الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الدكتور يحي فارس المدية

Université Docteur Yahia FARES Médéa

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté de Science de la Nature et de la Vie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement et caractérisation des bactéries du genre Acinetobacter de la rhizosphère d'orge et du blé

Présentées par :

Mlle MAMI Amina & Mlle FERHAT Khaoula

Soutenue le : 14 /07/2021 Devant le jury composé de :

Mme BOUHRAMA .A	MAA	Université de Médéa	**Encadreur**
Mr TEFFAHI .D	Laborantin	EPSP Ouled Aich	**Co-encadreur**
Mme BOUMEDIENE.F	MCB	Université de Médéa	**Présidente**
Mme DIF.S	MAA	Université de Médéa	**Examinatrice**

Année universitaire : 2020/2021

Dédicaces

Au nom de Dieu *le clément et le miséricordieux. Louange à dieu qui m'a aidé durant des années, éclairé et ouvert les portes du savoir*

C'est avec une profonde émotion que je dédie ce mémoire :

À mon cher père «Mohamed» *qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, que dieu le garde et le protège pour moi. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie, Merci pour ta confiance et tes encouragements.*

À ma très chère mère: BENAHMED Cherifa

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

À ma chère sœur «Bochra» *et son mari et notre petit prince qui va venir prochainement inchaalah, Merci pour être a mes coté, que Dieu vous préserve santé, bonheur et longue vie.*

À mes grands parents décédés, *Qu'Allah vous fasse miséricorde, et qu'Il vous pardonne, et qu'Il vous rétribue en bien.*

Un dédicace spéciale à ma grande mère décédée **« ZEROUK Fatma Zohra »** *grâce a tes Prières que je suis aujourd'hui là, Je ne t'oublierai jamais, repose en paix.*

À Toute la famille **MAMI** *et la famille* **BENAHMED.**

A ma chère binôme **« FERHAT Khaoula »**

À *ma moitié* **Bahia** *et* **toutes mes chères amies**, *avec qui j'ai partagé mes moments inoubliables.*

« Amina »

Dédicaces

A cœur vaillant rien d'impossible
A conscience tranquille tout est accessible
Quand il y a la soif d'apprendre
Tout vient à point à qui sait attendre
Quand il y a le souci de réaliser un dessein
Tout devient facile pour arriver à nos fins
Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés qui s'interposent
Souhaitant que le fruit de mes efforts fournis
Jour et nuit, me mènera vers le bonheur fleuri
Aujourd'hui, ici rassemblé auprès des jurys,
Je prie Dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance
Je dédie ce travail ...

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour
les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.
Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder la santé et le bonheur
A mes chers frères Younes , Oussama et ma chère sœurs Zineb .
Nos conseillers, et amis fidèles, qui m'ont assisté dans les moments difficiles.
A mes chères amies Amina, Soumia, loubna , Kaouter, Assia , ...
Avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, et nous sommes devenus une entité, une famille.

« Khaoula »

Remerciements

Nous aimerions en premier lieu remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force, la volonté, la patience et le courage durant ces longues années d'étude, pour accomplir ce travail modeste et d'avoir éclairé le chemin de la réussite.

En second lieu, nous remercions **nos parents** pour leur confiance, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel.

Un remerciement spécial pour notre encadreur **Mme BOUHRAMA Amina** qui nous a beaucoup aidé et retenue la longue de la rédaction de ce mémoire et qui nous a orienté avec ses conseils et surtout merci pour sa patience. Merci pour votre gentillesse, vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, soyez rassuré de notre profonde gratitude et notre respectueuse considération vos qualités scientifiques et humaines resteront à jamais pour nous l'exemple.

Nous tenons à remercier notre Co-encadreur **Mr TEFAHI Djamel** pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la pratique aussi pour son rigueur scientifique, sa disponibilité et ses qualités humaines nous ont profondément touchées.
Nos remerciements les plus chaleureux au présidente du jury, **Mme BOUMEDIENE.F** d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de juger et d'examiner ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements également au membre de jury; **Mme DIF.S** qui nous on honorés de leur présence et d'avoir consacré de leur temps afin d'évaluer ce travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous remercions également tout le personnel médical de laboratoire d'hygiène de BLIDA de nous avoir acceptée et facilitée le travail ; Ainsi à tous l'équipe de laboratoire de faculté des sciences d'université de Médéa.

On remercie également de tous nos cœurs tous les enseignants qui ont contribué à notre apprentissage depuis notre jeune âge à ce jour, et on leur adresse nos sentiments respectueusement reconnaissant pour tout le savoir qu'ils nous ont prodigués.

Enfin on remercie tous ceux qui ont contribué de près ou loin à l'aboutissement de ce modeste travail.

Encore une fois de plus merci

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Tableaux des antibiotiques	**28**
Tableau II	Résultat de la sensibilité des isolats testés aux différentes concentrations d'antibiotiques.	**40**
Tableau III	Résultats de la densité optique de test de PH à longueur d'onde 600.	**42**
Tableau IV	Résultats de la densité optique de test de la salinité à longueur d'onde 600.	**42**
Tableau V	Résultats de la densité optique de test de la sécheresse à longueur d'onde 600.	**43**
Tableau VI	L'estimation quantitative de la capacité de solubilisation des phosphates des 6 isolats.	**50**

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (D'après Lynch 1983).	**2**
Figure 2	Interactions pantes-bactéries au niveau du sol rhizosphérique (Khan et *al.*, 2009)	**6**
Figure 3	Structure générale des sidérophores citrate-hydroxamate (Gibson et Magrath, 1969).	**8**
Figure 4	Classification phylogénétique du genre *Acinetobacter*	**12**
Figure 5	Ultrastructure d'une *Acinetobacter baumannii* sous microscope électronique à transmission avec un grossissement de 43000 X (a) Structure des *Acinetobacter* groupées en paire (b) et en chaine (c).	**14**
Figure 6	Aspect morphologique des colonies d'Acinetobacter sur gélose nutritive (a) sur gélose macConkey (b), et sur gélose au sang (c).	**15**
Figure 7	Vue d'ensemble de la dynamique entre les patients, les bactéries appartenant au groupe ACB et l'environnement hospitalier	**17**
Figure 8	Taxonomie des céréales (Belitz H.D. et *al.*, 2019).	**19**
Figure 9	La production nationale de blé dure, blé tendre et orge (ONFAA, 2015).	**21**
Figure 10	Remplissage de la galerie API 20 E	**26**
Figure 11	Principe de technique de la mise en œuvre de la production de Cyanure d'hydrogène (HCN)	**32**
Figure 12	Morphologie générale des colonies obtenues après purification.	**36**
Figure 13	Observation microscopique à un grossissement x 100 après la coloration de Gram d'un isolat (15 OR2).	**35**
Figure 14	Aspect macroscopiques des colonies des bactéries du genre Acinetobacter sur Hektoen	**36**
Figure 15	Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase sur la souche 16(OR2)	**37**
Figure 16	Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase	**37**
Figure 17	Profil biochimique des bactéries du genre Acinetobacter	**38**
Figure 18	Aspect morphologique de l'isolat OR-15 incubés à différentes température	**41**
Figure 19	Résultat du test Amylase pour les isolats PR-4 (a), PR-12 (b) et OR-5 (c)	**44**
Figure 20	Diamètre du halo de dégradation (cm) obtenu par l'activité de l'enzyme amylase chez nos isolats.	**44**
Figure 21	Résultat du test Protéase pour les isolats PR-12 (a), OR-15 (b) et OR-16 (c).	**45**
Figure 22	Diamètre du halo de dégradation (cm) obtenu par l'activité de l'enzyme protéase chez nos isolats.	**46**
Figure 23	Résultat du test lipase pour les isolats PR-4 (a), PR-12 (b) et OR-5 (c).	**47**

Figure 24	Diamètre du halo de dégradation (cm) obtenu par l'activité de l'enzyme lipase chez nos isolats.	**47**
Figure 25	Résultat du test de la fixation d'azote pour les isolats OR-15 (a) OR-16 (b) et PR-7(c).	**49**
Figure 26	Le résultat du test de la solubilisation du phosphate pour l'isolat PR-4.	**49**
Figure 27	Résultats du test de Sidérophore pour l'isolat OR-15 (a), OR-5 (b) et PR-4 (c).	**51**
Figure 28	Résultat de test de Production HCN pour l'isolat PR-4.	**52**

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole Acétique

°C : Degrés Celsius

CAS : milieu Chrome Azurol Sulfate

CO_2 : Dioxyde de carbone

H : heure

HCN : le cyanure d'hydrogène

H_2O : eau

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

IS: l'indice de solubilisation

ISP : l'indice de solubilisation de phosphate

J : jour

K : potassium

KCL : Chlorure de potassium

KOH : Hydroxyde de potassium

M : Molaire

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

MSP : microorganismes solubilisant le phosphate.

NaCl : Chlorure de sodium.

NBRIP : le milieu de National Botanical Research Institute phosphate.

NH3 : Ammoniac

NH4 +: Ions Ammonium

nm: nanomètre

O_2: Oxygène

ONPG: Ortho-Nitro-Phényl-β-Galactoside

P : phosphore.

PEG : Polyéthylène Glycol

PGPB: Plant Growth Prometing Bacteria.

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PH: potentiel Hydrogène.

Sid : sidérophore.

TSB: Trypticase soja broth

UFC/ml : Unité Formant Colonie par millilitre

µl : microlitre

µm : micromètre

µg : micrograme

Résumé

Les microorganismes du sol peuvent être bénéfiques en affectant positivement la qualité du sol et la croissance des plantes. La diversité des communautés bactériennes rhizosphériques est influencée à la fois par le sol, sa composition, ses caractères physicochimiques, ainsi que par les exsudats racinaires produites par les plantes. Parmi cette grande diversité bactérienne, un groupe de bactéries communément appelé PGPR, « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » est capable de coloniser la rhizosphère des plantes et d'apporter un effet positif à leur croissance.

Dans le cadre d'une étude qui porte sur l'isolement et la caractérisation des bactéries du genre *Acinetobacter* de la rhizosphère d'orge et du blé, nous avons isolé et purifié 32 isolats à partir du sol rhizosphérique de l'orge et 48 isolats à partir du sol rhizosphérique du blé, les deux plantes ont été cultivé au niveau de la wilaya d'El Meneaa.

La caractérisation morphologique, phénotypique et biochimiques nous a permis de sélectionnées 6 isolats dont 3 isolats sont obtenus de la rhizosphère d'orge et 3 isolats obtenus de la rhizosphère du blé, et qui ont été considérer comme des *Acinetobacter* .spp.

Parmi les souches testées, 50% étaient capables de fixée l'azote moléculaire (N2), et 83% ont la capacité de solubiliser le phosphate tricalcique sur le milieu NBRIP et 100% étaient capable de produire le Sidérophore et 66% étaient capable de produire l'acide cyanhydrique.
Les isolats ont montré une tolérance modérée pour les tests physiologique et une activité enzymatique élevée, dans laquelle 83% possède l'enzyme amylase et 100%des isolats possède l'enzyme protéase et lipase par contre aucun isolat ne possède l'enzyme uréase.
Par ailleurs, L'étude de la sensibilité in vitro de ces bactéries vis-à-vis de 13 antibiotiques différents a révélé l'émergence de souches Acinetobacter multi résistantes aux antibiotiques testés.
L'ensemble des résultats obtenus ont montré que nos souches pourront être utilisées comme des PGPR dans le domaine de l'agriculture mais aussi dans les industries biotechnologiques par les utilisés comme des bio-fertilisants pour diminué l'utilisation des produits chimiques.

Mots-clés : PGPR, rhizosphère, Acinetobacter, caractérisation. El Menea

Abstract

Soil microorganisms can be beneficial by positively affecting soil quality and plant growth. The diversity of rhizospheric bacterial communities is influenced both by the soil, its composition, its physicochemical characteristics, as well as by the root exudates produced by plants. Among this great bacterial diversity, a group of bacteria commonly called PGPR, "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" is able to colonize the rhizosphere of plants and bring a positive effect to their growth.

Within the framework of a study on the isolation and characterization of bacteria of the genus Acinetobacter from the rhizosphere of barley and wheat, we isolated and purified 32 isolates from the rhizosphere soil of barley and 48 isolates from the rhizosphere soil of wheat, both plants were cultivated at the level of the wilaya of El Meneaa.

Morphological, phenotypic and biochemical characterization allowed us to select 6 isolates of which 3 isolates were obtained from barley rhizosphere and 3 isolates obtained from wheat rhizosphere, and which were considered as Acinetobacter .spp.

Among the tested strains, 50% were able to fix molecular nitrogen (N2), and 83% have the ability to solubilize tricalcium phosphate on NBRIP medium and 100% were able to produce Siderophore and 66% were able to produce hydrocyanic acid.

The isolates showed a moderate tolerance for physiological tests and a high enzymatic activity, in which 83% possessed the enzyme amylase and 100% of the isolates possessed the enzyme protease and lipase, however, no isolate possessed the enzyme urease.

Moreover, the study of the in vitro sensitivity of these bacteria towards 13 different antibiotics revealed the emergence of multi-resistant Acinetobacter strains to the tested antibiotics.

All the results obtained showed that our strains could be used as PGPR in the field of agriculture but also in biotechnological industries by using them as bio-fertilizers to decrease the use of chemical products.

Keywords: PGPR, rhizosphere, Acinetobacter, characterization. El Menea

ملخص

يمكن للكائنات الحية الدقيقة في التربة أن تكون مفيدة من خلال التأثير الإيجابي على جودة التربة ونمو النبات. يتأثر تنوع مجتمعات الجذور البكتيرية بالتربة ، وتكوينها ، وخصائصها الفيزيائية والكيميائية ، وكذلك بالإفرازات الجذرية التي تنتجها النباتات. من بين هذا التنوع البكتيري الكبير ، مجموعة من البكتيريا المعروفة باسم PGPR ، "البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات" ، قادرة على استعمار جذور النباتات ولها تأثير إيجابي على نموها.

في دراسة ركزت على عزل وتوصيف بكتيريا جنس Acinetobacter من جذور الشعير والقمح ، قمنا بعزل وتنقية 32 عزلة من تربة جذور الشعير و 48 عزلة من التربة الجذرية للقمح ،تم زرع النبتتين بولاية المنيعة.

سمح لنا التوصيف المورفولوجي والظاهري والكيميائي الحيوي باختيار 6 عزلات من بينها 3 عزلات تم الحصول عليها من جذر الشعير و 3 عزلات تم الحصول عليها من جذر القمح والتي تم اعتبارها على أنها Acinetobacter.

من بين السلالات التي تم اختبارها ، 50 ٪ كانت لهم القدرة على تثبيت النيتروجين الجزيئي (N2) ، و 83 ٪ كانت لهم القدرة على إذابة فوسفات ثلاثي الكالسيوم في وسط NBRIP و 100 ٪ كانت لهم القدرة على إنتاج Siderophore و 66 ٪ كانت لهم القدرة على إنتاج حمض الهيدروسيانيك.

أظهرت العزلات تحملاً معتدلاً للاختبارات الفسيولوجية ونشاط إنزيمي مرتفع ، حيث احتوت 83٪ من العزلات على إنزيم الأميليز و 100٪ من العزلات تحتوي على إنزيم البروتياز والليباز ، بينما لم يكن لدى أي من العزلات إنزيم اليورياز.

علاوة على ذلك ، كشفت دراسة الحساسية في المختبر لهذه البكتيريا لـ 13 مضادًا حيويًا مختلفًا عن ظهور سلالات Acinetobacterمقاومة للمضادات الحيوية المختبرة.

أظهرت جميع النتائج التي تم الحصول عليها أنه يمكن استخدام سلالاتنا كمواد PGPR في مجال الزراعة وأيضًا في صناعات التكنولوجيا الحيوية من خلال استخدامها كسماد حيوي لتقليل استخدام المواد الكيميائية.

الكلمات المفتاحية : PGPR ، الجذور ، Acinetobacter ، التوصيف. المنيعة.

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX
LISTE DES FIGURES
LISTE DES ABREVIATIONS
RESUME
ABSTRACT
SOMMAIRE
INTRODUCTION ……. 1
CHAPITRE I. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE…… 2
I. Rhizosphère ……..…..…… 2
1. Définition et structure ……..……..…..……. 2
2. Communauté bactérienne rhizosphérique ……...…….3
3. Les facteurs influençant la structure des communautés bactériennes…….……..3
4. Les bactéries promotrices de croissance des plantes……..……...6
II. Acinetobacter ……..……..…….11
1. Historique et taxonomie…….……11
2. Caractéristiques bactériologiques……..…….……..13
3. Pathogénicité d'Acinetobacter…….…….. 15
4. Effet bénéfique d'Acinetobacter pour les plantes ……..……. 18
III. Culture céréalière en Algérie ……19
1. Les céréales ……..……..……..……..……..……..…… 19
2. Production du blé et du l'orge en Algérie ……..……..……..……20
3. L'effet de la communauté microbienne sur la culture de l'orge et du blé ……... 21
CHAPITRE II. Matériels et méthodes ……...23
I. Matériels ……..……...23
1. Matériesl non biologique ……23
2. Matériels biologique ……..23
II. Méthodes……23
1. Isolement des bactéries du genre Acinetobacter spp……..23
2. Identification phénotypique……...24
3. L'étude de la sensibilité des bactéries d*'Acinetobacter* aux antibiotiques ……27
4. Caractérisation ……..28
4.1.Caractérisation physiologique……...…….....28
4.2. Caractérisation enzymatique ……..29
4.3. Caractérisation métabolique……31
CHAPITRE III. Résultats et discussion ……..……..……...34
1. Densité de la flore bactérienne rhizosphérique totale……..34

2. Sélection des bactéries du genre Acinetobacter …….35
2.1. Caractérisation morphologique……36
2.2. Caractérisation biochimique……36
3. Résistance aux antibiotiques ……39
4. Caractérisation ……...40
4.1. Caractérisation physiologique……..40
4.2. Activité enzymatique. ……..43
4.3.. Activité métabolique ……..48
Conclusion …….54
Références bibliographiques
Annexes

Introduction

Le sol est un environnement complexe abritant différentes populations de microorganismes ayant des particularités biologiques et biochimiques diverses. Parmi ces microorganismes, figurent des bactéries d'intérêt agricole (Diaw et *al.*, 2018) dites PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéria), synonyme de Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Ces bactéries arrivent à s'adapter facilement et s'associer avec plusieurs plantes et induisent des améliorations significatives des rendements (Benchabane et *al.*, 2012). En effet, elles peuvent stimuler la croissance des plantes et réduire d'éventuelles maladies causées par les agents pathogènes. (Rajkumar et *al.*,2010 ; Ma et *al.*, 2011).

En effet, l'intérêt bénéfique qu'elles présentent les PGPR constitue une importance majeure dans le développement de l'agriculture. L'utilisation des bactéries dans l'agriculture offre un bon rendement même dans des conditions sévères tel que la salinité et la sécheresse (Harish et al., 2009).

Une large variété de microorganismes est considérée comme des PGPR, appartiennent essentiellement aux genres : *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Klebsiella, Enterobacter, Bacillus*,…. (Kloepper et *al.*, 1989; Glick, 1995).Les bactéries appartenant au genre *Bacillus*sont les plus étudiées dans la recherche scientifique et les plus exploitées en agriculture. Elle sont très répandues dans la nature et représentent une proportion importante de la microflore (Kloepper et *al.*, 2004).

Au cours des dernières années, des membres du genre *Acinetobacter*qui ont été isolés de la rhizosphère de différentes plantes (RokhbakhshZamin et *al.*, 2011 ; Kuan et al., 2016) ont montré une forte capacité dans la promotion de la croissance des plantes (Huddedar et *al.*, 2002 ; Indiragandhi et *al*., 2008). Certaines souches de ce genre tel que *A.calcoaceticus*sont connues pour être impliquées dans la solubilisation du phosphate, d'autres (*A.johnsonii*) ont monté un impact sur la croissance des plantules et sur la capacité de leur système racinaire à absorber les nutriments minéraux et sont aussi capables de produire des sidérophores (*A.iwoffii*).

L'étude que nous avons mené consiste à étudier au niveau phénotypique des isolats bactériennes obtenues à partir du sol rhizosphériquedu l'orge et du blé, les deux plantes ont été cultivées dans la zone aride de la wilaya d'EL Menea afin de sélectionner parmi celles-ciles isolats appartient au genre *Acinetobacter*, et par la suite évaluer leur capacité comme étant des PGPR et les caractériser sur le plan physiologique.

Rappel Bibliographique

I. Rhizosphère

1. Définition et structure

Le terme rhizosphère a été décrit pour la première fois en 1904 par un chercheur allemand Lorenz Hiltner (Anton et *al.*, 2008). C'est un mot composé d'origine grec : " rhizo " ou" rhiza" signifiant" racine" et "sphère" qui veut dire « globe » ou « La zone du sol dans laquelle la microflore est influencée par les racines des plantes », donc rhizosphère peut être définit comme étant la fraction du sol qui entoure et englobe le système racinaire des plantes.

La rhizosphère est définie comme étant la zone du sol située près des racines et caractérisée par une activité microbiologique intense. C'est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micros et macronutriments du sol présent en quantité limitée. (Gholami et *al.*, 2012).

La rhizosphère peut être aussi divisée en plusieurs zones distinctes (Fig.1) : l'endorhizosphère (tissus racinaires), l'endoderme et les couches corticales, et inclue aussi la surface racinaire avec l'épiderme et les mucilages polysaccharidiques, et l'ectorhizosphère (Morgan et *al.*, 2005) qui est correspond au volume de sol colonisé ou potentiellement colonisable par les microorganismes (bactéries ou champignons) et influencé par ceux-ci.

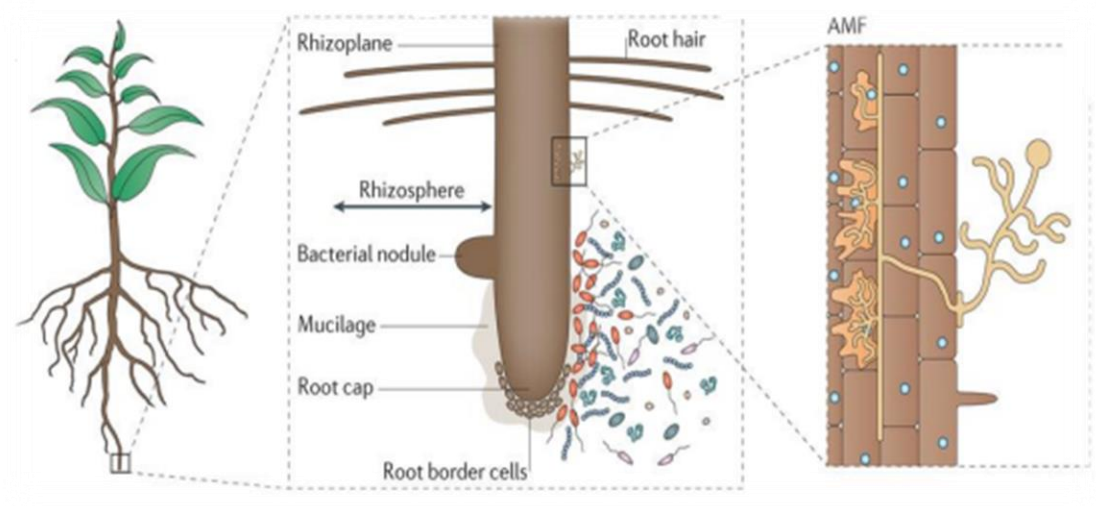


Figure1. Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (D'après Lynch 1983).

2. Communauté bactérienne rhizosphérique

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol. On compte les bactéries, les virus, les champignons, les protozoaires et les algues (Paul et Clark, 1996).

Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne 6.108 cellules par gramme de sol et un poids de 10000 $kg.ha^{-1}$ équivalant à 5% du poids sec des composés organiques du sol.

Les bactéries associées aux racines des plantes sont définies comme étant les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). Les échanges entre la plante et le sol sont influencés par les rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont élevées. Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère (Glick, 1995).

Un grand groupe des bactéries rhizosphèriques peuvent avoir un effet positif sur la plante car elles sont capables d'être des promotrices de la croissance des plantes (Vaeheron et *al.,* 2013).

La rhizosphère contient aussi des bactéries néfastes pour la plante, ce sont des bactéries pathogènes pour la plante et qui vont faire face à cette croissance, mais l'existence de l'interaction biologique de la rhizosphère va créer un centre réactionnel qui rend la vie du sol bénéfique pour la plante. (Bell, 2002). Les interactions multi trophiques plants-microorganismes forment une boucle de rétroaction à bénéfices réciproques à laquelle peuvent être assimilées les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère.

3. Les facteurs influençant la structure des communautés bactériennes

La structure d'une communauté bactérienne est soumise à des fluctuations temporelles et spatiales qui correspondent à des phases de colonisation de nouveaux milieux ou de remplacement d'une communauté par une autre plus adaptée**.** Beaucoup des paramètres interviennent pour modeler cette structure tant en termes de diversité que d'effectifs (Hassink, 1993, Borneman et Triplett, 1997).

Un certain nombre d'études ont toutefois permis d'identifier les facteurs présentant une influence marquée sur la structure des communautés bactériennes (Borneman *et al.,* 1996).

3.1. Facteurs liés au sol

La structure des communautés microbiennes est variable et dépendante de nombreux facteurs. En effet, nous savons que la structure des communautés bactériennes ainsi que sa composition peuvent varier considérablement suivant l'espace (Faugier, 2010). Plusieurs études ont montrées que la structure des communautés microbiennes dans le sol et leur distribution est liée aux caractéristiques des sols. Le pH peut influencer fortement la composition bactérienne, il est l'un des forts prédicateurs de la composition des communautés bactérienne et de leurs diversités, en effet une variation du pH du sol peut affecter sa composition en Acidobacteria et en Actinobacteria.

L'effet de l'eau comme facteur limitant des activités bactériennes est plus évident, surtout dans les sols désertiques que dans d'autres environnements (Killian et Fehèr, 1939). Selon Skujins (1986), la teneur en eau dans les sols désertiques n'a pas assez d'importance mais la grande importance est attachée au potentiel hydrique des sols. Ce dernier décrit essentiellement la force par laquelle l'eau est retenue dans le sol et l'énergie que les microorganismes devraient dépenser pour assimiler l'eau. En conséquence, la croissance microbienne des sols de désert peut se produire la plupart du temps à de plus basses températures coïncidant avec la disponibilité prolongée de l'eau (Skujins, 1986).

La texture constitue une importante caractéristique du sol, elle influence plusieurs aspects de son fonctionnement comme la quantité d'eau retenue par le sol, ses capacités d'échange d'électrolytes et de cations. Les sols à texture fine ont une faible aptitude à l'infiltration mais une grande capacité d'accumuler et de fournir de l'eau que les sols à texture grossière. La texture du sol agit aussi sur la distribution et l'activité des organismes du sol et sur leurs interactions (Lavelle et Spain, 2001). Par exemple, elle influence la survie des bactéries, en affectant leur niveau de protection contre les nématodes ou les protozoaires (Van Overbeek et Van Elsas, 1997). Hassink *et al.*,(1994) montrent que la pression de prédation des nématodes bactérivores sur les bactéries est plus élevée dans les sols sableux que dans les sols limoneux et argileux.

Les conditions climatiques et les variations saisonnières provoquent des fluctuations considérables dans la densité et l'activité des communautés microbiennes. Killian et Fehèr (1939) ont démontré que le nombre des bactéries a augmenté de 1,6 x104 jusqu' au 1.5 x 106 UFC par gramme de sol durant la période pluvieuse dans les sols désertique du grande Sahara algérien. De même, dans un sol oasien ou la teneur en eau dans le sol est élevée.

3.2. Facteurs liés à la plante

Dans un écosystème, la disponibilité des ressources nutritives est un facteur limitant. Il existe une forte relation entre le taux de carbone organique dissous et la composition des communautés bactériennes (Iribar, 2007). En effet au niveau de la rhizosphère, la quantité et la qualité des exsudats racinaire fournit par les plantes peuvent influencer fortement sa composition bactérienne, on parle de l'effet rhizosphère.

L'effet rhizosphère, décrit par Hiltner en 1904, suppose que de nombreux micro-organismes sont attirés par les nutriments (composés organiques) secrétés par les racines des plantes, et que sont utilisés par les micro-organismes comme source de carbone et d'énergie (Bais et *al.*, 2006 ; Jossi, 2008).

Les changements induits par les racines dans le sol environnant conduisent à l'adaptation des communautés bactériennes du sol et à la sélection des communautés spécifiques principalement constituées par les populations les plus compétentes (Gobat et *al.*, 2004).

Des observations scientifiques ont montré que beaucoup de plantes sélectionnent des groupes de microorganismes spécifiques via l'exsudation de composés dans la rhizosphère, qui représente une association positive où les plantes fournissent le carbone pour la croissance microbienne et les microorganismes en retour fournissent des éléments majeurs tels que l'azote et le phosphore, ainsi qu'une protection contre les attaques des pathogènes et parasites (Zoe et Cardon, 2007).

L'apport trophique racinaire influence la densité des populations bactériennes présentes dans la rhizosphère (environ 10^6 microorganismes par gramme de sol). En effet, Lynch et Whipps (1990), ont indiqué que les populations bactériennes présentes sur les racines et dans la rhizosphère sont plus abondantes (5 à 50 fois plus) que dans le reste du sol. La composition de ces populations rhizosphériques, pour un même sol, varie d'une plante à une autre, voire d'un cultivar à l'autre. Cet effet rhizosphère correspond à un recrutement de communautés microbiennes telluriques par la plante (Smalla *et al.*, 2000).

3.3. Facteurs liés à la composition microbienne

Les bactéries partagent la rhizosphère avec d'autres organismes et des microorganismes. Beaucoup de recherches ont montré l'existence de phénomène de la compétition entre les microorganismes du sol vis-à-vis les sources de nutriments et de l'habitat (Varma et *al.*, 2006).

De nombreux exemples montrent l'existence de tous ces types d'interactions entre les populations microbiennes dans les sols. Les champignons mycorhiziens arbusculaires communément appelés mycorhizes peuvent sécréter des substances qui ont un effet sélectif sur la communauté microbienne (Marschner et Timonen, 2005). Ainsi, leur colonisation peut influencer, le taux de

croissance et l'organisation bactérienne en modifiant, entre autres, le nombre de bactéries aérobiques dans la rhizosphère (Barea et *al*., 2002). L'inverse est également vrai. À titre d'exemple, la relation symbiotique entre *Azospirillum* et les champignons mycorhizes permet une amélioration de l'établissement de la bactérie dans la rhizosphère tout en favorisant la formation des mycorhizes (Barea et *al*., 2002).

Un autre exemple est l'inhibition des champignons pathogènes *Gaeumannomyces graminis* des racines du blé par Pseudomonas fluorescens, due à la production in situ d'antibiotique du type phénazine (Thomashow *et al.*, 1990) .

4. Bactéries promotrices de croissance des plantes

Les bactéries rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes, connue souvent dans le monde scientifique par l'appellation « PGPR », une abréviation anglaise de « Plant Growth Promoting Rhizobacteria », ce terme est attribué aux bactéries de la rhizosphère, qui interviennent dans la croissance et la santé des végétaux. Elles sont communément utilisées pour augmenter le rendement de diverses cultures (Bashan Y. et *al.*, 2008).

Les PGPR sont divisées en deux groupes pouvant stimuler la croissance des plantes de façon Directe et indirecte (Fig.2).

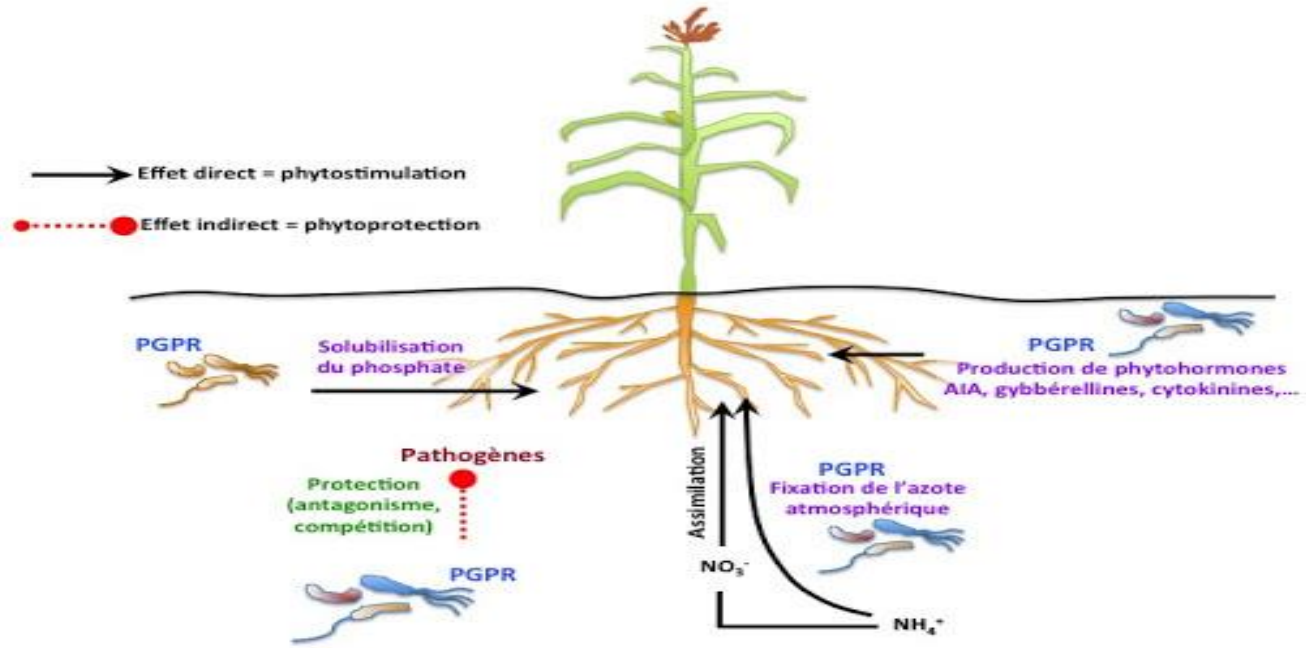


Figure2. Interactions pantes-bactéries au niveau du sol rhizosphérique (Khan et *al.*, 2009)

4.1. Effet directe des PGPR sur la plante

Les bactéries PGPR facilitent la croissance des plantes directement en aidant à l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétales (Munees et Mulugeta, 2014), Elles peuvent aussi augmenter la tolérance des plantes à divers stress tels les pesticides et le stress hydrique y compris la sécheresse (Cohenet *al.*, 2009).

4.1.1. Fixation d'azote

L'azote (N) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes. Bien qu'il y ait environ 78% de N2 dans l'atmosphère, il est indisponible pour les plantes en croissance. Le N2 atmosphérique est converti en formes utilisables par la plante par la fixation biologique de N2 par les bactéries en utilisant un système enzymatique complexe appelé nitrogénase (Kim et Rees, 1994).

Les bactéries fixatrices de l'azote ont la capacité de récupérer l'azote atmosphérique et de le fournir aux plantes par deux mécanismes: symbiotiques et non symbiotiques. La fixation d'azote symbiotique est une relation mutualiste entre une bactérie et la plante. La bactérie entre d'abord dans la racine et plus tard sur les nodules de forme dans lesquels se produit la fixation de l'azote. La rhizobie est un vaste groupe de rhizobactéries qui ont la capacité d'établir des interactions Symbiotiques par la colonisation et forme de nodules racines dans le végétale, dans le quelle l'azote est fixé à L'ammoniaque et le rendre disponible pour l'hôte (Munees et Mulugeta, 2014).

4.1.2. Solubilisation du phosphate

Le phosphore et le deuxième nutriment important limitant la croissance des plantes après l'azote, il est largement disponible dans le sol sous deux forme organique et inorganique (khan et *al.*, 2009). Il joue un rôle pratiquement important dans tous les processus métaboliques majeurs dans les plantes, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (Khan et *al.*, 2010). Les plantes sont incapables d'utiliser le phosphate car 95 à 99% de phosphate présents sous la forme insoluble, immobilisée et précipitée. Les plantes absorbent le phosphate uniquement sous deux formes solubles: les ions monobasique (H2PO4) et basique (HPO4 2) (Govind et *al.*, 2015). La solubilisation microbienne du phosphate joue un rôle important dans la conversion du P insoluble en P soluble. En effet, il a été démontré que certains microorganismes du sol sont impliqués dans la solubilisation des phosphates insolubles. Ces microorganismes bénéficient directement du P bio disponible nécessaire pour leur croissance. De même, d'autres organismes sont en mesure de profiter du P Solubilisé, tels que les champignons et les plantes supérieures. Notons que ces microorganismes produisent des acides organiques et relâchent des protons, qui à travers leurs groupements

carboxyliques, chélates les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles (Salma, 2015).

4.1.3. Production des sidérophores

Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (Neilands, 1995).Ces oligoéléments qui ont soumis une forte compétition, certains bactéries sont capable de séquestrer le fer du milieu environ de X molécule appeller sidérophores. Ces sidérophores se lient avec l'ion ferrique et forment un complexe Sidérophore-ferrique qui se lie ensuite avec des récepteurs dépendants de la suspension de fer à la surface de la cellule bactérienne. L'ion Ferrique est ensuite relâché et actif dans le cytoplasme comme ion ferreux. Beaucoup des plantes peuvent utiliser divers sidérophores bactériens comme sources de fer, beaucoup des bactéries productrices de sidérophores appartiennent aux genres *Bradyrhizobium, Pseudomonas, Rhizobium, Serratia* et Streptomyces de la rhizosphère (Kuffner et *al.*, 2008).Le Sidérophore le plus connu est l'aérobactine (Fig.3), isolée pour la première fois de *Aerobacteraerogenes* (Gibson et Magrath, 1969).

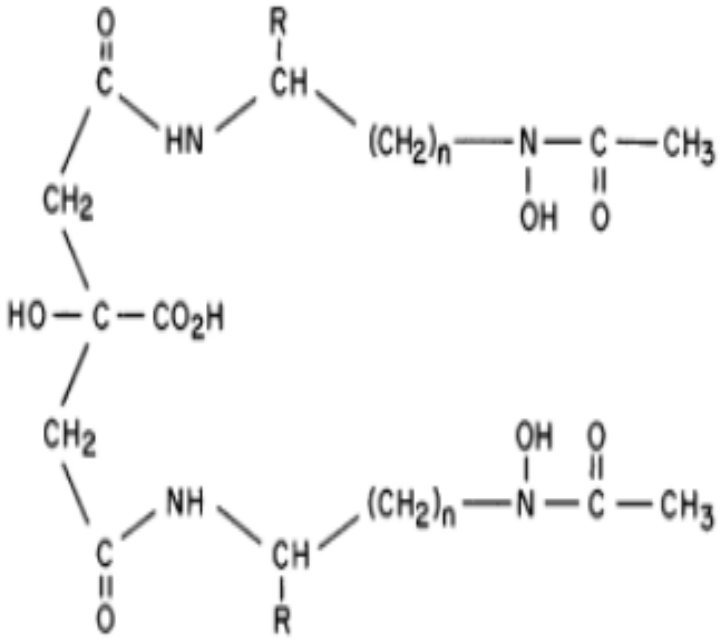


Figure3. Structure générale des sidérophores citrate-hydroxamate (Gibson et Magrath, 1969).

4.1.4. Acide Indole Acétique

L'acide indole acétique (IAA) représente l'une des hormones végétales les plus importantes, ce qui renforce de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes tout au long du cycle cellulaire de la plante, de la division cellulaire, de l'allongement cellulaire et de différenciation (Guilfoyle et *al.*, 1998). Généralement, IAA affecte la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales, Stimule la germination des semences 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 accidentelles, médiatise 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 à des conditions stressantes. En outre, l'IAA bactériennes augmentant la surface et la longueur de la racine et fournit ainsi à la plante un meilleur accès aux nutriments du sol. En outre, l'IAA rhizobactéries le dégage les parois cellulaires de la plante, et en conséquence facilite une augmentation de l'exsudation des racines qui fournit des nutriments supplémentaires pour soutenir la croissance des bactéries rhizosphériques (Glick, 2012). Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes. Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. Les poids des tiges et des racines des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (Cherif, 2014).

4.2. Effet indirect des PGPR sur les plantes

Le deuxième groupe bactérien, nommé bio contrôle-PGPB, ne stimule pas directement le métabolisme de la plante. Par contre, il influence indirectement la croissance de celle-ci par la prévention des effets causés par des phytopathogènes tels des bactéries, des mycètes, des nématodes et des virus (Bashan Y. et *al.*, 2008).

4.2.1. Productions des antibiotiques

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes de bio contrôle les plus puissants et les plus étudiés chez les PGPR. (Shilev, 2013) example d'antibiotiques produits par PGPR : l'acide phénazine-1-carboxyclique l'oomycineA, les rhamnolipides (Fernando et *al.*, 2005).

Secrété par le genre *Pseudomonas.* Ces antibiotiques sont connus pour posséder des activités antivirales, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-oxydantes, cytotoxiques, anti-tumorales et agissant également sur la croissance de plantes (Fernando et *al.*, 2005 ;Kim, 2012).

4.2.2. Induction d'un système de résistance

PGPR peut déclencher chez la plante un phénomène connue sous le nom d'induction de la résistance systémique qui est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise qui se produit lorsque la plante active ses mécanismes de défense en réponse à une infection par un agent pathogène (corné et *al.*, 2009).

Les plantes inoculées avec des PGPR peuvent également fournir une résistance systémique contre un large éventail des pathogènes végétaux, même les dommages causés par les insectes et les nématodes peuvent être réduits après l'application de PGPR (Naznin et *al.*, 2012) il confère à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un Phytopathogènes via la stimulation de mécanismes de défense systémique. Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par les microorganismes bénéficiaires (cherif ,2014).

4.2.3. Formation de biofilm

Parmi les communautés microbiennes du sol associées aux plantes, les bactéries bénéficiaires de colonisation des racines (rhizobactéries), connues sous le nom de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Lugtenberg et Kamilova, 2009) .Ils sont connus comme des groupes prédominants qui exercent des effets bénéfiques dans l'amélioration de la croissance des plantes. Ceci y compris par leur différent activités solubilisation du phosphate, production des antibiotique …etc. (Zehnder et *al.*, 2001). Les biofilms sont des communautés microbienne uni ou multi adhérentes aux surfaces biotiques ou abiotiques et / ou en contact intime l'une avec l'autre, enfermées dans une matrice autoproduite des substances polymères extracellulaires (EPS). Des biofilms moins complexes avec un nombre inférieur des cellules sont décrits de manière variable comme des microcolonies, des agrégats ou des grappes de cellules (Ramey et *al.*, 2004). La production de biofilm par PGPR reflète leur pouvoir de colonisation du système racinaire et est considéré comme une activité PGPR importante (Prescott ,2003).

II. Acinetobacter

1. Historique et taxonomie

L'histoire du genre *Acinetobacter* a débuté avec le microbiologiste néerlandais (Martinus Willem Beijerinck) qui a isolé en 1911, une souche bactérienne dénommée *Micrococcus calcoaceticus* à partir d'un prélèvement de sol enrichi dans un milieu minimum contenant l'acétate et le calcium (Beijerinck, 1911).

La caractérisation de cette souche a été poursuivie avec Brisou et Prévot en 1954, et le nom *Acinetobacter* a été proposé pour séparer les bactéries immobiles des bactéries mobiles du genre *Achromobacter* (Brisou and Prévot, 1954). Ce genre a regroupé une collection hétérogène des bactéries à Gram négatif, immobiles, à réaction d'oxydase négative ou positive. En 1971, suite aux travaux de Baumann et ses collaborateurs (Baumann et *al*., 1968), la sous-comité pour la taxonomie des *Moraxella* et ses bactéries apparentées a déclaré que le genre *Acinetobacter* devait inclure uniquement les espèces à oxydase négative. En 1984, le genre *Acinetobacter* a été officiellement inclus dans la taxonomie mondiale après son apparition sur la liste approuvée des espèces bactériennes (Approved Lists of Bacterial Names) et dans le manuel Bergey's de Bactériologie systématique (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Jung and Park, 2015). Cependant, une description détaillée des espèces appartenant à ce genre n'a pas été prévue avant 1986 où seules deux espèces ont été dénommées : *Acinetobacter calcocaceticus* pour les souches oxydant le glucose et *Acinetobacter lwoffii* pour les souches n'oxydant pas le glucose (Jung and Park, 2015; Seifert and Dijkshoorn, 2008).

La première étude taxonomique moderne du genre *Acinetobacter* a été réalisée par Bouvet et Grimont en 1986. Ils ont fourni une description de plusieurs espèces y compris *A baumannii, A haemolyticus, A johnsonii* et *A junii*et ont modifié la description de *Acalcoaceticus* et de *A lwoffii* en se basant sur des tests biochimiques, les besoins nutritifs des souches ainsi que sur des preuves d'hybridation ADN-ADN (Bouvet and Grimont, 1986). La taxonomie du genre *Acinetobacter* a ainsi été confuse en raison du manque de marqueurs biochimiques capables de distinguer les espèces bactériennes. Aussi, des désignations provisoires « espèces génomiques ou genomic species » ont été largement utilisées.

Le nom des espèces génomiques dérive du nom des auteurs par ex *Acinetobacter* genomic species 13TU a été proposé par Tjernberg et Ursing, Ac.gen.sp 13 TU a été proposé par Tjernberg et Ursing) (Seifert and Dijkshoorn, 2008). Plus tard, des travaux tentant de définir des espèces distinctes à partir des espèces génomiques ont été réalisés, et les noms validés

A bereziniae, *A guillouiae*, *A pittii*, et *A nosocomialis* ont été attribués aux espèces génomiques BJ10, BJ11, BJ3, et 13TU respectivement (Nemec et *al.*, 2010, 2011).

Depuis la description des premiers membres du genre *Acinetobacter*, plusieurs espèces ont été rapportées. Ce genre bactérien est formé actuellement de 71 espèces dont 53 portent des noms propres et officiels .Il convient de noter que la taxonomie de ce genre reste encore un défi aujourd'hui, surtout que les analyses phénotypiques utilisées en pratique courante dans les laboratoires de routine ne sont pas capables de détecter des différences minimes au niveau de certaines espèces (Peleg et *al.*, 2008). C'est le cas du complexe *A calcoaceticus-A baumannii* (Acb) qui comprend 6 espèces phénotypiquement très proches: *A baumannii, A pittii, A nosocomialis* et *A calcoaceticus* (Chan et *al.*, 2012) ainsi que les nouvelles espèces *A.seifertii* et *A.dijkshoorniae* (Cosgaya et *al.*, 2016; Nemec et *al.*, 2015). Récemment, les données du génome entier ont été incluses dans les analyses taxonomiques, et les chercheurs ont ainsi pu réussir à délimiter les espèces génomiques d'*Acinetobacter* (Fig.4). Cependant, l'application de ces données sans recours aux études phénotypiques n'a jamais été validée, ni acceptée.

Le genre *Acinetobacter* appartient actuellement au domaine des Bacteria, phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, ordre des Pseudomonodales et est classé dans la famille des Moraxellaceae (Doughari et *al.*, 2011) avec 57 espèces.

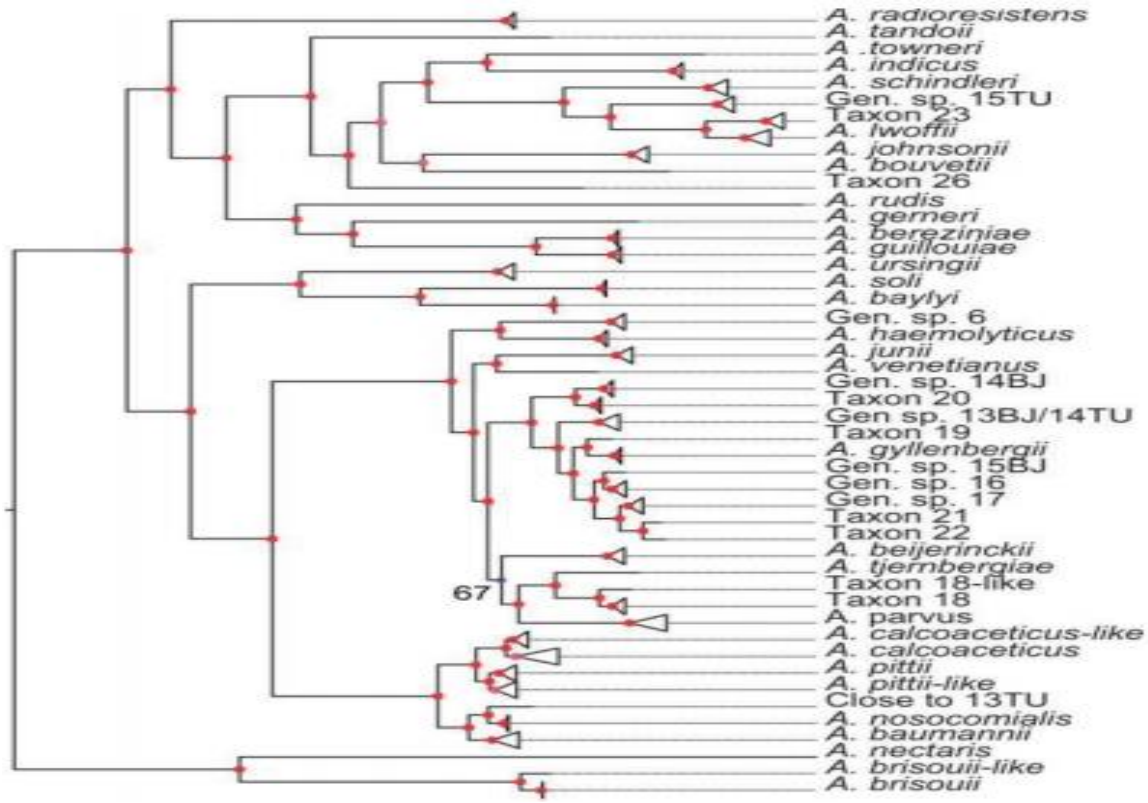


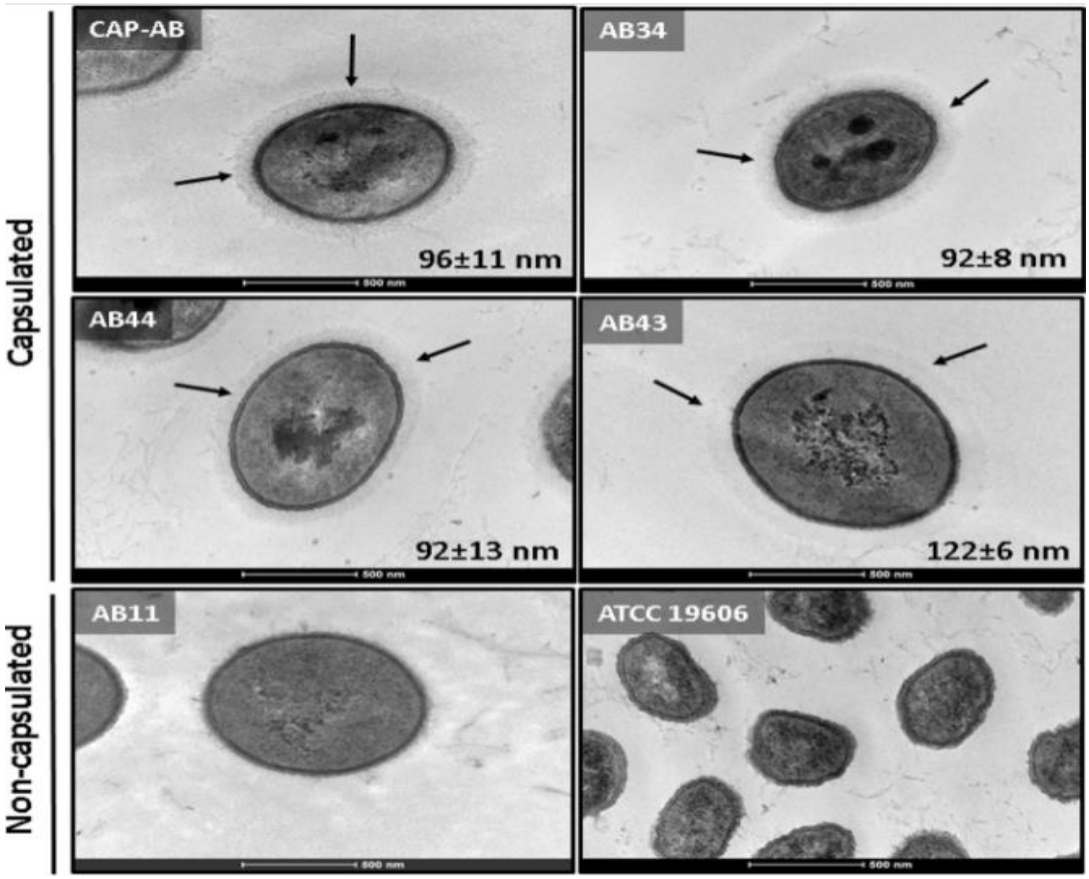
Figure 4. Classification phylogénétique du genre *Acinetobacter* basée sur l'alignement de séquences (950) des protéines appartenant au génome. (touchon et *al., 2014*) .

2. Caractéristiques bactériologiques

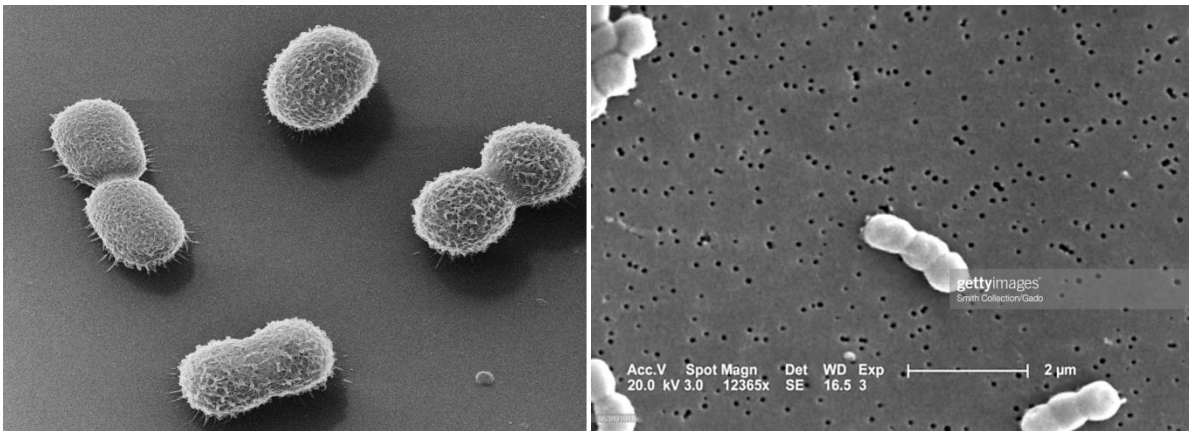
2.1. Caractéristiques morphologiques

Le genre *Acinetobacter* comprend des bacilles ou coccobacilles dont la structure de la paroi cellulaire est typique des bactéries Gram négatif. Cependant, ces bactéries résistent parfois à la décoloration de Gram en retenant le Crystal violet et peuvent donc être mal identifiées, comme des cocci Gram positif (Doughari et *al.*, 2011).

Ce sont des bactéries asporulées, parfois capsulées (Fig.5a), souvent groupées en paires(Fig.5b) mais aussi en chaînes (Fig.5c), de longueur variable. Dans la phase exponentielle de croissance, leur diamètre varie typiquement de 0,9 à 1,6µm et leur longueur de 1,5 à 2,5µm. Elles deviennent plus coccoides dans la phase stationnaire (Doughari et *al.*, 2011; Jung and Park, 2015). Bien que ces bactéries soient généralement considérées comme immobiles, une mobilité de type « mouvement par tremblement » ou « twitching motility » a été remarquée notamment sur des supports semi-solides (Roca et *al.*, 2012).



a



b **c**

Figure5. La structure d'une *Acinetobacter baumannii* sous microscope électronique à transmission avec un grossissement de 43000 X (a) Structure des *Acinetobacter* groupées en paire (b) et en chaine (c). (Matthew J. Arduino, DrPH, Janice Carr, Jana Swenson 2004)

2.2. Caractéristiques biochimiques

Les *Acinetobacter* sont des bactéries présentant des réactions de catalase positive et d'oxydase négative, et n'ont pas la capacité de métaboliser les sucres par les voies fermentaires (Kurcik-Trajkovska, 2010; Vaneechoutte et *al.*, 2011). Par ailleurs, la majorité des tests biochimiques utilisés habituellement en bactériologie clinique sont négatifs : indole, réduction des nitrates en nitrites, décarboxylase pour la lysine (LDC), décarboxylase pour l'ornithine (ODC), production d'hydrogène sulfuré (H2S), bêta-galactosidase et DNase. Les tests de l'Uréase, l'hydrolyse de la gélatine ou la phénylalanine désaminase (PAD) donnent quant à eux des réponses variables (Doughari et *al.*, 2011; Hawkey and Bergogne-Berezin, 2006).

2.3. Caractéristiques culturales

Les *Acinetobacter* sont des bactéries aérobies strictes, prototrophes, non fastidieuses, facilement cultivables sur la plupart des milieux ordinaires dans les laboratoires cliniques comme sur le milieu gélose nutritive (Fig.6a) et sur des milieux spécifique comme macConkey (Fig.6b) (Kurcik-Trajkovska, 2010). Aussi Sur gélose au sang (Fig.6c), les colonies apparaissent généralement non pigmentées, lisses ou muqueuses (lorsque la capsule est présente), opaques, de couleur blanche ou crémeuse, avec un diamètre de 1-2mm. Par ailleurs, certaines espèces n'appartenant pas au complexe *A.calcoaceticus -A.baumannii* présentent un caractère hémolytique (Bergogne-Bérézin, 2008).



a b c

Figure 6. Aspect morphologique des colonies d'*Acinetobacter* sur gélose nutritive (a) sur gélose macConkey (b), et sur gélose au sang (c).

Des milieux sélectifs ont été développés pour faciliter la détection des *Acinetobacter* comme par exemple le milieu Leeds Acinetobacter medium (LAM) commercialisé par Hardy Diagnostics (Etats-Unis) (colonies roses pour le genre *Acinetobacter*) ou encore le milieu CHROMagar commercialisé par Chromagar (France) (colonies rouges pour le genre *Acinetobacter*) (Ajao et *al.*, 2011; Jawad et *al.*, 1994). Enfin, certains milieux d'enrichissement minimum à base de l'acétate et de nitrate ont été utilisés pour faire pousser les *Acinetobacter* à partir de prélèvements environnementaux tels que l'eau ou encore le sol (Doughari et *al.*, 2011).

La plupart des espèces se multiplie bien à des températures d'incubation de 20 à 37°C, avec des températures optimales de croissance situées entre 33 et 35°C (Bergogne-Bérézin E, Towner K, Bouvet P, Grimont P). Les isolats cliniques d'*Acinetobacter* présentent une bonne croissance à une température de 37°C et certaines souches peuvent se développer à des températures élevées (Seifert and Dijkshoorn, 2008).

3. Pathogénicité d'Acinetobacter

Les infections nosocomiales sont des infections contractées dans un établissement de soins. Une infection est considérée comme telle lorsqu'elle était absente au moment de l'admission du patient, et elle apparaît après un délai de 48 heures d'hospitalisation.

Acinetobacter sont inscrites depuis 20 ans parmi les bactéries les plus redoutées des services de réanimation : ces bacilles à Gram négatif sont agents d'infections nosocomiales, sporadiques ou épidémiques. Chez des patients immunodéprimés, avec multiples facteurs de risque, ils sont responsables d'infections nosocomiales sévères. Ils ont développé des mécanismes de résistance

vis à vis d'antibiotiques majeurs : ces résistances sont source de difficiles problèmes thérapeutiques dans des infections telles que pneumopathies nosocomiales, septicémies, endocardites, méningites secondaires, infections chirurgicales.

Bien qu'un certain nombre des membres du genre *Acinetobacter*, tels que A. *haemolyticus*, A. *johnsonii*, A. *junii*, A. *lwoffii*, A. *radioresistens* et A. *parvus*, ait été isolé à partir de spécimens cliniques (Nemec et *al.*, 2003), seul *Acinetobacter baumannii* est un agent pathogène (Joly-Guillou, 2005).

Dès les années 1980, *A.baumannii* a été reconnu comme un important agent bactérien responsable d'infections nosocomiales. L'émergence d'infections à *A.baumannii* (Fig.7) en milieu hospitalier est corrélée avec l'introduction de nouveaux antibiotiques à large spectre ainsi qu'au développement des techniques invasives d'exploration et de réanimation (Boukhalfa, 2014)

Une enquête de surveillance des épidémies nosocomiales, réalisée dans 289 hôpitaux américains durant une période de deux années (2008-2009), a démontré qu'Acinetobacter.spp était identifié comme agent de 40 épidémies (13.7 %) (Rhinehart et *al.*, 2012).

Les principaux facteurs de risque liés à une infection/colonisation à *A.baumannii* sont :

- Facteurs liés à un environnement hospitalier contaminé par le micro-organisme.
- Facteurs liés au malade : une hospitalisation en service de soins intensifs, une intervention chirurgicale lourde, une pathologie sous-jacente grave (cancer, brûlures, immunodépression, traumatisme), un âge avancé plus de 50 ans, prématurité, une maladie pulmonaire chronique, des procédures invasives, la ventilation mécanique, une durée d'hospitalisation prolongée.
- Le rôle de la pression de sélection des antibiotiques (céphalosporines de troisième génération, fluoroquinolones, ou carbapénèmes) (Bergogne-Bérézin, 2008.)

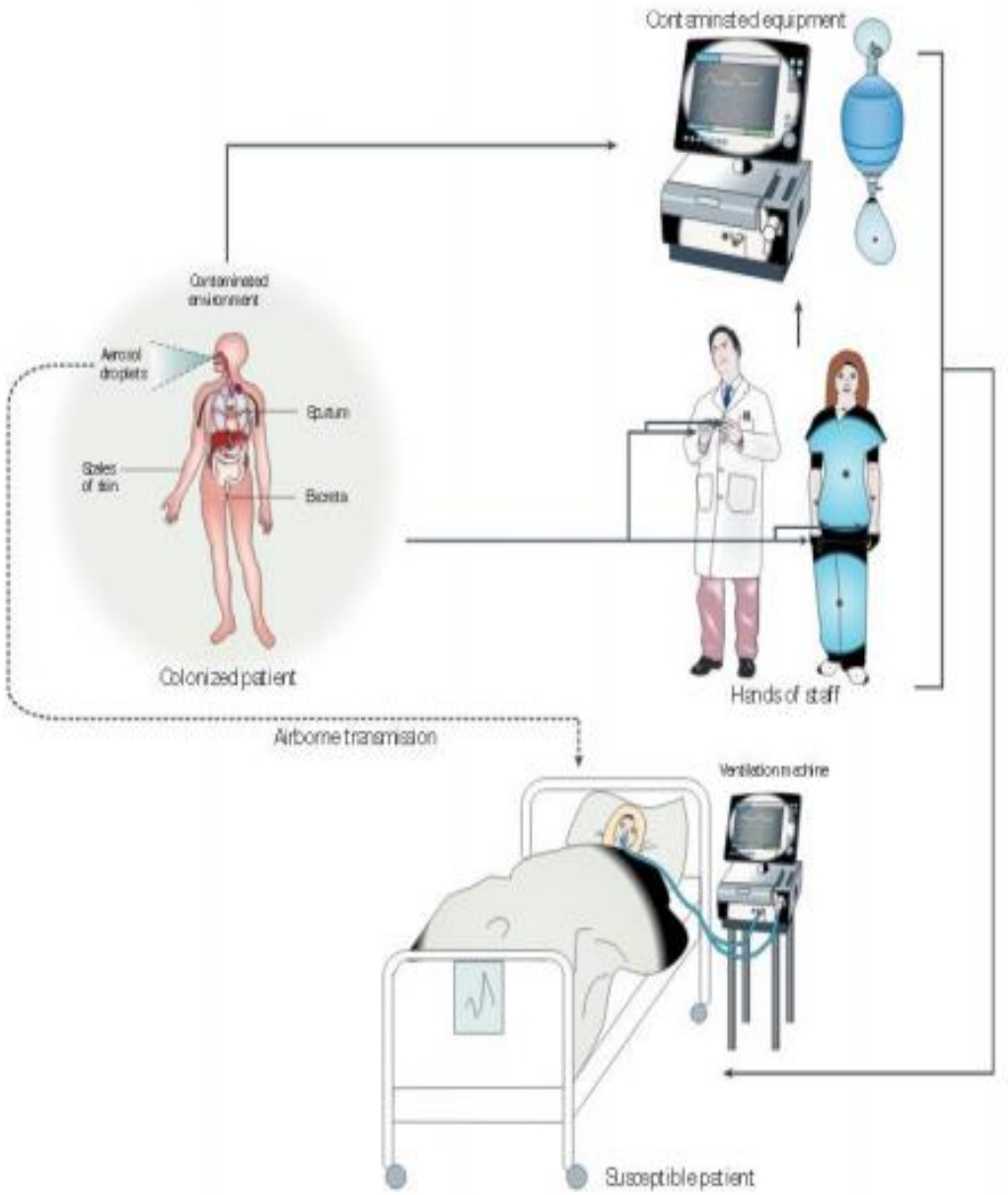


Figure 7. Vue d'ensemble de la dynamique entre les patients, les bactéries appartenant au groupe ACB et l'environnement hospitalier (Dijkshoorn et *al.*, 2007)

4. Effet bénéfique d'Acinetobacter pour les plantes

Plusieurs genres bactériens peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter, Arthrobacter, Azospirillum, Pseudomonas, Bacillus, Acinetobacter, Flavobacterium, Micrococcus, Agrobacterium, Clostridium, Burkholderia,* et *Xanthomonas* (Mitter et al., 2002; Tsakelova et *al.,* 2006; Joo et *al.,* 2009).

Le genre *Acinetobacter* englobe des multiples pathogènes opportunistes nosocomiaux qui présentent un intérêt croissant à l'échelle mondiale en raison de leur capacité à survivre à l'exposition à divers agents antimicrobiens et de stérilisation. Parmi eux, *Acinetobacter baumannii* et *Acinetobacter pittii* sont les plus fréquemment isolés dans les hôpitaux du monde entier. Malgré son effet néfaste pour la santé humaine le genre *Acinetobacter* joue un rôle important dans la promotion de la croissance des plantes, au cours des dernières années les membres du genre *Acinetobacter* qui ont été isolés de la rhizosphère de différentes plantes ont montrées un effet bénéfique sur la promotion de la croissance des plantes. (Rokhbakhsh Zamin et *al.,* 2011 ; Kuan et *al.,* 2016).

Certaines souches de ce genre sont connues pour être impliquées dans la photostumulation qui est basé sur la production d'hormones qui favorisent la croissance des plantes (Huddedar et *al.,* 2002), et la production des sidérophores (Sarode Prashant et *al.,*2009).

D'autres souches d'*Acinetobacter* présentent une activité PGPR indirecte via la suppression de la croissance des champignons phytopathogènes. Tel que *Cryphonectriaparasitica*, *Phytophthora capsici*, et *Rhizoctonia solani,* aussi des propriétés potentielles de bio contrôle contre les bactéries pathogènes telles que *Ralstonia solanacearum*. (Bashan, Y. and G. Holguin. 1998.)

Par ailleurs, il existe des preuves qu'*Acinetobacter johnsonii* affecte sur la croissance des plantules et sur la capacité de leur système racinaire à absorber les nutriments minéraux. dans laquelle l'inoculation des graines de betterave à sucre avec la souche d'Acinetobacter *johnsonii* a permis d'augmenter significativement la teneur en sucre qui a été analysée.

La croissance peut également être améliorée par la capacité de la souche *Acinetobacter johnsonii* à solubiliser le phosphate, Le phosphore est très important pour la croissance et le développement normal des plantes.

III. Culture céréalière en Algérie

1. Les céréales

Les céréales sont un groupe des plantes cultivées appartenant à la famille des Poacées appelées ‹ graminées ›. Il existe trois grands groupes des céréales (Guignard et *al.*, 2004) (Fig.8). Le premier groupe est formé par le blé, l'orge, le seigle et l'avoine. Le deuxième groupe renferme le maïs, et le troisième groupe ordonné autour du riz (Alais et *al.*, 2003).

Dans le règne végétal, les céréales appartient au groupe spermaphytes aux sous groupe des angiospermes à la classe des monocotylédones à l'ordre des glumoflorales à la famille des graminées.

Dans la famille de la graminée il existe un grand nombre de genres Genre: *Triticum* : Espèce: *durum* (blé dur), Espèce : *vulgare* (blé tendre) Genre : *Hordeum* : Espèces: *hexasticum* (orge à six rangs), Espèce: *disticum* (orge à deux rangs) Cette classification en genre, espèce et variété correspond à des caractères spécifiques bien définis (Girignac P, 1996).

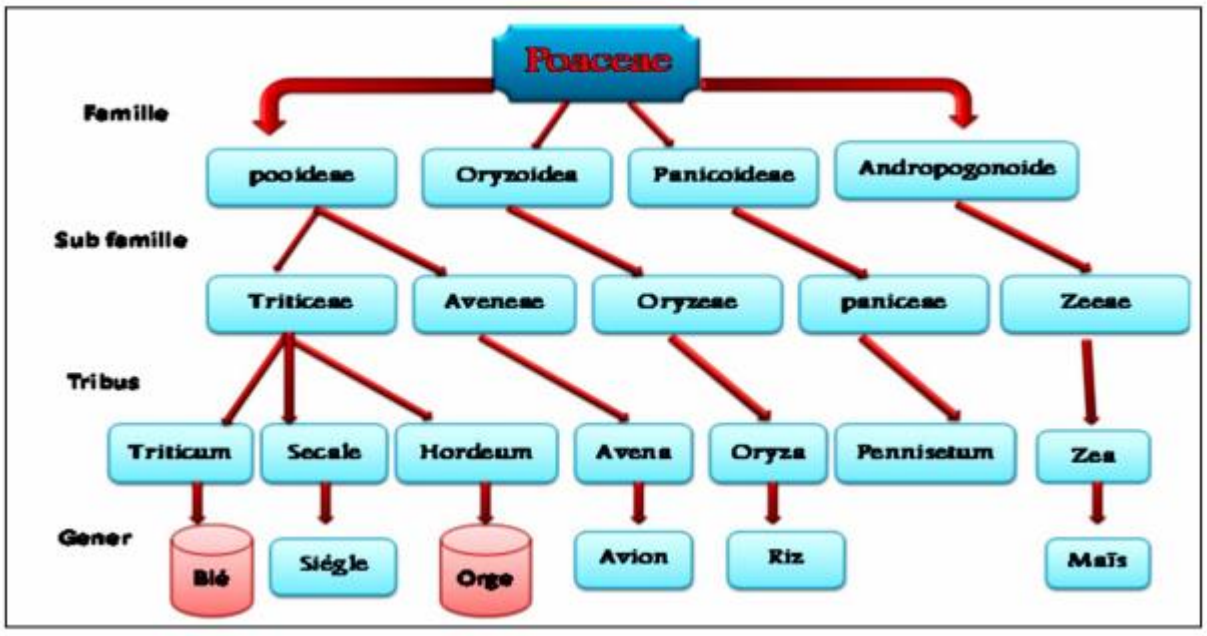


Figure 8. Taxonomie des céréales (Belitz H.D. et *al.*, 2019).

1.1. Le blé

Le blé est une plante annuelle herbacée, monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des graminées ou *Poaceae*. Aujourd'hui, deux espèces dominent la production mondiale, il s'agit du blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*). La production de blé est facile car il s'adapte à des sols et des climats variés. L'existence de variétés adaptées à différents milieux et résistantes à de nombreuses maladies permet de cultiver le blé dans de nombreux pays. Il existe des blés d'hiver et des blés de printemps, leurs périodes de plantation et de récoltes dans l'année sont différentes. Plus de vingt mille variétés de blé existent et des centaines de nouvelles sont crées chaque année (Anne-Laure, 2007).

1.2. L'orge

L'orge (*Hordeum vulgare L.*) est à côté du blé, du maïs et du riz, l'une des céréales les plus importantes dans le monde, étant classé au quatrième rang des céréales pour la production des grains avec 38% maïs, 29% blé, 20% riz et 6% d'orge (USDA, 2010/2011). L'orge est un aliment important dans plusieurs régions du monde telles que l'Afrique du Nord, le proche Orient, l'Asie, etc. La consommation moyenne et annuelle par personne dans ces régions varie entre 2 à 36 kg (EL-Haramein et Grando, 2010).

Dans les rapports historiques et archéologiques, l'orge est référée comme une source de santé, de force et d'énergie pour les athlètes et les ouvriers manuels. Les bénéfices sur la santé et les aspects médicaux des aliments à base d'orge font référence à la littérature Arabe, Chinoise, Egyptienne et Grèce ancienne, et ont été signalés par des civilisations plus récentes de l'Asie jusqu'en Europe (A.Chardouh.1999)

A l'échelle mondiale et par ordre d'importance, l'orge est utilisée en alimentation du bétail, pour le maltage (notamment en brasserie) et en alimentation humaine. Dans les régions tropicales et subtropicales.

2. Production du blé et du l'orge en Algérie

Les céréales constituent la base alimentent aire des algériens ; la majorité des calories proviennent essentiellement des céréales chaque algérien consomme en moyen annuellement sous divers formes 207 kg de blé (pain. Couscous, pates etc.) (Cimmmyt, 1991)

La culture de l'orge et du blé est pratiquée essentiellement sur les hautes plaines, en Algérie , Les superficies qui lui sont consacrées varient d'une année à l'autre avec une moyenne, sur plus d'un siècle (1901-2005), de I million d'hectares, une production moyenne variant de 3 à 16 millions quintaux et une moyenne de rendement en grain de 7 q/ha. Parmi les pays du Maghreb, l'Algérie

se classe en seconde position après le Maroc, qui produit plus de 16 millions de quintaux en moyenne (Faostat, 2008). L'orge et le blé sont des espèces très adaptée aux systèmes de cultures pratiqués en zones sèches. Cette adaptation est liée à un cycle de développement plus court et à une meilleure vitesse de croissance en début du cycle (Abbas et Abdelguerfi, 2008). Le total de la production nationale des céréales est de 3,6 millions de tonnes (Fig.9), soit 2 millions de tonnes de blé dur, 1 million de tonnes d'orge et 6361849 tonnes de blé tendre. Quinze (15) wilayas (Chlef, O.E.Bouaghi, Bouira, Tlemcen, Tiaret, S.B.Abbes, Guelma, Constantine, Medea, Mascara, Souk-Ahras, Mila, Ain-Defla, A.Temouchent, Relizane) ont enregistré une production dépassant la barre d'1 million de quintaux, (ONFAA, 2015).

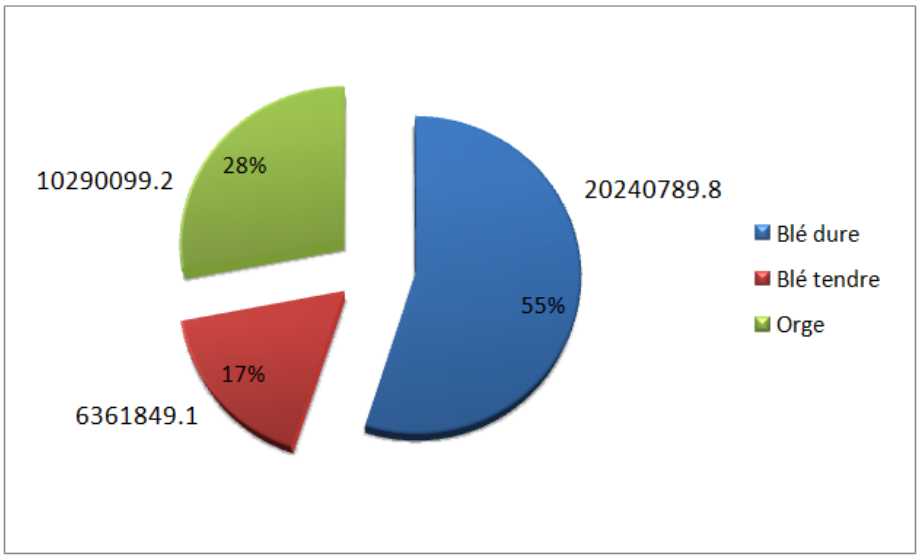


Figure9. La production nationale de blé dure, blé tendre et orge (ONFAA, 2015).

3. L'effet de la communauté microbienne sur la culture de l'orge et du blé

Les plantes terrestres hébergent des communautés microbiennes riches et diverses dans la fine couche de sol adhérant aux racines, c'est-à-dire la rhizosphère, et dans les tissus des racines, endophytes racinaires (Bulgarelli et *al.*, 2013). Les racines sécrètent une pléthore de composés organiques dérivés de la photosynthèse dans la rhizosphère (Dakora et Phillips, 2002). Ce processus, connu sous le nom de rhizodéposition, a été proposé comme le mécanisme principal qui permet aux plantes de maintenir leur microbiote (Jones et *al.*, 2009). À leur tour, les membres de la rhizosphère et du microbiote racinaire fournissent des services bénéfiques à leur hôte, comme la protection indirecte des agents pathogènes et l'augmentation de l'apport minéral du sol environnant pour la croissance des plantes (Bulgarelli et *al.*, 2013).

L'utilisation de PGPR est une méthode agricole prometteuse pour aider les cultures affectées par le sel à maintenir un niveau acceptable d'humidité et productivité sous des concentrations de sel

plus élevées (Nadeem et *al.*, 2012 ; Singh et *al.*, 2011). L'amélioration des effets négatifs du stress salin par différentes rhizobactéries sur plusieurs cultures est examinée par Paul et Lade (2014).

L'orge (*Hordeum vulgare L.*) et le blé font partie des cultures les plus répandues dans le monde et les plus tolérantes au sel. À notre connaissance, peu d'études ont été réalisées sur la promotion de la croissance des plantes par les PGPR sur l'orge (*H. vulgare L.)* (Omar et *al.*, 2009 ; Chang et *al.*, 2014 ; Hmaeid et *al.*, 2014 ; Nabti et *al.*, 2014), probablement en raison de sa tolérance naturelle au sel par rapport à d'autres cultures agricoles telles que le soja, la tomate et le riz. Par conséquent, la recherche croissante sur les souches de PGPR pour améliorer le stress salin des plantes sur l'orge aidera à améliorer sa tolérance naturelle dans les champs et aussi à améliorer la qualité de l'eau (Chang et *al.*, 2014).

Matériels et Méthodes

I. Matériels

1. Matériels non biologique

Durant notre travail réalisé nous avons utilisés des appareils (Annexe 1), des solutions (Annexe 2) et des milieux de culture (Annexe 3).

2. Matériels biologique

2.1. Matériels végétale

Pour la réalisation de notre étude nous avons choisi deux cultures, il s'agit de l'orge commune (*Hordeum vulgare* L.) et le blé tendre

Les deux plantes ont été cultivées au niveau de la station expérimentale de l'université des Sciences et de la technologie, Houari Boumediene, situé au niveau de l'Oasis de la wilaya d'El Menéa-Algérie (30°37'00.8"N, 2°52'47.0"E). Les parcelles retenues pour cette étude ont été cultivées pour une durée de 4 mois (Novembre-Février 2020).

Après 4 mois de culture, un échantionnage a été réalisé au niveau de chaque parcelle. 5 échantillons biologiques ont été collectées en évitant d'endommager leur système racinaire et de perdre le sol qui adhère à leurs racines et puis placés dans des sacs en polyéthylène stériles et transporté au laboratoire dans les conditions de froid (4°C).

2.2. Sol rhizosphérique

Les racines des plantes ont été coupées et placées dans des tubes Corning contenant 25ml d'une solution tampon phosphate additionné de 200ul.L^{-1} de Silwet L77(PBS). Après homogénéisation à l'aide d'un vortex pendant 15sec, 1ml de la suspension a été déposées dans des cryotubes contenant 1 ml de glycérol 80%. C'est à partir de ce stock que nous avons réalisés nos isolements bactériens du sol rhizosphérique (SR).

II. Méthodes

1. Isolement des bactéries du genre Acinetobacter spp.

Afin de pouvoir isoler des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter spp.* Nous avons procédé à un enrichissement. 50µl de la suspension mère (stock glycérol) a été ajouté à 25 ml du milieu MSC et puis mis à incubation pendant 24-48H, sous agitation (150rpm) et à 28±2°C. A partir

des tubes contenant un trouble bactérien, 50µl a été déposé sur des boîtes Petri contenant le MSC. Puis laisser à incuber pendant 24-48H et à 28±2°C.

Le dénombrement de la microflore bactérienne totale a été réalisé après 24-48H d'incubation à 25°C, en multipliant le nombre des colonies comptées (x) par le facteur de dilution (1/d) et par l'inverse du volume ensemencé (V), selon la loi de Kass. Le nombre total des bactéries (N) dans l'échantillon de départ est exprimé par $UFC.ml^{-1}$.

À partir des colonies formées une série de repiquages a été effectuée suivant la méthode des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de cultures pures.

L'ensemble des isolats pures obtenues à partir du sol rhizosphérique du l'orge ont été nommé par le code (OR), et les isolats pures obtenues à partir du sol rhizosphérique du blé ont été nommé par (PR), ensuit ces colonies ont été ensemencé sur milieu Hektoen. Un ensemencement en stries a été réalisé sur la surface de la gélose, suivi d'une incubation pendant 24-48H à 30±2°C. Seules les colonies présentant une coloration verdâtre ont été choisies.

2. Identification phénotypique

La détermination de l'identification des bactéries isolées comme étant appartenant au genre *Acinetobacter* a été réalisée à l'aide d'un ensemble des tests phénotypiques. Il s'agit de : la morphologie de la colonie, la coloration de Gram, la motilité, les réactions d'oxydase et de catalase et l'identification biochimique à l'aide des galeries API 20E.

2.1. Identification morphologique

Les colonies obtenues sur milieu solide ont été observées d'abord à l'œil nu. L'étude macroscopique permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, elle est basée sur les éléments d'identification donnés par Joffin et Leyral (2006): la forme, la taille, l'opacité, l'élévation et l'aspect de contour et de surface.

L'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes et le mode de groupement et de faire une approche de leur morphologie (Bousseboua, 2002).

Une petite goutte d'eau physiologique stérile à été déposée au centre d'une lame stérile, puis une partie d'une colonie bactérienne jeune (18H) à été prélevée par l'anse flambée et dissociée dans la goutte, une lamelle stérile a été ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air. L'observation microscopique a été réalisée à l'objectif X40 puis X100 (Joffin et Leyral, 2005).

L'Identification morphologique des colonies à l'état fixé consiste à une observation microscopique après coloration de Gram. La coloration de Gram est une coloration différentielle de base permet de distinguer deux grands groupes bactériens en fonction de la composition de leurs parois et de leurs affinités aux différents colorants : des bactéries à Gram positifs colorées en violette et Gram à négatifs en rose, et elle permet aussi de déterminer la forme, la taille, l'arrangement, la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes, la vérification de la pureté de l'isolat et permet de visualiser les endospores bactériennes, leurs formes et leurs positionnements.

2.2. Test catalase

La catalase est une enzyme antioxydante présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H2O2) dans la cellule bactérienne dont l'action serait létale. Elle décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène selon la réaction : $H2O2 \rightarrow H2O + ½ O2$.

Le test consiste à déposer sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée, dans laquelle un petit prélèvement d'une colonie bactérienne jeune a été dissocié à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Un résultat positif se traduit par un dégagement immédiat des bulles de gaz (O2) (Meyer et *al.*, 2004).

2.3. Test oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme (phényléne diamine oxydase) présente dans certaines chaines respiratoires cytochromiques bactériennes.

Le test consiste à mettre sur une boite de Pétri, un disque pré-imprégné d'un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) et l'imbiber avec de l'eau physiologique stérile, ensuite une colonie jeune a été prélevée avec une pipette Pasteur bouclée, et déposée sur le disque. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette après quelques secondes (Joffin et Leyral, 2006).

2.4. Identification biochimique

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires et non fastidieux (ex. *Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella, Vibrio, Aeromonas,* etc.) Combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un

milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

La première étape consiste à préparer la boite de la galerie par une répartition de 5ml de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Après on dépose stérilement la galerie dans la boite d'incubation. Ensuit, c'est la préparation de l'inoculum. Pour cette étape on prélève à l'aide d'une pipette pasteur 1 à 4 colonies de morphologie identique qui sont de cultures jeunes et on la verse dans 2 ml de l'eau distillée stérile.

Après avoir homogénéisé notre suspension on passe au remplissage des tubes de la galerie (Fig.10), pour les tests CTI et VP et GEL on remplit le tube et la cupule et pour les autres tests on remplit uniquement les tubes.

Certains tests nécessite l'anaérobiose (ADH, LCD, ODC, URE, H_2S), pour crée cette dernière on remplit leur cupule avec de l'huile de paraffine.

Au finale on ferme la boite d'incubation et on la place dans l'étuve a 37°C pendant 18 à 24 heures.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture, et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

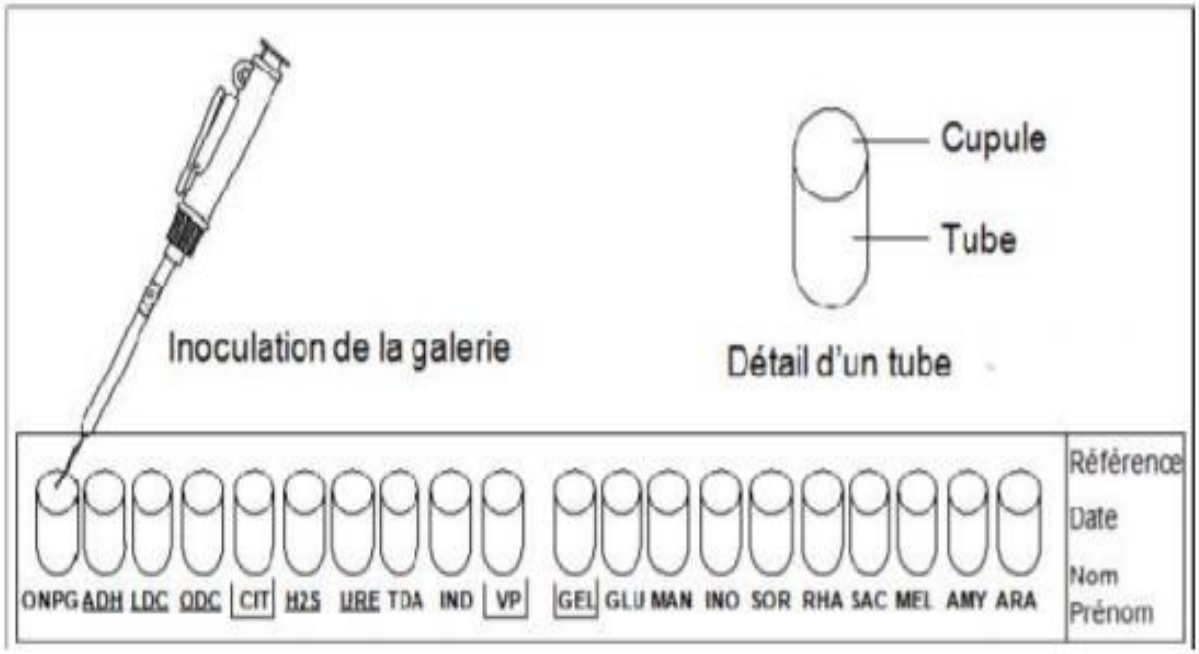


Figure10. Remplissage de la galerie API 20E (Koridak et Bekkouche, 2019).

2.5. Mannitol mobilité

Le milieu de culture Mannitol-Mobilité a été utilisé pour l'identification présomptive des souches bactérienne est mise en œuvre pour l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate (enzyme respiratoire). Le test a été procédé par l'ensemencement de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

La fermentation du mannitol se traduit par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune et les bactéries mobiles envahissent le milieu de culture à partir du point d'ensemencement.

3. L'étude de la sensibilité des bactéries d'*Acinetobacter* aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques à été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton selon les normes et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (CASFM, 2008).

Des colonies bien isolées et parfaitement identiques d'une culture jeune (18H) ont été raclé à l'aide d'une anse de platine à partir d'un milieu d'isolement approprié, puis l'anse a été déchargé dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile, puis la suspension bactérienne a été homogénéisé au vortex.

L'écouvillon déchargé de l'inoculum est frotté sur la totalité de la surface gélosée, en stries serrées en répétant l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60°C à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même puis l'ensemencement est finie par son passage sur la périphérie de la gélose.

A l'aide d'une pince bactériologique stérile, les disques d'antibiotique (tab.I) ont été pressés sur la gélose. Puis les boites ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après la période d'incubation les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision et comparés avec des valeurs critiques.

Tableau I. Tableaux des antibiotiques**.**

La famille	L'antibiotique	Symbole	Charge de disque µg
Aminopénicilline	Amoxicilline	AMC	30
Céphalosporine 3ème génération	Cefotaxime	CTX	30
Céphalosporine 3ème génération	Ceftazidime	CAZ	30
Céphalosporine 1ème génération	Cefazoline	CZ	30
Aminopénicilline	Ampicilline	AMP	10
Carbapénème	Imipénem	IMP	10
Monobactame	Aztréonam	AT	30
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30
Céphalosporine 3ème génération	Ceftriaxone	CTR	30
ACIDES FUSIDIQUES	Fusidic acide	FA	10
Fluoroquinolone	Ciproflaxine	CIP	5
Phénicolés	Chloramphenicol	C	30
Macrolides	Erythromycine	E	15

4. Caractérisation

4.1. Caractérisation physiologique

L'identification physiologique des souches a été mise en évidence par l'étude des critères suivants : Tolérance à la température, PH, salinité et stress hydrique.

La tolérance à la température a été réalisée sur des boîtes Petri alors que les autres paramètres ont été effectués sur des microplaques de titrage à 96 puits.

Pour la préparation de ces plaques 150µl de milieu TSA1/10 semi solide a été déposés dans chacun des puits et additionné de bleu de bromothymol qui est un indicateur de pH pour faciliter la lecture, ensuite les puits ont été ensemencés par piqure central et incubés à 37°C pendant 24H. La lecture a été effectuée par une comparaison à des puits non ensemencés, un virage de la

couleur au jaune (souches acidifiantes) ou vers le vert (souches alcalinisantes) signifié la croissance des bactéries.

Dans le cas où il n'y a pas un changement de couleur, les puits ont été observés à l'œil nu pour déceler un trouble ou un développement de petites colonies indicatrices d'une croissance bactérienne qui montre la résistance de la bactérie.

4.1.1. Température

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des isolats sélectionnés a été effectuée par incubation des souches ensemencées sur milieu Hektoen pendant 48 heures à différentes températures 4°C, 25°C, 40°C et à 60°C.

4.1.2. PH

L'influence du PH sur la croissance des bactéries a été réalisée par une série d'essais sur le milieu TSA 1/10 ajusté par l'addition de HCl 1% et du KOH 1% pour obtenir trois valeurs de pH 4, 7 et 9.

4.1.3. La salinité

L'effet de la concentration en NaCl sur la croissance des souches a été déterminé par la culture sur milieu TSA1/10 semi solide additionnés de NaCl et KCl pour avoir différentes concentrations 100 mM ,200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM.

4.1.4. Stress hydrique

Pour induire les différents niveaux de stress hydrique testés, des solutions de PEG à des concentrations croissantes (PEG : 15 $g.L^{-1}$, 30 $g.L^{-1}$, 45 $g.L^{-1}$ et 60 $g.L^{-1}$) ont été additionnées au milieu TSA1/10 semi solide afin de déterminer la tolérante au déficit hydrique de nos isolats.

4.2. Caractérisation enzymatique

Certaines enzymes produites par les bactéries du sol (cellulase, amylase, protéase etc.) jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique dans le sol en participant à sa fertilité et à la disponibilité des éléments minéraux nécessaires pour la nutrition des plantes.

Les différentes activités enzymatiques des souches microbiennes sélectionnées ont été mises en évidence par l'utilisation des milieux spécifiques contenant le substrat à dégrader (Ariffin et *al.*, 2006).

4.2.1. Amylase

Afin de mettre en évidence la capacité des souches à dégrader l'amidon, un test a été réalisé sur un milieu TSA1/10 à 1% d'amidon. Les souches ont été ensemencées par spot et incubées à 37°C pendant 5 jours.

Après l'apparition des colonies, une solution de Lugol a été éparpillée sur toute la surface du milieu et après quelques minutes de contact, l'excès a été éliminé. L'hydrolyse a été mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies à l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu noirâtre (De Vos et *al.,* 2009).

4.2.2. Protéase

Les protéases jouent un rôle important dans la minéralisation de l'azote dans le sol, et donc contribue à la disponibilité de l'azote (Stevenson, 1986) qui est nécessaire pour la croissance des plantes. L'activité protéasique peut influencer indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'AIA et d'autres substances appariées (Mansour et *al.,* 1994).

La révélation de l'activité protéasique des isolats a été déterminée par ensemencement par spot des bactéries sur un milieu de culture additionné de lait écrémé.

Après 48 h d'incubation à 37°C, l'apparition d'un halo transparent autour des colonies reflète la présence d'une activité hydrolytique protéolytique (Bach et Munch, 2000).

4.2.3. Uréase

L'Uréase est une enzyme responsable de l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO2 et l'ammoniac (NH3), ce qui augmente la disponibilité de l'azote pour les plantes (Byrnes et Amberger, 1989 ; Van et Wang, 1991). Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol, car sa concentration est en fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et *al.,* 2010).

L'activité uréasique a été déterminée par ensemencement par spot des isolats sur un milieu préparé à base de la peptone.

Après 48H d'incubation à 37°C, la production de l'uréase par les isolats a été décelée par l'apparition d'un halo rose autour des colonies (Christensen, 1946).

4.2.4. Lipase

Le milieu décrit par Sierra (1957) a été utilisé pour détecter la production des enzymes lipolytiques dans lequel le tween 80 a été ajouté comme substrat lipidique. Après ensemencement des souches par spot, les boites ont été incubées à 37°C pendant 48H.

La présence d'une activité se traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Carrim et *al.,* 2006).

4.2.5. Gélatinase

Le test a été effectué pour déterminer la capacité des micro-organismes à produire l'enzyme gélatinase (Aneja, 2003). Les cultures en croissance active jeunes ont été inoculées par piqure

centrale dans des tubes contenant un milieu à base de gélatine, puis incubées à 37°C pendant 15 jours.

Après incubation les tubes ont été placés dans un bain de glace ou un réfrigérateur (4°C) pendant 15-30 minutes, les cultures qui produisent de la gélatinase restent liquéfiées tandis que d'autres en raison de la présence de gélatine deviennent solides.

4.3. Caractérisation métabolique

4.3.1. Fixation d'azote atmosphérique

La recherche des souches fixatrices d'azote atmosphérique a été réalisée par ensemencement en striés des colonies d'une culture jeune sur le milieu exempt d'azote JENSEN, les boites ensemencer ont été incubées à 37°C pendant 4 jours.

Toute croissance sur ce milieu traduit la capacité des bactéries à fixer l'azote (Thompson, 1989).

4.3.2. Solubilisation des Phosphates

La solubilisation de phosphate inorganique a été déterminée sur le milieu NBRIP, (National Botanicalb Research Institut's Phosphate), contenant 0,5% du phosphate tricalcique (Ca3(PO4)2) comme seule source de phosphate insoluble (Nautiyal, 1999).

Les isolats bactériennes fraîches et âgées de 24h, ont été ensemencées par spot sur la surface du milieu NBRIP, puis incubées à 37°C pendent 14 jours.

Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Sagervanshi**,** 2012). L'estimation de l'activité de solubilisation a été déterminé par le calcul de l'indice de solubilisation (ISP) calculé selon la formule suivante (Sitepu et *al.,* 2007):

$$SI = \frac{\text{Diamètre de la colonie+ diamètre de la zone claire}}{\text{Le diamètre de la colonie}}$$

4.3.3. Production de sidérophores

La synthèse des sidérophores est testée sur milieu au Chrome Azurol Sulfate ou CAS gélosé proposé par Shwyn et Neilands (1987), les isolats ont été ensemencés en spots, les boites de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 7 jours.

Un résultat positif se traduit par un changement de couleur du bleu à l'orange autour de la colonie productrice de sidérophores. Le changement de couleur est dû au transfert des ions ferriques du CAS vers les Sidérophores.

4.3.4. Production d'acide cyanhydrique

La capacité des isolats à produire l'acide cyanhydrique a été vérifiée selon la méthode de Bakker et Schippers (1987) dont le principe est : en présence de l'acide picrique (NaCo3) et la production de d'HCN une coloration rouge sang intense apparaisse due à la formation de l'acide iso purpurique.

Chaque isolat a été inoculé par stries sur une boîte de Pétri contenant le milieu composé de TSA 1/10 additionné de 4,4 g de glycine par litre d'eau distillée, un papier filtre d'environ 6 cm de diamètre est déposé dans le couvercle de chaque boite Pétri en position inverse. Ce papier est par la suite imprégné d'une solution de couleur orangée contenant 0,5% d'acide picrique et 20% de carbonate de sodium. Les boites de Pétri sont scellées avec du papier film et incubées à 37°C. Les boites sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les boites Pétris dont le papier filtre changé de couleur du jaune au rouge orangé indiquant la synthèse de l'HCN (Fig.11).

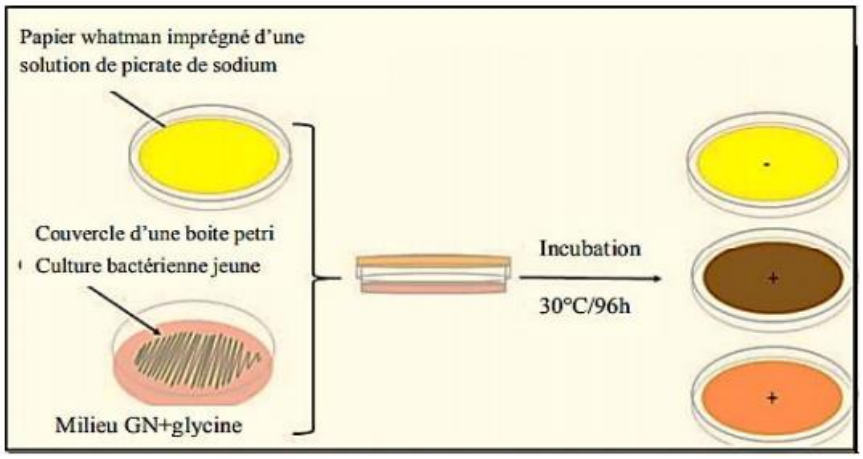


Figure11. Principe de technique de la mise en œuvre de la production de Cyanure d'hydrogène (HCN).

4.3.5. Production d'acide indole acétique (AIA)

La production d´AIA (auxines) par les bactéries sélectionnées a été déterminée selon la méthode décrite par Brick et *al.* (1991). Cette méthode consiste à ensemencer des cultures microbiennes jeunes dans des fioles contenant le milieu LB, supplémenté de tryptophane comme précurseur de l'acide indole acétique. Ce dernier est préalablement filtré à travers une membrane millipore (0.22 µm) et ajouté au milieu après autoclavage.

Après une incubation à 25° C pendant 4 jours, les cultures ont été centrifugées à une vitesse de 1000 tr/min pendant 10 minutes. Un volume de 1 ml du filtrat a été ensuite récupéré dans un nouveau tube et additionné des quelques goutes du réactif de Salkowski avec quelques gouttes

d'acide ortho-phosphorique. Le mélange a été ensuite incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 20min. Le développement d'une couleur rose est l'indicateur de la production d'AIA.

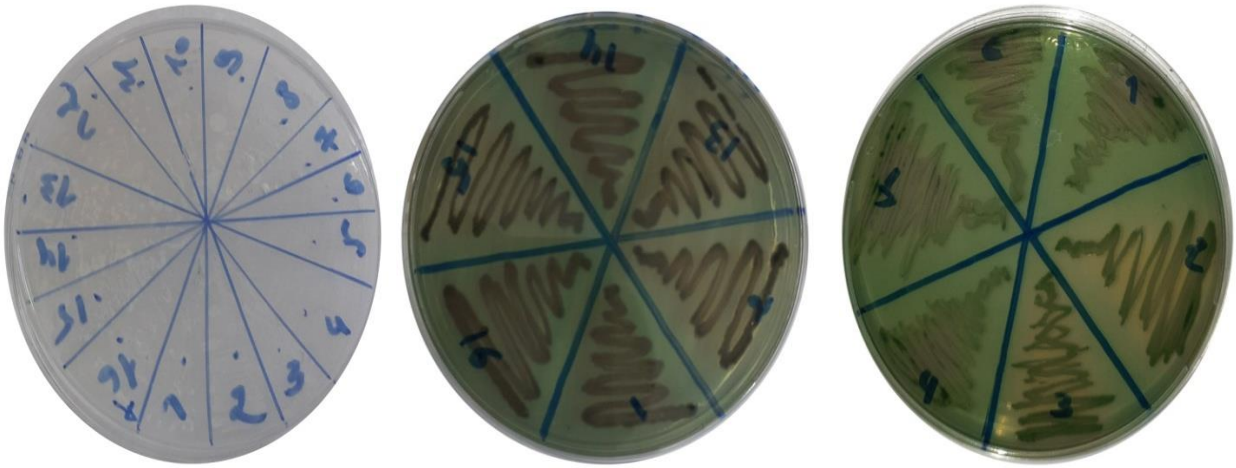
Résultats et discussion

1. Densité de la flore bactérienne rhizosphérique totale

Le dénombrement de la microflore totale des bactéries cultivables de la rhizosphère de l'orge et du blé a été effectué après une incubation de 48h à 28°C de nos boites (Fig.12). Nous avons dénombré 680 colonies pour la rhizosphère de l'orge, que soit l'équivalent de 6.80 $.10^{6}$UFC.mL^{-1} (6.80 LogUFC.ml^{-1}).et 484 colonies pour la rhizosphère du blé que soit l'équivalent de 4.84.10^{6}UFC.mL^{-1} (8.68 LogUFC.ml^{-1}).

Selon Soltner, (2003), la densité bactérienne rhizosphérique de nos plantules d'orge et du blé est dans les normes. La densité bactérienne trouvée est jugée comme étant forte par comparaison au nombre des communautés bactériennes cultivables qui peut contenir 10^{6} à 10^{9} Bactéries dans 1 g du sol rhizosphérique.

Cette densité relativement forte peut avoir aussi une explication technique. La durée d'incubation préconisée pour nos boites (24-48 h) permet la détection des colonies à croissance rapide (Dar, 2009).



a b c

Figure12. Morphologie générale des colonies obtenues après purification.

2. Sélection des bactéries du genre Acinetobacter

Suite à la collection et la purification, un nombre de 80 souches ont été isolées, 32 souches isolées à partir du sol rhizosphérique de l'orge OR et 48 souches isolées à partir du sol rhizosphérique du blé PR.

Les bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* sont souvent considérées comme des microorganismes ubiquitaires et peuvent être isolées à partir du sol et des eaux (Zahoun et *al*., 2010).

L'ensemble des colonies obtenues à partir de la rhizosphère du l'orge OR et à partir de la rhizosphère du blé PR ont été soumis à un repiquage sur le milieu Hektoen.

Après un repiquage sur Hektoen seulement 45 de nos isolats sur 80 ont montré une couleur verte, 23 isolats à partir du sol rhizosphérique de l'orge et 22 isolats à partir du sol rhizosphérique du blé. Ces 45 isolats ont été soumis un test d'oxydase, seulement 14 isolats ont montré un résultat négatif.

Les 14 isolats obtenues ont été soumis à une coloration de Gram, seulement 6 isolats ont présenté une coloration rose (Fig.13), et par conséquent ont été considérées comme des bactéries Gram négatives.

Les bactéries du genre Acinetobacter sont des bacilles ou coccobacilles à Gram négatif, aérobies strictes, oxydase négative, catalase positive, immobiles (Jans et *al.,* 2004).

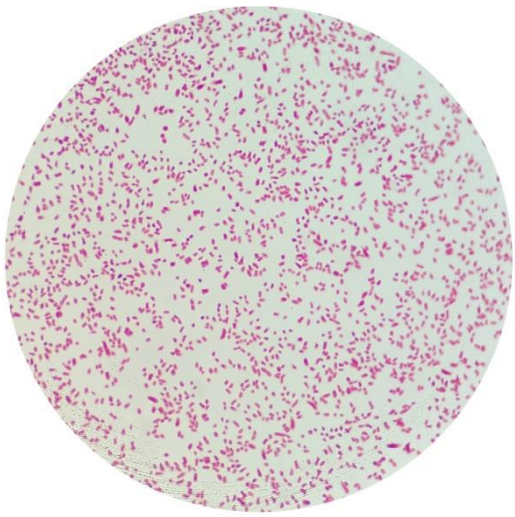


Figure13. Observation microscopique à un grossissement X100 après la coloration de Gram d'un isolat (OR-15)

2.1. Caractérisation morphologique

La caractérisation phénotypique admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées.

L'aspect macroscopique de nos souches (Fig.14) a été observé à l'œil nu sur milieu Hektoen après incubation à 37°C pendant 24h. L'observation a permis de constaté 46 isolats que ce sont des colonies rondes, plate, brillantes et opaques à bord régulier de couleur verte, dans laquelle 24 isolats appartiens au sol rhizosphérique de l'orge et 22 isolats appartiens au sol rhizosphérique du blé.

Les observations microscopiques réalisées sur des cellules vivantes non colorées à un grossissement de X40 ont montré que nos isolats sont immobiles sous forme bacille ou cocco bacille isolées.

La coloration de Gram des souches purifiées montre que seulement 6 isolats sont des bacilles roses, 3 isolats appartiens à la rhizosphère de l'orge et 3 appartiens à la rhizosphère du blé. Elles possèdent des parois à Gram négative. Nos résultats sont similaires avec les travaux de description des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* (Baumann et *al.*, 1968).



Figure 14. Aspect macroscopique des colonies des bactéries du genre Acinetobacter sur Hektoen

2.2 Caractérisation biochimique

2.2.1. Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en dioxygène. Elle est considérée comme un moyen de survie dans les sols salins (Kim et *al*, 2005). La présence de cette enzyme

s'exprime par un dégagement des bulles d'air, ce dégagement a été détecté chez les 45 isolats. (Fig.15).

D'après Baumann et *al.*, (1968) ont trouvé 100% des *Acinetobacter*.spp dans une zone semi-aride et tropicale ont test positive pour la catalase. Notre résultat est similaire avec ces travaux. Donc nos souches sont des aérobies stricts.

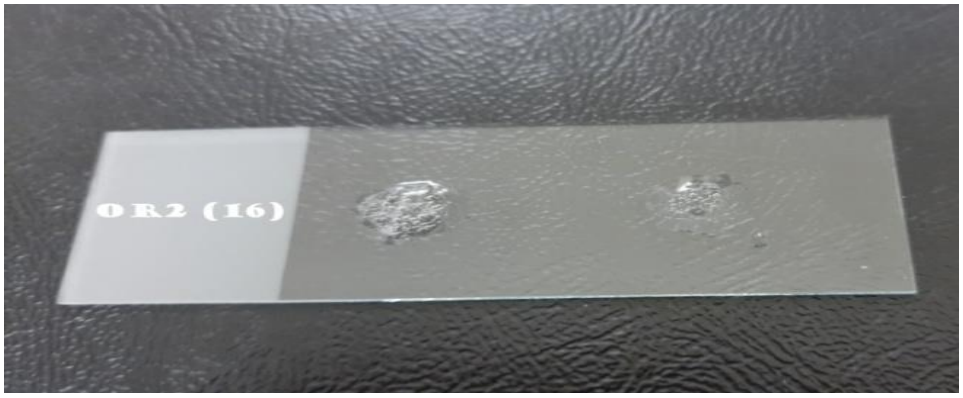


Figure15. Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase sur l'isolat OR-16

2.2.2. Oxydase

Le test oxydase est considérer comme un critère de contrôle pour les bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* car elles sont toutes oxydases négatives, il permet de mettre en évidence la capacité d'une bactérie à produire le cytochrome oxydase, qui est une enzyme intervenant à la fin de la chaine respiratoire pour catalyser la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène (Joffin et Leyral, 2006).

Les résultats obtenus ont montré que 12 isolats ont révélé une réponse négative traduite par l'apparition d'une couleur jaune sur le disque d'oxydase (Fig.16).

L'absence de cette enzyme est considérée comme un caractère taxinomique permettant l'identification des espèces d'*Acinetobacter* (Lessel EF ,1970).

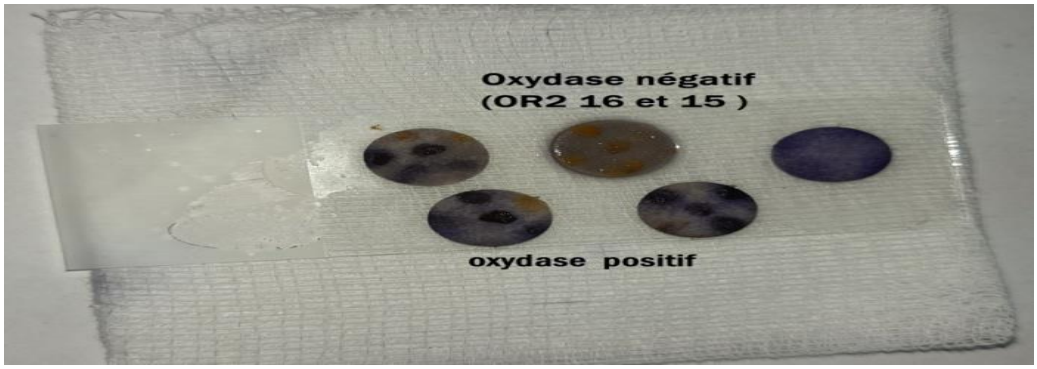


Figure16. Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.

2.2.3. Identification biochimique par galeries Api20E

Des galeries API 20 E ont été réalisées sur nos 6 isolats, 3 isolats du blé (PR-12, PR-7, PR-4) et 3 isolats d'orge (OR-5, OR-15 et OR-16).

Après incubation, la lecture de la galerie (Fig.17) a été réalisée en se référant au tableau de lecture. La galerie API 20 E nous a permis d'affiner nos résultats dans l'identification des souches.

Les résultats obtenus ont montré une réaction négative pour la majorité des tests et peu des réactions positives ce qui permet l'identification du genre *Acinetobacter*.

Les résultats évocateurs *d'Acinetobacter*.spp sont la réaction positive du glucose, du melibiose et de l'arabinose.

En pratique quotidienne dans le laboratoire de bactériologie classique, ils ne permettent pas la différenciation entre les différentes espèces d'*Acinetobacter*, car ils sont trop difficiles à mettre en œuvre.

Les tests biochimiques habituels pour le genre *Acinetobacter*.spp sont en majorité négatifs : nitrate réductase, LDC et ODC négatives, H2S et indole négatifs. Les tests de l'uréase, l'hydrolyse de la gélatine ou la phénylalanine désaminase (PAD) donnent des réponses variables (Doughari et *al.*, 2011; Hawkey and Bergogne-Berezin, 2006).

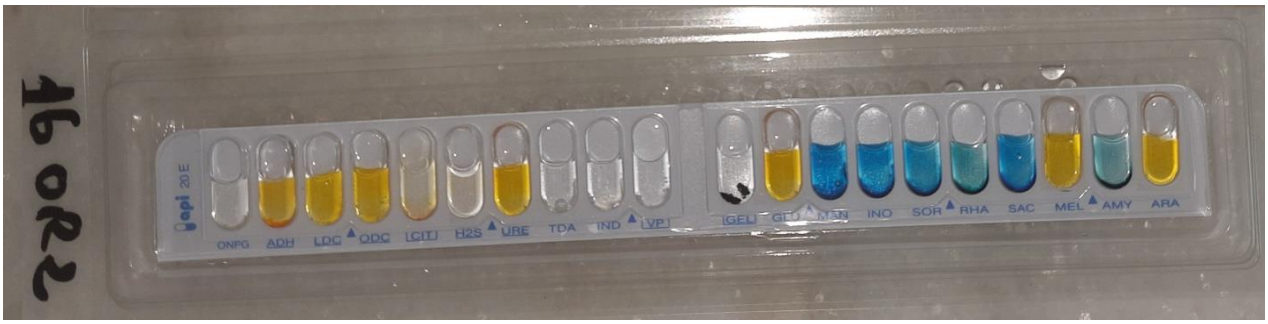


Figure17. Profil biochimique de l'isolat OR-15 sur galerie API 20 E

2.2.4. Mobilité

Un test de fermentation du mannitol a été réalisé pour tester la mobilité de nos 6 isolats qui sont apparues fixées sous microscope, les résultats obtenus ont montré une absence de virage de couleur rose vers le jaune alors il y'avait pas une fermentation du mannitol qui veut dire que toutes les isolats sont immobiles et mannitol négative.

Nos résultats sont similaires avec les études réalisées par Brisou et coll (1954) qui ont trouvé que la majorité des bactéries *Acinetobacter*.spp sont mannitol négatifs, et bien qu'elles soient généralement considérées comme immobiles (mais pouvant présenter une mobilité par saccade résultant de la présence de fimbriae polaires), une mobilité de type « mouvement par tremblement » ou « twitching motility » a été remarquée notamment sur des supports semi-solides (Roca et *al.*, 2012).L'immobilité est un caractère très connu chez les *Acinetobacter* (Euzéby, 2004).

3. Résistance aux antibiotiques

La résistance de nos isolats aux antibiotiques a été testée avec 13 antibiotiques, les résultats obtenus (Tab.II) ont montré que les 6 isolats présentent une croissance en présence des majorités d'antibiotiques. En effet sur les 13 antibiotiques retenus, les isolats résistent à 10 antibiotiques.

Nous considérons avec les résultats obtenus que nous sommes en présence de souches multi-résistantes. Il s'avère selon de nombreux auteurs que la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui un problème de santé publique, car certaines maladies bactériennes deviennent de plus en plus difficiles à soigner. C'est ce que l'Institut Pasteur a découvert à propos des antibiotiques béta-lactamines, est à ce titre particulièrement intéressant.

Les résultats obtenus ont montré aussi que les isolats d'*Acinetobacter* appartenant au sol rhizosphérique de l'orge sont montrés plus résistantes (10 antibiotiques) par rapport aux isolats obtenus à partir du sol rhizosphérique du blé (7 antibiotiques)

Les isolats d'*Acinetobacter* obtenus à partir du sol rhizosphérique du blé sont sensibles aux antibiotiques : Imipénem, Aztréonam, Vancomycine, Ciproflaxine, Chloramphenicol et Erythromycine tandis que les isolats d'*Acinetobacter* obtenus à partir du sol rhizosphérique de l'orge sont sensibles aux antibiotiques : Vancomycine, Chloramphenicol et Erythromycine.

Les 6 isolats montrent une résistance aux antibiotiques qui appartiennent à la famille des béta-lactamines. : Amoxicilline, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone. Et aussi à l'antibiotique : Acide Fusidique.

L'administration d'antibiotiques aux bétails, dans les années 1950, aurait rendu les bactéries résistantes aux béta-lactamines avant même sa commercialisation pour l'homme. Et c'est ca qui contribue à l'émergence des souches multi-résistantes, insensibles à une large gamme d'antibiotiques, y compris la nouvelle génération, à large spectre des β-lactamines, les aminosides et les Fluoroquinolones.

A.baumannii pose actuellement un problème de multi-résistance aux antibiotiques. Elle est aussi dénommée sous la terminologie de BMR (Bactérie Multi-résistante), notamment la résistance aux β-lactamines.

Tableau II. Résultats de la sensibilité des isolats testés aux différentes concentrations d'antibiotiques.

Anti / Souches	AMC	CTX	CAZ	CZ	AMP	IMP	AT	VA	CTR	FA	CIP	C	E
7-PR	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**
4-PR	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**
12-PR	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**
5-OR	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**
15-OR	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**
16-OR	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**

R : résistante S : sensible

4. Caractérisation

4.1. Caractérisation physiologique

4.1.1. Tolérance à la température

La température a une importance majeure dans le métabolisme et la croissance des microorganismes (Berry &Foegeding, 1997). L'incubation de nos 6 isolats à 4 différentes températures (4C° ,25°C ,40C°, et 60°C) nous a permis de constater que tous les isolats ont pu se développer aux températures 25°C et 40°C et 4°C à l'exception de T= 60°C (Fig.18).

En effet, les isolats OR-16, OR-15 et PR-12 ont montré une forte tolérance à 25 °C contrairement aux isolats OR-5, PR-7 et PR-4 qui ont présenté une croissance moyenne. Aussi à 4°C les isolats ont montré une croissance moyenne.

Pour une température de 40°C tous les isolats ont montré un taux de croissance élevé, donc ce sont des thermophiles (Delarras, 2014).

Il a été trouvé que la croissance optimum d'*Acinetobacter johnsonii*a a été obtenue à 40°C indiquant une meilleure adaptation du microorganisme à ces conditions.

Les travaux de Seifertet Dijkshoorn (2008) ont montré que les isolats cliniques d'*Acinetobacter* présentent une bonne croissance à une température de 37°C et certaines souches peuvent se développer à des températures élevées allant jusqu'à 40°C.

Selon Vegasa et Nieves 2005, le genre *Acinetobacter* se développe facilement dans une gamme de température de 25-37°C. Par ailleurs, Hirdi en 2012 a trouvé que *A,baumanii* est considérée comme souche thermotoérante qui résiste jusqu'a 44°C.

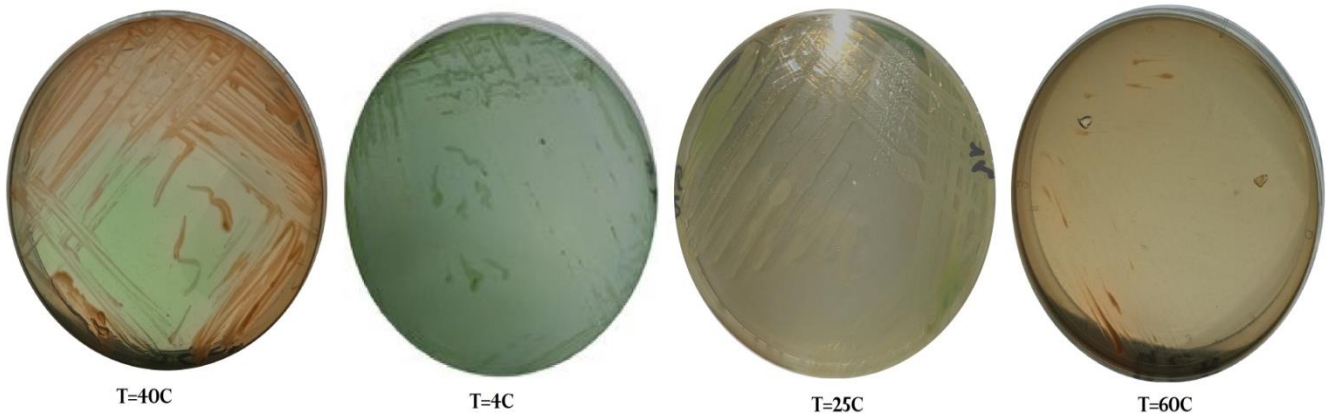


Figure18. Aspect morphologique de l'isolat OR-15 incubés à différentes température.

4.1.2. Tolérance aux variations du PH

Le PH est l'un des facteurs d'influence évidents de l'activité microbienne et des populations dans le sol (Woyessa et Assefa., 2011). Il ressort du test de l'effet du PH sur la croissance et le développement de nos isolats que les 6 isolats étudiés poussent à PH 7, elles sont de cet effet considéré comme étant neutrophiles Horikoshi (1999).

Les résultats ont montré que PH 4 est optimum pour la croissance de toute les isolats, par contre à PH 9 les isolats OR-5 et OR-15 ont montré une forte tolérance et les isolats OR-16, PR-4, PR-7 et PR-12 ont montré une faible croissance (Tab.III).

Le mode d'action du PH sur la survie bactérienne n'est pas toujours très bien éclairci. Booth (1985) s'est limité de rapporter que le PH extracellulaire est l'un des facteurs critiques dans le métabolisme et la croissance cellulaire.

Tableau III. Résultats de la densité optique de test de PH à longueur d'onde 600.

	PH 4	PH 9
OR-16	1.45	0.30
OR-15	1.44	1.57
PR-7	1.37	1.20
PR-4	1.17	0.20
OR-5	1.30	1.16
PR-12	1.42	0.51

4.1.3. Tolérance à la salinité

La salinité est un phénomène problème toujours en croissance dans de nombreuses régions du monde, particulièrement dans les régions arides et semi-arides (Flowers, 2004; Munns, (2005); Ashraf et Foolad, 2007).

Dans le but de tester la tolérance de nos isolats à la salinité, nous avons retenu pour cela, deux sels considérés comme majoritaires dans le sol des zones arides, il s'agit de NaCl et de KCl. Les résultats obtenus (Tab.IV) indiquent que toutes les isolats tolèrent la salinité de large intervalle allant de 100 mM à 400 mM, ce que suggère que nos souches sont halotolérantes.

Les microorganismes nécessitant moins 300 mM de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles (Ollivier et *al*., 1994) car les halophiles nécessitent la présence de cette concentration ou des concentrations plus élevées dans le milieu pour leur croissance (Tikia et *al*.,2007). En revanche, les halotolérantes sont les bactéries capables de se développer même en absence de sel tout en tolérant des concentrations élevées en sel (Echigo et *al*., 2005).

Whatmore et *al.* 1990 et da Costa et *al.* 1998 ont montré qu'*A.baylyi* peut s'adapter à l'augmentation de la salinité imposée par l'ajout de divers sels de sodium.

Tableau IV. Résultats de la densité optique de test de la salinité à longueur d'onde 600.

	100 mM	200 mM	300 mM
OR-16	**1.33**	**0.96**	**0.84**
OR-15	**0.56**	**0.44**	**0.98**
PR-7	**1.35**	**1.37**	**1.17**
PR-4	**0.67**	**0.75**	**0.77**
OR-5	**0.63**	**0.99**	**0.66**
PR-12	**0.99**	**1.77**	**1.20**

4.1.4. Tolérance au stress hydrique

L'implication des bactéries dans la tolérance des plantes lors d'un stress hydrique a largement été étudiée (Dimkpa et *al.* ,2009 ;Yang et *al.*,2009).Dans le but de tester la tolérance de nos isolats aux stress hydrique, ce dernier été créé en utilisant le polyéthylène glycol (PEG 6000) à différentes concentrations allant de 15 à 45g/l.

Les résultats obtenus (Tab.V) ont montré la capacité de croissance des 4 isolats testés aux différentes concentrations de PEG 6000. Nos résultats sont compatibles avec les études de Yurekli et *al*, (2003) sur la tolérance des rhizobactéries des céréales dans la zone aride aux différentes concentrations de PEG, cette tolérance aide la plante à résister à ce type de stress.

Des études antérieures ont montré que les souches d'*A.baumannii* peuvent varier considérablement dans leur capacité à survivre à la dessiccation, certaines ne survivant que quelques jours et d'autres pouvant survivre pendant des semaines ou des mois à l'état sec Jawad A, et *al* 1996.

Tableau V. Résultats de la densité optique de test de la sécheresse à longueur d'onde 600.

	15 g.l^{-1}	**30 g.l^{-1}**	**45 g.l^{-1}**
OR-16	**1.65**	**0.91**	**1.03**
OR-15	**0.73**	**1.25**	**1.20**
PR-7	**1.03**	**0.65**	**1.12**
PR-4	**0.93**	**1.03**	**0.77**
OR-5	**1.36**	**1.46**	**1.04**
PR-12	**0.61**	**0.65**	**0.84**

4.2. Activité enzymatique

4.2.1. Amylase

L'amylase est une enzyme qui a un rôle très important dans la germination des graines, elle a la capacité de mobiliser les réserves et donc le développement de l'embryon (Singh, 1973).

La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour leur croissance.

Tous nos isolats ont montré une activité amylase positive à l'exception de l'isolat OR-15qui a présenté un résultat positif qui se traduit par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie (Fig.19).

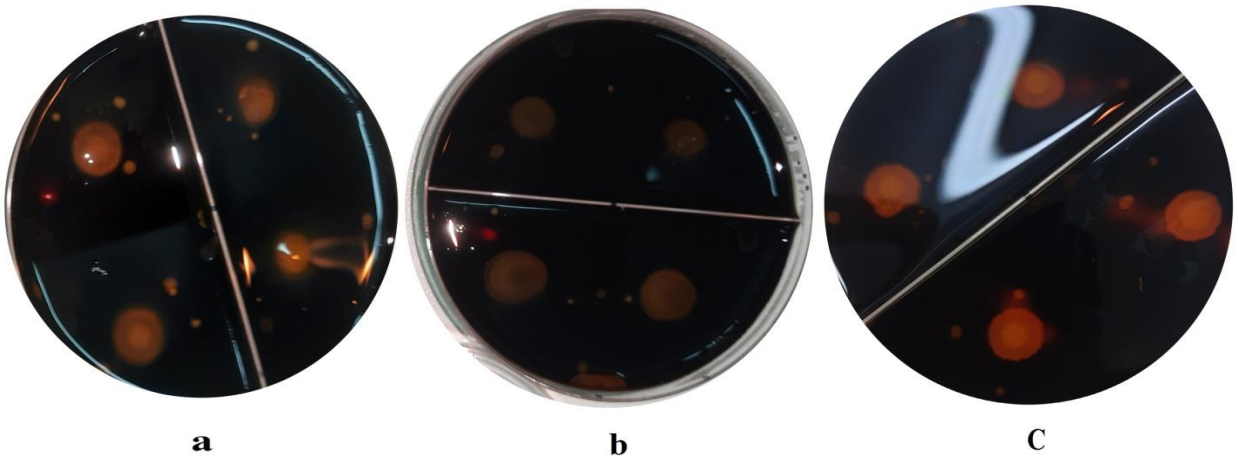


Figure19. Résultats du test Amylase pour les isolats PR-4 (a), PR-12 (b) et OR-5 (c).

Le diamètre du halo de dégradation formé autour de l'isolat peut nous informer sur l'intensité de cette activité. L'isolat PR-4 a montré la meilleure activité avec un diamètre d'halo de lyse de 18 mm, alors que la plus faible activité a été détectée chez les isolats PR-7avec un diamètre de 6 mm (Fig.20).

Il a été signalé qu'il existe des nombreux types d'enzymes biologiquement actives, notamment des amylases sécrétées par certains psychrophiles et psychrotrophes tel que la souche BJ-L *d'Acinetobacter.spp* isolée d'un échantillon d'eau, dont certaines ont été appliquées dans la production industrielle (Kuddus et Ramteke 2009).

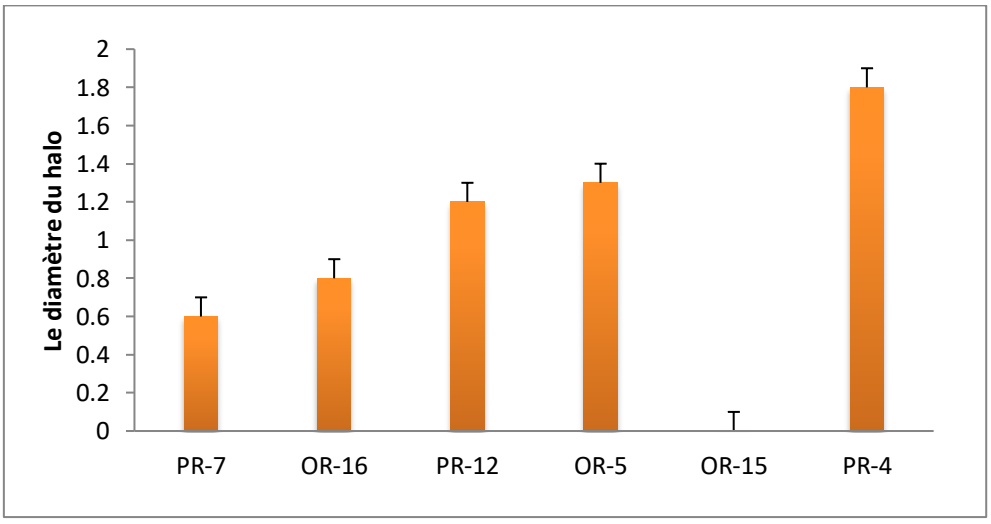


Figure 20. Diamètre du halo de dégradation (cm) obtenu par l'activité de l'enzyme amylase chez nos isolats.

4.2.2. Protéase

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux exigences du monde industriel a conduit a un intérêt accru pour les protéases microbiennes (Mala et *al.*, 1998). Les protéases d'origine microbienne sont probablement les plus largement secrétées parmi toutes les enzymes. (Ningthoujam et *al.*, 2009), elles représentent les 2/3 de la production commerciale de protéases. Les protéases microbiennes jouent ainsi un rôle capital dans l'industrie des détergents car elles sont capables de dissoudre les taches protéiques à basse température contrairement aux produits chimiques qui ne possèdent pas des propriétés équivalentes même à haute température (Garicia-Conesa et *al.*, 1999). Aussi, l'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente, la même chose pour l'industrie agricole et l'industrie pharmaceutique.

Une activité protéase positive chez les microorganismes se traduit par une zone lytique autour des colonies, c'est le cas de résultat obtenus chez nos 6 isolats (Fig.21).

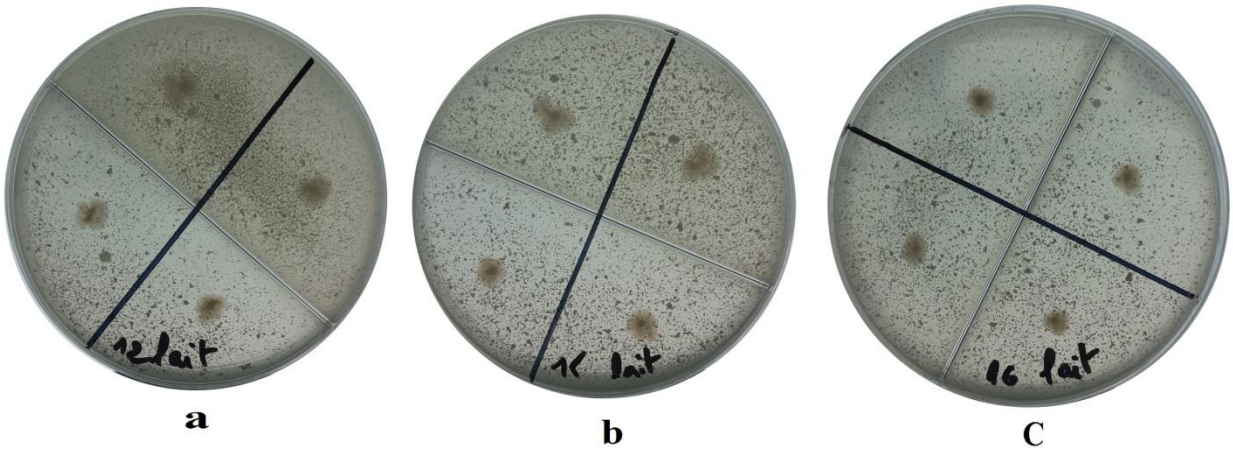


Figure21. Résultats du test Protéase pour les isolats PR-12 (a), OR-15 (b) et OR-16 (c).

La détermination du diamètre du halo formé nous a permis de classer les isolats à forte/faible productrice de protéase. Les isolats OR-5 et OR-15 ont un diamètre du halo de 11 mm et de ce fait elles sont considérées comme des fortes productrices. La deuxième classe des faibles producteurs regroupe les isolats PR-4, PR-7, PR-12 et OR-16 (Fig.22).

Nos résultats sont similaires à celles de Gulati 2020, qui a trouvé que les protéases sont produites par *Acinetobacter*.spp.

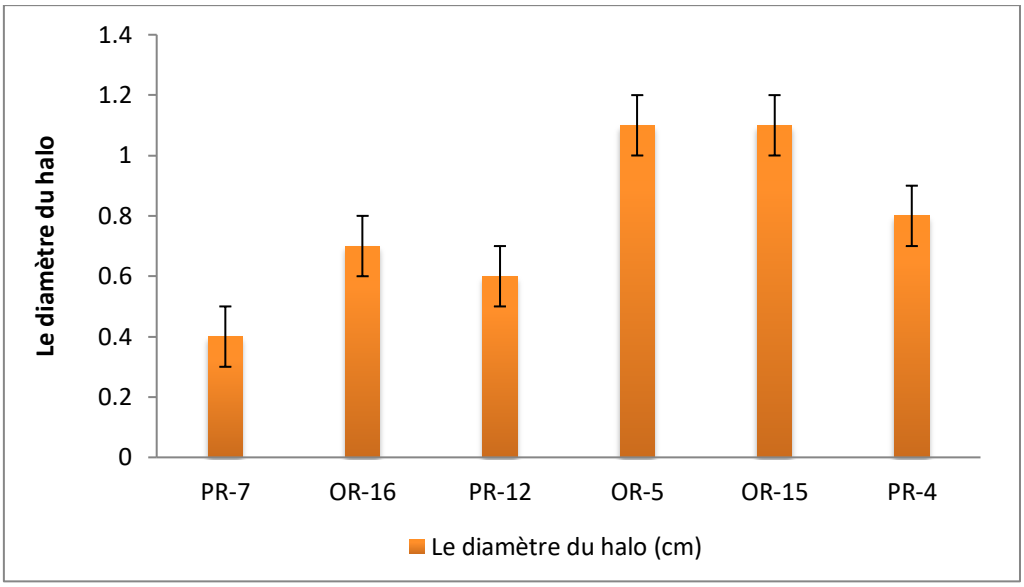


Figure 22. Diamètre du halo de dégradation (cm) obtenu par l'activité de l'enzyme protéase chez nos isolats.

4.2.3. Uréase

L'uréase est une enzyme extracellulaire qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et carbamate. La libération du carbonate d'ammonium alcalinise le milieu d'où le virage de l'indicateur coloré de l'orange en rose (Harley et Prescott, 2002).

Cette enzyme permet aux organismes d'utiliser l'urée comme source d'azote pour leur croissance, suite à l'hydrolyse de l'urée en CO2 et ammoniac (NH3) (Andrews *et al.*, 1984; Mobley et Hausinger,1989).

Nos résultats ont montré l'absence du halo rose de dégradation, donc les 6 isolats ne possèdent pas l'enzyme de l'uréase (Fig.30).

Contrairement au travaux de Spain 2009 qui a trouvé que nombreux membres *d'Acinetobacter* sont connus pour produire de l'uréase dans divers écosystèmes du sol (Spain et *al.*,2009),aussi Achal a trouvé que *l'Acinetobacter*.spp a produit une uréase significativement plus élevée que certains autres (Achal et *al.*,2011).

4.2.4. Lipase

La production de lipase est influencée par la nature et la disponibilité de la source de carbone et d'azote. Les lipases peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides et leurs substrats préférentiels qui sont les acides gras et le glycérol (Guzmán et *al.*, 2008).

Les résultats obtenus montrent que tous nos isolats ont la capacité de dégrader le lipide, cette dégradation est montrée par l'apparition d'un halo autour de la colonie(Fig.23).

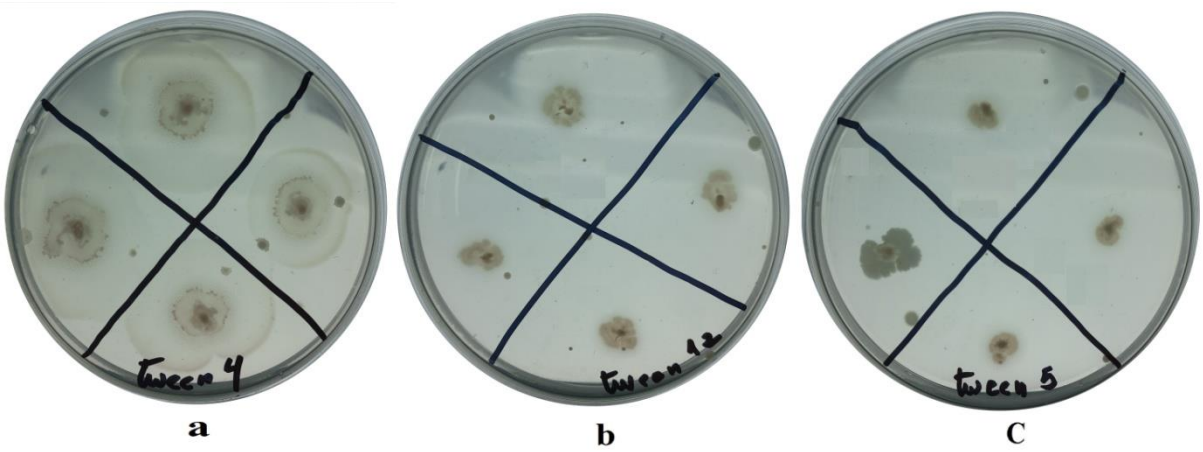


Figure23. Résultats du test lipase pour les isolats PR-4 (a), PR-12 (b) et OR-5 (c).

La comparaison du diamètre du halo de dégradation a montré que l'isolat PR-4 a une forte capacité de dégrader les lipides, les isolats OR-5, PR-7 et PR-12 ont une capacité modérée. Par contre les souches OR-15 et OR-16 ont une faible capacité de dégrader les lipides (Fig.24).

Nos résultats sont similaires à celle de Batumalaie (2018) qui a montré la présence d'une lipase recombinante produite par *Acinetobacter haemolyticus* qui a été isolée des conduites huileuses d'un moulin de palme.

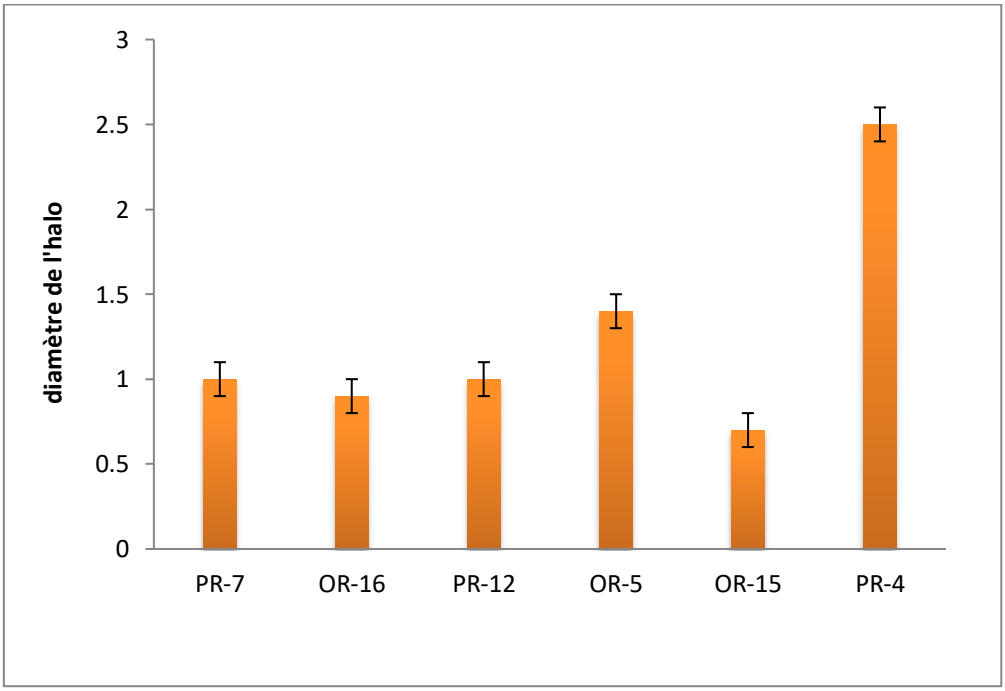


Figure24. Diamètre du halo de dégradation (cm) obtenu par l'activité de l'enzyme lipase chez nos isolats.

4.2.5. Gélatinase

Le test d'hydrolyse de la gélatine est utilisé pour détecter la capacité d'un organisme à produire de la gélatinase (enzyme protéolytique) liquéfiant de la gélatine. Dans la première réaction, les gélatinases dégradent la gélatine en polypeptides. Ensuite, les polypeptides sont convertis en acides aminés. Les cellules bactériennes peuvent ensuite absorber ces acides aminés et les utiliser dans leurs processus métabolique.

Les résultats obtenus ont montré que nos 6 isolats n'ont manifesté aucun pouvoir de production de la gélatinase. Contrairement aux résultats de Beceiro et Murali qui ont montré que des souches *d'A. baumannii* comprennent la production de gélatinase (Beceiro et *al.*, 2013 ; Murali et *al.*, 2014, Khan et *al.*, 2018b).

4.3. Activité métabolique

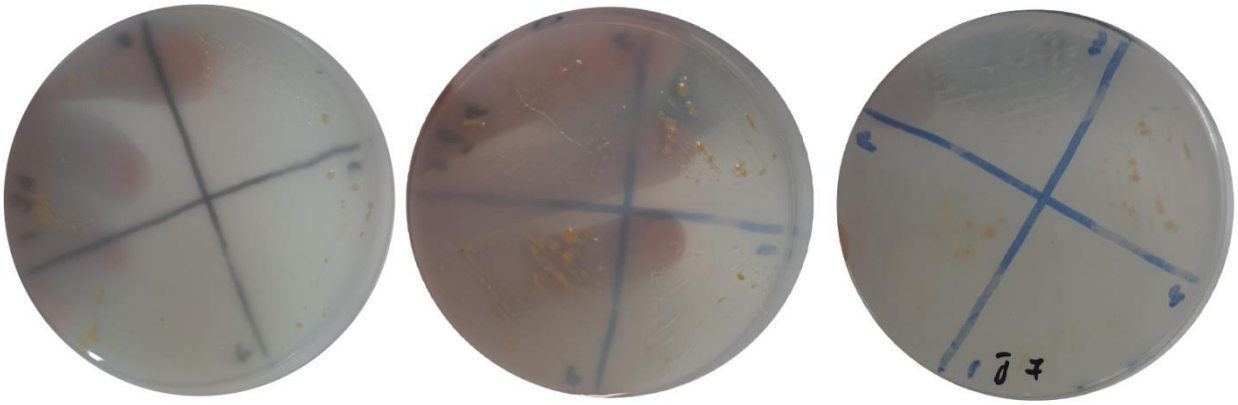
4.3.1. Fixation d'azote

Les bactéries sont les seules organismes capable d'assurer une fixation biologique de l'azote moléculaire atmosphérique (N2) et le transforme à une forme assimilable par la plante, à l'aide d'un système enzymatique complexe connu sous le nom de nitrogénase (Glick, 1995).

La croissance des colonies sur le milieu Jensen, exprime leur capacité de fixer l'azote moléculaire.

Sur l'ensemble des 6 isolats seulement 3 isolats ont été capables de fixer l'azote, il s'agit de : OR-15 et OR-16 et PR-7 avec des taux de prolifération variables (Fig.25). Étant donné que la capacité de fixer l'azote n'est pas un trait caractéristique *d'Acinetobacter*.spp (Baumann, 1968), il est normal que très peu de nos isolats démontrent la capacité de fixer l'azote.

Les bactéries possédant la capacité de fixer l'azote interviennent dans la nutrition azotée des plantes par l'assurance de la disponibilité de l'azote assimilable en échange avec le carbone libéré sous forme d'exsudats racinaires, cela constitue un avantage majeur pour les plantes. De nombreux travaux (Ding et *al.*, 2005) ont rapporté sur l'application de diazotrophes libres, telles que *Bacillus.sp* dans l'augmentation des rendements accrus de diverses cultures et l'absorption élevée des éléments tels que le phosphore et l'azote dans les plante sinoculées (Arau'jo,2008).



a b C

Figure25.Résultats du test de la fixation d'azote pour les isolats OR-15 (a) OR-16 (b) et PR-7(c).

4.3.2. Solubilisation des phosphates

Le phosphore est un élément essentiel pour le développement et la croissance biologique des organismes. Il est immobilisé dans le sol par précipitation chimique, il devient par conséquent moins soluble et indisponible aux plantes. Les microorganismes solubilisant les phosphates peuvent agir comme agents bio fertilisants en agriculture (Sharma et *al.*, 2007).

Les résultats obtenus ont montré que 5 de nos isolats ont la capacité de solubiliser le phosphate tricalcique sur le milieu NBRIP solide (Fig.26). Les isolats ont été identifiés comme solubilisatrices potentiel de phosphate sur la base de sa capacité à solubiliser le phosphate tricalcique [Ca3 (PO4)2] par la formation d'une zone de solubilisation claire autour de la colonie sur le milieu de culture gélosé NBRIP.



Figure26. Le résultat du test de la solubilisation du phosphate pour l'isolat PR-4.

Ces résultats sont similaires à celles trouvés par Gulati et *al* (2009) qui ont montré que plusieurs espèces *d'Acinetobacter* isolés à partir du sol rhizosphérique du millet perlé sont connues par un pouvoir de solubilisation élevé des phosphates organiques et inorganiques.

L'estimation de la quantité de solubilisation de phosphate de chaque isolat a été effectuée à l'aide de la détermination du diamètre du l'halo formé autour de l'isolat. La variation du diamètre de l'halo exprime-elle une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphate d'une souche à une autre (Tabl.VI).

Goldstein (2000) a démontré que la capacité de la solubilisation de phosphate est classée en 3 catégories, la première catégorie décrite comme faible ayant un diamètre allant de 0.5 à 2 mm, la deuxième comme modérée pour des diamètres compris entre 3 et 10 mm et la troisième comme forte présente du diamètre de 11à 21 mm. Trois isolats OR-5, PR-12 et OR-16 ont présenté une solubilisation modérée alors que les 2 isolats OR-15 et PR-4 ont présenté une faible solubilisation.

En effet, la quantité des phosphates solubilisés dépend de plusieurs facteurs environnementaux tels que le PH et le type de sol (Bouali, 2017).

La solubilisation des minéraux et l'augmentation de la disponibilité des minéraux sont considérées comme les traits les plus importants directement associés aux PGPR (Suresh et *al,*.2010), (Toro et *al,*.1997). Les bactéries solubilisatrices de phosphate (PSB) jouent un rôle important dans l'amélioration de la disponibilité du phosphore pour les plantes et l'augmentation du rendement des cultures (Jones & Darrah, 1994 ;Toro et *al.*, 1997).

Tableau VI. L'estimation quantitative de la capacité de solubilisation des phosphates des 6 isolats.

Les souches isolées	Diamètre du halo (mm)	Diamètre de la colonie	Indice de Solubilisation	Catégories de solubilisation des phosphates
7-PR	**0**	**0**	**0**	Négative
4-PR	**0.8**	**0.3**	**3.6**	Faible
12-PR	**2.5**	**1.5**	**2.6**	Modérée
5-OR	**2.7**	**0.3**	**10**	Modérée
15-OR	**0.6**	**0.2**	**4**	Faible
16-OR	**2.6**	**0.2**	**14**	Modérée

4.3.3. Production des sidérophores

Le fer est un micronutriment indispensable pour la majorité des organismes. En dépit de son abondance, cet élément est peu soluble et donc peu disponible dans les sols cultivés (Ma, 2005). Pour l'acquérir, les micro-organismes ont recours à la synthèse de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987). Cette synthèse n'a lieu qu'en situation de carence en fer (whipps, 2001).

Les résultats obtenus ont montré que nos 6 isolats sont capables de produire les sidérophores (Fig.27).

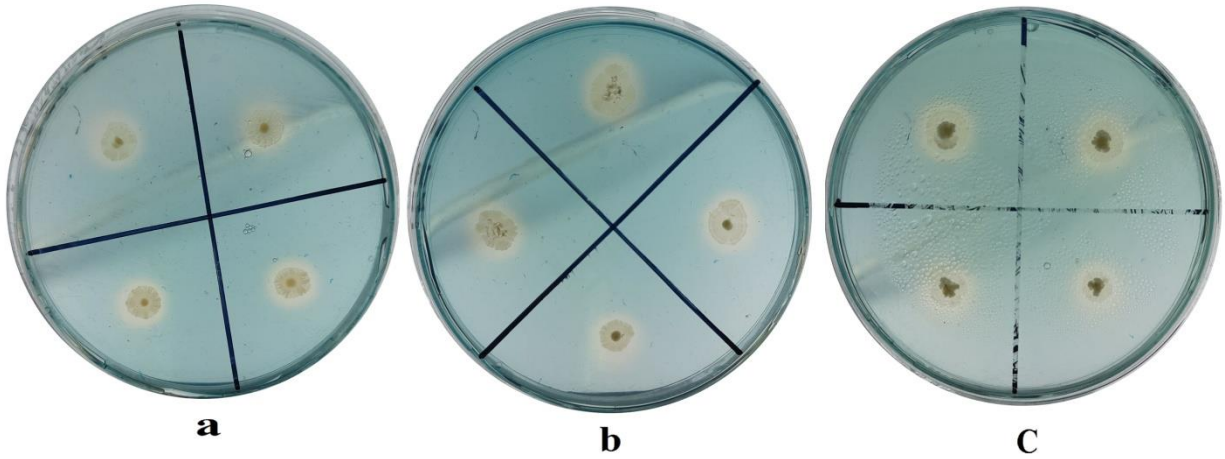


Figure 27. Résultats du test de Sidérophore pour l'isolat OR-15 (a), OR-5 (b) et PR-4 (c).

Nos résultats concordent avec les travaux de Huddedar et *al (*2002) et Indiragandhi et *al (*2008) qui ont montré que certaines souches d'*Acinetobacter* sont capables de protéger les plantes grâce à la production des sidérophores. Ces substances affectent la croissance de microorganismes phytopathogènes (*Gaeumannomycesgraminis, Fusariumoxysporum, cucumerinum, melonis, Pythiun*) par une compétition pour le fer.

Les bactéries qui peuvent produire des sidérophores peuvent stimuler la croissance des plantes et aider les plantes à acquérir suffisamment de fer pour une croissance optimale (Glick et *al.,* 1995; Chabot et *al.,* 1996 ; Rajkumar et *al.,* 2006).

Les travaux de Mihara ont montré que les souches d'*Acinetobacter* produisant des sidérophores dans la rhizosphère du millet perlé peuvent démontrer l'inhibition in vitro de la croissance de *F. oxysporum*. Les sidérophores d*'Acinetobacter* sont appelés « acinetobactins » et sont principalement constitués de histamine (Mihara et *al*., 2004).

4.3.4. Production d'acide cyanhydrique

Certaines bactéries qualifiées de PGPR produisent des antibiotiques volatiles, dont le plus important est l'HCN qui inhibe l'enzyme cytochrome oxydase de nombreux organismes. Les souches productrices possèdent une cytochrome oxydase alternative résistante à l'HCN, et sont relativement insensibles à ce dernier (Voisard et *al.*, 1989).

Les résultats obtenus ont montré que 4 de nos isolat (PR-7, PR-4, OR-15 et OR-16) sont révélés comme producteurs d'acide cyanhydrique par le changement de la couleur jaune vers la couleur orange (Fig.28).

L'absence de production chez certains isolats (PR-12 et OR-5) serait due à la perte des gènes responsable de la biosynthèse.

La production de HCN par les *Acinetobacter* est impliquée dans la suppression de différents d'agents pathogènes. Il agit directement sur les cellules en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire. Il contribue également à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci (Bulmer et Haas, 2000).

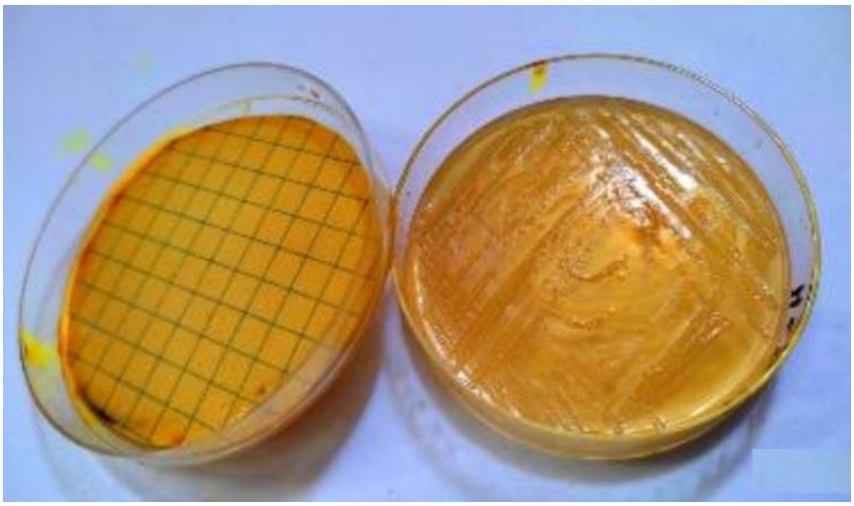


Figure 28. Résultat de test de Production HCN pour l'isolat PR-4.

4.3.5. Production d'acide indole acétique (AIA)

Les bactéries qui peuvent produire de l'IAA, qui favorise le développement des racines et améliore l'absorption du fer et du phosphore (Ali et al. 2009).

Les 6 isolats retenus ont été testées pour leur capacité de produire l'AIA sur le milieu LBT. Après incubation à 37°C pendant 4 jours, on observe un résultat négatif pour les 6 isolats.

Contrairement à nos résultats, il existe quelques études (Gulati et *al.*, .2009 ;Huddedar et *al.*, 2002) sur l'implication du genre *Acinetobacter* dans la production d'AIA et son effet sur la croissance des plantes. Par conséquent, la multiplication de ces populations bactériennes dans la

rhizosphère avec la libération d'IAA peut améliorer la rhizogenèse. Alternativement, la production d'IAA peut être une stratégie importante pour la détoxification de l'excès de tryptophane libéré dans la rhizosphère (Teixeira et *al.*, 2007).

Conclusion

L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes. En général ces bactéries rhizosphériques exercent sur les plantes de différents effets influençant leurs développements en améliorant leurs compétitivités et leurs réponses aux facteurs de stress extrêmes.

Notre étude a été fondée sur trois objectifs principaux. Le premier consistait à un isolement d'une flore bactérienne associée à la rhizosphère des plantules de l'orge et du blé cultivées dans la wilaya d'EL Menea. Le deuxième objectif a visé la sélection des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* en se basant sur des critères morphologiques et biochimiques tandis que le troisième objectif consistait à l'évaluation de la capacité des isolats comme étant des agents de promotion de croissance des plantes.

La sélection primaire des isolats appartenant au genre *Acinetobacter* a été effectuée on se basant sur leurs caractères culturaux (colonies vertes sur le milieu Hektoen), après réalisation du test oxydase et la coloration de Gram. Un résultat négatif aux trois tests retenus, nous a permis de sélectionner 6 isolats. 3 isolats à partir du sol rhizosphérique de l'orge et 3 isolats à partir du sol rhizosphérique du blé. La galerie API 20 E nous a permis de s'assurer que notre sélection d'isolats appartient au genre *Acinetobacter*.

Nos 6 isolats ont révélé une multi-résistance aux antibiotiques vus leur capacité à résister aux différents antibiotiques (13 antibiotiques) testés. Ils ont montré une résistance de 100% à la β-lactamines, aux aminosides et à la fluoroquinolone à l'exception de Vancomycine, Chloramphenicol et Erythromycine qui garde une sensibilité à 100%.

Les 6 isolats d'*Acinetobacter* sélectionnés ont été soumis à une caractérisation physiologique (température, pH, salinité et stresse hydrique) dans laquelle nos résultats ont montré que nos isolats sont thermotolérantes, acidophiles, halophiles. Puis une caractérisation métabolique dans laquelle les isolats ont montré une capacité moyenne de fixer l'azote atmosphérique (50%) mais une grande capacité de solubiliser les phosphates (83%) et de produire des sidérophore (100%) et de l'HCN (100%). Par ailleurs, ils ont montré une forte activité

enzymatique (amylase, protéase et lipase). Ils sont de ce fait des bons candidats pour une utilisation comme étant des biofertisants, des agents de biocontrôle ou même dans l'industrie.

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

- Une identification moléculaire du genre Acinetobacter.
- Etudier leur capacité métabolique dans les conditions de stress.
- L'utiliser sur des plantes comme étant des PGPR.
- Contrôler l'intégration des Acinetobacter dans la plante et son effet au temps que bactérie endophytes pour le consommateur.

Références bibliographiques

Achal, V., Pan, X., 2011. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. Curr. Microbiol. 62, 894–902.

Acharya, R.V., Satyamoorthy, K., 2014. Characteristics of microbial drug resistance and its correlates in chronic diabetic foot ulcer infections. J. Med. Microbiol.

Ajao, A.O., Robinson, G., Lee, M.S., Ranke, T.D., Venezia, R.A., Furuno, J.P., Harris, A.D., and Johnson, J.K. (2011). Comparison of culture media for detection of Acinetobacter baumannii in surveillance cultures of critically-ill patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. 30, 1425–1430.

Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S (2009) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of Triticum aestivum L. Lett Appl Microbiol 48:542–547.

ANDREWS, R. K., BLAKELEY, R. L., & Zerner, B. U. R. T. (1984). Urea and urease. *Advances in inorganic biochemistry*, (6), 245-283.

Aneja, K. R. (2003). Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology. New Age International Publishers, New Delhi, India.

Anton Hartmann, Michael Rothballer et Michael Schmid, 2008.« Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research », Plant and Soil, vol. 312, n o 1-2, novembre, p. 7.

Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2006). Production and characterization of cellulose produced by Bacillus pumilus EB3. Int. J. Eng. Technol, 3(1), 47-53.

Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2006). Production and characterization of cellulose produced by Bacillus pumilus EB3. *Int. J. Eng. Technol*, *3*(1), 47-53.

Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, *166*(1), 3-16.

Bach, H. J., & Munch, J. C. (2000). Identification of bacterial sources of soil peptidases. Biology and Fertility of Soils, 31(3-4), 219-224.

Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biology & Biochemistry 30: 1225-1228.

Bashan, Y, Puente, M. E., de Bashan, L.E., et Hemandez, J.P. (2008).Environmental use of plant growth-promq.ting bacteria. In A.E. Barka et C.Clément. Plant-Microbe.

Baumann, P., Doudoroff, M. & Stanier, R. Y. (1968). A study of theMoraxella group. II. Oxidative-negative species (genusAcinetobacter). J Bacteriol 95, 1520–1541.

Baumann, P., Doudoroff, M., and Stanier, R.Y. (1968). A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). J. Bacteriol. 95, 1520–1541.

Beijerinck, M.W. (1911). Pigments as products of oxidation by bacterial action. In KNAW, Proceedings, pp. 1910–1911.

Bergogne-Bérézin E, 2008. Importance of Acinetobacter spp. Acinetobacter biology and pathogenesis. Paris Springer: 1-18.

BERRY, E. D., FOEGEDING, P. M. (1997). *Cold Temperature Adaptation and Growth of Microorganisms. Journal of Food Protection, 60(12), 1583–1594.*

Bhattacharyya, P. N. et D. K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J. Microbiol.Biotechnol,. 28: 1327–1350. Curr. Microbiol., 56: 140- 144.

Boukhalfa S, 2014. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic bactériologique et l'étude des mécanismes de résistance d'Acinetobacter baumanni isolé au CHU de Batna. Université de Batna El hadj lakhdar. Thèse de Doctorat.)

Bousseboua H, 2002. Techniques d'étude des bactéries. Dans Microbiologie générale. Université Mentouri, Constantine (Algérie), 145-157.

Bouvet, P.J.M., and Grimont, P.A.D. (1986). Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and Emended Descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 36, 228–240.

Brisou, J., and Prevot, A.R. (1954). [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group]. Ann. Inst. Pasteur 86, 722–728 .

Carrim, A. J. I., Barbosa, E. C., & Vieira, J. D. G. (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of Jacaranda decurrens Cham.(Carobinha-do- campo). Brazilian Archives of Biology and Technology, 49(3), 353-359.

Chabot, R., Antoun, H., & Cescas, M. P. (1993). *Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. Canadian Journal of Microbiology, 39(10), 941–947.*

Chan, J.Z.-M., Halachev, M.R., Loman, N.J., Constantinidou, C., and Pallen, M.J. (2012). Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus Acinetobacter. BMC Microbiol. 12, 302.

Cherif Hafsa ,2014. Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec Bacillus sp. et Pantoea agglomerans isolées de sols arides. Thése de doctorat. Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Université Ferhat Abbas Sétif 1.

Christensen, W. B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *Journal of bacteriology*, *52*(4), 461.

Cosgaya, C., Marí-Almirall, M., Van Assche, A., Fernández-Orth, D., Mosqueda, N., Telli, M., Huys, G., Higgins, P.G., Seifert, H., Lievens, B., et al. (2016). Acinetobacter dijkshoorniae sp.

nov., a new member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Dar, GH (2009). *Microbiologie et biochimie des sols* . New India Publishing.

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H.and Whitman W. B. (Eds) (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The *Firmicute*(2e éd., Vol. 3, pp. 63–67). New York, États-Unis: Springer.

Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., et Chen, S. (2005). Isolement et identification des bacilles fixateurs d'azote des rhizosphères végétales de la région de Pékin. Journal of Applied Microbiology , 99 (5), 1271-1281.

Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., et Chen, S. (2005). Isolement et identification des bacilles fixateurs d'azote des rhizosphères végétales de la région de Pékin. *Journal of Applied Microbiology , 99* (5), 1271-1281.

Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., and Benade, S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of Acinetobacter spp.: An Overview. Microbes Environ. 26, 101–112.

Finnegan, S. & Droser, (2005). M. L. Relative and absolute abundance of trilobites and rhynchonelliform brachiopods across the Lower/ Middle Ordovician boundary, eastern Basin and Range. *Paleobiology* 31, 480–502

Gholami, A., Biyari, A., Gholipoor, M., et Rahmani, H.A. (2012). Growth promotion of maize (Zea mays L.) by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions Communications in soil science and plant analysis. 43: 1263-1272 .

Gholami, A., Biyari, A., Gholipoor, M., et Rahmani, H.A. (2012). Growth promotionof maize(Zea mays L.) by plant-growth promoting rhizobacteria under fieldconditionsCommunications in soil science and plant analysis. 43: 1263-1272 .

Gibson, F., and Magrath, D. J,1969. Biochim. Biophys. Acta 192, 175–187.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109– 117.

Govind Gupta, Shailendra Singh Parihar, Narendra Kumar Ahirwar, Sunil Kumar Snehi and Vinod Singh ,2015.Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture, MicrobBiochemTechnol, 7:2

Gulati, A., P. Vyas, P. Rahi, and R. C. Kasana. 2009. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent Acinetobacter rhizosphaerae strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. Curr. Microbiol. 58: 371-377.

Guzmán M.N., Vargas V.A., Antezana H. and Svoboda M. (2008). Lipolytic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganisms isolated from lagunaverde, bolivia. Centro de Biotecnología − UMSS, Cochabmamba - Bolivia ; Laboratoire de Chimie Biologique − Université Libre de Bruxelles, Belgium. 25(1)

Haas, D., et Défago, G. 2005. Lutte biologique contre les agents pathogènes du sol par des pseudomonades fluorescentes. Nat Rev Microbiol; 3 : 307–319.

Harley, J., & P Harley, J. (2002). *Laboratory exercises in microbiology*, 5th Eds, pp.449.

Hawkey, P., and Bergogne-Berezin, E. (2006). Acinetobacter spp. In Principles and Practice of Clinical Bacteriology, S.H. Gillespie, and P.M. Hawkey, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 231–244.

Hoorman, J. J., & Islam, R. (2010). Understanding soil microbes & nutrient Recycling. Fact Sheet for Agriculture and Natural Resources.

Huddedar S, Shete A, Tilekar J, Gore S, Dhavale D, Chopade B (2002) Isolation, characterization, and plasmid pUPI126-mediated indole-3-acetic acid production in Acinetobacter strains from rhizosphere of wheat. Applied Biochemestry and Biotechnology 102: 21-39.

Huddedar, S. B., A. M. Shete, J. N. Tilekar, S. D. Gore, D. D. Dhavale, and B. A. Chopade. 2002. Isolation, characterization and plasmid pUPI126 mediated indole 3 acetic acid (IAA) production in Acinetobacter strains from rhizosphere of wheat. Appl. Biochem. Biotechnol. 102: 21-29

Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Sa TM (2008) Characterization of plant growth–promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae). Current Microbiology 56: 327-333.

Jawad, A., Hawkey, P.M., Heritage, J., and Snelling, A.M. (1994). Description of Leeds Acinetobacter Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important Acinetobacter spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. J. Clin. Microbiol. 32, 2353–2358.

Joffin, J. N., & Leyral, G. (2005). Microbiologie Technique Tome 1" Dictionnaire des techniques". Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine, 171- 189.

Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006). Microbiologie Technique Tome 1" Dictionnaire des techniques". Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine, 368.

Joly-Guillou, M. L. 2005. Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter. Clin Microbiol Infect 11:868-73.

Jones, D. L. and P. R. Darrah. 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant Soil 166: 247-257

Jung, J., and Park, W. (2015). Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol.

Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M, Wani PA ,2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. Arch Agron Soil Sci 56:73-98

Khan, D.M., Rao, I.V., Moosabba, M.S., 2018b. Comparative study of gelatinase activity .

Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M., 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ. Chem. Lett. 7, 1–19.
Kim J, D.C,1994.Rees Nitrogenase and biological nitrogen fixation Biochemistry, 33 (), pp. 389–397.

Kim J, D.C,1994.Rees Nitrogenase and biological nitrogen fixation Biochemistry, 33 (), pp. 389–397.
Kim, S. Y., Lim, J. H., Park, M. R., Kim, Y. J., Park, T. I., Seo, Y. W., ... & Yun, S. J. (2005).

Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots

under saline stress. BMB Reports, 38(2), 218-224.

Kloepper JW, Tuzun S, Liu L, Wei G (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. In: Lumsden RD, Waughn JL (eds) Pest management: biologically based technologies. American Chemical Society Books, Washington, DC, pp 156–165 .

Kuan KB, Othman R, Rahim KA, Shamsuddin ZH (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. PloS one 11:e0152478.

Kuddus M, Ramteke PW. Cold-active extracellular alka-line protease from an alkaliphilicStenotrophomonasmaltophilia: production of enzyme and its industrialapplications. Can J Microbiol 2009;55:1294—301

Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A ,2008.Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. Plant Soil 304: 35- 44.

Kurcik-Trajkovska, B. (2010). Acinetobacter spp. - A Serious Enemy Threatening Hospitals Worldwide. Maced. J. Med. Sci. 2, 157–162.

Lessel EF. 1971 International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, MariaIsabel Hotel, Mexico City, Mexico. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Apr 1;21(2):213–4.

Lugtenberg B, Kamilova F,2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol 63:541–556 .

Ma, J. F. 2005. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Crit. Rev. Plant Science*, 24: 267-281.
Mansour, F. A., Aldesuquy, H. S., & Hamedo, H. A. (1994). Studies on plant growth regulators and enzymes production by some bacteria, 14 (2), 281-288.

Martinez-Salgado, M. M., Gutiérrez-Romero, V., Jannsens, M., &Ortega-Blu, R. (2010).Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology (pp. 319-328) .
master.Ed.Dunod. Paris.PP.480-481.Molecular Plant-Microbe Interactions 5, 4-13..

Meyer,J. J.,Staley,J.T., et Lorey.,2004.Cour de questions revision. PCEM.PCEP.2 ème cycle
Mihara K, Tanabe T, Yamakawa Y, Funahashi T, Nakao H, Narimatsu S, Yamamoto S. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by Acinetobacter baumannii ATCC 19606T. Microbiology. 2004 Aug 1;150(8):2587–97.

Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *53*(1), 85-108.

Morgan J. A. W., Bending G. D. and White P. J.(2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany.56 : 1729- 1739.
Munees Ahemad,MulugetaKibret , 2013 .Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, Journal of King Saud University – Science, January Volume 26, Issue 1, Page 1–20.
Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, *25*(2), 239-250.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS microbiology Letters, 170(1), 265- 270.

Naznin HA, Kimura M, Miyazawa M, Hyakumachi M,2012. Analysis of volatileorganic compounds emitted by plant growth promoting fungus phoma sp. GS8- 3 for growth promotion effects on tobacco. Microbe Environ 28: 42-49 .

Neilands, J.B., 1995. Siderophores structure and function of microbial iron transport compounds. J. Biol. Chem. 270, 26723–26726.

Nemec, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., Van Der Reijden, T.J.K., Jezek, P., and Vaneechoutte, M. (2003). Acinetobacter parvus sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1563–1567.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., and Higgins, P.G. (2015). Acinetobacter seifertii sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 934–942.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., and Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU). Res. Microbiol. 162, 393–404.

Nemec, A., Musílek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerová, M., van der Reijden, T.J.K., Zdráhal, Z., Vaneechoutte, M., and Dijkshoorn, L. (2010). Acinetobacter bereziniae sp. nov. and

Acinetobacter guillouiae sp. nov., to accommodate Acinetobacter genomic species 10 and 11, respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 896–903.

Ningthoujam D. S., Kshetri P., Sanasam S and Nimaichand.S . (2009). Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. *World Applied Sciences Journal.* 7: 907-916.

Paul ET Clark, 1996 *Soil Microbiology and Biochemistry* Academic Press: 2nd Edition, 1996. Price h/b: 29.95, ISBN 0 12 546806 7.

Peleg, A.Y., Seifert, H., and Paterson, D.L. (2008). Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21, 538–582.

Ramey BE, Matthysse AG, Fuqua C ,2004. The FNR-type transcriptional regulator SinR controls maturation of Agrobacterium tumefaciens biofilms. Mol Microbiol 52:1495–1511.

Rhinehart E, Walker S, Murphy D, O'Reilly K, Leeman P, 2012. Frequency of outbreak investigations in US hospitals: Results of a national survey of infection preventionists. American Journal of Infection Control; 40: 2-8.

Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., and Vila, J. (2012). The Acinetobacter baumannii Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. Front. Microbiol. 3, 148.

Rokhbakhsh-Zamin F, Sachdev D, Kazemi-Pour N, Engineer A, Pardesi KR, Zinjarde S, Dhakephalkar PK, Chopade BA (2011) Characterization of plant-growth-promoting traits of Acinetobacter species isolated from rhizosphere of Pennisetum glaucum. Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 556- 566.

Sagervanshi, A., Kumari, P., Nagee, A., & Kumar, A. (2012). Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from Anand agriculture soil. Life, 50, 245.

Salma Taktek ,2015. Dissolution biologique des phosphates : Interaction bactéries – mycorhizes. Thèse de doctorat . université LAVAL québec canada .

Sarode Prashant D, Rane Makarand R, Chaudhari Bhushan L, Chincholkar Sudhir B (2009) Siderophoregenic Acinetobacter calcoaceticus isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. Malaysian Journal of Microbiology 5: 6-12.

Schwartzbord J. 1985. Bactériologie des milieux aquatiques, aspects écologiques et sanitaires, In Martin G., point sur l'épuration des effluents : Eau-Air, 2.2, 47-113.

Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry, 160(1), 47-56.

Seifert, H., and Dijkshoorn, L. (2008). "Overview of the Microbial Characteristics, Taxonomy, and Epidemiology of Acinetobacter."In Acinetobacter Biology and Pathogenesis, E. Bergogne-Bérézin, H. Friedman, and M. Bendinelli, eds. (Springer US), pp. 19–45.

Sharma, A. et B. N. Johri. 2007. Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent Pseudomonas strain GRP3A in mung bean (Vigna radiata L. Wilzeck). *Microbiol. Res.,* 158: 77-81

Shilev S ,2013. Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. Chappitre5 plant microbe symbiosis fundamentals and advance naveenkumararora editor .

Singh Y., (1973). Lipase Production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in Solid State Fermentation Using Ground Nut Oil Cakes as Substrate. *Current Research Journal of Biological Sciences.* (4): 241-245.

Singh, S.K., Singh, S.K., Tripathi, V.R., Khare, S.K., Garg, S.K., 2011. Comparative one-factor-at-a-time, response surface (statistical) and bench-scale bioreactor level optimization of thermoalkaline protease production from a psychrotrophic Pseudomonas putida SKG-1 isolate. Microb. Cell Factories 10, 114.

Sitepu, I. R., Hashidoko, Y., Santoso, E., & Tahara, S. (2007, August). Potent phosphate-solubilizing bacteria isolated from dipterocarps grown in peat swamp forest in Central Kalimantan and their possible utilization for biorehabilitation of degraded peatland. In Proceedings of the international symposium and workshop on tropical Peatland, Yogyakarta (pp. 27-29).

Spain, A.M., Krumholz, L.R., Elshahed, M.S., 2009. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. Int. Soc. Microb. Ecol. J. 3, 992–1000. techniques" (4è éd.). Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine.

Stevenson, H. H. and J. C. Jarillo (1986). 'Preserving entrepreneurship as companies grow'.

Journal of Business Strategy, 6, pp. 10-23.

Suresh, A., P. Pallavi, P. Srinivas, V. Praveen Kumar, S. Jeevan Chandra, and S. Ram Reddy. 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent Pseudomonas associated with some crop plants. Afr. J. Microbiol. Res. 4: 1491-1494.

Teixeira, D. A., A. C. Alfenas, R. G. Mafia, E. M. Ferreira, L. D. Siqueira, L. A. Maffia, and A. H. Mounteer. 2007. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. Environ. Microbiol. 38: 111-123

Toro, M., R. Azcon, and J. M. Barea. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (sup32) P and nutrient cycling. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4408-4412.

Touchon, M., Cury, J., Yoon, E.-J., Krizova, L., Cerqueira, G.C., Murphy, C., Feldgarden,

M., Wortman, J., Clermont, D., Lambert, T., et al. (2014). The genomic diversification of the whole Acinetobacter genus: origins, mechanisms, and consequences. Genome Biol. Evol. 6, 2866–2882.

Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Nemec, A., Kämpfer, P., and Wauters, G. (2011). Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods*. 714–738.

Vegasa, B. Nieves, Acientobacter spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos yepidemiológicos, Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 25 (2)(2005).

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Défago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonasfluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.*, 8, pp.351-358.

Whipps JM. (2001). Microbial Interaction and Biocontroll in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52, 487-511.

Yurekli *et al*., (2003) Synthesis of phytochelatins in Heliathus annuus is enhanced by cadmium nitrate. Acta Botanica Croatica 62(1):21-25.

Zahoun A, Dao I, Karfo R, Essayagh T, Sekhsokh Y, Bousta M, Elhamzaoui S, 2010. Méningite nosocomiale postopératoire à *Acinetobacter baumannii* multirésistant en neurochirurgie : à propos d'un cas nosocomial. Pathologie Biologie. 29-31.

Zehnder GW, Murphy IF, Sikora EJ, Kloepper JW ,2001. Application to rhizobacteria for induced resistance. Eur J Plant Pathol 107:39–50.

Annexes

Annexe 01 : Appareillages et verreries

Appareillage	Verreries	Autre matériel
• Autoclave • Bain marie • Balance électrique • Etuve • Réfrigérateur • Congélateur • Microscope optique • pH-mètre • Plaque chauffante • Agitateur rotatif Shaker vortex	• Becher • Boite de pétrie • Erlenmeyer • Fiole • Flacons • Lame et lamelles • tube à essai	• Anses de platine • Papier aluminium •Papier parafilm • Pince en platine • cryotube •Tube Eppendorf • Spatule • Bec bunsen • Gants jetables • Marqueurs • Micro pipette • Portoir pour tube

Annexe 2 : Composition des solutions

Eau physiologique stérile 0.9%

NaCl …… 9g

Eau distillé …….. 1000mL

Cristal violet

Violet de gentiane …….. 1g

Acide phénique …….. 2 g

Alcool à 95% ……. 10ml

Eau distillé …… 100ml

Lugol

I2 …… 1g

KI …….. 2g

Alcool à 95% ……...10ml

Eau distillée ……100ml

Fuchsine

Fuchsine basique ……. 1g

Acide phénique ……... 5g

Alcool à 95% ……....10ml

Eau distillée ……100ml

Solution d'urée

Urée ……20g

Eau distillée ……1000ml

Solution picrate de sodium

Acide picrique …… …….. **0.5 g**

Carbonate de sodium …… …. **20 g**

Annexe 03: Composition des milieux de culture utilisés.

Technique de préparation

Pour la préparation des milieux de culture, les ingrédients sont pesés à l'aide d'une balance puis mélangés au volume d'eau distillée (1000ml), homogénéisés et dissoutes totalement par chauffage et agitation sur une plaque chauffante. Après refroidissement à 50-60 °C, le milieu est distribué dans des flacons stériles à 250 ml en vue d'être stérilisé à 120°C pendant 15-20 min.

Certains milieux nécessitent l'adjonction de produits qui ne supportent pas l'autoclavage (solution d'urée, tryptophane…), ces derniers doivent être stérilisés par filtration à l'aide d'un micro-filtre stérile de 0.22 µm de diamètre avant d'être apportés dans la gélose en surfusion.

TSB

Extrait pancréatique de la caséine…….……0.17g

Digestion papaique de Farine de soja.....…….....0.3g

NaCl…….....0.5g

K2HPO4…….....0.25g

Glucose Monohydrate…….....0.25g

TSA 1/10

TSB……..……...3g

Agar …….……15g

TSA à amidon 1%

TSB ……..…..3g

Amidon ……..……10g

Agar ……..…….15g

Gélose au tween 80

peptone…….……10g

NaCl …….……5g

CaCl2 2H2O……..……....0.1g

Tween 80 ……1%, v/v

l'Agar……..……18g

Milieu à base de gélatine

TSB……..……3g

Gélatine …….……12g

Agar ……..15g

Milieu Jensen

CaCO3…….2g

K2HPO4……..1g

MgSO4.7H2O……..0.5g

NaCl…….0.5g

FeSO4.7H2O……0.1g

Na2MoO4.2H2O……..0.005g

Glucose…….....20g

Agar …….15g

Milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's phosphate)

Glucose ……10g

Ca3(PO4)2 ……...5g

(NH4)2SO4 …….0.1g

NaCl ……0.2g

MgSO4.7H2O …….0.25g

KCl ……..0.2g

Agar ……15g

Mannitol et mobilité

Mannitol …… 2g

Peptone ……..……20g

Nitrate K……. 1g

Rouge de phenol 4% ……. 4 ml

Agar ……..4 g

Milieu Chrome Azurol Sulphonate

Solution CAS …….75 ml

TSB ……..3 g

Agar ……..…15 g

Annexe 04 : Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.

- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzen.

- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.

- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

- Ajouté du Lugol pendant 60 secondes.

- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

- Décoloré avec l'alcool 95%. Pendant 15 min.

- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

- Ajouter la fuschine et laisser pendant 60 secondes.

- Laver à l'eau.

- Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à au grossissement (× 100). Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe 05: les résultats de la galerie API 20 E

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	MEL	AMY	ARA
12pr1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	+
7pr1+pr2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+
4pr1+pr2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+
5or1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	+
15 or2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+
16 or2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	+