

## DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

# Mémoire de fin d'études

Présenté par

*Beddani Sara*

Pour l'obtention du diplôme de

## Master en Science biologique

**Spécialité: Microbiologie Appliquée**

Thème

### Caractérisation du potentiel PGP des *Pseudomonas* rhizosphériques

#### Devant le Jury

Président : *Sidhoum.W*

MCA

Université de Mostaganem

Examineur : *Djibaoui.R*

Pr

Université de Mostaganem

Encadreur : *Hamoum.H*

MCB

Université de Mostaganem

*Thème réalisé au laboratoire de Pédagogie de Microbiologie n°01*

**Année Universitaire 2021/2022**

# Remerciment :

Avant toute chose, nous remercions **ALLAH** qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser cette mémoire.

Notre encadreur le *Dr Hamoum Hakím* pour la confiance que nous a accordé en acceptant cet encadrement.

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de cette mémoire, pour son aide, ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de cette mémoire.

Nous remercions *Mm Sidhoum Warda* d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.

Nous remercions *Pr Djibaoui Rachid* qui a accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons aussi à remercier *Mm MJAHEB Saïda* pour ses encouragements, ses conseils, qui ont été pour nous un grand apport.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie, *Abaidi* et *Hafida* pour leur patience, leur aide précieux et leurs valeureux conseils.

Finalement, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

À vous tous, un grand *Merci*.

**SARA BEDDANI**

## *Dédicace :*

*Avant tout, je remercie "ALLAH" qui m'a donné le courage et la volonté de terminer cette mémoire.*

*Je dédie ce travail aux plus proches à mon cœur :*

*À mes chers parents qui m'ont soutenue pour réaliser mon rêve après de longues années d'études, qu'ALLAH les protège et leur prête santé et longue vie.*

*À mes très chers frères*

*À mon mari.*

*À mon fils*

*À toute ma famille : BEDDANI et MEKRARBECHE.*

*SARA BEDDANI*

# Sommaire

Remerciement

Sommaire

Liste des abréviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction.....01

## Chapitre I. Revue bibliographique

**I.1.Généralité sur le rhizosphère.....03**

I.1.2. Définition.....03

I.1.3. Activité de la rhizosphère.....03

I.1.4. La microflore de la rhizosphère.....04

I.1.5. Les bactéries rhizosphérique ou rhizobactéries.....04

**I.2.Les rhizobactéries promotrice de la croissance des plantes (PGPR).....04**

I.2.1. Effet directe des PGPR sur la plante.....05

I.2.1.1. Fixation d'azote.....05

I.2.1.2. Solubilisation du phosphate.....06

I.2.1.3. Solubilisation du potassium .....06

I.2.1.4. Production des phytohormones .....06

I.2.1.4.1. Production de l'acide indole acétique.....07

I.2.1.4.2. Production de l'Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase.....07

I.2.2. Effet indirect des PGPR sur les plantes.....08

I.2.2. 1. Productions des antibiotiques.....08

I.2.2.2. Induction d'un système de résistance.....09

I.2.2.3. Effet phytoprotectrice Sidérophores.....09

**I.3.La diversité taxonomique des PGPR .....10**

I.3.1- *Pseudomonas* spp.....10

I.3.1.1. Caractéristiques générales.....10

I.3.1.2. La classification phylogénétique.....11

I.3.1.3. Habitat des *Pseudomonas*.....11

I.3.1.4. *Pseudomonas* dans la rhizosphère .....11

I.3.1.5. *Pseudomonas* comme PGPR .....13

## Chapitre II. Matériels et méthodes

**II.1.Localisation de la zone d'étude.....15**

II.1.2. Prélèvement des échantillons du sol.....16

**II.2.1.isolement des *Pseudomonas*.....16**

II.2.1.1. Compartiment ectophyte.....16

II.2.1.2. Compartiment épiphyte.....17

II.2.1.3. Compartiment endophyte.....18

**II.2.2. purification et conservation des isolats.....19**

**II.2.3. Identification des isolats.....19**

II.2.3.1. Etude macroscopique.....19

II.2.3.2. Coloration de gram.....20

II.2.3.3. la mobilité.....20

II.2.3.4.catalase.....	20
II.2.3.5.oxydase.....	21
II.2.3.6.le type respiratoire .....	21
II.2.3.7. Mise en culture des <i>Pseudomonas</i> à 4°C et 42°C.....	21
<b>II.3.Evaluation des activités PGP.....</b>	<b>21</b>
II.3.1.Evaluation de la production d'AIA par les isolats.....	21
II.3.1.1.Réactivation des isolats conservés.....	21
II.3.1.2.Production de l'acide indole acétique (AIA).....	22
II.3.2.solubilisation du phosphate.....	23
II.3.3.production d'acide cyanhydrique (HCN).....	24
II.3.4.fixation d'azote.....	24
II.3.5.Solubilisation du zinc.....	24
<b>II.4. Etude statistique .....</b>	<b>25</b>
<b>Chapitre III. Résultats et discussion</b>	
<b>III.1.Résultats.....</b>	<b>26</b>
<b>III.1.1 Isolement et identification des isolats rhizosphériques.....</b>	<b>26</b>
III.1.1.1. caractérisation morphologique des isolats bactériens.....	26
III.1.1.2. Exam microscopique ( coloration de gram).....	27
III.1.1.3.Caractéristique biochimique.....	27
<b>III.1.2. Caractéristiques promotrices de la croissance végétale.....</b>	<b>28</b>
III.1.2.1.Production de l'acide indole acétique(AIA).....	28
III.1.2.2.Solubilisation du phosphate.....	30
III.1.2.3.production d'acide cyanhydrique HCN.....	31
III.1.2.4.Fixation d'azote.....	32
III.1.2.5.solubilisation du zinc.....	33
<b>III.2.Discussion .....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographique</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

**ACC** : Aminocyclopropane 1-carboxilique.

**AIA** : Acide Indole -3- Acétique.

**ARNr** : acide ribonucléique ribosomique.

**BR** :Bunt et Rovira.

**Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>**: Phosphate inorganique.

**DAPG** : diacetylphloroglucinol.

**DO** : Densité optique.

**ES** : efficacité de solubilisation.

**G** : gramme.

**GN** : gélose nutritif.

**HCN** : acide cyanhydrique.

**K** : potassium.

**LB** : Milieu Luria-Bertani.

**LPS** : lipopolysaccharide.

**Min** : minute

**ml** : millilitre.

**N<sub>2</sub>** : Azote.

**nm** : nanomètre.

**P** : Phosphore.

**P** : pseudomonas.

**PCA** : de l'anglais "Plate Count Agar".

**PGP** : De l'anglais "plant growthpromote".

**PGPR** : De l'anglais "Plant growthpromotingrhizobacteria".

**PH** : Potentiel d'Hydrogène.

**PVK** : Pikovskaya.

**tr/min** : Tour par minute.

**TSI** :la tolérance systémique induite.

**µg**: Microgramme.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Les coordonnées géographiques des quatre échantillons .....	16
<b>Tableau 2 :</b>	Caractères morphologique des souches de <i>Pseudomonas</i> .....	27
<b>Tableau 3 :</b>	Caractères biochimique des isolats.....	27
<b>Tableau 4 :</b>	Activités PGP des isolats testés.....	35

## Listes des Figures

<b>Figure1 :</b>	Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère.....	05
<b>Figure2 :</b>	Modèle schématique du mécanisme d'action de l'ACC désaminase des PGPR pour abaisser la concentration de l'éthylène empêchant ainsi l'inhibition de l'allongement racinaire causée par l'éthylène.....	08
<b>Figure3 :</b>	délimitation de la zone d'étude.....	15
<b>Figure4 :</b>	prélèvement des échantillons.....	16
<b>Figure5 :</b>	Schéma représentative de la partie ectophyte.....	17
<b>Figure 6 :</b>	Schémas d'isolement des Epiphytes.....	18
<b>Figure7 :</b>	Schémas d'isolement d'endophyte.....	19
<b>Figure8 :</b>	Réactivation des souches.....	22
<b>Figure9 :</b>	Production de l'acide indole acétique (AIA).....	23
<b>Figure 10 :</b>	Examen macroscopique de quelques colonies sur King B.....	26
<b>Figure 11 :</b>	Examen microscopique des isolats.....	27
<b>Figure 12 :</b>	Caractères biochimiques.....	27
<b>Figure 13:</b>	Etude de fluorescence sur King A et B.....	28
<b>Figure14 :</b>	Production de l'acide indole acétique par les isolats.....	29
<b>Figure15 :</b>	Taux de production de l'acide indole acétique.....	29
<b>Figure 16 :</b>	Solubilisation du phosphate par des isolats sur milieu PVK.....	30
<b>Figure 17 :</b>	Efficacité de solubilisation (ES) du phosphate sur le gélose pikovskaya par les isolats bactériennes.....	31
<b>Figure 18 :</b>	Production de l'acide cyanhydrique par les isolats.....	31
<b>Figure 19 :</b>	Les isolats qui produit d' HCN.....	32
<b>Figure 20 :</b>	Fixation d'azote atmosphérique par les isolats.....	32
<b>Figure 21 :</b>	Les isolats fixatrice d'azote.....	33
<b>Figure22:</b>	Solubilisation du zinc par des isolats sur milieu BR.....	34
<b>Figure23:</b>	: Efficacité de solubilisation (ES) du zinc sur le gélose BR par les isolats bactériennes.	34



## Résumé :

Les bactéries favorisant la croissance et contrôle des plantes dites PGPRs, ont de plus en plus acquis une importance scientifiques, biotechnologiques et agricole. Dans ce travail. Je vise d'isoler d'identifier et de caractériser quelques isolats de groupes *Pseudomonas* en tant que PGPR. Onze isolats rhizosphériques qui ressemblent au *Pseudomonas* ont été sélectionné, neufs permis eux qui ont prouvé la production de fluorescence KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KCY5, KDY6I, KDY6II, KBY7, KCX9 ont passé aux plusieurs tests de caractérisation et de PGP . Les résultats obtenus ont montré que la valeur maximale pour le test d'AIA été de  $8.86^a \pm 0.46 \mu\text{g/l}$  (KDY6II) et la valeur minimale été de  $3.10^c \pm 0.61 \mu\text{g/l}$  (KBX10) pour la production de l'AIA . Concernant La solubilisation du phosphate la valeur maximale été de  $533.39^a \pm 1.23$  (KAZ3) quant à la valeur minimale, elle été de  $233.33^f \pm 0.85$  (KCZ2) . Pour la production de l'HCN cinq isolats ont présenté une production positive et six isolats ont été négatives. Tous les isolats ont fixé l'azote. Pour la solubilisation du zinc , la valeur maximale été de  $500.33^a \pm 1.52$  (KAZ3) et une valeur minimale été de  $280^f \pm 1$  (KCZ2).

Mots clés : *Pseudomonas*, PGPR, AIA, HCN, solubilisation du phosphate, solubilisation du zinc, fixation d'azote.

## **Abstract :**

Plant growth promoting and controlling bacteria, known as PGPRs, have increasingly gained scientific, biotechnological and agricultural importance. In this work. I aim to isolate, identify and characterize a few isolates of *Pseudomonas* groups as PGPR. Eleven rhizospheric isolates resembling *Pseudomonas* were selected, nine of which demonstrated production of KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KCY5, KDY6I, KDY6II, KBY7, KCX9 fluorescence and passed multiple characterization and PGP tests. The results obtained showed that the maximum value for the AIA test was  $8.86^a \pm 0.46 \mu\text{g/l}$  (KDY6II) and the minimum value was  $3.10^e \pm 0.61 \mu\text{g/l}$  (KBX10) for the production of AIA . Regarding the solubilization of phosphate, the maximum value was  $533.39^a \pm 1.23$  (KAZ3) as for the minimum value, it was  $233.33^f \pm 0.85$  (KCZ2). For the production of HCN five isolates showed positive production and six isolates were negative. All isolates fixed nitrogen. For the solubilization of zinc, the maximum value was  $500.33^a \pm 1.52$  (KAZ3) and a minimum value was  $280^f \pm 1$  (KCZ2).

Keywords: *Pseudomonas*, PGPR, AIA, HCN, phosphate solubilization, zinc solubilization, nitrogen fixation.

## المخلص

اكتسبت البكتيريا التي تعزز نمو النبات ومكافحتها ، والمعروفة باسم PGPRs ، أهمية علمية وتقنية حيوية وزراعية بشكل متزايد. في هذا العمل. أهدف إلى عزل وتحديد وتمييز بضع عزلات من مجموعات *Pseudomonas* على أنها PGPR. تم اختيار أحد عشر عزلة جذرية تشبه *Pseudomonas*، تسعة منها أظهرت إنتاج KBZ1 و KCZ2 و KAZ3 و KDZ4 و KCY5 و KDY6I و KDY6II و KBY7 و KCX9 واجتازت اختبارات توصيف متعددة واختبارات PGP. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن القيمة القصوى لاختبار AIA كانت  $8.86 \pm$  و  $0.46^a$  ميكروغرام / لتر (KDY6II) وكانت القيمة الدنيا  $3.10 \pm 0.61^e$  ميكروغرام / لتر (KBX10) لإنتاج AIA. فيما يتعلق بإذابة الفوسفات ، كانت القيمة القصوى  $533.39$  (KAZ3)  $1.23^a \pm$  أما بالنسبة للقيمة الدنيا ، فقد كانت  $233.33$  (KCZ2).  $0.85^f \pm$  بالنسبة لإنتاج HCN ، أظهرت خمس عزلات إنتاجية إيجابية ، بينما أظهرت 6 عزلات سلبية. جميع عزلات النيتروجين الثابت. لإذابة الزنك ، كانت القيمة القصوى  $500.33^a$  (KAZ3)  $1.52 \pm$  وكانت القيمة الدنيا  $280$  (KCZ2).  $1 \pm^f$

**الكلمات المفتاحية :** *Pseudomonas*, PGPR, AIA, HCN ، إذابة الفوسفات ، إذابة الزنك ، تثبيت النيتروجين.

# Introduction

# Introduction

---

## Introduction

Le sol est un fantastique réservoir de microorganismes, en termes de diversité et de densité. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries, et de 6 000 à 5 000 espèces bactériennes (**Curtis *et al.*, 2002; Horner-Devine *et al.*, 2003**). Certains de ces microorganismes jouent un rôle clé dans un grand nombre de processus incluant : l'acquisition d'éléments nutritifs pour les plantes, les cycles géochimiques comme celui de l'azote, et la structure du sol (**Kowalchuk et Stephen, 2001 ; Rillig et Mummey, 2006 ; Pivato *et al.*, 2009**).

Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes, connues sous le terme PGPR, stimulent directement la croissance de celle-ci en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol. En effet, les PGPR interviennent sur la croissance des plantes selon plusieurs mécanismes. Ces bactéries sont capables de faciliter 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**), ou indirecte par production des antibiotiques ou par induction de système de résistance et production des sidérophores phytoprotectrices (**Kirdibillal, 2011**).

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 (**Kang *et al.*, 2012**).

Plusieurs recherches ont montré que les PGPR ont des effets bénéfiques sur les plantes, ces rhizobactéries peuvent procurer à la plante l'azote sous forme d'ammonium par leurs associations avec les plantes (**Kennedy *et al.*, 2006 ; Ficher *et al.*, 2007**).

De plus, ces PGPR peuvent aussi synthétiser les hormones de croissance (phytohormones) pour stimuler la croissance de la racine et aussi la plante (**Baca et Elmerich, 2007**).

## Introduction

---

Parmi les bactéries d'intérêt agricole (PGPR) les *Pseudomonas* font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants offre un bon rendement même dans des conditions sévères (**Ali et al., 2009 ; Bano et Fatima, 2009**).

Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore ou par la production de sidérophores. Elles peuvent modifier la morphologie et la physiologie racinaire par la production de régulateurs de croissance comme les auxines. Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses grâce à leur activité antagoniste vis-à-vis de pathogènes (**Lemanceau, 1992**).

L'objectif de cette recherche a été d'évaluer quelques activités PGP de *Pseudomonas* et leurs effets sur la croissance des plantes.

# Revue bibliographique

### **I.1.Généralité sur la rhizosphère**

L'introduction du mot «rhizosphère» a été effectué en 1904 par Lorenz Hiltner (**Anton et al.,2008**), bactériologiste spécialiste de microbiologie du sol et professeur d'agronomie au collège Technique de Munich (**Lombi et al., 2001**).Le mot « rhizosphère» a été composé en plusieurs mots, le « Rhizo » c'est un mot grec rhiza signifiant racine. « Sphère » vient du latin sphaera (même sens), mot provenant lui-même du grec ancien sfaira (signifiant balle, ballon, ou globe). La sphère est le champ d'influence du système racinaire. La rhizosphère est aussi appelée la moitié cachée (the *hiddenhalf* en anglais) en raison du volume qu'elle occupe, par rapport au volume de la plante (**Bowen et Roriva, 1991**).

#### **I.1.2.Définition :**

La rhizosphère est la région du sol qui situe sous les racines des plantes et soumise à leur influence directe. C'est un lieu d'intenses échanges entre le végétal et le substrat minéral. Qui peut être affecté par le tassement du sol, un ennoiment durable, sa salinisation, son eutrophisation ou la pollution, ou encore par des phénomènes d'aridification, aussi elle est la région d'activité microbienne intense (**Anoua et al.,1997**).

#### **I.1. 3. Activité de la rhizosphère :**

La libération des exsudats racinaires par les plantes qui sont constitués des substances organiques carbonées et azotées : polysaccharides, acides organiques et protéines (**Mench, 1985**) vont conduire au développement de la microflore pathogène ou non pathogène. Ainsique des propagules fongiques se développent d'une façon saprophyte jusqu'à la racine qu'elles peuvent infecter et éventuellement parasiter en réponse à l'apport énergétique représenté par les exsudats racinaires (**Schroth et Hildenbrand, 1964**). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines : il s'agit de «l'effet rhizosphère» (**Foster et Rovira, 1978**). La composition et la quantité des exsudats racinaires conditionnent également la nature des activités bactériennes qui résultent la synthèse de métabolites tels que les sidérophores, antibiotiques, substances de croissance, acide cyanhydrique (HCN), lipopolysaccharides (**Lemanceau, 1992**).

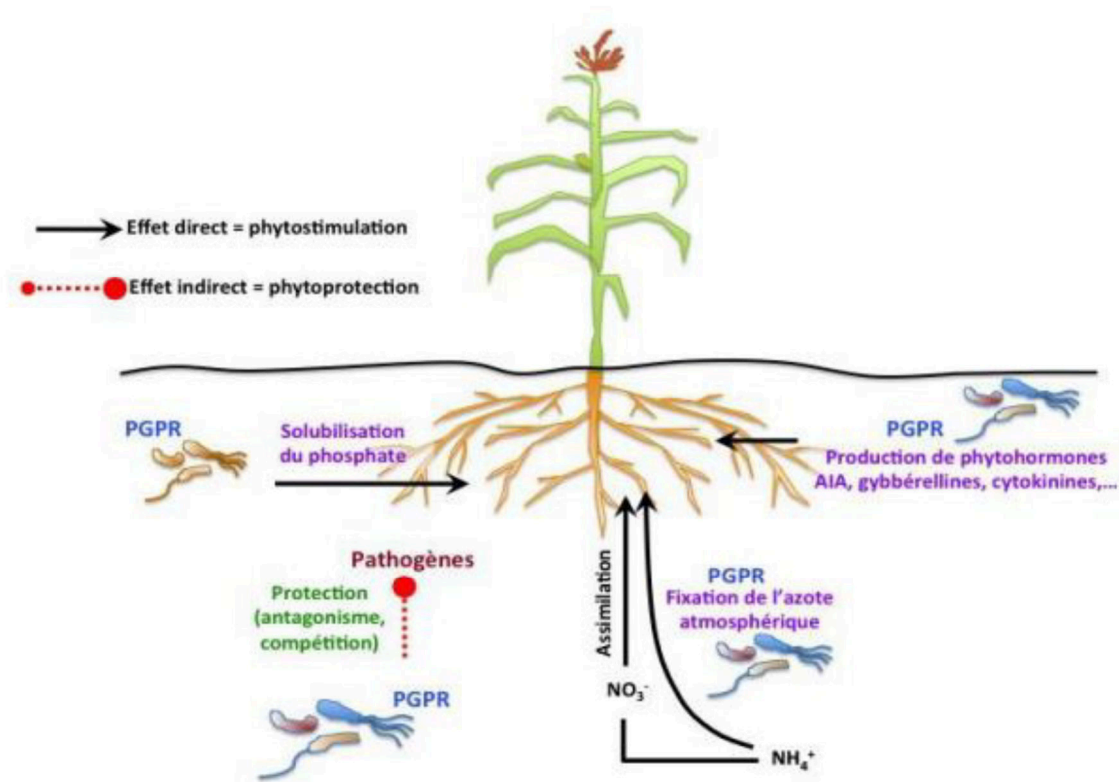


#### **I.1.4. La microflore de la rhizosphère**

Le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement. Le sol est un réservoir important de micro-organismes (champignons et bactéries), en termes de diversité et de densité. La microflore du sol est complexe, elle comprend des bactéries, des champignons, des protozoaires et des virus. En effet, un gramme de sol végétalisé contient environ 1 milliard de bactéries réparties en 5 à 25000 espèces dont la plupart ne sont pas encore connues. Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. On estime 1 gramme de sol quand peut contenir jusqu'à  $10^9$  bactéries par examen microscopique direct (Malek, 2015). Les actinomycètes constituent l'ordre des actinomycètes. Ce sont des bactéries filamenteuses, ramifiées, (Larpent *et al.*, 1989). Les mycètes sont également présents dans le sol, leur biomasse est sans doute très variable suivant les cas et peut atteindre entre 120 Kg/ha et plus d'une tonne, dans les sols normaux (Dommergues et Mangenot, 1970). Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologique des sols. De nombreux travaux indiquent la prédominance de : *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus* (Noumeur, 2008).

#### **I.2. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)**

Une flore bactérienne diversifiée, connue sous l'abréviation PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*), rhizobactérie promotrice de la croissance des plantes. Les PGPR interviennent sur la croissance des plantes selon plusieurs mécanismes, de manière directe ou indirecte. Ces bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (Khan *et al.*, 2009) (Figure 1).



**Figure 1:** Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère  
(Khan *et al.*, 2009)

### I.2.1. Effet directe des PGPR sur la plante :

Les bactéries PGPR facilitent et favorisent 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).

#### II.2.1.1. 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  $N_2$  dans l'atmosphère, il est indisponible pour les plantes en croissance. Le  $N_2$  atmosphérique est converti en formes utilisables par la plante par la fixation biologique de  $N_2$  par les bactéries en utilisant un système enzymatique complexe appelé *Nitrogénase* et cela par deux mécanismes ; symbiotiques et non symbiotiques (Kim et Rees, 1994).

### **I.2.1.2.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 formes 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 ( $H_2PO_4$ ) et basique ( $HPO_4$ ) (**Govind et al., 2015**). En effet, il a été démontré que certains microorganismes du sol sont impliqués dans la solubilisation des phosphates insolubles. Notons que ces microorganismes produisent des acides organiques et relâchent des protons, qui à travers leurs groupements carboxyliques, chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles (**Salma, 2015**).

### **I.2.1.3.Solubilisation du potassium**

C'est le troisième nutriment majeur important pour les plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% de potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux de silicate (**Parmar et Sindhu, 2013**). En outre, en raison de l'application déséquilibrée des engrais, la carence en potassium devient l'une des principales contraintes dans la production végétale. Selon Kumar et Dubey (**2012**), les micro-organismes de sol jouaient un rôle clé dans le cycle K naturel et par conséquent, les microorganismes solubilisant de potassium présents dans le sol pourraient fournir une technologie alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes (**Rogers et al., 1998**).

### **I.2.1.4.Production des phytohormones :**

Une large gamme de microorganismes trouvés dans la rhizosphère est capable de produire des substances qui régulent la croissance et le développement des plantes. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes produisent des phytohormones telles que les auxines, les cytokines, les gibbérellines et l'éthylène peuvent affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture racinaire par la

surproduction de racines latérales et de racines avec un accroissement subséquent de l'apport d'éléments nutritifs (**Arora, 2013**).

#### **1.2.1.4.1. Production de l'acide indole acétique :**

L'acide indole acétique est une auxine considérée comme la phytohormone la plus répandue, la plus produite par les PGPR. Il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (**Spaepen et al., 2007**), c'est un acide faible formé d'un noyau indole et d'une courte chaîne latérale carbonée pourvue du groupement carboxyle. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes (**Ashrafzaman et al., 2009**).

L'analyse du rôle de l'AIA montre que les bactéries utilisent cette phytohormone pour établir des interactions avec les plantes dans le cadre de leur stratégie de colonisation de ces dernières (**Rayan et al., 2008**). Il est généralement produit par les PGPR en utilisant les exsudats racinaires libérés dans la rhizosphère sous forme de métabolites secondaires. Les PGPR sont connues exclusivement pour leur capacité de fixation d'azote mais elles sont également signalées aussi pour produire des quantités importantes d'AIA (**Ahmed et al., 2008**).

#### **1.2.1.4.2. Production de l'Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase:**

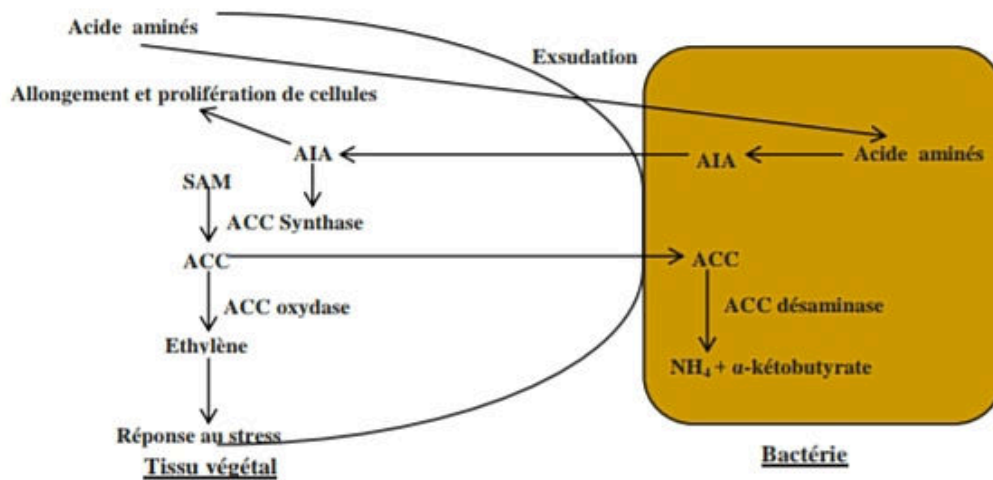
L'ACC est le précurseur direct de l'éthylène. La biosynthèse de l'éthylène se fait par les plantes à partir de la méthionine. La première étape est la synthèse de la S-adénosyl-méthionine, suivie de sa conversion en acide aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) (**Adams et Yang, 1979**).

L'éthylène gazeux produit de manière endogène par les plantes a plusieurs effets sur leur développement et agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante. L'éthylène est impliqué dans beaucoup de processus physiologiques, comme la germination de la graine, la différenciation de tissus, la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons, le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la sénescence d'organe, la maturation de fruit et l'abscission de la feuille et du fruit. A des concentrations élevées, l'éthylène affecte négativement de nombreuses étapes physiologiques des

plantes. Une augmentation de la production d'éthylène agissant comme hormone sensitive stimule la maturation des fruits et le vieillissement des fleurs. (Cherif, 2014).

Les PGPR possèdent l'ACC désaminase régulent et abaissent les niveaux de l'éthylène en métabolisant l'ACC un précurseur de l'éthylène (Figure 2). L'ACC désaminase régule la production d'éthylène en réponse à une multitude de stress biotiques et abiotiques comme la salinité, la sécheresse et les variations de la température. Les bactéries possédant une ACC désaminase confèrent aux plantes une tolérance relative au sel (Glick, 2005).

L'absorption et l'hydrolyse de l'ACC par les microorganismes diminuent sa quantité en dehors la plante (Figure 2). L'ACC par les plantes est repris à l'intérieur des cellules bactériennes et dégradé par l'enzyme ACC désaminase. Cet enzyme a été trouvée dans différents type de bactéries (Glick, 2005).



**Figure 2** : Modèle schématique du mécanisme d'action de l'ACC désaminase des PGPR (Glick *et al.*, 1999).

## II.2.2. Effet indirect des PGPR sur les plantes :

### I.2.2.1. Productions des antibiotiques :

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes de biocontrôle les plus puissants et les plus étudiés chez les PGPR. (Shilev, 2013)

exemple d'antibiotiques produits par PGPR : l'acide phénazine-1-carboxylique l'oomycineA, les rhamnolipides (**Fernando et al., 2005**).

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 et Kim, 2012**).

#### **1.2.2.2. Induction d'un système de résistance :**

Les PGPR peuvent 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 de pathogènes végétaux. Les maladies d'origine fongique, bactérienne et virale et dans certains cas, 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 phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique (**Cherif, 2014**).

#### **1.2.2.3. Production des Sidérophores :**

Les PGPR, notamment du genre *Pseudomonas*, sont connues pour leur faculté de produire des sidérophores dans le milieu. Ce sont des substances créatrices du fer, avec une grande affinité au fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ). Elles améliorent sa disponibilité à leur profit en cas de carence du sol et rendent difficile son assimilation aux autres populations microbiennes déficientes en cet élément. Ce phénomène est un aspect de compétition qui participe efficacement à l'antagonisme contre les agents phytopathogènes en réduisant leurs effectifs dans le sol. En outre, la plante peut facilement assimiler les complexes de sidérophores et ainsi promouvoir sa croissance. Les sidérophores peuvent fixer aussi d'autres métaux dans le sol tels que le magnésium, le manganèse et le chromium. D'après d'autres études, les PGPR peuvent extraire le fer des sidérophores formés par d'autres microorganismes (**Kirdi, 2011**).

### I.3. Diversité taxonomique des PGPR :

Diverses souches de PGPR ont été utilisées avec succès pour les inoculations des cultures. Celles-ci comprennent les membres bactériens du genre *Azospirillum* (Cassan *et al.*, 2008), *Bacillus* (Jacobsen *et al.*, 2004), *Pseudomonas* (Loper *et al.*, 2007), *Rhizobium* (Long, 2001). Ces bactéries sont connues pour s'associer avec les racines de blé, les graminées tropicales, le maïs, et d'autres céréales (Okon et Hadar, 1987; Lindberg et Granhall, 1984). Les *Azospirillum* spp ont été identifiés principalement comme bactéries de la rhizosphère, et leur mécanisme de coloniser la rhizosphère a été étudié par divers chercheurs (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000). La production des métabolites microbiens comme les polysaccharides modifie la structure du sol et présente un effet positif sur les plantes cultivées en stress hydrique. L'inoculation peut favoriser l'allongement de la racine (Dobbelaere *et al.*, 1999).

#### I.3.1-Le genre *Pseudomonas*

##### III.3.1.1. Caractéristiques générales

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, famille des *Pseudomonaceae*, ordre des *Pseudomonadales* (Moore *et al.*, 2006). Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux, et souvent pathogènes des animaux et des végétaux. Elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries ; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Moore *et al.*, 2006).

Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5 µm de long, mobiles et asporulées (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Ce sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines qui peuvent utiliser le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> comme accepteur d'électrons. Elles ont un métabolisme mésophile et chimio-

organotrophe oxydatif (Moore *et al.*, 2006). Les différentes espèces de *Pseudomonas* sont divisées en cinq groupes selon leur ARNr 16s. Le sous-groupe des *Pseudomonas* fluorescents, appartenant au premier groupe génomique, est certainement le plus étudié. Il se distingue par la production de pigments jaune-vert fluorescents (pyoverdine ou pseudobactine) dans des conditions de carence en fer. Les espèces appartiennent à ce groupe sont : *Pseudomonas aeruginosa*, espèce pathogène pour l'homme, *P. syringae*, (espèce phytopathogène) et *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. chlororaphis*(Höfte et Altier, 2010).

### I.3.1.2. Classification phylogénétique

Les premiers changements majeurs dans la taxonomie de *Pseudomonas* fussent apportés par Woese *et al.*,(1984) qui ont proposé une nouvelle classification de ces espèces sur la base de leurs ARN ribosomiaux. Toutefois ce nouveau schéma d'identification n'a pas été pris en considération dans l'édition 1994 du **BergeysManual**. Plus tard Kersters *et al.*,(1996) ont repris les propositions de Woese *et al.*, (1984) dans leurs rapports pour classer les proteobactéries sur la base de l'ARNr 16s en 15 genres. A partir de 1990, le séquençage de l'ARNr 16s est appliqué pour l'ensemble des bactéries nouvellement isolées. Partiel au début pour être ensuite appliqué sur l'ensemble du génome.

### I.3.1.3. Habitat des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* ont souvent une versatilité nutritionnelle très large, ce qui leur permet de vivre dans des niches écologiques naturelles très diverses. A cause de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreuses conditions environnementales ce qui favorise la sélection de certaines espèces dans certains milieux particuliers.

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes, *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* ont été isolés respectivement de plants d'ail et de riz (Ahouak *et al.*, 2000). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (Peix *etal.*, 2005), d'autres ont été isolées à partir de la phyllosphère des plantes le cas de *P. lurida* de la phyllosphère de l'herbe (Behrendt *et al.*, 2007)



alors que d'autres peuvent même coloniser les tissus internes des plantes **(Ramesh et Joshi, 2009)**.

#### **I.3.1.4. *Pseudomonas* dans la rhizosphère**

Les *Pseudomonas* spp fluorescents associés aux plantes incluent des souches pathogènes et des souches bénéfiques. Les souches influençant avantageusement l'hôte végétal sont désignées sous le terme « plant- pro biotique fluorescent *Pseudomonas* spp » **(Höfte et Altier, 2010)**. Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines **(Lemanceau, 1992)**. Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses que le piétin échaudage des céréales, les pourritures des tubercules de pomme de terre, les fusarioses des racines et du collet de la tomate **(Bell-Perkins et Lynch, 2002)**.

Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques de *Pseudomonas* spp *fluorescents*. Ces bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive. Puis elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère **(Lemanceau, 1992 ; Brimecombe *et al.*, 2008)**. Les exsudats racinaires, et en particulier les sucres et les acides aminés, attirent les bactéries par chimiotactisme à la surface des racines. Ils stimulent notamment la mobilité flagellée des bactéries, ce qui permet à ces dernières de coloniser la rhizosphère **(de Weert *et al.*, 2002)**. Chez *P. fluorescens* WCS417 les chaînes lipopolysaccharides latérales constituant l'antigène 0 des LPS bactériens jouent un rôle important dans la colonisation racinaire **(Mercado-Blanco et Bakker, 2007)**. L'adsorption des bactéries à la racine résulte d'interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine **(Lemanceau, 1992)**. Cette seule colonisation peut entraîner une occupation de sites suffisantes pour empêcher la croissance des pathogènes **(Kamilova *et al.*, 2005)**.

Les espèces de *Pseudomonas fluorescens* ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autres microorganismes. Elles peuvent aussi reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent **(Mercado-Blanco et Bakker, 2007)**.

D'autres métabolites produits par les *Pseudomonas* spp *fluorescents* peuvent également interférer avec la croissance des phytopathogènes. Le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et les différents dérivés de la phénazine jouent un rôle très important dans son activité antagoniste contre *Gaeumanomycesgraminis*(agent de la piétine échaudage). La production de HCN par la souche de *P. fluorescens*CHA0 réduit la pathogénicité des champignons tels *Thielaviopsisbasicola*, agent de la pourriture noire du tabac (Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

Les *Pseudomonas* spp*fluorescents* sont capables de synthétiser de nombreuses molécules appelés « déterminants ou éliciteurs ». Elles sont impliquées dans l'induction ou la potentialisation des réactions de défense de la plante et conduisant à leur tour à la mise en place d'une ISR. Ces molécules sont de natures variées et pouvaient être divisées en trois classes :

- des composants de surface cellulaire (e.g. LPS) ;
- des métabolites à activité chélatrice du fer (e.g. sidérophores, acide abscissique).
- des molécules à activité antibiotique (e.g. HCN, DAPG) (van Loon et Bakker, 2005).

Les éliciteurs stimulent la production, par la plante, de phytoalexines toxiques vis-à-vis du pathogène (Ramos Solano *et al.*, 2008).

### **1.3.1.5.Pseudomonas comme PGPR**

Divers rhizobactéries, regroupées sous le terme PGPR, ont une capacité à promouvoir la croissance de leur plante hôte par des effets sur : la nutrition, l'architecture racinaire ou la santé de leur partenaire végétal (Grover *et al.*, 2010). Ils peuvent aussi déclencher l'expression des mécanismes de la tolérance systémique induite (TSI)vis-à-vis de différents facteurs de stress abiotiques telle la sécheresse, la salinité et les métaux lourds (Yang *et al.*, 2009). L'inoculation de la souche *Pseudomonas* AMK-P6, par exemple, induit une thermotolérance au sorgho (47-50°C) ; ceci est réalisé par une amélioration de sa biomasse végétale ainsi que de sa teneur en chlorophylle, en sucres, en acides aminés et en proline (Ali *et al.*, 2009). Chez le maïs (*Zeamays*), l'inoculation de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* induit une réaction de tolérance au sel se traduisant par une augmentation de la production de proline, un maintien de la teneur en eau dans les feuilles et une absorption sélective des ions K<sup>+</sup>(Bano et Fatima, 2009). Malgré la présence de cadmium, la croissance du colza (*Brassicnapus*) pourrait améliorer

suite à l'inoculation des souches de *Pseudomonas (tolasioufluorescens)* résistantes au cadmium. *Pseudomonas aeruginosa* R75 et *P. savastanoi*CB35 peuvent améliorer la croissance d'Elyme de Daourie (*Elymusdauricus*) par la dégradation des contaminants organiques tels les chloro-benzoates (**Zhuanget al., 2007**). Les naphthalènes sont dégradés par *P. putida*(**Kuiper, 2001**).

Les exopolysaccharides (EPS) produits par *Pseudomonas putida*GAP-P45 jouent un rôle positif dans les phénomènes de régulation de la teneur en eau, et la diffusion de la source de carbone aux plantes notamment dans des conditions de stress hydrique (**Sandhyaet al., 2009**). Ces effets sont constatés pour les sols salés dans la plupart des régions arides et semi-arides où la productivité est limitée. Les espèces de *Pseudomonas* affectent également la croissance des plantes en améliorant leur alimentation minérale. *Pseudomonas striata*,*P.cissicola*, *P. fluorescens*, *P. pinophilum*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*, *P. putrefaciens*et*P. stutzeri*isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, du maïs, du soja et d'autres céréales solubilisent efficacement les phosphates (**Tilak et al., 2005**). D'autre part, la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) par *Pseudomonas putida*GR12-2 améliore le rendement du colza (**Patten et Glick, 2002**).

La stimulation du métabolisme hormonal de la plante via la sécrétion de phytohormones telles les auxines, les cytokinines et les gibbérellines favorisent le développement racinaire et par conséquent la croissance végétale (**Sandhya et al., 2010**).

# Matériels et méthodes

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Localisation de la zone d'étude

L'ensemble des prélèvements des échantillons effectués pour ces études ont été réalisés à partir de la rhizosphère des sols prélevés d'une zone dans la région de Hadjadj de la wilaya de Mostaganem. (**Figure 3**).



**Figure 3** : Délimitation de la zone d'étude

### II.1.2. Prélèvement des échantillons du sol

Le prélèvement des échantillons du sol de la rhizosphère a été fait en profondeur de 15 cm, un poids de sol a été prélevé. Une fois que l'échantillon a été prélevé dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination, les échantillons ont été ramenés au laboratoire pour l'analyse (**Aly *et al.*, 2012**) (**Figure 4**).



**Figure 4** : prélèvement des échantillons

**Tableau 1** : Les coordonnées géographiques des échantillons.

Echantillon	Plante	Coordonné cartographique
A	Courgette	36°08'34.05 N 0° 21' 16.92 E
B	Ail	36°08'36.19 N 0° 21' 17.36 E
C	Betterave	36°08'34.05 N 0° 21' 16.92 E
D	Haricot vert	36°08'34.05 N 0° 21' 16.92 E

### II.2.1. Isolement des *Pseudomonas*

L'isolement a été fait à partir des trois compartiments de la rhizosphère (endophyte, ectophyte et épiphyte). L'ensemencement a été fait sur le milieu de culture King B (**King et al., 1954**)(Annexe I). Après l'incubation, la sélection des souches fluorescentes (pigment fluorescent) a été effectué.

#### II.2.1.1. Compartiment ectophyte

Une solution mère a été préparée de 10g de sol mélangé avec 90ml d'eau physiologique, agitée à 180tr/min pendant 10 min. Ensuite, des dilutions décimales ont été effectuées (de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ). 0,1ml des deux dernières dilutions a été déposé sur la surface de la boîte d'agar contenant le milieu King B (**Hui et al., 2011**).



**Figure 5 :** Schéma représentatif d'isolement à partir du compartiment ectophyte

### II.2.1.2. Compartiment épiphyte

2.5g de racine ont été coupés (2-5mm) et rincés à l'eau de robinet, ensuite remplis dans un flacon avec 50 ml d'eau physiologique. Le mélange a été homogénéisé et agité à 180rpm/30 min. Des dilutions décimales ont été effectuées, 0,1 ml des deux dernières dilutions a été déposé sur gélose King B (Dasri *et al.*, 2014).

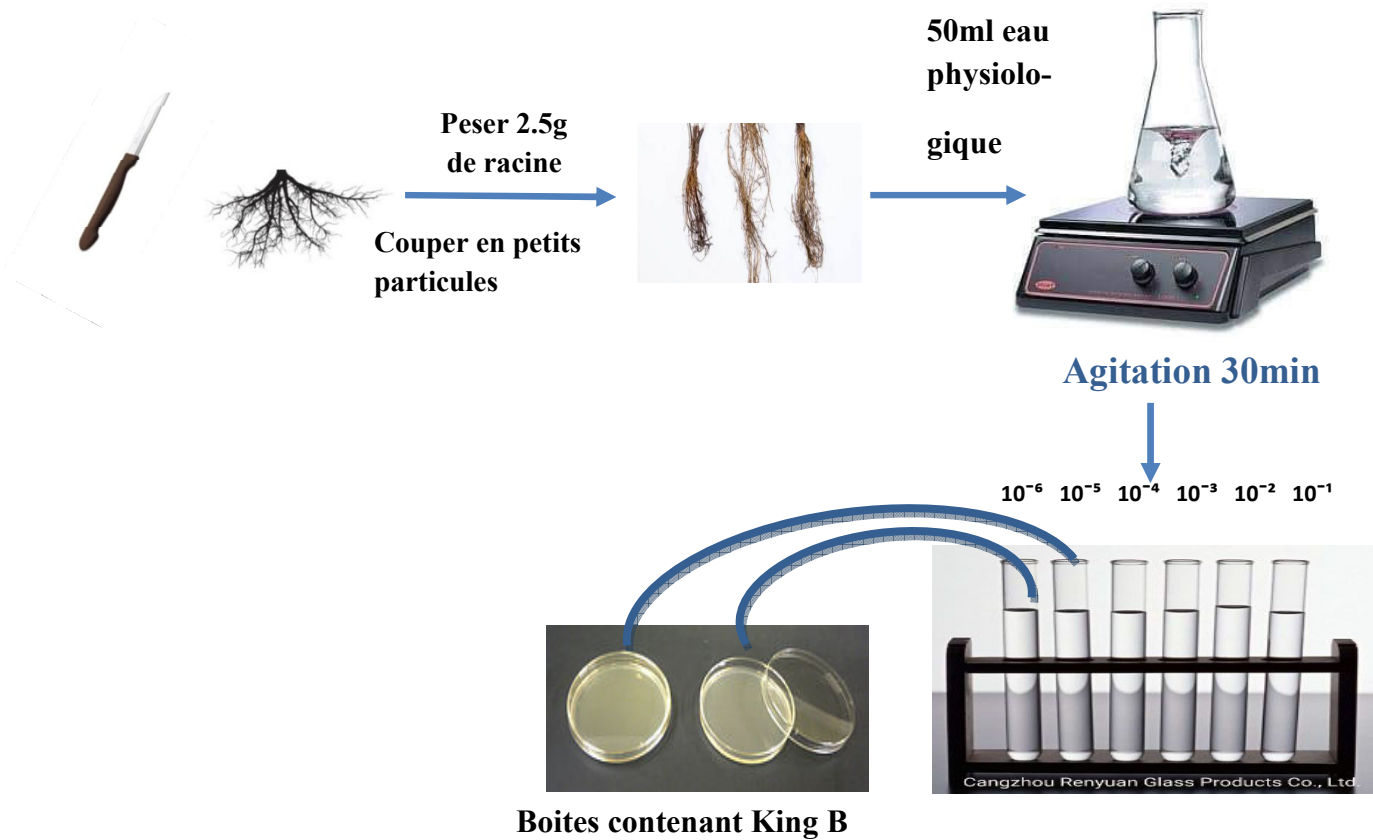
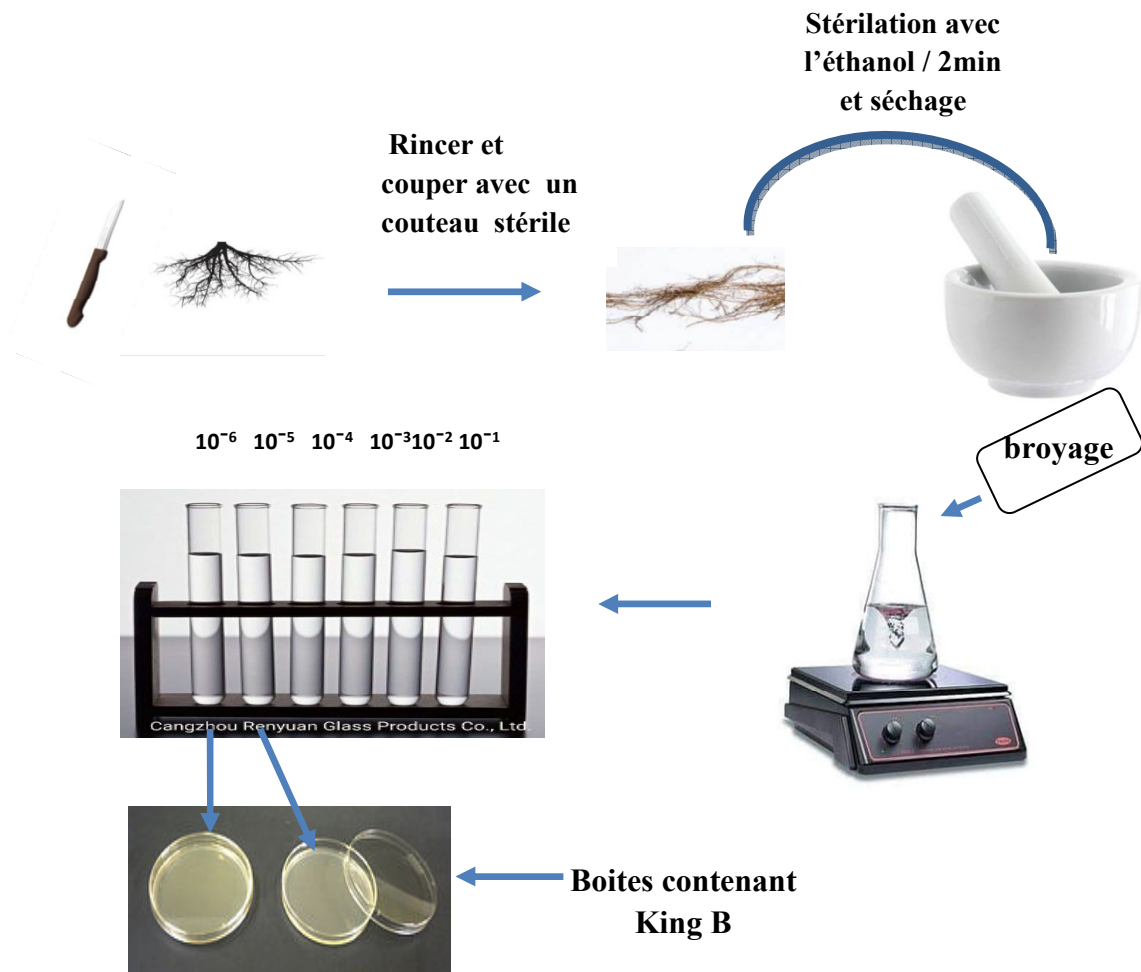


Figure 6 :Schémas d'isolement des Epiphytes

### II.2.1.3. Compartiment endophyte

Les racines ont été rincées à l'eau de robinet puis coupées en petits morceaux, ensuite stérilisées par l'éthanol pendant 2 min et séchées. Elles ont été broyées avec un mortier, ensuite des dilutions décimales ont été effectuées, 0,1 ml des deux dernières dilutions a été déposé sur gélose King B (Furini.A, 2015)





**Figure 7 :** Schémas d'isolement d'endophyte

### II.2.2. Purification et conservation des isolats

La purification a été faite par la méthode de quatre quadrants pour avoir des isolats purs, ensuite ils ont été conservés aux géloses inclinées à 4°C.

### II.2.3. Identification des isolats

L'étude microscopique et macroscopique des isolats sont un ensemble de caractères qu'on doit étudier.

#### II.2.3.1. Etude macroscopique

L'observation macroscopique des cultures est le premier examen effectué après de l'isolement. Elle consiste à observer l'aspect et la couleur de la colonie pour sélectionner

des isolats pour repiquage et purification. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées.

### II.2.3.2. Coloration de gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi : Gram positif et Gram négatif. En effet, quand la bactérie est mise au contact du violet de gentiane et ensuite soumise à l'action du Lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout le cytoplasme des bactéries. Cependant lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif (présence de membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la Fushine. Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violette(**Annexe II**).

### II.2.3.2. La mobilité

L'étude de la mobilité a été réalisée au milieu Mannitol-mobilité (**annexeI**). Ce milieu permet l'étude de la dégradation du mannitol et la mobilité. La culture estensemencée par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit puis incubé à 30 °C pendant 24 h. Les caractères recherchés sont :

- La fermentation du Mannitol par le virage de couleur ; le tube orange ou jaune indique la dégradation du Mannitol et le tube rouge indique qu'il n'est pas dégradé du Mannitol (**Abdlhafid,2011**).
- La mobilité : La recherche de la mobilité est réalisée en milieu mannitol- mobilité (**Mouafek,2010**).

### II.2.3.3. Catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée( $H_2O_2$ ) en eau( $H_2O$ ) et oxygène ( $O_2$ ).



Le test catalase se fait par les étapes suivantes comme suit, sur une lame en verre propre, on dépose une colonie bactérienne puis on ajoute une goutte de  $H_2O_2$ .S'il y a une

apparition des bulles, donc le catalase est positive, causée par le dégagement gazeux de l'oxygène (Delarras, 2007).

#### II.2.3.4. Oxydase

C'est un test qui détecte l'enzyme cytochrome oxydase beaucoup plus chez les bactéries à gram négative celle qui produisent cet enzyme comme les *Pseudomonas*.

A l'aide de pinces, placer un disque d'oxydase sur une lame, une colonie bien isolée a été choisie puis frottée doucement sur le disque. Si on observe l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes, donc l'oxydase est positive, s'il n'y a pas une coloration le test est négatif (Flandroits et Chomarot, 1988).

#### II.2.3.5. Le type respiratoire

Le milieu de culture utilisé pour ce test est le milieu viande-foie (annexe I). A l'aide d'une pipette pasteur fermée, l'ensemencement a été effectué en spirale dans la gélose, le tube doit être semi solide (à 45°C). Solidifier puis mettre à l'étuve à 30 °C pendant 24h (Zaferane et al., 2019).

#### II.2.3.6. Mise en culture des *Pseudomonas* à 4°C et 42°C

La culture positive des boîtes soumises à une incubation à 4°C indique que tous les isolats appartiennent au genre *Pseudomonas* fluorescents. Les *Pseudomonas* fluorescents ne poussent pas à la température 42°C mais se développent facilement dans à 4°C (Djibaoui et Bensoltan, 2005).

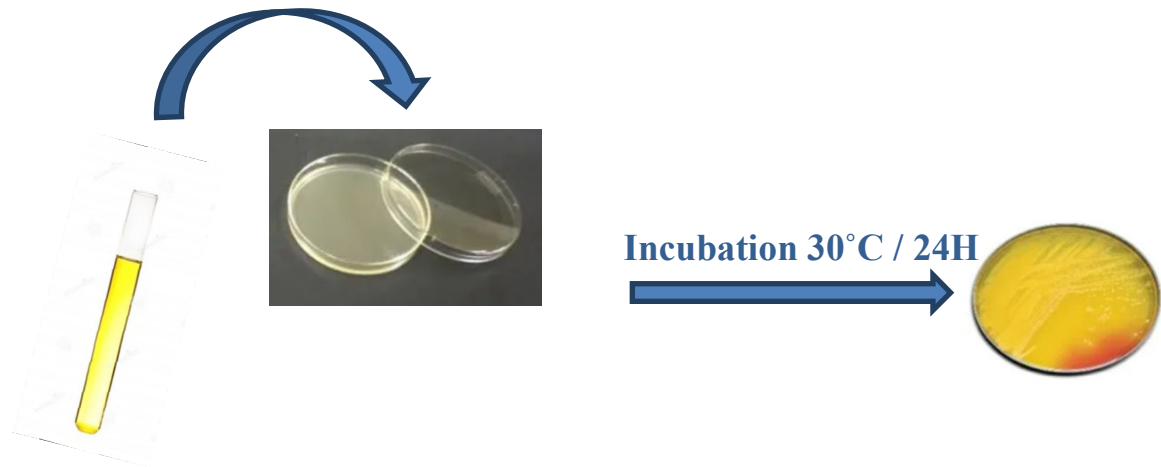
### II.3. Evaluation des activités PGP

Cette partie de notre travail est consacrée à la caractérisation des rhizobactéries (*Pseudomonas*) qui favorisent la croissance des plantes.

#### II.3.1. Evaluation de la production d'AIA par les isolats

##### II.3.1.1. Réactivation des isolats conservés

Nous avons pris les isolats conservés, on ensemence dans des boîtes pétries qui contiennent de la gélose nutritive (GN) (annexe I), ensuite l'incubation a été effectuée à 30°C pendant 24 heures.



**Figure8** :Réactivation des souches

### 3.1.2. Production de l'acide indole acétique (AIA)

Selon la méthode décrite par Loper et Schroth (1986), les isolats ont été ensemencés dans bouillon LB(Annexe I) additionnée de tryptophane à 0,1 %, après incubation de 96 heures à 30°C dans une étuve agitée à 160 tr / min, les cultures ont été centrifugées à 6000 tr/min, ensuite 1 ml du surnageant est ajouté à 2 ml de réactif de Salkowski (1ml de solution de  $\text{FeCl}_3$  à 0.5 M + 50ml d'acide perchlorique à 35%). Les solutions ont été mises en obscurité pendant 30 minutes, le changement de la couleur vers le rose indique la production de IAA. La densité optique a été mesurée à 530 nm, la concentration de l'AIA a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Annexe III).

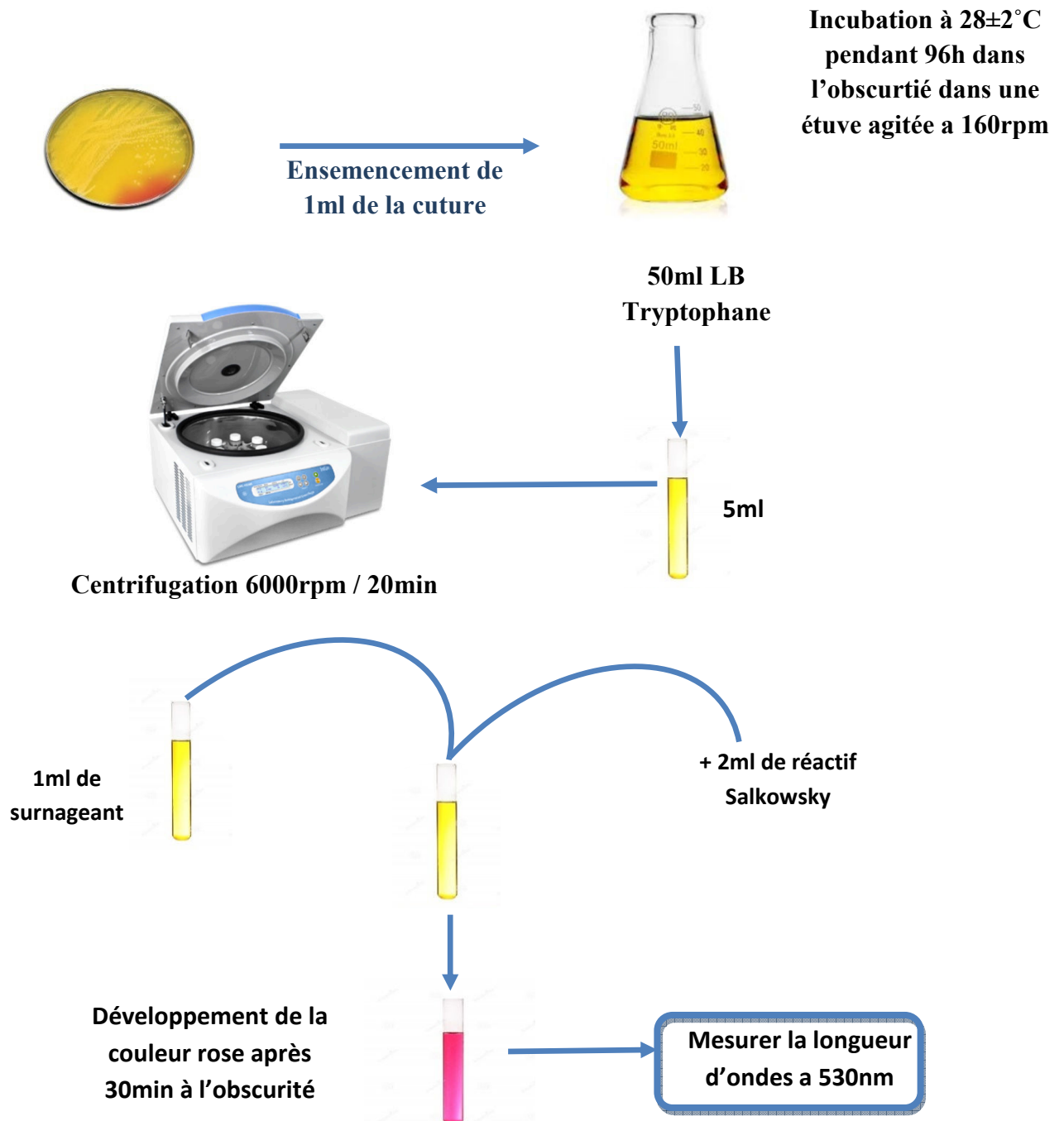


Figure 9 : Production de l'acide indole acétique (AIA)

### II.3.2. Solubilisation du phosphate

Le test de solubilisation de phosphate nous a permis d'évaluer la capacité des différents isolats à solubiliser le phosphate inorganique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Sur gélose Pikovskaya (**pikovskaya,1948**)(**annexe I**), on ensemence par touche centrales à la surface de la gélose. après incubation à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 7 jours, on observe un halo transparent autour de colonie qui indique la capacité de solubilisation du phosphate par l'isolat. ensuite l'efficacité de solubilisation a été calculé selon Nguyen *et al.*,(**1992**) par la formule suivante :

$$ES = \frac{\text{diamètres des solubilisation} + \text{diamètre de croissance}}{\text{diamètre de croissance}} * 100$$

### II.3.3. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La capacité de production de l'acide cyanhydrique par les isolats de *Pseudomonas* a été étudiée selon la méthode de Bakker et Schippers(**1987**). Chaque isolata été inoculée sur milieu GN(**Annexe I**) additionné de glycine (4,4 g /l). Un papier Whatman a été imprégné dans une solution de 5% d'acide picrique dans 2% de carbonate de sodium puis déposé sur le couvercle de chaque boîte de Pétri. Celles-ci ont été scellées avec du papier Parafilm et incubées à  $30^\circ\text{C}/4$  jours. Elles ont été vérifiées quotidiennement, l'isolat à HCN+ est capables de virer la couleur du papier, du jaune à l'orangé ou marron(**Abbas-Zadeh et al., 2010**).

### II.3.4. Fixation d'azote

La mise en évidence de la fixation de l'azote atmosphérique est effectuée après l'inoculation d'une suspension bactérienne de chaque isolat dans des milieux de culture dépourvus de toute source de l'azote (Beurk N Free) additionné de 20 mg/l de bleu de bromothymol (**Annexe I**), et incubées à une température de  $30^\circ\text{C}$  pendant 72 heures (**Laradj zazou,2017**). La lecture positive de la fixation d'azote se manifeste par le développement d'une couleur bleu.

### II.3.5. Solubilisation du zinc

Une étude a été effectuée pour vérifier la capacité des bactéries isolées à solubiliser le zinc (d'oxyde de zinc ZnO). Les isolats bactériens sélectionnés ont été ensemencés en surface sur gélose Bunt et Rovira(**Annexe I**) contenant une source de Zn insoluble pour déterminer qualitativement la solubilisation du Zn (**Bunt et Rovira,1955**).Après incubation à  $30^\circ\text{C}$  pendant 7 jours, les diamètres des colonies et des halo ont été mesurés à l'aide d'une échelle de mesure pour calculer l'efficacité de solubilisation (ES)par la formule suivante qui est décrite par Sharma *et al.*,(**2014**) :

$$ES = \frac{\textit{diamètre de solubilisation}}{\textit{diamètre de croissance}}$$

#### **II.4. Etude statique**

Les résultats de différents paramètres ont été réalisés en triplicata et traités par analyse de variance par l'utilisation de logiciel *Statbox6.4*, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux par le test de *Newman & Keuls*.

# Résultats et discussion



### III. Résultats et discussion

#### III.1. Résultats

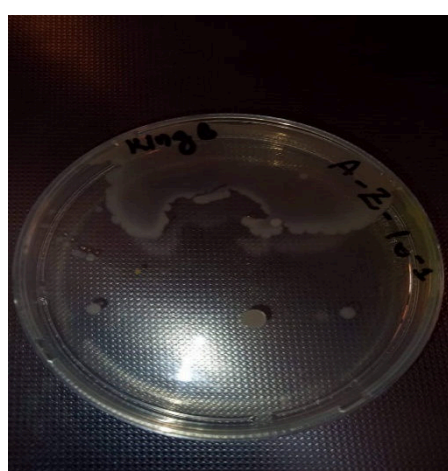
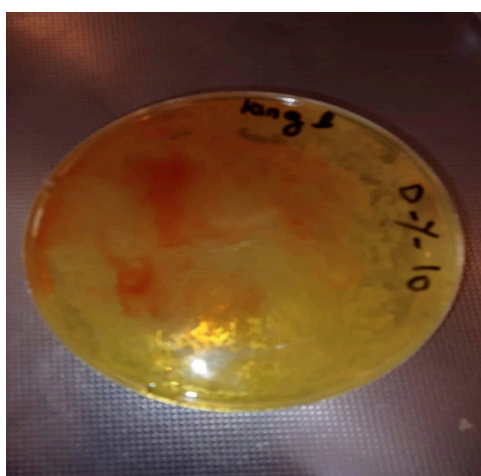
##### III.1.1 Isolement et identification des isolats rhizosphériques

##### III.1.1.1. Caractérisation morphologique des isolats bactériens

Dans cette partie, l'isolement et la sélection des bactéries de *Pseudomonas* ont été réalisés par l'ensemencement des différents échantillons du sol sur gélose King B. Les colonies se sont avérées crème de différentes couleurs. Elles sont capables d'élaborer un pigment vert-jaune sur gélose King B (**Figure 10, Tableau 2**).

**Tableau 2** : Caractères morphologique des souches de *Pseudomonas*.

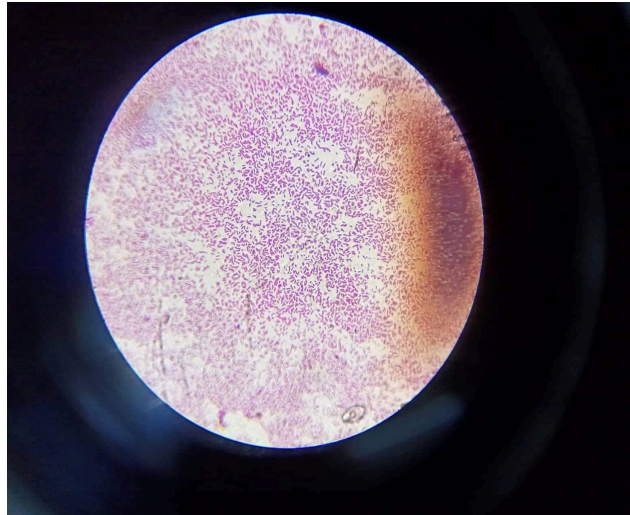
Souche	Forme	Élévation	Surface	Pigment
<b>KBZ1</b>	Irrégulière	Bombé	Lisse brillante	Jaune
<b>KCZ2</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Orange
<b>KAZ3</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Vert
<b>KDZ4</b>	Irrégulière	Bombé	Lisse brillante	Jaune
<b>KCY5</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Orange
<b>KDY6I</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Jaune
<b>KDY6II</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Jaune
<b>KBY7</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Orange
<b>KBX8</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Blanc
<b>KCX9</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Blanc
<b>KBX10</b>	Irrégulière	Plate	Lisse brillante	Blanc



**Figure 10** : Examen macroscopique de quelques colonies sur King B

### III.1.1.2. Exam microscopique(coloration de gram)

L'observation microscopique a révélé des bacilles à Gram négatif à bouts arrondis. Elles sont mobiles et non sporulées.



**Figure 11** : Examen microscopique des isolats.

### III.1.1.3.Caractéristique biochimique

Tous les isolats étudiés ont été à oxydase+, catalase+, aérobies stricts, mobiles. Tous les isolats ont été fluorescents sauf deux KBX8 et KBX10 sur le milieu King A et King B. Les isolats KBX8, KCX9 et KBX10 se cultivent à 42°C, ce caractère oriente leur identification vers *P. putida* ou *aeruginosa*. Les isolats KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KCY5, KDY6I, KDY6II et KBY7 se cultivent à 4°C, ils ont été identifiés comme *P. fluorescens*.

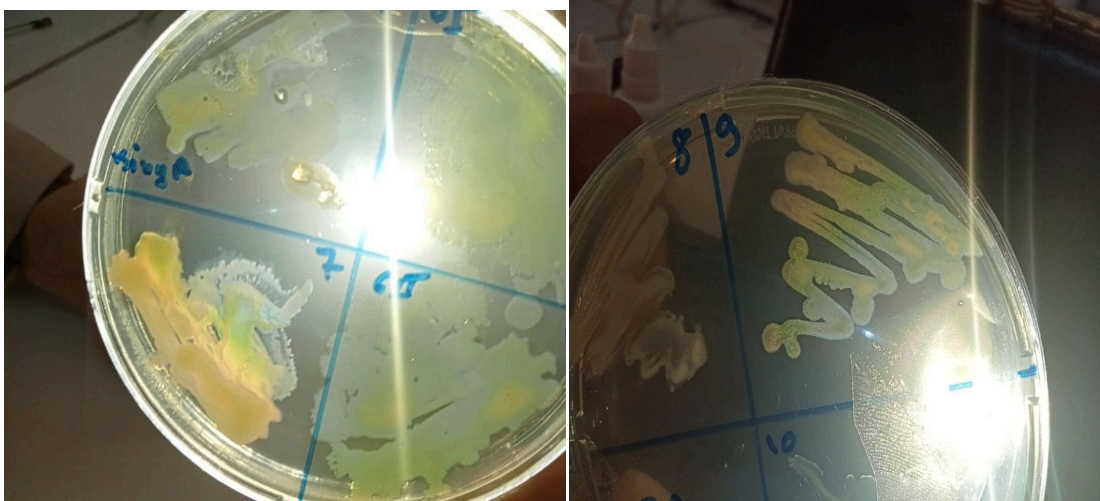
Tableau 3:Caractère biochimique des isolats

isolat	Fuore Scences	Coloration de gram	oxydase	Catalase	mobilité	Type respiratoire	Pigment sur King A	Croissance sur kingB	Croissance à 4°C	Croissanc e à 42°C	Espèce identifiée
<b>KBK1</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>P.fluorescent</i>
<b>KCZ2</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>p.fluorescent</i>
<b>KAZ3</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>P.fluorescent</i>
<b>KDZ4</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>P.fluorescent</i>
<b>KCY5</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>P.fluorescent</i>
<b>KDY6I</b>	+ve	-ve	+	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>P.fluorescent</i>
<b>KDY6II</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>P.fluorescent</i>
<b>KBY7</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	+ve	-ve	<i>P.fluorescent</i>
<b>KBX8</b>	-ve	-ve	-ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	-ve	+ve	<i>P.aerogénosa</i>
<b>KCX9</b>	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	-ve	+ve	<i>P.aerogénosa</i>
<b>KBX10</b>	-ve	-ve	-ve	+ve	+ve	Aérobic stricte	+ve	+ve	-ve	+ve	<i>P.aerogénosa</i>

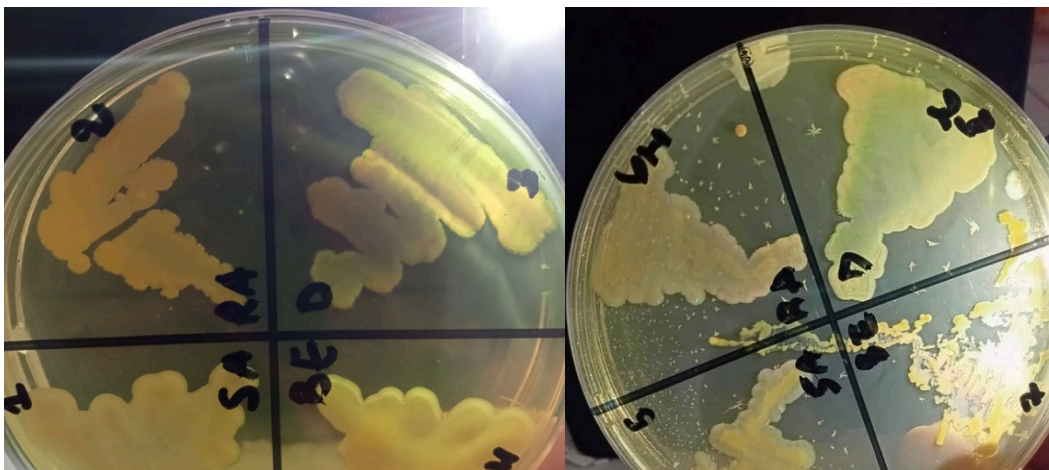
+ : positive / - : négative



**Figure 12** :Caractères biochimiques



A



B

**Figure 13:** Etude de fluorescence sur King A et B

B : sur milieu King B      A : sur milieu King A

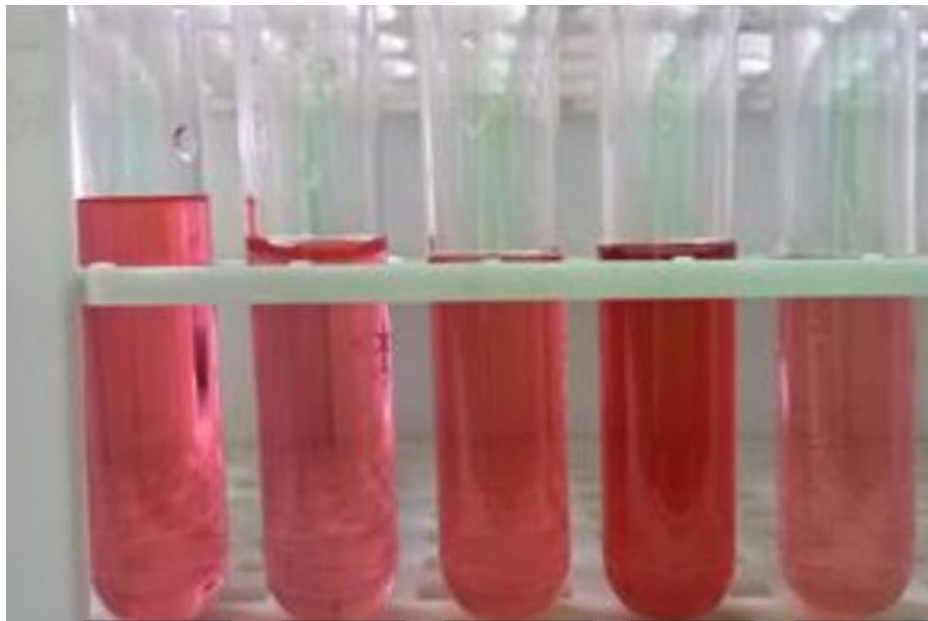
### III.1.2. Caractéristiques promotrices de la croissance végétale

#### III.1.2.1. Production de l'acide indole acétique (AIA)

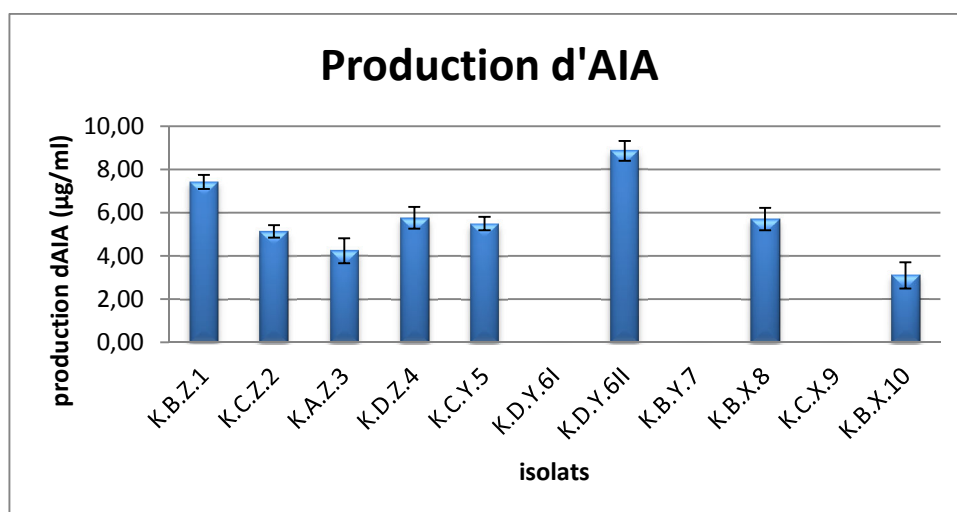
La recherche de l'acide indole acétique chez l'ensemble des isolats a été réalisée après leur culture au bouillon LB additionné de tryptophane à raison de 100mg/l. après 4 jours d'incubation agitée à 30°C, l'apparition de la couleur rose après addition du réactif salkowski indique la production de l'acide indole acétique (**Figure 14**).

L'analyse de la variance a montré un effet hautement significatif du facteur étudié. Les taux de production observés vont de  $3.10^e \pm 0.61$  jusqu'à  $8.86^a \pm 0.46$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  (**Figure**

**15, tableau 4).** La comparaison des moyennes deux a deux par le test de Newman et Keuls a montré que les deux isolats KBZ1 et KDY6II ont présenté des taux de production d'AIA les plus élevés par rapport à la majorité des isolats testés, avec des valeurs d'AIA ( $\mu\text{g/ml}$ ) de :  $7.42^{\text{b}} \pm 0.33$  et  $8.86^{\text{a}} \pm 0.46$  respectivement. Des valeurs moyennes de production ont été observées chez les isolats KCZ2, KAZ3, KDZ4, KCY5, KBX8 et KBX10 avec des valeurs d'AIA de ( $\mu\text{g/ml}$ ) :  $5.13^{\text{c}} \pm 0.29$ ,  $4.24^{\text{d}} \pm 0.58$ ,  $5.76^{\text{e}} \pm 0.5$ ,  $5.5^{\text{e}} \pm 0.31$ ,  $5.7^{\text{e}} \pm 0.52$  et  $3.1^{\text{e}} \pm 0.61$  respectivement. Les isolats KDY6I, KBY7, KCX.9 ont représenté des taux de production négatifs  $0^{\text{f}} \pm 0$ .



**Figure 14 :** Production de l'acide indole acétique par les isolats.



**Figure 15 :** Taux de production de l'acide indole acétique.

### III.1.2.2.Solubilisation du phosphate

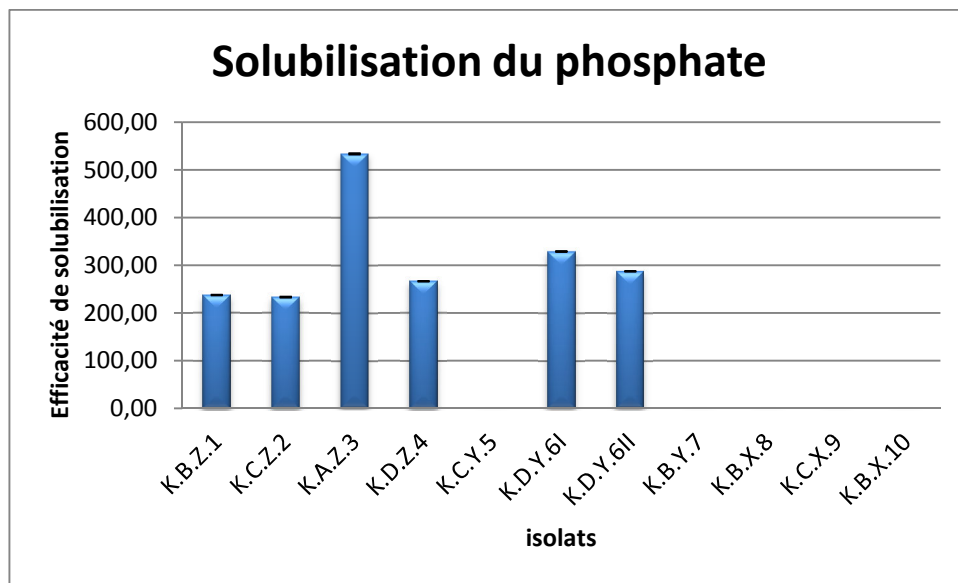
La capacité des isolats de *Pseudomonas* à solubiliser les phosphates inorganique a été étudié par un test dans lequel le pouvoir de solubilisation a été évalué après croissance sur le milieu gélosé Pikovskaya (PVK).

La culture de chacun des isolats sur le milieu gélosé PVK a montré que les isolats KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KDY6I et KDY6II sont entourées par une zone claire (**Figure 16**) traduisant leur capacité à solubiliser le phosphate présent dans le milieu. L'importance de cette solubilisation a été mesuré par l'indice de l'efficacité de solubilisation qui est variable d'un isolat à l'autre.

C'est ainsi que des valeurs d'efficacité de solubilisation (ES) du phosphate allant de 0 jusqu'à  $533.39^a \pm 1.23$  ont été observés. La comparaison des moyennes deux a deux par le test de Newman et Keuls a montré une valeur maximale de  $533.39^a \pm 1.23$  chez l'isolat KAZ3. Des valeurs moyennes de solubilisation ont été observées chez les isolats KBZ1, KCZ2, KDZ4, KDY6I et KDY6II avec des valeurs de :  $237.46^e \pm 0.65$ ,  $233.33^f \pm 0.85$ ,  $266.58^d \pm 0.56$ ,  $328.56^b \pm 0.04$ ,  $287.33^c \pm 0.56$  respectivement. Au contraire cinq isolats KCY5, KBY7, KBX8, KCX9 et KBX10 ont été incapable de solubiliser le phosphate (ES=0) (**Figure 17, Tableau 4**).



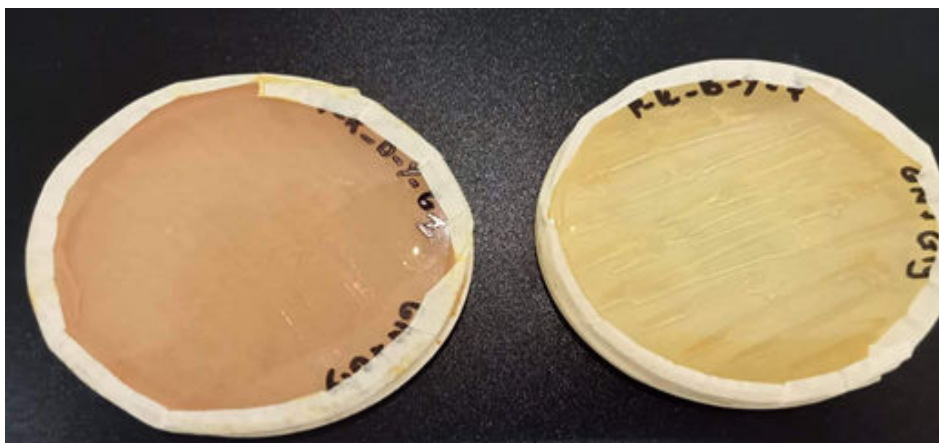
**Figure 16** : Solubilisation du phosphate par des isolats sur milieu PVK



**Figure 17 :** Efficacité de solubilisation (ES) du phosphate sur le gélose pikovskaya par les isolats bactériennes

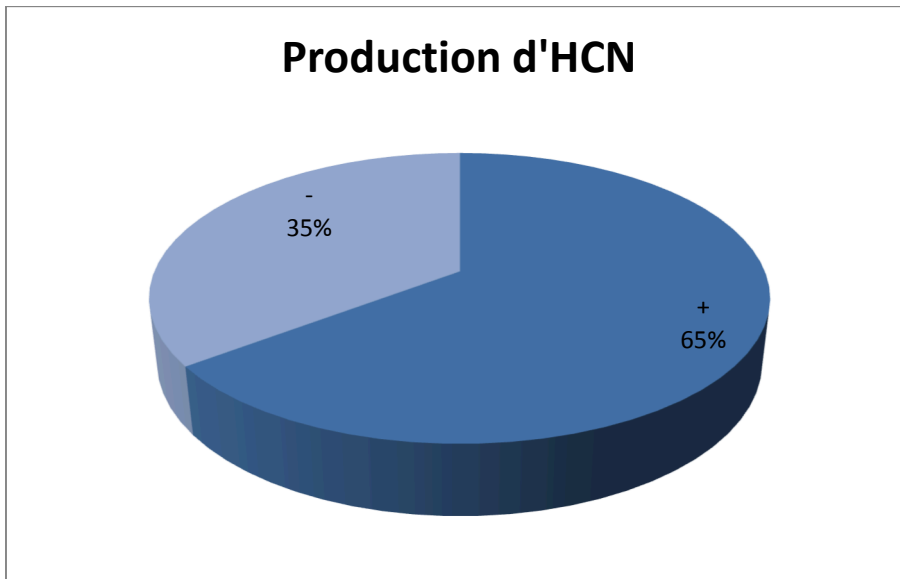
### III.1.2.3. Production d'acide cyanhydrique HCN

Le virement de la couleur jaune vers la couleur orange, a été observé chez cinq isolats KBZ1, KAZ3, KDZ4, KDY6I et KDY6II, par contre les autres isolats était négatif pour le test (**Figure 18et19 ;Tableau4**).



**Figure18 :** Production de l'acide cyanhydrique par les isolats



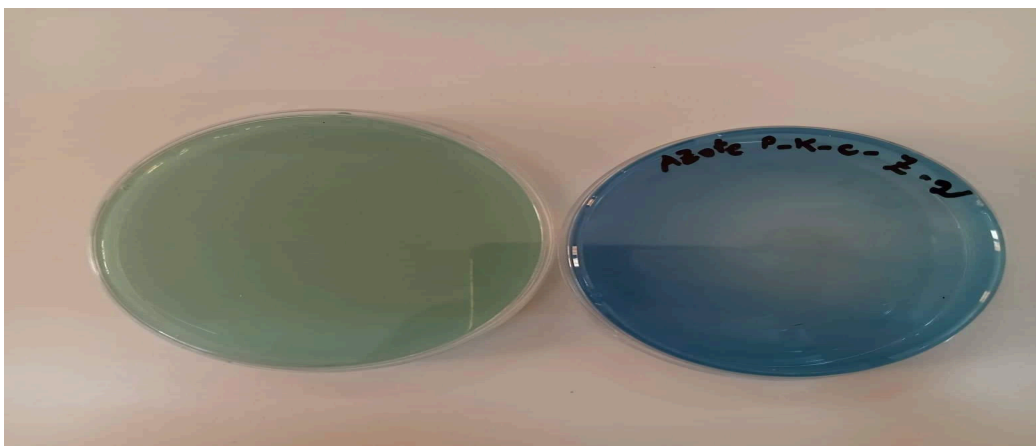


**Figure 19** : Les isolats qui produit d' HCN

#### III.1.2.4. Fixation d'azote

La mise en évidence de la fixation de l'azote atmosphérique chez les différents isolats via la production de l'ammonium, est révélée par le virement de la couleur verte vers le bleu sur le milieu de culture.

Selon les résultats obtenus, tous les isolats sont capables de fixer l'azote atmosphérique (**Figure 20 et 21, Tableau 4**).



**Figure 20** : Mise en évidence Fixation d'azote atmosphérique par les isolats



**Figure 21** : Les isolats fixatrices d'azote

#### III.1.2.5. Solubilisation du zinc

La capacité des isolats de *Pseudomonas* à solubiliser le zinc a été évalué par un test dans lequel le pouvoir de solubilisation a été testé après croissance sur le milieu gélosé Bunt et Rovira.

La culture pure de chacun des isolats sur le milieu gélosé BR a montré que les isolats KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KDY6I et KDY6II étaient entourés par une zone claire (**Figure 22**) traduisant leur capacités à solubiliser le zinc présent dans le milieu. L'importance de cette solubilisation a été mesuré par l'indice de l'efficacité de solubilisation, est variable d'un isolat à autre.

C'est ainsi que des valeurs d'efficacité de solubilisation (ES) du zinc allant de 0 jusqu'à  $500.33^a \pm 1.52$  ont été observés. La comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman et Keuls a montré une ES maximale de  $500.33^a \pm 1.52$  chez l'isolat KAZ3. Des valeurs moyennes de solubilisation ont été observées chez les isolats KBZ1, KCZ2, KDZ4, KDY6I et KDY6II avec des valeurs de  $425.00^c \pm 2$ ,  $280.00^f \pm 1$ ,  $325.33^e \pm 0.57$ ,  $433.22^b \pm 0.1$  et  $350.00^d \pm 0$  respectivement. Au contraire cinq isolats KCY5, KBY7, KBX8, KCX9 et KBX10 ont été incapable de solubiliser le zinc (ES=0) (**Figure 23, Tableau 4**).

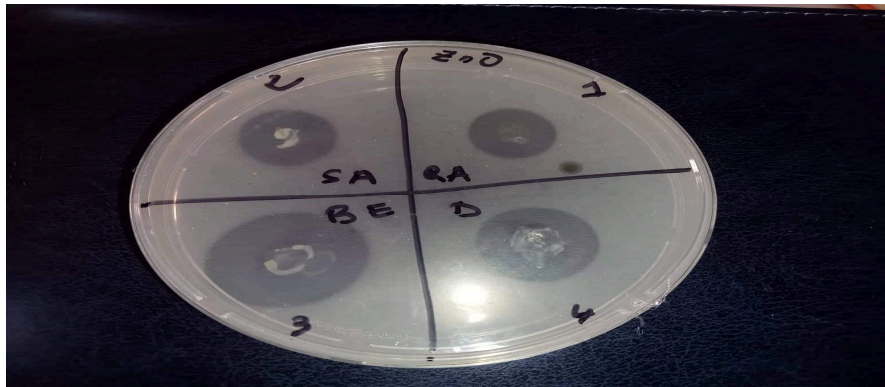


Figure 22 : Solubilisation du zinc par des isolats sur milieu BR

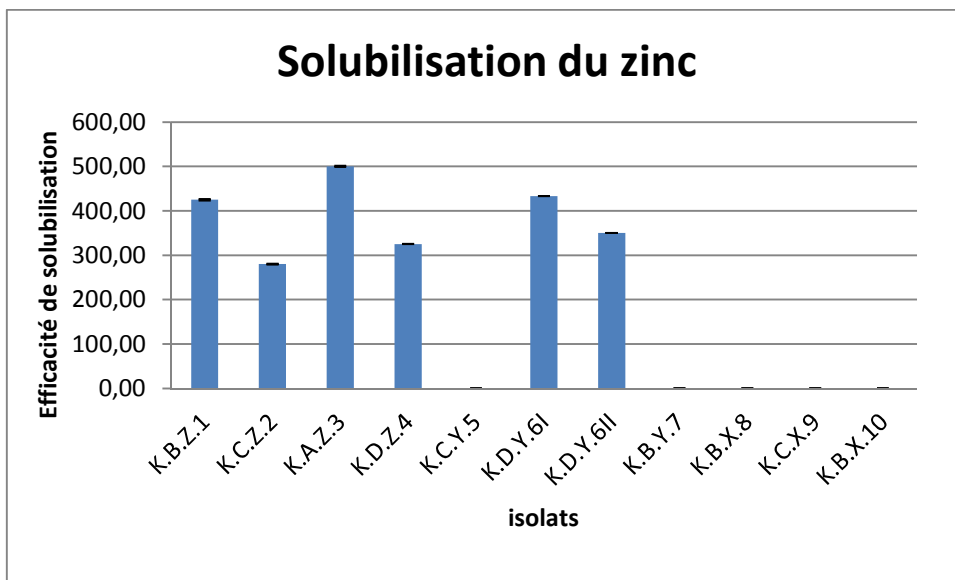


Figure 23 :Efficacité de solubilisation (ES) du zinc sur le gélose BR par les isolats bactériennes

**Tableau4:** Activités PGP des isolats testés.

<b>Isolats</b>	<b>AIA</b>	<b>SP(ES)</b>	<b>HCN</b>	<b>Fixation d'azote</b>	<b>SZ(ES)</b>
<b>KBZ1</b>	7.42 <sup>b</sup> ±0.33	237.46 <sup>e</sup> ±0.65	+	+	425,00 <sup>c</sup> ±2
<b>KCZ2</b>	5.13 <sup>c</sup> ±0.29	233.33 <sup>f</sup> ±0.85	-	+	280.00 <sup>f</sup> ±1
<b>KAZ3</b>	4.24 <sup>d</sup> ±0.58	533.39 <sup>a</sup> ±1.23	+	+	500.33 <sup>a</sup> ±1.52
<b>KDZ4</b>	5.76 <sup>c</sup> ±0.5	266.58 <sup>d</sup> ±0.56	+	+	325.33 <sup>e</sup> ±0.57
<b>KCY5</b>	5.50 <sup>c</sup> ±0.31	0.00 <sup>g</sup> ±0	-	+	0.00 <sup>g</sup> ±0
<b>KDY6I</b>	0.00 <sup>f</sup> ±0	328.56 <sup>b</sup> ±0.04	+	+	433.22 <sup>b</sup> ±0.1
<b>KDY6II</b>	8.86 <sup>a</sup> ±0.46	287.33 <sup>c</sup> ±0.56	+	+	350.00 <sup>d</sup> ±0
<b>KBY7</b>	0.00 <sup>f</sup> ±0	0.00 <sup>g</sup> ±0	-	+	0.00 <sup>g</sup> ±0
<b>KBX8</b>	5.7 <sup>c</sup> ±0.52	0.00 <sup>g</sup> ±0	-	+	0.00 <sup>g</sup> ±0
<b>KCX9</b>	0.00 <sup>f</sup> ±0	0.00 <sup>g</sup> ±0	-	+	0.00 <sup>g</sup> ±0
<b>KBX10</b>	3.1 <sup>c</sup> ±0.61	0.00 <sup>g</sup> ±0	-	+	0.00 <sup>g</sup> ±0

**III.2.Discussion :**

La caractérisation macroscopique et microscopique et la production des pigments, ont permis de sélectionner 11 isolats de *Pseudomonas*. ces derniers ont montrés une couleur verdâtre sur King A. seulement neuf isolats ont produit un pigment jaune verdâtre (**Figure 5**).

Les colonies ont des formes bombé, lisse, lisse, brillante, et muqueuse. L'observation microscopique a montré des bacilles droits ou légèrement incurvé présentant une coloration de Gram négative. Tous ces caractères en plus les tests positive de l'oxydase et catalase ont permis de rapprocher les souches de *Pseudomonas* (**Palleroni et al.,1984 ; Jacques,1994 ; Bossis,1995**).

L'application de l'identification selon la schémas proposé par Digat et Gardan(**1987**) a ressorti deux groupes principaux, le premier est représenté par *Pseudomonas fluorescent /putida* pouvant a croitre à 4°C avec un pourcentage de 72.7% et la deuxième groupe pouvant croitre à 42°C est rapproché à *Pseudomonas aeruginosa* avec un pourcentage de 27.3%. les résultats préliminaires obtenus montrent une diversité phénotypique qui peut clarifier la dominance de *Pseudomonas fluorescent/putida* par rapport à l'autre espèce retrouvée *Pseudomonas aeruginosa*.

De nombreux chercheurs dans le monde ont apporté différents mécanismes pour expliquer le pouvoir des PGPR à stimuler la croissance des plantes et pour les protéger contre les pathogènes en agriculture (**Laslo et al., 2012 ; Mavrodi et al., 2012**). La fixation d'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphate et la production des phytohormones (AIA) sont autant des processus biochimiques les plus souvent cités comme les principaux mécanismes utilisés par les PGPR pour améliorer la production du rendement des cultures (**Venieraki et al., 2011**).

Les résultats obtenus ont montré que les huit isolats KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KCY5, KDY6II, KBX8 et KBX10 ont manifesté une excellente production de l'acide indole acétique lors de la comparaison avec d'autre souches PGPR isolées et testées dans les études de **Ahmed et al.,(2004);Khakipour et al., (2008)et Karnwal, (2009)**.

La croissance des racines a été stimulée par la libération de IAA par les exsudats racinaires en présence de tryptophane compose un précurseur de la biosynthèse de l'auxine (**Kamilova et al., 2006 ; Khalid et al., 2006**). L'AIA produit par PGPR et son impact

positif sur la croissance des plantes ont été rapportés par de nombreux chercheurs (**Rashid et al., 2012 ; Ahmad et al., 2016**).

Plusieurs études antérieures ont aussi rapporté que l'AIA est produit par diverses bactéries de la rhizosphère. Kumar *et al.* (2014) rapportent que des souches de *Pseudomonas fluorescens* (Ps-BK1 et PsAB4) étaient capables de produire des quantités d'AIA variables allant de 95.60 à 110.00 µg/ml en présence de 200 µg/ml de tryptophane.

Les 6 souches bactériennes isolées, sélectionnées promotrices de la croissance des plantes (KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KDY6I et KDY6II) ont montré un excellent potentiel de solubilisation de phosphate, traduit par la formation des zones claires sur la surface de la gélose du milieu Pikovskaya .

Des travaux antérieurs réalisés par **Ruchiet al., (2012)** ont rapporté sur des résultats similaires chez 26 souches isolées du genre *Pseudomonas*, avec une activité de solubilisation de phosphate.

L'isolat KAZ3 qui est isolé à partir de compartiment endophyte a montré une excellente potentiel de solubilisation (ES= 533.39<sup>a</sup>±1.23), des travaux similaire montré que la solubilisation des phosphates a été également détectée chez les bactéries endophytes (**Baig et al., 2010**). Ces bactéries présentent un intérêt particulier pour l'agriculture (**Ji et al., 2014**).

Les travaux d'Alam *et al.*, (2002) ont également obtenu un ISP avoisinant 3.29 chez la souche PSB- 125 107MB isolée à partir de la rhizosphère de plante de maïs. En revanche, Islam *et al.*, (2007) un index de solubilisation important de 6.7 chez des souches originaires de la surface des racines du riz.

Les résultats obtenus ont montré que 5 souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de plantes (KBZ1, KAZ3, KDZ4, KDY6I et KDY6II) ont manifesté une excellente production d'HCN. La production de HCN par les *Pseudomonas* 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 (**Blumer et Haas, 2000**).

Des travaux similaires a été réalisée par Hamoum (2017), ou il a trouvé que un taux de production d'HCN très faible chez tous les genres étudiés excepté pour *pseudomonas* (100%).

Les résultats obtenus ont montré que les tous isolats sélectionnés ont manifesté une excellente activité de fixation d'azote, révélée par la croissance sur milieu de culture dépourvu d'azote.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux réalisés par Shabayev, (2010), quia rapporté que les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* ont présenté une excellente activité de fixatrice d'azote atmosphérique.

Les 6 isolats bactériennes sont montré un excellent potentiel de solubilisation de Zinc, qui est traduit par la formation des zones claires autour des colonies sur la surface de la gélose BR. Il avait été rapporté que la solubilisation et la libération de composés Zn peuvent être dues à la production d'acides organiques (Agusto da Costa et Duta,2001). Des travaux similaires de Azadeh *et al.*,(2012)montrent que les *Pseudomonas* ont un excellent potentiel de solubilisation du zinc ou leur ES varient entre 0 et 800.

Conclusion



## Conclusion :

De nombreux microorganismes, bactéries ou champignons, naturellement présents dans le sol ou bien appliqués au niveau du système racinaire vont contribuer à la croissance des plantes environnantes. On parle donc sur les PGPR ou Plant Growth-Promotin Rhizobacteria. Ces microorganismes agissent via différents modes d'action.

Dans le but d'isoler des rhizobactéries (*Pseudomonas*) à potentiel de promotion de la croissance de plante, 11 isolats bactériennes ont été sélectionnées par isolement à partir de la rhizosphère. Après identifications (coloration de gram, oxydase, catalase, type respiratoire,) des isolats ont a obtenues 3 souches de *Pseudomonas fluorescens /putida* et 8 souches de *Pseudomoas aeroginosa* .

Dans cette étude, une estimation des capacité PGP de *Pseudomonas* a été réalisé, les résultats obtenus variaient de  $3.10^a \pm 0.61$  (KDY6II) jusqu'à  $8.86^a \pm 0.46$   $\mu\text{g}8/\text{ml}$ (KBX10). Les isolats KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KDY6I et KDY6II sont induit la solubilisation du phosphate qui ont entourées par une zone claire traduisant la capacité à solubiliser le phosphate présent dans le milieu, à un indice de l'efficacité de solubilisation de  $233.33^f \pm 0.85$ (KCZ2 ) jusqu'à  $533.39^a \pm 1.23$ (KAZ3). Les isolats KBZ1, KAZ3, KDZ4, KDY6I ET KDY6II produit l'acide cyandhydrique . Toute les isolats a été fixé l'azote atmosphérique. Et pour la solubilisation du zinc. Les isolats KBZ1, KCZ2, KAZ3, KDZ4, KDY6I et KDY6II sont entourées par une zone claire qui traduisent la solubilisation par un indice de l'efficacité de solubilisation de  $280^f \pm 1$  (KCZ2) jusqu'à  $500.33^a \pm 1.52$  (KAZ3).

Ces différents modes d'actions contribuent tous potentiellement à un meilleur développement de la plante et pourront conduire à un meilleur rendement.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographique :

**Abbas-Zadeh, P., N. Saleh-Rastin, H. Asadi-Rahmani, K. Khavazi, A. Soltani, A.R. Shoary-Nejati, et M. Miransari. 2010.** Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta. Physiol. Plant.* **32**: 281-282.

**Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R. and Gardan, L., (2000).** *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.*, 50 :9–18.

**Adams, D. O., and Yang, F, 1979.** Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 170-174.

**Agusto da Costa, A.C. and F.P. Duta, 2001.** Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, and *Bacillus subtilis*. *Braz. J. Microbiol.*, 32: 1–5.

**Ahmad, F., Ahmed, I., Khan, M.S.(2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.

**Alam S., Khalil, S., Ayub, N. and Rashid, M. 2002.** In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *Intl. J. Agric. Biol.* 4:454-458.

**Ali, S.k.Z, V. Sandhya, M. Grover, N. Kishore, L.V. Rao, et B. Venkateswarlu. 2009.** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils.* **46**: 45–55.

**Ali, S.k.Z, V. Sandhya, M. Grover, N. Kishore, L.V. Rao, et B. Venkateswarlu. 2009.** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils.* **46**: 45–55.

**Ali, S.Z., V. Shya and L.V. Rao, 2014.** Isolation & characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. *Ann.Microbiol.*, 64: 493–502.

**Aly, M. M., EL Sayed, H E. A., Jastaniah, S. D. (2012).** Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. Isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat. *Journal of American science*, 8(5), 667-676.

**ANOVA, B., Jaillard, B., RUIZ, J., Béné, J. C., et Cousin, B. 1997.** Couplage entre transfert de matière et réactions chimiques dans un sol. Partie 2: Application à la modélisation des transferts de matière dans la rhizosphère. *Entropie*, 33(207), 13-24.

**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, no 1-2, novembre, p. 7.

**Arora NK, Tewari S, Singh R ,2013.** Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. In: Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, 411-449.

## Références bibliographiques

---

- Ashrafzaman, M., Hossen, F.A., Ismail, M. R., Hoque, A., Islam, M. Z., Shahidullah, S. M., Meon, S.(2009).** Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7). 1247-1252.
- Azadzah, B ; Ahmad, A ; Hishem, M ; Kazem, K et Ebrahim, P(2012).** Evaluation of zinc solubilization by different strains of fluorescent pseudomonas. *J. applsci. Environ.* 16(3).295-298.
- BACA B.E. and Elmerich C (2007).** Chapter 6: Microbial Production of plant Hormone. C.Elmerich and W.E.Newton(eds). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*.
- Baig, K.S., Arshad, M., Zahir, Z.A. and Cheema, M.A. 2010.** Comparative efficacy of qualitative and quantitative methods for rock phosphate solubilization with phosphate solubilizing rhizobacteria. *Soil Environment*, 29: 82-86.
- Bakker, A.W., et B. Schippers. 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth-stimulation. *Soil. Biol. Biochem.* 19: 451-457.
- Bano, A et M. Fatima. 2009.** Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fert. Soils.* 45: 405–413.
- Bano, A et M. Fatima. 2009.** Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fert. Soils.* 45: 405–413.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M and Spröer, C., 2007).** *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (5): 979-985.
- Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch. 2002.** Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. *In* G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- Benduzi, A., Peres, D., Vargas, L. K., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia., L. M. P. (2008).** Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39(3), 311-320.
- Blumer, C., et D. Haas. 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol* 173: 170-177.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L. 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20:51-53.
- Brimecombe, M. J., F.A. De Leij, et J.M. Lynch. 2007.** Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. *In* R. Pinto, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), *The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press. New York.
- Bunt, J.S. and A.D. Rovira, 1955.** Microbiological studies of some subantarctic soils. *J. Soil Sci.*, 6: 119–128.
- Cheng, Z., E. Park, et B.R. Glick. 2007.** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can. J. Microbiol.* 53: 912-918.

## Références bibliographiques

---

- 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. Thèse de doctorat. Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. & Scannell, J.W. (2002).** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6(99).
- Dasri, K., Kaewharn, J., Kanso, S., & Sangchanjiradet, S. (2014).** Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 19, 268-268.
- Delarras C ,2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- Dell'Amico, E., L. Cavalca, et V. Andreoni. 2008.** Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium resistant rhizobacteria. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 74–84.
- Djibaoui R, Bensoltane A. 2005.** Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*, *African Journal of Biotechnology*, Vol 4 (7), 697-702.
- Dommergues, Y. Mangenot, F,1970. ecologie microbienne du sol .Masson et Cie, 2013.** Microbacterium avec l'uranium. Th doctorat : Microbiologie : Université d'AixMarseille,. paris, pp9- 72(796).
- Duangpaeng, A., Phetcharat, P., Chanthapho, S. and Okuda, N. 2013.** Screening of endophyte bacteria for phosphate solubilization from organic rice Proceeding Science and Engineering, 4th International Science, Social Science, Engineering and Energy Conference 2012- 61–66.
- Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Akkanas-Krishnamoorthy S.& Savchuk S.C., 2005.** Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem*, 37: 955–964.
- Flandrois J. P., Chomarot M., 1988,** L'examen cytobactériologique des urines. in : Bactériologie médical pratique, MEDSI / Mc GRAW-HILL, Paris ; 21, p.3-11.
- Foster RC, Rovira AD ,1978.** The ultrastructure of the rhizosphere of *Trifolium subterraneum* L. In: *Microbial ecology* (MW Loutit, JAR Miles, eds) Springer-Verlag, Berlin, 278-290
- Glick, B. R. (2005).** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC desaminase. *FEMS microbiology letters*, 251(1). 1-7.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., Penrose, D. M. (1999).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *World Scientific*, London, UK. 267p.
- 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

## Références bibliographiques

---

- Grover, M.S.k.Z. Ali, V. Sandhya, A. Rasul, et B. Venkateswarlu. 2010.** Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Doi: 10.1007/s11274-010-0572-7.
- Haas, D., et C. Keel. 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* **41**: 117-153.
- Hamoum H., (2017)** - Screening des diazotrophes non symbiotiques associés aux plantes des zones salines de l'ouest algérien : effet phyto-stimulateur sur la croissance du blé dur, Thèse de Doctorat, Université de A. Ben badis de Mostaganem, 115p.
- Hanna, A. L., Youssef, H. H., Amer, W. M., Monib, M., Fayez, M., Hegazi, N. A. (2013).** Diversity of bacteria nesting the plant cover of north siani desrts, Egypt. *Journal of advanced research*, 4(1), 13-26.
- Höfte, M., et N. Altier. 2010.** Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* **161**: 464-471.
- Hui, L. I. U., Xiao-Qin, W. U., Jia-Hong, R. E. N., & Jian-Ren, Y. E. (2011).** Isolation and identification of phosphobacteria in poplar rhizosphere from different regions of China. *Pedosphere*, 21(1), 90-97.
- Islam, M.d. T., Deora, A., Hashidoko, Y., Rahman, A., Ito, T., and S. Tahara. 2006.** Isolation and identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Biosci.*, 62(1/2): 103-110.
- Jacques, P. 1999.** Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plakett-Burman design. *Appl. Biotechnol.*, 77:223-233.
- Jain D. K. and Patriaquin D. G (1985).** Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Canadian Journal of microbiology* 31: 206-210.
- Ji, S.H., Gururanib, M.A. and Chuna, S.C. 2014.** Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169: 83-98.
- Kamilova. F., S. Validov, T. Azarova, I. Mulders, et B. Lugtenberg. 2005.** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1809–1817.
- Kang, H –F., Zong, X-X., Guang, J-P., Youg, T., sun, X-L, Ma,Y., Redden, R. (2012).** Genetic diversity and relationship of global fababean (*viciafaba* L.) germplasmreveledby.ISSR markers. *Theor APPL Genet.*124.
- Karnwal A. (2009).** Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* **91**: 61-63.
- Kennedy Ivan R.,LilyL.Pereg-Grek,Graig Wood, Rosalind Deaker, Kate Glichrist and SuniethaKatupitiya (1997).**Biologicalnitrogen fixation in non-leguminous field corps: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. SUN Fix Centre for Nitrogen Fixation, Departement of Agricultural Chemistry and soil Science, University of Sydney, NSW, Australia.
- Khakipour N., K. Khavazi, H. Mojallali, E. Pazira and H. Asadirahmani (2008).**

## Références bibliographiques

---

- 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, 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
- King, E.O., M.K. Ward, et D.E. Raney. 1954.** Two simple methods for the determination of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 303-304.
- kirdi billal ,2011.**Rôle des PGPR « Plant GrowthPromotingRhizobacteria » dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites.Mémoire Magister en Sciences Agronomiques,Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach –Alger).
- Kowa Ichuk, G. A. & Stephen, J. R. (2001).** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.*
- Kuiper, I., G.V. Bloemberg, et B.J.J. Lugtenberg. 2001.** Selection of a plant bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 14 : 1197-205.
- Kumar P, Dubey RC ,2012.**Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of Phaseolus vulgaris. *J CurrPersApplMicrobiol* 1: 6-38.
- Kumar, A., Maurya, B. R., Raghuwanshi, R. 2014.** Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3 121–128.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B. N. (2011).** *Bacillus* as PGPR in cro ecosystem. *In* :Maheshwari, D. K. (Ed). *bacteriain agrobiologie. Corpecosystem. Springer Berlin Heidelberg, Germany.* Pp. 37-59.
- Laredj Zazou Rahma, 2020.** EVALUATION DU COMPORTEMENT PHYSIOLOGIQUES, ET POTENTIALITES BIOCHIMIQUES ET PHYTOCHIMIQUES ADAPTATIVES DU (*Phaseolus vulgaris*.L) SOUMISE AU STRESS SALIN : CAS DES CULTIVARS SIDI FERREDJ ET DJADIDA. Thèse de doctorat. Laboratoire d'Écodéveloppement des espaces. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes.
- Larpent J. P. et Sanglier J. J, 1989.**Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris. 130 pages (31-61).
- LemanceauP, 1992.** Effets b'en'efiques de rhizobact'eries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie, EDP Sciences*, 12 (6), pp.413-437.
- Lombi. E, 2001.***Trace Elements in the Rhizosphere.* CRC Press. Cité dans *Microbial Health of the Rhizosphere & Environ. Sci.*, 4 (6): 687-692.
- Long S.R (2001).** Genes and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant growth and physical.*125: 69-72.
- Loper S.R et Gross H (2007).** Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Eur.J. Plant Pathol.* 119: 265-278.

## Références bibliographiques

---

- Loper, J. E., Schroth, M. N. (1986).** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopatology*. 76(4), 386-389.
- Malek F ,2015.**interaction microbienne cours assure aux Master II microbiologie et Magistère Maitrise de la qualité et du développement microbien. Université de Tlemcen. P :17
- Masson et Cie, Noumeur, S,2008.** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna). Th doctorat : Biologie : Université Mentouri Constantineparis, pp9- 72(796).
- Mavrodi, O. V., Walter, N., Elateek, S., Taylo, C. G., Okubara, P. A (2012).** Suppression of rhizoctonia and pythium root rot of wheat by new strains of pseudomonas. *Biological control*, 62(2), 93-102.
- Mench M ,1985 .** Influence des exsudats racinaires solubles sur la dynamique des métaux dans la rhizosphère du maïs (*Zea mays* L). Thèse de Dr del'INPL, Univ Nancy, 109 p
- Mercado-Blanco, J., et P.A.H.M. Bakker. 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*. 92: 367-389.
- Moore, E.R.B., B.J. Tindall, V.A.P. Martins Dos Santos, D.H. Pieper, J.L. Ramos, et N.J. Palleroni. 2006.** Nonmedical: *Pseudomonas*, p.646-703. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA.
- Mouafek A .2010 .**La symbiose à *rhizobia* chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicag osativa* L.) dans la région de Biskra .Mémoire de magister ,Sciences Agronomiques ,Université de Mohamed khider Biskra ,p 6 et 37.
- MuneesAhemad,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
- MuneesAhemad,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.
- 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.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., & Sa, T. (2005).** Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2), 127-133.
- Parmar P, Sindhu SS ,2013.** Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *J Microbiol Res* 3: 25-31.
- Patten, C.L., et B.R. Glick. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801.
- Peix, A., Berge, O., Rivas , Abril, A.and Velazquez E, (2005).** *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1107–1112.



## Références bibliographiques

---

**Pikovskaya, R.I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species, *Microbiologiya*, 17, 362-370.

presence of l-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*, 61-63.

Production of auxin hormone by fluorescent Pseudomonads. *American-Eurasian J. Agric.*

**Ramesh R.; Joshi A. A.; Ghanekar M. P. (2009).** *Pseudomonads*: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:47–55.

**Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, et F.J. Gutiérrez Mañero. 2008 a.** Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), p. 41- 52. *In* : I. Ahmad, J. Pichtel et S. Hayat(ed.), *Plant-bacteria interactions*. Wiley -Vch, Weinheim.

**Rogers J.R., Bennett, P.C. and Choi, W.J., 1998,** Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *American Mineralogy*, 83, 1532-1540.

**Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., Dowling, D. N. (2008).** Bacterial endophytes : recent developments and application. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.

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

**Sandhya, V., S.K.Z. Ali, B. Venkateswarlu, G. Reddy, et M. Grover. 2010.** Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Arch. Microbiol.* **192**: 867-876.

**Sandhya, V., S.K.Z. Ali, M. Grover, G. Reddy, et B. Venkateswarlu. 2009.** Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils.* **46**: 17-26.

**Sauvêtre, A., & Schröder, P. (2015).** Uptake of carbamazepine by rhizomes and endophytic bacteria of *Phragmites australis*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 83.

**Schroth MN, Hancock JG ,1981.** Selected topics in biological control. *Annu Rev Microbiol* 34, 453-476  
**Schroth MN, Hancock JG ,1982.** Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* 216, 1376-1381

**Schroth MN, Hildenbrand DC ,1964 .** Influence of plant exudates on root-infecting fungi. *Annu Rev Phytopathol* 2, 101-132

**Sharma, P., K.C. Kunawat, S. Kaur and N. Kaur, 2014.** Assessment of zinc solubilization by endophytic bacteria in legume rhizosphere. *Ind. J. Appl. Res.*, 4: 439–441.

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

**Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews.* 31(4), 425-448.

## Références bibliographiques

---

**Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, Shilpi Mittal, A.K. Tripathi, et B.N. Johri. 2005.** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* **89**: 136-150.

**van Loon, L.C., et P.A.H.M. Bakker. 2005.** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, p. 39-66. *In* Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer Science Dordrecht, The Netherlands.

**Vancanneyt, M., Segers, P., Torck, U., Hoste, B., Bernardet, J.-F., Vandamme, P. and Kersters, K. (1996).** Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 46:926–932.

**Venieraki, A., Dimou, M., Pergalis, P., Kefalogianni, I., Chatzipavlidis, I., Ktinakis, P. (2012).** The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial ecology*, 61(2), 277-285.

**Yang, J, J.W. Kloepper, et C.M. Ryu. 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.*4:1-4.

**Zahira, AZ., U. Ghani, M. Naveed, S.M. Nadeem, et H.N. Asghar. 2009.** Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Arch. Microbiol.* **191**: 415-424.

**Zhuang, X., J. Chen, H. Shim, et Z. Bai. 2007.** New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Int.* **33**: 406-413.

Annexes

# Annexes

---

## Annexe 1 : composition des milieux de culture :

### 1.1.King B

Peptone.....	10g
NaCl.....	5g
Extrait de levure .....	3g
Extrait de viande .....	3g
Agar agar .....	20g
PH.....	7,2

### 1.2.mannitol-mobilité

Hydrolysate tryptique de caséine.....	10g
Mannitol.....	7,5g
Rouge de phénol.....	0,04g
Nitrate de potassium.....	1g
Agar .....	3,5-4g
PH.....	7,6

### 1.3.viande-foie

Base de viande foie .....	20g
Glucose.....	2g
Agar.....	6g
PH.....	7,4

### 1.4.Gélose nutritif

Peptone.....	10g
NaCl.....	5g
Extrait de levure .....	3g
Extrait de viande .....	3g
Agar agar .....	20g
PH.....	7,2

### 1.5.Picovskaya

Glucose .....	10g
---------------	-----

## Annexes

---

Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> O.....	5g
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> .....	0,5g
KCl.....	0,2g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,1g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O.....	0,004g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,002g
NaCl.....	0,2g
Extrait de levure .....	0,5g
Pourpre de bromocrésol.....	0,1g
PH.....	7±0,2

### 1.6.Burk N Free :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.4g
Phosphate dipotassique .....	0.5g
Sulfate du sodium.....	0.05g
Chlorure de calcium.....	0.2g
Sulfate mg 7H <sub>2</sub> O.....	0.1g
Sulfate de fer 7H <sub>2</sub> O.....	0.005g
Molybdate de sodium.....	0.003g
Agar.....	15g

### 1.7.Bunt and Rovira :

Glucose.....	10g
Sulphate d'ammonium.....	1g
Chloride de potassium.....	0.2g
Di-potassium hydrogène phosphate.....	0.1g
Sulphate de magnésium.....	0.2g
Source de Zn .....	0.1%
Agar.....	15g

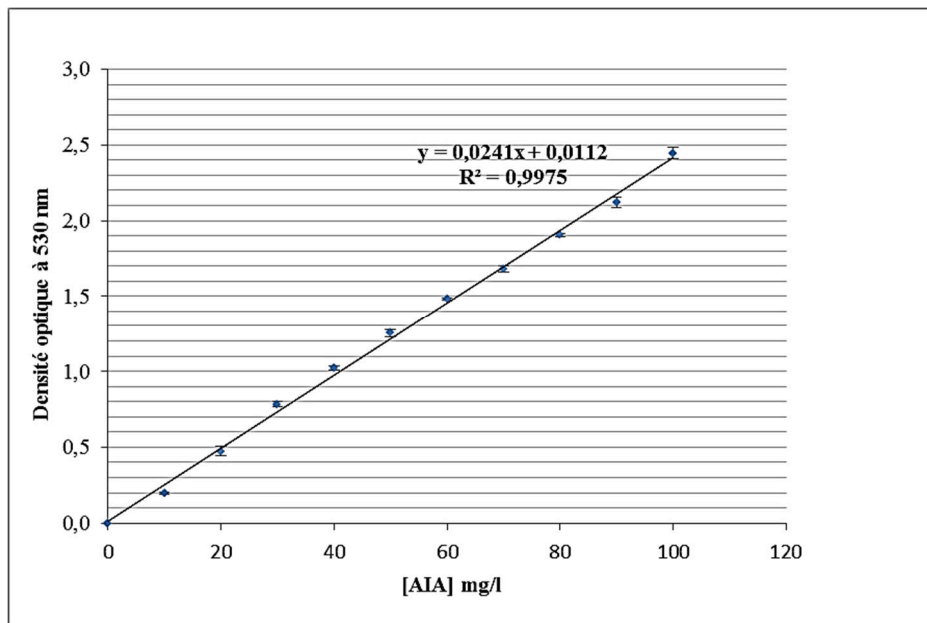
## Annexes

### Annexe II : coloration de gram :

Protocole :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur une lame bien propre.
- Prélever une colonie bien isolée avec une pipette Pasteur boutonnée et la dissocier dans la goutte d'eau. Le frottis obtenu est séché.
- Recouvrir totalement avec du violet de gentiane pendant 1 min, rincer ensuite à l'eau de robinet. Le frottis est ensuite recouvert de lugol pendant 1 min.
- Décolorer par l'alcool et laver rapidement à l'eau du robinet. Le frottis est enfin recouvert de fushine pendant 30 secondes, puis lavé à l'eau, séché à température ambiante.
- Examiner le frottis au microscope optique à l'objectif 100 et à l'immersion à l'huile de cèdre. Après la coloration de Gram le *Pseudomonas* apparaît sous forme de bacilles colorés en rose.

### Annexe III : Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA :



### Annexe IV : tableaux des analyses statistiques (STATBOX) :

Tableau 1 : l'analyse de la variance de la production de l'Acide Indole Acétique :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	284,181	32	8,881				
VAR.FACTEUR 1	280,648	10	28,065	174,737	0		
VAR.RESIDUELLE 1	3,533	22	0,161			0,401	9,64%

## Annexes

---

**Tableau 2** : l'analyse de la variance de la solubilisation du Phosphate :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1000007	32	31250,23				
VAR.FACTEUR 1	1000001	10	100000,1	332075,7	0		
VAR.RESIDUELLE 1	6,625	22	0,301			0,549	0,32%

**Tableau 3** : l'analyse de la variance de la solubilisation di Zinc :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1315958	32	41123,68				
VAR.FACTEUR 1	1315943	10	131594,3	188297,5	0		
VAR.RESIDUELLE 1	15,375	22	0,699			0,836	0,40%