

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Ecologie Microbienne



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Activités enzymatiques d'intérêt chez les rhizobiums

Présenté par : **MERIDJA Chahinez et MOUSSOUNI Nora**

Soutenu le : **13/09/2021**

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mme SAIDANI Karima	MCB	Univ. De Bejaia	Présidente
Mr BELHADI Djellali	MCA	Univ. De Bejaia	Encadreur
Mr ADJEBLI Ahmed	MCB	Univ. De Bejaia	Examinateur

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

On voudrait tout d'abord adresser toute notre gratitude au directeur de notre mémoire, M. BELHADI Djellali pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils judicieux qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

On tient à remercier les membres de jury Mme SAIDANI et M. ADJEBLI qui ont accepté de corriger notre mémoire et que leurs lectures attentives et les remarques pertinentes qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance ne pourront qu'améliorer notre travail.

On désire aussi remercier les professeurs de l'université de Bejaia, spécialement ceux de la faculté de sciences de la nature et de la vie qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite non seulement dans nos études universitaires, mais aussi pour ce qui va venir après.

Et enfin nous tenons également à remercier tous les membres de l'équipe, à leur tête la directrice du laboratoire Mme BOULILA F. et particulièrement M. HEMMACHE Amir.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon défunt père, aucun mot ne peut exprimer ma reconnaissance pour tes sacrifices, tes efforts et ton amour. J'ai toujours souhaité que tu sois là en ce jour important et voir ce regard de fierté dans tes yeux ; tu resteras présent dans mon cœur à chaque étape de ma vie.

À ma mère, a cette femme courageuse qui nous a montré avec son grand amour et son grand cœur, le chemin de la bonté, de la persévérance et du succès.

A mes frères : Amazigh et Idir qui ont toujours été là pour nous

À mes sœurs Dakhia et Sabrina pour leurs soutiens et amour

À mon cher mari pour sa présence, son soutien et surtout sa patience avec moi tout au long de ce travail.

À M. BENSALIM Karim qui a su me motiver dans les moments les plus difficiles de mon cursus universitaire.

À mon binôme MOUSSOUNI Nora pour son amitié, à tous mes amis et les personnes qui ont été là pour moi.

MERIDJA Chahinez

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes chers parents

Aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon grand respect, et mon immense gratitude, car je ne pourrais jamais oublier la tendresse et l'amour dévoué pour lesquels ils m'ont toujours entouré depuis mon enfance

Que Dieu les gardes et les protège

À mes charmants frères et mes sœurs, pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral qui m'ont permis de réaliser les études pour lesquelles je me destine et par conséquent ce mémoire.

À mon binôme MERIDJA Chahinez qui m'a beaucoup aidé et mes adorables amies qui m'ont toujours encouragé et partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, et à qui je souhaite plus de succès, et À tous ceux que j'aime.

MOUSSOUNI Nora

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I

I- Rhizosphère et interactions plantes – microorganismes	3
I-1. Rhizosphère.....	3
I-1.1 Les exsudats	3
I-1.2 Microbiologie de la rhizosphère.....	4
I-1.3 Interactions plantes–microorganismes dans la rhizosphère	5

Chapitre II

II- Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP)	10
II.1. Espèces du genre <i>Pseudomonas</i>	10
II.2. Espèces du genre <i>Azospirillum</i>	10
II.3. Espèces du genre <i>Rhizobium</i>	10
II-1. Mécanisme d'amélioration de la croissance des plantes	11
II-1.1 Mécanismes directs	11
II.1.1.1 Fixation de l'azote	11
II.1.1.2 Solubilisation du phosphore	12
II.1.1.3 Solubilisation du potassium.....	12
II.1.1.4 Production des phytohormones.....	12
II-1.2 Mécanisme indirect	13
II-1.2.1 Production des antibiotiques	13
II-1.2.2 Production des sidérophores.....	14
II-1.2.3 Induction de la résistance systémique	14
II-1.2.4 Production des enzymes	14
A) Activité amylasique chez les rhizobiums	15
B) Activité cellulosique chez les rhizobiums	16
C) Activité chitinase chez les rhizobiums	16

D) Activité uréase chez les rhizobiums	16
II-2. Utilisation de rhizobium comme biofertilisant et production des inocula	16
II-2.1 Production des inocula bactériens	17
II-2.2 Caractéristiques d'un inoculum idéal	18
II-2.3 Commercialisation des RPCP	19

Matériels et méthodes

III- Matériel et Méthodes	20
III-1. Matériel	20
III-1.1 Matériel microbien	20
III-2. Méthodes	20
III-2.1 Criblage des souches solubilisant du phosphore	20
A) Par touche	20
B) Par spot	20
III-2.2 Effet de la concentration du glucose sur la solubilisation du phosphore	21
III-2.3 Activité amylolytique	21
III-2.4 Activité cellulolytique	21
III-2.5 Activité pectinolytique	21
III-2.6 Activité uréasique	22
III-2.7 Activité gélatinase	22
III-2.8 Réduction des nitrates en nitrites	22
III-2.9 Production d'Acide Indole Acétique	22

Résultats et discussions

IV- Résultats et discussions	24
IV-1. Criblage des souches solubilisant du phosphore	24
IV-2. Effet du glucose sur la solubilisation du phosphore	25
IV-3. Activité amylolytique	30
IV-4. Activité cellulolytique	31
IV-5. Activité pectinolytique	32
IV-6. Activité uréasique	32
IV-7. Activité gélatinase	32
IV-8. Nitrate réductase	32
IV-9. Production d'acide indole acétique	33

Conclusion	36
-------------------------	-----------

Références bibliographiques.....37

Annexes

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats de la sélection des souches solubilisant le phosphore.....	24
Tableau 2 : Effet du glucose sur la solubilisation du phosphore.....	27
Tableau 3 : Récapitulation des résultats des tests enzymatiques.....	31
Tableau 4 : Résultat du test d'activité nitrate réductase	33
Tableau 5 : Résultats de dosage de l'AIA	34

Liste des figures

Figure 1 : Aperçu des microorganismes présents dans la rhizosphère, (Mendes et al., 2013). .5	
Figure 2 : Aperçu schématique des fonctions et de l'impact des micro-organismes bénéfiques, phytopathogènes et pathogènes pour l'Homme sur la plante hôte (Mendes et al., 2013).....6	
Figure 3 : Mécanismes direct et indirect des bactéries favorisant la croissance des plantes (Gupta et al., 2015). 11	
Figure 4 : Organigramme des procédures de développement des inocula bactériens 18	
Figure 5 : Indice d'efficacité de solubilisation du phosphore par les souches étudiées28	
Figure 6 : Indice de solubilisation du phosphore par les souches étudiées29	
Figure 7 : Illustration de l'activité amylolytique chez les souches AKE1 et 2Vsat2L130	

Liste des abréviations

P :	Phosphore
Pi:	phosphore inorganique
RPCP	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
YMA :	Yeast Mannitol Agar
PVK :	Pikovskaya
LB :	Luria-Bertani
rpm :	Rotation par Minute
AIA :	Acide Indole Acétique
nm :	Nanomètre
NBRIY :	National Botanical Research Institute's phosphate growth medium devoid of Yeast extract

Introduction

Introduction

Le rythme de croissance démographique qui se fait sans répit augmente la demande en aliments et nécessite une production supplémentaire des vivres (Guy et Roch, 2020). L'amélioration des performances du secteur agricole constitue l'une des solutions essentielles aux problèmes de l'insécurité alimentaire (International Food Policy Research Institute [IFPRI], 2003).

Afin d'assurer la sécurité alimentaire, des produits phytosanitaires et des systèmes de culture étaient conçus pour assurer le meilleur compromis entre risque phytosanitaire et potentiel de production de la culture. Par la suite, l'acquisition de connaissances sur les besoins d'une culture en éléments minéraux et la maîtrise de la fertilisation, le développement des herbicides et des insecticides qui permettaient de s'affranchir des dégâts d'insectes ont profondément modifié les systèmes de culture (Expertise scientifique collective, 2011).

L'agriculture intensive utilise une variété de pesticides en grande quantité pour protéger les cultures et sécuriser la production alimentaire (Tang et Maggi, 2021), mais sont également des polluants environnementaux omniprésents, causant des effets néfastes sur la qualité de l'eau, la biodiversité et la santé humaine (Tang et al., 2021).

De par ces dommages, il est plus que nécessaire et primordial de trouver d'autres choix pour assurer un meilleur rendement agricole tout en faisant attention autant à la santé humaine qu'à l'environnement. Selon Duponnois (2018), dans son discours sur les ressources microbiennes des sols, la recherche d'une solution réfléchie nous pousse à nous orienter à adopter une approche qui nécessite l'utilisation d'outils biologiques afin d'assurer une productivité et durabilité écologique, économique et sociale.

Parmi ces outils, on peut citer les microorganismes, qui malgré plus de 450 millions d'années d'existence des relations symbiotiques (ou mutualistes) entre eux et les plantes, ils commencent à peine à être pris en compte par l'Homme (Sanchez, 2021), mais même s'ils sont longtemps méconnus, ou mal aimés en agriculture, aujourd'hui ils bénéficient d'un regain d'intérêt. L'exemple le plus pertinent de cette symbiose est celui des rhizobiums.

Les légumineuses se trouvent être les plantes qui ont un énorme avantage sur les autres plantes car elles peuvent être associées à des bactéries du sol communément appelées rhizobium. Cette association conduit à la formation d'un petit organe spécial appelé nodule dans la racine. Dans ce dernier, les bactéries fixent l'azote atmosphérique grâce à son activité nitrogénase et le

transfert à la plante sous une forme combinatoire et assimilable. En retour, les plantes fournissent des nutriments pour assurer le développement des bactéries. Il s'agit donc d'une véritable relation symbiotique, avec des échanges bénéfiques entre les deux partenaires (Giraud, 2007).

Cette symbiose fournit aux plantes et au sol les besoins essentiels, c'est ce qu'on appelle biofertilisation et la bioremédiation. Les biofertilisants définis comme des produits à base de microorganismes vivent habituellement dans le sol (Mena, 2015), ils sont apparus comme une alternative très puissante aux engrais chimiques en raison de leur nature écologique, facile à appliquer, non toxique et rentable (Ahsan et al., 2012).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail qui a pour objectifs :

- Recherche de la capacité de solubilisation du phosphore ;
- Evaluation de la performance des Rhizobium à dégrader certaines molécules via leurs activités enzymatiques.

Synthèse bibliographique

I- Rhizosphère et interactions plantes – microorganismes

I-1. Rhizosphère

Le terme rhizosphère a été évoqué pour la première fois par le scientifique pionnier Lorenz Hiltner, en 1904, où de nombreuses applications de l'écologie de la rhizosphère sont envisagées (Ottow, 2011). La rhizosphère est une niche écologique qui représente la zone de contact entre le sol, la plante et les micro-organismes. Selon le volume des racines, elle représente entre 0,1 et 1% du sol global des écosystèmes forestiers et près de 100 % des premiers centimètres des sols partiels (Bazot, 2005).

La rhizosphère est généralement considérée comme une zone étroite du sol soumise à l'influence des racines vivantes, où les exsudats racinaires stimulent ou inhibent les populations microbiennes et leurs activités (Lynch et al., 2001). La nutrition des plantes dépend de la composition de la flore du sol dans la rhizosphère, les plantes ont tendance à attirer les bactéries utiles par les excréments de leurs racines (Curl et Truelove, 2012).

I-1.1 Les exsudats

Les substances secrétées par les racines dans la rhizosphère peuvent être réparties en deux principaux groupes. Premièrement, les exsudats solubles dans l'eau tels que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les hormones et les vitamines. Deuxièmement, les matières insolubles dans l'eau telles que les parois cellulaires, les matières mouillées et autres débris racinaires et mucilages tels que les lysates libérés lorsque les cellules s'autolysent. De plus, le dioxyde de carbone provenant de la respiration des racines représente souvent une grande proportion du carbone libéré par les racines. Les sécrétions telles que les glucides polymériques et les enzymes, en fonction des processus métaboliques de leur libération, peuvent également être considérées comme des exsudats racinaires (Whipps, 1990).

Les exsudats racinaires et les cellules des racines sont des composants vitaux de la rhizosphère qui affectent considérablement la capacité de colonisation des racines et la multiplication des microorganismes de la rhizosphère, ainsi que la sécrétion de composés bioactifs organiques (Hassan et al., 2019)

I-1.2 Microbiologie de la rhizosphère

La rhizosphère semble être le territoire microbien le plus composite de la planète, englobant un système cohésif de racines de plantes, de particules de sol, ainsi qu'un conglomérat microbien (Walker et al., 2003). Les organismes présents dans la rhizosphère comprennent les bactéries, les champignons, les oomycètes, les nématodes, les protozoaires, les algues, les virus, les archées et les arthropodes. La plupart des membres du microbiome de la rhizosphère font partie d'un réseau trophique complexe qui utilise la grande quantité de nutriments libérés par la plante. Étant donné que ces rhizodépôts (par exemple, exsudats, cellules morte de racine et mucilage) sont une force motrice majeure dans la régulation de la diversité et de l'activité microbiennes sur les racines des plantes, il a été admis que les plantes peuvent moduler le microbiome de la rhizosphère à leur avantage en stimulant sélectivement des microorganismes dotés de caractéristiques bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes (Mendes et al., 2013).

Les plantes sont colonisées par un nombre impressionnant de microorganismes qui peuvent atteindre des densités cellulaires bien supérieures au nombre de cellules végétales (Figure 1). De plus, le nombre de gènes microbiens dans la rhizosphère dépasse de loin le nombre de gènes végétaux (Mendes et al., 2013).

Les organismes de la rhizosphère qui ont été bien étudiés pour leurs effets bénéfiques sur la croissance et la santé des plantes sont les bactéries fixatrices d'azote, les champignons mycorrhiziens, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RPCP), les microorganismes de lutte biologique, les champignons mycoparasites et les protozoaires. Les organismes de la rhizosphère qui nuisent à la croissance et à la santé des plantes comprennent les champignons pathogènes, les oomycètes, les bactéries et les nématodes. Un troisième groupe de micro-organismes que l'on peut trouver dans la rhizosphère sont les agents pathogènes humains. Au cours de la dernière décennie, il y a un nombre croissant de rapports décrivant la prolifération de bactéries pathogènes humaines dans et sur les tissus végétaux (Mendes et al., 2013).

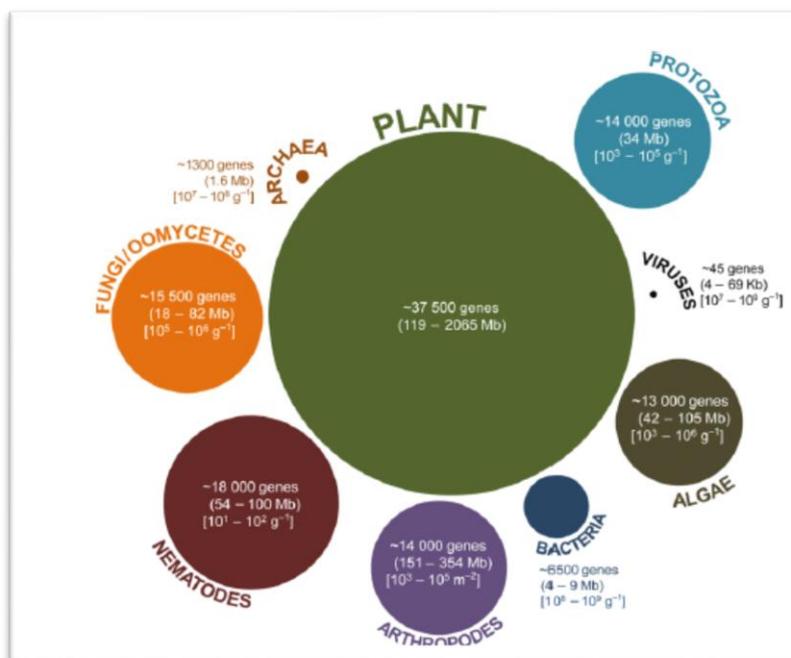


Figure 1 : Aperçu des microorganismes présents dans la rhizosphère, (Mendes et al., 2013).

La taille du cercle, à l'exception des Virus, est une mesure du nombre moyen de gènes dans les génomes d'espèces représentatives de chaque groupe d'organismes ; la taille (ou la plage de taille) de leurs génomes respectifs est indiquée entre parenthèses. Pour chacun de ces microorganismes, les chiffres approximatifs de leur abondance sont indiqués entre crochets.

La taille du cercle, à l'exception des Virus, est une mesure du nombre moyen de gènes dans les génomes d'espèces représentatives de chaque groupe d'organismes ; la taille (ou la plage de taille) de leurs génomes respectifs est indiquée entre parenthèses. Pour chacun de ces microorganismes, les chiffres approximatifs de leur abondance sont indiqués entre crochets.

I-1.3 Interactions plantes–microorganismes dans la rhizosphère

Les communications racines-racines, racines-microorganismes et racines-insectes sont probablement des occurrences continues dans cette zone de sol biologiquement active, mais en raison de la nature souterraine des racines, ces interactions intrigantes ont été largement négligées. La communication racines-racines et racines-microorganismes peut être positive (symbiotique) pour la plante, comme l'association d'épiphytes, de champignons mycorhiziens et de bactéries fixatrices d'azote avec les racines ; ou négative pour la plante, y compris les interactions avec les plantes parasites, les bactéries pathogènes, les champignons et les insectes.

Ainsi, les racines des plantes sont en communication constante avec des organismes symbiotiques et pathogènes (Walker et al., 2003).

Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées rhizobiums (Giraud, 2007). Cette association symbiotique fournit l'azote nécessaire pour la croissance et le développement de la plante et contribue à l'amélioration du bilan azoté des sols. Selon Ludwig et al. (1984), la réduction biologique de l'azote atmosphérique en ammonium fournit environ 65% de l'azote disponible dans la biosphère. La majeure partie de cet azote est apportée par la symbiose légumineuses-rhizobia, avec un apport annuel d'azote dans les terres estimées de 200 à 300 kg N/ha. Par conséquent, la symbiose rhizobienne pourrait, par la culture des légumineuses, dispenser les agriculteurs de la fertilisation chimique coûteuse et polluants (Hasan, 2018).

Un nombre important d'études a révélé que de nombreux micro-organismes associés aux plantes peuvent avoir des effets profonds sur la germination des graines, la vigueur des semis, la croissance et le développement des plantes, la nutrition, les maladies et la productivité (Figure 2) (Mendes et al., 2013).

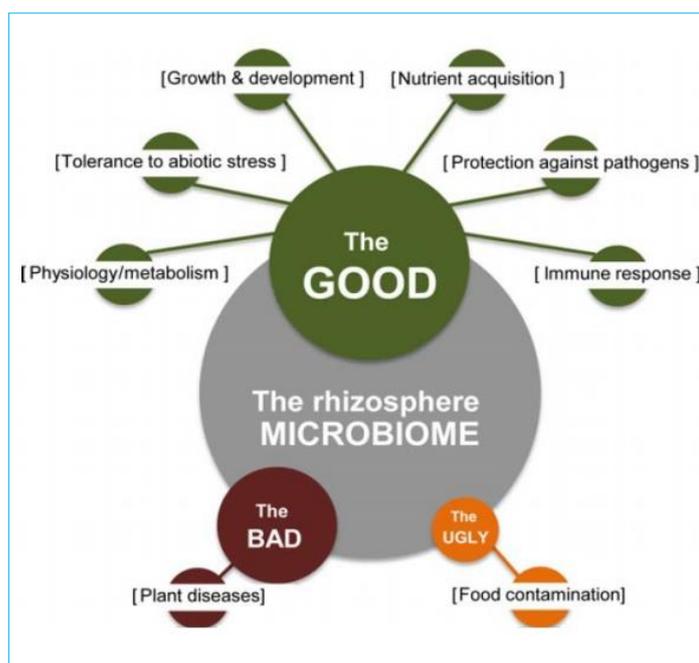


Figure 2 : Aperçu schématisé des fonctions et de l'impact des micro-organismes bénéfiques, phytopathogènes et pathogènes pour l'Homme sur la plante hôte (Mendes et al., 2013).

II- Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP)

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sont les bactéries du sol habitant autour et/ou sur la surface des racines et sont directement ou indirectement impliquées dans la promotion de la croissance et du développement des plantes *via* la production et la sécrétion de divers produits chimiques régulateurs à proximité de la rhizosphère. En général, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes facilitent directement la croissance des plantes en aidant à l'acquisition de ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou en modulant les niveaux d'hormones végétales (Ahemad et Kibret, 2014). Ces bactéries de la rhizosphère sont reprises sous le terme RPCP (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Ce terme s'invoque aux bactéries qui ont la capacité d'améliorer le développement des plantes (Ahmad et al., 2008).

Dans la famille des RPCP, il existe plusieurs genres bactériens : *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, etc.

II.1. Espèces du genre *Pseudomonas*

Le genre comprend un groupe de bactéries gram-négatives, non sporulées, mobiles, en forme de bâtonnets appartenant à la classe des gamma-proteobacteria. *Pseudomonas* se compose d'espèces trouvées dans une variété d'environnements naturels comme le sol, l'eau douce, saumâtres et marine et en association avec des plantes et des animaux (Behera et al., 2018).

II.2. Espèces du genre *Azospirillum*

Azospirillum est l'un des genres de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes les mieux étudiés (Cassán et Diaz-Zorita, 2016). Ce microorganisme est capable de coloniser plus d'une centaine d'espèces végétales et améliorer significativement leur croissance, leur développement et leur productivité en conditions de terrain (Bashan et de-Bashan, 2010).

II.3. Espèces du genre *Rhizobium*

Les *Rhizobium* sont des bactéries bien connues pour la fixation biologique de l'azote par symbiose avec des légumineuses. Ces bactéries peuvent également fonctionner comme Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Adnan et al., 2016).

II-1. Mécanisme d'amélioration de la croissance des plantes

Les bactéries favorisant la croissance des plantes améliorent leurs développements par divers mécanismes : directs et indirects. Les bactéries à caractère spécifique impliquent la résistance des plantes à différents phytopathogènes par divers modes d'action. Le mode d'action des bactéries RPCP varie selon le type de plante hôte et les facteurs biotiques et abiotiques qui peuvent influencer sur les plantes (figure 3) (García-Fraile et al., 2015 ; Gupta et al., 2015 ; Zakry et al., 2012 ; Vacheron et al., 2013).

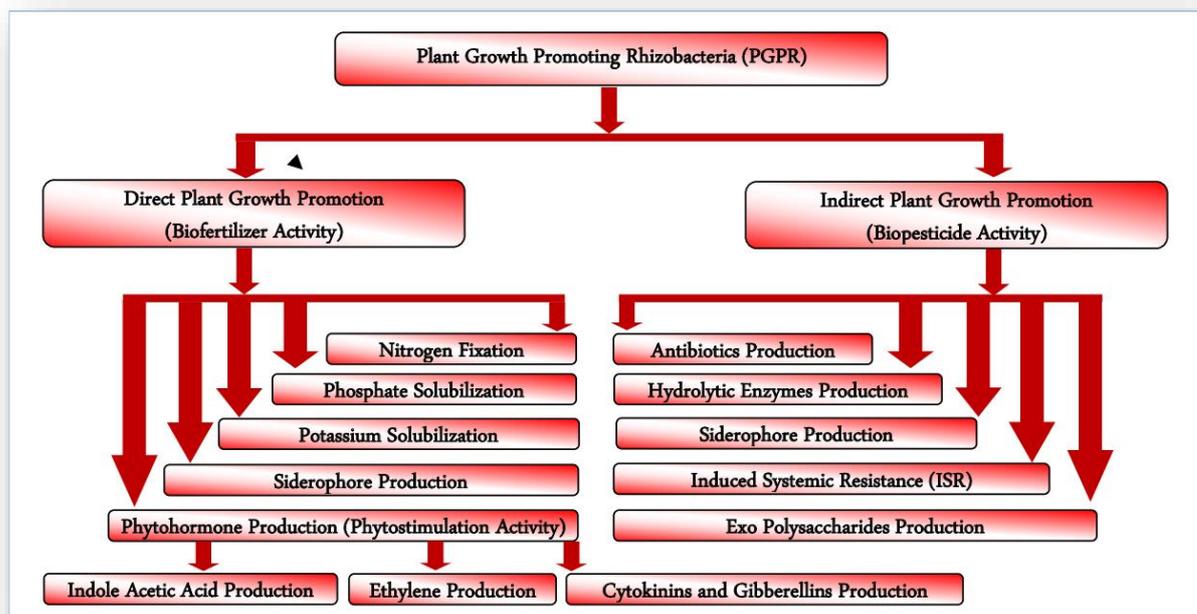


Figure 3 : Mécanismes direct et indirect des bactéries favorisant la croissance des plantes (Gupta et al., 2015).

II-1.1 Mécanismes directs

Les bactéries favorisant la croissance des plantes facilitent leur développement par un contact direct en augmentant l'accessibilité et la concentration des nutriments par la fixation d'azote, la solubilisation du phosphate et la production des phytohormones (Ahemad et Kibret, 2014).

II.1.1.1 Fixation de l'azote

L'azote est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes bien que 78% de l'azote présent dans l'atmosphère est indisponible pour les plantes (Govind et al., 2015 ; Gaby & Buckley, 2012).

La fixation biologique de l'azote est en effet un mécanisme direct du processus RPCP qui est effectué par deux interactions symbiotiques et non symbiotiques. Les RPCP symbiotiques peuvent entrer dans la racine des plantes et former des nodules qui ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique (Reed et al., 2011 ; Shridhar, 2012 ; Ahemad et Kibret, 2014 ; Damam et al., 2016).

II.1.1.2 Solubilisation du phosphore

Le phosphore inorganique peut se trouver dans la nature sous forme soluble ou insoluble (Mackey et al., 2009). Typiquement, la solubilisation du phosphore inorganique se produit à la suite de l'action d'acides organiques de faible poids moléculaire tels que l'acide gluconique et l'acide citrique, tous deux synthétisés par diverses bactéries du sol. D'autre part, la minéralisation du phosphore organique se produit par la synthèse d'une variété de phosphatases, catalysant l'hydrolyse des esters phosphoriques. Il est important de noter que la solubilisation et la minéralisation du phosphate peuvent coexister chez la même souche bactérienne (Glick, 2012).

II.1.1.3 Solubilisation du potassium

Le potassium est un macronutriment essentiel utilisé pour le développement des plantes. 90% du potassium est présent sous forme de roche insoluble et de minéraux de silicate. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes produisent des acides organiques qui ont la capacité de solubiliser le potassium. Les rhizobactéries solubilisant le potassium les plus connues sont *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* sp. L'utilisation de rhizobactéries solubilisant le potassium et favorisant la croissance des plantes comme biofertilisant peut contribuer dans l'amélioration de l'agriculture et la promotion d'une production agricole respectueuse de l'environnement (Han et Lee, 2006 ; Kumar et Dubey, 2012 ; Liu et al., 2020 ; Singh et Sindhu, 2013).

II.1.1.4 Production des phytohormones

Les hormones végétales jouent un rôle clé dans la croissance et le développement des plantes et dans la réponse des plantes à leur environnement (Davies, 2010). Lorsque les plantes rencontrent des conditions environnementales limitant la croissance, elles tentent souvent d'ajuster les niveaux de leurs phytohormones endogènes afin de diminuer les effets négatifs des facteurs de stress environnementaux (Salamone et al., 2006). Un large éventail de

microorganismes présents dans la rhizosphère possèdent la capacité de synthétiser des substances qui interfèrent avec de nombreux processus de développement des plantes. Les rhizobactéries produisant des phytohormones telles que les auxines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide indole-acétique (AIA) peuvent affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture des racines par surproduction de racines latérales et de poils absorbants avec l'augmentation subséquente de l'apport de nutriment et d'eau (Kang et al., 2010 ; Spaepen et Vanderleyden, 2011).

De nombreuses bactéries promotrices de la croissance des plantes, dont les rhizobiums, peuvent modifier les niveaux de phytohormones et ainsi affecter l'équilibre hormonal de la plante et sa réponse au stress (Glick et al., 2007). La plupart des souches de *Rhizobium* qui ont été examinées se sont avérées produire de l'AIA. Celle-ci affecte la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales ; stimule la germination des graines et des tubercules ; augmente le taux de développement du xylème et des racines ; contrôle les processus de croissance végétative ; initie la formation de racines latérales et adventives ; arbitre les réponses à la lumière, à la gravité et à la fluorescence ; affecte la photosynthèse, la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites et la résistance aux conditions stressantes (Glick, 2012).

II-1.2 Mécanisme indirect

Les mécanismes de contrôle biologique par lesquels les rhizobactéries peuvent favoriser indirectement la croissance des plantes, comprennent l'antibiose, l'induction d'une résistance systémique et la compétition pour les nutriments et les niches (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Les bactéries favorisant la croissance des plantes produisent des substances qui participent à la neutralisation des effets des phytopathogènes sur les plantes telles que la production des antibiotiques en réponse aux agents pathogènes des plantes, la production des sidérophores et l'induction d'une résistance systémique (Akhgar et al., 2014).

II-1.2.1 Production des antibiotiques

La production des antibiotiques par les RPCP est l'un des mécanismes de bio-contrôle les plus efficaces et les plus étudiés pour empêcher la prolifération des phytopathogènes (Ulloa-Ogaz et al., 2015). Les antibiotiques produits par les RPCP comprennent : les butyrolactones, la zwittermycine A, la kanosamine, l'oligomycine A, l'oomycine A, l'acide phénazine-1-

carboxylique, la pyrolutéorine, la pyrrolnitrine, la viscosinamide, la xanthobaccine et le 2, 4-diacétyl phloroglucinol (2, 4-DAPG) (Whipps, 2001).

II-1.2.2 Production des sidérophores

Le fer est un nutriment vital dont tous les organismes vivants ont besoin pour de nombreux processus cellulaires (Sujatha et Ammani, 2013). Le fer est extrait du sol par deux mécanismes efficaces par augmentation de la solubilité du fer en libérant des protons et des réducteurs chélateurs, tels que acides organiques et phénoliques, dans la rhizosphère, ou par la sécrétion de substances de sous-chélation ferrique (phytosidérophores) couplées à un Fe^{3+} (Ma, 2005).

Les microorganismes produisent des composés chélateurs de fer de faible poids moléculaire, appelés sidérophores, qui sont utilisés pour l'amélioration directe et indirecte du développement des plantes qui transportent cet élément dans leurs cellules. La quantité de fer est faible pour l'assimilation par les organismes vivant car l'ion ferrique ou Fe^{3+} n'est que faiblement soluble (Ahmed et Holmström, 2014). L'apport de fer aux plantes par les bactéries du sol est encore plus important lorsque les plantes sont exposées à un stress environnemental tel que la pollution par les métaux lourds. Dans ce cas, les sidérophores aident à atténuer les stress imposés aux plantes par les niveaux élevés de métaux lourds dans le sol (Diels et al., 2002).

II-1.2.3 Induction de la résistance systémique

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes peuvent fournir une résistance systémique contre un large spectre d'agents pathogènes des plantes tels que les champignons, les bactéries et les virus. Dans certains cas, même les dommages causés par les insectes et les nématodes peuvent être réduits après l'utilisation de rhizobactéries (Beneduzi et al., 2012).

II-1.2.4 Production des enzymes

Les RPCP sont largement utilisées pour améliorer la capacité de rétention des nutriments du sol, qui est étroitement liée à l'activité microbienne du sol et à l'activité enzymatique (Ren et al., 2019). Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui accélèrent les réactions biochimiques dans les organismes vivants, et qui peuvent être extraits des cellules puis utilisés pour catalyser un large éventail de processus commercialement importants (Robinson et al., 2015).

Les souches rhizobactériennes favorisant la croissance des plantes peuvent produire certaines enzymes telles que les chitinases, la déshydrogénase, la β -glucanase, les lipases, les phosphatases, les protéases, etc. présentent une activité hyperparasitaire, attaquant les agents pathogènes en excréant des hydrolases de la paroi cellulaire. Grâce à l'activité de ces enzymes, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes jouent un rôle très important dans la promotion de la croissance des plantes en particulier pour les protéger des stress biotiques et abiotiques en supprimant les champignons pathogènes dont *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum*.

De nombreux rapports ont montré l'efficacité des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes en tant qu'agents de lutte biologique, notamment *Pseudomonas fluorescens* supprime la pourriture noire des racines causée par le champignon *Thielaviopsis basicola*, *Pseudomonas putida* contre *Macrophomina phaseolina* dans le pois chiche et *Azotobacter chroococcum* contre *Fusarium oxysporum* dans *Sesamum indicum* respectivement. De même, il a été rapporté que l'effet synergique des champignons antagonistes *Trichoderma* avec l'application combinée de *Pseudomonas* et de souches rhizobiennes peuvent protéger le pois chiche de l'infection par le pathogène de la pourriture du collet *Sclerotium rolfsii* (Gupta et al., 2015). L'infection rhizobienne des légumineuses est un processus délicatement équilibré. Si des enzymes dégradant les parois sont impliquées, leur production devrait être limitée pour tenir compte d'une pénétration lente et localisée sans destruction des poils absorbants et avortement ultérieur du processus d'infection. Plusieurs études ont détecté des activités enzymatiques pectinolytiques, cellulolytiques et hémicellulolytiques à partir de cultures pures de rhizobium (Mateos et al., 1992).

A) Activité amylasique chez les rhizobiums

Les enzymes amylolytiques provenant de nombreuses sources dégradent l'amidon, le principal polysaccharide de stockage des plantes. Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie, représentant environ 25 % du marché (Rao et al., 1998).

Toutes les souches de rhizobium pourraient produire plus de protéines extracellulaires, de biomasse et d'amylases avec les différents types de substrats carbonés. Parmi les sources de carbone testées, le maltose était le meilleur substrat pour la production de protéines et d'amylase (Oliveira et al., 2007).

B) Activité cellulosique chez les rhizobiums

Les espèces de *Rhizobium* ont le potentiel de produire des enzymes d'importance industrielle ; comme l'amylase et cellulase (Martínez-Molina et al., 1980). La diversité connue des bactéries capables de former une symbiose racinaire-nodule fixatrice d'azote avec les légumineuses comprend 10 genres et plus de 50 espèces. Toutes les souches types officielles de chacun de ces taxons ont été examinées pour l'activité cellulase, L'évaluation des génomes des rhizobiums a indiqué des gènes codant pour des cellulases représentées par une diversité de familles de glycosyl hydrolases (Robledo et al., 2008).

C) Activité chitinase chez les rhizobiums

Les chitinases et les -1,3-glucanases sont deux principaux moteurs hydrolytiques. Associés à la lyse de la paroi cellulaire fongique. il y a des enzymes mycolytiques produites par les rhizobium, en particulier chitinases, qui sont connues pour hydrolyser la chitine, un composant des parois cellulaires fongiques (Das et al., 2017).

D) Activité uréase chez les rhizobiums

L'uréase est une métalloenzyme complexe qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone. Cette enzyme permet à de nombreuses bactéries du sol d'utiliser l'urée comme source d'azote. L'uréase est également un facteur de virulence qui améliore la survie des bactéries pathogènes dans des conditions difficiles au sein de l'hôte et provoque directement des dommages dus à l'ammonium et au CO₂ (Toffanin et al., 2002).

II-2. Utilisation de rhizobium comme biofertilisant et production des inocula

Les biofertilisants sont les substances, préparées à partir de micro-organismes qui, lorsqu'ils sont appliqués sur les graines ou la plante, peuvent coloniser la rhizosphère ou la parties intérieures des plantes et favorise ainsi l'enracinement et la croissance (Bhattacharyya et Jha, 2012).

Au cours des dernières décennies, des progrès impressionnants ont été réalisés dans la production, la commercialisation et l'utilisation d'inocula. Récemment, les agriculteurs sont plus réceptifs à leurs utilisations, principalement parce que des produits de haute qualité et des souches polyvalentes, améliorant les rendements à faible coût par rapport aux engrais chimiques sont disponibles sur le marché. Dans le cadre d'une agriculture plus durable, les inocula

microbiens contribuent également à atténuer les impacts environnementaux causés par les produits agrochimiques (Santos et al., 2019).

II-2.1 Production des inocula bactériens

Le premier objectif lorsque l'on envisage l'inoculation de plantes avec des PGPB (y compris les rhizobiums), est de trouver la meilleure souche de bactéries ou un consortium microbien qui assure l'effet souhaité sur la culture cible (figure 4). L'étape suivante consiste à concevoir une formulation d'inoculum spécifique pour la culture cible et une méthode d'application pratique, compte tenu des limites des producteurs.

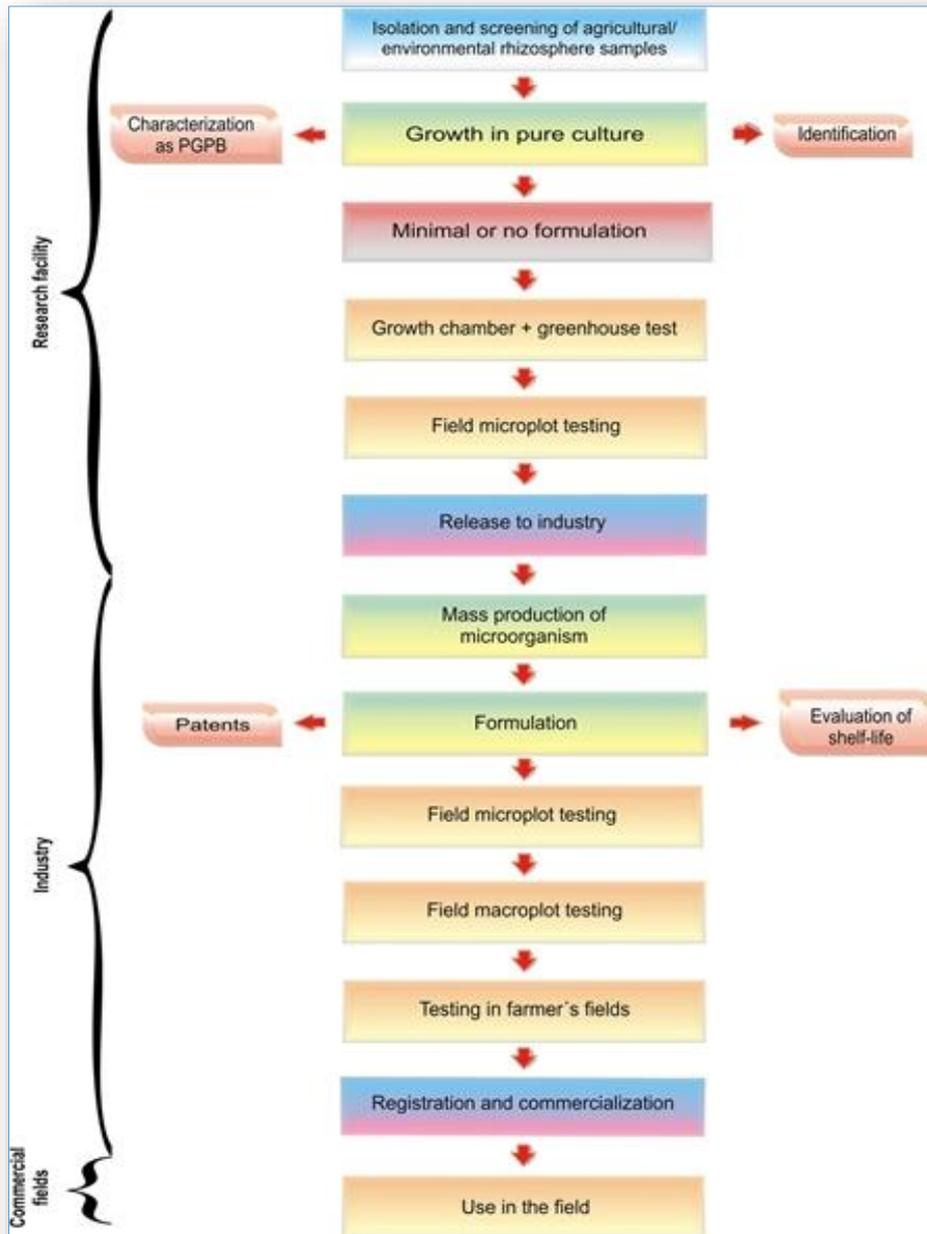


Figure 4 : Organigramme des procédures de développement des inocula bactériens

II-2.2 Caractéristiques d'un inoculum idéal

Pour concevoir un bon inoculum, on doit tenir compte des intérêts des producteurs et des fabricants, qui sont complémentaires. En pratique, et surtout, les producteurs recherchent toujours un rendement maximum. Les principales caractéristiques pratiques des inocula attendues par le producteur sont que l'inoculum doit être compatible avec les pratiques

courantes sur le terrain, telles que la désinfection des semences et l'utilisation courante de pesticides. Deuxièmement, les caractéristiques importantes des inocula sont : (1) la facilité d'utilisation, (2) la compatibilité avec l'équipement de semis au, (3) la tolérance aux abus pendant le stockage, (4) la capacité de travailler dans différentes conditions et types de sol, et (5) la capacité d'aider à prolonger la survie des bactéries inoculées pendant le temps nécessaire à la plante. Les exigences supplémentaires des fabricants sont : (6) une durée de conservation dépassant une saison, (7) des résultats reproductibles sur le terrain, et (8) la sécurité humaine, animale et végétale en éliminant l'utilisation de matières dangereuses (Catroux et al., 2001).

II-2.3 Commercialisation des RPCP

Un effort d'application du génie génétique pour assainir les sols contaminés (Denton, 2007) et ainsi augmenter la productivité des cultures en agriculture est une autre idée intéressante. La communauté rhizobactérienne peut être spécialement conçue pour cibler divers polluants et fournir une rhizoremédiation personnalisée (Wu et al., 2006) .

Le succès et la commercialisation des souches RPCP dépendent des liens entre les organisations scientifiques et industrielles. Selon Nandakumar et al., (2001) les différentes étapes du processus de commercialisation comprennent l'isolement de souches antagonistes, criblage, efficacité des tests en pot et sur le terrain, production de masse et développement de formulations, méthodes de fermentation, viabilité de la formulation, toxicologie, liens industriels et contrôle de la qualité. Le marché mondial des biofertilisants en termes de chiffre d'affaires était estimé à environ 5 milliards USD en 2011 et, selon une analyse détaillée du marché et les scénarios de son développement dans les différents continents, est prévu de doubler d'ici 2017 (Mandmarkets, 2013).

Matériel et méthodes

III- Matériel et Méthodes

III-1. Matériel

III-1.1 Matériel microbien

Les souches de rhizobiums utilisées dans cette étude proviennent de la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université A. Mira de Bejaïa. Elles ont été isolées à partir de nodules de deux espèces de légumineuses à savoir *Vicia sativa* (33 souches) et *Vicia faba* (2 souches).

III-2. Méthodes

III-2.1 Criblage des souches solubilisant du phosphore

Dans la présente étude, 35 souches de rhizobiums ayant été retenues ont fait l'objet d'un test pour la mise en évidence de la capacité de solubiliser le phosphate tricalcique. Ces souches ont été repiquées à partir de la collection de souches conservées dans des tubes de gélose Yeast Mannitol Agar (YMA) conservée à 4°C, puis incubées à 28°C pendant 48h en vue de revivification. La mise en évidence de la solubilisation du phosphore a été réalisée sur les deux milieux de culture solides PVK et NBRIY dont la composition a été rapportée par Fiske et Subbarow (1925), en utilisant deux méthodes d'ensemencement :

A) Par touche

À l'aide d'une pipette pasteur une colonie de chaque souche obtenue sur le milieu YMA a été prélevée puis déposée directement sur la surface des milieux gélosés suscités par simple touche perpendiculaire. Trois répétitions sont ainsi réalisées.

B) Par spot

À l'aide d'une anse de platine, des suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau physiologique stérile. Après ajustement de la DO_{600nm} à 0,5 unité, 10 µl de chaque suspension ont été déposés sur la surface de chacun des milieux utilisés. Trois répétitions sont ainsi réalisées pour chaque souche et sur chaque milieu.

Après incubation à 28°C, la présence de la capacité à solubiliser le phosphore se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des colonies. Les diamètres des halos clairs, ainsi que ceux des colonies sont mesurés après 3, 6 et 9 jours.

III-2.2 Effet de la concentration du glucose sur la solubilisation du phosphore

Les souches ayant été sélectionnées auparavant pour leur capacité à solubiliser le phosphore ont fait l'objet de l'étude de l'effet du glucose à différentes concentrations sur cette activité. Ainsi, les souches qui ont montré des résultats positifs dans le test de criblage ont été ensemencées sur milieu NBRIY additionné de glucose à des concentrations de 5, 10 et 15g/L. Les milieux ainsi préparés ont été ensemencés en spot à raison de 10 µl puis incubés à 28°C. Trois spots ont été réalisés pour chaque souche.

III-2.3 Activité amylolytique

La mise en évidence de l'activité amylolytique a été réalisée sur la gélose à base d'amidon ensemencée par la méthode de spot par dépôt d'un volume de 10 µl d'une suspension bactérienne de 0.5 unité DO de chaque isolat et à raison de trois répétitions. Après incubation à 28°C pendant 72h, une solution de Lugol préalablement préparée a été dispersée sur toute la surface du milieu, après 5 minutes de contact, l'excès a été éliminé. Une couleur bleu sombre désigne une absence d'activité amylolytique par contre l'apparition d'une zone claire autour de la colonie indique l'hydrolyse de l'amidon (Vinoth Raj et al., 2009).

III-2.4 Activité cellulolytique

Pour la mise en évidence de l'activité cellulolytique chez les rhizobiums, un ensemencement par spot des isolats a été effectué sur milieu gélosé additionné de Carboxy-Méthyl- Cellulose. Après incubation à 28°C pendant 72h, le réactif de rouge Congo a été dispersé sur toute la surface du milieu. Après 15 minutes, l'excès du réactif a été éliminé et il est remplacé par une solution d'HCl (annexe). L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique la présence d'une cellulase extracellulaire.

III-2.5 Activité pectinolytique

La recherche de l'activité pectinolytique a été réalisée sur milieu YMA dont le mannitol a été remplacé par la pectine. Après incubation à 28°C pendant 72h, une solution de Lugol a été versée sur la surface du milieu puis laisser agir 5 minutes. La présence d'un halo clair autour de la colonie indique la dégradation de la pectine.

III-2.6 Activité uréasique

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats sont cultivés sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée l'équivalent de 20g /L et 0,012g de rouge de phénol comme indicateur de pH à 28 °C pendant 72 heures.

L'hydrolyse de l'urée produit de l'ammoniac et du CO₂, la formation d'ammoniac alcalinise le milieu et le changement de PH est détecté par changement de couleur de l'indicateur rouge de phénol qui passe de l'orange claire a pH=6,8 au magenta a pH=8,1.

III-2.7 Activité gélatinase

La recherche de l'activité gélatinase a été effectuée sur le milieu gélosé contenant 4g/l de gélatine. Le milieu est ensemencé en spots à raison de 10 µl. Après incubation à 28°C pendant 72h, la révélation de la présence d'une activité gélatinase a été faite par addition d'une solution de sulfate d'ammonium.

III-2.8 Réduction des nitrates en nitrites

Les souches bactériennes à tester ont été mises en culture dans le bouillon nitraté puis incubées à 28°C pendant 72h. Au terme de l'incubation, on ajoute à chaque tube les réactifs nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et nitrate réductase 2 (α -naphthylamine dans l'acide acétique 5M). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites, traduisant un résultat positif. En l'absence de coloration rouge donc absence de nitrites, une pincée de zinc métallique est ajoutée et une observation après quelques minutes de la teinte obtenue est réalisée. Le virage au rouge indique l'absence de la nitrate réductase tandis que l'absence de coloration indique que les nitrates sont réduits au-delà du stade nitrite.

III-2.9 Production d'Acide Indole Acétique

Le test au réactif de Salkowski est souvent utilisé comme premier test pour les rhizobactéries productrices d'AIA. Lorsqu'une réaction positive se produit suite à l'ajout du réactif au surnageant, un changement de couleur se produit (du rose au rouge foncé). La couleur rose est due à la formation d'un complexe (tris-(indole-3-acétate) -ferIII) (Kamnev et al., 2001).

Pour la détection et la quantification de la production d'AIA par les souches retenues. 1ml de la solution Tryptophane (annexe) filtrée a été ajoutée à chaque tube de milieu LB, après incubation à 28°C pendant 96h, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 14000 rpm pendant 3

minutes, ensuite, 1ml du surnageant a été ajouté à 2 ml du réactif Salkowski et 2 gouttes d'acide orthophosphorique, le mélange a été incubé à 30°C et à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance des différentes solutions a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 530nm. L'estimation quantitative de l'AIA est effectuée en utilisant une courbe d'étalonnage préparée par des concentrations croissantes de l'AIA (annexe), dans un intervalle de 0 à 50mg/L.

Résultats et Discussions

IV- Résultats et discussions

IV-1. Criblage des souches solubilisant du phosphore

Les résultats de criblage de souches de rhizobiums capables de solubiliser le phosphore montrent que seules 7 souches présentent cette activité (tableau 1). En effet, un halo clair autour des colonies a été observé.

Tableau 1 : Résultats de la sélection des souches solubilisant le phosphore

Souches	Milieu NBRIY		Milieu PVK		Souches	Milieu NBRIY		Milieu PVK	
	par Spot	par Touche	par Spot	par Touche		par Spot	par Touche	par Spot	par Touche
Vte N6a	-	-	-	-	Vte N1b	-	-	-	-
N5A	-	-	-	-	EC6	-	-	-	-
Vte N1a	-	-	-	-	RLV	+	+	+	+
Vte N41	-	-	-	-	AKE1	+	+	+	+
Vte N52a	-	-	-	-	SSN2C	-	-	-	-
Vte N2b	-	-	-	-	1-AmA	-	-	-	-
Vte N52b	-	-	-	-	Ksat N51	-	-	-	-
Vte N2a	-	-	-	-	Ksat N2a	-	-	-	-
Vte N1C8	-	-	-	-	Ksat N5A	-	-	-	-
Vte N1C7	+	+	+	+	KsaT N1A	-	-	-	-
Vte N5B	-	-	-	-	SSN2d	+	+	+	+
Knar 1L1	-	-	-	-	2Vsat 112b	-	-	-	-
N4b	-	-	-	-	1Vsat 1LC2	+	+	+	+
Vte N6b	-	-	-	-	2-1L2A	-	-	-	-
Vte N5b	-	-	-	-	1Vsat 1LC1	-	-	-	-
Knar Ama	-	-	-	-	2Vsat 2L1	+	+	+	+
Vte N42	-	-	-	-	2-1L3a	+	+	+	+
					SSN2a	-	-	-	-

+ : Présence d'un halo clair : solubilisation du phosphore.

- : Absence d'un halo clair : absence de solubilisation du phosphore.

Ce qui ressort à partir de ce tableau est l'absence de la solubilisation chez la plupart des souches testées et que le milieu d'étude n'a pas d'influence sur l'expression de cette activité. Ainsi, sur les 35 souches retenues, seules 07 (soit 20%) étaient positives.

Le taux de solubilisation obtenus dans cette étude est supérieur à celui obtenus par Aarab et al. (2009), qui ont rapporté que parmi les 53 isolats, seulement 6 (soit 11.32%) ont la capacité de solubiliser le phosphore. Il est par contre inférieur à celui observé par (Alikhani et al., 2006) sur une collection de 446 souches de rhizobium iranien et qui est de 44 % (198). Antoun et al. (1998), ont testé 266 souches obtenues de différents laboratoires d'Australie, de Colombie, d'Egypte et d'Amérique du Nord sur le milieu solide de Goldstein (1986) additionné de vitamines (Vincent, 1970), et ont trouvé que 144 (54 %) étaient capables de solubiliser du phosphate dicalcique (DCP).

Les différences observées peuvent s'expliquer par les différentes sources de phosphate, de calcium et d'azote utilisées. Dans le présent travail, l'extrait de levure a été utilisé comme source d'azote et de vitamines tandis qu'Antoun et al., (1998) ont utilisé le NH_4Cl comme source d'azote.

Les sols peuvent contenir une quantité substantielle de phosphore organique, et les phosphatases des micro-organismes peuvent effectuer la minéralisation de la plupart des composés organiques du phosphore. En effet, de 30 à 63 % des bactéries du sol cultivables peuvent minéraliser le phosphore organique dans les sols (Rodriguez et Fraga, 1999).

IV-2. Effet du glucose sur la solubilisation du phosphore

L'étude de l'effet de la concentration du glucose sur la solubilisation du phosphore tricalcique est illustrée dans le tableau 2. Il y a lieu de signaler que la croissance bactérienne augmente avec l'augmentation de la concentration en glucose, par contre, on constate que la solubilisation du phosphore est meilleure à une concentration en glucose de 10g/l. Le calcul de l'indice de solubilisation du phosphore montre que celui-ci est proportionnel à la concentration en glucose. Ces résultats concordent avec les hypothèses rapportées par Behera et al., (2014) , qui stipule que la solubilisation du phosphore minéral s'avère être due à l'acide gluconique dérivé du glucose produit dans l'espace périplasmique. Il a été calculé que 60 mM d'acide gluconique entraînaient la libération d'environ 0,1 mM de Pi . Ainsi, il a été émis l'hypothèse que l'acide gluconique produit conduisait à la libération de protons qui solubiliseraient finalement les phosphates insolubles.

Ces résultats sont également en accord avec ceux rapportés par Sridevi et Mallaiah, (2009). En effet, ces auteurs ont rapporté que le glucose, à une concentration de 1% (comme dans le milieu de Pikovskaya), supportait une solubilisation maximale du phosphate tricalcique. De même, ces auteurs ont rapporté que la solubilisation du phosphate augmentait avec l'augmentation de la concentration de glucose chez les isolats de *Rhizobium*. Il a également été observé que l'augmentation de la concentration de glucose de 2 à 3 % n'a pas montré beaucoup de changement dans la solubilisation du phosphate tricalcique. La diminution de la solubilisation a diminué aux concentrations élevées pourrait être dû à l'autoconsommation de phosphate soluble par la population bactérienne croissante.

Tableau 2 : Effet du glucose sur la solubilisation du phosphore

	Durée	Diamètre de la colonie			Diamètre de l'halo			Indice de solubilisation			Indice d'efficacité		
		Concentration g/l			Concentration g/l			Concentration g/l			Concentration g/l		
		5g	10g	15g	5g	10g	15g	5g	10g	15g	5g	10g	15g
Vte NIC17	3j	1	1,03	0,67	1,47	1,6	1,23	2,47	2,55	2,84	147,00	155,34	183,58
	6j	1,2	1,23	0,8	1,63	1,7	1,4	2,36	2,38	2,75	135,83	138,21	175,00
	9j	1,33	1,27	0,97	1,8	1,72	1,57	2,35	2,35	2,62	135,34	135,43	161,86
1V Sat 1LC2	3j	1,3	1,22	1,53	1,8	1,8	1,93	2,38	2,48	2,26	138,46	147,54	126,14
	6j	1,72	1,9	1,7	2,25	2	2	2,31	2,05	2,18	130,81	105,26	117,65
	9j	1,72	2	1,68	2,18	2,1	2,05	2,27	2,05	2,22	126,74	105,00	122,02
2V Sat 2L1	3j	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
	6j	1,41	1,43	1,5	2,3	2,5	3	2,63	2,75	3,00	163,12	174,83	200,00
	9j	1,4	1,43	1,5	2,3	2,5	3	2,64	2,75	3,00	164,29	174,83	200,00
SSN2d	3j	1,3	1,3	1,2	1,73	1,8	1,5	2,33	2,38	2,25	133,08	138,46	125,00
	6j	1,42	1,43	1,33	1,8	1,8	1,7	2,27	2,26	2,28	126,76	125,87	127,82
	9j	1,42	1,47	1,33	2	1,93	1,7	2,41	2,31	2,28	140,85	131,29	127,82
2-1L3a	3j	1,43	1,45	1,1	3	3	2,27	3,10	3,07	3,06	209,79	206,90	206,36
	6j	1,7	1,6	1,37	3	3,1	2,27	2,76	2,94	2,66	176,47	193,75	165,69
	9j	1,7	1,6	1,37	3	3,7	2,27	2,76	3,31	2,66	176,47	231,25	165,69
RLV	3j	1,33	0,97	0,8	2	2,7	2,27	2,50	3,78	3,84	150,38	278,35	283,75
	6j	1,31	0,97	0,9	2	1,93	1,7	2,53	2,99	2,89	152,67	198,96	188,88
	9j	1,35	1	1	1,9	3	2,27	2,41	4,00	3,27	140,7	300	227
AKE1	3j	1,25	1,29	1,13	1,83	1,92	1,9	2,46	2,49	2,68	146,4	148,84	168,14
	6j	1,78	1,93	1,62	2,35	2,51	2,39	2,32	2,30	2,48	132,02	130,05	147,53
	9j	1,79	2,1	1,73	2,38	2,51	2,45	2,33	2,20	2,42	132,96	119,52	141,62

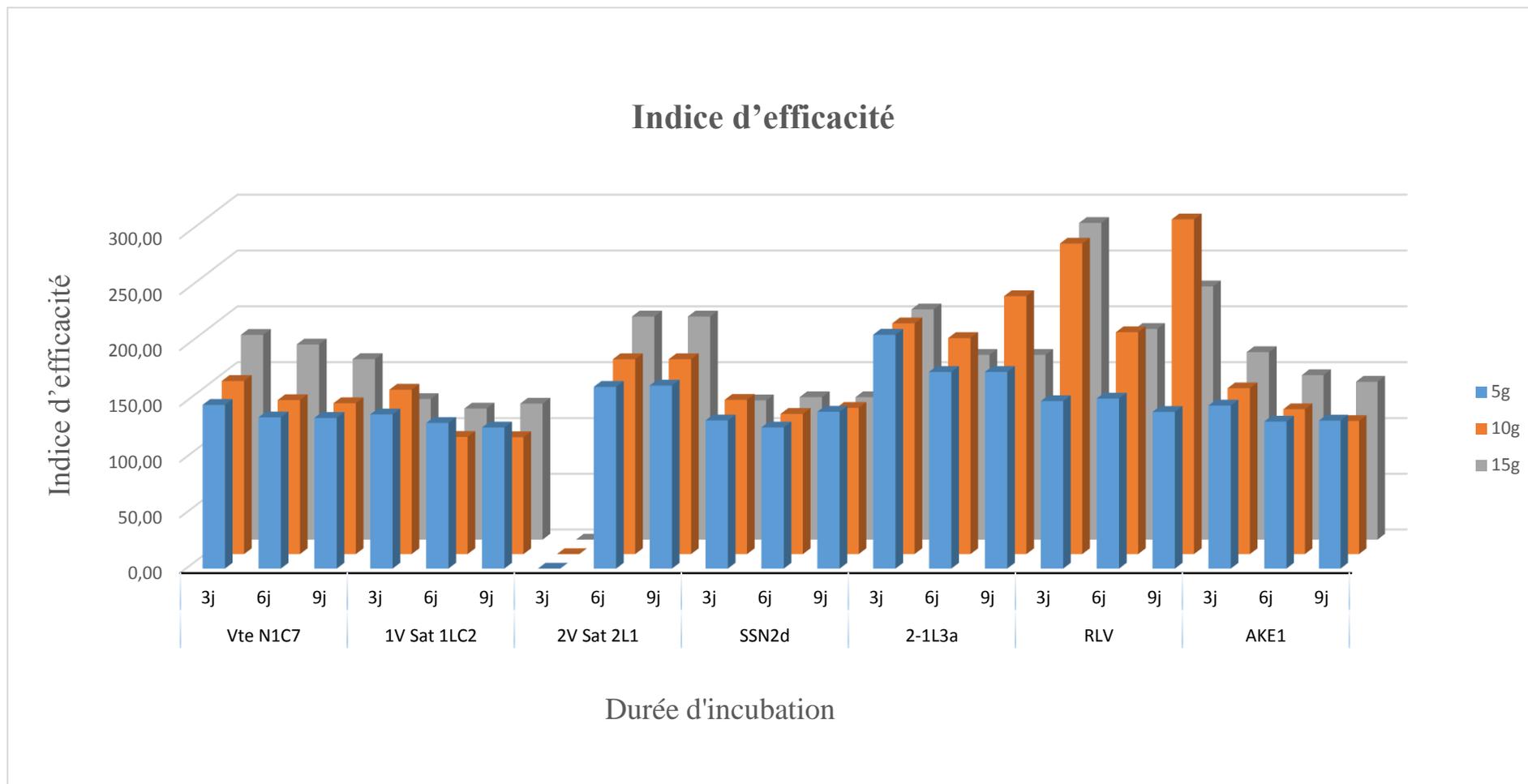


Figure 5 : Indice d'efficacité de solubilisation du phosphore par les souches étudiées

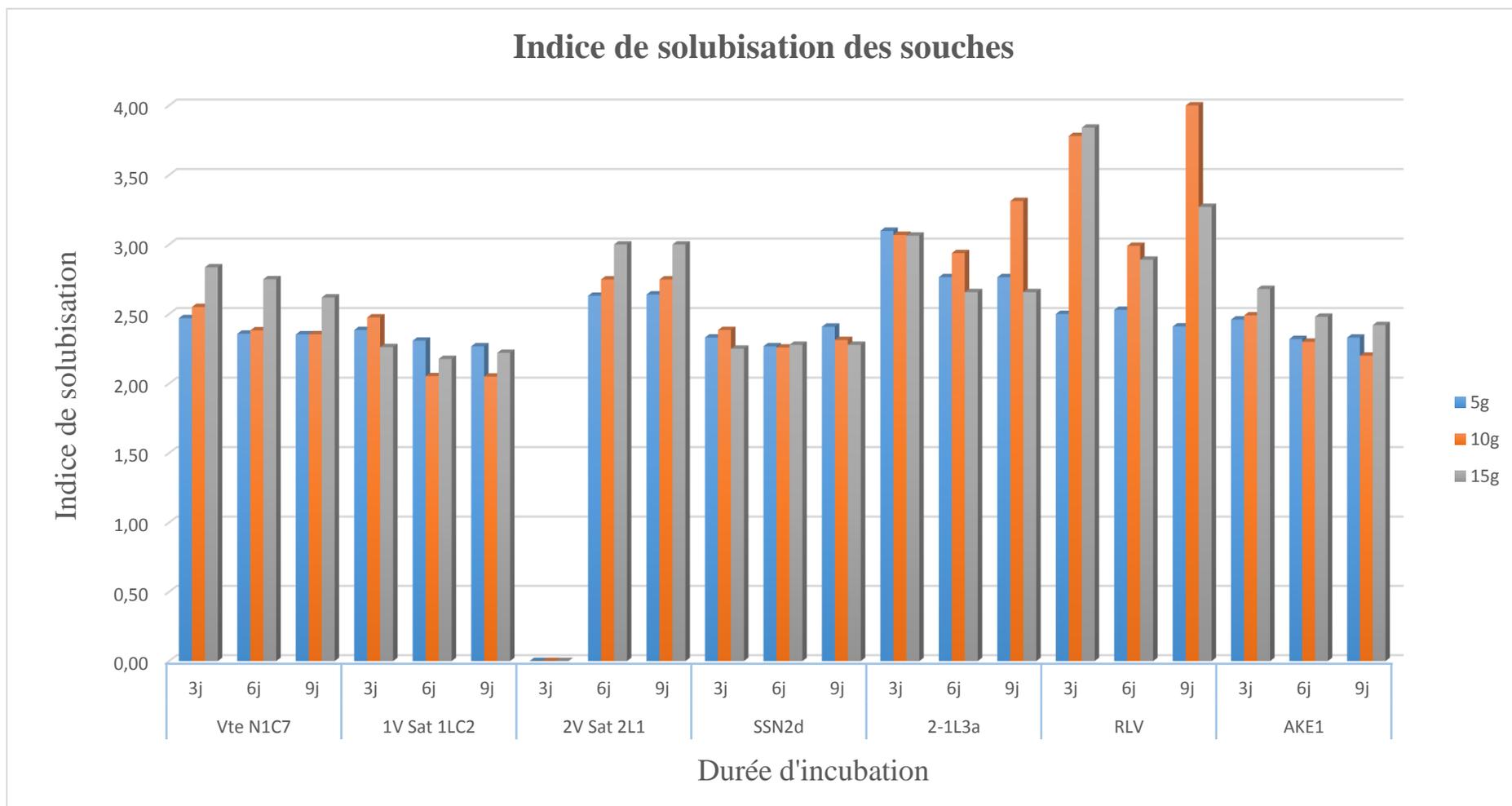


Figure 6 : Indice de solubilisation du phosphore par les souches étudiées

- Effet du temps d'incubation sur la solubilisation du phosphore

On peut lire à travers le diagramme (figure 7) que la durée d'incubation n'a pas d'influence sur la solubilisation de phosphore par les souches étudiées. On observe que pour la plupart des souches, l'indice de solubilisation reste stable ou diminue légèrement avec la prolongation du temps d'incubation. Ceci pourrait s'expliquer par l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture.

IV-3. Activité amylolytique

L'apparition d'un halo clair autour des colonies a été observée chez toutes les souches retenues, ceci dénote la présence d'une activité amylolytique (figure 8). Selon Forrest et al. (1991), l'activité amylolytique joue un rôle important dans la production de l'énergie nécessaire pour la fixation de l'azote dans les nodules.

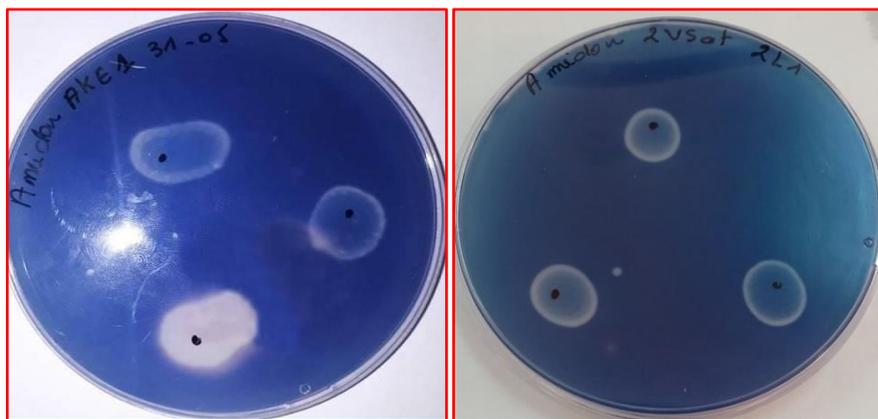


Figure 7 : Illustration de l'activité amylolytique chez les souches AKE1 et 2Vsat2L1

En comparant les diamètres des zones claires, nous constatons différents degrés de dégradation de l'amidon. En effet, les souches RLV et 2 1L3a ont une activité plutôt faible comparées aux autres souches (tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulation des résultats des tests enzymatiques.

Souches	SSN2d	RLV	2 1L3a	AKE1	1VSat 1LC2	2VSat 2L1	Vte N1C7
Activité amylolytique	+	+	+	+	+	+	+
Activité cellulolytique	-	+	-	-	+	-	-
Activité pectinolytique	+	+	+	+	-	+	-
Activité uréasique	+	+	+	+	+	+	+
Activité gélatinase	-	-	-	-	-	-	-

La présence de cette activité est d'une grande importance vue que l'amidon est un substrat peu coûteux comme seule source de carbone. Cette capacité à métaboliser ce substrat augmente le potentiel biotechnologique de ces souches, en réduisant les coûts de culture et ouvre de nouvelles possibilités aux applications des rhizobiums (Fernandes Júnior et al., 2012).

IV-4. Activité cellulolytique

Le test d'activité cellulolytique a permis de mettre en évidence la dégradation du carboxy-méthyl-cellulose chez deux souches (tableau 3). L'absence d'activité chez certaines souches serait liée à l'absence d'une source de carbone autre que la CMC. En effet, Chen et al. (2004) ont rapporté la présence d'une activité maximale dans des cultures contenant 0,5 % (p/v) de myo-inositol comme source de carbone pour la croissance. Par contre, les cultures contenant 0,5 % (p/v) de glucose comme source de carbone de croissance présentaient l'activité CMCase minimale.

Les cellulases bactériennes jouent un rôle essentiel dans le développement fongique, la dégradation des débris de plantes et l'inhibition de la germination des spores (Bhat, 2000).

IV-5. Activité pectinolytique

Après 05 minutes de l'addition du Lugol, un halo clair est observé autour des colonies indiquant une réaction positive chez la plupart des souches. Seules 1VSat 1LC2 et Vte N1C7 n'ont pas d'activité pectinolytique (tableau 3). Tan, (2014) a rapporté que seule une souche parmi les 5 testées a montré la capacité de produire de la pectinase.

IV-6. Activité uréasique

Parmi les enzymes du sol, l'uréase participe principalement à l'hydrolyse de l'urée en CO_2 et NH_3 , régulant le cycle de l'azote du sol.

Toutes les souches testées dans cette étude produisent une uréase sur milieu spécifique additionné d'urée, sa présence se manifeste par une alcalinisation du milieu, confirmé par l'observation du virage de couleur de l'orange claire au rose magenta (tableau 3). Ceci est en accord avec le constat de Jarvis et al. (1977) qui ont rapporté que les rhizobiums ont la capacité d'hydrolyser l'urée, cette activité est montrée par l'ajout de rouge de phénol comme indicateur de pH. une autre étude effectuée par Datta et al., (2015) à révéler aussi que parmi 4 souches, 3 ont montré la capacité de produire de l'uréase, ce qui concorde avec nos résultats.

IV-7. Activité gélatinase

Après l'ajout de la solution de sulfate d'ammonium, aucun changement n'a été observé ce qui signifie l'absence de l'enzyme gélatinase (tableau 3). Ce résultat est similaire avec celui rapporté par Hossain et al., (2019) ou les isolats testés dans son étude ont montré aussi un résultat négatif. D'après Hunter et al. (2007), l'absence de l'activité de la gélatinase est caractéristique des rhizobiums.

IV-8. Nitrate réductase

Parmi les 07 souches testées, seules 03 souches ont montré une activité réductrice des nitrates en nitrites. L'apparition d'une coloration rouge désigne la présence de NO_2^- issus de la réduction des NO_3^- .

Après l'ajout de la poudre de zinc aux 04 tubes qui n'ont pas présenté un changement de couleur, deux tubes ont montré cette fois un changement de couleur indiquant une réaction nitrate réductase négative et deux autres tubes restent inchangés, l'absence de la couleur rouge

signifie la disparition des nitrates dans le milieu, ils étaient donc réduits par ses 02 souches, au-delà du stade nitrite (N₂).

Tableau 4 : Résultat du test d'activité nitrate réductase

Souche	Résultat	
	Après ajout de NR1 et NR2	Après ajout de la poudre de zinc
SSN2d	+	
RLV	-	-
2 1L3a	+	
AKE1	-	+
1VSat 1LC2	-	+
2VSat 2L1	+	
Vte N1C7	-	-

Cette capacité de transformer les nitrates au-delà de stade nitrite permet la dépollution du sol des taux élevés de nitrate due à l'agriculture intensive et utilisation excessive des engrais azoté

La nitrate réductase est l'une des enzymes les plus importantes dans l'assimilation du nitrate exogène, la forme prédominante d'azote disponible pour les plantes (Srivastava, 1980), donc cette activité joue un rôle important dans la fertilisation des sols.

IV-9. Production d'acide indole acétique

L'apparence de la couleur rose dans les tubes après addition du révélateur de Salkawski indique la production de l'AIA, La figure 11 montre le virage de couleurs apparues sur les souches qui ont la capacité de produire l'AIA.

Après dosage et extrapolation sur la courbe d'étalonnage établie (annexe) nous constatons que toutes les souches ont montré la capacité de produire l'acide indole acétique, mais le taux varie d'une souche à une autre (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats de dosage de l'AIA

Souches	DO1 (nm)	DO2 (nm)	DO3 (nm)	Moyenne	[AIA](mg/l)
SSN2d	0,99	0,93	1,07	0,997	0,824
Vte N1C7	0,466	0,508	0,488	0,487	0,403
1 vsat 1LC2	0,605	0,75	0,84	0,732	0,605
2 vsat 2L1	0,297	0,276	0,28	0,284	0,235
AKE1	0,33	0,285	0,262	0,292	0,242
RLV	0,25	0,3	0,241	0,264	0,218
2 1L3a	0,31	0,318	0,294	0,307	0,254

Avec une production de 0,842 et 0,605 mg/l d'acide indole acétique, les souches SSN2d et 1vsat 1LC2 produisent les plus grandes quantités comparées aux autres souches

L'acide indole acétique (IAA) est une phytohormone qui joue un rôle central dans la croissance et le développement des plantes en tant que régulateur de nombreux processus biologiques (Ghosh et al., 2013).

Conclusion et perspectives

Conclusion

La fixation de l'azote par la symbiose Rhizobium-Légumineuses présente un intérêt économique et agronomique très important, en modérant l'utilisation des engrais azotés (nitrates) qui sont coûteux, polluants et nocifs pour la santé, et en augmentant le stock d'azote du sol pour produire un meilleur rendement agricole.

Notre travail a porté sur l'étude des différentes activités enzymatiques présentes chez les rhizobiums (activité cellulosique, amylolytique, uréasique, pectinolytique et la capacité de ses microorganismes symbiotiques à solubiliser le phosphore, à produire de la gélatinase, l'acide indole acétique et à réduire les nitrates. 35 souches de rhizobium ont été testés sur leurs potentiels à solubiliser le phosphore ou 20% se sont montrées positives pour cette activité, on a par la suite étudié l'effet de différentes concentrations du glucose et l'effet de la durée d'incubation sur le taux de solubilisation de phosphore.

Les souches qui se sont révélées positives ont été retenues afin d'étudier leurs activités enzymatiques. Les activités amylolytique et uréasique étaient présentes chez toutes les souches testées ce qui correspond à un taux de 100 %, tandis que pour l'activité pectinolytique et la réduction des nitrates en nitrite on constate un taux de 71%, et un taux de 28% pour l'activité cellulosique et une absence totale de la production de gélatinase. Toutes les souches ont été capables de produire l'acide indole acétique, SSN2d a le taux de production la plus élevée estimé à 0,824 mg /L.

En se basant sur les résultats obtenus, on conclut que les bactéries rhizosphériques (les rhizobiums) étudiées dans ce travail sont capables de produire différentes enzymes hydrolytiques d'une importance majeure dans de différents domaines industriels.

Toutefois, notre recherche n'a porté que sur quelques activités enzymatiques chez les rhizobiums, cette étude peut être plus approfondie et accomplie par d'autres tests incluant :

- La mise en évidence de la présence d'autres enzymes.
- Une évaluation quantitative des activités enzymatiques présentes chez ces souches.
- L'étude de l'activité antifongique et antibactérienne ;

- L'étude des méthodes d'optimisation de la croissance des souches de rhizobium a intérêt agronomique.

Bibliographie

Références bibliographiques

- Adnan, M., Shah, Z., Arif, M., Khan, M. J., Mian, I. A., Sharif, M., Alam, M., Basir, A., Ullah, H., Inayat-ur-Rahman, & Saleem, N. (2016). Impact of rhizobial inoculum and inorganic fertilizers on nutrients (NPK) availability and uptake in wheat crop. *Canadian Journal of Soil Science*, 96(2), 169-176. <https://doi.org/10.1139/cjss-2016-0012>.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria : Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research : Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>.
- Akhgar, A. R., Arzanlou, M., Bakker, P. A. H. M., & Hamidpour, M. (2014). Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase-Containing Pseudomonas spp. In the Rhizosphere of Salt-Stressed Canola. *Pedosphere*, 24(4), 461-468. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60032-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60032-1)
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). Chapter Two—How the Plant Growth-Promoting Bacterium Azospirillum Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. In D. L. Sparks (Éd.), *Advances in Agronomy* (Vol. 108, p. 77-136). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bazot, S. (2005). *Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récents dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne (Lolium perenne L.)* [These de doctorat, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL]. <http://www.theses.fr/2005INPL043N>
- Behera, P., Mahapatra, M., Seuylemezian, A., Vaishampayan, P., Ramana, V. V., Joseph, N., Joshi, A., Shouche, Y., Suar, M., Pattnaik, A. K., & Rastogi, G. (2018). Taxonomic description and draft genome of Pseudomonas sediminis sp. Nov., isolated from the rhizospheric sediment of Phragmites karka. *Journal of Microbiology*, 56(7), 458-466. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7549-x>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (RPCP) : Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1044-1051.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (RPCP) : Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Cassán, F., & Diaz-Zorita, M. (2016). Azospirillum sp. in current agriculture : From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>

- Catroux, G., Hartmann, A., & Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230(1), 21-30. <https://doi.org/10.1023/A:1004777115628>
- Curl, E. A., & Truelove, B. (2012). *The Rhizosphere*. Springer Science & Business Media.
- Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B., & Kausar, R. (s. d.). *Plant Growth Promoting Substances (Phytohormones) Produced by Rhizobacterial Strains Isolated from the Rhizosphere of Medicinal Plants*. 24, 7.
- Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017). Rhizobia : A potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62(5), 425-435. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0513-z>
- Davies, P. J. (Éd.). (2010). *Plant Hormones : Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (3^e éd.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>
- de Garcia Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2006). Role of Cytokinins in Plant Growth Promotion by Rhizosphere Bacteria. In Z. A. Siddiqui (Éd.), *RPCP: Biocontrol and Biofertilization* (p. 173-195). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_6
- Delas, J. (2000). *Fertilisation de la vigne*. Féret.
- Diels, L., van der Lelie, N., & Bastiaens, L. (2002). New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(1), 75-82. <https://doi.org/10.1023/A:1015188708612>
- Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2012). A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase. *PLOS ONE*, 7(7), e42149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042149>
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R., García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*, 2(3), 183-205. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.183>
- Giraud, E. (2007). Symbiose rhizobium/ légumineuse : Un nouveau sésame. *médecine/sciences*, 23(6-7), 663-666. <https://doi.org/10.1051/medsci/20072367663>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, e963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In P. A. H. M. Bakker, J. M. Raaijmakers, G. Bloemberg, M. Höfte, P. Lemanceau, & B. M. Cooke (Éds.), *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research* (p. 329-339). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_8
- Gupta, G., Parihar, S., Ahirwar, N., Snehi, Dr. S. K., & Singh, V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (RPCP) : Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial & Biochemical Technology*, 7, 096-102.
- Han, H. S., & Lee, K. D. (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *PLANT SOIL ENVIRON.*, 7.

- Hasan, M. (2018). EFFECT OF RHIZOBIUM INOCULATION WITH PHOSPHORUS AND NITROGEN FERTILIZER ON PHYSICO - CHEMICAL PROPERTIES OF THE GROUNDNUT SOIL. *Environment & Ecosystem Science*, 2(1), 4-6. <https://doi.org/10.26480/ees.01.2018.04.06>
- Hassan, M., McInroy, J., & Klopper, J. (2019). The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture*, 9, 142. <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>
- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Jadon, P., Dotaniya, C. K., Mohbe, S., Khandagle, A., & Singh, A. (2019). *CALCIUM: ESSENTIAL FOR PLANT GROWTH AND NUTRITION*. 4(2)2019, 1-4.
- Kang, J., Hwang, J.-U., Lee, M., Kim, Y.-Y., Assmann, S. M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2355-2360. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909222107>
- Krapp, A., & Castaings, L. (2012). Réponses des plantes à la disponibilité en azote. *Biologie Aujourd'hui*, 206(4), 323-335. <https://doi.org/10.1051/jbio/2012031>
- Kumar, P., & Dubey, R. C. (2012). Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of Phaseolus vulgaris L. *Journal of Current Perspectives in Applied Microbiology*, 1, 6-38.
- Liu, N., Shao, C., Sun, H., Liu, Z., Guan, Y., Wu, L., Zhang, L., Pan, X., Zhang, Z., Zhang, Y., & Zhang, B. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi biofertilizer improves American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) growth under the continuous cropping regime. *Geoderma*, 363, 114155. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114155>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lynch, J. M., Brimecombe, M. J., & De Leij, F. A. (2001). Rhizosphere. In John Wiley & Sons, Ltd (Éd.), *ELS* (p. a0000403). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000403>
- Ma, J. F. (2005). Plant Root Responses to Three Abundant Soil Minerals : Silicon, Aluminum and Iron. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(4), 267-281. <https://doi.org/10.1080/07352680500196017>
- Mackey, K. R. M., Rivlin, T., Grossman, A. R., Post, A. F., & Paytan, A. (2009). Picophytoplankton responses to changing nutrient and light regimes during a bloom. *Marine Biology*, 156(8), 1531-1546. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1185-2>
- Martínez-Molina, E., Morales, V., & Hubbell, D. (1980). Hydrolytic Enzyme Production by Rhizobium. *Applied and environmental microbiology*, 38, 1186-1188. <https://doi.org/10.1128/AEM.38.6.1186-1188.1979>
- Mateos, P. F., Jimenez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martinez-Molina, E., Hubbell, D. H., & Dazzo, F. B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes

in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1816-1822. <https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1816-1822.1992>

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome : Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>

Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheela, J., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (s. d.). *A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice*. 18.

Oliveira, A. N. de, Oliveira, L. A. de, Andrade, J. S., & Chagas Júnior, A. F. (2007). Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 208-216. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200005>

Ottow, J. C. G. (2011). Physiko-Chemie und Mikrobiologie der Rhizosphäre. In J. C. G. Ottow (Éd.), *Mikrobiologie von Böden : Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik* (p. 431-454). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00824-5_17

Prasad, R., & Shivay, Y. (2020). Calcium as a Plant Nutrient. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*, 11, i-iii. <https://doi.org/10.23910/1.2020.2075a>

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3), 597-635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>

Ren, S., Li, C., Jiao, X., Jia, S., Jiang, Y., Bilal, M., & Cui, J. (2019). Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications. *Chemical Engineering Journal*, 373, 1254-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.141>

Robinson, B. H., Anderson, C. W. N., & Dickinson, N. M. (2015). Phytoextraction : Where's the action? *Journal of Geochemical Exploration*, 151, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.01.001>

Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J. M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., & Mateos, P. F. (2008). *Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 7064. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802547105>

Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants : Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

Shridhar, B. S. (2012). *Review : Nitrogen Fixing Microorganisms*. 7.

Singh, P., & Sindhu, S. (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria : Influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3.

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>

- Sujatha, N., & Ammani, K. (2013). SIDEROPHORE PRODUCTION BY THE ISOLATES OF FLUORESCENT PSEUDOMONADS. *Undefined*. /paper/SIDEROPHORE-PRODUCTION-BY-THE-ISOLATES-OF-Sujatha-Ammani/6b4b706db9996c16d12aa71852721c4e31e55c3a
- Toffanin, A., Cadahia, E., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., & Palacios, J. (2002). Characterization of the urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Archives of Microbiology*, *177*(4), 290-298. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0392-0>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2013). Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant and Soil*, *368*(1-2), 87-99. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1589-0>
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology*, *132*(1), 44-51. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *52*(suppl_1), 487-511. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487
- Williams, L., & Salt, D. E. (2009). The plant ionome coming into focus. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(3), 247-249. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.009>
- Wu, S. C., Cheung, K. C., Luo, Y. M., & Wong, M. H. (2006). Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *140*(1), 124-135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.023>

Annexes

Annexes

Milieux cultures

Milieu YMA

Mannitol.....	10g
Extrait de levure	0.4g
Hydrogénophosphate de potassium.....	0.5g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Chlorure de sodium (Nacl).....	0.1g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	6.8

Milieu PVK

Glucose.....	10g
Sulfate d'ammonium.....	0.5g
Sulfate de magnésium.....	0.1g
Extrait de levure.....	0.5g
Chlorure de potassium.....	0.2g
Chlorure de sodium (Nacl).....	0.02g
Sulfate de fer.....	0.002g
Sulfate de manganèse.....	0.002g
Phosphate tricalcique.....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH	07

Milieu à base d'amidon

Amidon.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
Hydrogénophosphate de potassium.....	0.5g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Chlorure de sodium (NaCl).....	0.1g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH	07

Milieu à base d'urée

Mannitol.....	10g
L'urée.....	20g
Hydrogénophosphate de potassium.....	0.5g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Chlorure de sodium (NaCl).....	0.1g
Rouge phénol.....	0.012g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	07

Milieu NBRIY

Glucose.....	10g
Sulfate d'ammonium.....	0.5g
Sulfate de magnésium.....	0.1g
Chlorure de potassium.....	0.2g
Chlorure de sodium (NaCl).....	0.2g
Sulfate de fer.....	0.002g
Sulfate de manganèse.....	0.002g
Phosphate tricalcique.....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	07

Milieu à base de la cellulose

Hydrogénophosphate de potassium.....	0.5g
Sulfate de magnésium 7H ₂ O.....	0.2g
Chlorure de sodium (NaCl).....	0.1g
Extrait de levure.....	0.4g
Carboxy-méthyl cellulose.....	10g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	07

Milieu à base de pectine

Hydrogénophosphate de potassium.....	0.48g
Sulfate de magnésium 7H ₂ O.....	0.2g
Chlorure de sodium (NaCl).....	0.08g
Pectine.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	07

Milieu à base de gélatine

Peptone.....	5g
Extrait de viande.....	3g
Gélatine.....	4g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	07

Milieu LB

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Chlorure de sodium (NaCl).....	5g
Eau distillée.....	1000ml

Solutions de révélations

Solution tryptophane

Tryptophane.....	0.05g
Eau distillée.....	10ml

Solution d'Acide Indole Acétique

Dissoudre 100mg d'AIA dans 0.5ml d'éthanol 95°, Amener à 100ml de l'eau distillée.

Milieu Nitraté

Bouillon nitraté	25.5g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	07

Eau physiologique

Chlorure de sodium (NaCl).....	9g
Eau distillée.....	1000ml

Lugol

Iode.....	5g
Iodure de potassium.....	10g
Eau distillée.....	100ml

Réactif de salkowski

FeCl ₃	(0.5) 1 ml
Acide perchlorique.....	50 ml

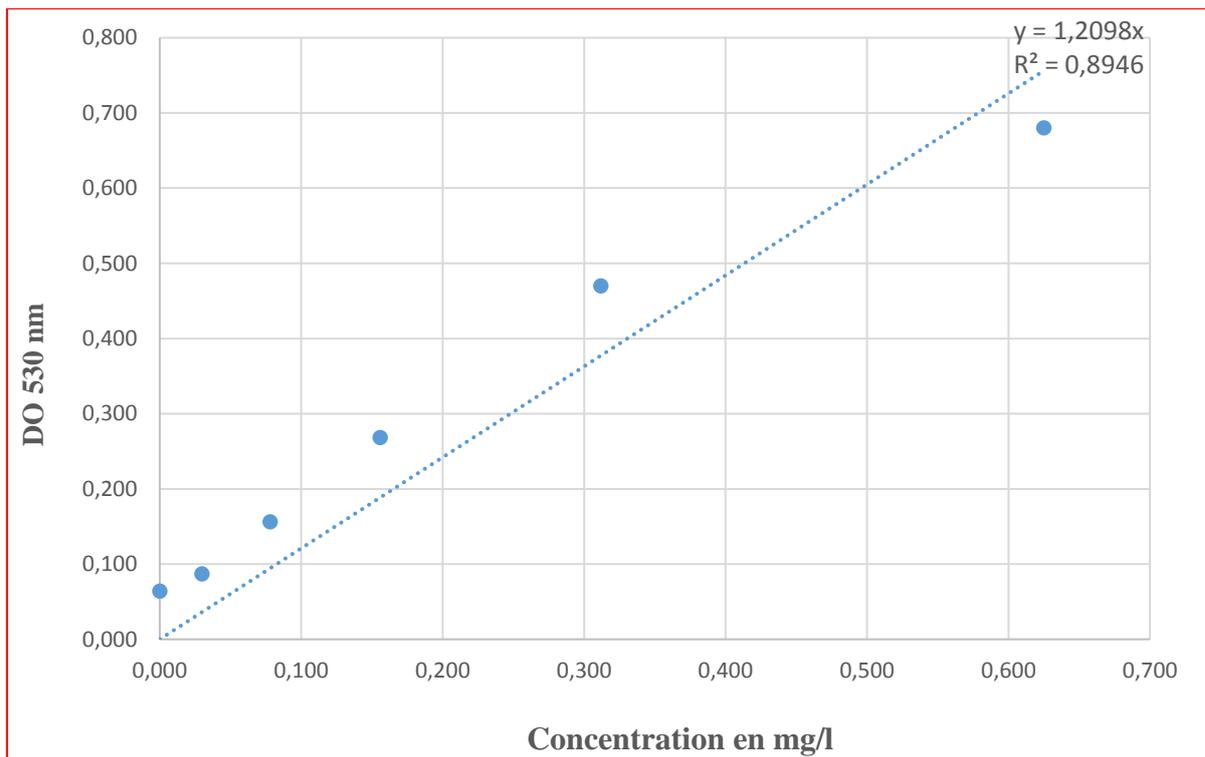
Réactif de rouge congo

Rouge Congo.....	0.1g
Eau distillée.....	100ml

Solution de Sulfate d'ammonium

Sulfate d'ammonium.....	12.5g
Eau distillée.....	25ml

Courbe d'étalonnage



Résumé

Les rhizobiums sont un groupe particulier de bactéries qui vivent en relation symbiotique avec des légumineuses et ils leur apportent de l'azote assimilable, en échange de substrat carboné. L'objectif de ce travail est de rechercher certaines activités biologiques chez des souches de rhizobium. 35 souches de rhizobium isolées de *Vicia sativa* et *Vicia faba* ont été étudiées pour mettre en évidence leurs aptitude à produire des enzymes comme l'amylase, cellulase, uréase, pectinase et gélatinase, mais aussi l'étude de la capacité des rhizobiums à solubiliser le phosphore, produire l'acide indole acétique et à réduire les nitrates.

Nos résultats ont montré que 20% des souches étudiées ont la capacité de solubiliser le phosphore sur milieu PVK et NBRIY. Elles présentent toutes une activité amylolytique et une activité uréasique. La majorité d'entre elles (71.43%) présentent également l'activité pectinolytique et sont réduisent les nitrates en nitrites. Seules 28.57% d'entre elles présentent l'activité cellulolytique.

Mots clés : Rhizobium, Activités enzymatiques, *Vicia faba*, *Vicia sativa*, Phosphore

Abstract

Rhizobia are a special group of bacteria that live in a symbiotic relationship with legumes and provide them assimilable nitrogen, in exchange for carbonaceous substrates. The objective of this work is to research certain biological activities in strains of rhizobia. 35 strains of rhizobium isolated from *Vicia sativa* et *Vicia faba* were studied to demonstrate their ability to produce enzymes such as amylase, cellulase, urease, pectinase and gelatinase, but also to study the ability of rhizobia to solubilize phosphorus, produce indole acetic acid and reduce nitrates.

Our results have shown that 20% of the strains studied have the capacity to solubilize phosphorus on PVK and NBRIY medium. They all exhibit amylolytic activity and urease activity. The majority of them (71.43%) also exhibit pectinolytic activity and are reduced nitrates to nitrites. Only 28.57% of them exhibit cellulolytic activity.

Key word: Rhizobium, enzymatic activities, *Vicia faba*, *Vicia sativa*, Phosphorus