

Projet de Fin d'Etudes
Licence Sciences & Techniques
Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

**Effet de certaines bactéries rhizosphériques sur
la germination des graines de *Vicia faba L.***

Présenté par : Sayyad Safae

Encadré par :

- Pr. MIKOU Karima

- Pr. ERRACHIDI Faouzi

Soutenu le : 05/07/2022

Devant le jury composé de :

- Pr. EL GUENDOUI Souraya
- Pr. MIKOU Karima
- Pr. ERRACHIDI Faouzi

Année universitaire
2021/2022

Remerciements

Même si parfois les mots semblent fades à côté de la profondeur des sentiments, il faut pourtant les concrétiser en remerciements, pour honorer tous ceux qui m'ont aidé à franchir ce pas vers l'avenir.

Au terme de ce travail, je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, l'aide pour finir ce travail.

Je tiens à remercier Mr. EL GHADRAOUI Lahsen responsable du laboratoire, de m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de son équipe du laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Génie de l'Environnement à la FST de Fès.

Je voudrais aussi remercier très chaleureusement mon encadrant de stage Mme. MIKOU Karima, professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Fès, pour son encadrement, son accueil, ses précieux conseils tout au long de stage et pour m'avoir dirigée lors de ce travail.

Je tiens aussi à remercier Mr. ERRACHIDI Faouzi, Professeur de Biologie à la Faculté des Sciences et des Techniques de Fès, pour son encadrement, sa gentillesse et sa patience, sa disponibilité et le temps qu'il a consacré à ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Mr. JANATI Walid, doctorant à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, en tant qu'encadrant pour ses conseils, son aide à l'élaboration et le suivi de ce projet.

Résumé

Les rhizobactéries jouent un rôle important dans le maintien et l'équilibre du sol. Parmi ces bactéries, il y a celles qui ont montré leur capacité à favoriser la croissance des plantes. Elles sont connues sous le terme de rhizobactéries favorisant la germination des plantes, elles agissent positivement sur la croissance de la plante, en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux et jouent un rôle important dans la fertilité du sol. Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à étudier les effets de douze souches bactériennes sur la germination des graines de *Vicia faba*. Pendant 7 jours nous avons surveillé les paramètres de germination des graines inoculées in vitro et dans des conditions stériles. Les souches WJEF15, WJEF26, WJEF38 et le témoin commercial ont montré les meilleurs résultats ; un temps de latence court (59 heures) et un taux de germination élevé (allant de 70% à 80%). La deuxième partie de notre travail a consisté à cultiver les graines inoculées dans des pots contenant du sol stérile, les souches WJEF38, WJEF26 et le témoin commercial ont permis une plus forte germination. Ces résultats obtenus nous ont servi de sélectionner et de classer les bactéries les plus performantes pour stimuler la germination des graines.

Mots clés : Rhizobactéries, Germination, Inoculation, *Vicia faba*.

Liste des figures et tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition de certaines graines de légumineuses (% de la matière sèche, sauf pour acides aminés exprimés en g/16g N) (Feillet, 2000).	10
Tableau 2 : Résultats de la germination des graines de fève inoculées sur des pots	23

Liste des figures

Figure 1 : L'effet biofertilisant des PGPR (<i>Bacillus subtilis</i> et <i>B. amyloliquefaciens</i> . Sur la croissance des plants de poivrons. A : Plantes témoins non-inoculées ; B : Plantes inoculées.	9
Figure 2 : Différentes parties de <i>Vicia faba</i> L. a : Tige et Feuille, b : Gousses, c : Graines, d : Fleur. .	11
Figure 3 : Aspect des graines de <i>Vicia faba</i> L.	14
Figure 4 : Souches bactériennes.	14
Figure 5 : Germination des graines de fève inoculées par les différentes bactéries.	16
Figure 6 : Culture des graines de fève.	17
Figure 7 : Variation du taux de germination des graines de fève inoculées par les différentes bactéries.	19
Figure 8 : Variation de l'énergie de germination.	20
Figure 9 : Temps moyen de germination.....	20
Figure 10 : Teneur en eau des graines inoculées par différentes bactéries.....	21
Figure 11 : Concentration des protéines solubles.....	22
Figure 12 : Gamme étalon de BSA.	22
Figure 13 : Dosage d'activité protéasique.	23

Liste des abréviations

PGPR : Plant growth promoting rizobacteria (Bactéries Favorisant la Croissance des Plantes).

BSP : Bactérie solubilisatrice de phosphate.

LB : Luria-Bertani.

T : Témoin.

Tc : Témoin comercial.

Sommaire

Introduction.....	1
Etude Bibliographique.....	4
1. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.....	4
2. Biodiversité des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes dans la rhizosphère	4
2.1. Proteobacteria.....	4
2.2. Actinobacteria	5
2.3. Firmicutes	5
3. Bactéries solubilisatrices de phosphore	5
3.1. Principaux rôles des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes.....	5
3.1.1. Fixation de l'azote	6
3.1.2. Inhibition des phytopathogènes	6
3.1.3. Solubilisation du phosphate.....	6
3.1.4. Production des phytohormones.....	6
4. L'inoculation	6
4.1.1. Types d'inoculum	7
4.1.2. Techniques d'inoculation	7
5. Stimulation de la germination et la croissance des graines	8
6. Généralités sur la Fève	9
6.1. Historique et origine de la Fève	10
6.2. Description de la plante hôte	10
6.3. Intérêts cultureux de la fève	11
6.4. Fève au Maroc	11
6.5. Production et rendement de la fève au Maroc.....	12
.....	13
Matériel et méthodes	14
1. Matériel biologique	14
2. Méthodes expérimentales	15
2.1. Préparation de milieu de culture Luria-Bertani.....	15
2.2. Préparation d'inoculum.....	15
2.3. Stérilisation, inoculation et germination de la fève	15
2.4. Paramètres étudiés	16
2.5. Mise en culture des graines de fève.....	17
.....	18

Résultats et discussion.....	19
1. Taux de germination des graines inoculées par des souches bactériennes	19
2. L'énergie de la germination.....	19
3. Temps moyenne de la germination.....	20
4. Teneur en eau des graines inoculées par les souches bactériennes.....	21
5. Dosage des protéines solubles	21
6. Détermination de l'activité protéasique	22
7. L'effet des souches bactériennes sur la germination des graines de fève dans des pots.....	23
Conclusion	24

Introduction

Le sol est un réservoir fantastique de microorganismes, en termes de diversité et de densité. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries, et de 6 000 à 50 000 espèces bactériennes. Certains de ces microorganismes jouent un rôle clé dans un grand nombre de processus incluant : l'acquisition d'éléments nutritifs pour les plantes, les cycles géochimiques comme celui de l'azote, et la structure du sol (Kowalchuk et Stephen, 2001). L'utilisation massive d'engrais chimique détruit les microorganismes et les insectes non pathogènes qui protègent la plante rendant les récoltes plus susceptibles aux maladies et donc l'utilisation de biofertilisants permet d'apporter une réponse concrète aux enjeux actuels, et constitue une alternative naturelle à l'utilisation d'engrais chimiques.

La biotechnologie a pour but essentiel la mise au point d'inoculant composé de microorganismes sélectionnés afin de minimiser l'application de fertilisants chimiques et maximiser la croissance et la nutrition des plantes. La sélection des microorganismes composant l'inoculant biologique permet d'améliorer l'effet positif produit par chaque groupe de microorganismes améliorant ainsi la germination des plantes dans les sols infertiles. Certaines bactéries rhizosphériques sont connues pour leur capacité à produire des substances favorisant la germination et la croissance des plantes plus particulièrement lorsqu'elles sont associées aux champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules. Le nombre et la répartition des microorganismes, varient d'un sol à l'autre et d'une rhizosphère à l'autre. Cependant, cette grande variabilité génétique entre les différentes espèces microbiennes explique la grande capacité des microorganismes à s'adapter à différents environnements d'où la nécessité de développer des combinaisons spécifiques hôte-espèces microbiennes avec une plus grande efficacité dans différentes conditions expérimentales. Différentes cultures sont inoculées avec des microorganismes, les fourrages comme la Luzerne, et les légumineuses à grains comme la fève. La fève est une des légumineuses alimentaires qui représentent une source de protéine importante à la fois, pour l'homme et le bétail, en particulier dans les pays pauvres, où les protéines animales sont chères. Elles fournissent également des matières grasses et des hydrates de carbone. En outre les légumineuses sont riches en minéraux pour la construction des os et des vitamines essentielles pour être en bonne santé (Porres et al., 2003). Cette étude conduite au Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Génie de l'Environnement de la Faculté des Sciences et Technique de Fès, a pour but de tester l'effet de certaines souches bactériennes sur la germination des graines de *Vicia faba L.*

Notre travail est organisé en trois parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur Les rhizobactéries promotrices de la germination et de la croissance des

plantes en général ; elle précise également quelques généralités sur la fève. La deuxième partie est consacrée à la description du matériel végétal utilisé et des méthodes expérimentales adoptées pour la réalisation de ce travail, les résultats et discussion sont présentés dans la troisième partie. En fin le travail sera achevé par une conclusion générale.



PARTIE I

Etude Bibliographique



Etude Bibliographique

1. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Ces bactéries sont alors reprises sous le terme Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Wipps, 2001).

Les PGPR colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via divers mécanismes. Cet effet bénéfique peut être directe, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plante-hôte) ou indirecte (antagonisme) (Dobbelaere et al., 2003).

2. Biodiversité des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes dans la rhizosphère

Au cours de la dernière décennie, le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère. Elles présentent une diversité de genres et d'espèces. Elles appartiennent majoritairement aux quatre phylums suivants : Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes. De nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers (Hugenholtz, 2002).

2.1. Proteobacteria

Le phylum de proteobacteria comprend trois classes :

- **Alphaproteobacteria**

Les α -protéobactéries rassemblent la majorité des protéobactéries capables de se développer même si la quantité de nutriments disponibles est très faible. Les PGPR appartenant à cette classe sont les *Rhizobia*, d'abord classés par leur capacité à fixer l'azote et à produire des nodules au niveau du système racinaire des plantes. Ces souches peuvent se comporter comme des PGPR quand elles colonisent les racines des plantes légumineuses dans une relation spécifique (Sawada et al., 2003).

- **Betaproteobacteria**

Cette classe comprenant la famille de Burkholderiaceae, où le genre Burkholderia forme un groupe monophylétique composé de 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 asymbiotique l'azote (Moulin et al., 2001).

- **Gammaproteobacteria**

C'est la classe de bactéries la plus nombreuse, et comprennent des microorganismes très diversifiés sur le plan physiologique. La famille des Pseudomonadaceae comprend le genre Azotobacter. Ce genre est composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes à cause de sa capacité de fixer le l'azote et ne produisant pas de nodules (Sawada et al., 2003).

2.2. Actinobacteria

Dans le phylum des Actinobacteria le genre Frankia est un microorganisme fixateur symbiotique d'azote. Cette capacité est une caractéristique de ce genre. Ces bactéries sont associées à des plantes actinorhiziennes pionnier de la colonisation des sols pauvres ou dégradés (Sawada et al., 2003).

2.3. Firmicutes

Dans ce phylum, Bacillus est le genre le plus commun et le plus prédominant. Elles représentent environ 95% de la flore isolée. ce sont des bactéries prépondérantes dans l'environnement (Sawada et al., 2003).

3. Bactéries solubilisatrices de phosphore

Les bactéries capables de coloniser la rhizosphère et de promouvoir la croissance des plantes, sont désignées comme PGPR. Ces bactéries vivent en symbiose avec la plante et en retour ils ont des effets bénéfiques pour la plant à travers une multitude de mécanismes. Selon leur caractérisation, ces bactéries ont des effets de bio-fertilisation, de phyto-stimulation, de bio-contrôle et de phyto-remédiation. L'utilisation des bactéries solubilisatrices de phosphates (BSP) pour la solubilisation du phosphate naturel est une approche très intéressante. Les BSP sont capables de solubiliser le phosphore par divers mécanismes (Reyes et al., 2001).

3.1. Principaux rôles des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

Il est connu depuis longtemps que la présence des microorganismes dans le sol exerce des effets importants sur la croissance des plantes. Ils exercent une grande influence sur plusieurs mécanismes responsables de la santé et de la croissance des plantes. Plusieurs mécanismes sont réputés et jouent un rôle essentiel dans la croissance des plantes (Robin, 2012). Les plus fondamentaux sont :

3.1.1. Fixation de l'azote

La fixation symbiotique de l'azote a été l'un des premiers mécanismes bactériens identifiés dans la rhizosphère des végétaux comme susceptible d'induire une augmentation de la croissance des plantes. Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés. L'inoculation des semences de maïs par les rhizobactéries, (par *Pseudomonas cepacia*, *P. fluorescens* et par *Streptomycesaurantiacus*), en combinaison avec une dose de 120 k.ha⁻¹ d'azote, permet d'obtenir un accroissement de plus de 25% des rendements par rapport à ceux obtenus avec la même dose d'azote mais sans inoculation par les microorganismes (Siddiqui, 2006).

3.1.2. Inhibition des phytopathogènes

Les PGPR autochtones du sol et la rhizosphère jouent un rôle majeur dans la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes. Elles peuvent supprimer un large spectre de maladies bactériennes, fongiques et parasitaires (Siddiqui, 2006).

3.1.3. Solubilisation du phosphate

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques (H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻). Les microorganismes bénéfiques solubilisant le phosphore convertissent les formes insolubles en formes directement assimilable par les plantes (Siddiqui, 2006).

3.1.4. Production des phytohormones

De nombreuses espèces fongiques et bactériennes peuvent produire les phytohormones. Ainsi, la production de phytohormones par les PGPRs est, maintenant, considérée comme l'un des mécanismes les plus importants pour améliorer la croissance des plantes. Ce sont de petites molécules de signal produites en très faible concentration, elles agissent comme des messagers chimiques influençant les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques dans les plantes. Il existe cinq principaux groupes d'hormones : les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique. L'acide indole-3-acétique (AIA) est le plus important du groupe des auxines, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Siddiqui, 2006).

4. L'inoculation

L'inoculation des légumineuses est le processus d'introduction dans le sol d'une souche de bactérie spécifique, sélectionnée pour son efficacité symbiotique et son pouvoir compétitif pour la nodulation. L'inoculation assure donc la présence d'un grand nombre de bactéries

sélectionnés qui favorise l'infection des racines, la nodulation, la fixation de l'azote atmosphérique, stimule les racines et améliore la croissance (Sanginga et al., 1994 ; Date, 2000). L'inoculation consiste à un l'apport en masse de microorganismes sélectionnés au laboratoire, au moment du semis. Cette opération est le meilleur moyen pour assurer la présence de la souche rhizobienne appropriée au bon moment et en nombre suffisant afin d'assurer une infection rapide et effective (Amrani, 2009).

L'inoculation des plantes avec des bactéries sélectionnées ne donne pas toujours l'effet positif sur les légumineuses sur lesquelles elle a été appliquée. La réponse positive ou l'absence de réponse à l'inoculation peuvent dépendre soit de la qualité de l'inoculum lui-même, soit des caractéristiques symbiotiques de la plante ou des propriétés du sol, soit encore d'une ou plusieurs des composantes du système sol-plante-microorganismes (Amrani, 2009).

4.1.1. Types d'inoculum

Il existe de nombreux inoculums commerciaux qui se rattachent aux principaux types suivants :

- **Inoculum en poudre**

C'est le type plus commercialisé. La culture de rhizobium est mélangée à un support finement broyé, dont le pH est proche 6.5, qui protège les rhizobiums pendant le stockage et facilite leur adhésion sur la graine. La tourbe non acide reste le meilleur des supports mais divers produit organiques ou minéraux peuvent être employés pour la remplacer ; il faut de toute façon vérifier la survie des bactéries sur ces supports (Rome, 1992).

- **Inoculum granulé**

Ce produit est constitué par des micro-granules obtenus à partir d'un inoculum en poudre aggloméré avec des paillettes d'argile (Rome, 1992).

- **Inoculum liquide**

L'inoculum est constitué par la culture liquide de bactérie qui est diluée au moment de l'emploi. Ce produit doit être conservé à 4 °C, Il peut être ajouté aux graines avant semis ou appliqué directement dans la raie de semis (Rome, 1992).

- **Inoculum sur milieu gélosé**

Cette formule n'est plus guère utilisée. La survie des bactéries sur la graine n'est pas bonne (Rome, 1992).

4.1.2. Techniques d'inoculation

On distingue trois modes d'inoculation :

L'inoculation Directe : les graines sont enrobées dans l'inoculum avant le semis (enrobage) (Kannaiyan et al., 2000).

L'inoculation Indirecte : l'inoculation est réalisée dans le sol au moment du semis (microgranulés-inoculum liquide) (Kannaiyan et al., 2000).

Graines pré-inoculées : L'inoculation est réalisée par le fabricant, avant la commercialisation. La survie des bactéries sur la graine est de très courte durée (2 ou 3 jours) (Kannaiyan et al., 2000).

5. Stimulation de la germination et la croissance des graines

• La germination

Les PGPR utilisées comme des bio fertilisants efficaces pour l'amélioration des rendements des cultures en améliorant les paramètres de rendement notamment le taux de germination des semences et du développement végétal ainsi que l'amélioration de l'obtention des éléments minéraux et l'utilisation de l'eau. Ces effets se traduisent généralement par une phyto-stimulation tel qu'il a été démontré chez des souches d'*Azospirillum*, *Pseudomonas* et *Azotobacter*, des souches de *Pseudomonas* stimulent la germination de la semence du maïs cultivé dans des sols stérilisés ou non stérilisés sous serre et en plein champ. L'effet bénéfique des PGPR sur la germination des semences est aussi remarquable par leur pouvoir de coloniser la rhizosphère contre d'autres bactéries inhibitrices de la germination appelées rhizobactéries délétères (DRB) qui sont des saprophytes non pathogènes (Shaukat et al., 2006). Ainsi Kloepper et al. (1991) ont montré que le taux de germination de graines de colza, semées dans un sol froid et battant, pouvait être significativement augmenté grâce à l'inoculation par certaines souches bactériennes.

Récemment, Digat et al. (1990) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* peuvent stimuler significativement la germination de graines de tomate même lorsque les conditions d'environnement ne semblent pas défavorables.

• La croissance végétale

Les microorganismes colonisant les racines des plantes peuvent être libres, parasites ou bien saprophytes et leur diversité reste dynamique avec un changement fréquent de la structure de la communauté et de l'abondance des espèces cela est principalement dû à la quantité et à la composition des exsudats racinaires. Un groupe important de communautés bactériennes qui exercent des effets bénéfiques sur la croissance des plantes lors de la colonisation des racines ont tout d'abord été quantifiées comme des PGPR. Ces bactéries vivant librement et colonisant les racines, lorsqu'elles sont appliquées à des graines ou à des racines, améliorent la croissance de la plante, réduisent les dommages causés par les phyto-pathogènes et confèrent une résistance contre le stress abiotique (Figure 1) (Kloepper et al., 1991).

Plusieurs études sur la relation PGPR-amélioration de l'absorption des nutriments ont conclu que l'application des inoculations bactériennes améliore considérablement l'absorption de N, P, et K. Fondamentalement, les PGPRs sont définies par trois caractéristiques intrinsèques : (1) elles doivent pouvoir coloniser la racine ; (2) elles doivent survivre et se multiplier dans les micro-habitats associés à la surface des racines, en concurrence avec d'autres microbiotes ; et (3) elles doivent favoriser la croissance des plantes (Niranjana et Hariprasad, 2014).

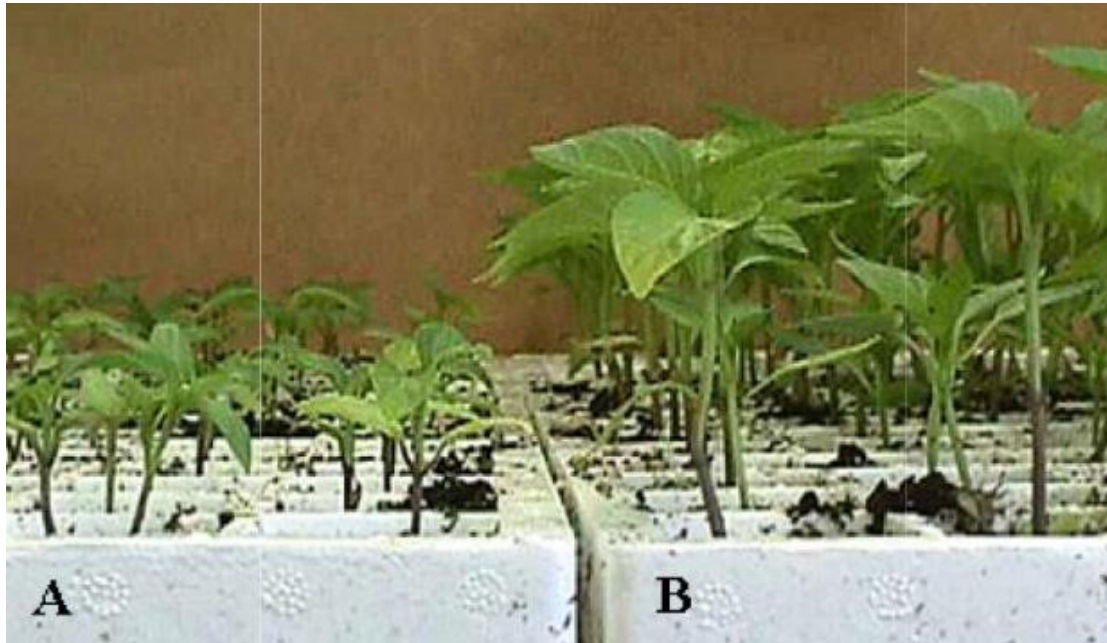


Figure 1 : L'effet biofertilisant des PGPR (*Bacillus subtilis* et *B. amyloliquefaciens*. Sur la croissance des plants de poivrons. A : Plantes témoins non-inoculées ; B : Plantes inoculées.

6. Généralités sur la Fève

La famille des légumineuses appelée aujourd'hui fabacée, représente une famille d'une grande importance économique et occupe le second rang après les céréales comme culture alimentaire dans le monde. Les légumineuses alimentaires sont une importante source protéique et se présentent comme un substitut aux protéines animales, disponibles à travers les viandes rouges et blanches qui sont difficilement accessibles à de larges couches de la population, mais aussi pour la production animale en termes de nourriture animale et de fourrages. Elles contiennent généralement 20 – 30 % de protéines (Tableau 1) (Rugheim et al., 2012).

Tableau 1 : Composition de certaines graines de légumineuses (% de la matière sèche, sauf pour acides aminés exprimés en g/16g N) (Feillet, 2000).

	Amidon	Fibre	Lipides	Protéine	Lysine	Methionine + Cysteine
Pois	50	15	2	22 - 25	7.1	2.4
Fève	43	18	2	28 - 32	6.5	2.1
Soja	1	22	10	35 - 39	4.3	2
Lupin blanc	2	20	20	36 - 40	6.2	2.8

6.1. Historique et origine de la Fève

La fève est une plante cultivée par l'homme depuis le Néolithique (7000 ans avant J.C), elle est originaire des régions méditerranéennes du Moyen-Orient. La fève, le pois et la lentille sont les plus vieilles espèces légumières introduites en agriculture (10000 ans). Cette plante figure parmi les légumineuses les plus anciennement cultivées. A partir de son centre d'origine, elle s'est propagée vers l'Europe, le long du Nil, jusqu'en Ethiopie et de la Mésopotamie vers l'Inde. L'Afghanistan et l'Ethiopie deviennent par la suite, les centres secondaires de dispersion (Peron, 2006). D'après Dajoz (2000) la fève est classée comme suit :

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Dialypétales
Série :	Caliciflores
Ordre :	Rosales
Famille :	Fabacées (Légumineuses)
Sous-famille :	Papilionacées
Genre :	<i>Vicia</i>
Espèce :	<i>Vicia faba L</i>

6.2. Description de la plante hôte

La fève est une plante herbacée annuelle présentant une tige simple, dressée, creuse et de section carrée, sans ramification se dressant à plus d'un mètre de hauteur. La taille de l'espèce varie en fonction de nombreux facteurs dont la température, la pluviométrie et autre. Les feuilles, sont alternes de couleur vert glauque ou grisâtre, composées-pennées et sont constituées de 2 à 4 paires de folioles amples et ovales. Les fruits sont des gousses pendantes noircissant à la maturité. Les graines sont charnue, vertes et tendres à l'état immature, à complète maturité, elle développe un tégument épais et coriace de couleur brun-rouge, à blanc verdâtre et prend une forme aplatie à couleur presque circulaire (Chaux et Floury, 1994) (figure 2).

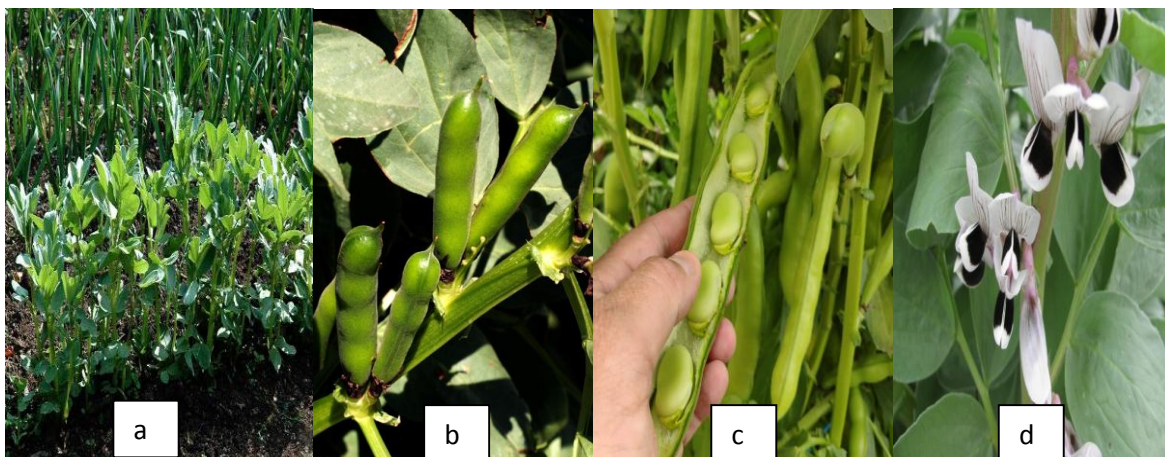


Figure 2 : Différentes parties de *Vicia faba L.* a : Tige et Feuille, b : Gousses, c : Graines, d : Fleur.

6.3. Intérêts cultureux de la fève

Vicia faba L est d'une importance incontestable, elle a deux intérêts :

Intérêt agronomique

Comme toute légumineuse, la fève fixe l'azote de l'air et ne nécessite, dès lors levée, aucune fumure azotée minérale ou organique. C'est donc un bon précédent pour les céréales qui bénéficiera d'une restitution en azote permettant un meilleur rendement qu'après une betterave, un maïs (de 500 à 800 kg.Ha⁻¹).

Son intégration dans la rotation, en tant que tête de rotation, permet de diversifier les cultures et, ainsi, de faciliter la gestion des adventives et des maladies (Abras et al., 2016).

Intérêt alimentaire

La fève est l'une des légumineuses à grains les plus communes. Elle est utilisée pour la consommation humaine et animale. Cette légumineuse a une teneur en protéine élevée et une excellente source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines (B9 et C) et de minéraux. Elle constitue un aliment nutritif très important surtout pour les populations à faibles revenus, qui ne peuvent pas toujours s'approvisionner en protéine d'origine animale (Abras et al, 2016).

6.4. Fève au Maroc

Principale légumineuse alimentaire au Maroc, la fève occupe 43% de la superficie emblavée en légumineuses alimentaires. Elle est suivie du pois chiche (19%), de la lentille (14%) et du pois (9%). Grâce à ses multiples rôles sur le plan agrobiologique et socio-économique la fève reste une composante essentielle dans les systèmes de production agricoles marocains. En plus de ses intérêts agro-économiques, la fève constitue l'une des principales sources de protéines pour la consommation humaine et animale. Sa richesse en protéine est de l'ordre de 25 à 35 %. Elle

contribue à combler le déficit protéique des régimes alimentaires à base des céréales de la majorité des familles marocaines (MADRPM, 2002).

6.5. Production et rendement de la fève au Maroc

Au Maroc, la production de la fève se trouve concentrée dans deux zones principales, à savoir le Sais et le pré-Rif (Ouazzane, Chefchaouen, Taounate, Taza) et dans la région ouest centrale du pays (Chaouia, Abda et Dokkala). La production moyenne annuelle de la fève est de l'ordre de 152 000 tonne, fluctuant entre un maximum de 345 000 tonne récolté en 1974 et un minimum de 16 000 tonne obtenu en 1993. Le rendement moyen national reste très faible (820 kg.Ha⁻¹) et très variable, entre 1520 kg.Ha⁻¹ obtenu en 1974 et 180 kg.Ha⁻¹ en 1993 (MADRPM, 2002).



PARTIE II

Matériel et méthodes



Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

- **Matériel végétal**

Le model biologique pour tester l'effet potentiel des isolats bactériens sur le phénomène de germination est la graine de fève (*Vicia faba L*) (Figure 3).



Figure 3 : Aspect des graines de *Vicia faba L*.

- **Matériel bactérien**

Bank des souches du laboratoire écologie fonctionnelle et génie d'environnement (Figure 4). Les douze isolats bactériens sélectionnés sont (T. commercial, WJEF15, WJEF26, WJEF38, WJEF41, WJEF45, WJEF46, WJEF51, WJEF56, WJEF59, WJEF61, WJEF63).

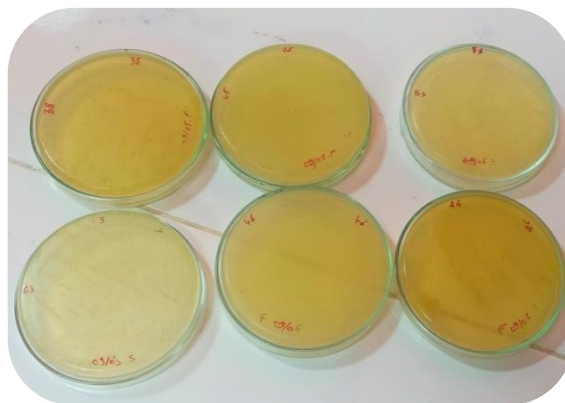


Figure 4 : Souches bactériennes.

2. Méthodes expérimentales

2.1. Préparation de milieu de culture Luria-Bertani

Le milieu de culture Luria-Bertani (LB) est un milieu non sélectif de culture nutritif, servant initialement à la culture bactérienne. La composition du milieu LB est 10 g peptone, 5 g levure, 10 g NaCl, 20 g d'Agar agar, tout est versé dans 1 L d'eau distillée dans une fiole avec l'agitation sur une plaque chauffante par un barreau magnétique pendant 10 minutes puis passé dans l'autoclave à 121°C pendant 21 minutes pour la stérilisation. Le milieu de culture stérilisé est laissé refroidir à 45°C puis on répartit le contenu dans 12 Boîtes de Pétries dans les conditions stériles jusqu'à ce que l'agar soit solidifié (à moins de 15 cm du Bec benzène) ensuite nous identifions les boîtes de pétri et nous les mettons dans l'incubateur pendant 24 heures.

- Repiquage des souches :

Les souches bactériennes ont été repiquées sur le milieu LB, pour chaque souche on prélève une colonie à l'aide d'un ensemoisseur et on l'étale en stries sur milieu de culture LB en boîte de Pétri, Puis nous les plaçons dans l'incubateur pendant 24 heures.

2.2. Préparation d'inoculum

- **Préparation d'un milieu Luria-Bertani liquide**

La composition du milieu LB est la suivante : 10 g peptone, 5 g levure, 10 g NaCl tout est versé dans 1 L d'eau distillée dans une fiole 10 mn puis Chauffer le milieu de culture jusqu'à obtenir une ébullition avec agitation par un barreau magnétique ensuite passé dans l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes pour la stérilisation. Le milieu de culture stérilisé est laissé refroidir à 45 °C puis réparti dans 26 flacons (pour chaque souche on a 2 flacons pour répétitions, et 2 flacons témoin) en condition aseptique. À la fin on place les flacons dans l'incubateur pendant 24 heures. La préparation d'inoculum de différentes souches a été réalisée par la mise en culture des souches étudiées dans un milieu LB liquide. Une colonie de chaque souche est prélevée par un ensemoisseur puis repiquée dans un flacon contenant de 25 ml de milieu LB liquide avec 2 répétitions pour chaque souche, et mettez les flacons dans l'incubateur.

2.3. Stérilisation, inoculation et germination de la fève

Avant germination, seules les semences saines et homogènes sont choisies. Les graines de fève ont été stérilisées par traitement à l'eau de javel 2% pendant 5 minutes, Elles ont été ensuite abondamment rincées 4 fois pendant 45 minutes à l'eau distillée stérile dans des conditions aseptiques (près d'un bec benzène).

- **Inoculation des graines**

Nous travaillons par 12 souche bactériens (T. commercial, WJEF15, WJEF26, WJEF38, WJEF41, WJEF45, WJEF46, WJEF51, WJEF56, WJEF59, WJEF61, WJEF63) plus témoin (C). Alors nous préparons 12 flacons contenant les isolats bactériens avec deux répétitions plus 2 flacons témoins non inoculés. Les graines désinfectées ont été immergées séparément dans les flacons contenant le milieu de culture inoculé par les isolats bactériens pendant 45 minutes sous agitation.

- **Germination des graines**

Les graines sont placées dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre, pour chaque flacon nous préparons 4 boîtes de Pétri contenant chacune 6 graines imbibé d'eau distillée stérile pour assurer l'humidité, en fin ces boîtes ont été ensuite placées à l'incubateur à 25°C pendant une semaine. On considère qu'une graine de fève est germée lorsque la radicule perse l'enveloppe séminale (Figure 5).



Figure 5 : Germination des graines de fève inoculées par les différentes bactéries.

2.4. Paramètres étudiés

Des paramètres de germination réalisés chaque jour pendant une semaine sont les suivants :

Le temps de latence (TL) : Fait référence au temps écoulé de la date de semis à l'apparition des premières germinations.

Le taux de germination (TG) : C'est le Rapport du nombre de graines germées (G) à celui du nombre de graines semées (N), multiplié par 100.

L'énergie germinative (EG) : C'est le nombre de graines qui germent jusqu'au moment de germination maximal diviser par le nombre total des graines, multiplié par 100.

La teneur en eau des graines : C'est la quantité d'eau contenue dans les graines calculé par la relation suivante : $TE\% = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$.

(Pi) : Poids de l'échantillon initial.

(Pf) = poids de l'échantillon final.

Le temps moyen de germination : C'est le nombre de graines germées au temps / le nombre de graines germées à la fin de l'essai.

Dosage des protéines solubles : Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford en utilisant une gamme étalon de BSA de concentration connue. On broyer 100 g de matière fraîche avec 2 ml solution de tampon phosphate, l'homogénat est centrifugé pendant 10 min puis 50 µl de surnageant sont prélevés et mélangés avec 2 ml de réactif Bradford et 950 µl d'eau distillée et laissé à incuber dans l'obscurité pendant 15 min. La DO est lu à 595nm.

Détermination de l'activité protéasique : 100 g de matière fraîche sont broyés dans 200 µl de solution tampon phosphate, on centrifuge pendant 10min, puis on récupère le surnageant (extrait enzymatique) et on mélange 50 µl d'extrait enzymatique et 1 ml de caséine à 1% nous laissons incuber à 37°C pendant 20 min puis on ajoute l'acide trichloracétique à 10%. La DO est lu à 280nm.

2.5. Mise en culture des graines de fève

L'expérience a été réalisée dans une serre et sous des conditions semi-contrôlées. On a stérilisé le sol à l'aide d'un autoclave et les pots de plastique par l'eau de javel puis nous avons semé les graines inoculés avec les différentes souches étudiées. dans des pots remplis du sol stérile, sont placé à raison de six graines par pot. Chaque pot est inoculé par 5 ml de la suspension Bactériennes. On a fait 28 pots pour chaque souche et 2 pots pour témoin (Figure 6). Toutes les pots sont irrigués par l'eau de robinet une fois par jour du premier jour de la mise en pot jusqu'à le dernier jour.



Figure 6 : Culture des graines de fève.



PARTIE III

Résultats et discussion



Résultats et discussion

1. Taux de germination des graines inoculées par des souches bactériennes

La figure montre le TG des graines de fève inoculées avec les différentes bactéries. Les capacités de germination des graines inoculées sont variables. Il apparaît que l'inoculation avec les souches T. commercial, WJEF15, WJEF26, WJEF38, WJEF41, WJEF45, WJEF46, WJEF51, WJEF56, WJEF59 et WJEF63 a eu pour effet d'améliorer le TG, entre elles il y a celle qui a amélioré de manière importante le TG il est passé de 61.11% à 88%, tandis que la souche WJEF61 n'a pas eu d'effet positif sur le taux de germination par rapport au témoin leur TG est inférieur à 61.11% (Figure 7).

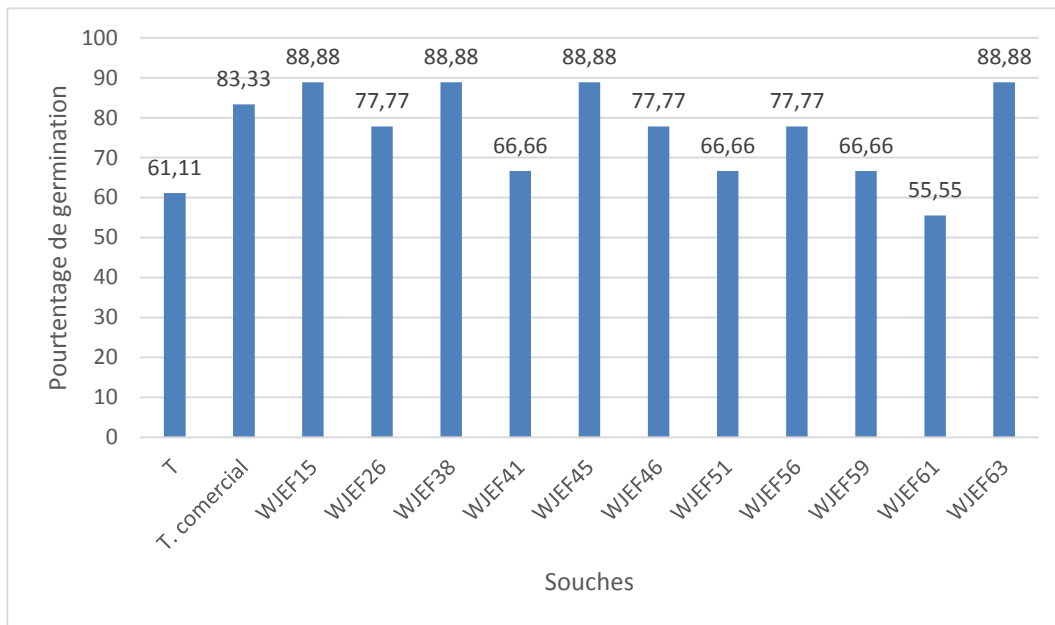


Figure 7 : Variation du taux de germination des graines de fève inoculées par les différentes bactéries.

Pour une meilleure germination, vous avez besoin d'un meilleur TG, donc les variétés T. commercial, WJEF15, WJEF26, WJEF38, WJEF41, WJEF45, WJEF46, WJEF51, WJEF56, WJEF59 et WJEF63 accélèrent-la germination.

2. L'énergie de la germination

Les souches WJEF63 et WJEF38, WJEF45, WJEF51, WJEF15, WJEF26, WJEF46, WJEF56, WJEF59, WJEF61 ont une EG élevée avec un pourcentage compris entre (40% et 80%), par rapport au témoin (38,88%), nous avons remarqué que les souches T. commercial, WJEF41, montraient un résultat similaire à celui du témoin (38.88%) (Figure 8).

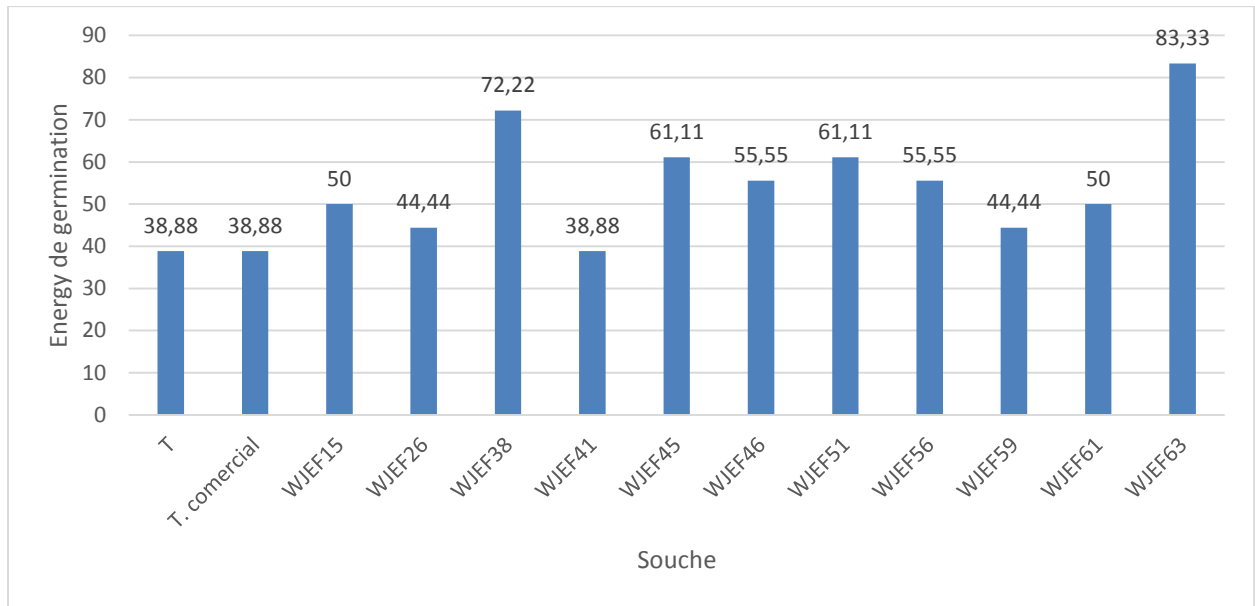


Figure 8 : Variation de l'énergie de germination.

3. Temps moyenne de la germination

La figure ci-dessous montre qu'aucune souche n'a germé pendant les deux premiers jours, la germination est commencée au troisième jour par témoin suivi par toutes les souches sauf la souche WJEF61 qui a germé tardivement au quatrième jour. Toutes les souches commerciales de T., WJEF15, WJEF26, WJEF38, WJEF46, WJEF51, WJEF61 stimulent la germination des graines entre le jour 4 et le jour 7, montrant une augmentation de TMG jour par rapport au témoin (Figure 9).

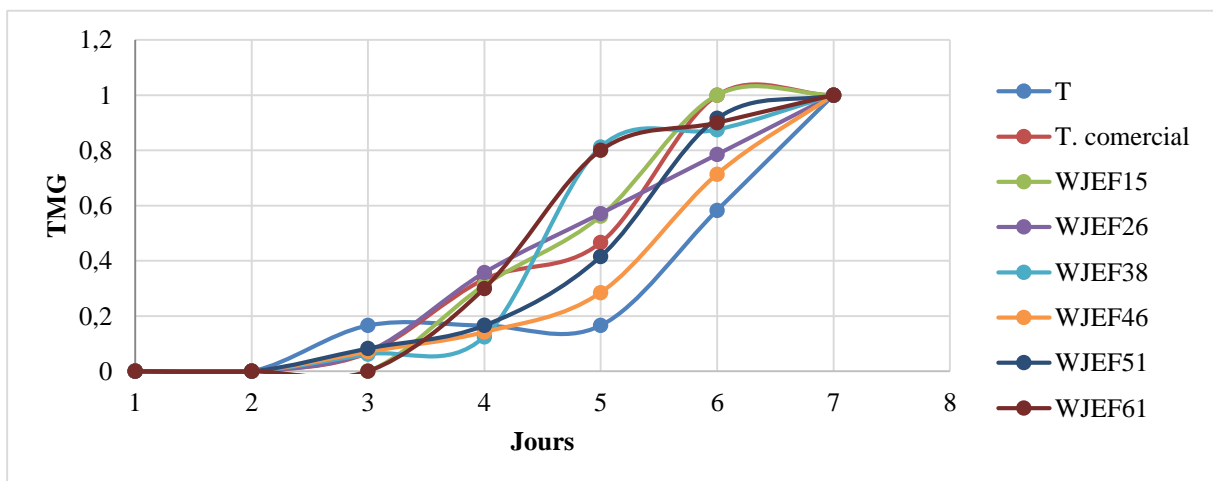


Figure 9 : Temps moyen de germination.

Bien que le témoin soit le premier à germer, il présente le TMG le plus faible. Nous remarquons que l'inoculation avec différentes souches augmente le TMG.

4. Teneur en eau des graines inoculées par les souches bactériennes

La figure montre la TE en fonction du temps (jours), les graines de *Vicia faba* préparées ont leur TE au première jour variant de 10% à 35%. La TE des souches T. commercial, WJEF15, WJEF26, WJEF38 presque similaire et stable, elles sont comparables au témoin tout au long de la semaine leur TE dépasse 40%, les souches WJEF46, WJEF51, WJEF61 elles ont efficaces augmente la TE dans les jours 4, 5 et 6 leur TE dépasse 60% par rapport au témoin.

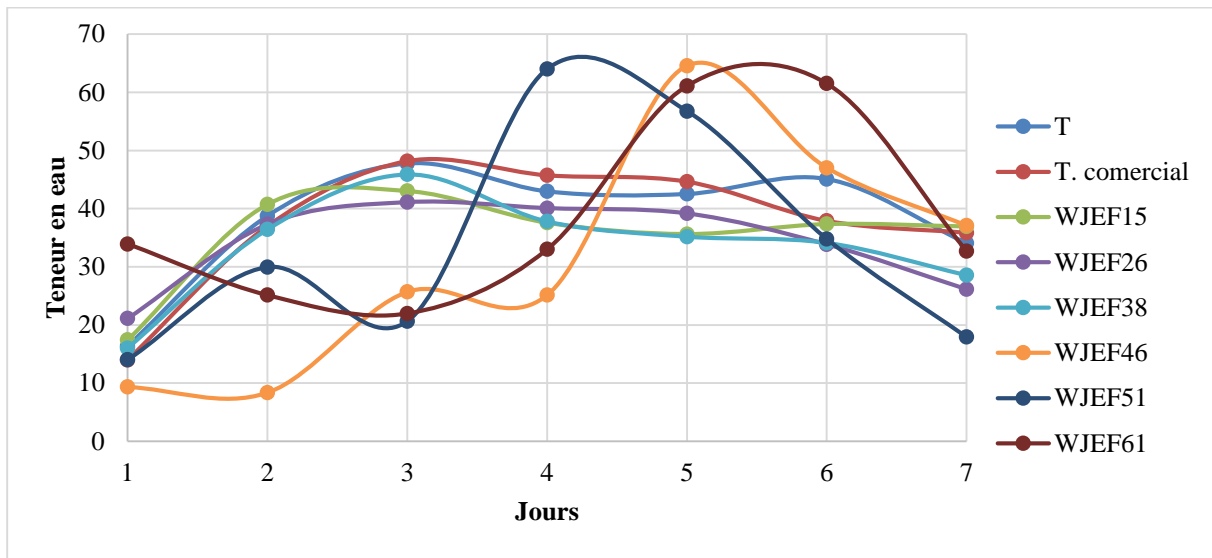


Figure 10 : Teneur en eau des graines inoculées par différentes bactéries.

Les graines inoculées par les souches WJEF51, WJEF46, WJEF61 donnent une meilleure imbibition plus important les autres souches leur évolution est comparable à celle du témoin (Figure 10).

5. Dosage des protéines solubles

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford en utilisant une gamme étalon de BSA de concentration connue. La quantité des protéines est déterminée par la mesure de la DO à 595nm, on utilise la courbe de régression. La figure 14 montre la concentration en protéines solubles, la teneur en protéines aux jours 1 et 2 est presque faible pour toutes les souches à une concentration comprise entre 100 µl et 200 µl, aux 3, 4 et 5 jours toutes les souches ont montré une teneur en protéines élevée par rapport au témoin, puis toutes les souches ont légèrement diminué. Cela peut s'expliquer par une activité protéasique qui dégrade les protéines entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour pour une meilleure germination (Figure 11).

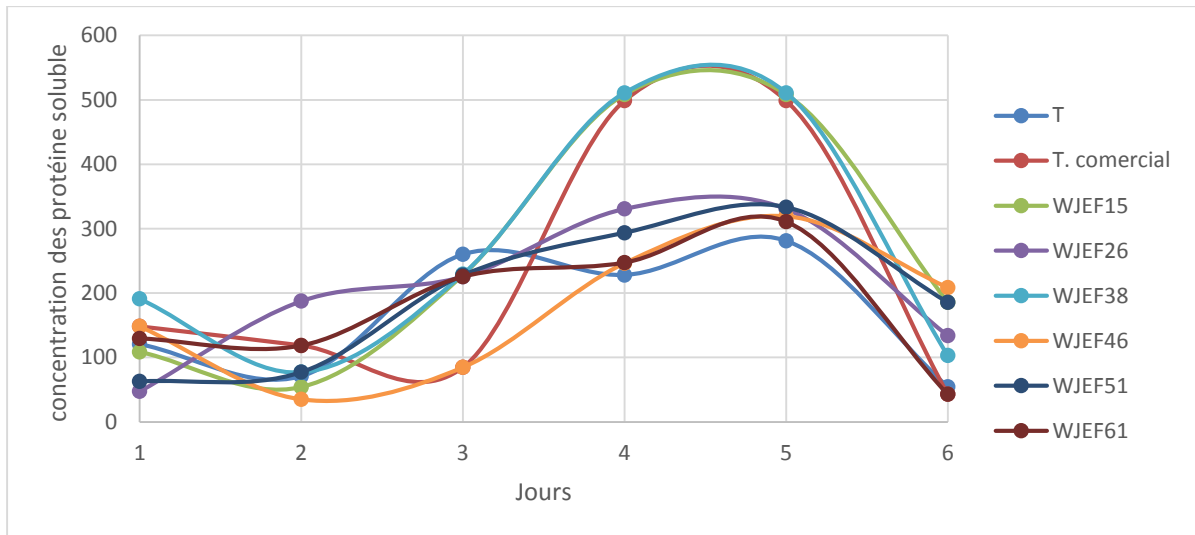


Figure 11 : Concentration des protéines solubles.

La concentration des protéines solubles a été calculée sur la base d'une gamme standard préparée avec des solutions de référence BSA contenant des concentrations allant de zéro à $250 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (Figure 12).

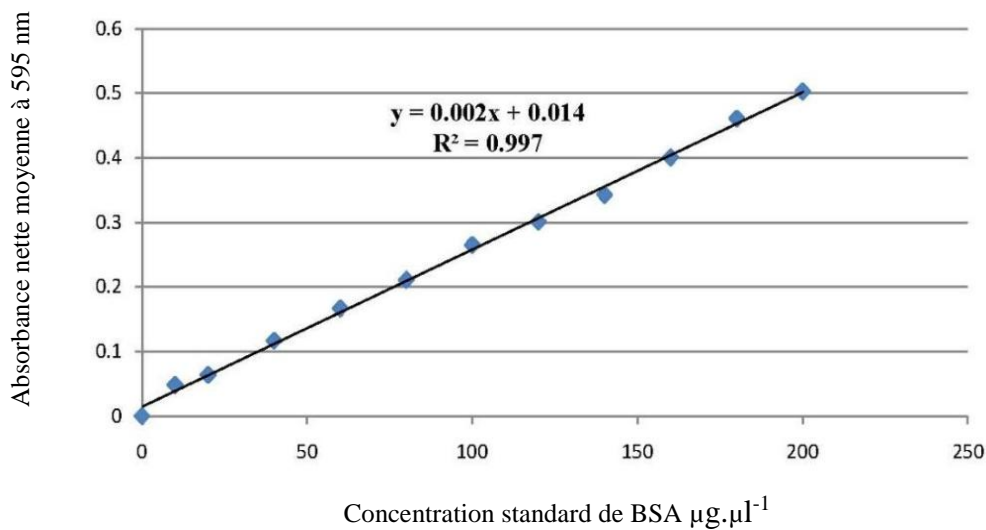


Figure 12 : Gamme étalon de BSA.

6. Détermination de l'activité protéasique

La figure 12 montre la variation de l'AP pendant une semaine. Aucune activité protéasique dans les 2 premiers jours par rapport au contrôle, les souches WJEF26, WJEF15, WJEF38, T. Commercial, WJEF46, WJEF61 ont des AP élevées entre le jour 2 et 4 par rapport au témoin. L'AP du témoin n'apparaît qu'au cinquième jour et diminue ensuite. On explique qu'entre le deuxième jour et le quatrième jour il y a une dégradation des protéines, donc un PA plus élargi, à la fin on a une meilleure germination (Figure 13).

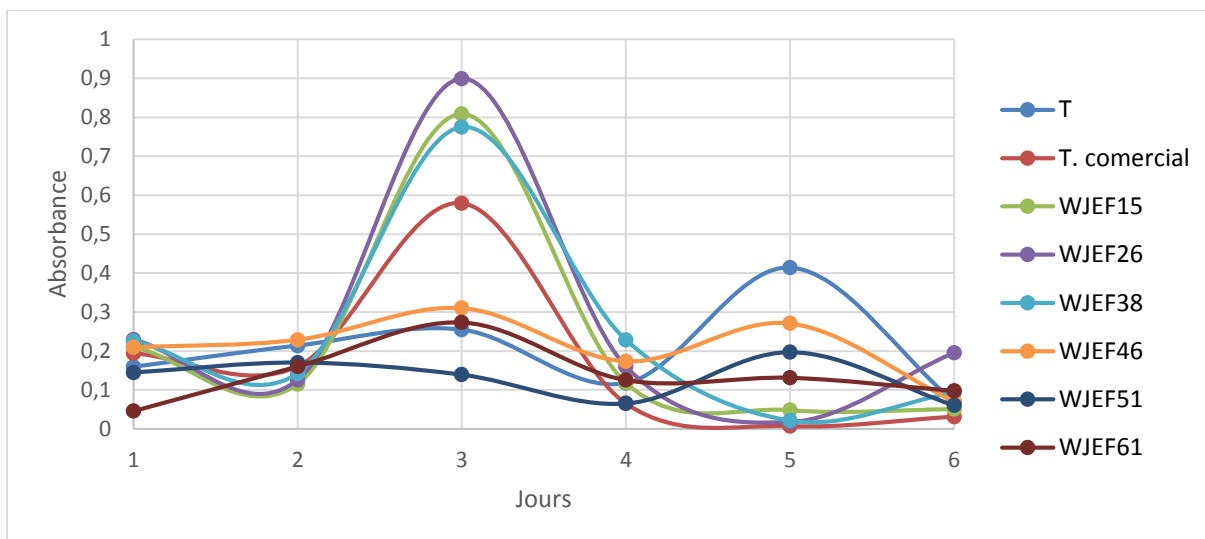


Figure 13 : Dosage d'activité protéasique.

7. L'effet des souches bactériennes sur la germination des graines de fève dans des pots

Tableau 2 : Résultats de la germination des graines de fève inoculées sur des pots

Souches	% germination
T	8,33
Témoin Commercial	24,99
WJEF15	0
WJEF26	0
WJEF38	16,66
WJEF41	25
WJEF45	8,33
WJEF46	0
WJEF51	0
WJEF56	16,66
WJEF59	16,66
WJEF61	16,66
WJEF63	0

Cet essai a été fait à la Faculté des sciences et techniques Fès dans une serre. La germination des plantes de la fève varie selon la souche, les graines se sont mieux germées dans les pots inoculés par les souches T. comercial, WJEF41, WJEF45, WJEF56, WJEF59, WJEF61, par rapport au témoin, on remarque qu'aucune graine germée n'est apparue dans les pots inoculés par les souches WJEF26, WJEF46, WJEF51, WJEF63, WJEF15 (Tableau 2).

Conclusion

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. Certaines bactéries du sol ont la capacité de favoriser le développement des cultures agricoles en stimulant leur germination et leur croissance.

Dans cette étude, douze souches bactériennes déjà isolées et purifiées au Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Génie d'Environnement ont été testées pour leur effet sur la germination des graines de *Vicia faba L.* Les isolats ont été utilisés pour inoculer les graines de fève in vitro afin de voir leur effet sur la germination pendant une semaine dans des boîtes de pétri. Tous les isolats ont un effet positif sur la germination mais différent. Les isolats WJEF38, WJEF15 favorisent la germination en accélérant tous les paramètres de germination des graines.

La deuxième partie de notre travail expérimental a consisté à faire germer des graines dans des sols stériles inoculés avec les souches bactériennes nous avons travaillé dans une serre. Les résultats ont montré qu'il y a des souches bactériennes qui étaient plus efficaces que d'autres sur le phénomène de la germination. Les souches WJEF38, WJEF26, WJEF45, WJEF56, WJEF59, WJEF61 stimulaient la germination, tandis que les autres ne le faisaient pas.

Ce travail a permis d'identifier des souches bactériennes ayant un effet positif sur la germination, phénomène important et déterminant pour toute croissance et production végétales. Ces bactéries peuvent avoir des caractéristiques des PGPR. Il serait intéressant de se focaliser sur ces bactéries afin d'établir leurs caractéristiques et leur mode d'action en tant que bactéries phyto-stimulatrices. Pouvant être valorisées et utilisées en agriculture et en biotechnologie. On peut également envisager d'étudier l'effet de ces bactéries sur les paramètres de croissance et de production de la plante. Ceci peut constituer les perspectives potentielles pour la poursuite de ce travail.

Références

- Abras Morgan et Cartryse Christine, FroidmontEric, JAMAR Daniel, RONDIA Pierre, Wayreille José, 2016 « LA FEVROLE UNE LÉGUMINEUSE À GRAINES RICHES EN PROTÉINES ET EN ÉNERGIE », Les protéagineux De la production à la valorisation.
- Amrani A., 2009 : effet de la double inoculation rhizobium-champignons mycorhiziens sur la croissance de la féverole et du haricote nain, mémoire de magister en Biotechnologie, université d'Oran.
- Dajoz, R. 2000. Eléments d'écologie. Ed. Bordas. Paris, 5ème édition. 631pp.
- Digat B, Gaudillat M, Labadie JM (1990). Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes to plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Symbiosis* 9, 295- 303
- Dobbelaere S.J; Vanderleyden; Okon Y., (2003). Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* P 22: 107-149.
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), reviews0003, 1-7.
- Kloepper, J. W., Zablutowicz, R. M., Tipping, E. M., Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: *The rhizosphere*
- Kowalchuk, G.A. & Stephen, J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol* 55(1) : 485-529.
- MADRPM., 2002. Statistiques du Ministère de l'Agriculture, de Développement Rural et des Eaux et Forêts. Maroc.
- Martínez-V, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G. and Mora, M.L. (2010). Mechanisms and practical consideration involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (3): 293 – 319
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950. Niranjana. C. (Eds), Springer, New York, USA. pp. 59-108.
- PERON J-Y., 2006. Références. Production légumières. 2ème Ed. 613 p
- Porres, J.M., Jurado, M. L., Aranda, P., and Urbano, G. (2003). Effect of heat treatment and mineral and vitaminsupplementation on the nutritive use of protein and calcium from lentils (*Lens culinaris* M.) in growingrats. *Nutrition*, 19 (5): 451-456
- Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., Antoun, H., 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicilliumrugulosum*. *Soil Biol. Bidoche*. 33, 1741–1747. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00099-2)
- Robin, R. (2012). Stimuler la croissance des plantes pour mieux valoriser les ressources agricoles : Les engrais minéraux comme hôtes de microorganismes stimulant la croissance des plantes.
- Rome S., Fernandez M.P., Brunel B., Normand P., et Cleyet-Marel J.C., 1992: «*sinorhizobiummedicae* sp. Nov., isolated from annual *Medicago* spp» .*Int J SystBacteriol*,46 : 978-980.
- S., Govindarajan K., Kumar K., and Chendrayan K., (2000). Use of biofertilizers for increasing pulse production. In: *Pulses Production Strategies in Tamil Nadu*. Centre for Plant Breeding and Genetics, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 8-23
- Sanginga, N., Wirkom, L.E., Okogun, A., Akobundu, I.O., Carsky, R.J., and Tian, G. (1996). Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and legumes in Guinea savanna in Nigeria. *Biol Fert Soils*, 23 : 441-448.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of general and applied microbiology*, 49(3), 155-179.

Shaukat, K., Affrasayab, S., Hasnain, S., 2006. Growth responses of *Helianthus annuus* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. *Journal of Agriculture Research* 6, 573-581

Siddiqui, Z. A., Mahmood, I. (1999). Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 69(2), 167-179.

Siddiqui, Z.A. (2006). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Z.A. Siddiqui (ed). *PGPR: Biocontrol and Biocontrol*. Springer, Netherlands, pp: 112-142

Wipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Experiment. Bot.*, 52 : 487-511.