



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Microbiologie**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des  
Micro-organismes**

**Intitulé :**

---

**Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches  
d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isolées des sols rhizosphériques.**

**Identification de souches représentatives.**

---

**Présenté et soutenu par : KAIOUA Amel et GRAIRI Imene**

**Le : 02 /07/2015**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Mme. Boubekri K (Maître de conférences - UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mr. Boulahrouf A (Professeur-UFM Constantine).

**Examinatrice :** Melle. Khenaka K (Maître assistante- Univ. 08/05/1945 Guelma).

**Année universitaire  
2014 - 2015**

# Remerciement

*Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans des bonnes conditions.*

*Nous remercions chaleureusement Mlle **Khenaka K** et **Leulmi N** pour leur contribution scientifique et technique, pour leur gentillesse, leur dévotions, et leur grande générosité, qu'elles veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nous tenons à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur **Boulahrouf A** de l'honneur qu'il nous a accordé en acceptant de diriger ce travail, ainsi que pour tous ses précieux conseils, et ses encouragements. Nous tenons aussi à lui témoigner toute notre reconnaissance pour toute l'aide qu'il nous a apporté durant tout notre cursus universitaire.*

*Nos remerciements vont également à Mlle **Khenaka K** (Maître assistante) d'avoir participé au jury ainsi que Mme **Boubékri K** (Maître de conférences) d'avoir accepté de la présider.*

*Un grand merci à nos familles respectives pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de nos longues années d'études.*

*Sans oublier l'ensemble des personnes qu'on a croisées au L.G.M.A. qui en ont fait un lieu peu banal à nos yeux, nos collègues et amis(es), ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.*

# *Dédicace*

*C'est avec un grand plaisir et une immense joie et fierté que  
je dédie ce modeste travail :*

*À mon cher père*

*Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout  
du chemin. Sois fière de moi aujourd'hui et vois à travers ce  
travail mon amour s'insère et ma gratitude profonde.*

*À ma très chère mère*

*Ma douce et tendre mère. Quoi que je face, je ne pourrais te  
rendre ce que tu as fait pour moi.*

*Si je suis arrivée là c'est bien grâce à vous que dieu vous  
donne longue vie et vous protège pour moi.*

*À mon adorable frère : MOHAMED*

*À mes très chères sœurs : IBTISSME, IMENE, LEILA*

*et*

*ILHEM*

*pour leurs soutien et encouragement.*

*À toute la famille KAILOUA et la famille HAMMOUD*

*A mes amies : IMENE, FATIMA et IMENE.*

*A toute personne qui a participé à la réalisation de ce  
mémoire.*

*AMEL*

# *Dédicace*

*C'est avec un grand plaisir et une immense joie et fierté que  
je dédie ce modeste travail :*

*À mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde  
et à*

*Les quelles je dois toute ma vie et toutes mes réussites.*

*A mes chères sœurs : SABRINA et AMIRA pour leurs soutien  
et*

*Encouragement*

*A mes chers frères : HOSSEME et RAMZI.*

*A mon très cher ami AMEL pour leur soutien durant  
toutes les années d'étude*

*A mes amies : WISSEME, HASSIBA, AHLLEM, ZINEB et  
AMEL*

*En fin*

*A toute personne qui a participé à la réalisation de ce  
mémoire.*

*IMENE*



## Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

### Revue bibliographique

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>1. Propriétés générales de la rhizosphère</b> .....	2
1.1. Définition de la rhizosphère .....	2
1.2. Rôle de la rhizosphère .....	3
1.3. La flore rhizosphérique .....	3
1.4. Les différentes interactions dans la rhizosphère .....	3
1.4.1. Les interactions entre les microorganismes .....	4
1.4.2. Les interactions plantes-microorganismes .....	4
<b>2. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP) ou <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> (PGPR)</b> .....	5
2.1. Les principaux rôles des rhizobactéries.....	6
2.1.1. La fixation de l'azote .....	6
2.1.2. La production de phytohormones.....	6
2.1.3. La solubilisation du phosphate .....	6
2.1.4. La production des sidérophores.....	7
2.1.5. Inhibition des phytopathogènes.....	8
<b>3. Deux cas de rhizobactéries</b> .....	9
3.1. Le genre <i>Pseudomonas</i> sp .....	9
3.1.1. Classification et habitat .....	9
3.1.2. Morphologie et structure .....	9
3.1.3. Croissance et nutrition.....	10
3.1.4. Caractéristiques métaboliques.....	10
3.1.5. Le genre <i>Pseudomonas</i> sp en association avec les plantes .....	11
3.2. Les actinomycètes .....	12
3.2.1. Généralités.....	12
3.2.2. Morphologie .....	13
3.2.3. Métabolisme .....	14

## Matériel et méthodes

<b>1. Les souches étudiées</b> .....	15
<b>2. Les milieux de culture</b> .....	15
<b>3. Inocula</b> .....	16
<b>4. Solubilisation du phosphate</b> .....	16
<b>5. Production des sidérophores</b> .....	16
5.1. Principe.....	16
5.2. Technique .....	17
5.2.1. Préparation des milieux de culture exempts du fer .....	17
5.2.2. Préparation du milieu de révélation .....	17
5.2.3. Culture et révélation .....	18
<b>6. Etude de l'activité antifongique</b> .....	18
6.1. Réalisation du test .....	18
6.1.1. Pour les <i>Pseudomonas</i> spp .....	18
6.1.2. Pour les actinomycètes .....	18
<b>7. L'identification de quelques souches actinomycètes</b> .....	19
7.1. Étude morphologique .....	19
7.1.1. Macromorphologie et caractères cultureux .....	19
7.1.2. Micromorphologie.....	19
7.2. Étude physiologique et biochimique .....	20
7.2.1. Production de pigments mélanoides.....	20
7.2.2. Action sur le lait écrémé.....	20
7.2.3. Utilisation de sources de carbone .....	21
7.2.4. Utilisation de sources azotée .....	21
7.2.5. Les activités de dégradation .....	21
7.2.6. Production de sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S).....	22
7.2.7. Réduction des nitrates .....	22
7.2.8. La production de chitinase .....	22
7.2.9. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques .....	23
7.2.10. La résistance aux antibiotiques .....	23
<b>8. Milieu optimal et effets de deux facteurs sur la production des antibiotiques par les souches ARF4 et ARF10</b> .....	23

8.1. Milieu de culture optimal de production d'antifongique .....	23
8.2. Effet de la concentration en NaCl du milieu optimal sur la production d'antifongique	24
8.3. Effet de la valeur de pH initial du milieu optimal sur la production d'antifongique ....	24
<b>9. Cinétique de la production des substances antifongiques .....</b>	<b>24</b>
<b>10. Estimation de la croissance (biomasse) des souches ARF4 et ARF10 à différents pH et concentrations en NaCl.....</b>	<b>24</b>

## Résultats et discussion

<b>1. Solubilisation de phosphate .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Production des sidérophores .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Etude de l'activité antifongique .....</b>	<b>28</b>
<b>4. L'identification de quatre souches d'actinomycètes .....</b>	<b>31</b>
4.1. Étude morphologique .....	31
4.1.1. Aspect macroscopique.....	31
4.1.2. Aspect microscopique .....	38
4.2. Caractères physiologiques et biochimiques .....	39
<b>5. Effet de quelques facteurs sur l'activité antifongique des souches ARF4 et ARM10 ..</b>	<b>46</b>
5.1. Milieux de culture .....	46
5.2. Effet du pH et du NaCl.....	47
<b>6. La cinétique de la production d'antifongiques .....</b>	<b>48</b>
<b>7. Estimation de la biomasse.....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>50</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>52</b>

**Annexes**

**Résumés**



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents .....	12
<b>Tableau 2:</b> diamètre du halo de solubilisation du phosphate .....	25
<b>Tableau 3:</b> rapport CAS* de la production des sidérophores sur milieu gélosé CAS .....	27
<b>Tableau 4:</b> caractéristiques culturales de la souche ARF4.....	32
<b>Tableau 5:</b> caractéristiques culturales de la souche ARF10.....	34
<b>Tableau 6:</b> caractéristiques culturales de la souche ARF47.....	35
<b>Tableau 7:</b> caractéristiques culturales de la souche ARM10. ....	37
<b>Tableau 8:</b> aspect microscopique des souches d'actinomycètes purifiés.....	38
<b>Tableau 9:</b> utilisation des sources de carbone.....	41
<b>Tableau 10:</b> utilisation des sources d'azote .....	42
<b>Tableau 11:</b> résultats des activités de dégradation.....	43
<b>Tableau 12:</b> Croissance en présence d'inhibiteurs.....	44
<b>Tableau 13:</b> résistance aux antibiotiques... ..	45

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> structure Schématique de la rhizosphère .....	2
<b>Figure 2:</b> représentation schématique décrivant les interactions plantes-micro-organismes dans la rhizosphère .....	5
<b>Figure 3:</b> solubilisation du phosphore par l'action des micro-organismes .....	8
<b>Figure 4:</b> croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide.....	13
<b>Figure 5:</b> détection des sidérophores sécrétés par un microorganisme cultivé sur milieu CAS Agar.....	17
<b>Figure 6:</b> technique d'ensemencement des souches étudiées pour la mise en évidence de l'activité antifongique .....	19
<b>Figure 7:</b> technique de culture sur lamelle.....	20
<b>Figure 8:</b> photographies de la solubilisation du phosphate (halo) par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> sp et d'actinomycètes.....	25
<b>Figure 9:</b> photographies de la production des sidérophores (halo rouge/orangé) par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> sp et d'actinomycètes.....	27
<b>Figure 10:</b> photographies de l'inhibition des deux champignons phytopathogènes ( <i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> ).....	28
<b>Figure 11:</b> pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporium</i> et d' <i>A. niger</i> en présence des souches de <i>Pseudomonas</i> sp (PRT).....	29
<b>Figure 12:</b> pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporium</i> et d' <i>A. niger</i> en présence des souches d'actinomycètes (ART).....	30
<b>Figure 13:</b> pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporium</i> et <i>A. niger</i> par les souches d'actinomycètes de sol forestier en plaine (ARF).....	30
<b>Figure 14:</b> pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporium</i> et d' <i>A. niger</i> en présence des souches d'actinomycètes de sol forestier en montagne (ARM).....	30
<b>Figure 15:</b> culture de la souche ARF4 sur différent milieux.....	32
<b>Figure 16:</b> culture de la souche ARF4 sur deux milieux.....	33
<b>Figure 17:</b> culture de la souche ARF47 sur deux milieux.....	35
<b>Figure 18:</b> photographie de la souche ARM10 sur milieux ISP5 et ISP7.....	36
<b>Figure 19:</b> photographies de la morphologie microscopique des souches d'actinomycètes.....	38
<b>Figure 20:</b> production des pigments mélanoides.....	39
<b>Figure 21:</b> action des souches étudiées sur le lait écrémé.....	40

<b>Figure 22:</b> photographies de l'utilisation des sucres comme source de carbone par les souches ARF4, ARF10 .....	40
<b>Figure 23:</b> photographies de l'utilisation des différentes sources d'azote. ....	41
<b>Figure 24:</b> photographies des activités de dégradation. ....	42
<b>Figure 25:</b> photographies de la production d'H <sub>2</sub> S par les souches étudiées .....	43
<b>Figure 26:</b> photographies de la production de nitrate réductase après 14 jours d'incubation .....	43
<b>Figure 27:</b> photographie de la croissance ARF47 en présence d'inhibiteur .....	44
<b>Figure 28:</b> photographies de la sensibilité et de la résistance des souches ARF4, ARF10, ARF47, ARM10 aux antibiotiques .....	45
<b>Figure 29:</b> photographies de l'inhibition de <i>F. oxysporum</i> sur différents milieux.....	46
<b>Figure 30:</b> effet du milieu de culture sur l'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F.oxysporum</i> et d' <i>A. niger</i> .....	47
<b>Figure 31:</b> effet du pH et de différentes concentrations de NaCl sur l'inhibition de croissance mycélienne de <i>F. oxysporum</i> et d' <i>A. niger</i> .....	47
<b>Figure 32:</b> effet de différents pH sur l'activité antifongique des souches ARF4 et ARM10 .....	48
<b>Figure 33:</b> effet de différente concentration de NaCl sur l'activité antifongique des souches ARF4 et ARM10 .....	48
<b>Figure 34:</b> effet des périodes d'incubation sur l'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F.oxysporium</i> et d' <i>A. niger</i> .....	49
<b>Figure 35:</b> la biomasse produite pour différentes valeurs de pH et de concentrations en NaCl ..	49

## Liste des abréviations

**AIA** : acide indole -3-acétique.

**API** : inhibiteur de protéase alcaline.

**BMA** : bennett modifié.

**Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>** : phosphate tricalcique.

**CAS** : *chrome azurol s.*

**CCA** : *colloidal chitin agar.*

**CMC** : *carboxy méthyl cellulose.*

**CTAB** : *bromure d'héxadecyl tri-méthyl ammonium.*

**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : dihydrogénophosphate.

**H<sub>2</sub>S** : sulfate d'hydrogène.

**HDTMA** : *hexadécyltriméthyl ammonium.*

**HgCl<sub>2</sub>** : chlorure de mercure.

**HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : monohydrogénophosphate.

**IJSEM** : *international journal of systematic and evolutionary microbiology.*

**ISP** : *international streptomyces project.*

**ISR** : *résistance systématique induite.*

**KDa** : kilodalton.

**KNO<sub>3</sub>** : nitrate de potassium.

**NaCl** : chlorure de sodium.

**PDA** : *potato dextrose agar.*

**PVK** : *pikovskaia.*

**P/V** : poids par volume.

**PGPR** : *plant growth promoting bacteria.*

**SCA** : *starch casein agar medium.*

**SM** : *synthetic medium.*

**TSI** : *triple sugar iron.*

**UFC** : unité formant colonie.

**YMEA** : *yeast malt extract agar.*



# Introduction

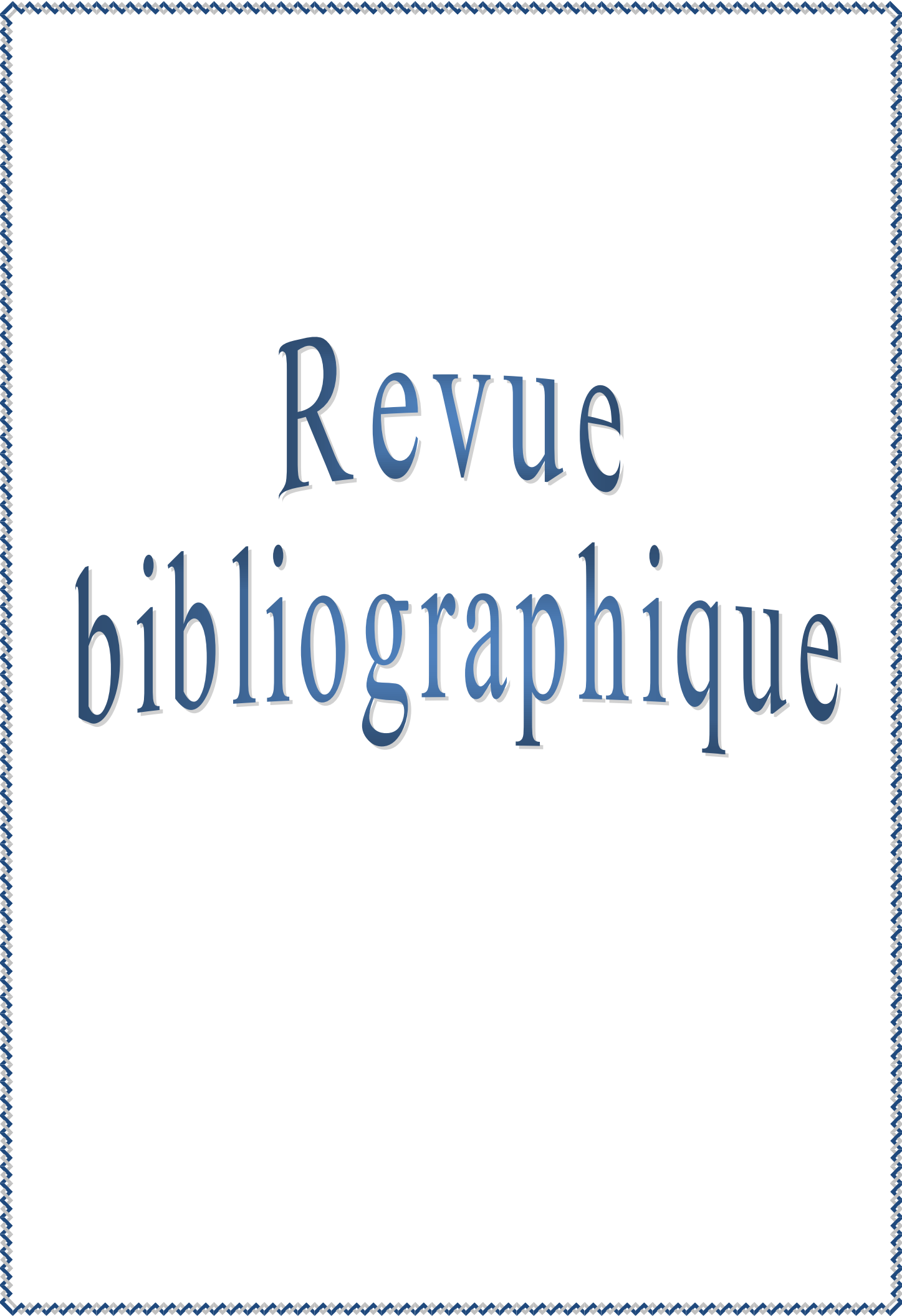
Le sol est l'un des environnements les plus complexes de la biosphère, il héberge une grande diversité microbienne à la fois du point de vue taxonomique et du point de vue fonctionnel. En effet, il est estimé que 80 à 90% des processus dans le sol sont des réactions induites par les micro-organismes [1]. Cependant, la densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu [2].

La rhizosphère est l'ensemble des microrégions du sol en contact avec les racines des plantes supérieures.

Par ailleurs, la croissance des plantes ne repose pas uniquement sur la disponibilité et l'absorption des nutriments. Certains mécanismes de croissance sont contrôlés par des substances autres que les nutriments. Ces substances sont produites par des micro-organismes mieux connus sous leur vocable anglais *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB). Certaines bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculant pour améliorer le développement des racines *via* la production de certaines phytohormones [3]. De nombreuses autres bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des micro-organismes phytopathogènes.

Ainsi, les bactéries actinomycétales, d'une part, sont les meilleures candidates à appliquer sous forme de cellules vivantes. Elles sont connues pour leur production de métabolites bioactifs ayant des propriétés antibiotiques [4] [5] [6] [7], et d'autre part, les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas fluorescents* sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol [8]. Plusieurs études montrent que ces bactéries ont des effets bénéfiques pour augmenter la croissance de la plante. Cette efficacité repose sur la synthèse de métabolites particuliers (sidérophores, antibiotiques, enzymes...etc) Pour toutes ces raisons, nous sommes fixés trois objectifs principaux :

- ✓ l'étude, *in vitro*, de la capacité à solubiliser le phosphate et à produire des sidérophores d'une collection de souches bactériennes appartenant au groupe *Pseudomonas* spp et d'actinomycètes isolées de sol rhizosphérique de la plante de tomate;
- ✓ la mise en évidence de l'activité antifongique de souches bactériennes appartenant au groupe *Pseudomonas* spp et d'actinomycètes isolées de sol rhizosphérique et des souches actinomycétales isolées de sol rhizosphérique de forêts en plaine et en montagne (altitude);
- ✓ identification de quelques souches d'actinomycètes représentatives.

A decorative border with a repeating geometric pattern in blue and grey surrounds the text.

# Revue bibliographique

## 1. Propriétés générales de la rhizosphère

### 1.1. Définition de la rhizosphère

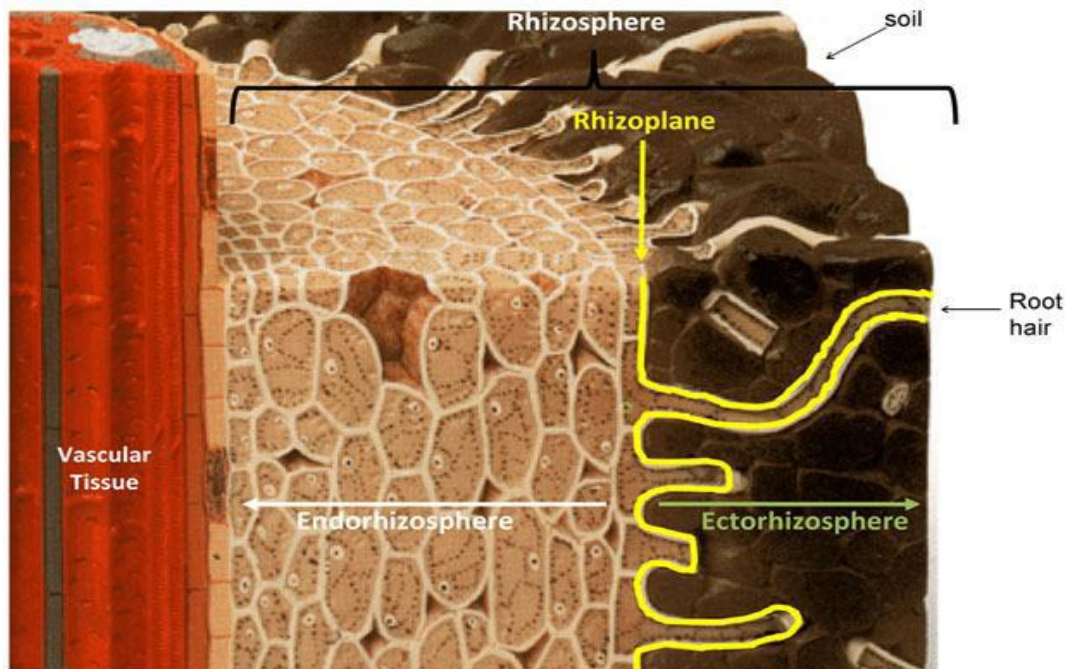
Ce concept mis par le chercheur allemand Lorenz Hiltner en 1904, correspond au volume du sol autour des poils absorbants des plantes supérieures où prolifèrent des organismes vivants (bactéries, champignons...etc.). Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "*rhizo*" ou "*rhiza*" signifiant "racine" et "*sphère*" signifiant champ d'action ou d'influence.

Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire [9]. De même, cette zone se caractérise par une importante diversité microbienne comparativement au sol environnant [10]. Par rapport aux racines, la rhizosphère peut être divisée en trois zones distinctes :

-l'**endorhizosphère** comprend des parties du cortex et de l'endoderme dans lesquelles les microbes et les cations peuvent occuper l'espace libre entre les cellules (espace apoplastique), de ce fait, le contact entre la plante et les microorganismes aura lieu à l'intérieur des racines [11].

-le **rhizoplan** représente la zone médiane directement adjacente à la racine, y compris l'épiderme racinaire et le mucilage [11].

-l'**ectorhizosphère** représente la zone extérieure qui se trouve directement après le rhizoplan [11].



**Figure 01:** structure Schématique de la rhizosphère [11].



## 1.2. Rôle de la rhizosphère

La rhizosphère joue un rôle actif dans la régulation des interactions entre plantes et micro-organismes [12]. De ce fait, il a été suggéré que la plante favorise celles qui lui sont bénéfiques [13] [14]. C'est une zone de vie, où les exsudats racinaires, d'une part, permettent le développement d'une faune et d'une flore spécifiques et d'autre part, permettent le développement d'une flore symbiotique qui assure une bonne croissance aux plantes, en produisant de substances bénéfiques à la croissance comme les phytohormones et les antibiotiques assurant la protection contre des phytopathogènes.

C'est une niche écologique qui éveille et stimule diverses activités microbiennes, en participant ainsi, au fonctionnement des cycles des nutriments majeurs et des oligoéléments comme le carbone, l'azote, le phosphore, le fer, etc [15].

## 1.3. La flore de la rhizosphère

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes [16]. Certains sont sans effets sur le développement des végétaux, d'autres encore sont favorables alors que d'autres ont des effets délétères [17].

La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu [2]. Ces modifications quantitatives de la microflore ou « effet rhizosphère », s'accompagnent également de modifications qualitatives. Les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^9$  UFC par gramme de sol [18]. Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^3$  UFC par gramme de sol [19]. La densité des champignons est estimée à  $10^6$  UFC par gramme de sol et les bactéries filamenteuses ou actinomycètes peuvent atteindre  $10^7$  unités par gramme de sol [20].

## 1.4. Les différentes interactions dans la rhizosphère

Il existe différentes interactions dans la rhizosphère [21]. Les processus racinaires impliqués dans ces interactions sont entre autres la rhizodécomposition, la respiration de la racine, l'absorption d'eau et des nutriments [10].

### 1.4.1. Les interactions entre les microorganismes

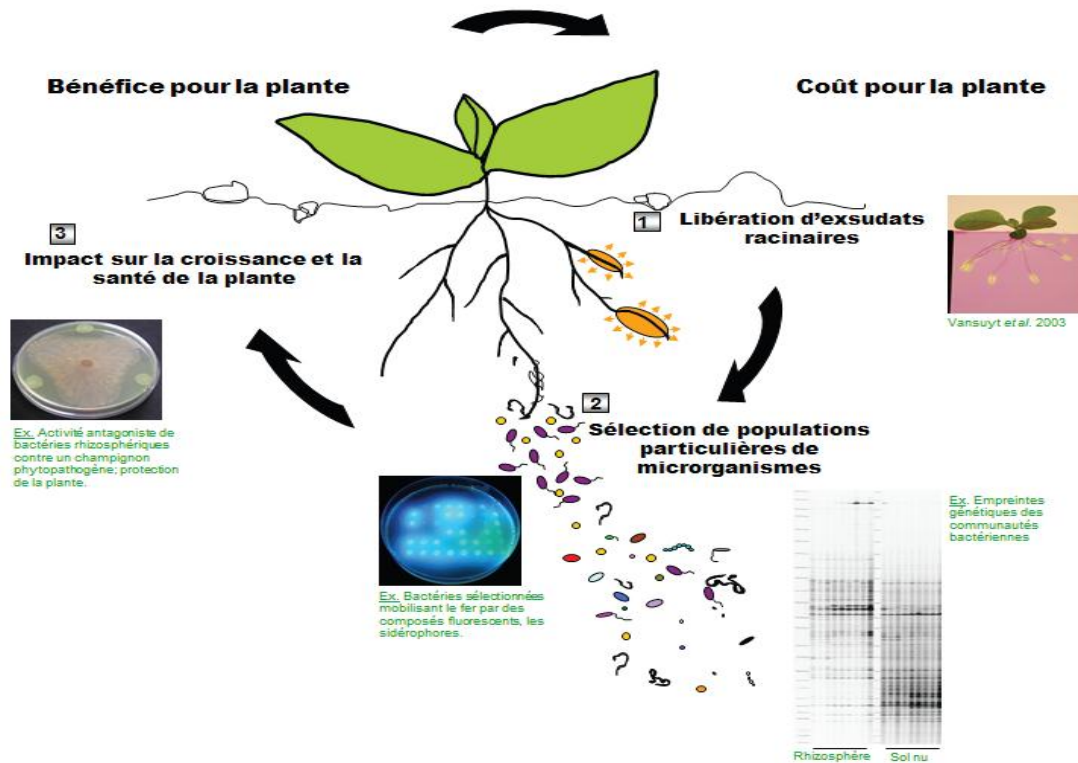
Les microorganismes en particuliers les bactéries sont fréquemment impliquées dans une multitude d'interactions non génétiques avec d'autres microorganismes, notamment au niveau de la rhizosphère. Ces interactions sont souvent nutritionnelles. Un micro-organisme dépend d'un autre micro-organisme pour la dégradation de produits ou de substrats spécifiques, ou différents microorganismes sont en compétition pour le même substrat [22]. Dans d'autres cas, un micro-organisme peut exercer un effet nuisible sur les autres microorganismes, par exemple par la production d'antibiotiques ou de composés toxiques.

Les interactions entre populations microbiennes peuvent être reconnues comme des interactions négatives (compétition, amensalisme), positives (commensalisme, synergie et mutualisme), ou positives pour l'un et négatives pour l'autre population (parasitisme ou prédation) [21].

### 1.4.2. Les interactions plantes-microorganismes

L'ensemble de ces exemples illustre la boucle de rétroaction à laquelle peuvent être assimilées les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère [23]. Cette boucle de rétroaction schématisée sur la **figure 02** :

- La libération d'exsudats racinaires (1) ;
- Ces exsudats favorisent des populations microbiennes particulières au sein de la communauté tellurique (2) ;
- En retour, certaines de ces populations favorisent la croissance (exemple présenté : nutrition en fer) et la protection (exemple présenté : antagonisme microbien) de la plante-hôte (3) ; ces effets bénéfiques compensent le coût représenté par les exsudats racinaires pour la plante.



**Figure 02:** représentation schématique décrivant les interactions plantes-micro-organismes dans la rhizosphère [23].

## 2. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP/PGPR)

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 RPCP/PGPR.

Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a connu une grande augmentation 2 à 5% des rhizobactéries; elles comprennent de nombreuses espèces bactériennes [17] [24].

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, lorsqu'elle contrôle des organismes phytoparasites (antagonisme) [25].

## 2.1. Les principaux rôles des RPCP/PGPR

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. Ils règlent souvent la réponse de la plante au stress environnemental et contribuent au développement même des racines et de la biomasse. Plusieurs mécanismes sont réputés jouer un rôle essentiel dans la croissance des plantes [26]. Les plus fondamentaux sont :

### 2.1.1 La 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 [27]. Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés [28]. Hernandez *et al.* (1995) [29] affirment que l'inoculation des semences de maïs par les rhizobactéries, (par *Pseudomonas cepacia*, *P. fluorescens* et par *Streptomyces aurantiacu*), en combinaison avec une dose de 120 kg/ha 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.

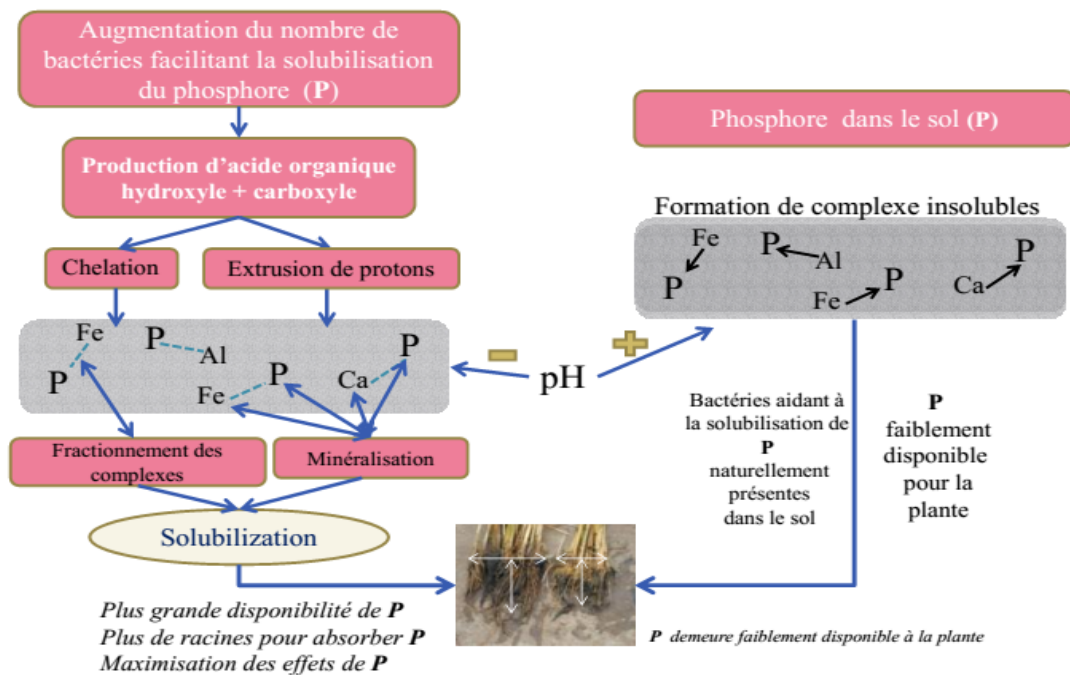
### 2.1.2. La production de phytohormones

De nombreuses espèces fongiques et bactériennes peuvent produire les phytohormones . Ainsi, la production de phytohormones par les PGPR 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 [35].

### 2.1.3. La 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 ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) [30] [31]. Il

est présent sous forme de composés métalliques liés au fer, à l'aluminium, ou au silicium dans les sols acides ou avec le carbonate de calcium dans les sols alcalins [32]. Les composés phosphatés insolubles peuvent être solubilisés par des acides organiques et une grande variété des enzymes phosphatases produites par des plantes et des micro-organismes [33]. Parmi les bactéries possédant cette activité, les actinomycètes occupent une place de choix [34]. À titre d'exemple, nous illustrons ici, de manière schématique, l'action des micro-organismes sur la solubilisation du phosphore (P).



**Figure 03:** solubilisation du phosphore par l'action des micro-organismes [23].

#### 2.1.4. La production des sidérophores

Le fer est l'un des oligoéléments le plus important pour la croissance microbienne. Dans les micro-organismes, il agit comme un régulateur global pour de nombreux processus cellulaires, métaboliques et biosynthétiques [36]. Sous des conditions limitantes en fer, les bactéries aérobies (principalement) et champignons produisent des composés de faible poids moléculaire de (400-1000 kDa) appelés sidérophores [37]. Ce sont des métabolites secondaires dont le rôle est d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques, de le solubiliser et de le chélater le rendant, ainsi, accessible aux micro-organismes [38]. Cette forte compétition pour le fer provoque une réduction de la croissance saprophyte de l'agent pathogène, et donc de la fréquence des infections racinaires, ce qui s'accompagne d'une

amélioration de la santé de la plante-hôte. De plus, les plantes ont développé des stratégies actives d'acquisition du fer complexé aux sidérophores microbiens qui contribuent ainsi significativement à leur nutrition en cet élément essentiel pour leur physiologie mais peu disponible dans les sols [39]. À titre d'exemple, la sélection de populations de *Pseudomonas* adaptées à la carence en fer et produisant des sidérophores très efficaces [40].

### 2.1.5 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 [41] [42]. La stratégie habituelle pour le contrôle des phytopathogènes s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action direct *via* la production d'antibiotiques, des enzymes hydrolytiques (chitinases, protéases, lipases, etc.), ou indirecte tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), l'activation de la résistance systématique induite (ISR).

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes les plus puissants pour la lutte contre les phytopathogènes. Ils peuvent être produits par différentes souches de *Pseudomonas*, une des espèces bactériennes les plus courantes de la rhizosphère [35]. L'efficacité de certaines souches de *Pseudomonas* spp et *P. fluorescents* en protection biologique des plantes a été démontrée dans de nombreux travaux dans des conditions expérimentales et pratiques [43].

Les sols suppressifs ont été décrits pour bon nombre de pathogènes telluriques, citons à titre d'exemples des champignons tels que: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *G. graminis* [44]. Les espèces du genre *Aspergillus* sont saprophytes et sont également considérées comme de faibles agents pathogènes des plantes [45] [46].

#### ➤ *Fusariumoxysporum*

*Fusarium oxysporum*, est un champignon d'origine tellurique très ubiquiste, et le plus agressif causant des flétrissements et des pourritures racinaires de plusieurs espèces végétales cultivées d'intérêt économique [47]. C'est un agent vasculaire qui se conserve dans le sol sous forme de chlamydospores et infecte les plantes *via* les racines qu'il pénètre directement ou par des blessures d'origine mécanique ou biologique (percées des racines secondaires, piqûres de nématodes,...). Les maladies dues à l'espèce *F. oxysporum* sont largement répandues

dans le monde. Elles sont dommageables pour de nombreuses plantes maraîchères (tomate, cucurbitacées etc) [48].

➤ *Aspergillus niger*

Les espèces du genre *Aspergillus* sont saprophytes [45]. En particulier *A. niger* est un organisme qui a été bien étudié et qui est considéré comme un faible agent phytopathogène. Il sécrète des enzymes extracellulaires qui peuvent causer des dommages aux cultures agricoles. Il a été rapporté qu'*A. niger* était un composant important de la communauté fongique sur les raisins [49] [50].

Bien qu'il ne soit pas considéré comme une cause importante de maladie des plantes, *A. niger* causait des dommages à un grand nombre de cultures et d'aliments, y compris le maïs, les arachides, les oignons, les mangues et les pommes [50] [51]. De nombreux cas de pourriture des plantes sont causés par *A. niger* parmi elles la pourriture noire du collet sur l'arachide provoquant la mortalité des plantes [44].

### 3. Deux cas de rhizobactéries

#### 3.1. Le genre *Pseudomonas* sp

##### 3.1.1. Classification et habitat

Le genre *Pseudomonas* a été découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à la famille des *Pseudomonaceae*, et à l'ordre des *Pseudomonales* [52]. Actuellement, nous comptons 188 espèces répertoriées dans l'IJSEM (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*) comme: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. stutzeri* [53].

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont pour la plupart des ubiquitaires, nous les retrouvons sur tous les horizons particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes [54]. Ces microorganismes colonisent un large éventail d'environnements, elles sont rencontrées principalement dans les sols, sur les végétaux, ainsi que dans les eaux douces et marines [55].

##### 3.1.2. Morphologie et structure

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, asporulants, de forme droite ou légèrement courbée. Leur taille est comprise entre 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5 µm de long,

très mobiles en aérobiose grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche [56]. Cependant, certaines souches et notamment *P. msallei* sont immobiles et aciliées [57]. Elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique [58].

### 3.1.3. Croissance et nutrition

Les *Pseudomonas* ont la capacité à croître à des températures extrêmes qui varient de 4°C à 42°C. Toutes les espèces ou souches saprophytes se multiplient à des températures optimales situées entre 28°C et 30°C [59]. Quelques espèces comme *P. syringea*, sont phytopathogènes [60]. Les *Pseudomonas* ont un taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries [61].

Ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques [61] [62]. La culture des *Pseudomonas* peut être obtenue sur des milieux très simples comme le milieu peptoné et la gélose lactosée. Ces milieux sont ajustés à un pH supérieur à 4,5 et un temps d'incubation de 48 à 72 h est nécessaire pour que les colonies soient repiquables [63]. Elles produisent des pigments hydrosolubles se diffusant dans le milieu [64].

### 3.1.4. Caractéristiques métaboliques

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose). Les *Pseudomonas* spp. sont chimio-organotrophes facultatifs et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier [65].

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides [66]. L'aptitude de certains isolats à dégrader des substances xénobiotiques a également retenu l'attention de différents chercheurs [67] [54]. De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* sont capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. L'assimilation des composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère [68] [69].



En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement [70].

### 3.1.5. Le genre *Pseudomonas* sp en association avec les plantes

Les *Pseudomonas* spp associés aux plantes incluent des souches pathogènes et des souches bénéfiques. Elles ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. Les exsudats racinaires, et en particulier les sucres et les acides aminés, attirent les bactéries par chimiotactisme à la surface des racines. Ils stimulent notamment la mobilité flagellée des bactéries, ce qui permet à ces dernières de coloniser la rhizosphère [71]. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux *pathovars* de *Pseudomonas syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes [72].

Néanmoins, d'autres espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui promouvoient la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires [73] [17] [2] [74] [75]. Les *Pseudomonas* produisent notamment, de nombreux métabolites antifongiques [74] [75]. Ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes [76].

Ces bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive. Puis elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère [77] [78].

## 3.2. Les actinomycètes

### 3.2.1. Généralités

Les actinomycètes appartiennent à la classe des *Actinobacteria*, ce sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, à Gram positif et de haut coefficient de Chargaff (%GC) : généralement compris entre 60 et 75 %. Le phylum des *Actinobacteria* est grand et complexe. Il regroupe 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens [79] [80] [81].

Les actinomycètes sont, pour la plupart, immobiles, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures. Ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines et sont abondamment distribués dans la nature [82] [83]. Les actinomycètes ont un type de croissance mycélien rappelant celui des champignons filamenteux, leurs cellules produisent des filaments ou hyphes avec des ramifications [84].

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes. Ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol jusqu'à 2 m de profondeur c'est-à-dire dans la rhizosphère. Le genre *Streptomyces* est le plus fréquent dans le sol, il couvre à lui seul 95% des souches d'actinomycètes isolées [85].

**Tableau 1:** fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents [86].

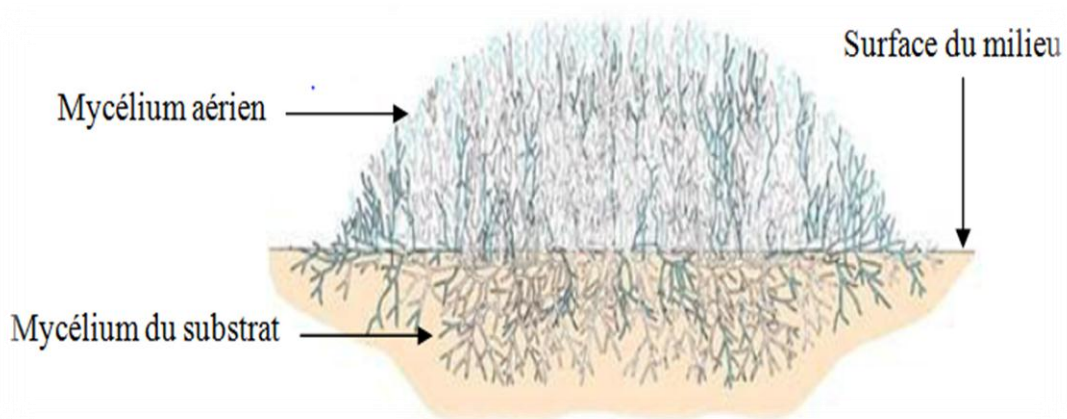
Genres	Pourcentage (%)
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

### 3.2.2. Morphologie

La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes. Le mycélium se développe sur et dans les milieux (mycélium végétatif ou mycélium de substrat), il est constitué par des hyphes, qui pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface. Cette formation montre la capacité des actinomycètes à pénétrer dans le substrat solide et ainsi dégradent la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires [87]. Au-dessus du mycélium de substrat se développe un autre mycélium dit aérien. Les filaments produisent des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporange ou conidies. Ces derniers libèrent des spores isolées ou groupées en chaînes. Elles sont de diverses formes, d'aspect lisse et ridée.

Certains actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières. D'autres enfin, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires [84].

Les colonies que forment les actinomycètes sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc [84].



**Figure 04:** croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide [88].

### 3.2.3. Métabolisme

Selon leur métabolisme, les actinomycètes sont répartis en deux groupes, le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif qui sont localisés, principalement, dans le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux [89].

En général, les actinomycètes sont des bactéries chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais plusieurs espèces sont capables, aussi, de croissance chimioautotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone [90].

Les actinomycètes ont été et demeurent la source la plus féconde pour tous les types de métabolites bioactifs. Plus d'un millier de métabolites secondaires produits par les actinomycètes ont été découverts de 1988 à 1992. Parmi ces métabolites, les antibiotiques avec des structures chimiques diverses telles que celles des polycétides, des B-lactames et des peptides [91]. Le reste est constitué d'une grande variété d'enzymes extracellulaires qui leur permettent de dégrader divers biopolymères dans le sol comme les cellulases ou pour lutter contre les champignons pathogènes des plantes dans la rhizosphère comme les chitinases ou les glucanases [92].



# Matériel et méthodes

## 1. Les Souches étudiées

- ***Pseudomonas* sp** : 193 souches isolées de sol rhizosphérique de la plante de tomate de l'espèce de *solanum lycopersicum* L (site : medje zamar, guelma), par Mlle Khenaka Karima. Ils sont notés de PRT1 jusqu'à PRT193.
- **Actinomycètes :**
  - 83 souches notées ART1 jusqu'à ART83 isolées à partir de la rhizosphère de plantes de tomate de l'espèce de *solanum lycopersicum* L (site : medjez amar guelma ) par Mlle Khenaka Karima.
  - 49 souches notées ARF1 jusqu'à ARF49 isolées à partir de la rhizosphère forestière d'oumtifis et 10 souches notées ARM1 jusqu'à ARM10 isolée de la rhizosphère de forêt en montagne de l'aures par Mlle LEULMI Nassima (wilaya de kenchla).
  - **Phytopathogènes :** deux souches appartenant, respectivement, aux espèces *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* ont été utilisées comme micro-organismes tests pour la détermination de l'activité antifongique

**Nota-Béné :** Melle Khenaka.K et Melle Leulmi. N sont des enseignantes-chercheurs de l'équipe de « Microbiologie Appliquée » du laboratoire de « Génie Microbiologique et Applications ». Équipe dirigée par Mr le Professeur Boulahrouf Abderrahmane

## 2. Les Milieux de culture

- **Les milieux d'isolement et de conservation :** *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA) pour les actinomycètes, *Potato Dextrose Agar* (PDA) pour les champignons et le milieu *King B* et *Succinate-Agar* pour les souches du genre *Pseudomonas*.
- **Les milieux pour l'étude des caractères macroscopiques des actinomycètes :** milieux *International Streptomyces Project* (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7, ISP9), le milieu *Synthetic Medium* (SM), le milieu SMK, le milieu *Starch Casein Agar medium* (SCA), le milieu Gausse et le milieu *Czapek*.
- **Le Milieu *Pikovskaia* (PVK) :** pour la mise en évidence de la solubilisation de phosphate.
- **Le milieu *Chrome Azurol S (CAS) Agar modifié* :** milieu de révélation pour la production des sidérophores.
- **Le Milieu *Sierra* :** pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80%.
- ***Pectine Agar* :** pour la mise en évidence de la dégradation de pectine.

- **CarboxyMéthyl Cellulose-agar (CMC)** : pour la mise en évidence de la dégradation de cellulose
- **Le milieu TSI** : pour la mise en évidence de la production d'H<sub>2</sub>S.
- **Bouillon nutritif à 0,1 % de KNO<sub>3</sub>** : milieu pour la mise en évidence de la production de nitrate réductase.
- **Le milieu Colloidal Chitin Agar (CCA)** : pour la mise en évidence de production de chitinas.

### 3. Inocula

- les souches d'actinomycètes sont cultivées sur milieu YMEA à 28°C pendant 14 jours,
- les souches de mycètes sont cultivées sur milieu PDA à 28°C pendant 14 jours,
- les souches du genre *Pseudomonas* sp sont cultivées sur milieu *King B e* à 30°C pendant 7 jours.

### 4. Solubilisation du phosphate

L'activité solubilisatrice de phosphate a été mise en évidence sur le milieu *Pikovskaya* (PVK) solide (**Annexe 1**) qui contient du phosphate tricalcique Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> comme seule source de phosphore [93]. À partir des inoculas précédemment réalisés, Les souches de *Pseudomonas* sp et d'actinomycètes sont déposées sous forme des touches sur le milieu PVK. Après 3 jours d'incubation pour les souches non filamenteuses et 7 jours pour les actinomycètes filamenteux à 28 °C, les diamètres des halos de solubilisation qui entourent les isolats sont mesurés

### 5. Production des sidérophores

La production des sidérophores a été mise en évidence par la technique de **Pérez-Miranda et al., 2007** [94].

#### 5.1. Principe

Le principe de cette technique repose sur la présence du complexe fer-CAS-hexadécyltriméthyl ammonium (complexe Fer/CAS/HDTMA) dans le milieu, ce complexe de couleur bleu peut se dissocier en présence des chélateurs de fer, qui captent le fer et libère ainsi le *Chrome Azurol S* qui a une couleur orange.

L'examen visuel permet de s'assurer de la capacité des souches à produire des sidérophores et le calcul du rapport  $\frac{\text{diamètre du halo}}{\text{diamètre de colonie de la souche}}$  permet de comparer les différences de production entre les souches étudiées (**figure 5**).



**Figure 5:** détection des sidérophores sécrétés par un microorganisme cultivé sur milieu CAS Agar.

## 5.2. Technique

### 5.2.1. Préparation des milieux de culture exempts du fer

Les milieux de culture choisis sont le *Succinate-Agar* (**Annexe 1**) pour les souches non filamenteuses et le milieu *Czapek* (**Annexe 1**) pour les actinomycètes (souches filamenteux), ces milieux sont préparés sans l'addition de sulfate de fer.

Pour éliminer toute trace de fer dans le milieu, un volume de milieu de culture est mélangé avec un volume de 8-hydroxyquinoline à 3% (préparé dans le chloroforme). Le mélange est agité et conservé à 4°C pendant une nuit. Ensuite la phase aqueuse (la phase supérieure) est récupérée à après décantation (ampoule à décanter). Afin d'éliminer les traces de 8-hydroxyquinoline, la phase récupérée est lavée deux fois avec le chloroforme, le milieu de culture est, ensuite, porté à ébullition sous la hotte chimique pour éliminer les traces de chloroforme.

### 5.2.2. Préparation du milieu de révélation

Selon la méthode de **Pérez-Miranda et al**, le milieu CAS (**Annexe 1**) est préparé selon la méthode de **Schwyn et Neilands (1987) [95]** avec quelques modifications : le milieu n'est pas additionné de substances nutritives et l'Agar est remplacé par l'agarose.



### 5.2.3. Culture et révélation

La culture de différentes souches est réalisée par touche sur le milieu de culture exempt de fer, pour une durée de 48 h pour les souches non filamenteuses et 5 jours pour les actinomycètes filamenteux.

Après, le milieu est inondé avec 10 ml du milieu de révélation. La production des sidérophores est indiquée par l'apparition d'un halo orange autour des colonies après 15 min. Le diamètre de chaque halo ainsi que le diamètre de croissance des colonies sont mesurés afin de calculer le rapport cité précédemment.

## 6. Etude de l'activité antifongique

L'activité antifongique est mise en évidence, sur le milieu PDA (**Annexe 1**), contre les micro-organismes tests phytopathogène suivants : *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*.

### 6.1. Réalisation du test

#### 6.1.1. Pour les *Pseudomonas* spp

L'étude de l'activité antifongique des souches *Pseudomonas* spp vis-à-vis des 2 champignons est réalisée par la même technique utilisée pour les actinomycètes sauf que l'ensemencement des souches étudiées est réalisé par 4 touches en parallèles et distantes de 03 cm du disque du champignon. Ces boîtes sont incubées dans l'étuve à 30°C pendant 7 jours.

#### 6.1.2. Pour les actinomycètes

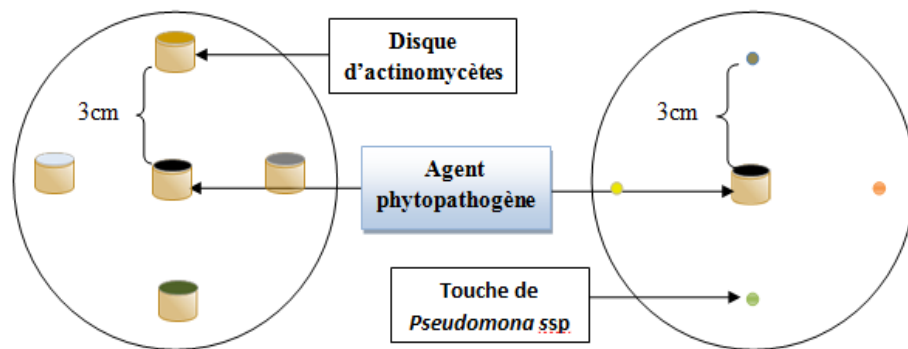
La production de métabolites antifongiques par les actinomycètes est mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar. Un disque de 08 mm de diamètre issu d'une culture pure de l'agent phytopathogène (*F. oxysporum* ou *A. niger*) est déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA [96]. Ensuite, quatre disques de 08 mm de diamètre de l'actinomycète sont placés, en parallèle et autour, dans ces boîtes, avec une distance de 03 cm du disque de champignon. Ces boîtes sont incubées dans l'étuve à 30°C pendant 14 jours. Des boîtes contenant justes le disque de champignon sont incubées dans les mêmes conditions, elles servent de contrôles [97].

Après les périodes d'incubation ; l'évaluation de l'inhibition est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante [98]:

$$\%I = \frac{C-T}{C} \times 100$$

**C** : Diamètre de croissance de *F. oxysporum* ou *A. niger* dans la boîte contrôle.

**T** : Diamètre de croissance de *F. oxysporum* ou *A. niger* en présence des souches étudiées.



**Figure 6:** technique d'ensemencement des souches étudiées pour la mise en évidence de l'activité antifongique.

## 7. L'identification de quelques souches actinomycètes

Des souches représentatives d'actinomycètes seront sélectionnées selon leur forte activité inhibitrice des agents phytopathogène pour une pré-identification.

### 7.1. Étude morphologique

#### 7.1.1. Macromorphologie et caractères cultureux

Les caractéristiques culturelles des souches telles que la croissance, la couleur du mycélium de substrat et la production de pigments diffusibles ont été observés après 14 jours d'incubation sur les milieux suivants : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7, [99]. SCA, Gausse et SM [100] (Annexe 1).

#### 7.1.2. Micromorphologie

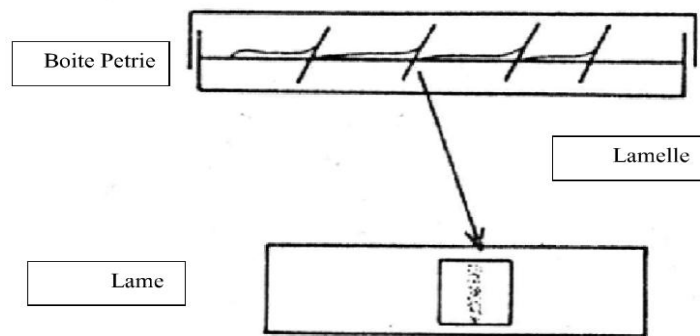
##### ➤ Technique de culture sur lame [101]

Les quatre souches sont ensemencées sur milieu solide ISP2. Ensuite, une portion rectangulaire d'Agar de 1cm x 1cm x 2 mm est découpée puis déposée sur une lame et recouverte

avec une lamelle. Les cultures sous forme de sandwich sont incubées à 28°C pendant 14 jours. L'observation se fait sous microscope optique à grossissements (X 100).

➤ **Technique de culture sur lamelle [102]**

Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu Gélosé ISP2 de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec celui-ci. Une goutte de chaque inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose entraînant quelques fragments du mycélium, elle est ensuite déposée sur la lame et examinée au microscope optique à grossissements (X 100).



**Figure 7:** technique de culture sur lamelle.

## 7.2. Étude physiologique et biochimique

### 7.2.1. Production de pigments mélanoides

La mise en évidence de la production des pigments mélanoides est réalisée par culture des souches sur deux milieux solides en gélose inclinée : ISP6 et ISP7. L'ensemencement est réalisé en surface par stries serrées. Un tube non ensemencé sert de témoin. L'observation de la couleur brune noire caractéristique des pigments mélanoides se fait au 2<sup>ème</sup> jour et au 4<sup>ème</sup> jour, en comparant les tubes ensemencés avec le témoin [100] [103].

### 7.2.2. Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de 10% de lait écrémé en poudre sont ensemencés et incubés à 28°C. Après 14 jours, la coagulation et la peptonisation sont notées [104].

### 7.2.3. Utilisation de sources de carbone

L'utilisation des différents substrats comme sources de carbone a été étudiée selon les méthodes de **Shirling et Gottlieb (1966)[99]**, **Goodfellow (1971)[105]** et **Williams *et al.* (1983b)[106]**. Le milieu ISP9 est utilisé comme milieu de base. Les sucres sont incorporés à une concentration finale de 1%, tandis que les sucres alcool et les acides organiques à 0,1% (P/V), les sources utilisées sont :

- **Sucre:** glucose, saccharose, arabinose, cellulose, xylose, lactose, fructose, maltose, galactose, ribose, sucrose, inositol,
- **Sucres Alcool :** Mannitol, sorbitol;
- **Acides organiques :** propionate de sodium et succinate de sodium.

L'utilisation des différents substrats est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur les milieux servant de contrôle positif (milieu ISP9 contenant 1% de glucose) et de contrôle négatif (milieu ISP9 sans la source de carbone).

### 7.2.4. Utilisation de sources azotée

La mise en évidence de la capacité des souches à utiliser de différentes sources d'azote a été déterminée selon la méthode décrite par **Williams *et al.*, (1983b)[106]**. Le milieu ISP9 est additionné par des substrats azotés à une concentration de 0,1% (P/V). Les différentes substances utilisées sont : la méthionine, l'acide aspartique, la cystéine, la tyrosine, l'arginine, la proline, la glycine, le tryptophane. Les résultats d'assimilation sont notés après 14 jours par comparaison avec le témoin positif (asparagine) et négatif (sans source d'azote ajoutée).

### 7.2.5. Les activités de dégradation

La dégradation de la gélatine (0,4%), la caséine (1%), l'amidon (1%) la tyrosine (0,5%) l'adénine (0,1%) a été déterminée sur le milieu de base de l'ISP9. L'hydrolyse du tween 80 à 0,1% a été testée sur milieu de Sierra (**Annexe 1**). Pour la dégradation de la pectine (1%), Les souches sont ensemencées sur le milieu pectine Agar (**Annexe 1**). Les activités de dégradation sont notées après 14 jours d'incubation.

Pour les composés insolubles, les activités ont été détectées par l'apparition, autour des colonies, de zones claires. Cependant, le résultat pour la gélatine, l'amidon et la pectine est notée après inondation des cultures respectivement avec la solution de chlorure de

mercure ( $\text{HgCl}_2$ ), de lugol et de une solution de CTAB (*bromure d'héxadecyl tri-méthyl ammonium*) à 1% (p/v) et laisser à température ambiante pendant quelques [107] [108] [109].

La dégradation de cellulose été déterminée selon la méthode décrite par (Maki et al ; 2011) [113]. A partir d'une culture pure (inoculas) des isolats , une colonie est prélevée, ensuite déposée sur boîte contenant du CMC (*Carboxyméthyl cellulose*) gélosé (Annexe 1). La production de cellulase est mise en évidence par la coloration à la solution Iodine (Gram) (Annexe 2).

Pour ce faire, un volume de 10 ml est coulé dans la boîte. Les colonies développant une auréole montre que les souches en question possèdent une activité cellulase.

#### 7.2.6. Production de sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ )

Des tubes contenant du milieu TSI (Annexe 1) sontensemencés puis incubés pendant 14 jours à 28°C. La production de l' $\text{H}_2\text{S}$  est appréciée par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu [110].

#### 7.2.7. Réduction des nitrates

La nitrate- Réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des nitrates  $\text{NO}^{-3}$  en  $\text{NO}^{-2}$  (nitrite) ou an  $\text{N}_2$ . Elle est mise en évidence selon le protocole de (Singleton, 1999) [111].

10 ml de bouillon nutritif contenant 0,1% de nitrate de potassium (Annexe 1) sontensemencés et incubés à 28°C. Au 5<sup>eme</sup>, 10<sup>eme</sup> et 14<sup>eme</sup> jour d'incubation, trois gouttes des réactifs de Griess I et II sont ajoutées à 1ml de culture. La réduction de nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés. L'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche). En absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites).

#### 7.2.8. La production de chitinase

La mise en évidence de l'activité chitinolytique consiste à ensemencer les souches actinomycétales par simple strie sur milieu CCA (*Colloidal Chitin Agar*) (Annexe 1). Après 8 jours d'incubation, la production de chitinase extracellulaire est traduite par l'apparition de zones claires autour des colonies [112].

### 7.2.9. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques

Pour l'étude de l'effet trois inhibiteurs chimiques sur la croissance bactérienne, les 4 souches sont ensemencées sur milieu Bennett modifié (MBA) (**Annexe 1**) additionné de composés inhibiteurs aux concentrations suivantes : chlorure de sodium 4, 7, 10, 13 % (P/V), phénol (0,1 P/V), crystal violet (0,0001 P/V). La présence ou l'absence de la croissance est enregistrée après 7 et 14 jours d'incubation par comparaison avec le témoin [106] [114].

### 7.2.10. La résistance aux antibiotiques

La mise en évidence de la sensibilité des quatre souches aux différents antibiotiques est basée sur la méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (YMEA) (**Annexe1**), recommandée par **Williams et al. (1983)** [107]. Les différents antibiotiques utilisés sont l'ampicilline (AMP), l'Erythromycine (E), la spiromycine (SP), la gentamicine (CN), l'amikacine (AK), l'imipenème (IPM), *Nalidixic Acid* (NA30), le Cefuroxime (CXM30), la Streptomycine(S10) et l' Amoxicilline (AMC30) À partir des culture pure des 4 souches d'actinomycète, une colonies est ensemencée par stries sur la surface de la gélose puis les disques d'antibiotiques y sont déposés. Après une pré-diffusion de 30 minutes, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures, ensuite les diamètres d'inhibition sont mesurés.

## 8. Milieu optimal et effets de deux facteurs sur la production des antifongiques par les souches ARF4 et ARF10

### 8.1. Milieu de culture optimal de production d'antifongique

Pour sélectionner le milieu nutritif optimal pour la production d'antibiotiques, cinq milieux de culture différents (SCA, SM, SMK, Bennett, *Czapeck* et YMEA) (**Annexe 1**) ont été utilisés. Les milieux ont été ensemencés par stries serrées à partir d'une colonie et/ou spores des souches ARF4 et ARF10 puis incubés pendant 14 jours à 30 °C. L'activité antifongique a été déterminée par la méthode des cylindres d'Agar contre deux champignons *A. niger* et *F. oxysporum*.

Le milieu dans lequel la souche présente la production d'antifongique maximale exprimée en termes de diamètre de zone d'inhibition est utilisé comme milieu optimal de production d'antifongique.

## 8.2. Effet de la concentration en NaCl du milieu optimal sur la production d'antifongique

Les différentes concentrations en NaCl étudiées sont : 0%, 2%, 4%, 6%, 8% et 10%. L'activité antifongique a été estimée par la technique des cylindres d'Agar contre les deux souches phytopathogène (*A. niger* et *F. oxysporum*). La concentration en NaCl qui donne une bonne production d'antifongique est notée (diamètre des zones d'inhibition).

## 8.3. Effet de la valeur de pH initial du milieu optimal sur la production d'antifongique

Les différentes valeurs de pH initial étudiées sont : 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9. pour étudier l'impact du pH. La production d'antifongique a été estimée par la technique des cylindres d'Agar contre les deux souches phytopathogènes (*A. niger* et *F. oxysporum*). Le pH initial qui donne une bonne production d'antifongique est notée (diamètre des zones d'inhibition).

## 9. Cinétique de la production des substances antifongiques

La cinétique de production de substances antifongiques par les deux souches ARF4 et ARF10 a été suivie sur le milieu optimal en utilisant la technique des cylindres d'Agar. Un cylindre est prélevé quotidiennement du premier au Septième jour d'incubation puis testé contre les champignons *A. niger* et *F. oxysporum*.

## 10. Estimation de la croissance (biomasse) des souches ARF4 et ARF10 à différents pH et concentrations en NaCl

La mesure de la biomasse a été réalisée selon la méthode de **Pfefferle et al. (2000)**[115]. Les souches d'actinomycètes ARF4 et ARF10 sont cultivées en erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu optimal à différents pH et d'autres à différentes concentration en NaCl puis ils sont cultivées à 28°C sous agitation 250 rpm pendant sept jours. Les inocula utilisés correspondent à des colonies et/ou des spores prélevées à partir des cultures précédemment réalisées.

Un volume de culture est prélevé puis centrifugé à 45000 g pendant 30 mn dans une centrifugeuse. Le culot (biomasse) est lavé par centrifugation à trois reprises avec de l'eau distillée stérile. Les tubes (culot sans eau) sont ensuite incubés à 60°C durant 24 h puis pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare.

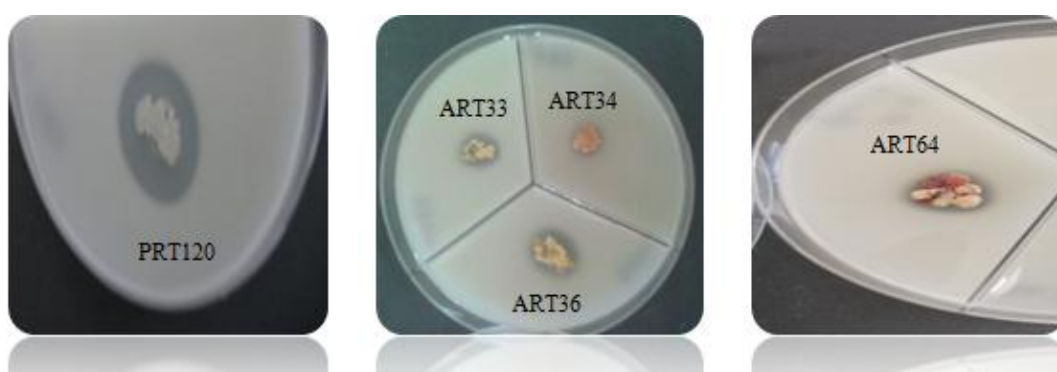
A decorative border with a repeating geometric pattern in blue and grey surrounds the page content.

# Résultats et discussion



## 1. Solubilisation de phosphate

La capacité à solubiliser le phosphate inorganique varie d'une souche à l'autre. Sur les 276 isolats analysés, seulement 45 souches de *Pseudomonas* sp et 18 souches d'actinomycètes (**Figure 8**) ont un pouvoir solubilisateur. Les souches PRT120, PRT41, PRT117 et ART36, ART63 présentent un halo de solubilisation de 15, 8, 7 mm et 8, 7 mm respectivement (**Tableau 2**). Ils semblent être les plus efficaces. D'autres souches particulièrement PRT1, PRT93, PRT40, ART22 et ART13 solubilisent modérément le phosphate avec un diamètre du halo qui varie de 2 à 4 mm. Le halo de solubilisation est absent chez tout le reste des isolats. Les codes de ces derniers ne figurent pas dans le tableau 2.



**Figure 8:** photographies de la solubilisation du phosphate (halo) par quelques souches de *Pseudomonas* sp et d'actinomycètes.

**Tableau 2:** diamètre du halo de solubilisation du phosphate

Souches	Diamètre en (mm)
<b><i>Pseudomonas</i> spp</b>	
PRT41	8
PRT49	5
PRT120	15
RT117, PRT128, PRT129	7
PRT49, PRT78, PRT38, PRT124, PRT28, PRT59, PRT110	5
PRT69, PRT76, PRT77, PRT79, PRT86, PRT93, PRT99, PRT125, PRT186, PRT1, PRT5, PRT7, PRT27, PRT32, PRT44, PRT81, PRT85, PRT91, PRT102, PRT106, PRT112	2
PRT4, PRT29, PRT37, PRT40, PRT45, PRT47, PRT90, PRT75, PRT83, PRT84, PRT89, PRT94, PRT111, PRT119	4
<b>Actinomycètes</b>	
ART36	8
ART63	7
ART33, ART37, ART64, ART13, ART34	5
ART21, ART22, ART43, ART31, ART77, ART32	3
ART11, ART26, ART34, ART17, ART20, ART44, ART77	4

Ainsi, dans notre étude, 24,35 % des souches de *Pseudomonas* spp et 24,09% des souches d'actinomycètes sont capables de solubiliser le phosphate inorganique. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par d'autres auteurs. **Hamdali et al. (2008) [116]** ont montré que parmi les 300 actinomycètes étudiés 55 souches (soit 18%) solubilisent le phosphate. De même, **Babana (2003) [117]** a rapporté que les bactéries solubilisatrices du phosphate isolées à partir de quatre échantillons de sol au Mali représentent de 7,52 à 30,26% des bactéries totales. Ces bactéries appartiennent principalement au genre *Pseudomonas*.

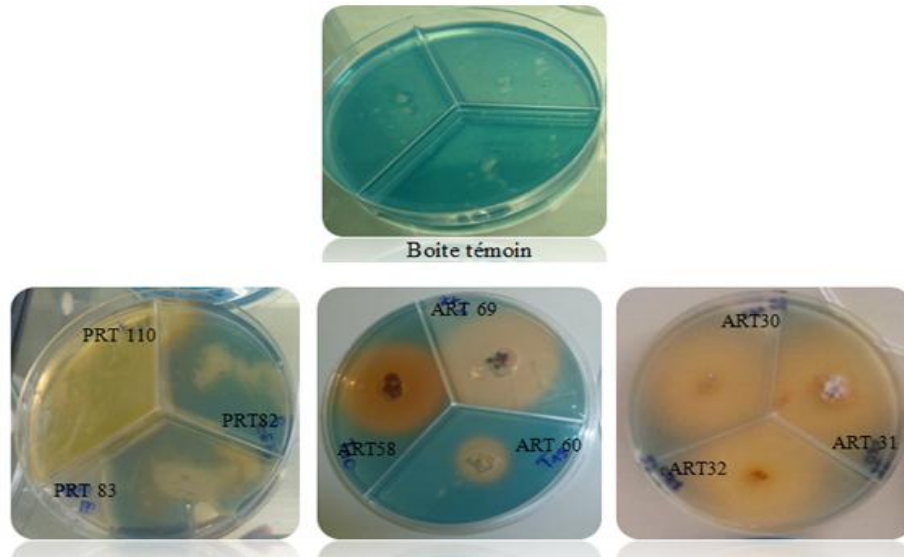
La solubilisation du phosphate par les micro-organismes rhizosphérique est d'un intérêt certain pour l'agriculture. Les essais en champs en Inde ont prouvé que l'utilisation des micro-organismes solubilisant du phosphate (MSP) peut augmenter les rendements de cultures jusqu'à 70 % [118] [129] [120]. Ces cultures comprenaient, la tomate, le maïs, la pomme de terre et le riz.

Les rapports dans la littérature suggèrent que la solubilisation microbienne du phosphate minéral peut être soit par l'excrétion d'acides organiques entraînant une acidification du milieu externe (**Whitelaw, 2000**)[121] soit par des phosphatases qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates solubles monobasique ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) et dibasique ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ).

## **2. Production des sidérophores**

La production des sidérophores est attestée par l'apparition d'un halo rouge/orangé autour de chaque colonie bactérienne (**Figure 9**). La production de sidérophores, par 65 souches de *Pseudomonas* sp et 14 souches d'actinomycètes, a envahi les boîtes donc de rapport CAS n'a pu être déterminé. En revanche, 9 isolats de *Pseudomonas* sp présente un halo de sidérophores dont le diamètre se confond au diamètre de la colonie donc ces souches ne produisent pas de sidérophores.

14 souches de *Pseudomonas* sp et 12 souches d'actinomycètes présentent un halo de production des sidérophores donc pour ces souches, les diamètres des halos formés, par la production de sidérophores, ont été mesurés, ainsi que les diamètres des colonies afin d'établir les rapports CAS (**Tableau 3**).



**Figure 9:** photographies de la production des sidérophores (halo rouge/orangé) par quelques souches de *Pseudomonas* sp et d'actinomycètes.

**Tableau 3:** rapport CAS\* de la production des sidérophores sur milieu gélosé CAS.

Isolats	Rapport CAS
<b><i>Pseudomonas</i> sp</b>	
PRT102	3,0
PRT69, PRT79, PRT151	1,5
PRT35, PRT44, PRT189, PRT192	1,7
PRT1, PRT10, PRT77, PRT164, PRT168, PRT175	2,0
<b>Actinomycètes</b>	
ART42	2,4
ART72	3,6
ART52, ART69	6,0
ART56, ART81	2,1
ART60, ART57	3,0
ART77, ART78	2,5
ART22, ART26, ART62	2,0

\* : le rapport CAS correspond au rapport des diamètres du halo sidérophore et de la colonie bactérienne.

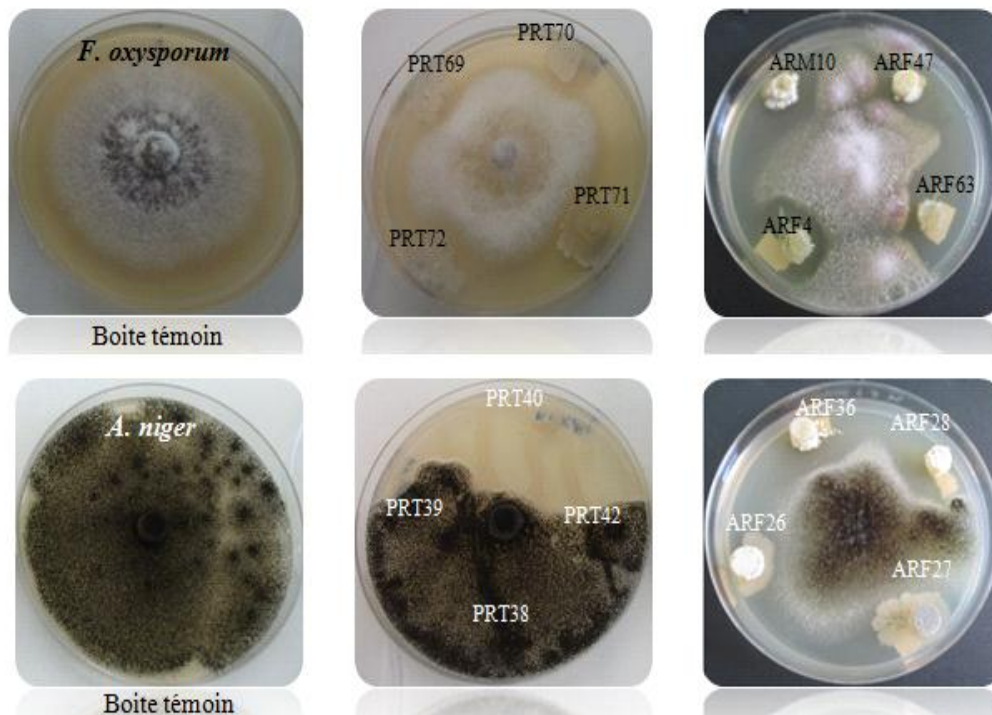
Les rapports CAS (**Tableau 3**) des souches appartenant au genre *Pseudomonas* sp varient de 2,0 à 3,0 contrairement aux souches d'actinomycètes dont les rapports varient de 2,0 à 6,0 mm ce qui laisse supposer que les actinomycètes présentent une forte capacité d'élaboration de ces chélateurs. En effet, la meilleure production a été détectée pour les souches ART52 et ART69 avec un rapport CAS égal à 6. Dans cette étude, 276 souches de *Pseudomonas* sp et

d'actinomycètes, isolés à partir de la rhizosphère de tomate, ont été examinés pour la production de sidérophores. Les résultats indiquent que 40.93% des souches PRT et 31.32% des souches ART produisent des sidérophores. Alors que d'autres études comme celle de **Pérez-Miranda *et al* (2007) [94]** qui ont démontré que parmi 48 microorganismes isolés à partir de différents sites (sols alcalins..), 36 souches produisent des sidérophores ce qui correspond à 75%.

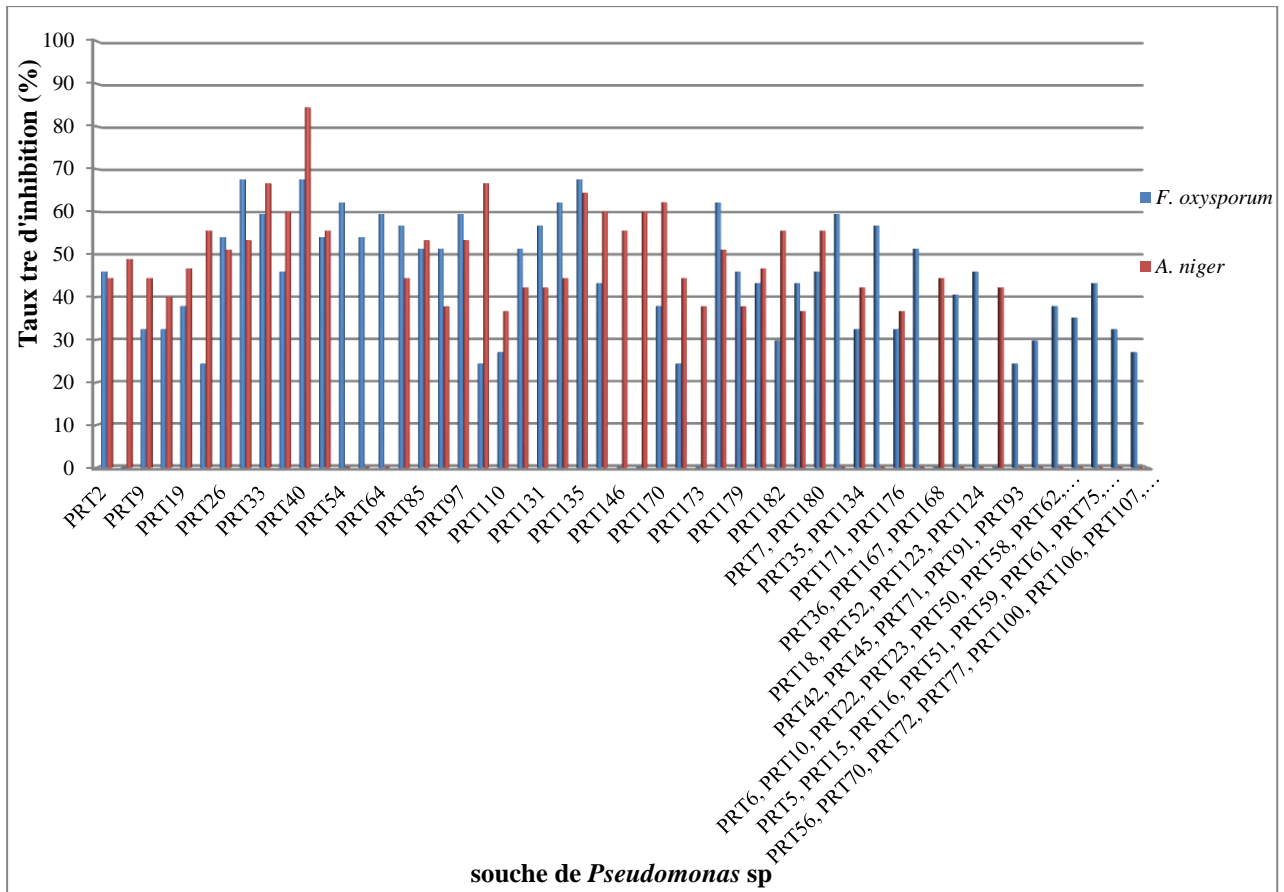
### 3. Etude de l'activité antifongique

Dans les **Figures (11, 12, 13, 14)** sont présentés les résultats de l'antagonisme des 143 souches d'actinomycète et 193 souches de *Pseudomonas* sp contre les deux mycètes phytopathogène : *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*.

Parmi les 193 souches de *Pseudomonas* sp, 83 souches ne montrent aucune activité antifongique. Par contre, 33 souches inhibent, respectivement, la croissance mycélienne des deux phytopathogènes et 117 souches inhibent un seul des deux champignons phytopathogènes. Les plus importants pourcentages d'inhibition ont été obtenus avec la souche PRT40 et atteignent les valeurs de 67,57% pour *F. oxysporum* et 84.44% pour *A. niger*. Les plus faibles pourcentages ont été obtenus avec 5 souches, parmi eux la PRT42 avec 24,32% d'inhibition contre *F. oxysporum* et PRT91 avec 0% d'inhibition vis-à-vis d'*A. niger*.



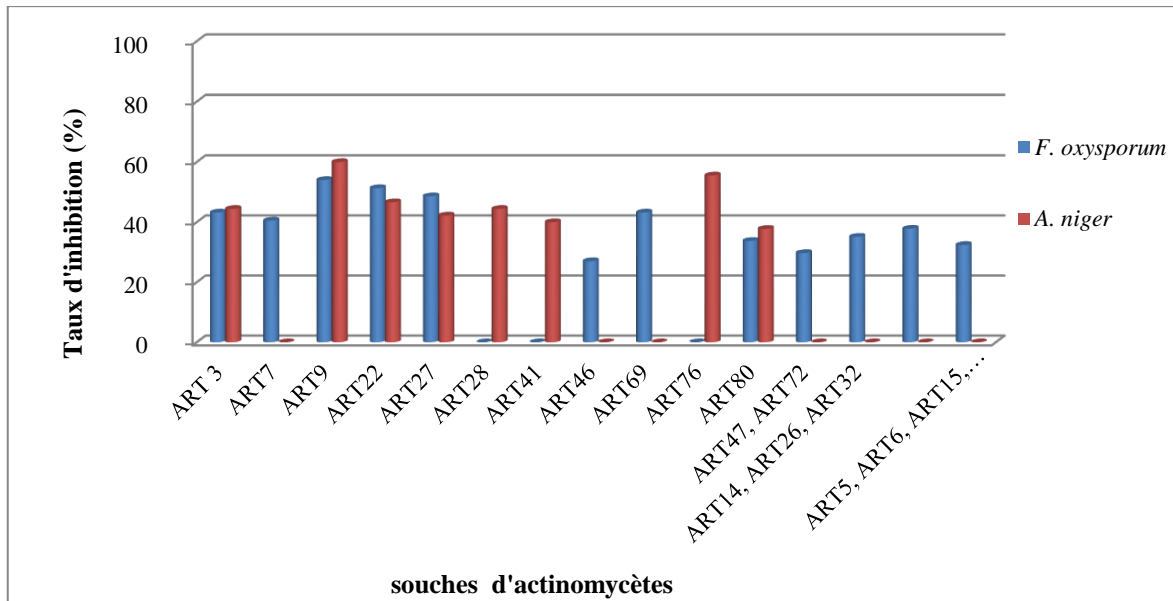
**Figure 10:** photographies de l'inhibition des deux champignons phytopathogènes (*A. niger*, *F. oxysporum*).



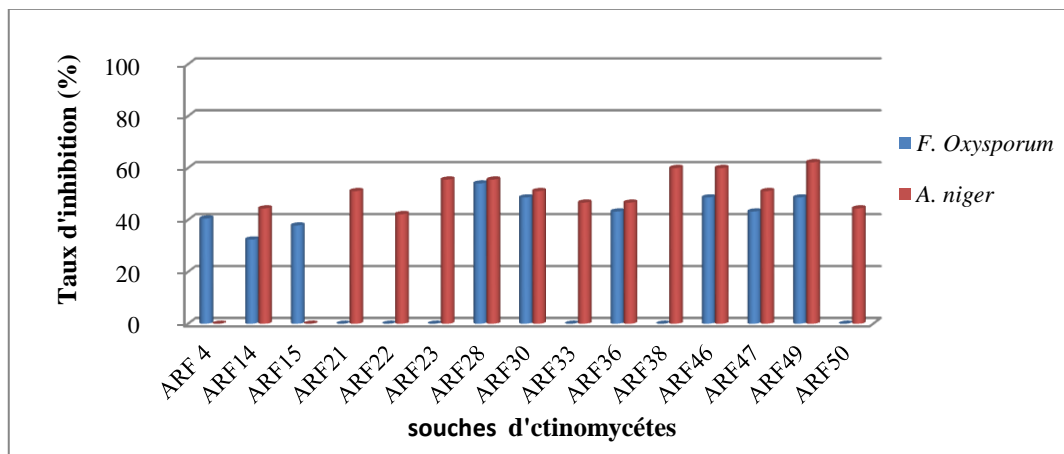
**Figure 11:** pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporium* et d' *A. niger* en présence des souches de *Pseudomonas* sp (PRT).

Parmi les 144 souches d'actinomycètes, 54 souches d'ART, 36 souches d' ARF et 7 souches d'ARM n'ont montré aucune activité antagoniste, 29 souches (22 ART, 7ARF ) ont inhibé la croissance d'un seul des deux champignons phytopathogènes et 18 souches ( 7 ART , 7ARF, 4 ARM ) ont inhibé les deux espèces de champignons .

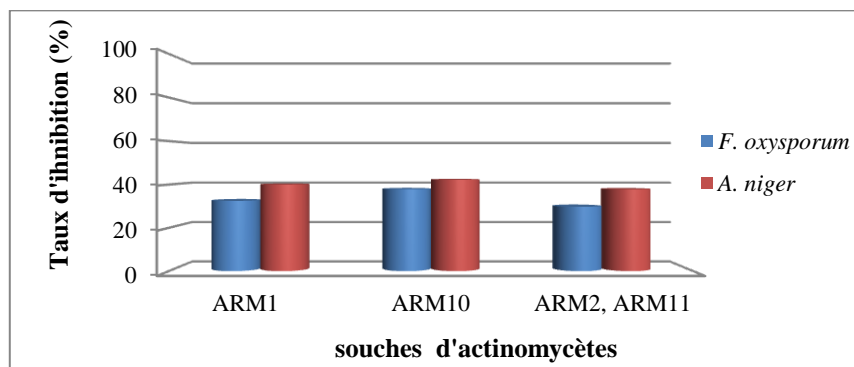
Les souches d'actinomycètes provenant du sol rhizosphérique de plantes de tomate sont fortement antagonistes vis-à-vis *F. oxysporum* avec un pouvoirs inhibiteur qui varie de 27,03 à 54,05% , la souche ART9 présente le taux d'inhibition le plus élevé soit 54,05% (**Figure 12**). Par contre, les souches rhizosphérique de forêt en plaine présentent une forte activité inhibitrice contre l'*A. niger* estimée de 42,22% à 62,22%, notamment la souche ARF49 qui donne la meilleure activité avec un pourcentage de 62,22% (**Figure 13**). Cependant, les actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère de forêt en montagne montrent, également, une activité intéressante vis-à-vis des 2 champignons à la fois avec des pourcentages variant de 29,73 à 42,22% (**Figure 14**).



**Figure 12:** pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum* et d' *A. niger* en présence des souches d'actinomycètes (ART).



**Figure13:** pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum* et *A. niger* par des souches d'actinomycètes de sol forestier en plaine (ARF).



**Figure 14:** pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum* et d'*A. niger* en présence des souches d'actinomycètes de sol forestier en montagne (ARM).

Dans notre étude, 150 (soit 77,72 %) parmi les 192 souches de *Pseudomonas* sp et 47 (soit 32,64%) parmi les 144 souches d'actinomycètes ont montré une activité antifongique contre au moins un des champignons phytopathogène. Ainsi, le nombre de souches de *Pseudomonas* sp inhibitrices est plus de deux fois plus élevé que celui des actinomycètes et ceci quel que soit la rhizosphère (plante de tomate ou de forêt).

Cependant le pourcentage des souches d'actinomycètes actives est plus élevé que d'autres pourcentages de souches actives décrites dans des études de criblage dans le sol. Par exemple **Hilali et al. (2002)[122]** ont trouvé que sur 85 souches d'actinomycète isolées à partir du milieu naturel (sol, eau et sédiments marins), seulement 25 souches (29,41 %) ont une activité vis-à-vis au moins un des germes cibles ( bactéries et/ou des champignons pathogènes). De même **Nirina et al.,(2014)[123]** montrent que parmi les 87 souches d'actinomycètes provenant des sols rhizosphérique de plantes d'haricot, de tomate et de concombre, 24 sont antagonistes de *Fusarium* spp et les pouvoirs inhibiteurs de ces isolats varient de 14% à 60%.

Nos résultats indiquent, également, que les isolats d'origine terrestre, sont une source potentielle intéressante de substances antifongiques et ont mis en évidence la présence d'une souche du genre *Pseudomonas* (PRT40) dont l'activité inhibitrice vis-à-vis des deux champignons est très intense.

Cette inhibition des phytopathogène est due soit à la production des antibiotiques par les antagonistes, soit à la compétition vis-à-vis des éléments nutritifs, soit à des inhibiteurs. En effet, **Vernekar et al. (1999)[126]** à découvert un inhibiteur de protéase alcaline (API) en tant que nouvelle classe de protéines antifongiques contre les champignons phytopathogène tels que *Fusarium*.

## 4. L'identification de quatre souches d'actinomycètes

### 4.1. Étude morphologique

#### 4.1.1. Aspect macroscopique

Les différentes observations concernant la croissance, le développement du mycélium aérien et la pigmentation des souches ARF4, ARF10, ARF47 et ARM10 sont rassemblées dans les **Tableaux (4, 5, 6, 7)**

• La souche ARF4

Du 14<sup>ème</sup> jour au 21<sup>ème</sup> jours d'incubation, ARF4 a une bonne croissance sur les milieux ISP4, ISP2 et Gausse en développant un mycélium aérien abondant. Sur tous les autres milieux, ARF4 présente un mycélium aérien moins important et parfois il est absent totalement. Sa pigmentation sur les milieux de l'ISP tend vers une couleur beige, gris ou violet (Tableau 4). La coloration du mycélium de substrat varie suivant les milieux, elle est jaune sur ISP7 et vert sur les milieux *Czapek* et Gausse. ARF4 élabore un pigment, de couleur jaune, qui diffuse dans tous les milieux ISP7 (Figure 15).

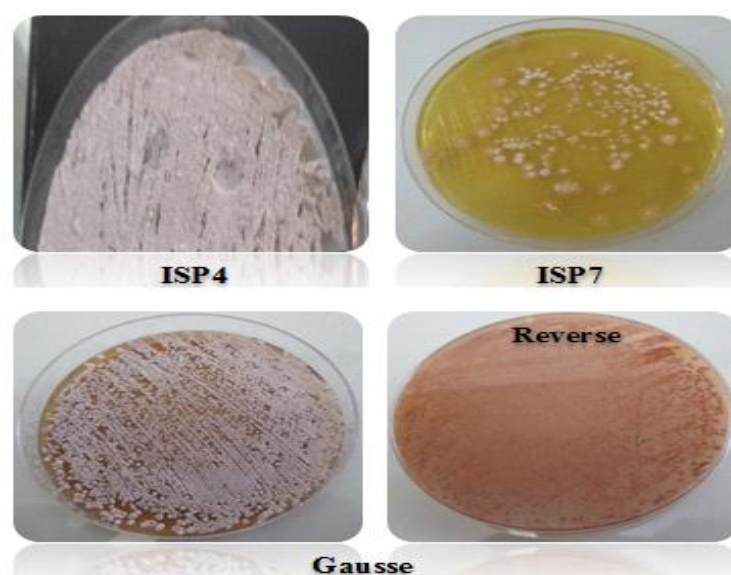


Figure 15: culture de la souche ARF4 sur différent milieux.

Tableau 4: caractéristiques culturelles d'ARF4.

Temps de culture	Milieu de culture	Caractéristique de la croissance	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Pigment diffusible
3 <sup>ème</sup> jour	ISP1	Faible	Jaune clair	Beige	Rose
	ISP2	Moyenne	Jaune	Beige	-
	ISP4	Moyenne	Beige	Beige	-
	ISP5	Moyenne	Jaune	Beige	-
	ISP6	Faible	Jaune	Beige	-
	SM	Faible	Jaune claire	Beige	-
	<i>Czapek</i>	Très faible	Beige	Beige	-
	YMEA	Faible	Blanche	Verte	-
	ISP3, ISP7, ISP9, SMK, Gausse, SCA	-	-	-	-
	ISP1	Faible	Beige	Beige	Rose
	ISP2	Bonne	Vert claire	Gris	-
	ISP4	Bonne	Beige	marron claire	-
	ISP5	Moyenne	Beige claire	Jaune-beige	Jaune

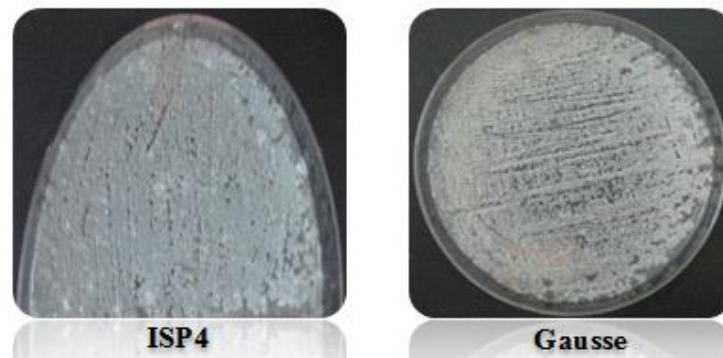


7 <sup>ème</sup> jour	ISP6	Faible	Beige claire	Jaune-beige	-
	ISP7	Faible	Jaune	Beige	Jaune
	SM	Faible	Jaune	Beige claire	-
	SCA	Faible	Vert	Blanche	-
	Czapek	Moyenne	Vert-jaune	Gris claire	Vert
	Gausse	Bonne	Marron	Gris	Vert
	YMEA	Bonne	Vert foncé	Mauve foncé	-
	ISP3, ISP9, SMK	-	-	-	-
Du 14 <sup>ème</sup> au 21 <sup>ème</sup> Jours	ISP1	Faible	Jaune	Beige	-
	ISP2	Bonne	Vert-Marron	Violet claire	-
	ISP4	Bonne	Gris	Violet	-
	ISP5	Moyenne	Jaune	Beige	Jaune
	ISP6	Très Faible	Jaune	Jaune claire	-
	ISP7	Moyenne	Jaune	Beige	Jaune
	SMK	Très faible	Beige	Marron	-
	SM	Faible	Beige foncé	beige claire	-
	SCA	Faible	Vert	Blanche	-
	Czapek	Moyenne	Vert	Gris clair	-
	Gausse	Bonne	Marron foncé	Violet claire	-
	YMEA	Bonne	Vert-noir	Mauve foncé	-
	ISP3, ISP9	-	-	-	-

(-) pas de croissance, absence des pigments

- La souche ARF10

Du 14<sup>ème</sup> jour au 21<sup>ème</sup> jour, ARF10 présente une très bonne croissance sur les milieux ISP4 et Gausse avec une sporulation abondante (**Figure 16**), par contre elle ne sporule pas sur les milieux ISP6, ISP7, SM et SCA. Elle forme des colonies de couleur jaune et grise. Sur les autres milieux, elle ne se développe pas. La coloration du mycélium de substrat varie du beige, jaune au marron. ARF10 élabore des pigments diffusibles qui virent au jaune sur le milieu ISP6.



**Figure 16:** culture de souches ARF10 sur deux milieux.

**Tableau 5:** caractéristiques culturelles de la souche ARF10.

Temps de culture	Milieu de culture	Caractéristique de la croissance	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Pigment diffusible
3 <sup>ème</sup> jour	ISP1	Très faible	Beige claire	Blanc	-
	ISP2	Moyenne	Beige	Beige	-
	ISP4	Moyenne	Beige	Blanc	-
	ISP6	Faible	Jaune	Jaune	-
	SMK	Faible	Beige	Jaune claire	-
	SM	Moyenne	Beige	Jaune	-
	SCA	Faible	Marron	Beige	-
	Czapek	Faible	Beige	Blanc	-
	Gausse	Moyenne	Blanc	Blanc	-
	YMEA	Faible	Blanc	Blanc	-
	ISP3, ISP5, ISP7, ISP9	-	-	-	-
7 <sup>ème</sup> jour	ISP1	Faible	Beige claire	Blanc	-
	ISP2	Moyenne	Beige	Beige	-
	ISP3	Très faible	Beige	Gris	-
	ISP4	Bonne	Vert claire	Gris claire	-
	ISP6	Faible	Jaune	Jaune	-
	ISP7	Faible	Jaune	Jaune	-
	SMK	Moyenne	Marron claire	Gris claire	-
	SM	Moyenne	Beige	Jaune	-
	SCA	Moyenne	Marron	Gris	-
	Czapek	Moyenne	Beige	Gris	-
	Gausse	Bonne	Gris claire	Gris claire	-
	YMEA	Bonne	Beige foncé	Gris vers le bleu	-
	ISP5, ISP9	-	-	-	-
Du 14 <sup>ème</sup> au 21 <sup>ème</sup> Jours	ISP1	Faible	Beige	Blanc	-
	ISP2	Moyenne	Marron claire	Gris claire	-
	ISP3	Très faible	Beige	Gris	-
	ISP4	Bonne	Gris Claire	Verte	-
	ISP6	Moyenne	Jaune	Jaune	Jaune
	ISP7	Moyenne	Beige	Jaune	-
	SMK	Moyenne	Marron claire	Gris	-
	SM	Moyenne	Beige	Jaune	-
	SCA	Moyenne	Beige	Gris	-
	Gzapek	Moyenne	Beige foncé	Faible, gris	-
	Gausse	Bonne	Beige Claire	Gris claire	-
	YMEA	Bonne	Beige claire	Bleu claire	-
	ISP5,ISP9	-	-	-	-

(-) pas de croissance, absence des pigments.

• **La souche ARF47**

Elle a une bonne croissance sur les milieux ISP5, ISP2 et YMEA en développant un mycélium aérien moyennement important. Sur tous les autres milieux, ARF47 présente une couleur beige ou blanche. Sa pigmentation sur les milieux ISP2 et ISP5 tend vers le jaune-marron (**Figure 17**). La coloration du mycélium de substrat varie suivant les milieux, elle est grise sur les milieux ISP4 et beige à jaune-marron sur les milieux *Czapek* et ISP5.



**Figure 17:** culture de souche ARF47 sur deux milieux.

**Tableau 6:** caractéristiques culturelles de la souche ARF47.

Temps de culture	Milieu de culture	Caractéristique de la croissance	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Pigment Diffusible
3 <sup>ème</sup> jours	ISP1	Faible	Beige	Beige	-
	ISP2	Moyenne	Rose très claire	Blanc	-
	ISP4	Très faible	Gris	Gris	-
	ISP5	Moyenne	Beige claire	Beige	-
	ISP6	Moyenne	Gris-vert	Gris	-
	ISP7	Faible	Blanc	Jaune très claire	-
	SM	Moyenne	Jaune	Jaune claire	-
	SCA	Très faible	Beige	Beige	-
	<i>Czapek</i>	Très faible	Beige	Blanche	-
	<i>Gausse</i>	Très faible	Beige	Beige	-
	YMEA	Faible	Beige	Beige	-
	ISP3, ISP9, SMK	-	-	-	-
7 <sup>ème</sup> jours	ISP1	Moyenne	Jaune	Jaune claire	-
	ISP2	Moyenne	Marron	Beige	-
	ISP4	Moyenne	Beige claire	Rose clair	-

	ISP5	Moyenne	Jaune	Jaune-Beige	Jaune
	ISP6	Faible	Vert	Vert foncé	-
	ISP7	Moyenne	Jaune claire	Beige claire	-
	SMK	Faible	Jaune	Blanc	Jaune foncé
	SM	Moyenne	Vert-jaune	Marron	Marron claire
	SCA	Faible	Beige	Beige	-
	Czapek	Faible	Beige	Blanc	-
	Gausse	Faible	Blanc	Beige Claire	-
	YMEA	Bonne	Beige foncé	Beige	-
	ISP3, ISP9	-	-	-	-
	Du 14 <sup>ème</sup> au 21 <sup>ème</sup> Jours	ISP1	Moyenne	Jaune	Jaune claire
ISP2		Bonne	Marron foncé	Gris	Jaune
ISP4		Moyenne	Gris	Rose claire	-
ISP5		Bonne	Jaune	Blanc	Marron
ISP6		Faible	Vert foncé	Noire	-
ISP7		Moyenne	Jaune claire	Beige	-
SMK		Moyenne	Marron claire	Blanc	Jaune foncé
SM		Moyenne	Vert foncé	Vert	Marron
SCA		Moyenne	Beige foncé	Blanc	-
Czapek		Faible	Beige	Blanc	-
Gausse		Moyenne	Beige	Beige	-
YMEA		Bonne	Beige foncé	Beige	-
ISP3, ISP9		-	-	-	-

(-) pas de croissance, absence des pigments.

- **La souche ARM10**

Elle a une bonne croissance sur les milieux ISP5 et ISP7 en développant un mycélium aérien abondant. Sur tous les autres milieux. ARM10 présente un mycélium aérien faible ou absent. Sa pigmentation sur les milieux de l'ISP6 tend vers une couleur jaune claire. La coloration du mycélium de substrat varie suivant les milieux, elle est Beige sur les milieux ISP5, SMK. La présence d'un pigment diffusible dont la teinte d'une couleur jaune claire a été mise en évidence.



**Figure 18:** photographie de la souche ARM10 sur milieux ISP5 et ISP7.

Tableau 7: caractéristiques culturelles de la souche ARM10

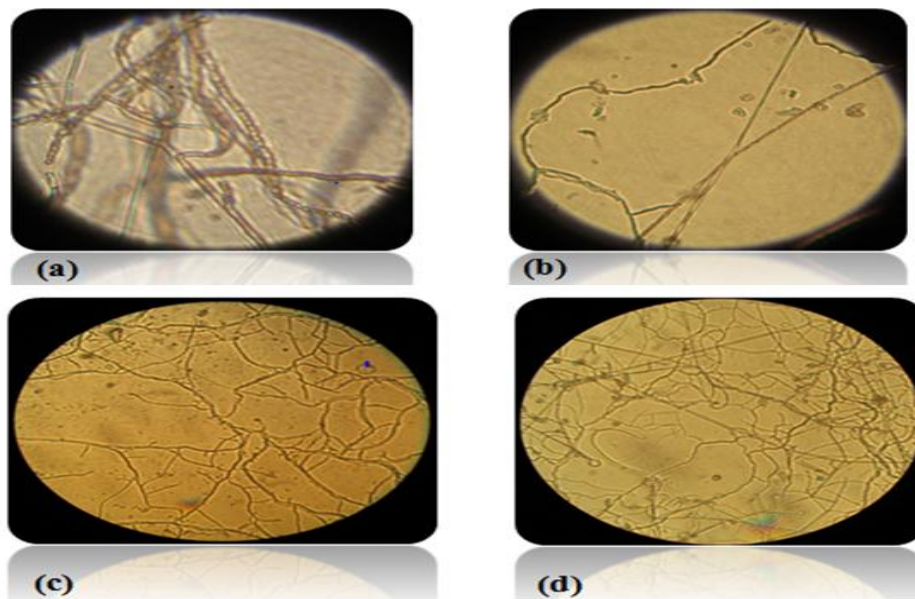
Temps de culture	Milieu de culture	Caractéristique de la croissance	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Pigment diffusible
3 <sup>ème</sup> jour	ISP1	Faible	Jaune clair	Beige	-
	ISP2	Moyenne	Jaune claire	Beige	-
	ISP5	Moyenne	Beige claire	Blanche	-
	ISP6	Moyenne	Beige	Beige	-
	ISP7	Faible	Beige	Blanche	-
	SM	Moyenne	Beige	Beige	-
	SCA	Très faible	Beige claire	Blanche	-
	YMEA	Faible	Blanc	Blanche	-
	ISP3, ISP4, ISP9, SMK, Czapek, Gousse	-	-	-	-
7 <sup>ème</sup> jour	ISP1	Moyenne	Jaune claire	Beige	-
	ISP2	Moyenne	Jaune foncé	Beige	-
	ISP5	Moyenne	Beige claire	Blanc	-
	ISP6	Moyenne	Jaune	Blanc	-
	ISP7	Moyenne	Beige foncé	Blanc	-
	SM	Moyenne	Jaune claire	Beige	-
	SCA	Très faible	Beige claire	Blanc	-
	Gousse	Très faible	Blanc	Blanc	-
	YMEA	Bonne	Jaune	Blanc	-
	ISP3, ISP4, ISP9, SMK, Czapek	-	-	-	-
Du 14 <sup>ème</sup> au 21 <sup>ème</sup> Jours	ISP1	Moyenne	Beige	Beige	-
	ISP2	Moyenne	Marron claire	Beige	-
	ISP5	Bonne	Beige	Blanc	-
	ISP6	Moyenne	Jaune	Beige	Jaune claire
	ISP7	Moyenne	Marron claire	Blanc	-
	SMK	Très faible	Beige foncé	Blanc	-
	SM	Moyenne	Jaune claire	Beige	-
	SCA	Très faible	Beige foncé	Blanc	-
	Gousse	Très faible	Beige	Blanc	-
	YMEA	Bonne	Jaune	Jaune-vert	-
	ISP3, ISP4, ISP9, Czapek	-	-	-	-

(-) pas de croissance, absence des pigments.

4.1.2. Aspect microscopique

- **Technique des lames et lamelles**

Tous les souches développent un mycélium aérien épais, moins ramifié que le mycélium de substrat (**Tableau 8**). Il est peu abondant pour la souche ARF47 et très abondant pour les autres souches. Les observations microscopiques du mycélium aérien des souches mettent en évidence des hyphes épais, très ramifiées pour ARF4 et moyennement pour les autres. Les hyphes portent de longues chaînes de spores droites de type rectiflexible (RF) (jusqu'à 40 spores par chaîne). Les spores sont cylindriques. Le mycélium de substrat est long, non fragmenté et ne portant pas de spores (**Figure 19**).



**Figure 19:** photographies de la morphologie microscopique des souches d'actinomycètes  
 (a): ARF4 ; (b): ARF10 ; (c): ARF47 ; (d): ARM10.

**Tableau 8:** aspect microscopique des souches d'actinomycètes purifiés.

Souches	Mycélium de substrat		Mycélium aérien (21 <sup>ème</sup> jour)						
	Fragmentation	Sporulation	La forme des chaînes de Spores			La longueur des chaînes de spores		La forme de la spore	
			RF	S	RA	< 20	> 20	Cylindrique	Arrondie
ARF4	-	-	+	-	-	-	+	+	-
ARF10	-	-	+	-	-	+	-	+	-
ARF47	-	-	+	-	-	+	-	+	-
ARM10	-	-	+	-	-	-	+	+	-

(\* **RF:** rectiflexible; **S:** spirale; **RA:** boucle ouverte (retinaculum-apertum)

L'étude des caractéristiques morphologiques macroscopiques par l'utilisation de plusieurs milieux de culture est très importante pour caractériser les genres des actinomycètes. La sporulation de nos 4 souches diffère d'un milieu à un autre selon leur composition chimique. Pour les souches ARF4 et ARF10 elle est très importante sur les milieux ISP4 et Gausse par contre, pour les autres souches le milieu ISP5 a permis une bonne sporulation.

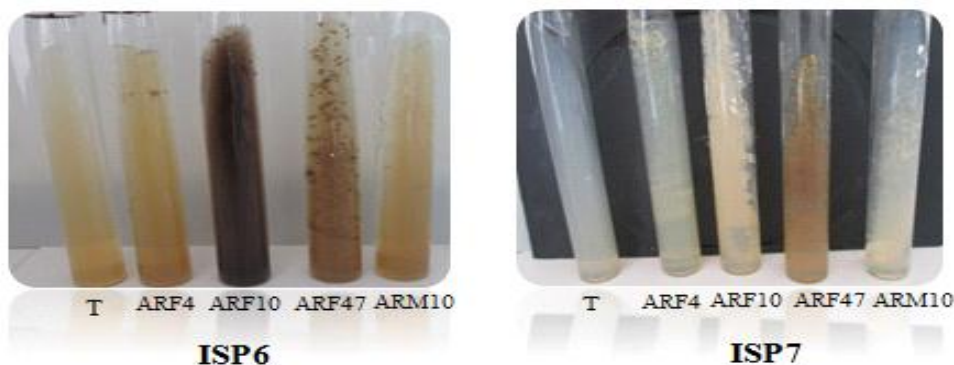
Plusieurs auteurs ont pu déterminer le genre des actinomycètes à partir de la caractérisation morphologique. En effet, d'après **Locci R (1989) [127]**, Les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieu de culture, montrent généralement une morphologie typique du genre *Streptomyces*. La totalité de nos isolats développent des colonies après 72 heures d'incubation. C'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide.

D'après l'étude microscopique sur lame et lamelle. Elles forment des chaînes de spores de plusieurs formes ; rectiflexibles, spirales (2 à 4 spires). Les spores ont une forme cylindrique, donc les 4 souches peuvent être classées dans le genre *Streptomyces*.

## 4.2. Caractères physiologiques et biochimiques

### ➤ Pigments mélanoides

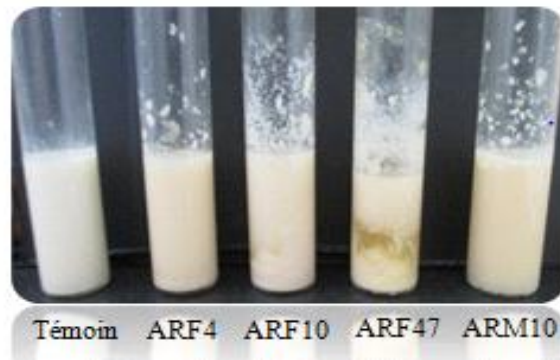
ARF10 et ARF47 élaborent des pigments mélanoides brun/noir et brun clair respectivement sur le milieu ISP6 mais pas sur le milieu ISP7. Cependant, ARF4 et ARM10 ne produisent aucun pigment mélanoïde, que ce soit sur milieu ISP6 ou ISP7 (**Figure 20**).



**Figure 20:** production des pigments mélanoides (T: témoin).

### ➤ Action sur le lait écrémé

Les souches ARF4, ARF10, ARM10 montrent une coagulation de lait ce qui traduit par la production de la coagulase. Par contre, la souche ARF47 peptonise le lait (**Figure 21**).

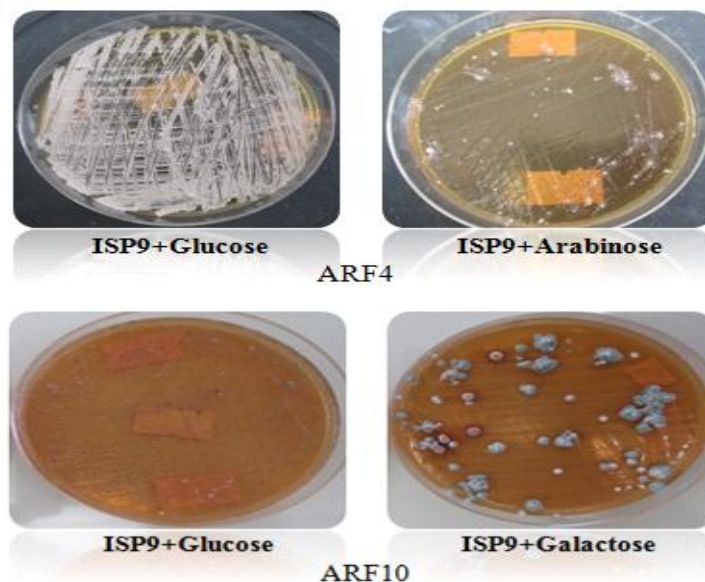


**Figure 21:** action des souches étudiés sur le lait écrémé (T: témoin).

➤ **Utilisation des sources de carbone**

Les 4 souches diffèrent par leurs capacités à utiliser les différentes sources de carbone. Toutes les souches sont capables d'utiliser le glucose, le galactose, le maltose et le fructose comme seule source de carbone. Alors qu'ils sont tous incapables d'assimiler le Propionate de sodium et le Succinate de sodium.

Pour l'ensemble de 15 sources de carbone. ARF10 utilise 11 sources et donne une croissance très abondante pour le saccharose suivie de la souche ARM10 avec 10 sources. Cependant, les souches ARF4 et ARF47 assimilent 7 et 5 sources de carbone respectivement avec une croissance abondante pour le D-fructose et le D-maltose et une croissance faible pour le D-galactose (**Tableau 9**).



**Figure 22:** photographies de l'utilisation des sucres comme source de carbone par les souches ARF4, ARF10.



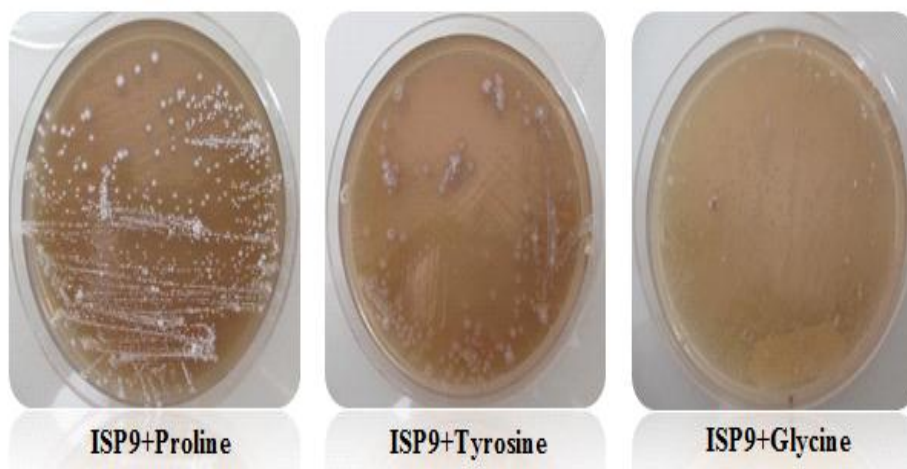
**Tableau 9:** utilisation des sources de carbone.

	Souches			
	ARF4	ARF10	ARF47	ARM10
Témoin négatif	-	-	-	-
D-glucose (témoin positive)	++	+	++	++
Lactose	-	+	-	+
Cellulose	-	-	-	-
Arabinose	-	+	-	+
D-xylose	-	+	-	+
Saccharose	-	++	-	-
D-fructose	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+
D-galactose	±	+	±	+
D-ribose	-	+	-	±
Sorbitol	-	±	±	-
Inositol	-	+	++	±
Mannitol	-	-	-	+
Propionat de sodium	-	-	-	-
Succinate de sodium	-	-	-	-

(-) : pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante,

➤ **Utilisation des sources azotées organiques (acides aminés)**

La souche ARF47 assimile la totalité des sources testées, alors que la souche ARF10 est capable d'assimiler tous les acides aminés à l'exception de la tyrosine, tandis que les souches ARF4 et ARM10 utilisent 5 sources d'azotes avec une croissance de modérée à abondante (**Tableau 10**).



**Figure 23:** photographies de l'utilisation des différentes sources d'azote.

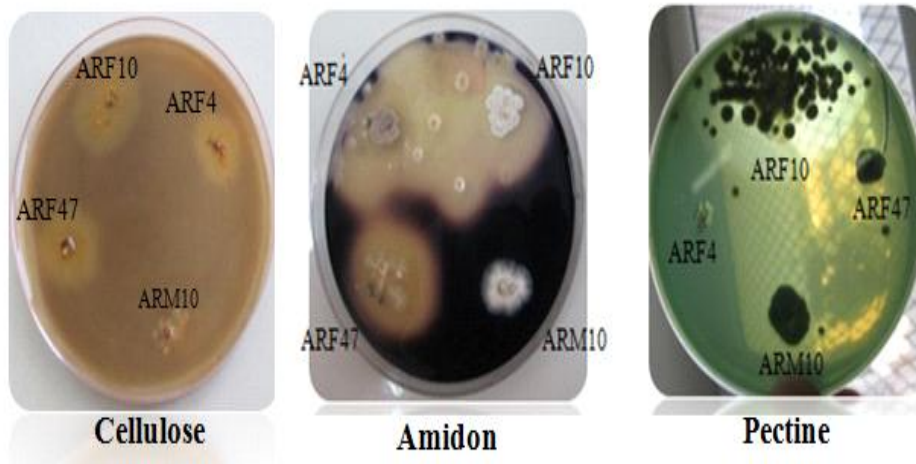
**Tableau 10:** utilisation des sources d'azote.

	souche			
	ARF4	ARF10	ARF47	ARM10
Asparagine	+	±	+	+
Méthionine	±	±	+	-
Acide aspartique	-	±	+	++
Cystéine	-	++	±	-
Tyrosine	+	-	++	++
Arginine	+	++	++	-
Proline	+	+	++	+
Glycine	+	±	++	+
Tryptophane	-	+	+	-

(-) pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante,

➤ **Les activités de dégradation**

Tous les souches hydrolysent la Gélatine et ne dégradent ni la caséine ni l'adénine. Seul la souche ARF10 ne dégrade pas l'amidon et la cellulose mais hydrolyse la pectine. Le tween 80 a été dégradé seulement par la souche ARF4. La souche ARM10 dégrade seulement la gélatine et la souche ARF47 présente une faible activité de dégradation envers la tyrosine (Tableau 11).



**Figure 24:** photographies des activités de dégradation.

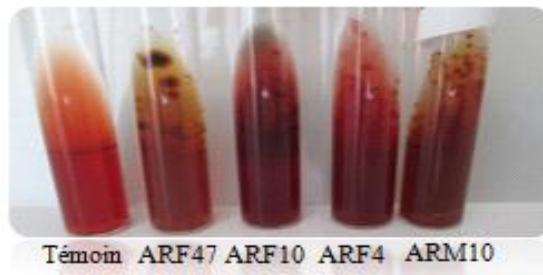
**Tableau 11:** résultats des activités de dégradation.

	Souche			
	ARF4	ARF10	ARF47	ARM10
Amidon	++	++	++	-
Caseine	-	-	-	-
Gélatine	+	++	+	++
Adénine	-	-	-	-
Tween 80	+	-	-	-
Tyrosine	-	++	±	-
Pectine	-	+	-	-
Cellulose	+	+	+	-

(-) pas de dégradation, (±) dégradation faible, (+) dégradation modérée, (++) dégradation forte.

➤ **Production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S)**

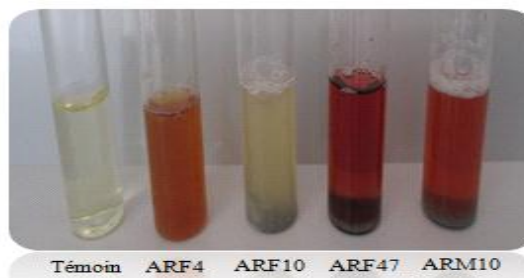
Les souches ARF10 et ARF47 produisent l'H<sub>2</sub>S dans le milieu TSI. Cette production se traduit par l'apparition des colonies noires. Par contre, les souches ARF4 et ARM10 ne présentent aucune production d'H<sub>2</sub>S (**Figure25**).



**Figure 25:** photographies de la production d'H<sub>2</sub>S par les souches étudiées.

➤ **Les activités enzymatiques**

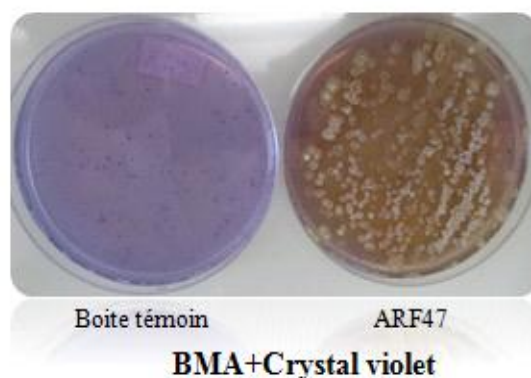
Les souches ARF4, ARF10, ARF47, ARM10 ne dégradent pas la chitine. ARM10 et ARF47 a montré des réactions négatives pour leur activité nitrate réductase après 5, 10 et 14 jours d'incubation par contre les souches ARF4, ARF10 indique la production de cette enzyme (**Figure 26**).



**Figure 26:** photographies de la production de nitrate réductase après 14 jours d'incubation.

➤ **La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques**

Dans le **Tableau (12)** sont portés les résultats de la croissance des quatre souches en présence de différents inhibiteurs. Pour les souches ARF4, ARF47 et ARM10 leur croissance a été inhibée en présence de 10 et 13 % de NaCl. Seuls la souche ARF10 résiste à l'action inhibitrice aux différentes concentrations de NaCl, du cristal violet et du phénol. Cependant, la croissance des souches ARF4 et ARF47 a été affectée en présence de 4% de NaCl et du Crystal violet. La souche ARM10 ne tolère pas des concentrations de NaCl égales à 10% et plus.



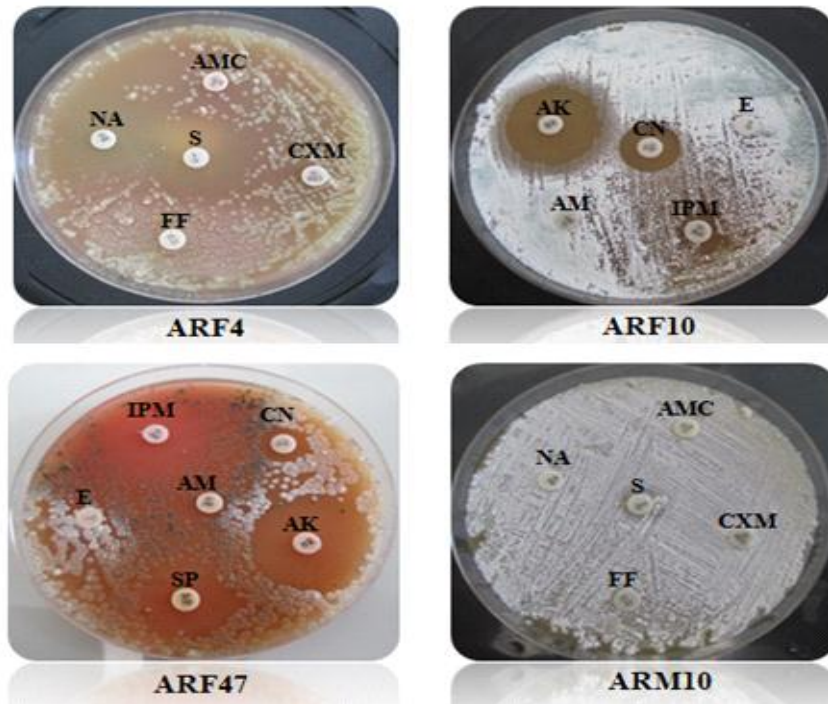
**Figure 27:** photographie de la croissance de la souche ARF47 en présence d'inhibiteur.

**Tableau 12:** Croissance en présence d'inhibiteurs.

	souche			
	ARF4	ARF10	ARF47	ARM10
NaCl 4%	+	++	+++	+++
NaCl 7%	-	++	+	±
NaCl 10%	-	++	-	-
NaCl 13%	-	++	-	-
Phénol	±	+++	+	-
Crystal violet	+++	+	+++	-

➤ **La résistance aux antibiotiques**

Les résultats de la résistance ou la sensibilité aux antibiotiques indique que tous les souches sont résistantes à l'Ampicilline, la Cefuroxime et Amoxicilline. Cependant, elles sont toutes sensibles à l'Amikacine. La souche ARM10 présente le profil le plus résistant, sur les 10 antibiotiques testés seulement 2 ont pu inhiber sa croissance. La souche ARF47 montre une sensibilité à 6 antibiotiques qui sont : l'Amikacin (30), Spiromycine, Imipenème, Gentamycine, Acide Nalidixique et la Streptomycine. Les plus grandes zones d'inhibition ont été enregistrées avec l'Amikacine et la spiromycine pour la souche ARF4 (**Tableau 13**).



**Figure 28** : photographies de la sensibilité et de la résistance des souches ARF4, ARF10, ARF47, ARM10 aux antibiotiques.

**Tableau 13:** résistance aux antibiotiques.

Antibiotiques Testés	Zones d'inhibition (mm)			
	ARF4	ARF10	ARF47	ARM10
Amikacine (30)	28	25	27	22
Spiramycine (100)	33	16	21	0
Erytromycine (15)	20	0	0	0
Imipenème (10)	0	0	26	24
Gentamycine (10)	0	15	13	0
Ampicilline (10)	0	0	0	0
Acide Nalidixique (30)	17	0	25	0
Cefuroxime (30)	0	0	0	0
Streptomycine (10)	22	26	26	0
Amoxicilline (30)	0	0	0	0
Fosfomycine (50)	0	0	0	0

Physiologiquement, tous les souches se sont révélés métaboliquement actifs. Cette activité métabolique s'est traduite d'une part par la production des pigments et d'autre part par un certain nombre d'activité comme l'activité amylolytique etc.

La majorité de nos souches sont capables de métaboliser les polymères comme l'amidon et la gélatine, d'utiliser plusieurs substances comme sources de carbone et d'azote. Par contre, uniquement les souches ARF10 et ARF47 produisent des pigments mélanoides sur milieu ISP7,

selon **Shirling et gottlieb (1972) [126]** cette dernière caractéristique est considérée comme une clé pour la classification des actinomycètes.

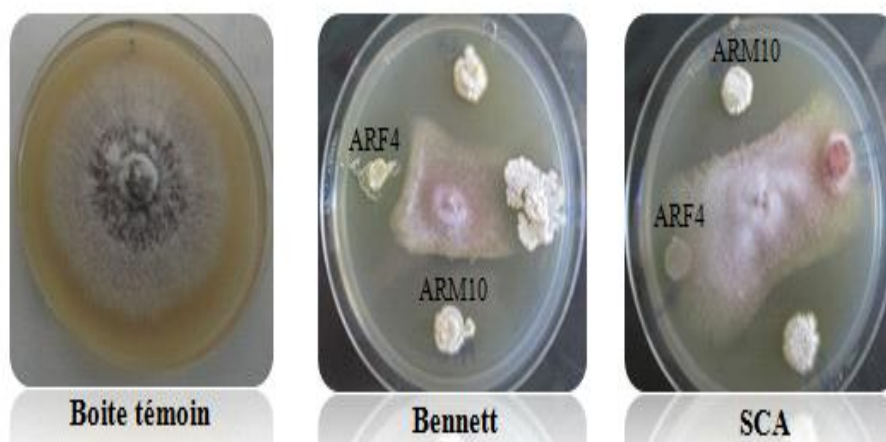
D'après les données de deuxième édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* et du *The international Streptomyces project*, l'ensemble des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques nous permet de rapprocher les quatre souches au genre *Streptomyces*.

## 5. Effet de quelques facteurs sur l'activité antifongique des souches ARF4 et ARM10

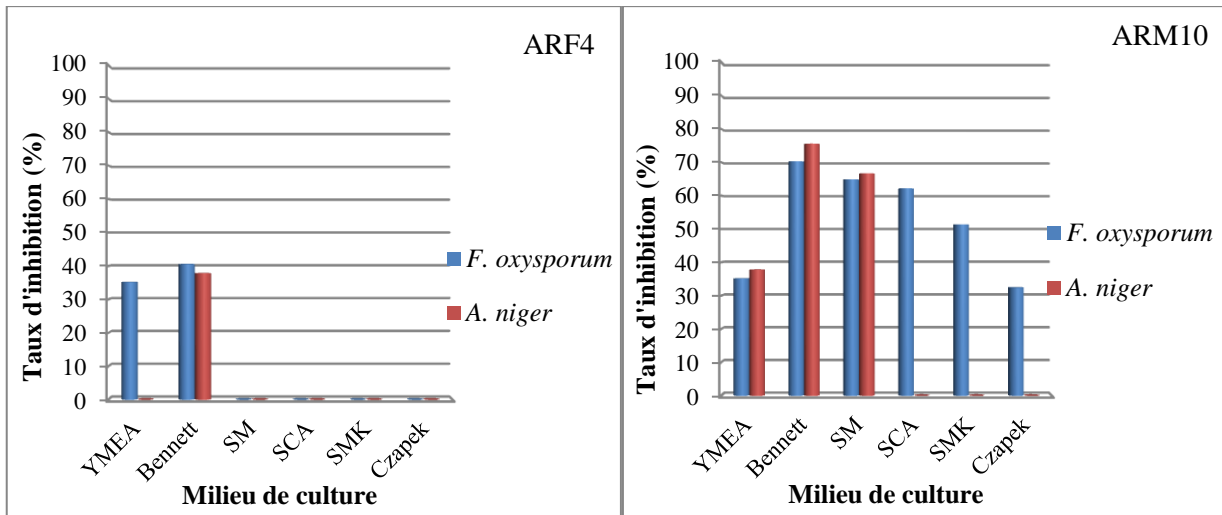
### 5.1. Milieux de culture

Les milieux Bennett et YMEA favorisent l'activité antifongique de la souche ARF4 contre *F. oxysporum*. Contre *A. niger*, le milieu Bennett est le plus propice pour la production d'antifongiques. Cependant, absence d'activité sur les autres milieux (**Figure 29**). L'efficacité du milieu Bennett dans la production d'antifongiques par rapport au milieu YMEA peut être attribuée à leur composition.

Alors que l'activité antifongique de la souche ARM10 apparaît sur tous les milieux de culture contre *F. oxysporum*, avec des valeurs importantes et sur Bennett contre les deux champignons (**Figure 30**). Le milieu Bennett donne les meilleures activités inhibitrices, Ces résultats confirment ceux obtenus dans de nombreux autres travaux de recherche notamment les travaux de **Khamna et al. (2009)**. Ainsi, tous les chercheurs considèrent le genre *Streptomyces* comme une source importante d'antifongiques comme ceux de **Khamna et al. (2009)**.



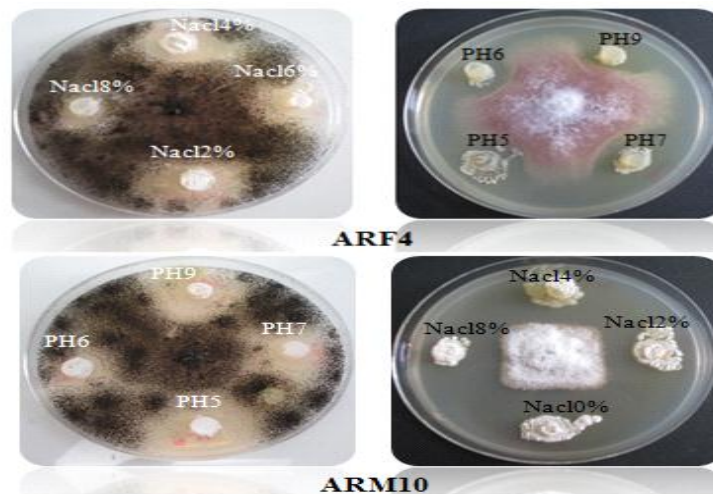
**Figure 29:** photographies de l'inhibition de *F. oxysporum* sur différents milieux.



**Figure 30:** effet du milieu de culture sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum* et d'*A. niger*.

### 5.2. Effet du pH et du NaCl

L'effet de différentes valeurs de pH et différentes concentrations de NaCl sur l'activité antifongique a été étudié sur le milieu Bennett modifié (BMA). Les résultats indiquent que l'activité inhibitrice des souches contre les phytopathogènes est variable d'une valeur et d'une concentration à une autre. ARF4 ne montre aucune activité contre *A.niger* pour toutes les valeurs de pH et les concentrations de NaCl mais elle a une forte production d'antifongique contre *F.oxysporum* avec un pourcentage de 54.05% pour le pH 7.5 et à 0 % de NaCl dans le milieu de culture (**Figure 32, 33**). Cependant, la souche ARM10 montre activité antifongique différente contre les 2 champignons pour toutes les valeurs de pH à l'exception du pH = 4 où l'inhibition est nulle et pour toutes les concentrations de NaCl contre *F.oxysporum*.



**Figure 31:** effet du pH et de différentes concentrations de NaCl sur l'inhibition de croissance mycélienne de *F. oxysporum* et d'*A. niger*.

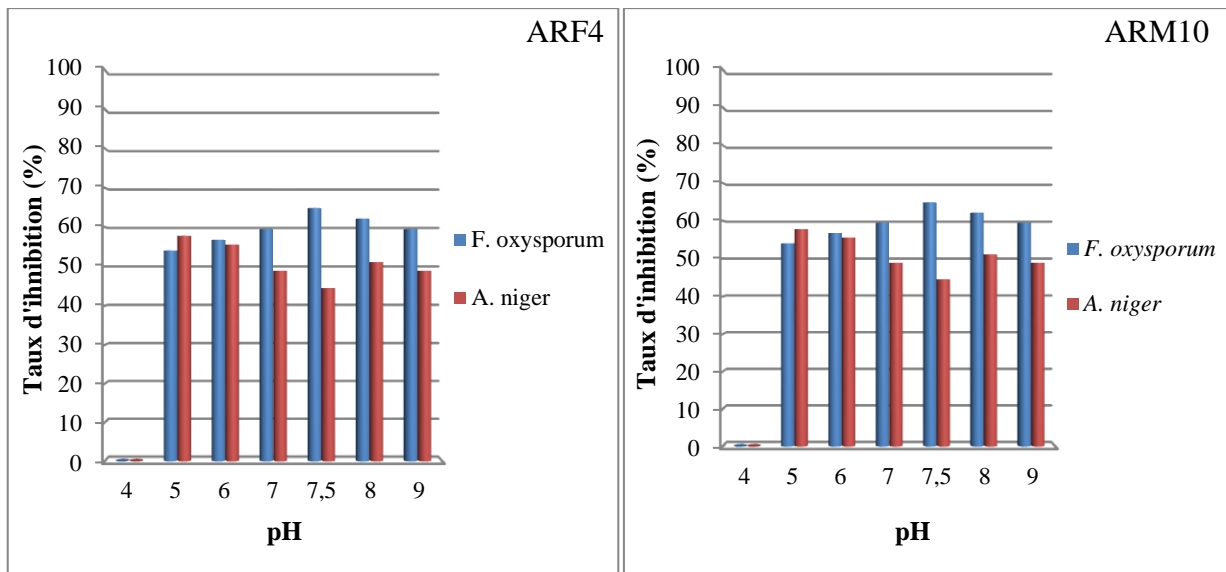


Figure 32: effet de différents pH sur l'activité antifongique des souches ARF4 et ARM10.

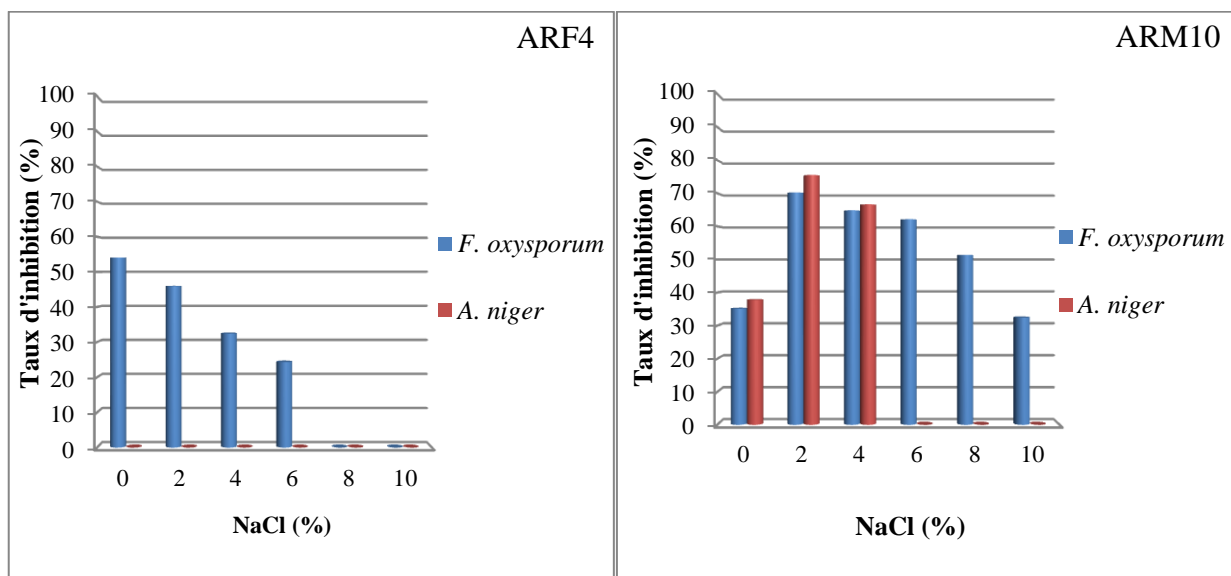


Figure 33 : effet de différents concentration de NaCl sur l'activité antifongique des souches ARF4 et ARM10.

## 6. La cinétique de la production d'antifongiques

L'activité antifongique de la souche ARF4 apparait dès le deuxième jour d'incubation contre *F. oxysporum* et le troisième jour contre *A. niger*, elle atteint son maximum au troisième jour contre *F. oxysporum* et au quatrième jour contre *A. niger*.

Par contre la souche ARM10 a montré une importante activité antifongique dès le premier jour d'incubation qui augmente pour atteindre une valeur maximale au quatrième jour contre les deux champignons (Figure 34).



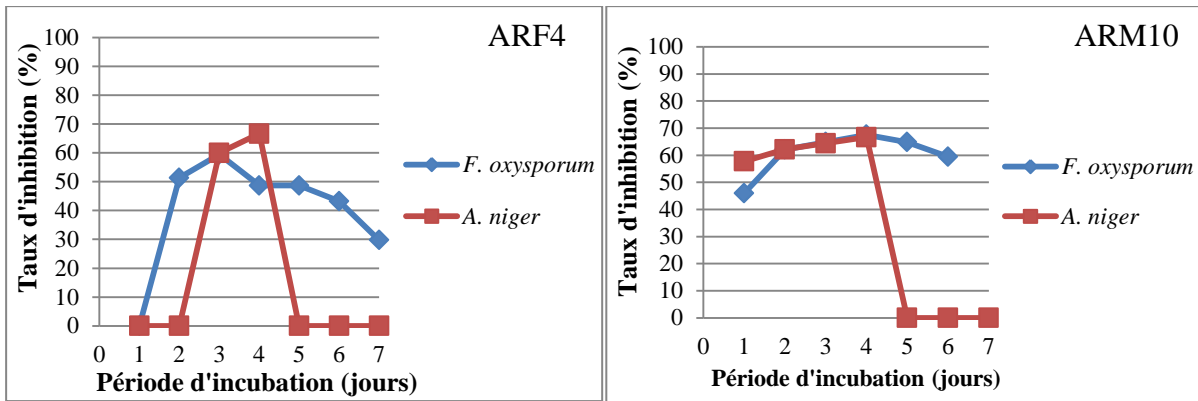


Figure 34 : effet des périodes d'incubation sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporium* et d'*A. niger*.

## 7. Estimation de la biomasse

La concentration cellulaire a été exprimée en poids sec après séchage à l'étuve. L'effet du pH sur la production de la biomasse est illustré dans la Figure (35).

Il est très clair que la production de la biomasse est différente selon les valeurs de pH et les concentrations de NaCl, la production de la biomasse pour la souche ARM10 est bien favorisée avec les pH alcalins. La plus importante production (2900 et 2800 mg/l) est remarquée avec les pH 7,5 et 8 respectivement. Par ailleurs, cette biomasse est plus importante avec des concentrations faibles en NaCl, pour une concentration de 2% et 4% les biomasses mesurées sont égales, respectivement, à 3000 et à 3600 mg/l.

Pour la souche ARF4, les valeurs de pH de 7 et de 7.5 donnent une meilleure croissance avec 1900 et 1600 mg/l respectivement.

Pour les deux souches aucune croissance n'a été détectée avec le pH de 4 (acide) et des concentrations de 8% et de 10% de NaCl

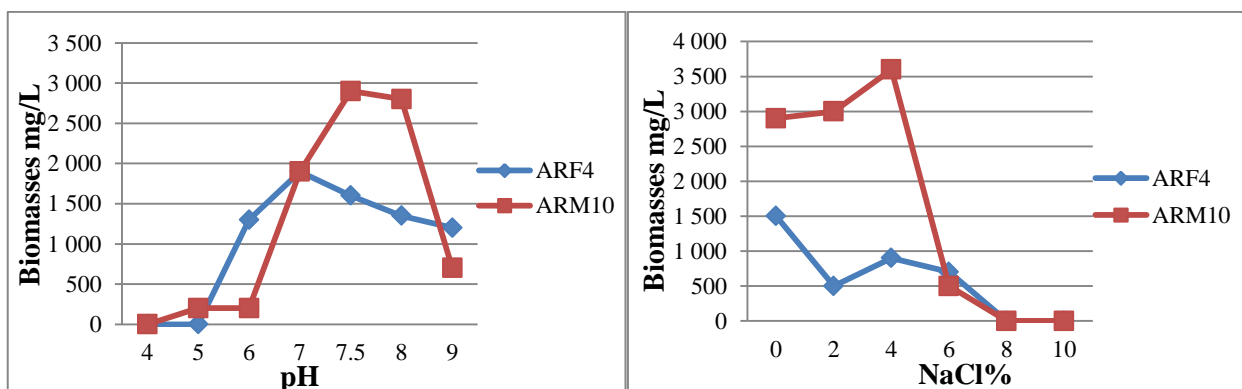


Figure 35: la biomasse produite pour différentes valeurs de pH et de concentrations en NaCl.



# Conclusion et perspectives

Ce présent travail entre dans le cadre de l'axe de recherche des métabolites biologiquement actifs dans les sols rhizosphériques. Les différents tests appliqués aux différentes souches bactériennes du genre *Pseudomonas* sp et d'actinomycètes isolées de la rhizosphère forestière et de la plante de tomate, nous ont permis de sélectionner des souches qui, à la fois, sont capables de solubiliser le phosphate minéral (inorganique) représenté par le phosphate tricalcique, de produire des sidérophores et des molécules bioactives contre les phytopathogènes fongiques, à savoir *A.niger* et *F.oxysporum*.

En effet, les 354 souches analysés se répartissent, en fonction, de leur niche écologique comme suit : 194 souches de *Pseudomonas* (PRT1 jusqu'à PRT194) et 83 souches d'actinomycètes (ART1 jusqu'à ART83) de la rhizosphère de plante de tomates, 49 souches d'actinomycètes (notés ARF1 jusqu'à ARF49) de la rhizosphère forestière et 10 souches d'actinomycètes (notée ARM1 jusqu'à ARM10) de la rhizosphère de forêt en montagne.

Environ pour les deux groupes bactériens, 25% des souches étudiés solubilisent le phosphate minéral, ce résultat est proche, du point de vue quantitatif, de celui obtenu par d'autres auteurs, néanmoins ces mêmes auteurs ont signalé une prédominance des souches du genre *Pseudomonas* contrairement à nos résultats. Parmi nos souches solubilisatrices, trois souches du genre *Pseudomonas* et deux souches d'actinomycètes provenant de la rhizosphère se sont avérées très actives.

En revanche pour la production de sidérophores, 41% des souches de *Pseudomonas* contre 31% pour les actinomycètes sont productrices de ces substances, ces résultats sont inférieurs à ceux signalés par d'autres auteurs notamment l'étude de **Pérez-Miranda et al (2007)** où le taux obtenu est de 75%. Toutefois nos souches peuvent être classées comme d'excellents phytostimulateurs. Il est à noter que sur les souches productrices, 82% et 56% des souches, respectivement, de *Pseudomonas* et d'actinomycètes sont intensément actives du point de vue de production de sidérophores. En effet, les milieux de culture ont été envahis par ces substances. Les trois souches de *Pseudomonas* et deux souches d'actinomycètes fortement solubilisatrices de phosphate minéral figurent parmi les souches à production intense de sidérophores.

Parmi les 193 souches de *Pseudomonas* sp, 110 inhibent au moins une espèce et 33 inhibent les deux mycètes phytopathogènes utilisés comme microorganismes-tests. Pour les actinomycètes, 29 souches (22 ART, 7ARF) ont inhibé la croissance d'un seul des deux champignons phytopathogènes et 18 souches (7 ART, 7ARF, 4 ARM) ont inhibé les deux

espèces de mycètes sur un total de 144 souches d'actinomycètes de rhizosphère forestière et de plante tomate. Par rapport à la production d'antifongiques, les souches de *Pseudomonas* se sont montrées plus nombreuses (environ 75%) que les souches d'actinomycètes (environ 32%)

Par ces résultats nous pouvons conclure que la microflore rhizosphérique de forêt et des plantes de tomate, de part leurs composantes en souches de *Pseudomonas* et d'actinomycètes, a une capacité importante dans la promotion de la croissance des plantes par divers mécanismes et dans la lutte contre les phytopathogènes.

Les souches d'actinomycètes ARF4, ARF10, ARF47 et ARM10 au vu de leur capacité de la promotion de croissance des plantes ont été retenus pour identification. L'ensemble des caractéristiques macromorphologiques, micromorphologiques, physiologiques et biochimiques permet de rapprocher les quatre souches au genre *Streptomyces*. Ceci semble évident dans la mesure où ce genre est dominant dans le sol. L'activité antifongique de ces quatre souches diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en sel dans le milieu et la diminution du pH. Elle est nulle en milieu fortement acide. Ces souches peuvent être utilisées comme biofertilisants et biocontrôle dans des sols où la salinité et l'acidité ne sont pas extrêmes.

En perspectives pour cette étude, il est recommandé :

- ✓ de compléter l'identification des souches jusqu'au niveau de l'espèce par les caractéristiques chimiotaxonomiques et moléculaires plus approfondies ;
- ✓ de procéder à l'analyse structurale des sidérophores et des molécules antifongiques ;
- ✓ d'élucider les mécanismes par lesquelles les PGPR stimule la croissance et protège les plantes.

A decorative border with a repeating geometric pattern in blue and grey surrounds the text.

# Références bibliographiques

- [1]. **Nannipieri, P., Ash er, J., Ceccherni, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella G. (2003).** Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*, 54 (4): 655-670.
- [2]. **Van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254.
- [3]. **Bloemberg, G. and Lugtenberg, B. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.
- [4]. **Yuan W.M. and Crawford D.L. (1995).** Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 3119-3128.
- [5]. **Emmert E.A.B. and Handelsman J. (1999).** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett.* **171**, 1-9.
- [6]. **Xiao K., Kinkel L.L. and Samac D.A. (2002).** Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol. Control.* **23**, 285-295.
- [7]. **Bressan W. (2003).** Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *Biocontrol.* **48**, 233-240.
- [8]. **Digat, B. and Gardan, L. (1987).** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP.* **17**: 559-568.
- [9]. **Valencia, L. G. H. (2008).** Etudes des bases moléculaires de l'agrégation des sols par des exopolysaccharides bactériens, Université Joseph Fourier Grenoble 1,196:22-23.
- [10]. **Bazot, S. (2005).** Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récent dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne, Unité Mixte de Recherche INRA-INPL Agronomie Environnement Nancy Colmar, 176: 25-26.
- [11]. **David, H. and McNear, J. R. (2013).** The rhizosphere - roots. Soil and everything in between. *Nature education knowledge* 4 (3): 1.
- [12]. **Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B. and Yoder, J.I. (2003).** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecol.* **84**: 858-868.

- [13]. **Lynch, J.M. (1990)**. The Rhizosphere. Lynch JM, (ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [14]. **Cook, R.J., Thomashow, D.M., Weller, D., Fujimoto, M., Mazzola, G. Banger et D.S. Kim (1995)**. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4197-4201.
- [15]. **De Carne, C.Ch. (2010)**. Agriculture biologique, une approche scientifique. Edition : France agricole. Productions végétales et grandes cultures, 434 p. ISBN : 978-2-85557-211-6.
- [16]. **Cardon, Z., et D. J. Gage (2006)**. Resource exchange in the rhizosphere - molecular tools and the microbial perspective. *Ann. Rev. Ecol.*, **37**: 459-488.
- [17]. **Wipps , J.M. (2001)**. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Experimen. Bot.*, **52**: 487-511.
- [18]. **Davet P. (1996)**. Vie microbienne du sol et production végétale. 1ère édition, INRA, Paris.
- [19]. **Dommeregues Y. et Mangenot F. (1970)**. Ecologie microbienne du sol. Paris : Masson. 796p.
- [20]. **Morel R. (1996)**. Les sols cultivés, 2 éd. Paris : Tech.Doc :389p.
- [21]. **Djigal. D, (2003)**. Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhizienne) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différente plante. Diplôme de docteur de 3ème cycle de biologie végétal,166p.
- [22]. **Trevors,J. T.&VanElsas,J. D.(1997)**. Microbial Interactions in soil. In: VanElsasJ. D,Trevors1.T.&WellingtonE.M.H.(eds)Modem soil microbiology. Marcel Dekker, INC. NewYork.215-243.
- [23]. **Lemanceau, P., Offre, P., Mougel, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. and Berta, G., (2006)**. Microbial ecology of the rhizosphere. In: *Microbiological methods for assessing soil quality*. Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, pp. 228-230.

- [24]. **Ahmed, O.H., H. Aminuddinet M.H.A. Husni (2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agric. Scand.*, 58: 182-186.
- [25]. **Dobbelaere S.J; Vanderleyden; Okon Y., (2003).** Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* P 22: 107-149.
- [26]. **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.
- [27]. **Boddey RM, Döbereiner J. (1988).** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. Recent results and perspectives for future research. *Plant Soil* 108, 53-65.
- [28]. **Graham, P. H. (1988).** *Principles and Application of Soil Microbiology*, pp: 322–345.
- [29]. **Hernandez AN, Hernandez A, Heydrich M. (1995).** Selección de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz. *Cultivos tropicales*, 16(3): 5-8.
- [30]. **Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, M.T. Pereyra de la Iglesia, J. Domenech, et F. J. Gutiérrez Mañero. (2008).** Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*. **98**: 451-457.
- [31]. **Keneni, A., F. Assefa, et P.C. Prabu. (2010).** Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean of Ethiopia and their abilities on solubilization insoluble phosphates *J. Agr. Sci. Tech.* **12**: 79-89.
- [32]. **Whitelaw, M. A. (2000).** Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv. Agron.* **69**: 99-144.
- [33]. **Sharma, K. (2005).** In: Manual of Microbiology. Isolation, Purification and Identification of Bacteria. *Ane Books Pub. New Delhi*, p. 41.
- [34]. **Jiang, Y., W. J. Li, P. Xu, S. K. Tang et L. H. Xu. (2005).** Study on diversity of actinomycetes salt and alkaline environments. *Wei Sheng Wu Xue Bae.* **46**: 191-195.



- [35]. **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
- [36]. **Ratul, S., Nabaneeta, S., Donofrio, R.S and Bestervelt, L. (20112).** Microbial sidérophores. *Journal of Basic microbiology.*52:1-15
- [37]. **Briat, J.F. (1992).** Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.*, 138:2475-2483.
- [38]. **Neilands, J.B. (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem.* 270: 26723–26726. *Agrobacterium*,
- [39]. **Aarab,S., Laglaoui, A., Bakkali, M., et Arakrak, A. (2009).** Selection des isolats rhizobiens solubilisant le phosphate tricalcique : inoculation des graines triticales (variété momtaz ) *Covaphos III. 5 :147-152.*
- [40]. **Robin A., Mazurier S., Meyer J.-M., Vansuyt G.,Mougel C., Lemanceau P. (2007).** Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco. *Environ. Microbiol.* 9:1724-1737.
- [41]. **Weller, D.M., (1988).** Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with Bacteria, *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379–407.
- [42]. **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.
- [43]. **Toua, D., Benchabane, M & Bakour, R. (2006).** Diversités taxonomique et trophique de souches de *Pseudomonas* spp fluorescents isolées de palmeraies. *Revue des Régions Arides.*1123-1129.
- [44]. **Ezzahiri B. & Sekkat A. (2001).** Maladies et ravageurs de l'arachide identification et moyens de lutte. Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA. Transfert de Technologie en Agriculture. 86 , 1-4p.
- [45]. **Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S. (2006a).** Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *Intl J. Food Microbiol.* 111:S10-S17.

- [46]. **Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S. (2007b).** *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *J. Appl. Microbiol.* 102:124-133.
- [47]. **Hibar, K., Mejda, D-R et El Mahjoub, Mohamed. (2007a).** Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Tropicultura*, 2007, 25, 146-152.
- [48]. **El Hadrami I., Bellaj M., Idrissi A., J'Aiti F., Jaafari S. and Daayf F. (1998).** Biotechnologie végétales et amelioration du palmier dattier (*Phoenix dactilifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. *Cahiers Agriculture.* 7 (6): 463-468.
- [49]. **Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A. (2006).** Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:680-685.
- [50]. **Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakamchanakul, W., Samson, R.A. (2007).** Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud. Mycol.* 59:53-66.
- [51]. **Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1997).** *Fungi and Food Spoilage.* New York : Springer.
- [52]. **Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Martins Dos Santos, V. A. P., Pieper, D. H. Ramos, J. L. & Palleroni, N. J. (2006).** Nonmedical: *Pseudomonas*, In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA. P. 646-703.
- [53]. **Mezaache, S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat Abbas Sétif. 141: 3-26.
- [54]. **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., & Gardan, L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.

- [55]. **Dogan, B., & Boor, K. (2003).** Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. Volume (69). 130-138.
- [56]. **Bell-Perkins, L. J., & Lynch, J. M. (2002).** Rhizosphere microbiology, In G. Bitton (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada. P. 2713-2728.
- [57]. **Singleton, P., & Sainsbury, D. (2006).** Dictionary of Microbiology and molecular Biology, Third Edition Paul Singleton and Diana Sainsbury. John Wiley and Sons Ltd. ISBN. P: 637-638.
- [58]. **Haas, D. and Keel, C., (2003).** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:117–153.
- [59]. **Tsuji, A., Kaneko, Y., Takahashi, K., Ogawa, M., & Goto, S. (1982).** The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. (1): 15-24.
- [60]. **Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., (1966).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
- [61]. **Chin-A-Woeng, T. F., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. et Bloemberg, G. V. (2001).** Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 extends the strains. *Molecular. Plant Microbe Interaction.* **14**: 1006-1015.
- [62]. **Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J. O'Callaghan, M. and O'Gara, F., (1992).** Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.
- [63]. **Degroot, A., Filloux, A., & Tommassen, J. (1991).** Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* (229): 278-284.
- [64]. **Schroth, M.N. and Hancock, J.G. (1981).** Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**:453-476.

- [65]. **Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., (1966).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
- [66]. **Palleroni, N.J., (1984). Genus I. Pseudomonas Migula 1894.** In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- [67]. **Latour, X. and Lemanceau, P., (1997).** Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*, **17**: 427–443.
- [68]. **Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S. and Sorensen, J., (1995).** Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **18**: 51-62.
- [69]. **Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. and Lemanceau, P., (1996).** The composition of fluorescent *Pseudomonad* populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449-2456.
- [70]. **Euzeby, J.P., (2008).** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- [71]. **De Weert, S., H. Vermeiren, I.H.M. Mulders, I. Kuiper, N. Hendrickx, G.V. Bloemberg, J. Vanderleyden, R. De Mot, et B.J.J. Lugtenberg. (2002).** Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 1173-1180.
- [72]. **Höfte, M. and de Vos, P., (2006).** Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant-associated bacteria*. Part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 507-533.
- [73]. **Bloemberg et Lugtenberg, (2001)** Bloemberg, G. and Lugtenberg, B. 2001. molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.
- [74]. **Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden-Gardener, B B. and Thomashow, L S., (2002).** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 309–348.

- [75]. **Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. and Thomashow L.S., (2007).** Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol.* **9**: 4-20.
- [76]. **Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M. and Briat, J.F., (2009).** Role of iron in plant–microbe interactions. *Adv. Bot. Res.* **51**: 491-549.
- [77]. **Lemanceau, P., (1992).** Beneficial effects of rhizobacteria on plants : exemple of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, **12**: 413-437.
- [78]. **Brimecombe et al., (2008) Brimecombe, M. J., F.A. De Leij, et J.M. Lynch. (2007).** Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. In R. Pinto, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), *The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press. New York.
- [79]. **Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **47**(2): 479–491.
- [80]. **Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D. (2007).** Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**(3): 495–548.
- [81]. **Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt E. (2009).** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59** (Pt 3): 589–608.
- [82]. **Ottow, J.C.G., Glathe, H. (1968).** Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl Microbiol*, **16**(1): 170–171.
- [83]. **Larpent J-P. and Sanglier J.J. (1989).** *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson, Paris. 481.
- [84]. **Perry J.J., Staley J.T., Lory S. (2004).** *Microbiologie*. Edition Dunod.

- [85]. **Nonomura, H. and Ohara, Y. (1969).** The distribution of Actinomycetes in soil. VI. A selective plate-culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. Part I. *J. Ferment. Technol.* **47**: 463–469.
- [86]. **Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. (1967).** Biologie of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*,21: 71–100.
- [87]. **Locci. R. (1976).** “Developmental micromorphology of actinomycetes”. In :Actinomycetes the boundry microorganisms : Arai. TED, . Tokyo. 170-180.
- [88]. **Prescott L.M. Harley JP., and Klein DA.(2003).** *Microbiologie. Edition De Boeck et Larcier* . France.
- [89]. **Le Minor, L., Veron, M. (1989).** Bacteriologie medicale. 2ème édition. *Medecine. Sciences Flammarion.*
- [90]. **Mariat, F., Sebald M. (1990).** Les actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. L Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- [91]. **Behal, V. (2000).** Bioactive products from Streptomyces. *Adv. Appl. Microbiol.* **47** : 113-15.
- [92]. **Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L. et Beaulieu C. (2001).** Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* **82(3)**: 85-102.
- [93]. **Sharma. S., Vijay, k and Ram, B.T. (2011).** Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* **(2)**: 90-95.
- [94]. **S. Pérez-Miranda, N. Cabirol, R. George-Téllez, L.S. Zamudio-Rivera, and F.J. Fernández; O-CAS. (2007).** A fast and universal method for siderophore detection; *Journal of Microbiological Methods.* **70(1)**; 127-131.
- [95]. **Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* **160**, 47–56.
- [96]. **Attrassi, K; Selmaoui, K; Ouazzani, T.-A. Badoc, A; Douira, A. (2005).** Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l’azoxystrobine. **144**, 47-62.

- [97]. **Azouaoui-ait, K.T, Boucena, B; Amgoud, M et Rahmania, F. (2007).** Essai de lutte in vitro par le glyphosate contre des champignons telluriques phytopathogène : Fusarium et Pythium. *Sciences et technologie.* 26, 75-80.
- [98]. **Hibar, K; Mejda D. R , Jabnoun-Khiareddine Hayfa, El Akram Znaidi Ibrahim, EL MAHJOUB Mohamed. (2006b).** Effet des extraits de compost sur la croissance mycélienne et l'agressivité du *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici.* 10, 2, 101-108.
- [99]. **Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 16(3), 313-340.
- [100]. **Athalye, M., Lacey, J., Goodfellow, M. (1985).** Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* 51: 289-291.
- [101]. **Zaitlin B., Watson S., Dixon J. et Steel D. (2003).** Actinomycetes in Elbow River Basin Alberta Canada. *Water Qual Res J Canada.* 38(1): 115-125.
- [102]. **Williams S.T. et Cross T. (1971).** Actinomycetes, dans: *Methods in microbiology.* Academic Press, London: 295-334.
- [103]. **Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V. Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002).** Characteristics of actinomycetes from Antarctica . *J. Cult. Collect.* 3, 3-14.
- [104]. **Singleton P. (1999).** *Bacteria in biology, bacteriology and medicine.* Wiley, Chichester UK:236.
- [105]. **Goodfellow M. (1971).** Numerical Taxonomy of Some Nocardioform Bacteria. *Journal of General Microbiology.* 69, 33 -80.
- [106]. **Williams S. T., Goodfellow M., Wellington E. M. H. Vickers J. C., Alderson G., Sneath P. H. A., Sackin M. J. et al. (1983b).** A probability matrix for identification of some *Streptomyces*'s. *J Gen Microbiol.* 129: 1815-1830.
- [107]. **Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M. H., Sneath P. H. A. et Sackin M. J. (1983a).** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbial.* 129: 1743-1813.

- [108]. **Hankin L., Zucker M. and Sands D. C. (1971).** Improved solid medium for the detection and enumeration of pectinolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22, 205-209.
- [109]. **Nicemol Jacob K.N., Niladevi G.S. and Anisha, P. (2006).** Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiological Research*,(article in press).
- [110]. **Guiraud J.P. (1998).** Techniques d'analyse microbiologique, dans : Microbiologie alimentaire. Dunod Paris: 171-334.
- [111]. **Singleton P. (1999).** Bacteria in biology, bacteriology and medicine. Wiley, Chichester UK: 236.
- [112]. **Hsu S.C. et Lockwood J.L. (1975).** Powdered chitin agar as a selective medium for a enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.*29: (422-426).
- [113]. **Maki Miranda L., Michael Broere., Kam Tin Leung., Wensheng Qin.,(2011).**Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J Biochem Mol Biol*;2(2):146-154.
- [114]. **Gordon R.E. and Barnett D.A. (1977).** Resistance to rifampin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium and Nocardia* as a taxonomic tool. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 176-178.
- [115]. **Pfefferle C, Theobald U, Gurtler H, Fiedler HP (2000).** Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotechnology* 80:135–142.
- [116]. **Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y (2008).** Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* 38: 12-19.
- [117]. **Babana AH (2003).** Mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali. Published PhD thesis. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation de l'Université Laval Québec.
- [118]. **Verma, L.N. (1993).** Biofertiliser in agriculture. In P.K. Thampan, ed. Organics in soil health and crop production, pp. 152-183. Cochin, India, Peekay Tree Crops Development Foundation.



- [119]. **Wani, S.P. & Lee, K.K. (1992).** Role of biofertilisers in upland crop production. In H.L.S. Tandon, ed. Fertilisers, organic manures, recyclable wastes and biofertilisers, pp. 91-112. New Delhi, Fertiliser Development and Consultation Organization.
- [120]. **Subba Rao, N.S. (1982).** Utilization of farm wastes and residues in agriculture. In N.S. Subba Rao, ed. Advances in agricultural microbiology, pp. 509-522. Oxford and IBH, UK, Mohan Prilani, and New Delhi, Butterworth and Co.
- [121]. **Whitelaw, M.A., (2000).** Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69, 99–144.
- [122]. **Hilali, L., Khattabi, A., Nssarlah, N., Malki, A., Finance, C. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev Biol Biotech*, 2(1) : 49–53.
- [123]. **Nirina, R., Jefferson, Z., Daniel, R et Heriniaina R. (2014).** Lutte biologique antifongique : actinomycètes du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* L., 1753) pourri. *Afrique SCIENCE*, 10(3) : 243 – 255
- [124]. **Vernekar J.V., M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. (1999).** Alkaline protease inhibitor: a novel class of antifungal proteins against phytopathogenic fungi. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 262 : 702-707.
- [125]. **Locci R. (1989).** Streptomyces and related genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds: S.T.Williams, M.E. Sharpe et J.G. Holt.. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 4, 2451-2508.
- [126]. **Shirling E.B. and Gottlieb D. (1972).** Cooperative description of type strains of *Streptomyces*: V. Additional descriptions. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **22(4)**, 265-394.

# Annexes

## Annexe 1 :

## Milieux de culture (g/l)

**ISP1**

Tryptone .....	5g
Extrait de levure .....	3g
Agar .....	20g

pH: 7,0-7,1

**ISP2**

Extrait de levure .....	4g
Extrait de malt .....	10g
Glucose .....	4g
Agar .....	20g

pH: 7,3

**ISP3**

Solution d'avoine .....	1000ml
Solution saline1 .....	1ml
Agar .....	20g

pH: 7,2

**ISP4**

Amidon soluble .....	10g
NaCl .....	1g
CaCO <sub>3</sub> .....	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	1g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1g
Solution saline1 .....	1ml
Agar .....	20g

pH: 7,0-7,4

**ISP5**

Glycérol.....	10g
L-asparagine.....	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
Solution saline1 .....	1ml
Agar.....	20g

pH: 7,0-7,4

**ISP6**

Peptone.....	15g
Protéose peptone .....	5g
Citrate de fer ammoniacal .....	0,5g
Thiosulfate de sodium .....	0,08g
Extrait de levure .....	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
Agar.....	20g

pH: 7,2-7,4

**ISP7**

Glycérol.....	15g
L-asparagine.....	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,01g
Agar.....	20g

pH: 7,2-7,4

**ISP9**

(NH) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	2,64g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,38g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	5,65g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1g
Solution saline2.....	1ml
Agar.....	20g

pH: 6,8-7,0

**PDA (Potato Dextrose Agar)**

Glucose.....	20g
Pommes de terre.....	200g
Agar.....	20g

pH: 7

**Czapek**

NaNO <sub>3</sub> .....	3g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5g
Kcl.....	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
saccharose.....	30g
Agar.....	20g

pH: 7

**Succinate agar**

K <sub>2</sub> HP04.....	6g
KH <sub>2</sub> PO4.....	3g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> 0.....	0,2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1g
Acide succinique.....	4g
Agar.....	20g

pH: 7

**YMEA (Yeast Malt Extract Agar)**

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose.....	4g
Agar.....	20g

pH: 7,3

**SCA (Starch Casein Agar)**

Amidon.....	10g
KNO <sub>3</sub> .....	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
NaCl.....	2g
Caséine.....	0,3g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,05g
CaCo <sub>3</sub> .....	0,02g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,01g
Agar.....	20 g

pH: 7,2-7,5

**Gausse modifieur**

Amidon.....	20g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5g
KNO <sub>3</sub> .....	1g
Agar.....	20 g

pH: 7,5

**SMK** (*krasilnikov's synthetic agar*)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	3g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,3g
Nacl .....	0,2g
KNO <sub>3</sub> .....	1g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,001g
CaCO <sub>3</sub> .....	0,5g
Glucose.....	20g
Agar .....	20g

pH: 7

**PVK** (*Pikovskaya*)

Glucose.....	10g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	5g
KCl .....	0,2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,1g
Nacl .....	0,2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5g
FeSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,02g
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,002g
Agar.....	20g

pH: 7

**SM** (Milieu synthétique)

Amidon.....	10g
Extrait de levure .....	4g
Peptone .....	2g
Agar.....	20g

pH: 7,2-7,5

**CCA** (*Colloidal Chitin Agar*)

Chitine.....	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,3g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,7g
MgSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,5g
MnCl <sub>2</sub> .....	0,001g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,01g
ZnSO <sub>4</sub> .....	0,001g
Agar.....	20g

pH: 7,3

**Sierra**

Tryptone .....	3g
Extrait de levure .....	5g
Glucose.....	5g
Tween .....	1%
CaCl <sub>2</sub> .....	0,01%
Agar.....	20g

pH: 7

**CAS agar modifié**

CAS .....	60,5g
HDTMA .....	5g
PIPES .....	5g
1mM FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O in 10mM HCl .....	10 mL
Agarose .....	9g

pH: 7,5

**CMC (CarboxyMéthylCellulose)-agar**

Extrait de levure .....0,2g  
Glycérol.....2ml  
CMC(Carboxy Méthyl Cellulose)..... 10g  
Agar .....20g  
(Ajouter le CMC progressivement sous agitation et à une température d'environ 60°C)

pH:7,3

**Milieu Bennett**

Extrait de levure .....2g  
Extrait de viande..... 1g  
Peptone .....2g  
Glucose ..... 10g  
Agar .....20g

pH: 7,3

**Bouillon nutritif à 0.1% d'KNO<sub>3</sub>**

Peptone ..... 10g  
Extrait de levure ..... 5g  
NaCl ..... 5g

pH: 7,2

**BMA (Bennett modifié)**

Glycérol ..... 10g  
Extrait de levure ..... 1g  
NZ amine (caséine digest)..... 2g  
Extrait de viande ..... 1g  
Agar .....20g

pH: 7,3

**Pectine Agar**

Pectine .....5g  
Extrait de levure.....5g  
Agar .....20g

pH: 7

**Annexe 2 :****Solutions****Solution saline1**FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O..... 1g/lZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 1g/lMnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O..... 1g/l**Solution d'avoine**

Grains d'avoine pilés ..... 20g

Eau distillée ..... 1000ml

Faire bouillir pendant 20mn

Filtrer sur gaze et réajuster le volume à  
1000ml**Solution saline2**FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 1,1g/lCuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O.....6,4g/lZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 1,5g/lMnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ..... 7,9g/l**Solution iodine (Gram)**

KI..... 2g

I<sub>2</sub> ..... 1g

Eau distillée .....300ml

# Résumés



## Résumé

Parmi les PGPR symbiotiques des plantes, les *Pseudomonas* sp et les actinomycètes font l'objet d'une attention particulière pour la solubilisation du phosphate minéral, la production de sidérophores et d'antibiotiques. Dans notre étude, sur 276 souches rhizosphériques des plantes de tomate et de sol forestier analysés, seulement 45 souches de *Pseudomonas* sp (soit 25,35%) et 18 souches d'actinomycètes (soit 24,09%) solubilisent le phosphate minéral. Trois souches du genre *Pseudomonas* et deux souches actinomycétales solubilisent intensément le phosphate. En revanche pour la production de sidérophores, 79 souches de *Pseudomonas* sp et 26 souches d'actinomycètes sont avérés positifs avec pour la majorité de ces souches une production très importante.

Parmi les 193 souches de *Pseudomonas* sp, 83 ne montrent aucune activité antifongique. Par contre, 33 inhibent, respectivement, la croissance mycélienne des deux phytopathogènes et 117 inhibent un seul des deux champignons phytopathogènes. Les plus importants pourcentages d'inhibition ont été obtenus avec la souche PRT40 et atteignent les valeurs de 67,57% pour *F. oxysporum* et 84,44% pour *A. niger*. Les plus faibles pourcentages ont été obtenus avec 5 souches, parmi eux PRT91 avec 0% d'inhibition vis-à-vis d'*A. niger*.

Les souches d'actinomycètes provenant du sol rhizosphérique de plantes de tomate sont fortement antagonistes vis-à-vis *F. oxysporum* avec un pouvoir inhibiteur qui varie de 14% à 60%, la souche ART9 présente le taux d'inhibition le plus élevé soit 54,05%. Par contre, les souches rhizosphériques de forêt en plaine présentent une forte activité inhibitrice contre l'*A. niger* estimée de 42% à 62,22%, notamment la souche ARF49 qui donne la meilleure activité avec un pourcentage de 62,22%. Cependant, les actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère de forêt en montagne montrent, également, une activité intéressante vis-à-vis des 2 champignons à la fois avec des pourcentages variant de 29,73 à 42,22%.

Les souches représentatives d'actinomycètes (ARF4, ARF10, ARF47, ARM10) ont été identifiées. Ainsi, les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques nous permettent de les rapprocher au genre *Streptomyces*.

Le milieu Bennett est le plus propice pour la production d'antifongiques pour les souches ARF4 et ARM10. L'activité antifongique, sur milieu Bennett, contre les deux phytopathogènes varie d'un pH à l'autre et elle est nulle à pH 4. Cette activité est nulle pour des concentrations en NaCl de 10% à l'exception de la souche ARM10 contre *F. oxysporum*.

**Mots clefs :** rhizosphère, solubilisation du phosphate, activité antifongique, sidérophores, *Pseudomonas*, actinomycètes.

## Abstract

Among the PGPR symbiotic plants, *Pseudomonas* sp and actinomycètes is the subject of special attention for the inorganic phosphate solubilization, siderophores and antibiotics production. In our study of 276 isolates from rhizosphérique soil of tomato plants and forest soil analyzed, only 45 isolates of *Pseudomonas* sp (or 25.35%) and 18 isolates of actinomycètes (ie 24.09) solubilize mineral phosphate. Three strains of the genus *Pseudomonas* and two Actinomycetales strains intensely solubilize phosphate. In contrast to the production of siderophores, 79 isolates of *Pseudomonas* sp and 26 actinomycète isolates were positive with the majority of these strains a very high production.

Of the 193 isolates of *Pseudomonas* sp, 83 isolates showed no antifungal activity. However 33 isolates inhibit, respectively, the mycelial growth of two plant pathogens and 117 isolates inhibit only one of phytopathogène fungi. The largest percentages of inhibition were obtained with the PRT40 isolate and reach values of 67.57% for *F. oxysporum* and 84.44% for *A. Niger*. The smaller percentages were obtained with 5 isolates, among them PRT91 with 0% inhibition against *A. Niger*.

Actinomycète isolates from rhizosphérique soil of tomato plants are strongly antagonistic against *F. oxysporum* with an inhibitor powers vary from 14% to 60%, the present ART9 isolate the highest rate of inhibition or 54.05%. For against, the plain forest rhizosphere isolates exhibit strong inhibitory activity against *A. Niger* estimated 42% to 62.22%, including the ARF49 isolate that gives the best activity with a percentage of 62.22%. However, isolated actinomycètes from the mountain forest rhizosphere show, also an interesting activity vis-à-vis the two fungi both with percentages ranging from 29.73 to 42.22.

Representative actinomycète isolates (ARF4, ARF10, ARF47, ARM10) were identified. Thus, morphological, physiological and biochemical characteristics allow us to bring closer the genus *Streptomyces*.

Bennett media is most favorable for production of antifungal for ARF4 isolates and ARM10. The antifungal activity, on medium Bennett, both against phytopathogenic varies from pH to another and it is zero at pH 4. This activity is zero for NaCl concentrations of 10% with the exception of isolate ARM10 against *F. oxysporum*.

**Keywords** : rhizosphere, phosphate solubilization, antifungalactivity, siderophores, *Pseudomonas*, actinomycètes

## ملخص

بين النباتات التكافلية PGPR، تعتبر بكتيريا ال *Pseudomonas* و البكتيريا الخيطية (actinomycètes) موضع اهتمام خاص في تحليل الفوسفات غير العضوي، إنتاج مستقبلات الحديد (sidérophores) والمضادات الحيوية. من خلال الدراسة التي قمنا بها اظهرت النتائج انه من بين 276 سلالة تم عزلها من تربة جذور (ريزوسفير) نبات الطماطم و تربة جذور الغابة، 45 (أو 25.35). سلالة فقط من جنس ال *pseudomonas* و 18 (أي 24.09٪) سلالة من البكتيريا الخيطية وجدت لها القدرة علي إذابة الفوسفات. من بينهم ثلاث سلالات من جنس *pseudomonas* وسلالتين من البكتيريا الخيطية لهم تحليل مكثف لهذا الاخير. من جهة اخرى، 79 سلالة لل *pseudomonas* و 26 سلالة من البكتيريا الخيطية اعطت إنتاج عال جدا لمستقبلات الحديد (siderophores).

من بين 193 سلالة من جنس ال *pseudomonas* ، 83 سلالة لم تظهر أي نشاط مضاد للفطريات. في المقابل وعلى التوالي، 33 سلالة تمنع نمو فطرين من مسببات الأمراض النباتية و 117 سلالة تمنع نمو فطر واحد فقط. قد تم الحصول على أكبر نسبة تثبيط مع السلالة PRT40 بقيمة 67.57٪ ضد *F. oxysporum* و 84.44٪ ضد ال *A.niger* و لكن اقل نسبة تثبيط ظهرت مع 5 سلالات، من بينها PRT91 بنسبة 0٪ ضد *A.niger*.

البكتيريا الخيطية المعزولة من تربة ريزوسفير نبات الطماطم لها تثبيط عالي اتجاه *F.oxysporum* مع نسب تختلف من 14٪ إلى 60٪، السلالة ART9 اعطت أعلى معدل تثبيط بنسبة 54.05٪. بالنسبة للسلالات المعزولة من ريزوسفير الغابة السهلية فان نشاطها التثبيطي قوي ضد *A.niger* و يقدر ب 42٪ ليصل إلى 62.22٪، بما في ذلك فالسلالة ARF49 لها اقوى نشاط بنسبة 62.22٪. مع ذلك، البكتيريا الخيطية المعزولة من ريزوسفير الغابات الجبلية اعطت أيضا نشاط مثير للاهتمام ضد الفطرين على حد سواء بنسب تتراوح ما بين 29،73 حتى 42،22٪.

من اجل تصنيف السلالات المثالية (ARM10, ARF47, ARF10, ARF4)، تمت دراسة الخصائص المورفولوجية والفسولوجية والبيوكيميائي فاطهرت انتماءها الى جنس ال *streptomyces* من بين اوساط الزرع المستعملة لدراسة النشاط المضاد للفطريات. بينت النتائج ان وسط الزرع "البينت" (Bennett) هو الاكثر ملائمة لانتاج مضادات الفطريات بالنسبة للسلالتين ARF4 و ARM10، من جهة اخرى ان هذا النشاط المضاد للفطرين يختلف من درجة الحموضة إلى اخرى حيث يقدر بالصفير عند درجة الحموضة 4 كما انه يبلغ الصفير ايضا عند تركيز كلوريد الصوديوم 10٪ باستثناء النشاط التثبيطي للسلالة ARM10 ضد *F.oxysporum*.

**الكلمات المفتاحية :** ريزوسفير، تحليل الفوسفات، النشاط التثبيطي، مستقبلات الحديد (sidérophores)، *Pseudomonas*، البكتيريا الخيطية (actinomycètes).

**Thème : Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isolées des sols rhizosphériques. Identification de souches représentatives.**

**Période : du 01 Mars au 30 Mai 2015**

**Nature du diplôme :** Master.

**Domaine :** Science de la nature et de la vie.

**Mention :** Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes.

**Résumé :**

Parmi les PGPR symbiotiques des plantes, les *Pseudomonas* sp et les actinomycètes font l'objet d'une attention particulière pour la solubilisation du phosphate minéral, la production de sidérophores et d'antibiotiques. Dans notre étude, sur 276 souches rhizosphériques des plantes de tomate et de sol forestier analysés, seulement 45 souches de *Pseudomonas* sp (soit 25,35%) et 18 souches d'actinomycètes (soit 24,09%) solubilisent le phosphate minéral. Trois souches du genre *Pseudomonas* et deux souches actinomycétales solubilisent intensément le phosphate. En revanche pour la production de sidérophores, 79 souches de *Pseudomonas* sp et 26 souches d'actinomycètes sont avérés positifs avec pour la majorité de ces souches une production très importante.

Parmi les 193 souches de *Pseudomonas* sp, 83 ne montrent aucune activité antifongique. Par contre, 33 inhibent, respectivement, la croissance mycélienne des deux phytopathogènes et 117 inhibent un seul des deux champignons phytopathogènes. Les plus importants pourcentages d'inhibition ont été obtenus avec la souche PRT40 et atteignent les valeurs de 67,57% pour *F. oxysporum* et 84,44% pour *A. niger*. Les plus faibles pourcentages ont été obtenus avec 5 souches, parmi eux PRT91 avec 0% d'inhibition vis-à-vis d'*A. niger*.

Les souches d'actinomycètes provenant du sol rhizosphérique de plantes de tomate sont fortement antagonistes vis-à-vis *F. oxysporum* avec un pouvoirs inhibiteur qui varie de 14% à 60%, la souche ART9 présente le taux d'inhibition le plus élevé soit 54,05%. Par contre, les souches rhizosphérique de forêt en plaine présentent une forte activité inhibitrice contre l'*A. niger* estimée de 42% à 62,22%, notamment la souche ARF49 qui donne la meilleure activité avec un pourcentage de 62,22%. Cependant, les actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère de forêt en montagne montrent, également, une activité intéressante vis-à-vis des 2 champignons à la fois avec des pourcentages variant de 29,73 à 42,22%.

Les souches représentatifs d'actinomycètes (ARF4, ARF10, ARF47, ARM10) ont été identifiés. Ainsi, les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques nous permettent de les rapprocher au genre *Streptomyces*.

Le milieu Bennett est le plus propice pour la production d'antifongiques pour les souches ARF4 et ARM10. L'activité antifongique, sur milieu Bennett, contre les deux phytopathogènes varie d'un pH à l'autre et elle est nulle à pH 4. Cette activité est nulle pour des concentrations en NaCl de 10% à l'exception de la souche ARM10 contre *F. oxysporum*.

**Mots clés :** rhizosphère, solubilisation du phosphate, activité antifongique, sidérophores, *Pseudomonas*, actinomycètes.

**Lieu de travail :** Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications.

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Mme. Boubékri K (Maître de conférences - UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mr. Boulahrouf A (Professeur-UFM Constantine).

**Examinatrice :** Melle. Khenaka K (Maître assistante- Univ. 08/05/1945 Guelma).