important, qui conditionne la vie microbienne. Chaque espèce microbienne a ses propres intervalles de pH dans lesquels elle est active. Au sein de la rhizosphère un pH qui est relativement faible, agit de façon bénéfique sur l'activité des microorganismes solubilisant les phosphates inorganiques (Hedley, 1990). Ainsi, Engelstad et *al.*, (1974), ont montré, suite à une expérience au champ, que le pH du sol a un faible effet sur la réponse du riz au triple superphosphate; cependant, l'efficacité des phosphates naturels dépend du pH. Au pH 4.6 le riz flottant répond bien à l'application du phosphate naturel, le degré de réponse dépend de la réactivité de la phosphate roche. Cependant, à pH 8.0 tous les phosphates naturels sont inefficaces et n'améliorent pas la production du riz par rapport au contrôle. Le contenu en calcium du sol joue un rôle important dans la dissolution des phosphates inorganiques.

Doumbia et *al.*, (1993) ainsi que Toro et *al.*, (1998) ont montré que la stimulation de l'activité des bactéries solubilisatrices du phosphore entraîne une diminution du calcium échangeable du sol et favorise la dissolution des phosphates naturels. En plus du contenu en calcium, l'état d'aération du sol a été reconnu comme facteur important de la dissolution des phosphates inorganiques. La nature de la flore microbienne dépend de l'état d'aération du sol qui détermine le pouvoir d'oxydoréduction de la portion de sol considérée. Ainsi, selon Morel (1996), un sol bien aéré favorise

l'activité des microorganismes aérobies qui tirent leur énergie de l'oxydation des substances organiques mortes avec comme accepteur d'électrons l'oxygène. En plus, les microorganismes du sol requièrent pour leur croissance un ensemble d'éléments chimiques, classés en macroéléments (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg) et en micro-éléments (Cu, Zn, Mn, Mo, V...). Ainsi, la déficience d'un ou de plusieurs de ces éléments peut inhiber la dissolution des phosphates naturels en agissant négativement sur l'activité des microorganismes (Morel, 1996).

I. Matériel biologique

Pour atteindre les objectifs de cette étude, nous avons utilisé un stock d'isolats (80 isolats), préalablement prélevés à partir des nodules de quatre espèces d'*Acacia* de différentes régions du Maroc : *Acacia cyanophylla* (Fès, Tanger, Casablanca, Nador, Errachidia, Saïdia, Berkane, Tetouan, Martil); *Acacia mollissima*, (Meknes); *Acacia horrida* (Berkane, Fès, Kénitra, Rabat) et *Acacia nilotica* (Errachidia).

II. Caractérisation enzymatique des isolats étudiés

1. Recherche de l'activité amylase

L'activité amylase des isolats a été détectée sur milieu solide YMA à base d'amidon (où le mannitol a été remplacé par l'amidon) (Annexe 1).

Pour cela, une culture bactérienne a été préparée préalablement : C'est à l'aide d'une anse stérile (flambée et refroidie) qu'une seule colonie a été prélevée aseptiquement à partir d'une culture par épuisement sur boîte de pétri, puis ensemencée dans un tube contenant le milieu liquide (YMB). Ensuite, cette culture a été incubée sous agitation pendant 3 jours à 28 ± 2 °C.

A partir de cette suspension bactérienne un volume de 10µl de chaque isolat a été ensemencé par touche (sous forme d'un spôt) sur des boîtes contenant le milieu YMA à base d'amidon. Après incubation à 28 ± 2 °C pendant 72 heures, la révélation a été faite par addition de 3 ml d'une solution iodée (Annexe 2) sur les boîtes pendant 15 minutes, suivie par deux rinçages à l'eau distillé. L'hydrolyse de l'amidon, en milieu solide par un microorganisme, se traduit par un halo clair autour de la colonie. Si les microorganismes sont amylase négative, le milieu reste inchangé et uniformément opalescent (Sodhi et al., 2005).

2. Recherche de l'activité cellulase

L'activité cellulase a été mise en évidence en utilisant un milieu contenant de la carboxyméthyl cellulose (CMC) (Annexe 1) comme seule source de carbone. Ce milieu a été ensemencé par les isolats testés et leur croissance met en évidence la présence de l'enzyme cellulase.

A partir d'une suspension bactérienne fraîche préalablement préparée, un volume de 10µl de chaque isolat a été déposé (de la même manière que celle appliquée pour l'activité amylase) sur des boîtes contenant du CMC gélosé. La lecture des résultats est effectuée après incubation à 28 ± 2 °C pendant 24 à 48h. La mise en évidence de l'activité cellulolytique a été faite par l'ajout d'une solution de rouge

Congo (Annexe 2) à une concentration de 1mg/ml pendant 15 minutes, suivie de trois rinçages avec une solution de NaCl (1M).

Les colonies développant une auréole jaunâtre montrent que les souches en question possèdent une activité cellulase (Verma et *al.*, 2007).

3. Recherche de l'activité nitrate réductase

L'activité nitrate réductase a été détectée par ensemencement des isolats en milieu liquide Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Annexe 1) (Beringer, 1974) contenant 0,1% de KNO₃ (p/v). Ainsi, des tubes contenant 8 ml du milieu de culture liquide (TY) ont été ensemencés avec un volume de 25µl de culture bactérienne fraîche de chaque isolat.

Puis l'ensemble des tubes ont été incubés pendant 4 jours à 28 ± 2 °C sous agitation 150 rpm. Au terme de l'incubation, la révélation a été réalisée par addition des réactifs nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et nitrate réductase 2 (a-naphtylamine dans l'acide acétique 5M). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates ont été réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue. Après ajout du zinc, si le milieu ne change pas de coloration, nous disons que la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase et le vice versa (Beringer, 1974).

4. Solubilisation des phosphates

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate a été testée sur un milieu Pikovskaya (PVK) (Annexe 1) contenant 0,5% de phosphate tricalcique (Ca₃(PO₄)₂) comme source de phosphate insoluble (Pikovskaya, 1948). Ce test a été réalisé par deux méthodes :

4.1.Solubilisation des phosphates sur milieu solide : test qualitatif

Un volume de 10 µl de suspensions bactériennes issues de précultures fraîches, a été déposé à la surface du milieu PVK solide additionné de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948). Après incubation à 28 ± 2 °C pendant 7 jours, le diamètre de la colonie et de l'halo qui l'entoure ont été mesurés. L'indice de solubilisation a été calculé par la formule suivante :

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

4.2. Solubilisation des phosphates en milieu liquide : test quantitatif

Les isolats sélectionnés à la suite du premier test et qui ont présenté un indice de solubilisation élevé ont été soumis au test quantitatif. Ainsi, 50 ml du milieu PVK liquide a été inoculé avec 50 μ l de cultures bactériennes fraîches et incubé à 28 ± 2 °C pendant 7 jours sous agitation modérée 120rpm (Cherif, 2014).

Les cultures ont été ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 15 min. La quantité de phosphate soluble a été mesurée par la méthode colorimétrique d'Olsen (Olsen et Sommers, 1982). Pour ceci 1ml du surnageant a été ajouté à 10ml d'acide chloromolybdique (12mM) (Annexe 2) et 0.25ml de chlorure d'étain SnCl₂ (5 mM) (Annexe 2). Ce volume a été ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée (Ravikuma et *al.*, 2009). Le développement d'une couleur bleue indique la production de phosphates solubles. La concentration du phosphate a été déterminée par la mesure de la densité optique à 660nm (Cherif, 2014). Une courbe d'étalonnage standard a été effectuée avec une solution de KH₂PO₄ (Annexe 3) (W Jackson, 1973).

Afin d'étudier l'effet de la source d'azote sur la capacité des rhizobactéries isolées à solubiliser les phosphates sur milieu liquide, différentes sources ont été testées. Pour cela le sulfate d'ammonium du milieu PVK liquide a été remplacé par l'une des sources d'azotes suivantes : Nitrate d'ammonium, Nitrate de sodium, Nitrate de potassium et Asparagine à une concentration de 0.1%. (Kranthi Kumar et *al.*, 2014).

De plus, Les isolats ont été testés pour leur capacité à utiliser différentes sources de carbone. Le glucose du milieu PVK liquide a été remplacé par l'un des sucres suivants : Fructose, Inositol, Lactose, Mannitol, à une concentration de 1% (Kranthi Kumar et *al.*, 2014). Ces sucres ont été ajoutés après la stérilisation du milieu par autoclavage vue le risque de leur dégradation à haute pression et à température élevée. Des solutions stocks de ces sucres ont été préalablement préparées et stérilisées par filtration.

III. Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

➤ Production d'Acide Indole Acétique (AIA) en milieu solide : test qualitatif

Sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) additionné de tryptone 0.2%, nous avons déposé un volume de 10 μ l d'une jeune suspension bactérienne préalablement préparée. Chaque boîte a été recouverte par un disque stérile de papier filtre Whatman. Après incubation de 48 heures à 28 ± 2 °C, le papier filtre a été retiré et plongé dans une solution (2% FeCl₃ 0.5M dans l'acide perchlorique 35%) (Naik et Sakthivel, 2006). Ce réactif en présence d'AIA donne une

coloration rouge violacée. La production de l'AIA a été révélée par la coloration rouge du disque.

➤ **Production d'Acide Indole Acétique (AIA) en milieu liquide : test quantitatif**

La production d'AIA dans la culture liquide a été déterminée par la technique colorimétrique. En effet, des erlenmeyers contenant le milieu YMA liquide additionné de tryptone 0.2%, ont été inoculées avec 100µl de la culture bactérienne à tester. Ensuite les erlenmeyers ont été incubés pendant 28h à 72 h ± 2 °C sous agitation 120 rpm (Leveau et *al.*, 2005). Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 30 min. Le surnageant (50 µl) a été mélangé avec 450 µl de tampon phosphate. A partir de ce mélange 60 µl ont été ajoutés à 500 µl de réactif Salkowski (12 g de FeCl₃ par litre de 7,9 M H₂SO₄). Le développement d'une coloration rose-rouge indique la production de l'acide indole acétique. La densité optique a été mesurée à 530nm et les concentrations de l'AIA sont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Annexe 4) (Rabhi, 2012).

IV. Caractérisation moléculaire des rhizobiums isolés

1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des isolats étudiés a été obtenu par la méthode d'extraction au CTAB (Bromure de Céthylméthyl Ammonium) décrite par Ivanova et *al.*, (2000); avec quelques modifications (Berrada et *al.*, 2012).

Cette technique consiste à l'utilisation d'une variété de solvants organiques, induisant la fragilité de la membrane plasmique et par la suite la libération du matériel génétique. Le protocole suivant explique clairement l'ensemble des étapes de l'extraction de l'ADN génomique par solvant :

Une colonie a été prélevée à partir d'une culture pure et jeune à l'aide d'une anse stérile, puis solubilisée dans 267 µl de Tris-EDTA (TE). Après agitation, 30µl de lysozyme (30 mg/ml fraîchement préparée) a été ajouté. Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, 3µl de protéinase K (20mg/ml) a été ajouté afin d'éliminer les protéines. Après une incubation à 37°C pendant 30 minutes, 40µl de SDS (10%) a été additionné. L'ensemble a été homogénéisé et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite, 100µl de NaCl (5M), et 80µl de CTAB (10%, NaCl 0.7 M), ont été ajoutés et le mélange a été soumis à une forte agitation puis incubé à 65°C pendant 10 minutes. Puis, le phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (25 :24 :1) ont été

additionnés à un volume égal au volume du mélange et centrifugé à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Après avoir repris le surnageant et noté le volume récupéré, le chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) ont été rajoutés à un volume égal à celui déjà noté. Après, 2.5 du volume de l'éthanol absolu à -20°C a été ajouté, et incubé à -20°C pendant une nuit.

Par ailleurs, les tubes ont été centrifugés à 12000 rpm pendant 30 min, le culot a été récupéré, bien lavé avec l'éthanol froid à 70% et centrifugé de nouveau à 12000 rpm pendant 5 minutes. Le produit de centrifugation a été séché dans l'étuve à 40°C pendant 30 minutes. Finalement le culot a été mis en suspension dans 30µl de TE et conservé au congélateur à -20°C pour une éventuelle réaction d'amplification.

2. Amplification par PCR de l'ADN_r 16 S

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) repose sur une amplification élective d'une séquence d'ADN double brin, effectuée in vitro par extension itérative de deux amorces, situées de part et d'autre de la région considérée, grâce à une ADN polymérase. Afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Rappelons que dans notre cas le gène d'intérêt est la séquence du gène de l'ADN_r 16S.

• Protocole de PCR

La réaction de polymérisation en chaîne a été réalisée dans un mélange réactionnel (Tableau1) qui comprend l'ADN bactérien, la Taq polymérase, les amorces (Tableau 2), MgCl₂, l'eau distillée stérile et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) dans une solution tampon.

Les tubes contenant le mélange réactionnel ont été soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois (35) un thermocycleur. L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes:

- **Dénaturation thermique** à 94°C pendant 30 secondes : A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux brins d'ADN monocaténares.

- **Hybridation des amorces** à 55°C pendant 30 secondes : Au cours de cette étape, les amorces s'apparient spécifiquement sur leurs brins complémentaires. La spécificité de

la PCR repose sur la qualité de cet appariement lié à la taille des amorces et à leurs séquences.

- **Elongation** à 72°C pendant 1 min 30 secondes. A cette température, les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléosides (présents dans le mélange en large excès). Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Chaque programme d'amplification est précédé par une dénaturation initiale de 5min à 94°C, et se termine par une élongation finale de 5 min à 72°C.

Enfin, les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Tableau 1 : Mélange réactionnel pour la PCR

Réactifs	Volume (µl)
H ₂ O	6.6
Tampon Taq (x5)	4
dNTP (10 mM)	2
MgCl ₂ (25mM)	1.2
Fd1 (10 µM)	2
Rs 16 (10 µM)	2
Taq polymérase (5U/µl)	0.4
ADN génomique	2
Volume final	20.2

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées

Amorce	Séquence nucléotidique 5'---»3'
Fd1	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'
Rs 16	5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3'

3. Electrophorèse sur gel d'agarose

- **Protocole de la préparation du gel d'agarose 1%**

1g d'agarose a été solubilisé dans 100 ml de TAE 1X (Annexe 2) puis chauffé jusqu'à ébullition.

Après refroidissement du gel à une température de 45°C, 2µl de BET (bromure d'éthidium) (10mg/ml) ont été ajoutés. Ce dernier sert comme marqueur de mobilité fluorescent utilisé pour la détection des acides nucléiques qui s'intercale entre les bases et donne une fluorescence orange une fois excité par les ultras violets permettant ainsi la visualisation d'ADN.

Puis, le gel d'agarose a été versé après avoir placé les joints de coulage et le peigne qui permet de marquer l'empreinte des puits de dépôt de l'ADN. Une fois le gel a été solidifié, les éléments de montage ont été retirés et le gel a été recouvert de TAE 1X. Ensuite, 2µl de chaque produit d'amplification ont été mélangés avec 2 µl d'une solution de charge (Annexe 2) permettant de poursuivre la migration, puis le mélange a été déposé dans un puit. Enfin la migration a été réalisée au moyen d'un générateur de courant 70 Volts. La migration a été arrêtée une fois le témoin de migration (bleu de bromophénol) a atteint les trois quarts de la longueur du gel.

4. Séquençage

- **Analyse informatique des séquences**

Les séquences du gène de l'ARN 16S obtenues sont comparées à une base de données de séquences de ce même gène pour différentes bactéries de référence. En fonction des homologues de séquences, le degré de parenté est alors déterminé. Cette comparaison est effectuée en utilisant le programme BLAST : Basic Local Alignment Search Tool, permettant à la fin de définir soit l'espèce soit le genre grâce au % d'identité :

- $97 < \% \text{ d'identité} \leq 99$: permet de déterminer le genre ;
- $\% \text{ identité} > 99$: permet de déterminer l'espèce ;
- Si le $\% \text{ d'identité}$ est inférieur à 97 % on ne peut pas faire d'indentification.

I. Résultats de la caractérisation enzymatiques des isolats étudiés

1. Activité amylase

L'évaluation de la capacité de l'ensemble des isolats à hydrolyser l'amidon nous a permis de mettre en évidence 28 isolats à activité amylase, ce qui représente un pourcentage de 35% (28/80). Le graphe suivant (Figure 3) regroupe les isolats à activité amylase ayant un diamètre de l'halo qui est supérieur à 12mm. Ce qui correspond à un pourcentage de 42.86% (12/28).

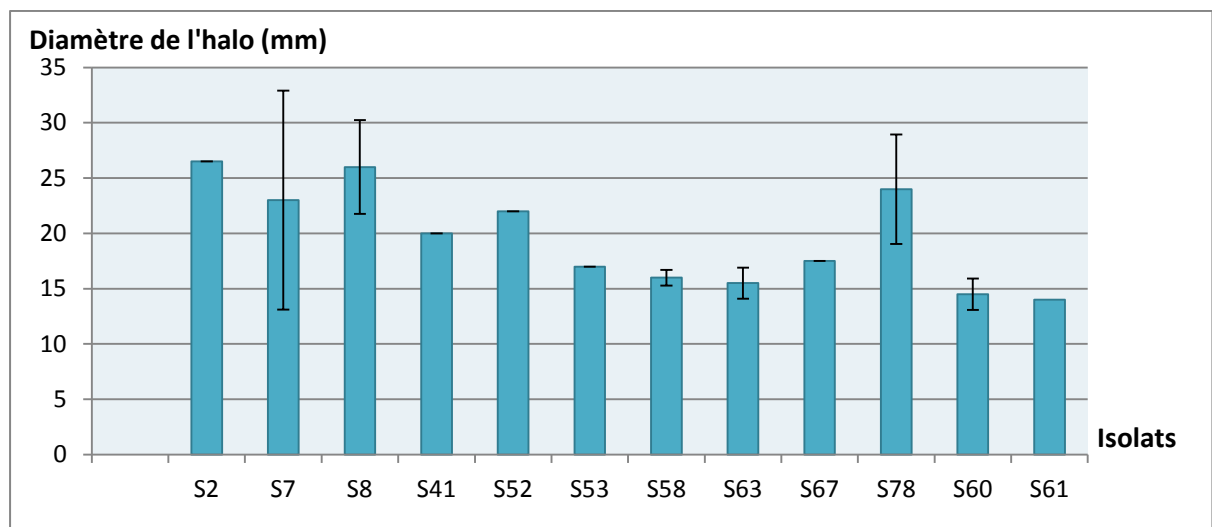


Figure 3 : Mise en évidence de l'activité amylase ayant un diamètre de l'halo supérieur à 12 mm.

Sur l'ensemble des isolats ayant une activité amylase positive, les isolats S2 et S8 ont montré une meilleure activité avec un diamètre d'halo de 26.5 mm et 26 mm respectivement suivi de S78 avec un halo de 24 mm. Cependant, la plus faible activité a été détectée chez S19 et S24 avec 5 mm. Ces résultats concordent avec ceux d'Oliveira et *al.*, (2007) qui ont montré que l'activité amylolytique la plus élevée correspondait à un diamètre de l'halot de 21.4 mm qui a été retrouvé pour l'isolat INPA R-926.

Par contre, une autre étude a détectée la meilleure activité chez l'isolat MR-22 avec un halo de 14 mm de diamètre qui est inférieur aux résultats obtenus pour certains isolats dans notre étude (Singh et Singh, 2014).

De plus, les diamètres des halos obtenus dans cette étude sont supérieurs à ceux trouvés par des travaux similaires (Singh et Singh, 2014). Par conséquent, nos isolats peuvent être des candidats qualifiés pour la production des amylases qui sont largement utilisées en industrie (Kumar et *al.*, 2012). En effet, les amylases microbiennes répondent généralement mieux aux exigences industrielles, en raison de la courte période de croissance des microorganismes, de productivité et de thermostabilité de ces amylases (Oliveira et *al.*, 2010). Aujourd'hui, un grand nombre d'amylases microbiennes sont disponibles en industrie et ont presque complètement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon dans l'industrie de transformation de l'amidon (Pandey et *al.*, 2000). En outre, en raison de l'importance industrielle de l'amylase, il y'a un besoin croissant dans le monde entier pour le criblage de nouveaux micro-organismes capables de produire des amylases appropriées pour des nouvelles applications industrielles (Oliveira et *al.*, 2010).

2. Activité cellulase

Sur les 80 isolats étudiés, 61.25% (49/80) ont montré une activité cellulase positive (Figure 4) avec un halo variant de 5 à 36 mm de diamètre détecté respectivement chez S13 et S43.

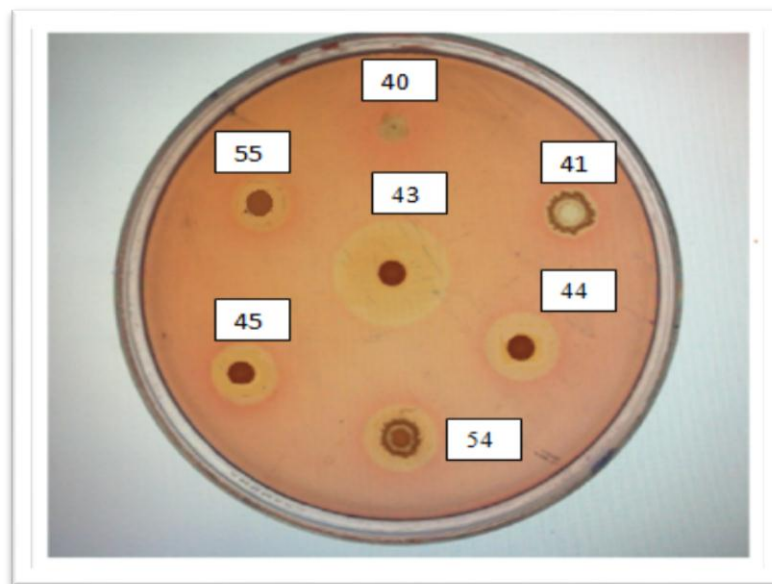


Figure 4 : Mise en évidence de l'activité cellulase sur milieu CMC solide

Parmi les 49 isolats à activité cellulase, nous en avons sélectionné 20 avec un diamètre d'auréole supérieur à 15mm (Figure 5).

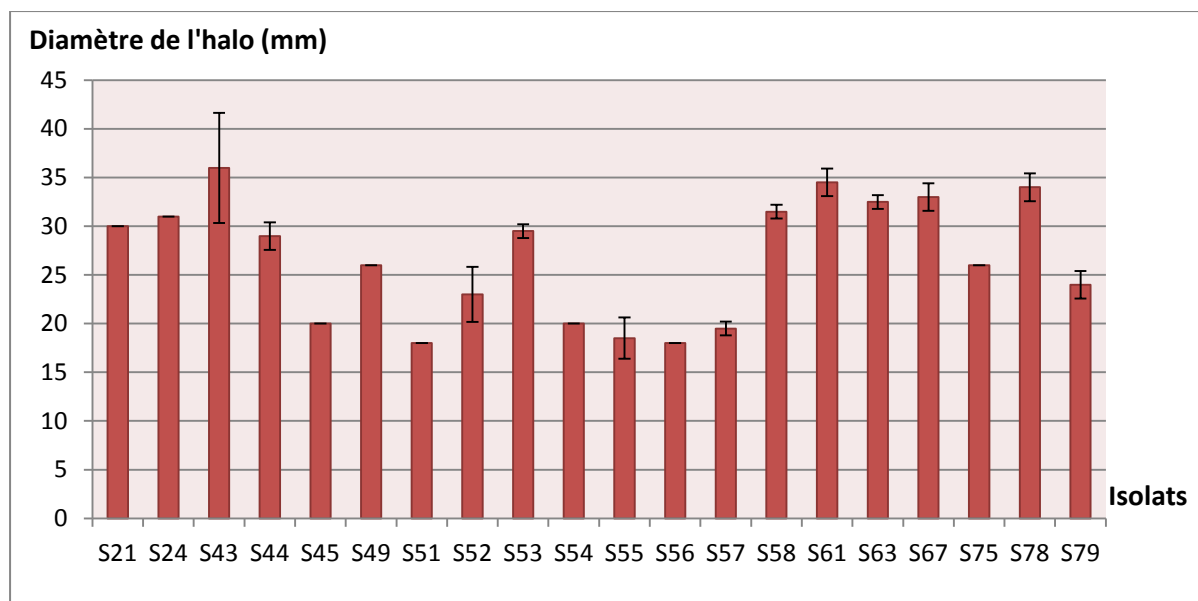


Figure5 : Mise en évidence de l'activité cellulase pour les isolats ayant un diamètre de l'halo supérieur à 15 mm.

Les résultats obtenus dans cette étude ont été concordants avec ceux obtenus par d'autres études précédentes, qui ont montré la capacité des rhizobactéries à produire la cellulase (Oliveira et *al.*, 2007, Sudto et *al.*, 2008). En effet, cette enzyme peut aider certaines rhizobactéries notamment les rhizobiums à pénétrer plus facilement dans l'espace intercellulaire de la cellule racinaire et induire l'infection symbiotique des racines de légumineuses (Robledo et *al.*, 2008; Ahmad, 2014).

3. Activité nitrate réductase

L'apparition de coloration rouge indicatrice de la réduction des nitrates a été signalée pour 41 tubes et montre que 51.25% (41/80) des isolats testés possèdent l'enzyme nitrate réductase. Ce résultat est similaire à celui d'El Hilali, (2006) qui a révélé la capacité de 52% des souches isolées du lupin à réduire le nitrate.

La variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents rhizobia (Mc Neil, 1982 ; Zahran, 1991). Par ailleurs, Munns (1968) a rapporté que la présence du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des rhizobia aux racines des plantes. En effet, un excès de nitrates peut provoquer une action inhibitrice sur la nodulation et l'activité de la fixation d'azote (Luciński et *al.*, 2002 ; Lebrazi et Fikri Benbrahim, 2014).

II. Solubilisation des phosphates

1. Sélection des isolats solubilisateurs des phosphates sur milieu solide (test qualitatif)

Sur l'ensemble des 80 isolats testés, 70% (56/80) des isolats ont été capables de solubiliser le phosphate inorganique sur le milieu PVK solide. Cette solubilisation a été traduite par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne. La variation du diamètre de cet halo montre qu'il y a une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphate entre les différents isolats testés (Figure 6). Le calcul de l'indice de solubilisation (IS) nous a permis de mettre en évidence la capacité solubilisatrice de chaque isolat bactérien afin de le comparer à d'autres.

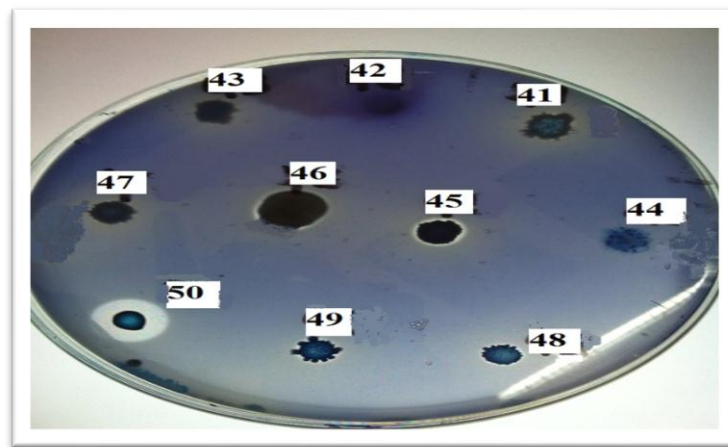


Figure 6 : Mise en évidence de la solubilisation des phosphates sur milieu PVK solide

Parmi ces isolats, cinq ont été, par rapport aux autres, très efficaces avec un indice de solubilisation variant de 120% à 200% (S50, S61, S63, S67 et S75), alors que la plus faible efficacité solubilisatrice a été observée chez S47 avec un indice de 11.11%.

Le graphe suivant (Figure 7) représente les différents isolats (13) dont l'indice de solubilisation est supérieur ou égal à 50%, et qui correspondent à un pourcentage de 23.21% (13/56) des isolats solubilisateurs des phosphates.

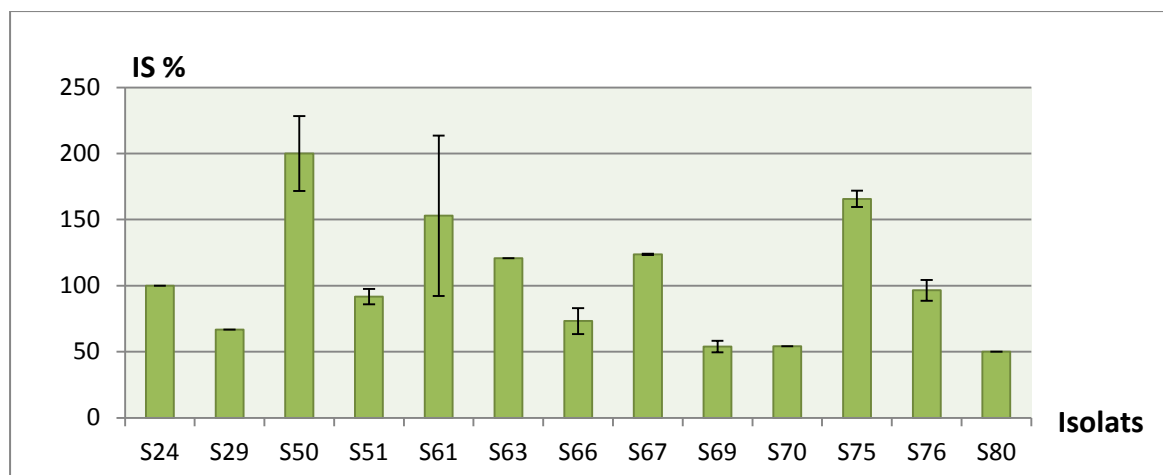


Figure 7 : indices de solubilisation des isolats ayant un indice de solubilisation supérieur ou égal à 50%

Les résultats obtenus au cours de ce test concordent avec plusieurs travaux précédents qui ont démontré la capacité des bactéries rhizosphériques de solubiliser les phosphates (Rodriguez et Fraga, 1999; Verma et *al.*, 2001). Ainsi, l'évaluation de cette activité solubilisatrice par une équipe iranienne chez différentes souches de *Rhizobium* a révélé un IS compris entre 248 pour *Rhizobium leguminosarum* *bv. Vicia* et 141% pour *Mesorhizobium ciceri*, *M. mediterraneum* et *Sinorhizobium meliloti* (Alikhani et *al.*, 2006). Ainsi, Pandey et *al.*, (2005) ont pu identifier une espèce *Burkholderia* *sp. MSSP* isolée à partir des nodules racinaires de *Mimosa pudica* caractérisée par un pouvoir de solubilisation du phosphate tricalcique élevé, avec un IS de 215%. Sridevi et Mallaiah, (2009) ont détecté une solubilisation maximale chez un isolat de *Rhizobium* isolé de *Chamaecrista absus* avec un IS de 150%.

2. Quantification du phosphate solubilisé par les bactéries solubilisatrices :

A partir des résultats obtenus lors du test qualitatif, nous avons sélectionné 10 isolats ayant des IS les plus importants : S50, S75, S61, S67, S63, S24, S29, S51, S66, S76, et qui ont fait l'objet du test quantitatif dont les résultats sont rapportés dans le graphe suivant (Figure 8) :

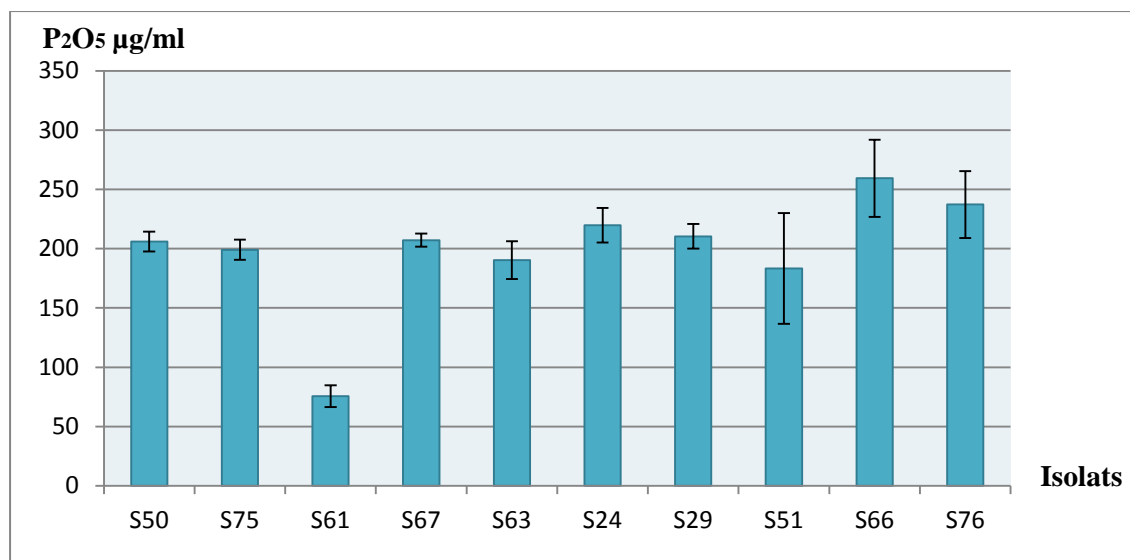


Figure 8 : Solubilisation des phosphates en milieu liquide (test quantitatif)

A partir du graphe ci-dessus (Figure 8) nous avons pu déduire que l'activité solubilisatrice des phosphates a été maximale chez l'isolat S66 avec une valeur de 259,34 µg/ml, alors qu'elle a été minimale chez l'isolat S61 avec une valeur de 75,5µg/ml. Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Aarab et *al.*, (2009) montrant une concentration de phosphate solubilisé qui oscille entre 9,62 µg/ml et 158,64 µg/ml. Cependant, d'autres études ont révélé des concentrations de phosphate solubilisé moyennement élevées par rapport à nos résultats (Kumar et Ram, 2009). Cela peut être expliqué par le faible volume inoculé dans le milieu liquide. Par ailleurs, ces résultats restent importants en comparaison avec ceux d'une étude réalisée sur d'autres rhizobactéries solubilisatrices de phosphate ayant montré des concentrations variant de 0 à 16.65 µg/m (Daimon et *al.*, 2006)l.

En effet, l'absence du phosphate soluble ou sa faible quantité chez certains isolats en milieu liquide seraient expliquées par leur déficience enzymatique (Chaiharm et Lymyong, 2009).

Ainsi, la comparaison de l'activité solubilisatrices des phosphates des deux tests : qualitatif (Figure 7) et quantitatif (Figure 8), a montré qu'il n'existe pas une relation entre l'indice de solubilisation (%IS) et la concentration maximale solubilisatrice des phosphates pour chaque isolats ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Baig et *al.*, (2010) et Yang et *al.*, (2012).

Ce résultat pourrait être attribué à divers facteurs qui peuvent influencer la solubilisation des phosphates. D'une part, en milieu solide, les acides organiques responsables de l'acidification et la solubilisation des phosphates circulent difficilement, ce qui n'est pas le cas en milieu liquide. D'autre part, en milieu liquide une agitation non adéquate peut contribuer à une mauvaise oxygénation et par conséquent une mauvaise multiplication bactérienne (Nautiyal, 1999).

En parallèle à la quantification des phosphates solubilisés, le pH a été mesuré pour les différents isolats (Figure 9), et les résultats obtenus ont révélé une acidification des milieux de culture sachant que le pH du milieu au départ a été ajusté à 7.

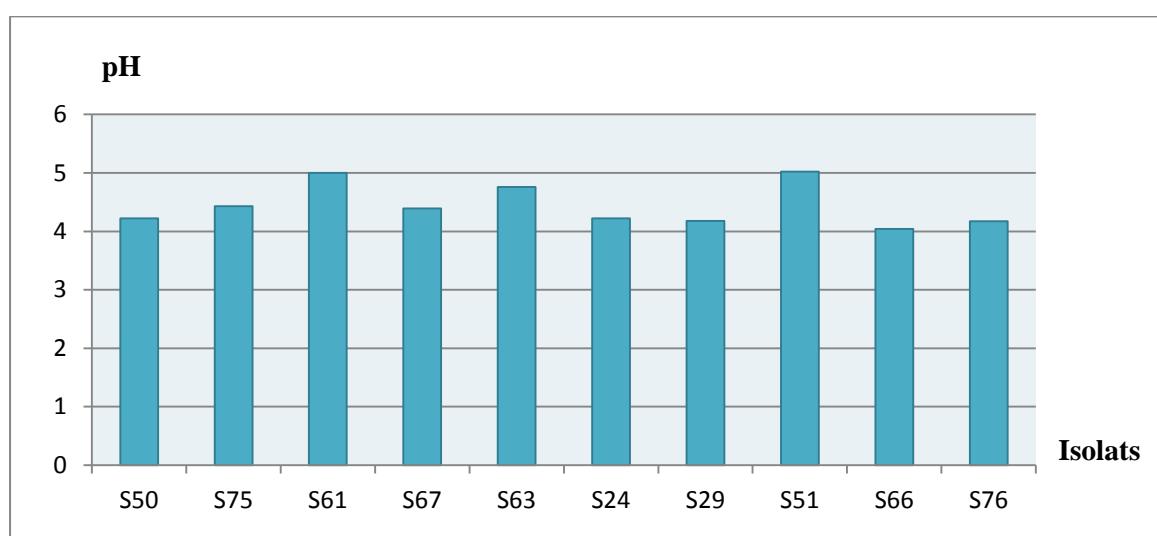


Figure 9 : pH final obtenu lors de la solubilisation de phosphate

D'après la figure 9, nous avons constaté l'existence une relation étroite entre le pH final et la concentration maximale de phosphate solubilisé. En effet, tant que la solubilisation de phosphate est maximale l'acidification du milieu l'est aussi. Ce qui rejoint les résultats de plusieurs recherches précédentes (Rabhi, 2012; Asuming-Brempong et *al.*, 2014). Sridevi et Mallaiah, (2009) ont montré que lors de la solubilisation du phosphate en milieu liquide, les bactéries acidifient l'espace périplasmique par une oxydation directe du glucose. Ceci conduit à la libération de différents acides organiques (tels les acides lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique) responsables de la solubilisation du phosphate en milieu liquide (Nautiyal, 1999).

2.1.Effet des sources de carbone sur la solubilisation des phosphates en milieu liquide

L'effet de différentes sources de carbone (1%) sur l'activité de solubilisation des phosphates a été étudié par le remplacement du glucose avec quatre sucres (mannitol, lactose, inositol, et fructose). Les résultats obtenus pour la solubilisation du P et pour le pH final ont été représentés dans les graphes suivants (Figures 10 et 11) :

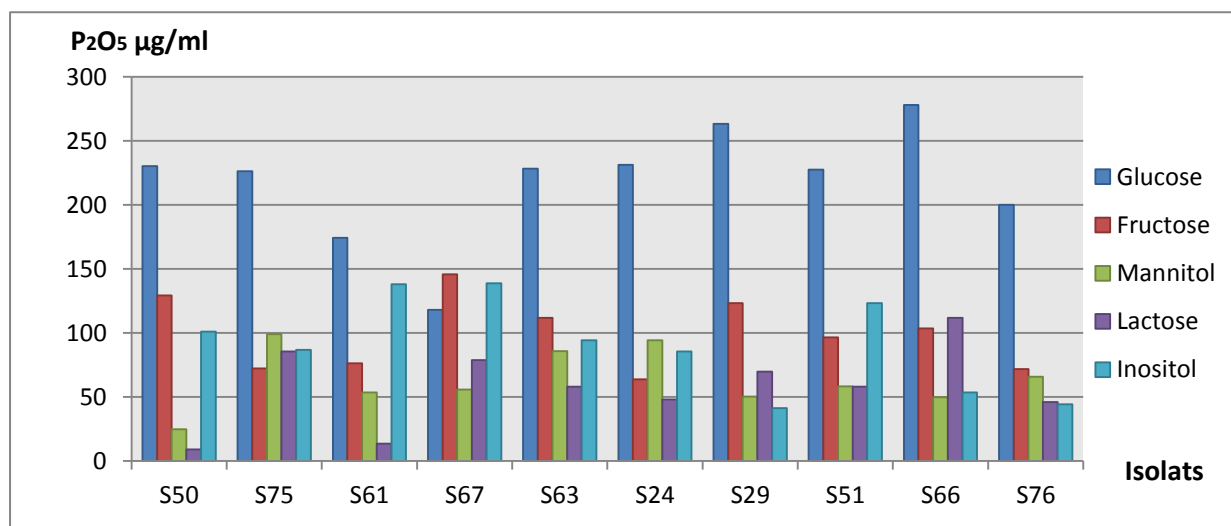


Figure 10 : Effet de la source de carbone sur la solubilisation de phosphate en milieu liquide

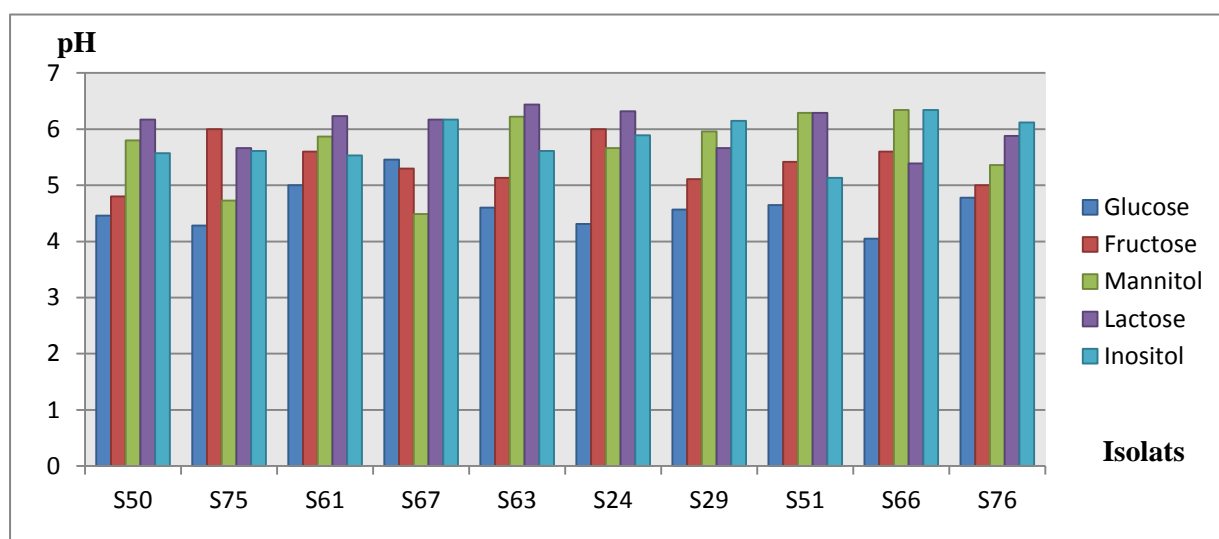


Figure 11 : pH final obtenu lors de la solubilisation de phosphate dans le milieu PVK avec différentes sources de carbone

D'après les résultats de la figure 10, nous avons pu déduire que la solubilisation maximale de phosphate a été enregistrée chez tous les isolats testés lorsque le glucose a été utilisé comme source de carbone. Ceci est en accord avec les résultats de plusieurs études précédentes (Sridevi et Mallaiah, 2007 ; Haltdar *et al.*, 1991).

Ainsi, La diminution du pH avec l'augmentation de la solubilisation du phosphate a été observée dans la présente étude (Figure 11), indépendamment des sources de carbone testées. Ce type de corrélation négative entre le pH et la solubilisation du phosphate a été signalé auparavant dans plusieurs études (Deve et Patel, 1999 ; Sridevi et Mallaiah, 2009 ; Kumar et Ram, 2014)

2.2.Effet des différentes sources d'azote sur la solubilisation des phosphates en milieu liquide

Pour étudier l'effet des sources d'azote (0,1%) sur la solubilisation des phosphates, différentes sources d'azote ont été ajoutées (nitrate d'ammonium, nitrate de sodium, nitrate de potassium et asparagine), pour remplacer le sulfate d'ammonium dans le milieu PVK liquide.

Les résultats de la solubilisation du P et du pH final ont été représentés dans les graphes suivants (Figures 12 et 13) :

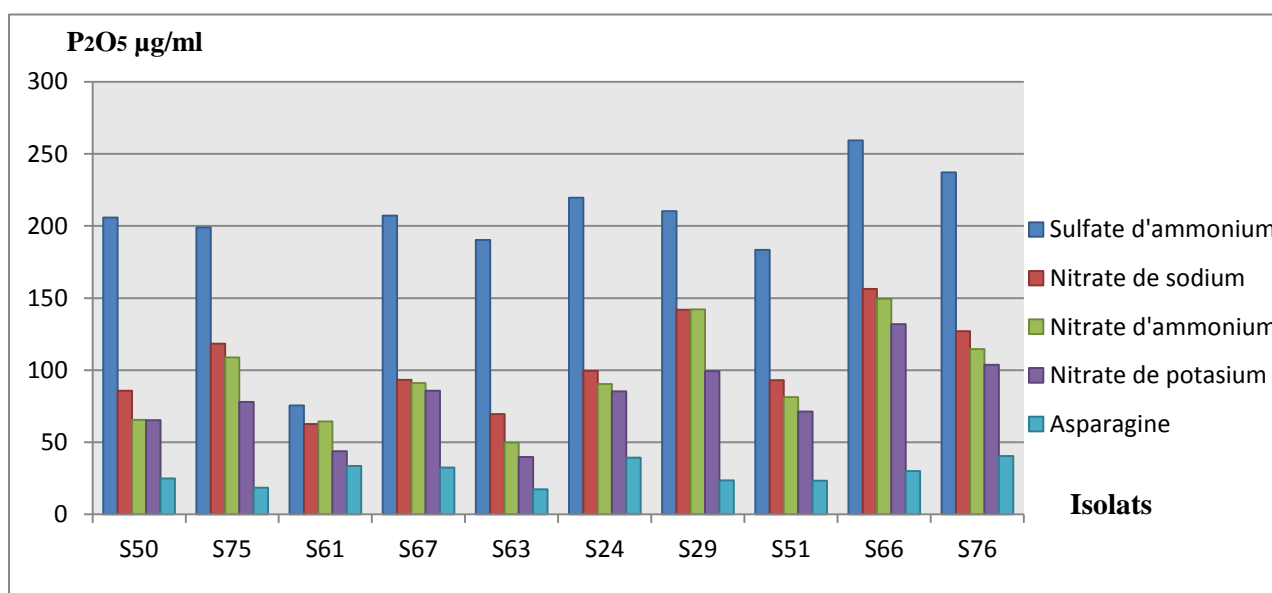


Figure 12 : Effet de la source d'azote sur la solubilisation des phosphates en milieu liquide

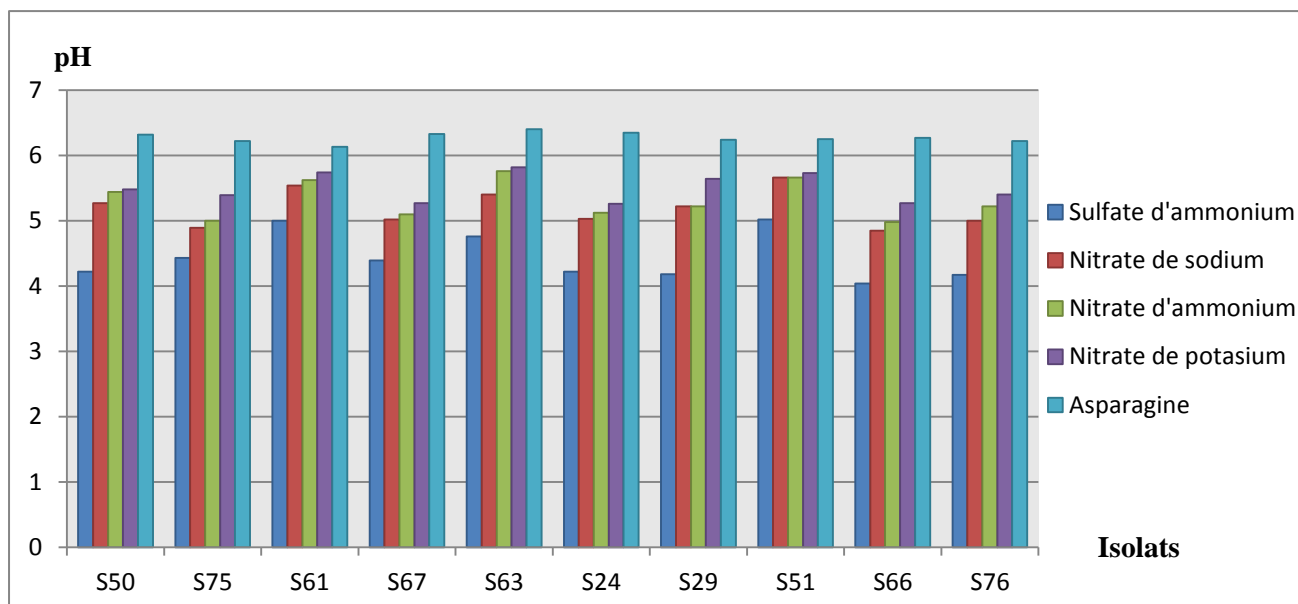


Figure 13 : pH final obtenu lors de la solubilisation de phosphate dans le milieu PKV avec différentes sources d'azote

Nous pouvons remarquer d'après les résultats du premier graphe (Figure 12), que les isolats utilisent différentes source d'azote. Le sulfate d'ammonium a donné une solubilisation maximale des phosphates pour tous les isolats testés tandis que la plus faible solubilisation a été notée pour l'asparagine. Ces résultats sont concordants avec les études de (Kumar et Ram; 2014). En outre, il a été observé que les sources d'azote inorganiques favorisent une meilleure solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par rapport aux sources d'azote organiques. Cela pourrait être dû à la production d'acides inorganiques par le mécanisme d'échange de proton en présence de NH_4^+ provoquant ainsi une accélération de la solubilisation de phosphate (Haldar et *al.*, 1991).

III. Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

Le test qualitatif de l'ensemble des isolats testés sur un milieu solide YMA additionné de tryptone 0.2%, nous a permis de mettre en évidence la production de cette hormone chez un seul isolat S77. La révélation de cette production est traduite par le changement de la couleur du disque de papier whatman en rouge en utilisant le réactif Salkowski.

Ainsi, la quantification de la production de l'AIA par l'isolat S77 en milieu liquide (Figure 14), nous a permis d'enregistrer une production de l'AIA de l'ordre :33 μ g/ml.

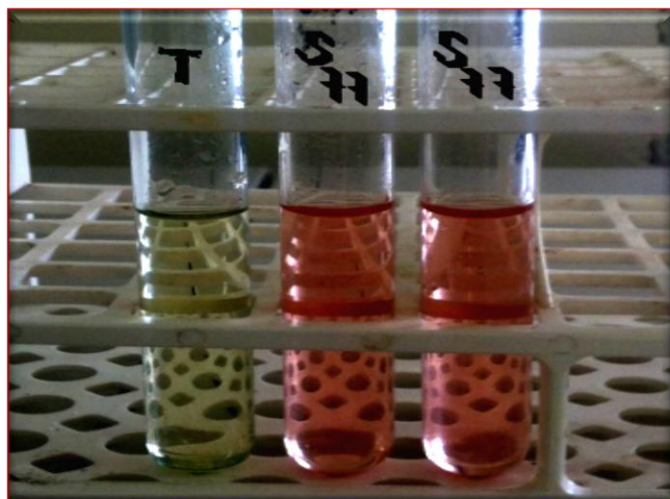


Figure 14 : Mise en évidence de la production de l'AIA en milieu YMA liquide

Au sein de la rhizosphère, presque 80% des bactéries sont capables de produire les hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est le plus reconnu. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2010). Malgré que le nombre d'isolats producteurs de l'AIA dans ce présent travail a été faible par rapport à des études antérieures (Mohite, 2013). La quantité d'AIA produite par notre isolat (33 μ g/ml) concorde avec les résultats de Mezaache (2012) qui ont montré un degré de production appréciable (quantitatif), avec une concentration variante de 31.5 à 57.5 μ g/ml.

En effet, Naik et Sakthivel (2006), ont suggéré que l'induction de la production d'AIA est probablement due à l'induction d'enzymes clé impliquées dans la biosynthèse d'AIA (Oberhansli *et al.*, 1991; Garcia de Salmone *et al.*, 2001). Ainsi, Selon Mirza *et al.*, (2001) et Mishra *et al.*, (2010), la production de cette hormone est influencée par les conditions de culture, le stade de croissance et par la disponibilité du substrat dans le milieu. L'absence de production chez certaines

souches serait liée à la perte de l'information génétique et du mécanisme physiologique de la biosynthèse de l'AIA.

IV. Caractérisation moléculaire des isolats

Différentes approches phylogénétiques permettent de classer les rhizobactéries. La PCR est intensément utilisée pour l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S (Graham *et al.*, 1991).

Dans cette étude, le gène ribosomique de l'ADN 16S de 10 isolats a été amplifié. L'analyse des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, nous a permis de révéler l'existence d'une bande unique chez l'ensemble des isolats (Figure 15).

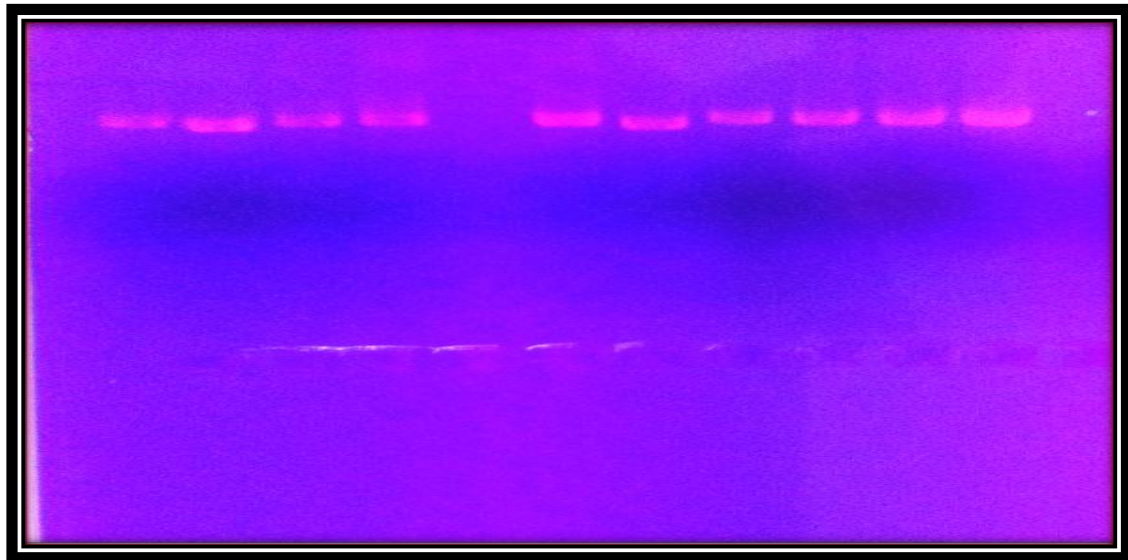


Figure 15 : Profil d'amplification sur gel d'agarose de dix isolats

Conclusion et perspectives

La rhizosphère est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les micro-organismes associés. Cet environnement particulier comprend une microflore microbienne qui inclut autant des micro-organismes bénéfiques que pathogènes. En effet, l'ensemble de ces bactéries bénéfiques regroupées sous le terme générique de rhizobactérie, joue un rôle important dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales par divers effets. Certaines agissent par effet direct, d'autres favorisent la croissance des plantes de façon indirecte (PGPR).

Par sa richesse naturelle, la rhizosphère est donc un nouveau continent à explorer et c'est à travers de ce modeste travail que nous avons pu découvrir ce merveilleux monde microbien.

Dans cette étude, une caractérisation des bactéries nodulant quatre espèces de légumineuse du genre *Acacia* a été réalisée.

La mise en évidence de l'activité enzymatique de 80 isolats sur milieu YMA solide à base d'amidon, a permis d'enregistrer 35% des isolats à activité amylase, avec un diamètre d'halo maximal de 26.5mm chez l'isolat S2. Par ailleurs, sur milieu de culture CMC solide 61.25% d'isolats à activité cellulase ont été sélectionnés, avec un diamètre d'halo maximal de 36mm chez l'isolat S43.

L'étude de l'activité nitrate réductase des 80 isolats sur milieu TY liquide additionné de 0.1% de KNO_3 , a révélé que 51.25% des isolats possèdent une activité nitrate réductase.

Afin de tester l'activité solubilisatrice des phosphates des 80 isolats, un test qualitatif et un test quantitatif sur milieu PVK contenant le phosphate tricalcique ont été réalisés. D'après les résultats du premier test, il s'est avéré que 70% des isolats sont capables de solubiliser les phosphates en milieu solide, avec un indice de solubilisation maximal de 200% (isolats S50). Alors que les résultats du deuxième test ont montré que la concentration maximale du phosphate solubilisé en milieu liquide a été de 278,11 μ g/ml (isolats S66). Ainsi, il semble qu'il n'y a pas de relation entre l'indice de solubilisation en milieu solide et la concentration du phosphate solubilisé en milieu liquide. Bien qu'il existe une relation étroite entre le pH final du milieu de culture et la concentration en phosphate solubilisé.

L'étude de l'effet des sources de carbone (glucose, fructose, lactose, mannitol, et inositol 1%) et des sources d'azote (nitrate d'ammonium, nitrate de sodium, nitrate de potassium et asparagine 0.1%), sur la solubilisation des phosphates en milieu liquide a révélé une meilleure solubilisation des phosphates en présence de glucose et de sulfate d'ammonium.

Quant à la production de l'AIA, seul l'isolat S77 a été capable de synthétiser l'AIA avec une quantité de l'ordre de 33µg/ml.

Ainsi, les isolats testés se caractérisent par une importante diversité enzymatique (amylase, cellulase, nitrate réductase et phosphatase). Par conséquent, ils peuvent être des candidats qualifiés pour promouvoir la production agricole tout en respectant et préservant l'équilibre environnemental.

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives semblent nécessaires à réaliser :

- Réaliser des études moléculaires plus approfondies (comme l'hybridation ADN/ADN et des analyses phylogénétiques) pour déterminer avec précision le statut taxonomiques des rhizobactéries étudiées.
- Etudier la capacité de ces rhizobactéries à tolérer différentes conditions de stress environnemental telles : la température, la salinité, le pHetc.
- Etudier le pouvoir des rhizobactéries isolées à produire d'autres phytohormones (cytokinines, 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, gibbérellines etc.) et procéder à la caractérisation d'autres activités enzymatiques telles : pectinases, lipases, chitinases, uréases.... etc.
- Exploiter les bactéries solubilisatrices des phosphates dans les champs, à travers l'inoculation des plantes par des produits biofertilisants à base de souches solubilisatrices de phosphore, afin de contribuer à la lutte contre l'utilisation intensive des engrais et des pesticides chimiques en agriculture.
- Exploiter les activités enzymatiques (amylases, cellulases.....)d'origine microbienne dans le domaine industriel et biotechnologique.