

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Ghardaia



**Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la
Terre**

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques.

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : DJANI Halima

MEHAYA Elalia

Thème

**Réponses morphologiques, biochimiques et effets PGPR chez
quelques isolats rhizobiens nodulant l'arachide
(*Arachis hypogaea* L.)**

Soutenu publiquement, le 24 /06 /2019.

Devant le jury composé de :

M. MHAMMEDI A.D.
M. KRAIMAT M.
M. DIF G.

Maitre-Assistant A
Maitre-Assistant A
Maitre-Assistant A

Univ. Ghardaia
Univ. Ghardaia
Univ. Ghardaia

Président.
Encadrant.
Examineur.

Année universitaire : 2018 – 2019

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remercions **ALLAH** qui nous a aidé et nous a donné la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous voudrions tout d'abord adresser toute nos reconnaissances à notre encadreur **Mr. KRAJMAT Mohamed**, pour son dévouement son écoute et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, qui n'aurait jamais vu le jour sans son inspiration, son aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire. Ainsi que toute l'équipe pédagogique de l'université de **GHARDAJA**.

Nous tenons à remercier sincèrement **Mr. BOURAS. N** et **Melle. DJEMOUAJ.N**, et l'équipe des laboratoires **EL SALAM** et **BJO 3** et tout leur personnel qui nous a guidé par leurs conseils et leurs critiques en acceptant de répondre à nos questions durant nos recherches.

Nous voudrions également remercier **les membres de notre jury Mr. Le président MHAMMEDJ** et **l'examinateur DEJF**, pour l'honneur qu'ils ont fait en portant leur attention sur ce travail.

Sans oublier nos chers parents et familles pour leurs contributions, leurs soutiens et leurs patiences et encouragements.

Ne pouvant citer chacun par son nom nous nous excusons de toute omission de nos proches et amis pour leur encouragement.

Merci à toutes et à tous.

Je dédie cette Thèse de master

À MES CHERS PARENTS Souad et Abdelaziz.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne m'en acquitterai jamais. Puisse Dieu, vous accorde santé, bonheur et longue vie.

À MES CHERS ET ADORABLE FRÈRES ET SOEURS

Amine, Amina, Khalil, aussi à ma belle-sœur Souhila et mon beau-frère Abdelfatah. En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance.

Je souhaite une vie pleine de bonheur et de Succès et que Dieu, le tout puissant, protégé et garde.

Toute famille de MEHAYA et DJERFAF.

Mes très chers amis.

Tous les membres de ma promotion.

Tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

Mon binôme Halima et toute la famille DJANI.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au succès de ce projet. Je vous dis tous merci.



Je dédie cette Thèse de master

À MES CHERS PARENTS Zohra et Ahmed.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne m'en acquitterai jamais. Puisse Dieu, vous accorde santé, bonheur et longue vie.

À MES CHERS ET ADORABLE FRÈRES ET SOEURS

Asma, Safia, Mehdi, Soufian, Ibrahime aussi à mon beau-frère Hichem, que j'aime profondément.

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de Succès et que Dieu, le tout puissant, vous protégé et vous garde.

À toute famille de DJANI et BELLI.

À mes très chers amis.

À tous les membres de ma promotion.

À tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

À mon binôme Elafia et toute la famille MEHAYA.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.



Résumé

Dans le but de l'amélioration du rendement et de la récolte d'arachide dans la Wilaya de Ghardaïa, 14 isolats ont été isolés à partir des nodules racinaires d'*Arachis hypogaea* L. récoltés de trois régions dans la même Wilaya. Les isolats ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers une étude morphologique, biochimique et physiologique, suivie d'une analyse numérique. L'étude relative à l'inoculation d'arachide par 14 isolats est réalisée dans le but d'évaluer la capacité de la formation de nodules chez les isolats et pour apprécier l'effet positif des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes "PGPR" (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Donc, l'efficacité des isolats est liée à la caractérisation des multiples activités PGP telles que la production de l'acide indole acétique (AIA), du cyanure d'hydrogène (HCN), des sidérophores, de la solubilisation des phosphates et potassium et activité enzymatique. Tous les 14 isolats (Bacille et Cocci à Gram + et Bacille à Gram -) produisent l'AIA et solubilisent le phosphate inorganique. Ainsi que 10 des isolats produisent des sidérophores. Pour les autres activités les isolats possèdent une variabilité de la production. L'isolat M4 identifié par séquençage du gène de l'ADNr16S a montré une similarité de 94.06% à *Pseudoxanthomonas koreensis*.

Mots clés : Arachide, Ghardaïa, rhizobactéries, PGPR, solubilisation, phosphate, sidérophores, MSP.

Abstract

The aim of this study is the growth promotion and yield enhancement of peanut in the Ghardaia province, 14 isolates were obtained from root nodules of the of *Arachis hypogaea* L. collected from three localities of same Ghardaia. The 14 isolates were subjected to a phenotypical characterization through a morphological, biochemical and physiological study followed by a numerical analysis. The study on the inoculation of peanut by 14 isolates was carried out for the purpose to assess the ability of nodule formation in isolates and to estimate the positive impact of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in peanut growth and development. Therefore, the effectiveness of these isolates is related to the characterization of multiple PGP activities like the production of IAA (indole acetic acid), hydrogen cyanide (HCN), siderophores, phosphate and potassium solubilization, and enzymatic activity. All 14 isolates (Bacillus and Cocci to Gram + and Bacillus to Gram -) showed production of AIA and phosphate solubilization. As well as 10 of these isolates showed production of siderophore. For the other activities, isolates have exhibited a variability of the production. The M4 isolate identified by sequencing the DNAr 16 S gene, showed a similarity of 94.06% to *Pseudoxanthomonas koreensis*.

Key words: peanut, Ghardaïa, rhizobacteria, PGPR, solubilization, phosphate, siderophores, SMP.

ملخص

من أجل تحسين محصول وحصاد الفول السوداني في ولاية غرداية ، تم عزل 14 عزلة بكتيريا من العقد الجذرية ل *Arachis hypogaea* التي تم جمعها من ثلاث مناطق مختلفة من الولاية، عُرِّضَت العزلات لتوصيف مظهري من خلال دراسة مورفولوجية وكيميائية وفيزيولوجية، متبوعة بتحليل رقمي ثم تم إجراء دراسة حول اضافة هاته العزلات للفول السوداني بغرض تقييم قدرة تكوين العقد في البكتيريا المعزولة وتقييم تأثيرها الإيجابي لنمو النبات الذي يميز البكتيريا الجذرية (PGPR). إذ ترتبط فعاليتها بقدرتها على التميز بالعديد من أنشطة PGP مثل إنتاج حمض (IAA) ، وسيانيد الهيدروجين HCN ، و sidérophores ، وإذابة الفوسفات والبوتاسيوم ، وإثبات احتوائها على انزيمات حيث أن جميع العزلات ال 14 (عصيات و مكورات موجبة Gram و عصيات سالبة Gram) تنتج AIA وتُذَيَّبُ الفوسفات. كما ان 10 من العزلات تنتج sidérophores. بالنسبة للأنشطة الأخرى ، فإن العزلات لها تباين في الإنتاج. أظهرت العزلة M4 التي تم تحديدها من خلال تسلسل ADNr16s هنالك تشابهً بنسبة 94.06% مع *Pseudoxanthomonas koreensis*.

الكلمات المفتاحية : الفول السوداني, غرداية, البكتيريا الجذرية, PGPR, الإذابة, الفوسفات, MSP, sidérophores.

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des rhizobactéries	3
Tableau 2. Analyse de la variance ANOVA de la solubilisation des phosphates.	37
Tableau 3. Analyse de la variance ANOVA de la production des sidérophores.	38
Tableau 4. Analyse de la variance ANOVA de la production d'AIA.....	40
Tableau 5. Résultats du test de nodulation.	46

Liste des figures

Figure 1. Évolution des superficies, productions et rendements d'arachide dans la wilaya de Ghardaïa (2007-2016) (DSA, 2016).....	2
Figure 2. L'isolat D2 après 1 repiquage. (Originale).	8
Figure 3. Test d'anaérobiose (Originale).....	10
Figure 4. Test de fermentation (Originale).....	11
Figure 5. Shaker rotateur (Originale).....	15
Figure 6. Centrifugeuse (Originale).....	15
Figure 7. Spectrophotomètre (Originale).	15
Figure 8. Le protocole de Lorck (Hanane et Lamia, 2018)	16
Figure 9. Les cultures avant la germination (Originale).....	17
Figure 10. Cultures en tubes Gibson (Originale)	18
Figure 11. Cultures hydroponique on phytotron (Originale)	18
Figure 12. Aspect macroscopique de quelques colonies de après 2 jours	22
Figure 13. Observation microscopique des isolats (Gx100). (Originale).	23
Figure 14. Classification Ascendante Hiérarchiques des isolats sur la base des caractères morphologiques.	24
Figure 15. Analyse des Correspondances Multiple des isolats sur la base des caractères morphologiques.	24
Figure 16. Résultats du test au bleu de bromothymol après 72h. (Originale).	25
Figure 17. Réaction de la catalase positive. (Originale)	26
Figure 18. Réaction de l'oxydase positive. (Originale).....	26
Figure 19. Classification Ascendante Hiérarchiques des isolats sur la base des caractères physiologiques et biochimiques.....	27
Figure 20. Analyse des Correspondances Multiple des isolats sur la base des caractères physiologique et biochimique.....	27
Figure 21. La galerie API 20 ^E de l'isolat M3 (Originale).	28
Figure 22. Heatmap de regroupement des isolats en fonction des triplets de tests API 20 ^E	29
Figure 23. Classification ascendante hiérarchique (CAH) des isolats rhizobiens en fonction des tests API 20 ^E	30
Figure 24. Dendrogramme de similarité des isolats selon l'indice de Bray-Crutis d'API 20 ^E . 31	
Figure 25. La galerie API 20 ^{NE} de l'isolat S1. (Originale).....	32
Figure 26. Heatmap de regroupement des isolats en fonction des triplets de tests API 20 ^{NE}	33
Figure 27. Classification ascendante hiérarchique (CAH) des isolats rhizobiens en fonction des tests API 20 ^{NE}	33

Figure 28. Dendrogramme de similarité des isolats selon l'indice de Bray-Crutis d'API 20^{NE}.	34
.....	34
Figure 29. Résultats de la galerie API 50CHB de l'isolat M6 après 48h. (Originale).	35
Figure 30. Résultats de la galerie API Strep de l'isolat M7 après 24h. (Originale).	36
Figure 31. Indice de solubilisation de phosphate.	37
Figure 32. Halo de transparence autour des colonies sur milieu NBRIP (Originale).	37
Figure 33. Solubilisation de Potassium sur milieu ALK (Originale).	38
Figure 34. Indices de production des sidérophores sur milieu solide CAS.	39
Figure 35. Halo orange autour de la colonie S1 caractéristique de la production de sidérophores (Originale).	39
Figure 36. Le taux de production d'AIA sur milieu LB.	40
Figure 37. Production d'AIA sur milieu LB (Originale).	40
Figure 38. Production de HCN (Originale).	41
Figure 39. Présence d'amylase (Originale).	41
Figure 40. Présence de gélatinase (Originale).	42
Figure 41. Classification Ascendante Hiérarchiques des isolats sur la de propriété PGPR des isolats.	43
Figure 42. Analyse des Correspondances Multiple des isolats sur la base des propriétés PGPR des isolats.	43
Figure 43. Des tubes de cultures de témoin + et témoin – (Originale).	44
Figure 44. La croissance des plantes en fonction des hauteurs de la tige principale	45
Figure 45. Des nodules formés par l'isolat D8 (Originale).	45
Figure 46. Arbre phylogénétique de l'isolat M4 basé sur les séquences de l'ADNr16 S.	47

Liste des abréviations

ACM : Analyse de Correspondance Multiple.	LB : Luria Bertani.
ADN : Acide DésoxyriboNucléique.	LCO : lipo chito oligosaccharides.
AIA : Acide Indole Acétique.	M : Concentration molaire.
ALK: Alksender.	min : minute.
ANOVA: Analysis of variance.	ml : millilitre.
API : Analytical Profile Index.	MSP : micro-organisme solubéatrice de phosphate.
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique.	NBRIP: National Botanical Research Institut's phosphate.
B : Bacillus.	N° : Numéro.
BCP : Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol.	NOD : Gènes de nodulation.
BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses.	P : valeur.
BTB : Bleu de BromoThymol.	PCR : Polymerase Chain Reaction.
C ° : Degré Celsius.	PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.
Ca ₃ (PO ₄) ₂ : Tricalcium phosphate.	PH : Potentiel Hydrogène.
CAH : Classification Ascendante Hiérarchique.	PVK : Pikovsakaya.
CAS : Chrome Azurol S.	Qx : Quintaux (100 Kg).
cm : centimètre.	R : Rhizobium.
ddNTP : di désoxy Nucléotide Tri-Phosphate.	rpm: rotation par minute.
dNTP : désoxy Nucléotide Tri-Phosphate.	S : Second.
DO : Densité Optique.	Sp : espèce non déterminée (species).
DSA : Directions des Services Agricoles.	Taq : Thermus aquaticus.
Fe ²⁺ : <i>Fer ferreux</i> .	TE : Tris-EDTA.
Fe ³⁺ : Fer ferrique.	Tr : Ture.
g : gramme.	µL : micro-litre.
h : heure.	UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean.
H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène.	UV : Ultraviolet.
H ₂ S : Sulfure d'hydrogène.	V : Verssion.
Ha : Hectare.	v/v : volume à volume.
HCl : Acide chlorhydrique.	W : Wattman.
HCN : cyanure d'hydrogène.	XVIème : 16 ^e siècle.
HTDMA : hexadécyltriméthyl ammonium.	YMA: Yeast Mannitol Agar.
IS : Indice de Solubilisation.	YMB: Yeast Mannitol Broth.
K : Potassium.	
KH ₂ PO ₄ : Phosphate de monopotassium.	
L : Lignée.	

Table des matières

Introduction

Matériel et méthodes	8
1. Isolement et purification des isolats	8
1.1. Isolement des isolats	8
1.2. Purification des isolats	8
1.3. Conservation des isolats	8
2. Caractérisation morphologique	9
2.1. L'observation macroscopique.....	9
2.2. L'observation microscopique	9
3. Caractérisation biochimique et physiologique	10
3.1. Test de catalase	10
3.2. Test de l'oxydase	10
3.3. Test de fermentation.....	10
3.4. Les galeries Api	11
3.5. Test de vitesse de croissance sur milieu BTB	13
4. Étude des propriétés PGPR des isolats	13
4.1 Solubilisation du phosphate sur un milieu solide	13
4.2 Solubilisation du potassium sur un milieu solide	14
4.3. Production des sidérophores sur un milieu CAS solide	14
4.4. Production d'acide indole acétique (AIA).....	14
4.5. Production d'HCN	15
4.6. Activités enzymatiques des isolats étudiés.....	16
5. Test de nodulation (prestations symbiotiques avec la plante-hôte)	17
5.1. Préparation et stérilisation du sable	17
5.2. Stérilisation de graines	17
5.3. Germination des graines	17
5.4. Culture des plantules	18
5.5. Inoculation	18
6. Caractérisation génotypique des isolats bactériens	18
6.1. Extraction de l'ADN	19
6.2. Amplification par PCR.....	19

6.3. Séquençage	20
6.4. Analyse phylogénétique	20
7. Analyse statistique	21
Résultats	22
1. Identification phénotypique	22
1.1. Caractérisation morphologique des bactéries rhizosphériques	22
1.2. Caractérisation biochimique et physiologique des bactéries rhizosphériques.....	25
1.3. Résultat de système Api	28
2. Résultats d'étude de la propriété PGPR des isolats	36
2.1. Solubilisation du phosphate.....	36
2.2. Solubilisation de Potassium.....	38
2.3. Production de sidérophores	38
2.4. Production d'AIA.....	40
2.5. Production de HCN	41
2.6. Activité de l'amylase.....	41
2.7. Activité d'une gélatinase	42
3. Analyse numérique d'étude de la propriété PGPR des isolats.....	42
3.1. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH).....	42
4. Résultats de Test de nodulation	44
5. Résultats d'analyse phylogénétique	46
Discussion générale	47
Conclusion	
Liste des références	
Annexes	

Introduction

Introduction

Le sol est l'un des environnements les plus complexes de la biosphère, où il héberge une grande diversité microbienne de son point de vue fonctionnel et taxonomique, elle est impliquée dans diverses activités biotiques de l'écosystème du sol pour le rendre dynamique, pour le renouvellement durable des nutriments et la production végétale (Ahemad et Kibret, 2014; Nannipieri *et al.*, 2017). En effet, les bactéries se localisent autour ou dans les racines de la plante (rhizosphère), pour la transformation, la mobilisation, ou encore la solubilisation des nutriments (Hayat *et al.*, 2010).

Le terme rhizosphère dérivé d'un mot grec « *Rhizo* » = racine et « *Sphère* » = champs d'influence (Morgan *et al.*, 2005), est défini comme étant la région spécifique du sol affectée par les racines des plantes (Wasaki *et al.*, 2005). La zone d'interaction entre les bactéries et les racines s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Azrou *et al.*, 2014). L'établissement de la symbiose plante-microorganisme en particulier les légumineuses est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire, entre la bactérie et la plante (Long, 1996). Le processus de nodulation commence lors de la pré-infection, par une phase de reconnaissance entre les deux partenaires, poursuivie de deux étapes quasiment simultanées, l'infection de la racine par les bactéries et l'organogenèse du nodule (Patriarca *et al.*, 2004).

La symbiose qui nous intéresse est l'association Arachide-rhizobactéries. L'arachide est une légumineuse des plus importantes oléagineuses cultivée dans le monde, notamment dans les régions arides et semi-arides de l'Afrique (Wani *et al.*, 1995). Elle est originaire de l'Amérique du Sud. Les portugais introduisirent la plante au début du XVIème siècle sur la côte occidentale de l'Afrique. La culture d'arachide est considérée très ancienne. En Algérie, elle s'est développée au cours des années 80, sans pratiquement aucun appui de la part de l'Etat, elle est cultivée dans plusieurs wilayas El Tarf, Adrar, Ghardaïa, El Oued, Skikda, Bechar et El Bayadh (AIT_OUALI, 2011). Selon la direction des services agricoles (DSA) durant la campagne (2017 dans la wilaya de Ghardaïa), une production de 6.000 Quintaux (Qx) a été réalisée à travers une superficie cultivée de 400 hectares, et une production de 7.560 Qx d'arachide devrait enregistrer au titre de la campagne de cueillette 2018 (DSA, 2017). Il y a d'autres campagnes selon les statistiques du DSA qui représente l'évolution des superficies, productions et rendements d'arachide dans la wilaya de Ghardaïa depuis 2007 à 2016 (DSA, 2016). Selon DSA (2016) la production d'arachide dans la wilaya de Ghardaïa ne cesse de diminuer d'une année à une autre, bien que la wilaya de Ghardaïa soit considérée comme une zone importante en matière de production d'arachide. À partir de l'année 2009, la

diminution les superficies consacrées aux arachides, sont accompagné une importante diminution de la production. Néanmoins, une récupération avait été notée dès l'année 2014, accompagnée d'une augmentation des superficies cultivées d'arachide pour atteindre 450 ha en 2016 avec un rendement 15 Qx/ha (Figure 1).

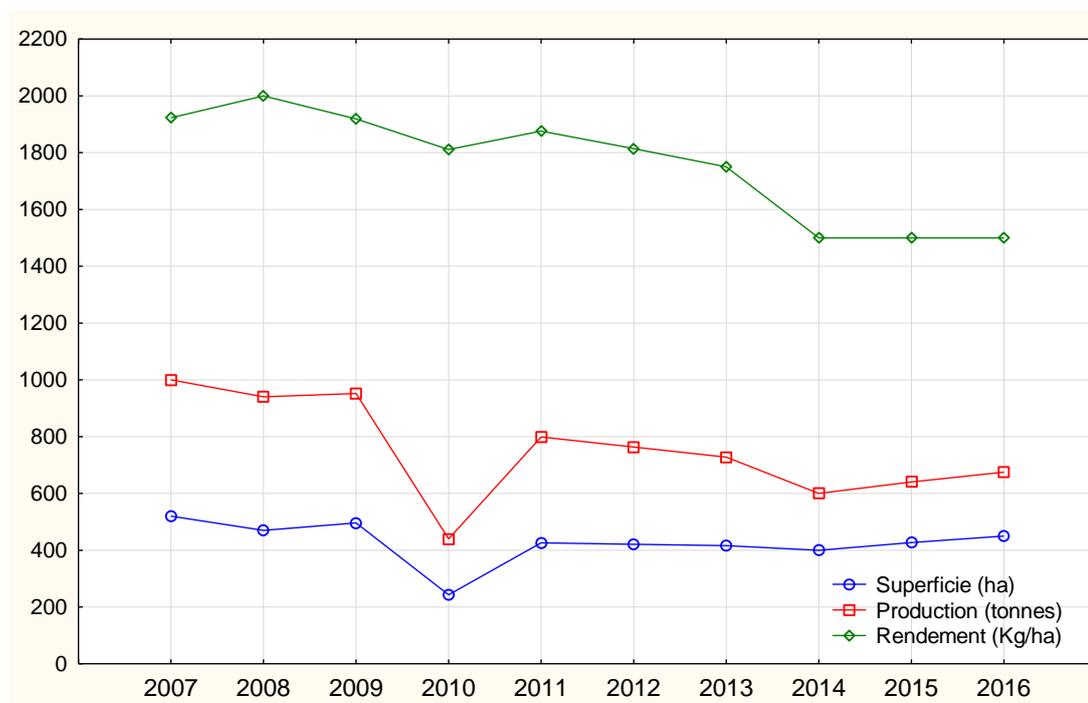


Figure 1. Évolution des superficies, productions et rendements d'arachide dans la wilaya de Ghardaïa (2007-2016) (DSA, 2016).

L'arachide est une espèce appartenant à la famille des légumineuses, sous famille des Papilionacées (Fabacée), tribu des Arachidinées (Krapovickas et Gregory, 1994). Ce dernier repartie en sept sections la plus importante est *Arachis* (Smartt *et al.*, 1978). La section *Arachis* comprend deux espèces (*Arachis monticola* et *Arachis hypogaea*). La germination chez *Arachis hypogaea* L. est une phase correspond à l'imbibition de la graine (24 à 48 h), après la mise en terre de la graine jusqu'à l'apparition de la racine (5 à 6 jours après semis). La germination de l'arachide est de type hypogé. Trois à quatre semaines après la germination, les nodosités apparaissent sur les racines (Issa *et al.*, 2016).

Les bactéries associées aux racines des plantes sont connue sous le terme les rhizobactéries. Les microorganismes rhizosphériques incluant les symbiotes comme les genres *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*. On a convenu alors d'appeler ces bactéries sous le terme global de Rhizobia (Konate, 2007). Les

Introduction

microorganismes rhizosphériques non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Rhizobium radiobacter*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Enterobacter*, *Caulobacter*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Actinobacter Sp*, *Streptomyces spp*. (Antoun *et al.*, 2005; Hallmann *et al.*, 1997; Karnwal, 2009; Khan *et al.*, 2009). Au cours des dernières années, le nombre des rhizobactéries identifiées a augmenté d'une façon significative. Ces microorganismes, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre *phyla* suivants: Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002).

L'étude taxonomique des rhizobactéries revêt une importance capitale pour leur utilisation en agriculture (Diouf, 1997). Pendant longtemps, les propriétés symbiotiques sont restées la seule base de la caractérisation des rhizobactéries mais actuellement l'on a complété l'étude classique des caractères phénotypiques par celles des nouvelles techniques d'études (génomique) (Rayene et Imene, 2016). Classification des rhizobactéries représentée dans le tableau 1 modifiée selon Berrada et Fikri-Benbrahim (2014).

Tableau 1. Classification des rhizobactéries

Phylum		Genres	espèces	Plante hôte	Références
Proteobacteries	Alpha	<i>Rhizobium</i>	<i>Symbiovarviciae</i> <i>Symbiovartrifolii</i> <i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> <i>Trifoliumpratense</i>	(Zakhia <i>et al.</i> , 2004).
		<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. ciceri</i>	<i>Lotus</i> , <i>Cicer</i> , <i>Anthyllis</i> , <i>Astragalus</i> .	(Zhang <i>et col.</i> 2002)
		<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i> <i>A. dobereinereae</i> <i>A. oxalatifilum</i>	<i>Sesbania rostrata</i> , <i>Sesbania virgata</i>	(Rinaudo <i>et col.</i> 1991)
		<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Lespedeza</i> , <i>Betaevulgaris</i>	(Rivas <i>et al.</i> , 2004)
		<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i> <i>S. fredii</i> <i>S. sahelense</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>	(Villegas <i>et al.</i> , 2006)
	Beta	<i>Burkholderia</i>	<i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i>	<i>Alysicarpusglumaceus</i> <i>Aspalatuscarnosa</i> <i>Machaeriumlunatum</i>	(Vandamme <i>et col.</i> 2002)
Gamma	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Peanut (Arachis</i> <i>hypogaea L.)</i>	(Dey <i>et al.</i> 2004)	
Actinobacteries		<i>Frankia</i>	<i>Frankia.sp</i>	<i>actinorhiziennes</i>	(Gray <i>et Smith</i> , 2005)
		<i>Streptomyces</i>	<i>S.ferrqlitis</i> <i>S.felleus</i>	<i>Zea mays</i> , <i>Brassica</i> <i>napus</i>	(Siddiqui <i>et Mahmood</i> , 1999)
Firmicutes		<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. weihenstephanensis</i>	<i>Cicer arietinum</i> , <i>Brassica oxyrrhina</i> ,	(Jackson <i>et al.</i> , 1999)

Introduction

Les rhizobactéries connues aussi sous le terme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) stimulent directement la croissance de plantes en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol (Hallmann *et al.*, 1997), les PGPR sont les principaux agents dans le recyclage des nutriments du sol et par conséquent, ils sont cruciaux pour la fertilité du sol (Glick, 2012).

La quête constante de l'homme pour l'amélioration de la productivité et la réduction des coûts des produits agricoles a eu des incidences négatives à plusieurs niveaux, par l'utilisation des produits chimiques considérés comme l'arme la plus efficace, mais l'utilisation accrue de ces substances a des conséquences néfastes sur l'environnement (Kouassi, 2001; Thakore, 2006). Actuellement, les biologistes s'approchent pour améliorer la production agricole, et pour gagner un statut fort parmi les agronomes par un système intégré de gestion des éléments nutritifs des plantes (Ahemad et Kibret, 2014). Par l'utilisation des bactéries dites promotrices de la croissance des plantes peut constituer une solution alternative prometteuse pouvant réduire l'application des produits chimiques (Nabti *et al.*, 2014). L'effet des PGPR offre donc des possibilités intéressantes pour une agronomie respectueuse de l'environnement (Janisiewicz et Korsten, 2002).

Les PGPR favorisent en général, la croissance des plantes directement en facilitant l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou en modulant les niveaux d'hormones des plantes, ou indirectement en diminuant les effets inhibiteurs de divers agents pathogènes sur la croissance et le développement des plantes sous la forme d'agents de lutte biologique (Glick, 2012).

À ce titre, la mise en évidence de certains effets des PGPR :

- Le phosphore est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes (Ezawa *et al.*, 2002). Le contenu du phosphate dans le sol est de l'ordre de 1 à 5%. Cependant, 95% de cette quantité se trouve sous forme triacide phosphorique (H_3PO_4) insoluble donc indisponible pour les plantes (Molla *et al.*, 1984). Les plantes absorbent le phosphate uniquement sous deux formes solubles: les ions monobasique ($H_2PO_4^-$) et dibasique (HPO_4^{2-}) (Gupta *et al.*, 2015). La capacité de quelques micro-organismes dans la solubilisation de phosphate peut être utilisée pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). La sécrétion d'acide organique telle que acide gluconique dans la voie indirecte et la production de la phosphatase et les phytases dans la voie

Introduction

directe facilitent la conversion de la forme insoluble du phosphate en une forme soluble (Kim *et al.*, 1997). Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas spp*, *Azotobacter*, *Chroococcum*, *Bradyrhizobium* et *Rhizobium sp.* sont les plus performantes dans la solubilisation des phosphates (Podile et Kishore, 2007).

- Le potassium (K) est considéré comme nutriment majeur important pour les plantes après le phosphore et l'azote. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% de potassium dans le sol existe sous forme des 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 (Kumar et Dubey, 2012). Il est à signaler que les micro-organismes des sols jouaient un rôle clé dans la solubilisation de potassium (Rogers *et al.*, 1998). Les bactéries solubilisant de potassium peut dissoudre les minéraux silicatés et le potassium grâce à la production d'acides organiques et inorganiques, à l'acidolyse, à la chélation et à des réactions d'échange. De nombreuses bactéries telles que *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Paenibacillus spp.*, *Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus* et *B. circulans* ont la capacité de solubiliser le potassium (Etesami *et al.*, 2017).
- Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (Neilands, 1995). Bien que le fer soit l'un des minéraux les plus abondants sur terre, il est indisponible pour l'assimilation directe par les microorganismes car l'ion ferrique (Fe^{3+}), forme prédominante dans la nature, est peu soluble (Neilands, 1987). Certaines bactéries sont capable de séquestrer le fer du sol le transforment en molécule appelée sidérophores. Ces derniers fixent le fer ferrique et forment un complexe sidérophore-ferrique, ensuite le retransforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe^{2+}). Les sidérophores sont utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes (Glick et Pasternak, 1998). Beaucoup de bactéries productrices de sidérophores appartiennent aux genres *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* de la rhizosphère (Kuffner *et al.*, 2008). Le siderophore le plus connu est l'aérobactine, isolée pour la première fois de *Aerobacteraerogenes* (Gibson et Magrath, 1969).

Introduction

- L'auxine ou l'acide indole acétique AIA est la phytohormone la plus répandue, elle est connue par son implication directe dans l'initiation de la croissance des racines, la division cellulaire et l'élargissement de la cellule (Vessey, 2003). Il accomplit un rôle primordial dans le développement des plantes, tout en agissant sur l'organogénèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008). L'AIA est synthétisé à partir du tryptophane comme principal précurseur. Les exsudats des racines des plantes sont la source principale du tryptophane dans le sol (Spaepen *et al.*, 2007). Chez le groupe des microorganismes plusieurs bactéries sont capables de produire l'AIA, y compris de nombreuses bactéries du sol appartenant aux genres *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas spp* (Baca et Elmerich, 2007).
- Certaines souches de PGPR ont la capacité à la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques qui inhibition directe de la croissance du pathogène. Les rhizobactéries : *Pseudomonas*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* et *Stenotrophomonas spp.* (Milner *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1999). Produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliquées dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN) (Defago, 1993; de Souza *et al.*, 2003; Haas et Defago, 2005), qui est un métabolite secondaire dont la glycine est le précurseur. Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition. Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien (Zeller *et al.*, 2007). Cet antifongique manifeste des propriétés antagonistes à l'encontre de différents champignons : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Pyricularia*, *Pythium* (Lindberg, 1981).
- En plus de ces effets, les PGPR ayant une activité enzymatique telle que l'amylase. Les amylases sont connues par l'accélération du processus de dégradation de l'amidon (Tang-um et Niamsup, 2012). Deux grandes classes d'amylases ont été identifiées ; la α -amylase (endo 1,4-glucohydrolase α D-glucane) est une enzyme extracellulaire synthétisée par les plantes, les animaux

Introduction

et les microorganismes, la β amylase (exo-1,4 glucanohydrolase α D-glucane) synthétisée principalement par les plantes (Raj *et al.*, 2009; Thoma *et al.*, 1971).

Dans ce contexte, il existe une recherche rigoureuse dans le monde entier avec une plus grande impulsion à explorer un large éventail de rhizobactéries et leur rôle biologiquement important. En effet, le présent travail a pour objectif principal la caractérisation des bactéries associées aux nodules des racines des arachides des régions de Djdid et Sebseb et Mansoura (Ghardaïa). Pour ce faire, les isolats vont être soumis à une étude phénotypique (aspects morphologiques, tests biochimiques), une prestation symbiotique avec la plante-hôte. En outre, les propriétés PGPR retenues dans le cadre de cette étude, concernent le potentiel de solubilisation de phosphate et potassium, la production de sidérophores, d'acide indole-acétique, d'acide cyanhydrique et des activités enzymatiques. Afin de situer la position taxonomique des isolats, les isolats isolés à partir des arachides vont être ainsi soumis à une caractérisation phylogénétique.

***Matériel et
méthodes***

1. Isolement et purification des isolats

1.1 Isolement des isolats

Pour atteindre les objectifs de cette étude, un stock d'isolats (14 isolats) a été utilisé, préalablement prélevés à partir des nodules d'arachide conservés, Une régénération a été effectuée sur un milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Annexe 1.1).

1.2 Purification des isolats

Les colonies ont été repiquées plusieurs fois, à l'aide d'une anse en platine flambée au bec bunsen et dans des conditions stériles, par ensemencement en stries sur des boîtes de pétries contenant le milieu YMA jusqu'à l'obtention des colonies homogènes et faciles à caractériser (Ghanimi, 2014) (Figure 2).



Figure 2. L'isolat D2 après 1 repiquage. (Originale).

1.3 Conservation des isolats

Pour une conservation jusqu'à un an, les isolats sont conservés dans le glycérol à 50 % (v/v) selon la méthode suivante :

- Préparer le milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) (Annexe 1.2) pour la conservation (composition de l'YMA sans ajout d'agar) puis répartir le milieu dans des tubes à Eppendorf stériles à raison de 0,6 ml/tube et inoculer les tubes par des colonies pures. Après 48 h d'incubation : ajouter 0,6 ml de glycérol à chaque tube inoculé, homogénéiser en évitant la formation des bulles d'air. En fin conserver sous une température de 4°C.

2 Caractérisation morphologique

2.1 L'observation macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

Les caractéristiques étudiées sont :

- La forme des colonies : rondes, irrégulières.....etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- La chromogène : couleur de la colonie.
- L'élévation : convexe, concave, plate....etc.
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée.....etc.

2.2 L'observation microscopique

2.2.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram et l'observation microscopique ont permis la détermination de la forme, l'arrangement, la pureté, la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées et la distinction entre deux groupes bactériens : les bactéries à Gram positif, colorées en violet et à Gram négatif en rose. La coloration de Gram et la mobilité bactérienne sont déterminées selon la méthode de Gram.

2.2.2 Détermination du type respiratoire

Les isolats sont ensemencés en stries sur le milieu YMA et incubées 24 h à 30° C dans une jarre anaérobique. Après incubation, la détermination du type respiratoire est effectuée : Si les bactéries poussent donc elles sont anaérobies, si non elles sont aérobies. (Figure 3).

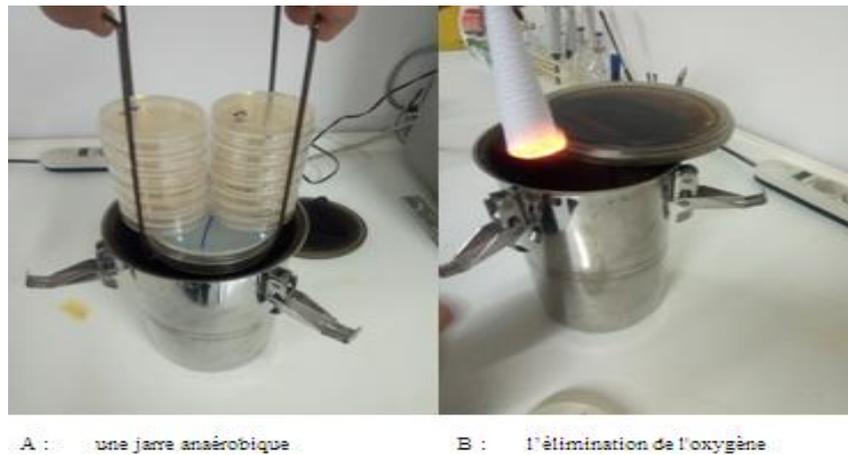


Figure 3. Test d'anaérobiose (Originale).

3 Caractérisation biochimique et physiologique

3.1 Test de catalase

Il s'agit de la recherche de la catalase : enzyme importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$.

Le principe consiste à prélever une colonie à partir du milieu solide et de la mettre sur une lame stérile, puis ajouter une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 . La mise en évidence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses.

3.2 Test de l'oxydase

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral.

Déposer quelques gouttes du réactif d'oxydase (Annexe 2.1) sur un papier filtre blanc puis prélever 2 ou 3 colonies avec une pipette Pasteur flambée et les mélanger à la goutte.

- Une coloration nettement bleue signe une oxydase positive.
- Pas de coloration ou décoloration signe une oxydase négative.

3.3 Test de fermentation

La fermentation du lactose est mise en évidence par l'acidification du milieu qui provoque le virage au jaune de l'indicateur pH (pourpre de bromocrésol), ainsi que par la production de gaz dans les cloches de Durham.

Mettre en solution 13,0 g de bouillon lactose au pourpre de bromocrésol (BCP) déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Répartie en tubes contenant une cloche de Durham, à raison de 10 ml par tube. Stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les cloches de Durham ne doivent pas contenir d'air; puis ensemencer les tubes et Incuber à 30°C pendant 24 et 48 h (Figure 4).

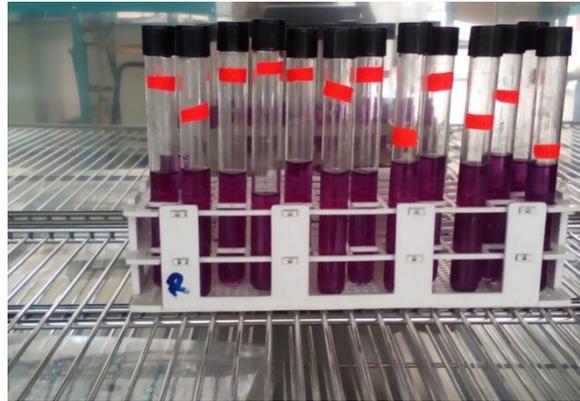


Figure 4. Test de fermentation (Originale).

3.4 Les galeries Api

3.4.1 Test sur galerie API 20^E

Afin de caractériser les isolats, sur le plan biochimique, un test sur galerie API 20^E a été réalisé selon le Protocole de bioMérieux. La galerie 20^E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fastidieux.

La galerie API 20^E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Annexe 2.2).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe3.1) et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification Api Web Biomerieux API20^E V5.0.

3.4.2 Test sur galerie API 20^{NE}

API 20^{NE} est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux. La galerie API 20^{NE} comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline (NaCl à 1%) qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries réagissent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe 3.2) et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique et d'un logiciel d'identification Api Web Biomerieux. API20^{NE} V8.0.

3.4.3 Test sur galerie API 20 Strep

La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de PH Api GP Medium) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique et d'un logiciel d'identification Api Web Biomerieux API 20 Strep V8.0.

3.4.4 Test sur galerie API 50 CHB

L'API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimique permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. L'assimilation de différents substrats carbonés a été testée en utilisant les galeries API (API 50 CH, BioMérieux) selon la procédure décrite par Kersters *et al.*, (1984).

La galerie API 50 CH est constituée de 50 micro-tubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, le premier tube sans principe actif, sert de témoin négatif (Kerstens *et al.*, 1984) la lecture est réalisée après 24 h et 48 h d'incubation sur la base de la couleur apparue :

- Couleur rouge = résultat négatif, - Couleur jaune = résultat positif.
- Couleur noire = production H₂S, - Couleur orange = résultat positif.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique et d'un logiciel d'identification Api Web Biomerieux API 50 CHB V4.1.

3.5 Test de vitesse de croissance sur milieu BTB

Chacun des isolats testés est mis en culture dans des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA gélosé additionné de Bleu de Bromothymol (Annexe 1.3) qui est un indicateur coloré de pH. Les boîtes mises en incubation pendant 5 jours. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration de milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide, reflétant donc une appartenance aux bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium* et *Mesorhizium*) et une coloration bleu foncée indique une réaction basique donc la souche appartient aux bactéries à croissances lente (genre *Bradyrhizobium*) (Jordan, 1984).

4 Étude des propriétés PGPR des isolats

4.1 Solubilisation du phosphate sur un milieu solide

La capacité des isolats isolées à dissoudre le phosphate tricalcique Ca₃(PO₄)₂ a été testée selon la méthode décrite par Nautiyal (1999). Les bactéries isolées sont déposées sous forme de spots sur le milieu solide NBRIP (National Botanical Research Institut's Phosphate) (Annexe 1.4). Après incubation à 28°C/10 jours la solubilisation du phosphate se manifeste par l'apparition d'un halo clair autours de la colonie. Le taux du phosphate solubilisé est calculé par l'indice de solubilisation selon la formule suivante :

$$\text{IS phosphate} = \frac{\text{Diamètre de la zone claire} - \text{Diamètre de la colonie}}{\text{Le diamètre de la colonie}} \times 100$$

4.2 Solubilisation du potassium sur un milieu solide

La capacité des bactéries à solubiliser le K est testé selon la méthode des spots sur un milieu solide d'Aleksandrov (milieu déshydraté) à pH neutre et à une température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ incubé pendant 7 jours. La solubilisation du potassium se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie (Mursyida *et al.*, 2015).

29.605g de milieu Aleksandrow Agar dans 1000 ml d'eau distillé stérilisé par l'autoclavage pendant 20 min à 120°C

Le taux du potassium solubilisé est calculé par l'indice de solubilisation selon la formule suivante :

$$\text{IS potassium} = \frac{\text{Diamètre de la zone claire} - \text{Diamètre de la colonie}}{\text{Le diamètre de la colonie}} \times 100$$

4.3 Production des sidérophores sur un milieu CAS solide

Le principe de cette technique repose sur la présence du complexe fer –CAS-hexa décyl tri méthyl ammonium (complexe Fer/CAS/HDTMA) dans le milieu, ce complexe de couleur bleu peut se dissocier en présence des chélateurs de fer, qui captent le fer et libère ainsi le *Chrome Azurol S* qui a une couleur orange (Schwyn et Neilands, 1987). Les cultures sont déposées en spot sur le milieu de détection Chrome Azurol Sulfate (CAS) selon la méthode de Schwyn et Neilands, (1987) et Louden *et al.*, (2011) modifiée et adaptée (Annexe 1.5.6). Ce milieu de couleur bleu, permet la visualisation de la production de sidérophore, grâce à la formation d'un halo orange autour de la colonie productrice. Le diamètre de ce halo est mesuré.

L'examen visuel permet de s'assurer de la capacité des isolats à produire des sidérophores et le calcul du rapport : $\frac{\text{Diamètre du halo}}{\text{Diamètre de colonie}}$

4.4 Production d'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA (auxines) par les bactéries sélectionnées est déterminée selon la méthode de Bric *et al.*, (1991). Les bactéries sont ensemencées sur milieu Luria Bertani (LB) (Annexe 1.7) supplémenté de 0,5% de glucose et de 0,5 mg/ml de tryptophane. Ce dernier est préalablement filtré à travers une membrane millipore ($0.22 \mu\text{m}$) et ajouté au milieu après autoclavage. Après une incubation à $28^\circ\text{C}/72 \text{ h}$ sous agitation 180 rpm (Figure 5), les cultures

sont centrifugées à 1000 tr/min/15min. Après centrifugation, 1ml du surnageant est récupéré et additionné de 2 ml du réactif de Salkowsky (Annexe 2.3). Le mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 20min. Le développement d'une couleur rose est l'indicateur de la production d'AIA (Figure 6).



Figure 5. Shaker rotateur (Original).



Figure 6. Centrifugeuse (Original).

L'absorbance de la coloration rose apparue est mesurée par spectrophotomètre à 530 nm. Les valeurs d'AIA produit par chaque isolats sont calculées par extrapolation sur une courbe standard préparée de l'AIA pure (Sigma-Aldrich ®) (Annexe 3.3). (Figure 7)



Figure 7. Spectrophotomètre (Originale).

4.5 Production d'HCN

La production d'HCN a été recherchée suivant le protocole de Lorck (1948). Sur une gélose nutritive additionnée de 4.4g/l de glycine préalablement filtrée, les isolats bactériens sont ensemencés par stries, un disque de papier Whatman N°42 de 9 cm de diamètre saturé en picrate alcalin (Annexe2.4) est déposé dans les couvercles des boîtes, ces dernières sont

scellées avec du para-film et incubées inversées à 30°C/96 h. Le virage de la couleur du papier Whatman du jaune vers l'orange ou le marron indique la production de l'HCN. (Figure8).

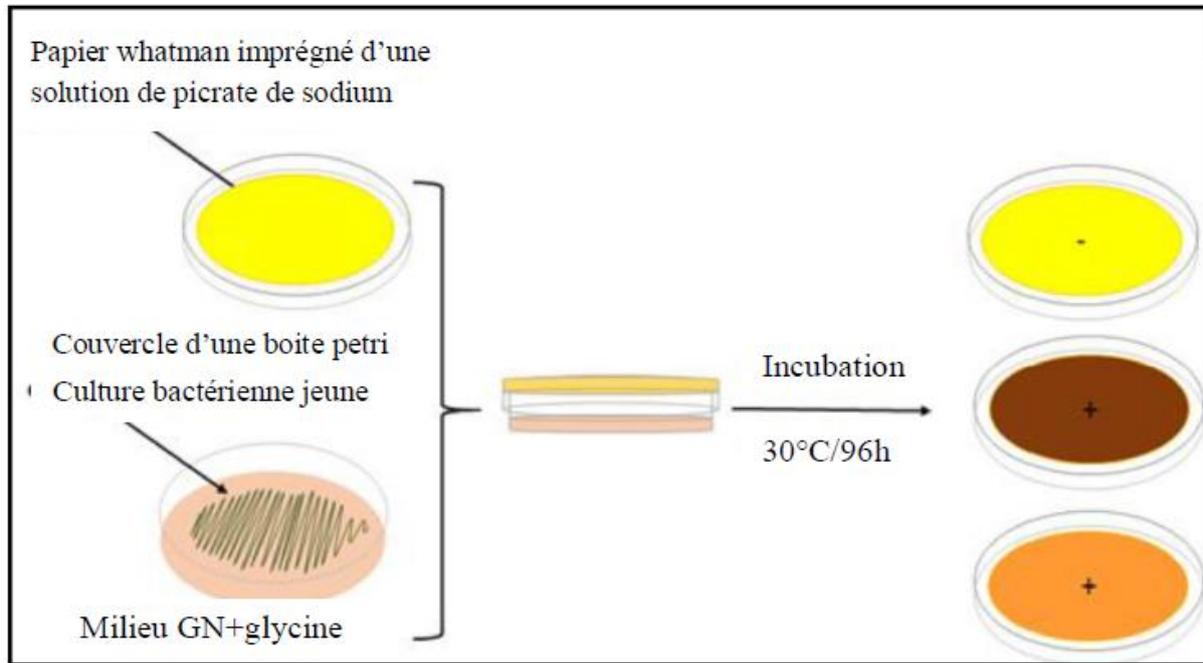


Figure 8. Le protocole de Lorck (Hanane et Lamia, 2018).

4.6 Activités enzymatiques des isolats étudiés

4.6.1 Recherche de l'activité amylase

Ce test a été réalisé sur milieu gélose nutritif contenant 1% d'amidon soluble (Annexe 1.8). Le milieu estensemencé, puis incubé à 30°C /48 -72 h. Ensuite, une solution de Lugol est versée à la surface des boîtesensemencées, quelques minutes après, l'excès est éliminé et les boîtes sont rincées à l'eau distillée. L'apparition d'une zone claire autour des disques indique la présence d'une activité amylase (Gordon et Smith ,1953).

4.6.2 Recherche de l'activité gélatinase

Ce test a été réalisé sur le milieu nutritif gélosé contenant la gélatine (Annexe 1.9), selon la méthode de Williams et Cross, (1971). Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri puisensemencé par des stries de l'isolat et incubé à 30°C/48 -72 h. Une solution de chlorure de mercure (le réactif de Frazier) (Annexe 2.5) permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine, qui se traduit par la présence d'une auréole claire autour des colonies (Williams et Cross, 1971).

5 Test de nodulation (prestations symbiotiques avec la plante-hôte)

Tous les isolats doivent être testés et confirmés avant de les inoculer, le test de nodulation est la capacité et l'aptitude des isolats à former des nodules avec la plante-hôte dans des conditions bactériologiques contrôlées. (Vincent, 1970; Beck *et al.*, 1993).

Ce test consiste en l'inoculation des plantules hôte (*Arachis hypogaea* L) avec les différents isolats obtenus.

5.1 Préparation et stérilisation du sable

Le sable est stérilisé par autoclavage à 120° C pendant 20 min 3 fois successives.

5.2 Stérilisation de graines

Tremper les graines 30 second dans de l'hypochlorite de sodium NaCl, puis rincer 7 fois avec l'eau distillé, le test a été réalisé avec 2 types de graines.

Arachide d'El-Kala *Berrihane*.

Arachide de Ghardaia *Metlili*.

5.3 Germination des graines

Mettre les graines dans les gobelets contenant le sable stérile 10 jours à 28°C et à l'obscurité pour la germination (Figure 9).



Figure 9. Les cultures avant la germination (Originale).

5.4 Culture des plantules

Après germination (7 à 10 jours selon l'espèce) les jeunes plantes sont transférées dans des tubes Gibson (Gibson,1980) (Annexe1.10) et placées dans une chambre de culture en conditions photopériodiques (20 W/m²) à 28°C et l'humidité 50% (Figure11).

Les tubes contenant 25 ml de milieu de culture sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 120°C. À la sortie de l'autoclave ils sont disposés de façon inclinée jusqu'à ce que la gélose se fixe en pente et ensuite remplis avec le même milieu liquide (60 ml par tube) (Bertrand, 1997) (Figure10).



Figure 10. : Cultures en tubes Gibson (Originale).



Figure 11. Cultures hydroponique on phytotron (Originale).

5.5 Inoculation

L'inoculation des plantes est réalisée 48 heures après la mise des plantes en tube avec 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Chaque essai comprend un témoin négatif non inoculé.

6 Caractérisation génotypique des isolats bactériens

L'identification moléculaire qui est un outil fiable et précis, développé pour la classification et l'identification des bactéries. Après avoir étudié les caractères de morphologie et de physiologie des isolats, une identification moléculaire a été effectuée (pour de meilleures données taxonomiques) pour l'isolat M4. L'identification moléculaire de

bactérie a été réalisée au niveau du laboratoire MacroGen Europe (Meibergdreef 31, 1105 AZ Amsterdam, Pays-Bas : North Holland (<https://dna.macrogen.com/eng/>)).

6.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN bactérien est une étape primordiale avant toute manipulation génétique. L'ADN bactérien chromosomique est extrait par chauffage dans un tampon Tris-EDTA (TE) est une solution de lyse (1mM de Tris-HCl et EDTA 10mM pH 7,4). Quelques colonies d'une culture pure sont introduites dans un tube Eppendorf stérile contenant le tampon TE stérile. La suspension est agitée puis soumettre à choc thermique permet la lyse cellulaire. La suspension est centrifugée avec refroidissement. Le surnageant est récupéré stérilement dans un autre tube à Eppendorf. Le surnageant est gardés à 4°C pendant une nuit pour permettre l'élimination de l'ARN par lyse puis ajouter la matrice d'extraction InstaGene (BIO-RAD, cat.no.732-6030), est centrifugée encore une fois. La matrice adsorbe les produits de lyse cellulaire qui interfèrent avec le processus d'amplification par PCR. L'ADN dans le surnageant est prêt pour la PCR (Silini, 2014).

6.2 Amplification par PCR

La PCR (Polymérase Chaîne Réaction) permet amplifier les séquences du gène ARNr 16S qui sont des séquences très conservées chez les procaryotes par lequel les petites différences entre les espèces microbiennes peuvent être mesurées et même utilisées pour identifier les microorganismes (Chibani, 2017).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) consiste à multiplier la séquence de l'ADNr 16S en utilisant les deux oligo universelles (amorces) encadrant la séquence de ce gène.

Le principe de la PCR à l'aide d'un thermocycleur (DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD), V2.0) consiste en la répétition d'un cycle triphasique : dénaturation de l'ADN à amplifier, hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible et enfin, élongation des amorces par l'activité d'une ADN polymérase en présence de dNTP. La Taq ADN polymérase est (Dr. MAX DNA Polymerase (Doctor protein INC, Korea, cat.no.DR00302) possède une activité terminal-transférase qui a pour effet l'ajout d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés.

L'amplification de l'ADN se déroule comme suit : après une première phase de dénaturation (5min à 95°C), 35 cycles comprenant chacun trois étapes de variation de température :

- dénaturation de 30 s à 95°C et une hybridation de 30 s à 55°C puis une élongation de 1min 30 s à 72°.

À la fin du dernier cycle, une incubation de 7 min à 72°C permet d'achever les synthèses de l'ADN en cours. Les produits d'amplification sont analysés par Électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est visualisé sous lumière UV.

6.3 Séquençage

La méthode de Sanger consiste à synthétiser in vitro des brins d'ADN complémentaires à l'un des brins de l'ADN que l'on veut séquencer. La technique repose sur l'incorporation d'un nucléotide modifié (un didésoxyribonucléotide, auquel il manque deux atomes d'oxygène) qui empêche la contamination de la synthèse d'ADN.

Avant de procéder au séquençage, l'ADN à analyser doit être purifié selon le traitement enzymatique pour dégrader les amorces et les dNTP restants. Par la suite, les échantillons sont réamplifiés et marqués en utilisant un kit de marquage «Big Dye Terminator Cycle Sequencing, v3.1» (Applied Biosystems). Le milieu réactionnel est composé : de Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués par un composé fluorescent, d'une amorce reverse fraîchement, d'un tampon de dilution et de l'eau ultrapure. Les quatre réactions peuvent ainsi se dérouler dans la même éprouvette; la couleur de la fluorescence permet de reconnaître les extrémités « didésoxy » des brins d'ADN produits par la réaction. Le séquençage est effectué sur un séquenceur (analyseur ABI PRISM 3730XL (type à 96 capillaires)). Des chromatogrammes sont analysés par le logiciel Variant Reporter version 1.1 (Biosystèmes appliqués).

6.4 Analyse phylogénétique

La séquence est comparée aux séquences homologues contenues dans les banques de données des séquences à travers le portail EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>), L'alignement multiple des séquences est réalisé en utilisant le logiciel Mega 5.05 et le dendrogramme phylogénétique est réalisé par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel Mega 5.05.

7 Analyse statistique

Les données recueillies ont fait l'objet d'une ANOVA à un seul facteur et d'une comparaison multiple des moyennes, en utilisant la méthode Tukey HSD (Tukey Honest significant difference). La comparaison des moyennes à un témoin pour certains tests a été réalisée via le test Dunnett bilatérale. Par ailleurs des analyses multi-variées, en l'occurrence : heatmap, matrice de corrélation multiple, l'analyse des Correspondances Multiples (ACM) et Classification Ascendante Hiérarchique (CAH), ont été aussi réalisées à l'aide de logiciel R.3.5.2. Une analyse de similarité selon la méthode de Bray-Curtis (ANOSIM), en utilisant l'algorithme UPGMA a été établie sur le programme Past 3.

Résultats et discussion

Résultats

1. Identification phénotypique

La pré-identification des différents isolats bactériens a été fait dans un premier temps, sur des tests d'orientation simples : une caractérisation phénotypique de la diversité des isolats bactériens, basée sur les caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, afin d'approcher au maximum le sommet de la hiérarchie taxonomique.

1.1 Caractérisation morphologique des bactéries rhizosphériques

1.1.1 Analyse macroscopique

La croissance est détectable après 24 à 48 heures sur milieu YMA, dont l'observation macroscopique de l'aspect morphologique des isolats a été réalisée sur ces mêmes milieux (Figure12).

L'observation des colonies bactériennes isolées à partir de la rhizosphère a révélé de différents types de colonies, à caractéristiques similaires pour quelques-unes et relativement variables pour d'autres, les colonies sont toutes de couleur blanchâtre et d'un aspect lisse brillant. Cependant, nous avons noté une variation dans la forme, l'opacité, la consistance et le relief des colonies.

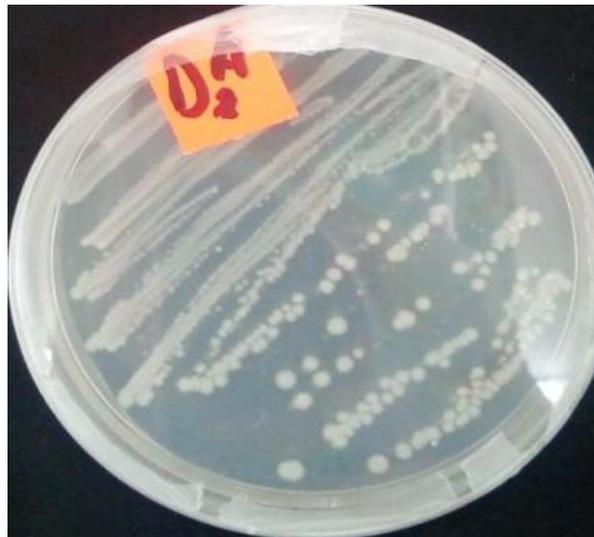
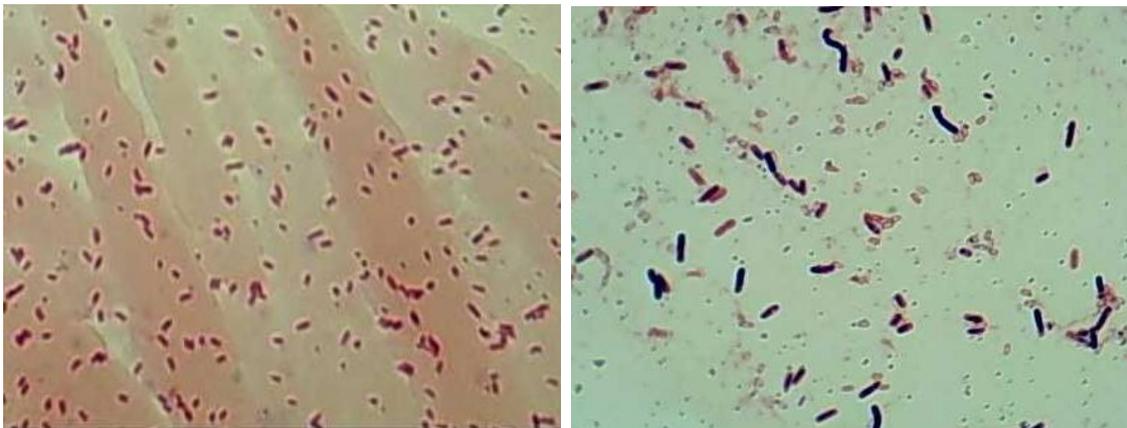


Figure 12. Aspect macroscopique de quelques colonies de après 2 jours de culture sur YMA à 28°C (Originale).

1.1.2 Analyse microscopique

Les résultats de l'identification préliminaire obtenus après la réalisation des tests d'observation microscopique révèlent qu'il y a une diversité assez remarquable au niveau de leur caractéristique. L'observation microscopique à l'état frais et la coloration de Gram (Gx100) a montré que la majorité de nos isolats testés sont des Bacilles mobiles, à Gram négatif, à l'exception de M6 qu'est un Bacille de Gram positif et M7 qui est définie comme Cocci à Gram positif (Figure13). La coloration de Gram a permis également de vérifier la pureté des cultures.



A : Bacille à Gram négative (D2).

B : Bacille à Gram positive (M6).

Figure 13. Observation microscopique des isolats (Gx100). (Originale).

1.1.3 Analyse numérique des critères morphologique

La caractérisation morphologique des isolats bactériens isolés des racines d'arachide a été basée sur 10 caractères. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe4.1). L'Analyse des correspondances multiple (ACM) a montré une bonne représentation des variables sur le plan factoriel, dont les deux dimensions retiennent 80,15% d'inertie totale. Le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (C.A.H.), issu de l'ACM (Figures 14.15), montre que les 14 isolats testés sont répartis en deux principaux groupes :

- Le groupe A, divisé en deux sous-groupes A1 et A2. Le sous-groupe A1 est constitué par tous les isolats provenant de la région d'El-Djdid avec de deux isolats (S1 et M3), isolés essentiellement de deux régions (Mansoura et Sebseb). Ces isolats partagent des caractères morphologiques communs. En effet, ils se distinguent par une petite

Résultats et discussion

taille, une forme régulière, bombée, translucide avec une consistance crémeuse. Le sous-groupe A2 est composé de deux isolats de la région de Mansoura (M6 et M1), qui sont plutôt des Bacilles envahissantes, de colonies bombées et crémeuses.

- Le groupe B, lui-même se divise en deux sous-groupes B1 et B2. Bien que le sous-groupe B2 retient les isolats M2, M4 et S3 à des colonies de forme plate, transparente et sèche, le groupe B1 maintient l'isolat M7 dont la forme est en Cocci et de Gram positif.

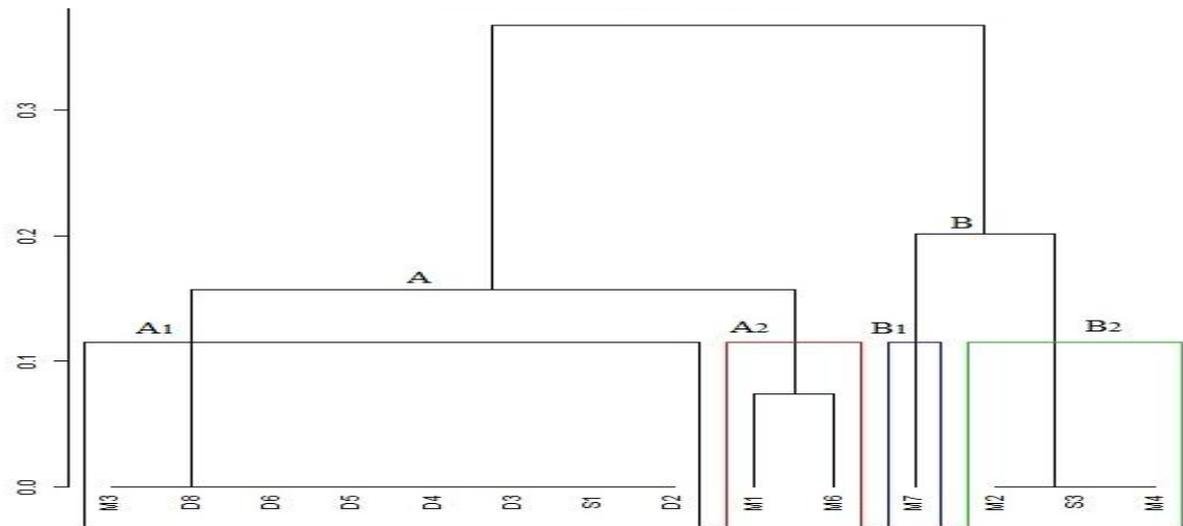


Figure 14. Classification Ascendante Hiérarchique des isolats sur la base des caractères morphologiques.

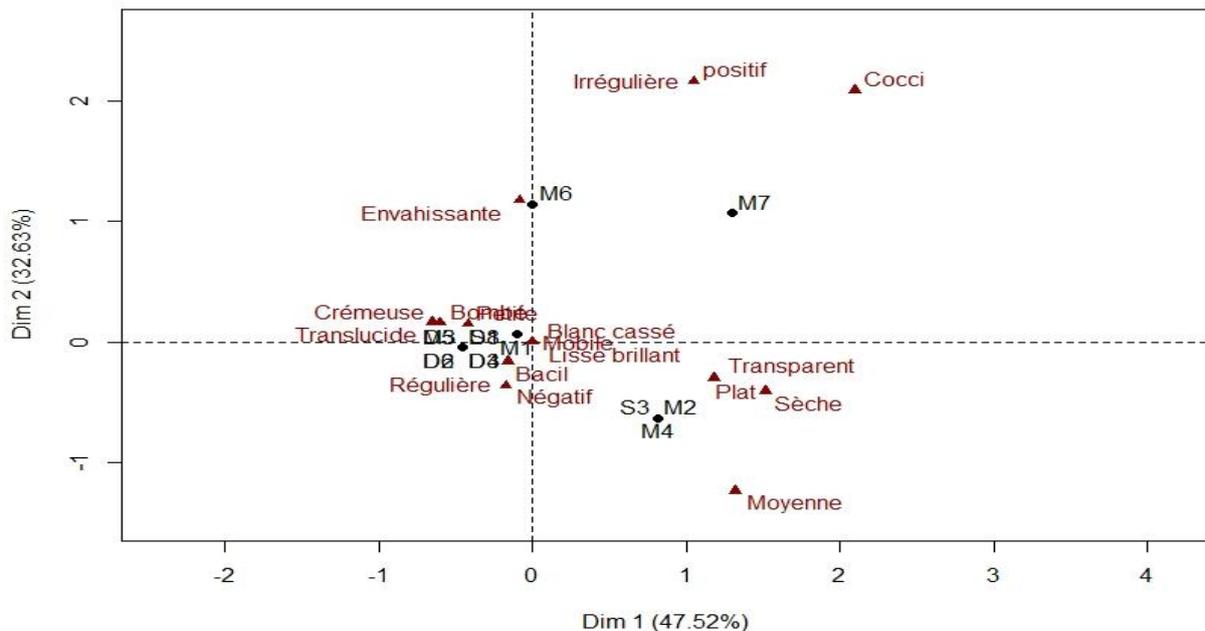


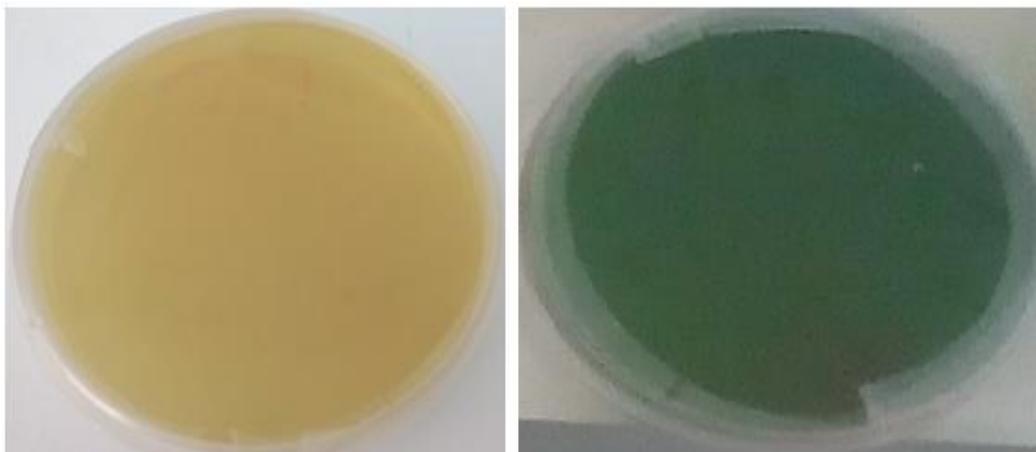
Figure 15. Analyse des Correspondances Multiple des isolats sur la base des caractères morphologiques.

1.2 Caractérisation biochimique et physiologique des bactéries rhizosphériques

1.2.1 Analyse physiologique (Test de la vitesse de croissance sur milieu BTB)

Cette expérience ayant pour but de distinguer les isolats acidifiant le milieu YMA additionné du bleu de bromothymol (BTB), et les isolats produisant des composés alcalins. En effet, le BTB est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du vert vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par l'apparition de la coloration bleue (Figure16).

Les isolats à croissance rapide sont considérés généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux isolats à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture. Après 24h d'incubation, le milieu d'isolats D2, D3, D5, M1 et M6 a viré vers le jaune. Néanmoins, après 72h seul l'isolat M7 qui a viré la couleur du milieu vers le bleu.



A : D2 (acidifiant)

B : M7 (alcalinisant)

Figure 16. Résultats du test au bleu de bromothymol après 72h. (Originale).

1.2.2 Analyse biochimique

Pour effectuer l'identification d'une bactérie il est préférable de connaître son type respiratoire. Dans autre cadre, on trouve la catalase chez tous les organismes aérobies. C'est un cytochrome appartenant à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes, dont la présence se traduit par le dégagement de bulles (Figure17). On a trouvé toutes les isolats identifiées sont se répartissent en aérobie stricte et catalase positive pour la plupart des isolats et aéro-anaérobie facultatifs et

catalase négative pour M6 et M7. Ces résultats correspondent au test de fermentation qui donne réactions négatives avec tous les isolats.

L'oxydase est l'un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles à Gram négatif. Une réaction oxydase positive se matérialise par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée (Figure 18). On estime que la plupart des isolats révélés oxydase positif sauf S3 et D5.



**Figure 17. Réaction de la catalase positive.
(Originale).**



**Figure 18. Réaction de l'oxydase positive.
(Originale).**

1.2.3 Analyse numérique des critères biochimique et physiologique des bactéries

Le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (C.A.H.), issu de l'ACM, montre les résultats de caractérisation physiologique et biochimique des 14 isolats testés. Les caractères de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe4.2). En effet, les isolats sont répartis en deux principaux groupes. (Figures 19.20).

- Le groupe A est constitué par deux isolats M7 et M6 d'origine de la région de Mansoura. Ce sont des isolats alcalinisant qui se distinguent par un type respiratoire facultatif, une catalase négative et une oxydase positive.
- Le groupe B retient tous les isolats de type respiratoire aérobic strict avec une catalase positive. Ce cluster se divise lui-même en deux sous-groupes B1 et B2. Bien que le sous-groupe B1 regroupe les isolats à oxydase négative (D5 et S3), le sous-groupe B2 est constitué par la plupart des isolats de trois régions. Ce dernier est divisé en deux. Le B2a maintient les isolats (D3, D2 et M1) qui sont des acidifiants. Le B2b est

Résultats et discussion

constitué par les isolats M3, M2, M4 et D3, D6, D4 et S1 qui sont plutôt des alcalinisants.

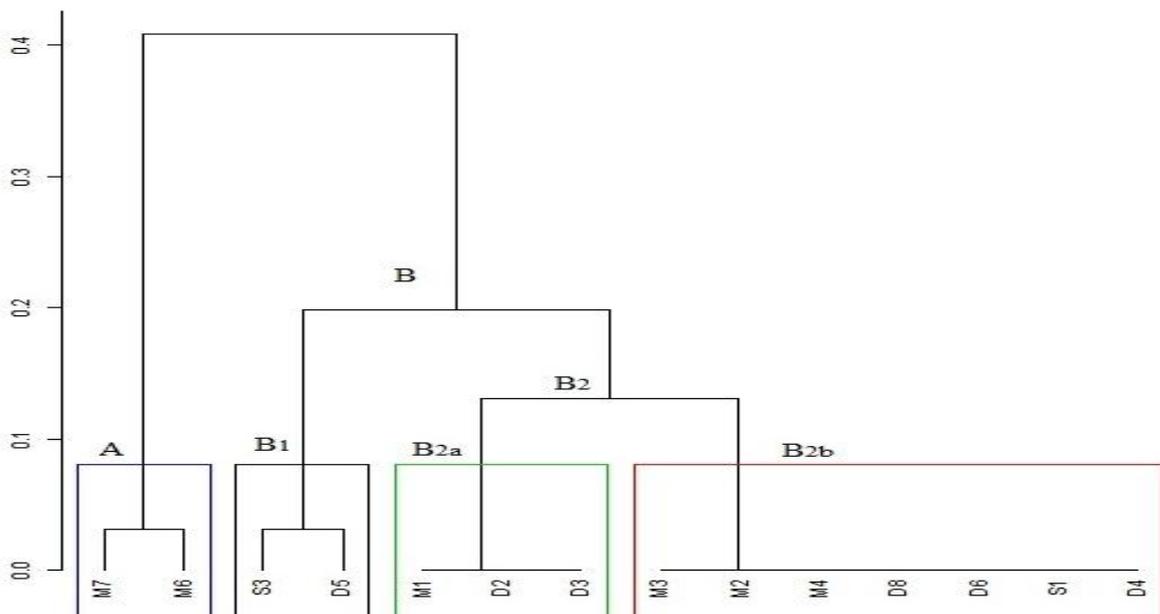


Figure 19. Classification Ascendante Hiérarchiques des isolats sur la base des caractères physiologiques et biochimiques.

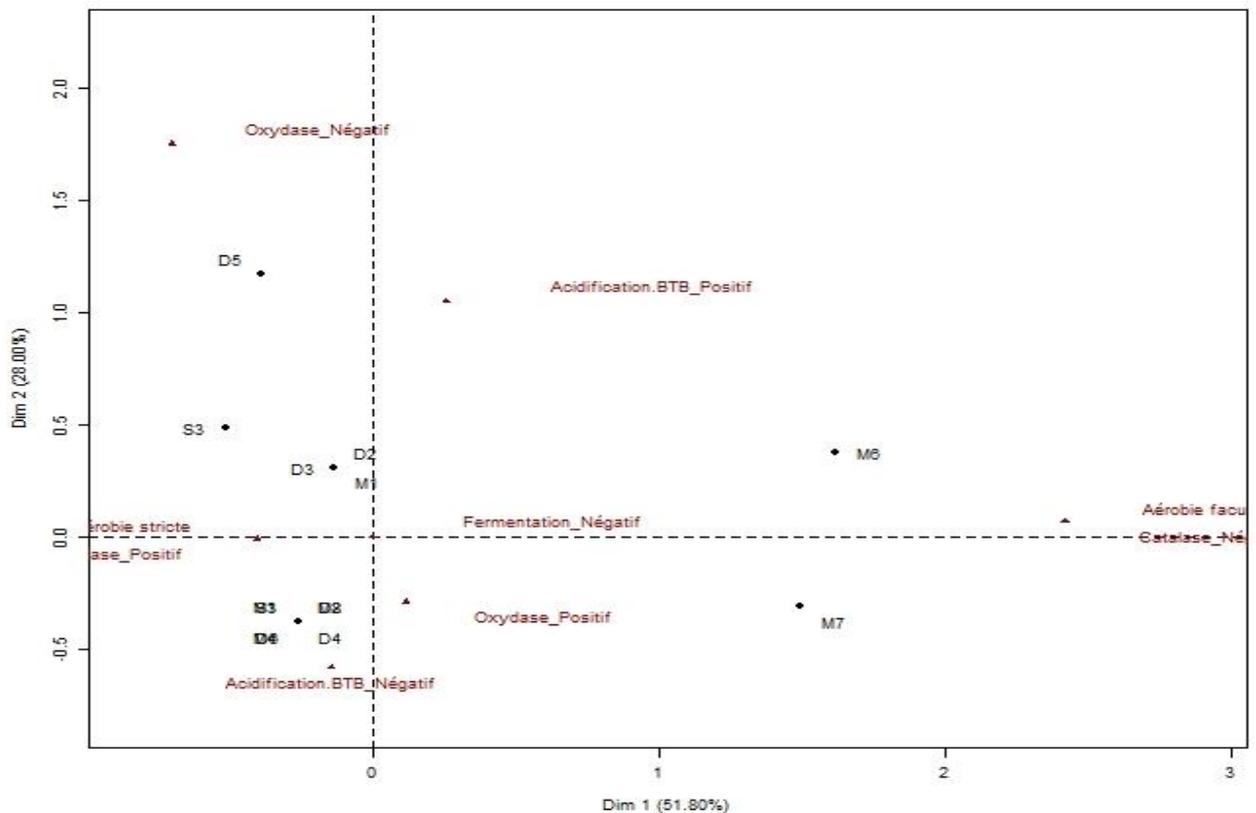


Figure 20. Analyse des Correspondances Multiple des isolats sur la base des caractères physiologique et biochimique.

1.3 Résultat de système Api

1.3.1 API 20^E

Les tests de galeries API 20^E ont été réalisés dans le but de caractériser les isolats selon les substrats (notamment les sucres) qu'elles sont capable d'utiliser et de dégrader et l'étude de la fermentation de divers glucides. Les caractères de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe 4.3). Les résultats représentent dans la Figure 21.



Figure 21. La galerie API 20 E de l'isolat M3 (Originale).

1.3.1.1 Regroupement des isolats en fonction des triplets de tests biochimiques API 20^E

La fonction heat map 2 permet de répartir les variables sur une palette de couleurs récapitulant la matrice de corrélation entre les différentes variables, dont l'intensité de la couleur est proportionnelle aux coefficients de corrélation. La projection de cette corrélation aux isolats testés a été, en parallèle, réalisé en faisant recours aux résultats de la classification ascendante hiérarchique (CAH). En effet, les isolats sont donnés en deux principaux groupes (Figures 22 .23).

- Le groupe A, est divisé en sous-groupes A1 et A2. Le cluster A1, est constitué la plupart des isolats (D2, D3, M1, M2, M4, M7et S3) indiqués plus proche au *Ochrobactrum anthropi* donnant un pourcentage d'identité variant entre 86% et 96% (Annexe 3.4). Ce sont les isolats produisant d'avantage l'indole acétique et pyruvique. Cependant, les observations montrent une variabilité entre les isolats pour l'utilisation du citrate comme source carbone, production d'acétoïne, test ONPG (β -galactosidase) et arabinose (ARA). le cluster A2, est composé d'isolats D8 et S3. Ce sont plutôt les isolats produisant le tryptophane et l'acétoïne ayant une réponse positive avec le test ONPG (β -galactosidase).

Résultats et discussion

- Le cluster B1, constitué par l'isolat D5 montrant des caractères biochimiques plus ou moins variés. Le cluster B2, renferme les isolats D4, D6, M3 et M6, ayant une réaction positive des tests TDA et IND (production de indole). Néanmoins, leurs réactions étaient variables pour le test de gélatinase (GEL), citrate trisodique (CIT), ONPG, VP et URE.

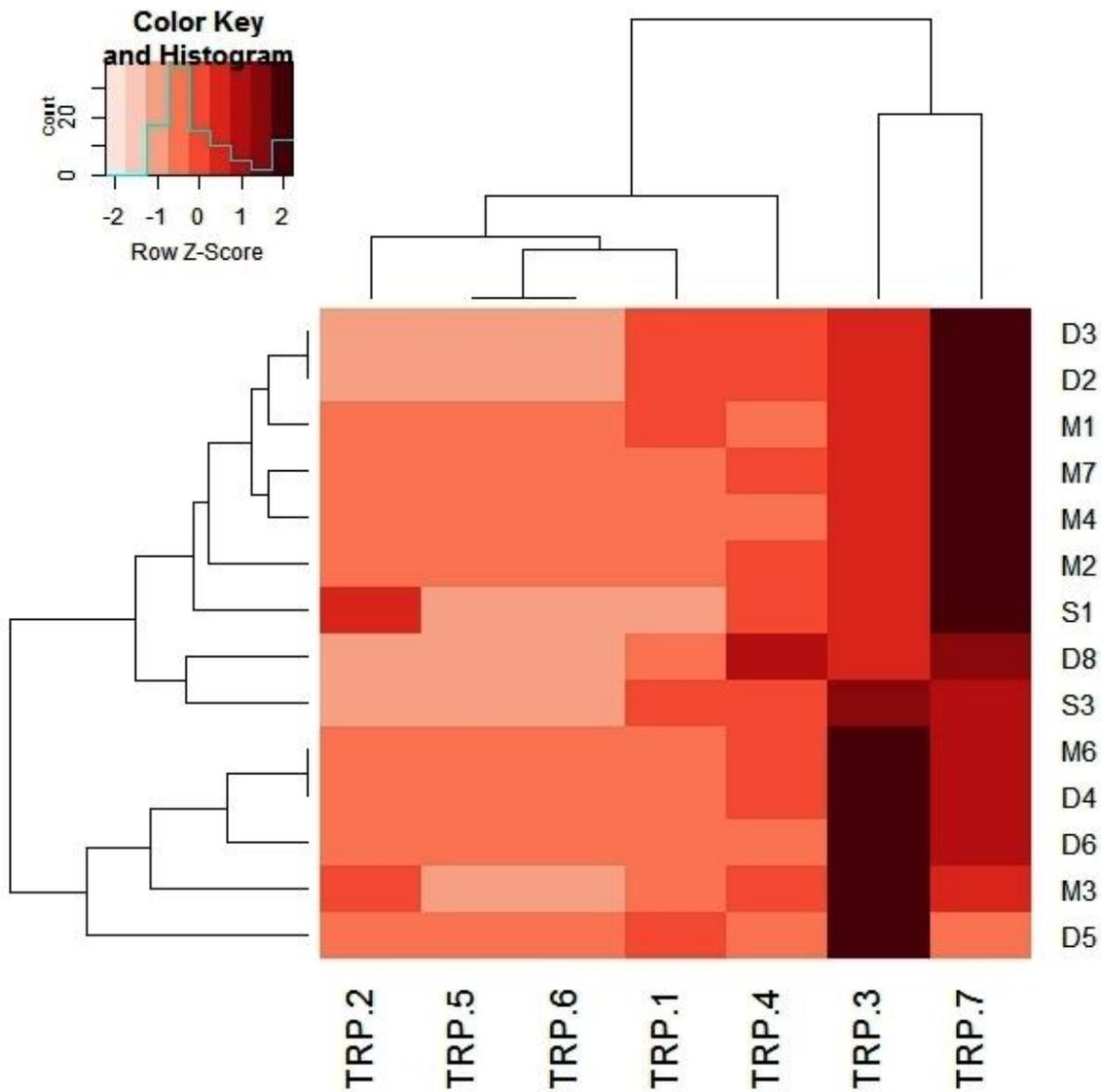


Figure 22. Heatmap de regroupement des isolats en fonction des triplets de tests API 20^E.

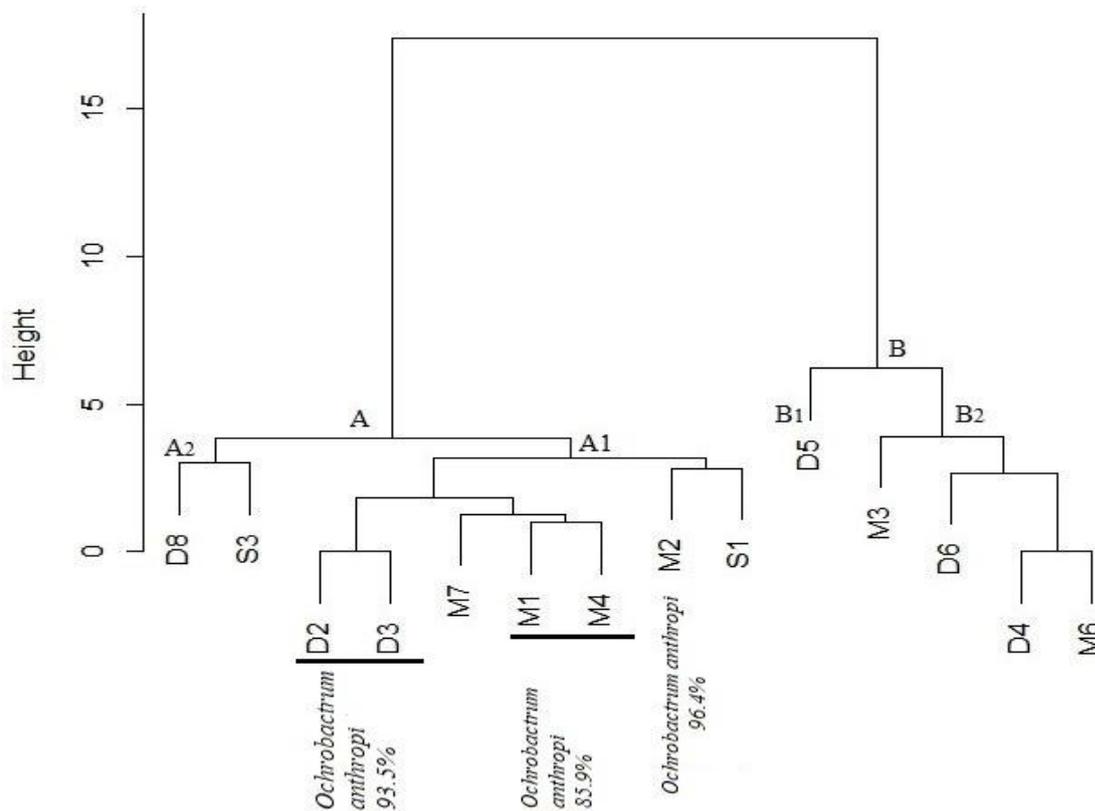


Figure 23. Classification ascendante hiérarchique (CAH) des isolats rhizobiens en fonction des tests API 20^E.

1.3.1.2 Analyse de similarité des isolats de teste API20^E (ANOSIM)

Les résultats d'analyse de similarité entre les isolats en fonction de leurs réponses testées sur les API20^E ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe 4.4). Les résultats ont été établis par le calcul d'indice de similarité selon la méthode de Bray-Curtis, en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweight Paired Group Method with Arithmetic mean) utilise un algorithme de clusterisation Hierarchical séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité. Le dendrogramme établi par de clusterisation hiérarchique montre qu'à une distance de similitude de 0.9299. Est montre que les isolats sont répartis en deux principaux groupes A et B. (Figure 24).

- Le groupe A est constitué uniquement de l'isolat D5 avec l'indice de similarité le plus faible variant de 25% à 70% par rapport aux isolats restants.
- Le groupe B est constitué de 13 isolats avec plusieurs ramifications, B1, B2, chacun est sous groupé en deux: B1a, B1b et B2b, B2a. Ce dernier est, à son tour, classé en trois clusters : B2aa/B2ab/B2ac.

- Le cluster B1 renfermant les isolats D6, M3, M6, D4 ayant un indice de similarité allant de 64% à 70%. En revanche, le cluster B2 regroupant les isolats S1, D8, M1, D2, M2, M4, M7, M2, S3 présentant un indice de similarité variant entre 80% et 90%. Quant à l'isolat D3, les résultats ont révélé un profil identique à celui de D2). En effet, les indices de similarité de sous-groupe B1a variant de 66% à 70% pour les isolats D4, M6, D6, alors que pour le sous-groupe B1b, le seul isolat représentatif détient 64% de similarité. En ce qui concerne le sous-groupe B2b d'isolat S3 est caractérisé par un indice de similarité de l'ordre de 80%. Le reste d'isolats constituent un sous-groupe B2a, caractérisé par un indice de similarité qui varie entre 82% et 93%. Il est à noter que les isolats M6 et D4 (B1a) sont à 100% similaires, mais l'isolat D6 ne présente que 90% de similarité à ces deux derniers. Les isolats M1 et D2 (B2aa) ont 93% de similarité comparés autres du même cluster (M4 et M7) qui sont similaires à 92%. qui sont similaires à 92%. L'isolat M2 (B2ab) et l'isolat S1 (B2ac) sont caractérisés par des indices de similarité 82% - 77% avec les isolats de B2aa.

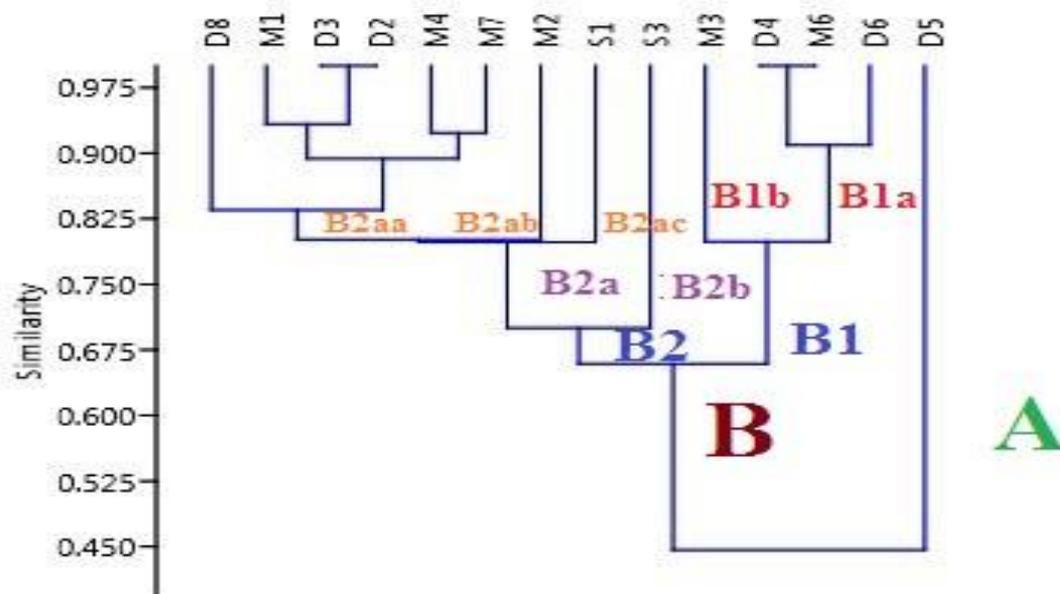


Figure 24. Dendrogramme de similarité des isolats selon l'indice de Bray-Crutis d'API 20E.

1.3.2 API 20^{NE}

Le test d'API 20^{NE} est réalisé dans le but de mettre en évidence la source carbonée préférée par les différents isolats étudiés, qui constitue une base solide de l'identification biochimique. Nous avons testé 7 isolats selon les tests d'orientation (Annexe 3.5). Les

caractères de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe 4.5). Le résultat représente dans la Figure 25.



Figure 25. La galerie API 20NE de l'isolat S1. (Originale).

1.3.2.1 Regroupement des isolats en fonction des triplets de tests biochimiques API 20^{NE}

Les résultats d'API 20^{NE} illustrés dans la matrice heatmap et le dendrogramme en clusters nous ont permis de distinguer deux principaux groupes d'isolats rhizobiens (Figures 26.27).

- le groupe A, composé d'isolats M2 et M4 qui ont montré une réaction positive pour le test ESC (β -glucosidase) en produisant de faibles quantités d'indole pyruvique. Néanmoins une variabilité est constatée entre les deux isolats pour les tests de la Gélatinase (GEL), réduction de nitrites (NO₃), arabinose (ARA), N-acétyl-glucosamine (NAG), gluconate (GNT) et l'acide malique (MLT).
- le groupe B, lui-même se divise en deux sous-groupes B1 et B2. Le sous-groupe B1 représenté par l'isolat S1 comme une branche 1. La branche 2 est composé, en revanche par les isolats M6 et D4. Les observations montrent que les deux isolats donnent un bon développement pour le test ESC (β -glucosidase), de tryptophane (TRP), arabinose (ARA), mannose (MNE), N-acétyl-glucosamine (NAG) et maltose (MAL). En plus, le profil issu des lectures montre un pourcentage d'identité de 98.9% au *Rhizobium radiobacter* pour ces isolats. Les isolats D5 et S3 appartenant au sous-groupe B2 ont réagi positivement avec (ESC), (TRP), (ARA), (MAL), β -galactosidase (PNPG), glucose (GLU), mannose (MNE), mannitol (MAN) et l'acide malique (MLT). Leur profil d'identité met en évidence un pourcentage d'identité de 94.0% au *Rhizobium radiobacter*. (Annexe 3.6).

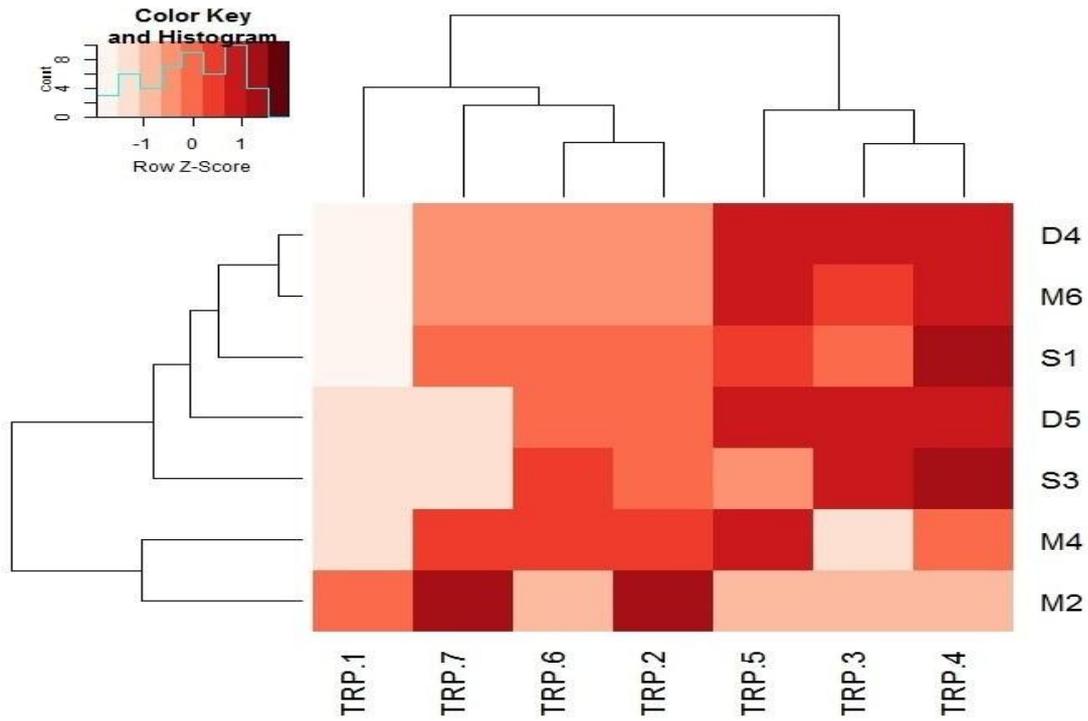


Figure 26. Heatmap de regroupement des isolats en fonction des triplets de tests API 20NE.

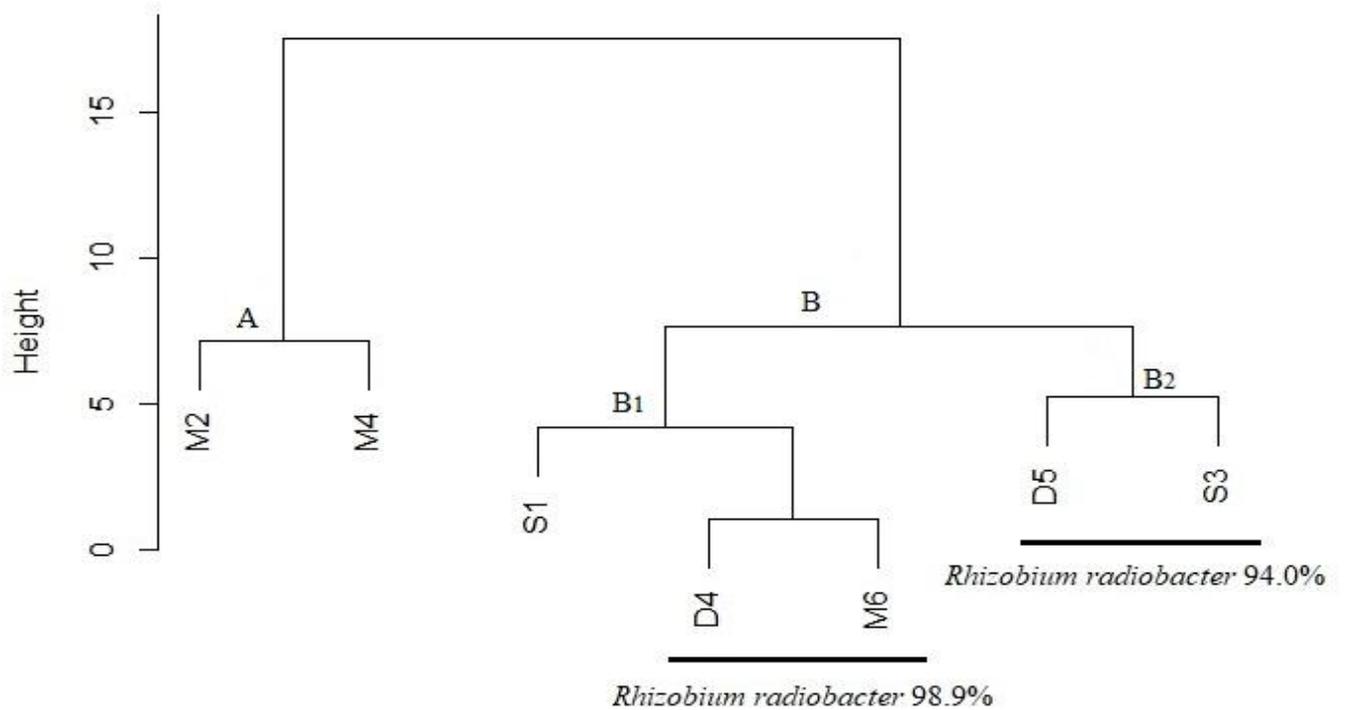


Figure 27. Classification ascendante hiérarchique (CAH) des isolats rhizobiens en fonction des tests API 20NE.

1.3.2.2 Analyse de similarité des isolats de test API 20NE(ANOSIM)

Les résultats d'API 20^{NE} établis par le calcul d'indice de similarité selon la méthode de Bray-Curtis, en utilisant l'algorithme UPGMA. L'indice de similarité entre tous les isolats représente dans le tableau (Annexe 4.6). Le dendrogramme issu par l'algorithme UPGMA est mette en évidence deux principaux groupes A et B (Figure 28).

- Le groupe A est composé d'un seul isolat M2 avec un indice de similarité faible pour tous les isolats.
- Le groupe B, constitué par la plupart des isolats, divisé en deux sous-groupes. le sous-groupe B1 retient l'isolat M4, possédant un indice de similarité variant entre 57 à 75 % comparés aux isolats indiqués comme plus proches au *Rhizobium radiobacter*. le sous-groupe B2 divise en B2a qui retient l'isolat S3 (57 à 80% de similitude) ; B2b composé d'isolats D4, D5, M6 et S1 dans lesquels les indices des similarités sont les plus marquants, variant entre 93 à 98%.

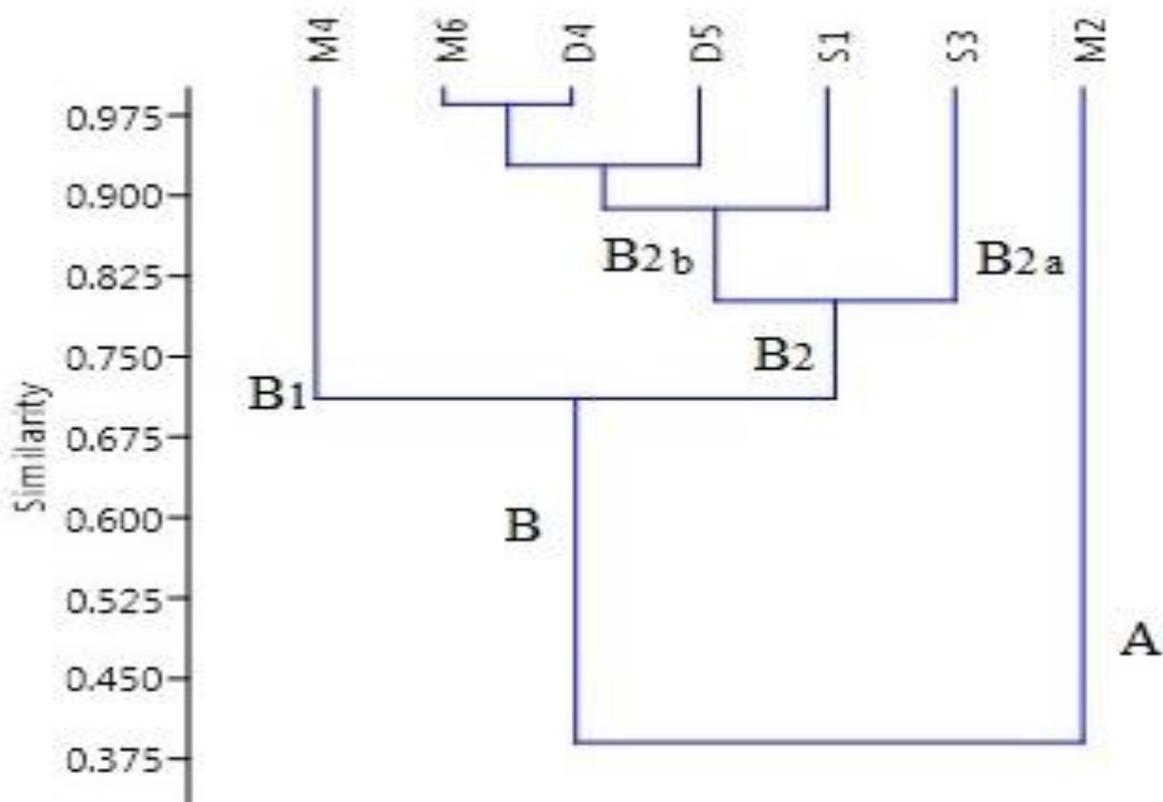


Figure 28. Dendrogramme de similarité des isolats selon l'indice de Bray-Crutis d'API 20NE.

1.3.3 API CH50

L'identification biochimique de M6 est effectuée sur galerie API 50 CHB selon le test d'orientation (Annexe 3.7). Après 48 h d'incubation à 28°C, le changement de couleur est noté (Figure 29). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau (Annexe 4.7). D'après ces résultats, on constate qu'un grand nombre de caractères négatifs ne permet pas l'identification de l'isolat en question par le logiciel (Annexe 3.8).

En effet l'isolat assimile 46% des substrats testés : D-Arabinose, L-Arabinose, D-Adonitol, Méthyl-βD-Xylopyranoside, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, Inositol, D-mannitol, D-sorbitol, Méthyl-α D-glucopyranoside, Amygdaline, Arabutine, D-maltose, D-lactose, D-mélézitose, D-raffinose, Xylitol, Gentiobiose, D-Fucose, L-fucose, D-arabitol, L-Arabitol.

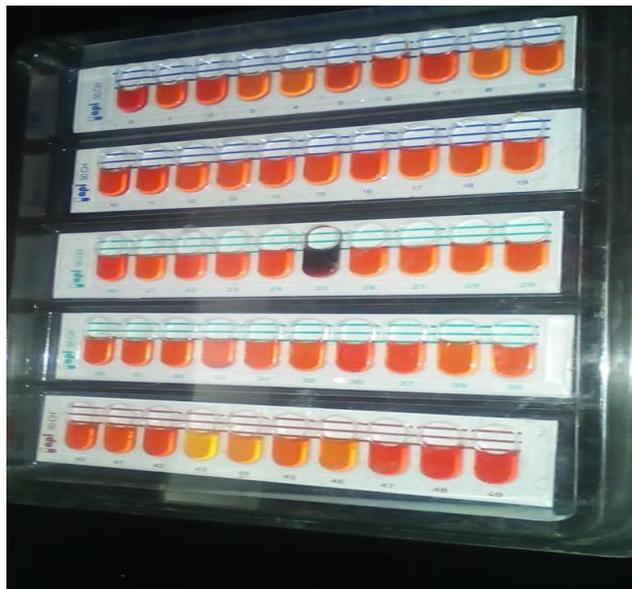


Figure 29. Résultats de la galerie API 50CHB de l'isolat M6 après 48h. (Original).

1.3.4 API Strep

L'isolat M7 selon le test d'orientation a été identifié par une galerie API Strep, avec le même principe que celui de la méthode enzyme/substrat (Annexe 3.9). Chaque cupule contient un substrat différent avec lequel chaque enzyme bactérienne réagit. Ils sont analysés pour leur capacité fermentaire sur 20 tests biochimiques constituant les galeries Api Strep, après une incubation à 37°C pendant 24 h. Le profil de fermentation des glucides obtenus est

répertorié dans le tableau (Annexe 4.8). On recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage de couleur de l'indicateur de pH contenu dans le milieu dans certain cupule (Figure 30).

Les résultats suggèrent que l'isolat M7 appartient au genre *Streptococcus*, avec 59.1% d'identité à l'espèce *Streptococcus mitis* (Annexe 3.10).



Figure 30. Résultats de la galerie API Strep de l'isolat M7 après 24h. (Originale).

2. Résultats d'étude de la propriété PGPR des isolats

Le but principal de cette partie est de déterminer la réponse des bactéries isolées aux différents tests mettant en évidence la capacité de production de métabolites améliorant la croissance des plantes. Ce screening permettra par la suite la sélection et le choix des isolats les plus performants. Différentes activités PGPR sont testées. Celles ayant un rôle de biofertilisation, sont la solubilisation des phosphates et la production des phytohormones (principalement l'AIA). Celles ayant des activités de biocontrôle protégeant les plantes des phytopathogènes sont la production de composés volatiles (HCN), ou substances inhibant la croissance des pathogènes telles les sidérophores, et la recherche de quelques activités enzymatiques (principalement amylase, gélatinase).

1.2.Solubilisation du phosphate

L'étude de la capacité des isolats bactériens à libérer le phosphate minéral a été réalisée avec un test qualitatif sur milieu solide NBRIP pour confirmer leur capacité à solubiliser le phosphate. Les résultats de l'analyse de la variance à un facteur (One-way ANOVA) (tableau 2) révèle une différence hautement significative ($p < 0,0001$) entre les isolats quant à leur indice de solubilisation. Les résultats obtenus ont été comparés à une souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 31). Les 14 isolats testés sont capables de produire un halo de solubilisation autour de la colonie (Figure 32), L'isolat la plus performante est M2 et la

production la plus faible est observée chez M6. le regroupement est présent dans le tableau (Annexe 4.9).

Tableau 2. Analyse de la variance de la solubilisation des phosphates.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Isolat	14	65258	4661	13.12	0.00000000379 ***
Résiduels	30	10660	355		

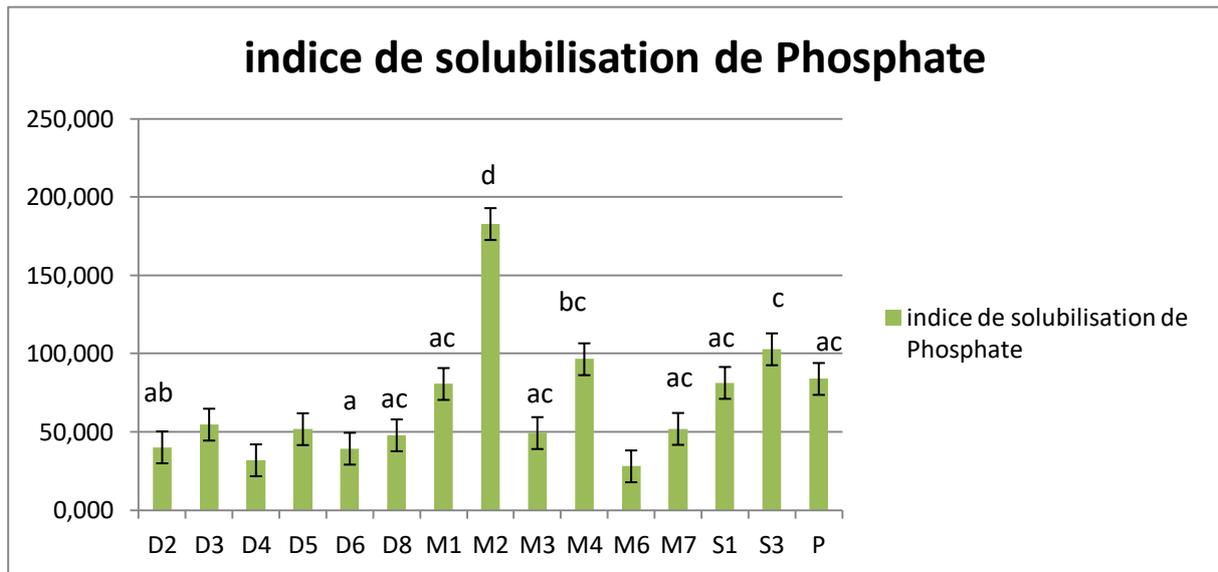
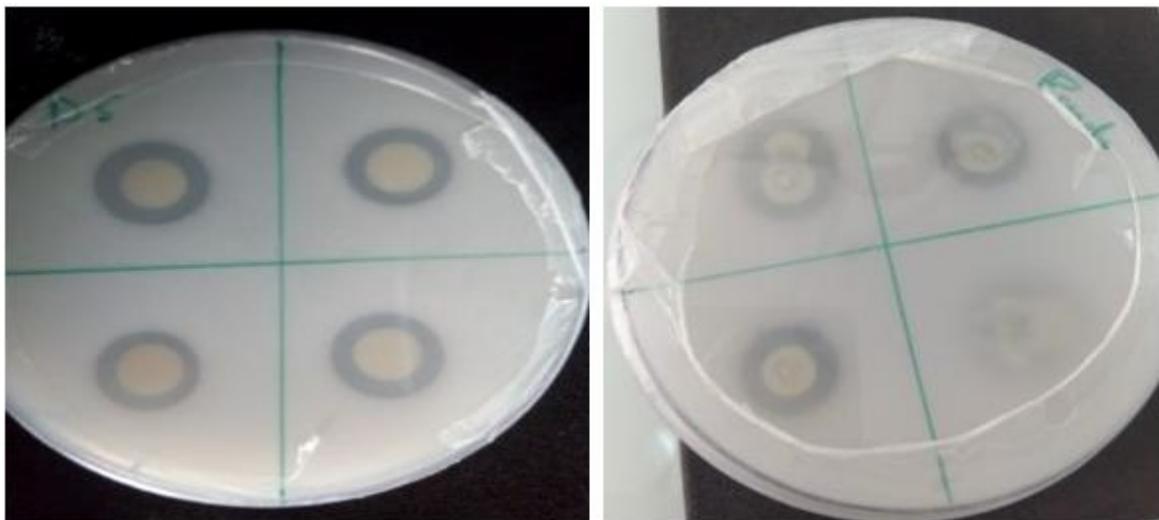


Figure 31. Indice de solubilisation de phosphate.



A : solubilisation de phosphate d'isolat D5

B : solubilisation de phosphate par le témoin

Figure 32. : Halo de transparence autour des colonies sur milieu NBRIP (originale).

La comparaison des moyennes d'indice de solubilisation d'isolats testés à un témoin positif (*Pseudomonas aeruginosa*) via le test Dunnett bilatéral a fait ressortir trois groupes des moyennes homogènes en fonction de l'existence ou non des différences significatives ($p <$

5% ou $p > 5\%$). entre (P et M2, P et M6, P et D4), aucune corrélation n'existe entre les autres les résultats présentent dans le tableau (Annexe 4.10).

2.2. Solubilisation de Potassium

Les isolats ont été examinés qualitativement pour déterminer leur capacité à solubiliser le K, en fonction de la formation de zones claires autour de la colonie (Figure 33). Parmi les 14 isolats, seulement M2, M4, S ayant la capacité de solubiliser le K et qui ont montré des indices de solubilisations de 99%, 95%, 81% respectivement.

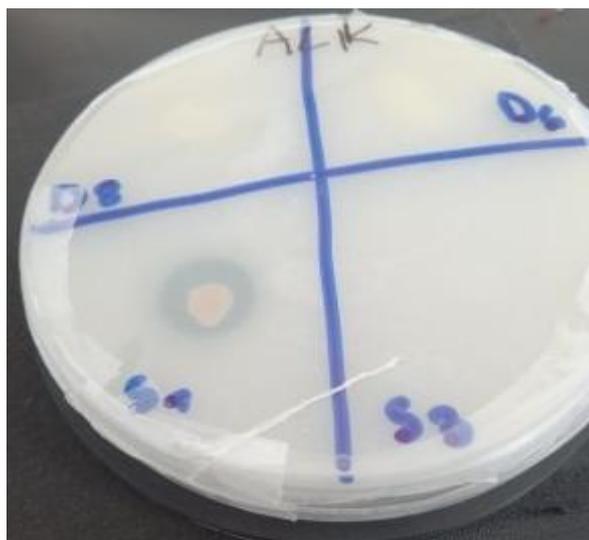


Figure 33. Solubilisation de Potassium sur milieu ALK (Originale).

2.3. Production de sidérophores

La production de sidérophores est effectuée sur un milieu solide. L'analyse de la variance à un facteur (tableau 3) révèle une différence significative ($p < 0,01$) entre les isolats quant à leur capacité de production. Les isolats les plus performantes sont D6, S1 et la production la plus faible est observé chez D4. L'estimation qualitative sur milieu au CAS solide se traduit par l'existence d'un halo orange formé autour de la colonie signifiant la production de sidérophores (Figures 34.35). Les résultats obtenus montrent que, parmi les isolats testés, ceux de M2, M3, M4, M6 sont considérées comme non productifs de sidérophores. Le regroupement est présent dans le tableau (Annexe 4.11).

Tableau 3. Analyse de la variance ANOVA de la production des sidérophores.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Isolat	9	1.7550	0.19500	6.492	0.000315 ***
Résiduels	19	0.5707	0.03004		

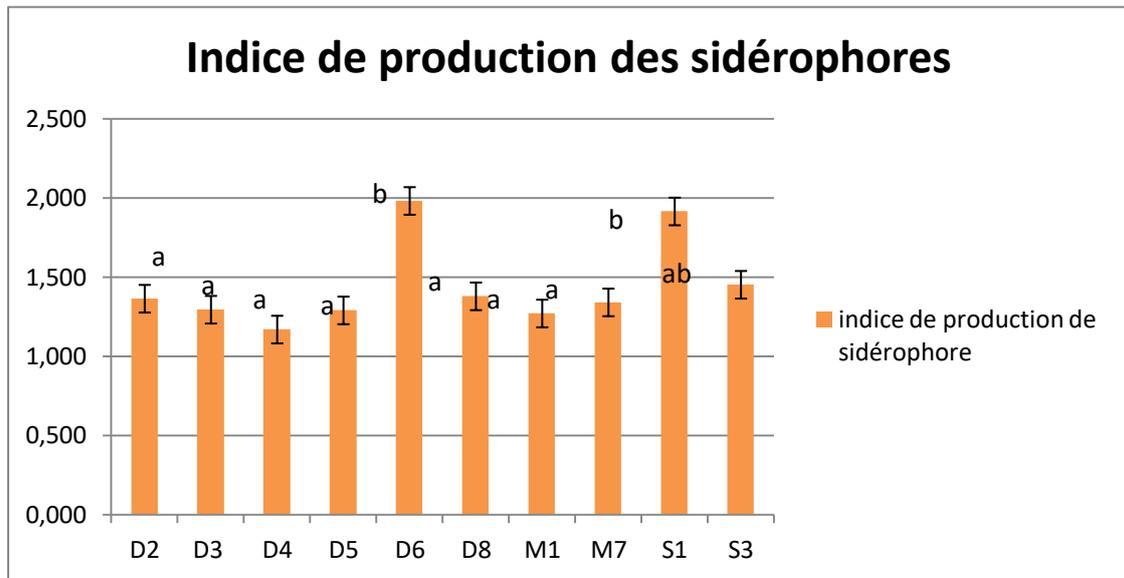


Figure 34. Indices de production des sidérophores sur milieu solide CAS.

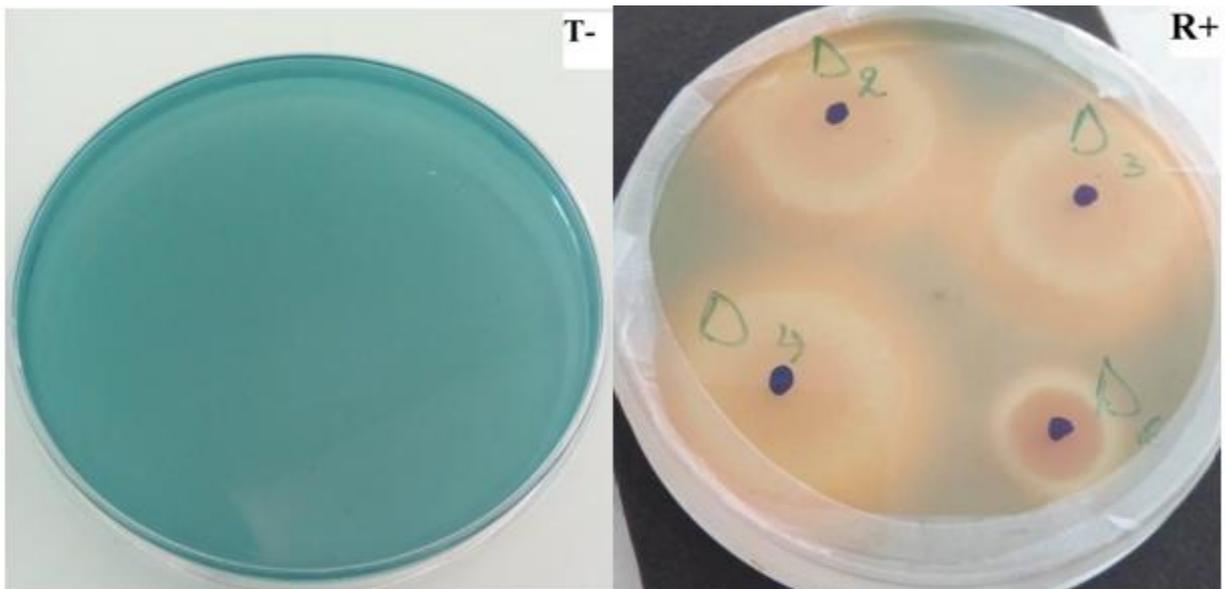


Figure 35. Halo orange autour de la colonie S1 caractéristique de la production de sidérophores (Originale).

2.4. Production d'AIA

La capacité de production de l'AIA est testée sur milieu LB additionné de tryptophane après 4 jours d'incubation à 30°C. L'analyse de la variance révèle une différence qui n'est pas significative de production ($p > 0,01$) entre les isolats testées (tableau 4). Cependant, l'isolat M2 est celui qui a montré un maximum de production, de l'ordre de 101.516 µg/ml. Par contre, l'isolat M6 est la moins productrice avec 47.161µg/ml d'AIA (Figures 36.37). Le regroupement est présent dans le tableau (Annexe 4.12).

Tableau 4. Analyse de la variance de la production d'AIA.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Isolat	13	7648	588.3	0.824	0.634
Résiduels	14	9997	714.1		

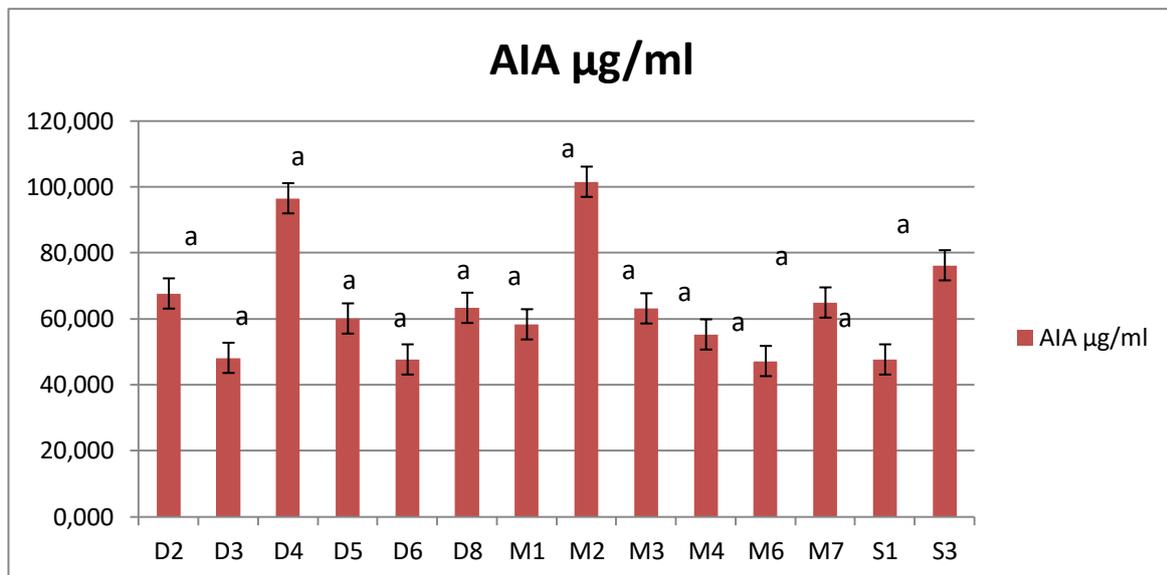


Figure 36. Le taux de production d'AIA sur milieu LB.

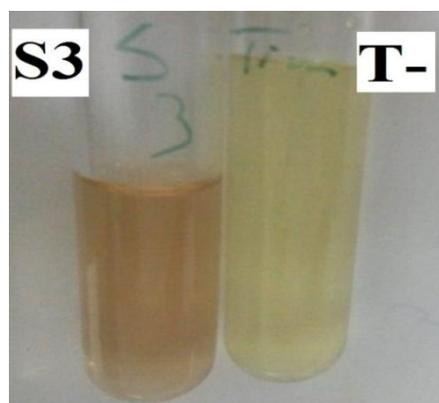


Figure 37. Production d'AIA sur milieu LB (Originale).

2.5. Production de HCN

Le cyanure d'hydrogène est l'un des produits impliqués dans l'élimination de divers agents phyto-pathogènes, le virage de la couleur du papier Watman du jaune à l'orange ou marron est un indicateur de la production de l'HCN (Figure 38).

Parmi les 14 isolats testés, les isolats D2, D5, D8, M2, M3, M6, M7, S1, S3 sont ceux considérés productrices de l'HCN.

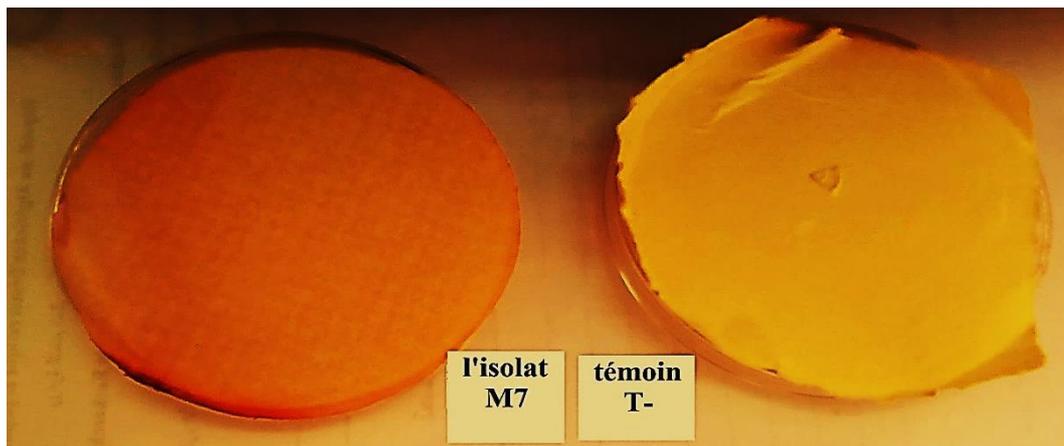


Figure 38. Production de HCN (originale).

2.6. Activité de l'amylase

D'après le test, une activité enzymatique a été prouvée chez les isolats ayant un amylase (+) D2,D5,D8,M1,M2 ,M4,M6 qu'ont pu dégrader l'amidon, au contraire des isolats D3,D4,D6,M3,M7,S1,S3 sont dépourvues de l'enzyme amylase.

L'activité amylolytique se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie après l'addition du « Lugol » (Figure 39).

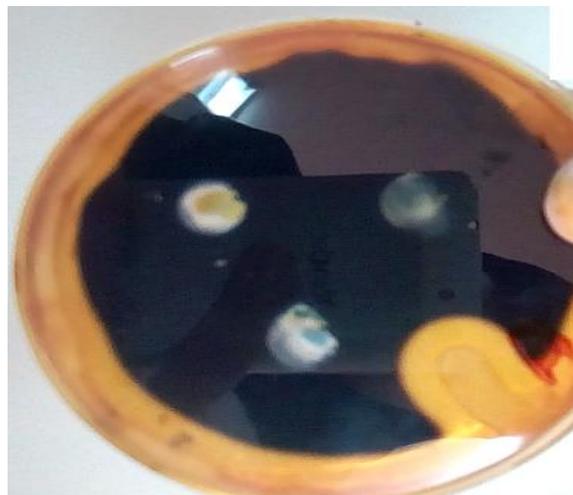


Figure 39. Présence d'amylase (originale).

2.7. Activité d'une gélatinase

D'après le test, une activité enzymatique a été prouvée chez les isolats, les résultats font la sélection de gélatinase (+) chez D6,D8,M1,M2 ,M7 donc ils ont pu dégrader la gélatine, au contraire des isolats D2,D3,D4,D5,M3,M4,M6,S1,S3 qui sont dépourvues de l'enzyme gélatinase .

L'activité se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie après l'addition du « solution de Frazier » (Figure 40).

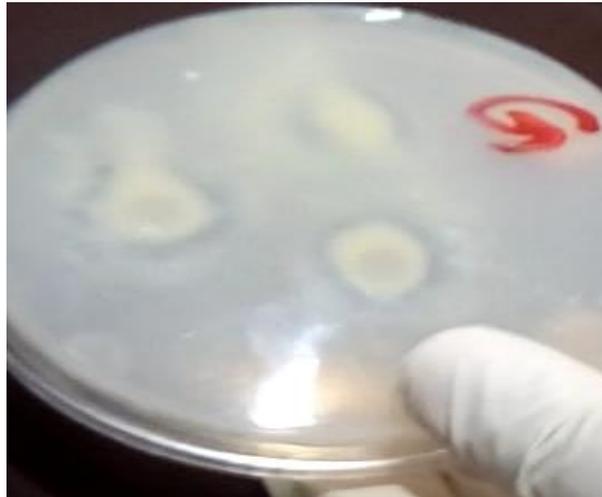


Figure 40.Présence de gélatinase (Originale).

3. Analyse numérique d'étude de la propriété PGPR des isolats

1. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

L'étude des propriétés PGPR des isolats a été basée sur 7 caractères. Les caractères de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe 4.13). Les résultats ont été récapitulés dans le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) issue d'une analyse des correspondances multiples (ACM), les isolats sont répartis en deux principaux groupes A et B. (Figures 40.41).

- Le groupe A est constitué uniquement de deux isolats M4, M2 partagent la présence d'un caractère unique pour chacun, M4 : HCN positive et M2 : amylase positive.
- Le groupe B est composé de 12 isolats D2, D3,D4,D5,D6,D8,M1,M3,M6,M7,S1,S3. Ce groupe est lui-même affilié en 2 sous-groupes B1 et B2. Chacun d'entre eux est divisé à son tour en B1a, B1b, et B2a, B2b.

Résultats et discussion

- Le sous-groupe B1a est composé de 2 isolats M3, M6 est caractérisé par une production négative des sidérophores.
- Le sous-groupe B1b est composé d'isolats S1, S3 dont le test de gélatinase est négatif, D2, D5 qui sont d'avantage des bons solubilisateurs du phosphate, de bons producteurs de sidérophores et d'HCN mais toutefois une solubilisation nulle du potassium.
- Le sous-groupe B2a est composé d'isolats D3, D4 caractérisé par une amylase négative.
- Le sous-groupe B2b regroupe les isolats M7, D8 dont la gélatinase est positive et D6, M1 dont la production des sidérophores est positive.

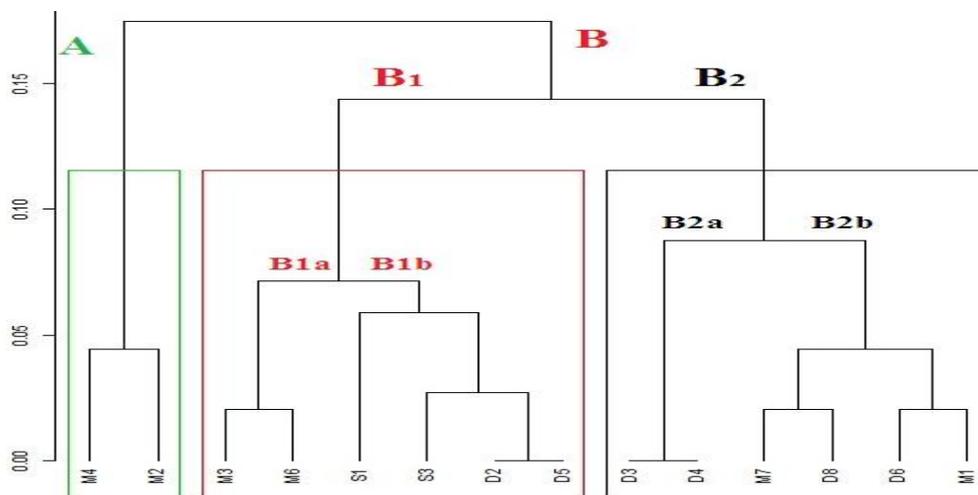


Figure 41. Classification Ascendante Hiérarchique des isolats sur la base de propriétés PGPR des isolats.

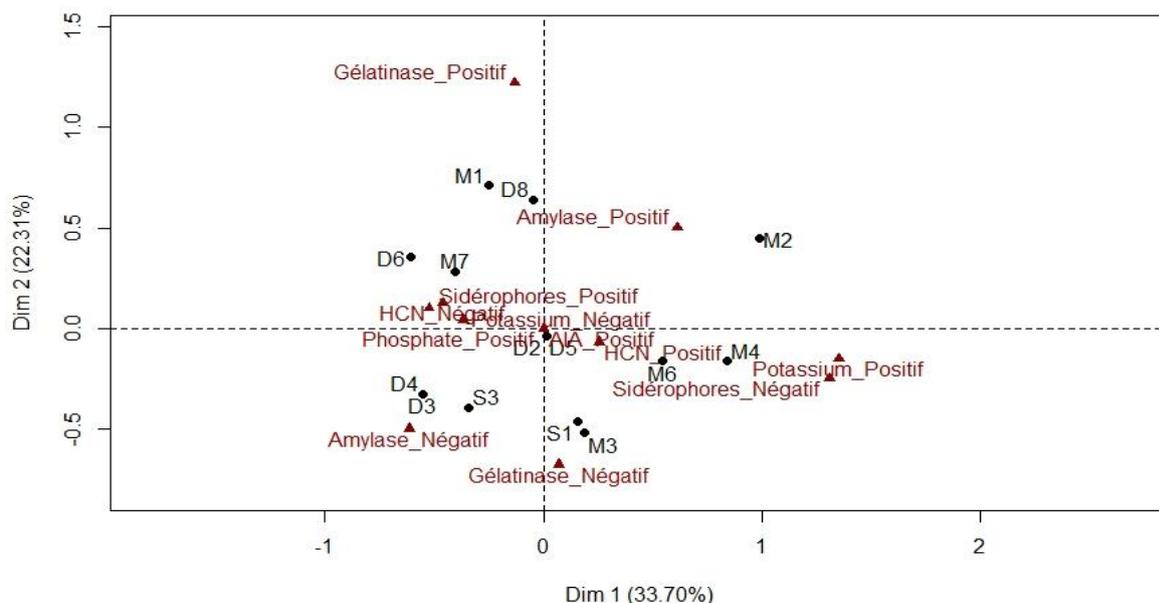


Figure 42. Analyse des Correspondances Multiple des isolats sur la base des propriétés PGPR des isolats.

4. Résultats de Test de nodulation

Dans cette expérience, les graines en germination d'arachide (*Arachis hypogaea*) ont été mises en culture en hydroponie, dans des tubes contenant une Solution nutritive et inoculer individuellement avec notre culture bactériennes. Après 5 semaines de croissances, l'effectivité a été observée chez les plantes d'*Arachis hypogaea* inoculée par les isolats.

La croissance des plantes est nettement améliorée ,elle est déterminée en fonction de la hauteur de la partie aérienne et racinaire ; les tiges de plants inoculé plus élevées que les plantes non inoculé surtout les plantes qui étaient inocules par les isolats D4,D6,D3,D8,S3,M2,M4,M3 plus de 25cm avec des racines bien développé et avec 5cm (Figures 43.44). Cependant l'ineffectivité des isolats est déterminée en fonction de nombre de nodules formés (Figure 45).les résultats de ce test présent dans le tableau 5.

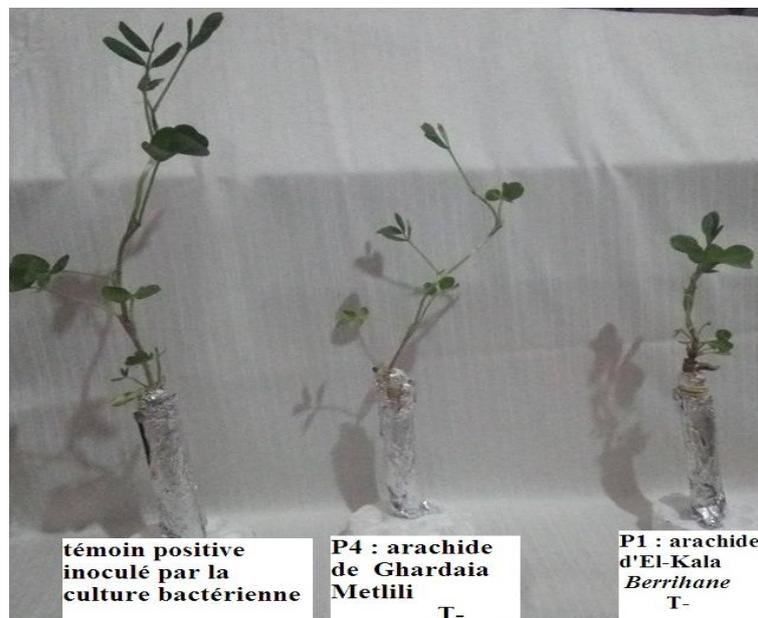


Figure 43. Des tubes de cultures de témoin + et témoin – (Originale).

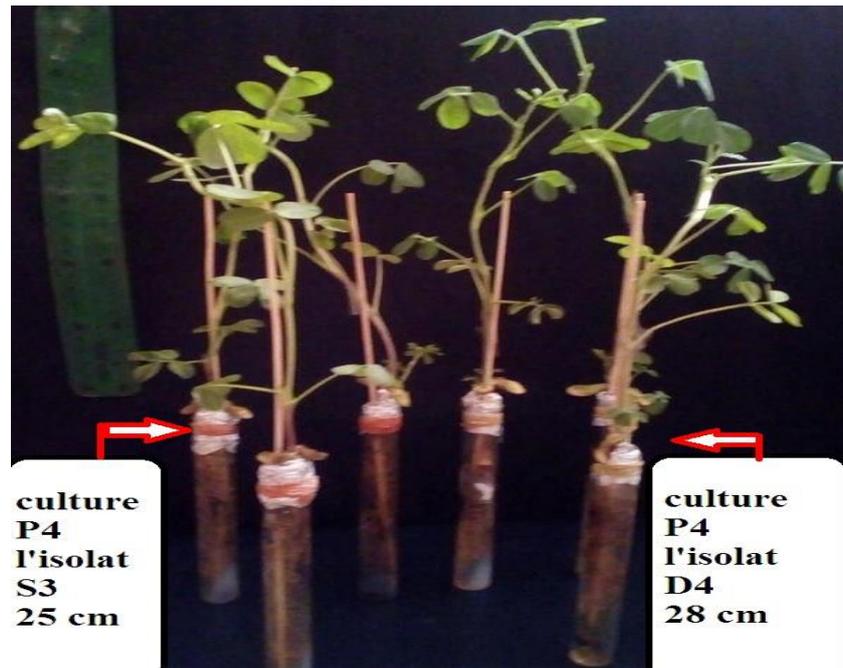
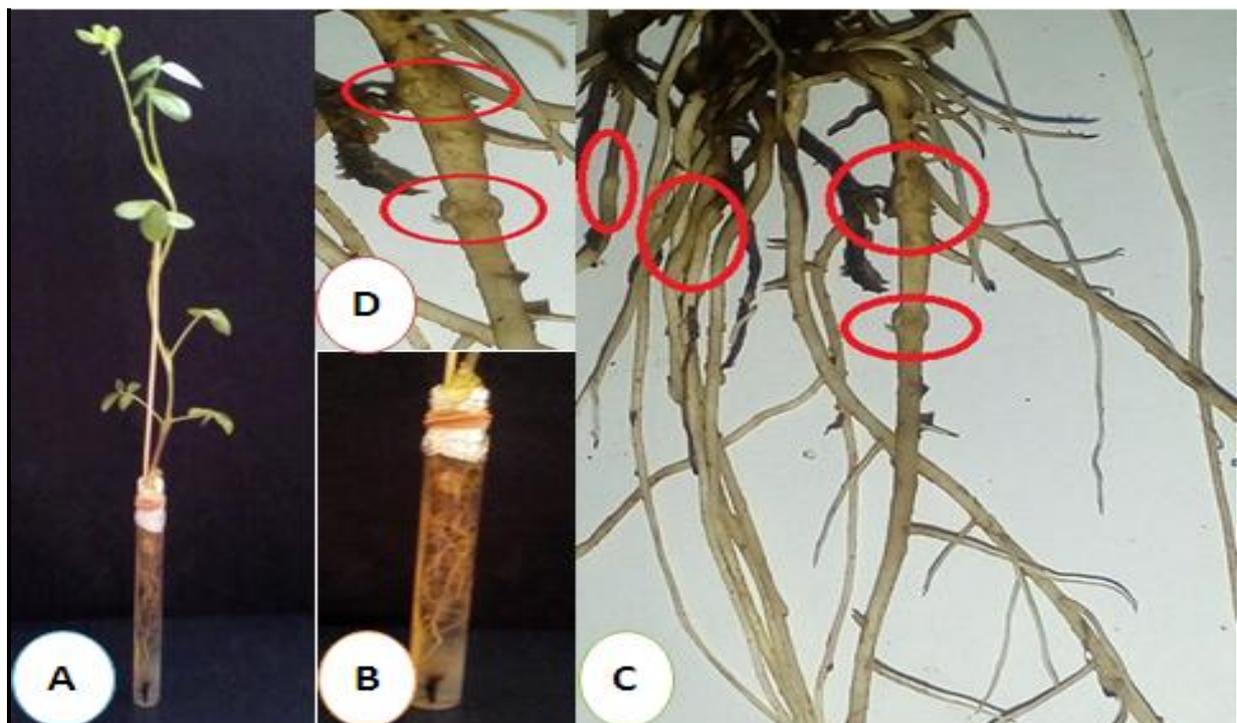


Figure 44. La croissance des plantes en fonction des hauteurs de la tige principale (Originale).



A : culture après 5 semaines, B : racines, C : nodules, D : zoom sur les nodules

Figure 45. Des nodules formés par l'isolat D8 (originale).

Tableau 5. Résultats du test de nodulation.

Nodulation	Génotype De <i>Berrihane</i>	Génotype De <i>Metlili</i>
Isolats		
M1	-	-
M2	-	+
M3	-	-
M4	-	-
M6	-	-
M7	-	+
D2	-	-
D3	+	-
D4	-	+
D5	-	+
D6	-	-
D8	-	+
S1	-	-
S3	-	-

5. Résultats d'analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique est effectuée par le séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S d'isolat M4. L'analyse des EzBioCloud pour la recherche de l'homologie avec les espèces similaires existant dans les banques de données, est utilisée pour la construction de l'arbre phylogénétique par l'algorithme Neighbor-Joining. M4 est identifiée comme *Pseudoxanthomonas koreensis* (Annexe 3.12) avec 94.06% de similarité du gène de l'ARNr 16S.

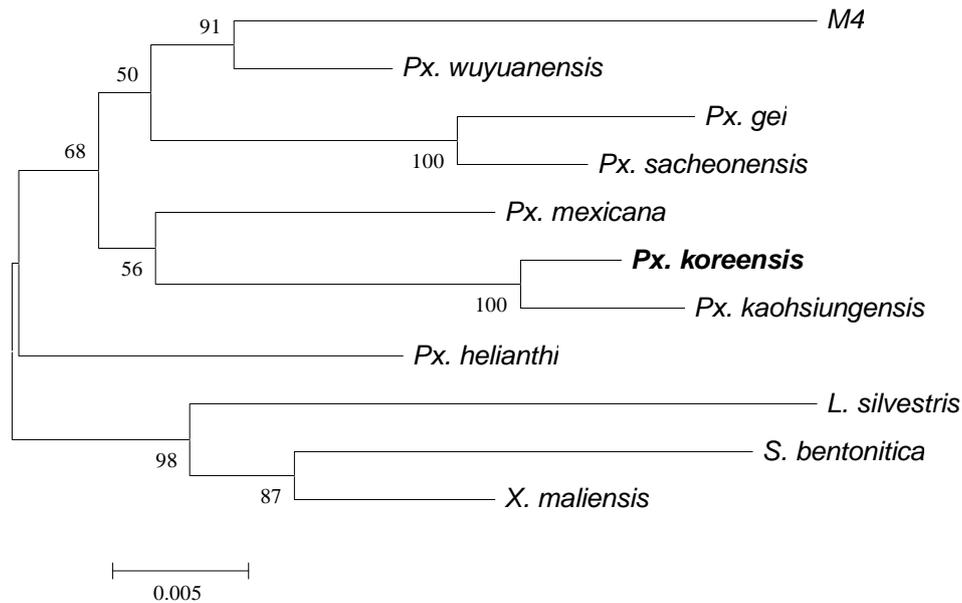


Figure 46. Arbre phylogénétique de l'isolat M4 basé sur les séquences de l'ADNr16 S.

Discussion générale

Les résultats de l'identification préliminaire obtenus révèlent qu'il y a une diversité assez remarquable au niveau de leur morphologie. Les colonies obtenues sont rondes lisses à bord régulier, irrégulières plus au moins bombées, de diamètre inférieur à 5 mm ou envahissantes et de différentes consistances. En effet, l'observation au microscope optique montre que tous les isolats sont mobiles avec des formes Bacilles et Cocci à 87.8% des bactéries ont été considérées à Gram négatif. En effet, les aspects microscopiques et morphologiques des colonies des isolats étudiées sont en accord avec la description faite par les auteurs (Abdesselam, 2017; Amri-Tiliouine, 2008 ; Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 2012 ; Vincent, 1970). Ces caractères d'identification ont permis l'orientation vers les genres *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* (Abdesselam, 2017). Ces résultats ne peuvent pas préciser la classification exacte de ces isolats, néanmoins, ils peuvent nous permettre de dire qu'il y a une approximation relative aux études mentionnées.

Dans le but d'étude la vitesse de la croissance bactérienne, les isolats ensemencés dans le milieu YMA additionné au BTB. Après 24 h, cinq (05) isolats ont produit des réactions acides alors que les 9 isolats restantes ont produit une légère alcalinisation du pH du milieu. Après 3 jours, la majorité des isolats ont changé la couleur d'YMA additionné au BTB vers le jaune, indiquant qu'ils sont des producteurs d'acide. L'acidification du milieu a été l'objet de

Résultats et discussion

plusieurs travaux portant sur les Rhizobia (Jida *et al.*, 2012). Ces études ont bien classé les Rhizobia comme des bactéries à croissance rapide. En outre, Belhadjissa et Benbitour (2017) ont de même constaté que la majorité des isolats testés isolés des nodules d'arachide, acidifient le milieu, ce qui est plus rassurant. Jordan (1984) indique que les bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* sont à croissance lente. Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira *et al.*, (1993). D'autres travaux qui ont montré que les Rhizobia à croissance rapide sont capables d'acidifier le milieu de culture (de Freitas et Silva, 2013).

Dans le cadre de l'identification d'une bactérie, il est préférable de connaître son type respiratoire. La faculté des bactéries isolées de vivre dans les milieux aérobies et de se comporter aussi comme des aérobies stricts est une caractéristique de bactéries rhizosphériques (Nakano et Hulett, 1997). Ceci est bien constaté dans notre étude et qui nous amène à supposer que nos isolats sont de type respiratoire aérobie strict ou faculté. Rien que Tian *et al.*, (2008) a indiqué que les tests d'oxydase et de catalase étaient positifs pour les Rhizobia associés aux légumineuses, alors que quelques-uns sont de catalase et oxydase négative, ce qui nous laisse supposer que ces isolats ne sont pas tous forcément des Rhizobia. Ces sont encore des résultats identiques à des études similaires (Benouaret et Kheloufi 2014 ; Bumunang et Babalola, 2014 ; Hafsa, 2014 ; Kravchenko *et al.*, 2004).

Les résultats de l'identification préliminaire a été permet de réaliser les tests des galeries API qui ont mis en évidence deux souches : *Ochrobactrum anthropi* pour API20^E et *Rhizobium radiobacter* pour API20^{NE} avec un indice d'identité important. Les deux souches sont considérées comme rhizobacteries. En 2004, des souches du genre *Ochrobactrum* de la famille Brucellaceae ont été trouvées dans des nodules d'*Acacia mangium*, mais aucune information sur leurs gènes symbiotiques n'a été rapportée (Ngom *et al.*, 2004). Plus tard une nouvelle espèce de ce genre portant des gènes symbiotiques proches de ceux du rhizobia a été signalé comme endosymbiote de *Lupinus honoratum* (Trujillo *et al.*, 2005). Il héberge des mégaplasmides de 1500, 200 et 150 kb et la nodulation (nod) a été détectés dans tous les plasmides en utilisant sonde nodD (Rivas *et al.*, 2009). La souche *Ochrobactrum*, d'après sa séquence partielle d'ADNr 16S, est le plus proche voisin de *Phyllobacterium sp.* Le *Ochrobacterium anthropi* sont connus pour être étroitement liés phylogénétiquement entre eux et avec les *Rhizobiaceae* et plus précis avec *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* (Willems et Collins, 1993; Zakhia, 2004). Les souches d'*Ochrobactrum anthropi* ont d'abord été isolées d'échantillons cliniques humains (Tatum *et al.*, 1974), et dans

le sols (Holmes *et al.*, 1988). Dans le même contexte et après un an, une souche pathogène nommée *Rhizobium radiobacter* a été isolée à partir de nodules de *Phaseolus vulgaris*. Les gènes nodD et nifH trouvés dans ce souche étaient proches de ceux nodulant *Phaseolus vulgaris* (Velázquez *et al.*, 2005). La description génotypique de *Rhizobium radiobacter* est rapportée par de Lajudie *et al.*, (1994) et Amarger *et al.* (1997). L'espèce comprend des souches pathogènes ou non pathogènes, les deux pouvant être signalées comme tumorigènes. (Young *et al.*, 2001).

Le phosphore joue un rôle très important dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance, l'amélioration de la productivité et le rendement agricole (Lindsay, 1979) . En effet, plusieurs expériences réalisées aux champs et/ou sous serres, ont montré une amélioration remarquable de la production des plantes inoculées avec des microorganismes solubilisant le phosphate (Domey et Lippmann 1989, Chabot, Antoun *et al.*, 1993).

La solubilisation via des bactéries rhizosphériques minéralisant du phosphore a été montré, *in vitro*, sur plusieurs milieux sélectifs : milieu Angle (Angle *et al.*, 1991), NBRIP (Nautiyala, 1999), Hill (Hill *et al.*, 2007, PVK (Pikovskaya, 1948).

Divers groupes de bactéries composés essentiellement de genres, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Azotobacter* utilisent une variété de réactions de solubilisation, telles que l'acidification, la chélation, les réactions d'échange et la production d'acide gluconique pour libérer du phosphore soluble à partir de phosphate insoluble (Pandey et Maheshwari, 2007), Les micro-organismes libèrent le P par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétion de H⁺. Par conséquent, le P peut être libéré par la substitution des protons ou par sa complexation avec les cations Ca²⁺ (Illmer et Schinner, 1995). . Dans le même contexte, Mardad *et al.*,(2013) et de Abreu *et al.*, (2017) ont révélé la présence des acides comme l'acide citrique, l'acide malique, l'acide gluconique, l'acide succinique et l'acide acétique suite à une solubilisation du phosphate par les isolats *Bacillus* avec une concentration élevée de l'acide gluconique.

Gull *et al.*, (2004) ont rapporté que les espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ont un grand potentiel de solubilisation de phosphate présent dans le sol. Ainsi, dans notre travail tous isolats testés (14/14) étaient capables de solubiliser le phosphate inorganique sur milieu NBRIP, qu'est le plus couramment utilisé pour évaluer la solubilisation de phosphate par les rhizobactéries (Johri *et al.*, 1999 ; Cherif, 2014) , vu qu'il est considéré comme le milieu plus performant de la solubilisation du phosphate par la plupart des MSP (Nautiyal *et al.*, 2000), avec un indice de solubilisation arrivant à 222% ce sont des résultats proches à celle de

Résultats et discussion

Alikhani *et al.*, 2007 qui a révélé un indice de solubilisation chez un certain nombre de souches de *Rhizobium* compris entre 141% à 248% pour *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium ciceri*, De même, Hatim, (2015) qui a signalé une espèce *Rhizobium ssp.* isolée à partir des nodules racinaires d'*Acacia* caractérisée par un pouvoir de solubilisation du phosphate tricalcique élevé, avec un IS de 200%. Ceci montre bien le grand pouvoir de solubilisation de nos isolats surtout lorsqu'on considère la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa*, connue par sa grande capacité solubilisatrice, vu que sept isolats ayant un pouvoir de solubilisation proche à celui de la souche référence.

Il a été suggéré que le type d'acide produit par chaque espèce bactérienne dépend de paramètres complexes tels que le statut nutritionnel, la physiologie de la culture, la concentration et la composition des éléments nutritifs dans le milieu de culture (Chen *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

Le potassium (K) est un macronutriment essentiel qui joue un rôle important dans la croissance, le métabolisme et le développement des plantes et améliore ainsi la nutrition des plantes (Meena *et al.*, 2016). Sans potassium adéquat, les plantes auront peu développé racines, poussent lentement, produisent de petites graines et ont des rendements plus faibles. (Memon *et al.*, 1988). Les bactéries rhizosphériques peut accélérer les réactions de solubilisation des minéraux K (Sharpley, 1989). Dans notre étude, il a été constaté que parmi les 14 isolats testés, seules trois formaient une zone significative de solubilisation du K. La majorité des isolats (78,57%) n'ont pas stimulé la solubilisation du K. Les résultats obtenus sont proches à ceux obtenues par Parmar et Sindhu (2013), et qui ont indiqué 72.3% des isolats n'ont pas provoqué de solubilisation du K. Par rapport aux indice de solubilisation de trois isolats, les indices de solubilisation sont plus proches à ceux rapportées par Meena (2013), et qui a noté des comprises entre 80 à 100%. Néanmoins, d'après Hu *et al.*, (2006), la majorité des solubilisant de K ont été identifiés comme étant *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp.* et *Rhizobium sp.*

Les sidérophores sont des protéines chélateurs de fer à faibles poids moléculaire, ils sont considérés comme des agents importants dans l'amélioration de la croissance des plantes, soit directement, en fournissant du fer à la plante ou indirectement en influençant la croissance des plantes. D'ailleurs, les travaux de (Sujatha et Ammani ,2013), en appliquant ces sidérophores, ont montré que les plants testés étaient capables de prélever d'avantage le fer. Ceci est marqué par un grand nombre de rhizobactéries favorisant ainsi leur croissance. Il est à signaler aussi que les sidérophores produites par les PGPR peuvent empêcher la

Résultats et discussion

prolifération de microorganismes pathogènes en séquestrant le Fe^{3+} dans la rhizosphère (Siddiqui, 2005). Les résultats indiquent que 71.43%(10/14) des isolats produisent des sidérophores avec des rapports CAS variant de 1.3 à 2.06. Ces résultats sont proches à ceux de Kaioua et Grairi, 2015 dont des rapports de 2,0 à 3,0, des souches appartenant au genre *Pseudomonas* sp. ont été notés. Cependant, plusieurs facteurs agissent sur la synthèse des sidérophores : le pH, la teneur en fer et les formes d'ions de fer, la présence d'oligo-éléments et une quantité suffisante de C, N, et P (Duffy et Defago, 1999).

La production de l'AIA est une caractéristique commune chez les PGPR. D'après Zakharova *et al.* (1999), 80% de bactéries rhizosphériques produisent de l'AIA à différentes concentrations. La synthèse d'AIA est largement répandue chez les rhizobactéries (Forlani *et al.*, 1995; PerselloCartieaux *et al.*, 2003). Les bactéries productrices d'AIA stimulent la germination des graines, la division, l'élargissement des cellules et des tissus, l'expansion des feuilles et jouent un rôle majeur dans l'élongation racinaire (Egamberdieva, 2008 ; Maleki *et al.*, 2010; Martínez -Viveros *et al.*, 2010). Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2011), ce dernier est considéré comme le précurseur de l'AIA (Glick, 1995). En effet, les résultats du test de la production de l'AIA ont montré une variabilité dans les niveaux de production de l'Acide Indole Acétique, allant de 47 $\mu\text{g/ml}$ à 100 $\mu\text{g/ml}$. Les concentrations d'AIA obtenues avec nos isolats sont nettement supérieures à celles obtenues par Nabti *et al.*, (2014) ; Aouar *et al.*, (2016) (de 1,35 à 31,04 $\mu\text{g/ml}$), Khamna (2010) et Azrou *et al.*, 2014 (5,5-91 $\mu\text{g/ml}$ et 19.3-25.4 $\mu\text{g/ml}$) respectivement. De plus, les résultats de Egamberdieva *et al.*, (2010) qui ont aussi révélé que les deux souches de *Pseudomonas trivialis* et *Pseudomonas extremorientalis* produisent 12 $\mu\text{g/ml}$ et 10,1 $\mu\text{g/ml}$ d'AIA respectivement. Dans le même contexte, ces quantités produites sont plus proches à celles rapportées par Hafsa (2014), qui ont révélé que les bactéries Gram- synthétisent des quantités plus élevées d'AIA. Cependant, la production d'AIA par des micro-organismes peut varier au sein d'une même espèce. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Mirza *et al.*, 2001).

L'acide cyanhydrique (HCN) est un métabolite secondaire volatile qui inhibe la croissance et le développement des microorganismes. Cet acide (HCN) produit par les bactéries provenant de la rhizosphère joue un rôle primordial et important dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes (Siddiqui *et al.*, 2006) . L'enzyme synthétase HCN est une flavoprotéine de la membrane qui catalyse la formation de HCN et CO_2 de la glycine

(Ramette *et al.*, 2003). La production d'HCN par *Pseudomonas* est impliqué dans la suppression de divers agents pathogènes, en particulier des champignons (Verma *et al.*, 2010). Ce composé volatile agit directement sur les cellules en bloquant le cytochrome C oxydase dans la chaîne respiratoire. Elle contribue également à la capture de certains ions métalliques en formant des complexes avec eux (Blumer et Haas, 2000) et peut agir comme un inducteur de résistance végétale (Kumar *et al.*, 2012). Les résultats de cette étude ont montré que 64% (9/14) d'isolats sont capables de produire de l'HCN. Cela est en accord avec les travaux de Chibani, (2017), lorsqu'ils testent les HCN produits par des bactéries solubilisant le phosphate associées au blé (*Triticum sp.*), isolées des sols salins dans l'ouest d'Algérie.

L'activité des enzymes extracellulaires bactériennes, ces composés de haut poids moléculaire peuvent être clivés en monomères et petits oligomères appropriés pour être assimilés par la cellule bactérienne (Rath *et al.*, 1993 ; Arnosti *et al.*, 2009). Parmi ces enzymes produites par les bactéries : les phosphatases, les amylases, les uréases, les protéases, les cellulases (Przemieniecki *et al.*, 2015).

Les amylases sont des enzymes connues par l'accélération du processus de dégradation de l'amidon (Pandey *et al.*, 2000). La production de divers enzymes hydrolytiques pourrait jouer un rôle important dans la fertilité des sols (Pidwirny, 2006).

Dans cette étude, l'activité amylasique est révélée chez la moitié 50% des isolats obtenus, la synthèse de ces enzymes par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique et fournit les éléments nécessaires pour la croissance des plantes. notre résultat sont en accord avec ceux de Adouane *et al.*, (2018). et sont supérieurs à ceux observés par Dinesh *et al.*, (2015). Dans leur étude sur *Bacillus sp*, Obi et Odibo, (1984) ont révélé une production de quantités considérables en α -amylases. Selon Whipps, (2001) ; Siddiqui, (2005) et Viollet, (2010), l'amylase produite par les rhizobactérie stimule la croissance et la santé des plantes. D'une manière générale, la production de l'amylase est variant entre les bactéries rhizosphériques. Tabli *et al.*, (2014), Nabti *et al.*, (2014) ont constaté que 100% des souches avaient montrés une activité positive pour ce test. Les résultats obtenus par Gontia-Mishra *et al.*, (2016) sont tous négatifs pour ce test. Ces différences peuvent être dues à la différence du site de prélèvement ainsi qu'à la variabilité et la diversité génétique des isolats.

Les protéases (incluant les gélatinases) sont parmi les enzymes les plus importantes en industrie avec un pourcentage de 30% de la production mondiale (Khanachakzai et Khan, 2008) Les protéases extracellulaires hydrolysent des protéines en mono- ou oligomères, principalement les peptides et les acides aminés. Ces composés organiques de faible poids

moléculaire sont les précurseurs immédiats de la synthèse des protéines et rentrent dans beaucoup de voies métaboliques de la cellule (Manandhar et shrestha, 1999). La recherche de cette enzyme dans nos isolats a indiqué que 35 % (5/14) de ces derniers présentent une activité gélatinase. Il est bien établi que la production des enzymes lytiques telles que les gélatinase est l'un des mécanismes d'action indirecte appliqué par les PGPR (Patel et Pratibha, 2014).

Cependant pour confirmer leur statut de BNL, les isolats doivent renoduler leur plante hôte *Arachis hypogaea*. Du point de vue physiologique et selon Dénarié et Cullimore, (1993) ; Dénarié *et al.*, (1996) ; Parniske et Downie, (2003) ; plusieurs composés dérivés des plantes et des bactéries jouent un rôle crucial dans l'établissement de l'association symbiotique. Les flavonoïdes libérés par les légumineuses et les lipo chito oligosaccharides (LCO) ou facteurs de nodulation (facteurs Nod) secrétés par les rhizobia sont les deux principaux signaux moléculaires impliqués dans l'établissement de la symbiose. Dans notre étude nous avons détecté la formation de peu de nodules avec petit taille sur les racines des plants testés chez certain isolats. La formation des nodules indique que nos isolats sont infectifs et elle confirme la relation symbiotique entre la plante hôte et le micro-symbionte qui est une relation spécifique. La nodulation observée plutôt sur le génotype de Metlili que chez celui de Berrihane, serait, sans doute, relater à la spécificité de reconnaissance entre les deux symbiotes. En effet, certaines bactéries ont un spectre large mais d'autres dépendent du génotype de la plante hôte (VERNIE, 2008).

Le phénomène de la non-renodulation observé chez les 8 des isolats dans cette étude avec le P4 peut être expliqué le fait que les conditions des méthodes d'authentification peuvent influencer les résultats de nodulation (Sellahi, 2008). Cependant, la plupart des isolats testés lors de notre étude ont montré des caractères PGPR positifs (la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA, de l'HCN et des sidérophores). Ces potentialités semblent jouer un rôle efficace pour la plante afin de mieux assimiler les nutriments. D'ailleurs, des études menées par Banerjee *et al.*, (2010) ; Abbasi *et al.*, (2011) et Rana *et al.*, (2011) en inoculant de grains de blé avec différentes rhizobactéries ont permis de constater une meilleure croissance résultante d'effets PGPR sur ces plantes. Dans un premier temps les plantes inoculées ont été comparées globalement aux plantes témoins : la hauteur, le développement général et la couleur. Les plantes qui ont initié la formation de nodosités, se comportent différemment, sur le plan croissance, aux témoins non inoculés. (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006 ; Lin *et al.*, 2008). Il est à noter aussi que certaines isolats non renodulantes ont quand même permis l'améliorer la croissance végétale des plantes inoculées

Résultats et discussion

comparativement aux plantes non inoculées. Néanmoins, le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux *et al.*, 2004).

Dans l'aspect taxonomique, notamment l'identification moléculaire, le séquençage de l'ADNr 16S selon la technique de Sanger, soumis à l'isolat M4 indique qu'il est apparenté (à 94.06%) à l'espèce de *Pseudoxanthomonas koreensis*, identifiée sous le nom de *Pseudoxanthomonas koreensis* TR7-09T (numéro d'accèsion AY550263). Cette identité permet de mentionner cette isolat comme un nouveau genre. Cette espèce a été isolée à partir de sol dans un champ de ginseng à Daejeon, en Corée du Sud, est mentionné par Yang *et al.*, (2005). Le genre *Pseudoxanthomonas* récemment étudié et répertorié comme bactéries PGPR, possédant une activité amylase, une production d'IAA, de sidérophores et d'HCN (Egamberdieva *et al.*, 2015).

Conclusion

Conclusion

La rhizosphère en comprend une microflore microbienne qui inclut autant des micro-organismes bénéfiques que pathogènes. En effet, l'ensemble de ces bactéries bénéfiques regroupées sous le terme générique de rhizobactérie, joue un rôle important dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales par divers effets. Certaines agissent par effet direct, d'autres favorisent la croissance des plantes de façon indirecte (PGPR).

Cette étude a visé une sélection des isolats selon leurs capacités d'améliorer la croissance végétale par leurs mécanismes d'actions directes (production des phytohormones assimilation et solubilisation des minéraux) ou indirectes (production des sidérophores; production de composés volatiles, production d'enzymes lytiques tell que l'amylase, gélatinase). Ces mécanismes ayant principalement un rôle dans le biocontrôle, dans la biofertilisation et un rôle dans la biostimulation.

Dans cette étude, une caractérisation phénotypique des bactéries nodulant l'arachide a été réalisée. L'étude phénotypique des isolats basée sur les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques, appuyée par une analyse numérique, suivi par un test de nodulation pour confirmer leur caractère BNL avec une identification phylogénétique pour l'isolat M4.

L'étude phénotypique, basée sur l'analyse des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques a montré une grande diversité sur le milieu de culture YEM à 28°C, et que les isolats isolées sont de *Bacille* et *Cocci*, mobiles et à Gram différent, aérobies facultatifs ou stricts.

Afin de tester l'activité solubilisatrice des phosphates des 14 isolats, un test qualitatif sur milieu NBRIP contenant le phosphate tricalcique a été réalisé. Il s'est avéré que tous les isolats sont capables de solubiliser le phosphate, avec un indice de solubilisation maximal de 219% (isolat M2). Alors que la solubilisation de potassium a été réalisé sur milieu ALK montre que seulement trois isolats sont capables de solubiliser le potassium avec des indices 81-95-99 % pour les isolats S1, M4, M2 respectivement.

La plupart des isolats bactériens étudiés ont montré un fort potentiel pour produire des substances impliquées dans la promotion de la croissance des plantes tel que l'acide indole acétique (AIA) avec une production maximale 106 µg/ml (M2), les sidérophores 71% d'isolats avec un rapport 1.13 à 2.30. En revanche, 64.28% des isolats étaient capables de produire l'acide cyanhydrique (HCN).

Conclusion

Ainsi, les isolats testés se caractérisent par une importante diversité enzymatique (amylase, gélatinase, catalase et oxydase). Par conséquent, ils peuvent être des candidats qualifiés pour promouvoir la production agricole.

Cependant, le test de nodulation *in vitro* par inoculation de ces isolats à la plante *Arachis*, nous a permis d'obtenir 6/14 isolats bactériennes capables d'induire la formation des nodules sur leurs racines, ce qui nous laisse supposer leur appartenance à la famille des *Rhizobiaceae*, cette inoculation à une action stimulatrice de la croissance des plantes.

Au terme de ce travail, d'autres perspectives semblent nécessaires à réaliser :

- Confirmer l'isolat M4 comme un nouveau genre.
- Une identification précise des sidérophores par HPLC.
- Étude du pouvoir des isolats à produire d'autres phytohormones (cytokinines, 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, gibbérellines etc.) et procéder à la caractérisation d'autres activités enzymatiques telles : pectinases, lipases, chitinases, uréases.... etc.
- Réalisation des tests d'inoculation d'isolats *in vivo* au champ ou en pots pour évaluer leurs caractères PGPR de promotion de la croissance des plantes (directs et indirects).
- Préciser la position taxonomique de nos isolats via un séquençage complet de l'ADNr 16S. L'hybridation ADN/ADN pourrait préciser si ces isolats constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi autre genre.
- Exploiter les isolats à travers l'inoculation des plantes par nos isolats comme des biofertilisants, afin de contribuer à la lutte contre l'utilisation intensive des engrais et des pesticides chimiques en agriculture.

Références bibliographiques

- **Abbasi, M., Sharif, S., Kazmi, M., Sultan, T., & Aslam, M. (2011).** Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. *Plant Biosystems*, 145(1), 159-168.
- **ABDESSELAM, N. (2017).** *IDENTIFICATIONS ET CARACTÉRISATIONS DES BACTÉRIES ISOLEES A PARTIR DE DIFFERENTS SOLS.*
- **Adouane, H., Adjaoute, L., & Nabti, E. (2018).** Isolement de bactéries telluriques «PGPR» productrices de substances antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes.
- **Ahemad, M., & Kibret, M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1), 1-20.
- **AIT_OUALI, K. (2011).** *Etude de comportement de quelques populations d'arachide (arachis hypogaea L.) vis-à-vis du stress hydrique, pp.78.*
- **Alikhani, H., et al. (2007).** Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. First international Meeting on microbial phosphate solubilization, Springer.
- **Amarger, N., Macheret, V., & Laguerre, G. (1997).** Rhizobium gallicum sp. nov. and Rhizobium giardinii sp. nov., from Phaseolus vulgaris nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 996-1006.
- **Amri-Tiloune, W. (2008).** Etude de la symbiose à rhizobium chez l'arachide (Arachis hypogaea L.): aspects microbiologiques, physiologiques et biochimiques et agronomiques. *Magister Thesis, Institut Nationale Agronomique-El-Harrach, Algeria.*
- **Angle, J. S., et al. (1991).** "New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution." *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12): 3674-3676.
- **Antoun, H., & Prévost, D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1-38): Springer.
- **Arnosti, C., et al. (2009).** "Enzyme activities in the water column and in shallow permeable sediments from the northeastern Gulf of Mexico." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 84(2): 202-208.

- **Aouar, L., Lerat, S., Boulahrouf, A., & Beaulieu, C. (2016).** Bacterial Antagonism and Plant Growth Promoting Traits of Actinobacterial Strains Previously Selected for their Antifungal Properties. *Transylvanian Review*(1).
- **Azrou, S., Guettafi, N., & Nabti, E.-H. (2014).** Recherche de caractères d'intérêt agricole chez certaines bactéries rhizosphériques, p.15.
- **Baca, B., & Elmerich, C. (2007).** Microbial production of plant hormones *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations* (pp. 113-143): Springer.
- **Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., & Standing, D. (2010).** Stress induced phosphate solubilization by 'Arthrobacter' Sp. And 'Bacillus' sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*, 4(6), 378.
- **Beck, D. P., et al. (1993).** "Practical Rhizobium-legume technology manual." Practical Rhizobium-legume technology manual.(19).
- **BELHADJAISSA, M, M. et .BENBITOUR, I. (2017).** Caractérisation de certains souches de *Rhizobia* associés à la culture d'arachide (*Arachis hypogaea L.*) à haut potentiel de solubiliser le phosphore dans la région de Ghardaïa. Mémoire de master.université de Ghardaïa. Ghardaïa.
- **Benouaret, S., Kheloufi, F., & Ramdani, N. E. (2014).** Caractérisation phénotypique des bactéries isolées des nodules racinaires de la légumineuse *Spartium junceum L.*
- **Berrada, H., & Fikri-Benbrahim, K. (2014).** Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal*, 4(6), 616.
- **Bertrand, H. (1997).** Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan, Lyon 1.

Références bibliographiques

- **Blumer, C. and D. Haas (2000).** "Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis." *Archives of Microbiology* **173**(3): 170-177.
- **Bric, J. M., et al. (1991).** "Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane." *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 535-538.
- **Bumunang, E. W., & Babalola, O. O. (2014).** Characterization of rhizobacteria from field grown genetically modified (GM) and non-GM maizes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *57*(1), 1-8.
- **Chabot, R., et al. (1993).** "Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique." *Canadian journal of microbiology* **39**(10): 941-947.
- **Chen, Y., et al. (2006).** "Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities." *Applied soil ecology* **34**(1): 33-41.
- **CHIBANI, H. R. (2017).** Sélection et caractérisation des bactéries solubilisant le phosphate isolées du sol salin dans l'ouest algérien: effet sur la promotion de la croissance du blé (*Triticum sp.*), *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 13 (2) June 2017, pp. 124-131.
- **Dastager, S. G., Deepa, C., & Pandey, A. (2011).** Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(2), 259-265.
- **de Abreu, C., et al. (2017).** "Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers." *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- **de Freitas, A. D. S., & Silva, T. A. (2013).** Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. *African Journal of Biotechnology*, *12*(17).
- **de Souza, J. T., de Boer, M., de Waard, P., van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M. (2003).** Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *69*(12), 7161-7172.
- **Défago, G. (1993).** 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant pathology*, *42*(3), 311-312.
- **Dénarié, J., & Cullimore, J. (1993).** Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, *74*(6), 951-954.
- **Denarie, J., Debelle, F., & Prome, J.-C. (1996).** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry*, *65*(1), 503-535.
- **Dey, R., Pal, K., Bhatt, D., & Chauhan, S. (2004).** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, *159*(4), 371-394.
- **Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y. K., Subila, K. P., & Aravind, R. (2015).** Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological research*, *173*, 34-43.
- **Diouf, A. (1997).** *Caractérisation et utilisation des souches rhizobium isolées du haricot vert (Phaseolus vulgaris L.) dans la zone des Niayes au Sénégal.* Thèse doctorat, UCAD. Dakar, 96p.
- **Domey, S. and G. Lippmann (1989).** Stimulation of Plant Growth by Phosphate Solubilizing Bacteria. *Developments in soil science*, Elsevier. **18**: 457-461.
- **DSA 2016 :** Service Statistique. Ghardaia, Algérie.
- **DSA 2017 :** Service Statistique. Ghardaia, Algérie.
- **Duffy, B. K. and G. Défago (1999).** "Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(6): 2429-2438.

Références bibliographiques

- **Duhoux, É., Nicole, M., & Selosse, M. (2004).** *Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes: premier cycle, prépas, CAPES, Pharmacie.*
- **Egamberdieva, D. (2008).** Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 9-15.
- **Egamberdieva, D., Berg, G., Lindström, K., & Räsänen, L. (2010).** Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *European Journal of Soil Biology*, 46(3-4), 269-272.
- **Egamberdieva, D., Shrivastava, S., & Varma, A. (2015).** *Plant-growth-promoting rhizobacteria (pgpr) and medicinal plants* (Vol. 42): Springer, 81 (4), 71-129.
- **Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017).** Potassium solubilizing bacteria (KSB):: Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17(4), 897-911.
- **Ezawa, T., Smith, S. E., & Smith, F. A. (2002).** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil*, 244(1-2), 221-230.
- **Forlani, G., Branzoni, M., Pastorelli, R., & Favilli, F. (1995).** Root colonization efficiency, plant-growth-promoting activity and potentially related properties in plant-associated bacteria. *Journal of Genetics and Breeding (Italy)*.
- **Ghanimi, R., 2014.** Analyse agro-physiologique de la réaction de la symbiose fève-*Rhizobia* sous déficit en phosphore. Mémoire master. Université CADI AYYAD, Marrakech. pp42.
- **Gibson, A. (1980).** "Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets." Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets.: 139-184.
- **Gibson, F., & Magrath, D. (1969).** The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 192(2), 175-184.
- **Glick BR et Pasternak JJ.(1998).** Plant growth promoting bacteria in molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. 2nd Ed. ,ASN press, Washington DC .glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany*. 60, 121-126.
- **Glick, B. R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.
- **Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- **Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A., & Tiwari, S. (2016).** Alleviation of mercury toxicity in wheat by the interaction of mercury-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of plant growth regulation*, 35(4), 1000-1012.
- **Gordon, R. E. and M. M. Smith (1953).** "RAPIDLY GROWING, ACID FAST BACTERIA I.: Species' Descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann1." *Journal of bacteriology* 66(1): 41.
- **Gray, E., & Smith, D. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412.
- **Gull, M., et al. (2004).** "Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture." *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44(6): 623-628.
- **Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 7(2), 096-102.

Références bibliographiques

- **Haas, D., & Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology*, 3(4), 307.
- **Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., & Kloepper, J. (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10), 895-914.
- **Hanane, M. A. and M. Lamia. (2018).** "Isolement de bactéries telluriques «PGPR» productrices de substances antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes."
- **Hatim S. 2015.** Activités enzymatiques et pouvoir solubilisateur du phosphate chez les bactéries fixatrices d'azote nodulant quatre espèces d'Acacia. Mémoire master sciences et techniques, FST FES Maroc.p44
- **Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010).** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- **Hill, J. E., et al. (2007).** "Isolation and assessment of microorganisms that utilize phytate." Inositol phosphates: Linking agriculture and the environment: 61-77.
- **Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M., & Kersters, K. (1988).** *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 406-416.
- **Hu, X., Chen, J., & Guo, J. (2006).** Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 983-990.
- **Hugenholtz, P. (2002).** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), reviews0003. 0001.
- **Illmer, P. and F. Schinner (1995).** "Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms." Soil Biology and Biochemistry 27(3): 257-263.
- **Issa, A., Falalou, H., Maârouhi, I. M., Yacoubou, B., & Didier, Z. J. (2016).** Caractérisation Agro-Morphologique Des Accessions D'arachide (*Arachis Hypogaea* L.) Pour La Teneur En Huile. *European Scientific Journal, ESJ*, 12(15), 337.
- **Jackson, P., Hill, K., Laker, M., Ticknor, L., & Keim, P. (1999).** Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *Journal of applied microbiology*, 87(2), 263-269.
- **Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002).** Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 411-441.
- **Jida, M., & Assefa, F. (2012).** Phenotypic diversity and plant growth promoting characteristics of Mesorhizobium species isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing areas of Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 11(29).
- **Johri, J. K., et al. (1999).** "Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils." Current Microbiology 39(2): 89-93.
- **Jordan, D. (1984).** "Family III. Rhizobiaceae Conn 1938." Bergey's manual of systematic bacteriology 1: 234-244.
- **Kaioua A, Grairi I. 2015.** Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isolées des sols rhizosphériques (Mémoire de l'obtention du Diplôme de Master, Université des Frères Mentouri Constantine), Constantine .92p 27
- **Karnwal, A. (2009).** Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*, 61-63.
- **Kersters, K., et al. (1984).** "Bordetella avium sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 34(1): 56-70

Références bibliographiques

- **Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2010).** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4.
- **Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P., Ahemad, M., & Oves, M. (2009).** Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status *Microbial strategies for crop improvement* (pp. 105-132): Springer.
- **KHANACHAKZAI, A. K. and K. KHAN (2008).** "Production of extracellular protease by locally isolated *Bacillus subtilis* IC-5 using agriculture by-products." *J. Chem. Soc. Pak* 30(6).
- **Kim, K., Jordan, D., & McDonald, G. (1997).** Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and fertility of soils*, 26(2), 79-87.
- **Konate, I. (2007).** Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées.
- **Kouassi, M. d. (2001).** La lutte biologique: une alternative viable à l'utilisation des pesticides? *VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2(2).
- **Krapovickas, A., & Gregory, W. (1994).** Taxonomía del género. *Arachis (Leguminosae)*, 1-186.
- **Kravchenko, L., Azarova, T., Makarova, N., & Tikhonovich, I. (2004).** The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. *Microbiology*, 73(2), 156-158.
- **Kumar, P., Dubey, R., & Maheshwari, D. (2012).** *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological research*, 167(8), 493-499.
- **Lajudie, P. d., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Heyra, M., . . . Gillis, M. (1994).** Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology (USA)*.
- **Lin, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., & Chen, W. X. (2008).** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1409-1413.
- **Lindberg, G. (1981).** An antibiotic lethal to fungi [Plant pathogens]. *Plant Diseases*.
- **Lindsay, W. (1979).** "Chemical Equilibria in Soils. John Willey & Sons." New York.
- **Long, S. R. (1996).** Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 8(10), 1885.
- **Lorck, H. (1948).** "Production of hydrocyanic acid by bacteria." *Physiologia Plantarum* 1(2): 142-146.
- **Louden, B. C., et al. (2011).** "Use of blue agar CAS assay for siderophore detection." Journal of microbiology & biology education: JMBE 12(1): 51.

Références bibliographiques

- **Maleki, M., Mostafae, S., Mokhtarnejad, L., & Farzaneh, M. (2010).** Characterization of Pseudomonas fluorescens' Strain CV6 Isolated from Cucumber Rhizosphere in Varamin as a Potential Biocontrol Agent. *Australian journal of crop science*, 4(9), 676.
- **Manandhar, S.P. and A. Shrestha. (1999).** Prtease activity of mesophilic bacteria isolated from leather factory and slaughter house. Tribhuvan university journal. XXII: 24-34.
- **Mardad, I., et al. (2013).** "Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit." *African Journal of Microbiology Research*, 7, 626-635.
- **Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., & Mora, M. (2010).** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319.
- **Meena, O., Maurya, B., & Meena, V. (2013).** Influence of K-solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica. *Agric Sust Dev*, 1, 53-56.
- **Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., & Meena, R. S. (2016).** *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture*: Springer.
- **Memon, Y., Fergus, I., Hughes, J., & Page, D. (1988).** Utilization of non-exchangeable soil potassium in relation to soil type, plant species and stage of growth. *Soil Research*, 26(3), 489-496.
- **Milner, J. L., Silo-Suh, L., Lee, J. C., He, H., Clardy, J., & Handelsman, J. (1996).** Production of kanosamine by Bacillus cereus UW85. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(8), 3061-3065.
- **Mirza, M. S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., & Malik, K. A. (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, 237(1), 47-54.
- **Molla, M., Chowdhury, A., Islam, A., & Hoque, S. (1984).** Microbial mineralization of organic phosphate in soil. *Plant and Soil*, 78(3), 393-399.
- **Moreira, F. M., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., & Franco, A. A. (1993).** Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and applied microbiology*, 16(1), 135-146.
- **Morgan, J., Bending, G., & White, P. (2005).** Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1729-1739.
- **Mursyida, E., et al. (2015).** "Selection and identification of phosphate-potassium solubilizing bacteria from the area around the limestone mining in Cirebon quarry." *Research Journal of Microbiology* 10(6): 270.
- **Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., . . . Hartmann, A. (2014).** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a Cellulosimicrobium sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology*, 61, 20-26.

Références bibliographiques

- **Nakano, M. M., & Hulett, F. M. (1997).** Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS microbiology letters*, 157(1), 1-7.
- **Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J., & Tahara, S. (1999).** Possible Role of Xanthobaccins Produced by *Stenotrophomonas* sp. Strain SB-K88 in Suppression of Sugar Beet Damping-Off Disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10), 4334-4339.
- **Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2017).** Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*, 68(1), 12-26.
- **Nautiyal, C. S. (1999).** "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms." *FEMS microbiology Letters* 170(1): 265-270.
- **Nautiyal, C. S., et al. (2000).** "Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils." *FEMS microbiology Letters* 182(2): 291-296.
- **Neilands, J. (1987).** Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. *Iron transport in microbes, plants and animals*, 3-34.
- **Neilands, J. (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726.
- **Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., . . . Higashi, S. (2004).** A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *The Journal of general and applied microbiology*, 50(1), 17-27.
- **Obi, S., & Odibo, F. (1984).** Partial purification and characterization of a thermostable actinomycete β -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(3), 571-575.
- **Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., & Soccol, V. (2000).** D., Singh, R. Mohan. *Advances in microbial amylases*, *Biotechnol. Appl. Biochem*, 31, 135-152.
- **Pandey, P. and D. Maheshwari (2007).** "Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*." *Current Science* (00113891) 92(8).
- **Parmar, P., & Sindhu, S. (2013).** Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *J Microbiol Res*, 3(1), 25-31.
- **Parniske, M., & Downie, J. A. (2003).** Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature*, 425(6958), 569.
- **Patel, T. and B. Pratibha (2014).** "Study on rhizospheric microflora of wild and transgenic varieties of *Gossypium* species in monsoon." *Research Journal of Recent Sciences* 3(IVC-2014): 42-51.
- **Patriarca, E. J., Tate, R., Ferraioli, S., & Iaccarino, M. (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol*, 234, 201-262.
- **Perez, E., et al. (2007).** "Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region." *Soil Biology and Biochemistry* 39(11): 2905-2914.
- **Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., & Robaglia, C. (2003).** Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, 26(2), 189-199.
- **Pikovskaya, R. (1948).** "Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species." *Mikrobiologiya* 17: 362-370.

Références bibliographiques

- **Przemieniecki, S. W., et al. (2015).** "Plant growth promoting potential of *Pseudomonas* sp. SP0113 isolated from potable water from a closed water well." Archives of Biological Sciences.
- **Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2007).** Plant growth-promoting rhizobacteria *Plant-associated bacteria* (pp. 195-230): Springer.
- **Raj, S. V., Raja, A. K., Vimalanathan, A. B., Tyagi, M. G., Shah, N. H., Justin, N. J. A., . . . Sathiyaseelan, K. (2009).** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology, 1*(1).
- **Ramette, A., et al. (2003).** "Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability." Molecular Plant-Microbe Interactions **16**(6): 525-535.
- **Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar, K., & Nain, L. (2011).** Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of microbiology, 61*(4), 893-900.
- **Rath, J., et al. (1993).** "Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the Caribbean Sea." Marine Ecology-Progress Series **102**: 89-89.
- **Rayene, K. L., & Imene, B. R. (2016).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara à Constantine.
- **Rinaudo, G., Orenga, S., Fernandez, M., Meugnier, H., & Bardin, R. (1991).** DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem-and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 41*(1), 114-120.
- **Rivas, R., García-Fraile, P., & Velázquez, E. (2009).** Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights, 2*, MBI. S3137.
- **Rivas, R., Willems, A., Palomo, J. L., García-Benavides, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., . . . Velazquez, E. (2004).** *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54*(4), 1271-1275.
- **Rogers, J., Bennett, P., & Choi, W. (1998).** Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *American Mineralogist, 83*(11-12_Part_2), 1532-1540.
- **Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006).** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 19*(8), 827-837.
- **Ryu, R. J., & Patten, C. L. (2008).** Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of bacteriology, 190*(21), 7200-7208.
- **Schwyn, B. and J. Neilands (1987).** "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores." Analytical biochemistry **160**(1): 47-56.
- **Sellahi, F. Z. (2008).** Les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL).
- **Sharpley, A. N. (1989).** Relationship between soil potassium forms and mineralogy. *Soil Science Society of America Journal, 53*(4), 1023-1028.

Références bibliographiques

- **Siddiqui, I. A., et al. (2006).** "Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato." World Journal of Microbiology and Biotechnology **22**(6): 641-650.
- **Siddiqui, Z. A. (2005).** PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. PGPR: biocontrol and biofertilization, Springer: 111-142.
- **Siddiqui, Z., & Mahmood, I. (1999).** Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresource technology*, **69**(2), 167-179.
- **SILINI, A. (2014).** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de azotobacter et sur la croissance du ble dur en milieu salin.
- **Smartt, J., Gregory, W., & Gregory, M. P. (1978).** The genomes of *Arachis hypogaea*. 1. Cytogenetic studies of putative genome donors. *Euphytica*, **27**(3), 665-675.
- **Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (2012).** *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*: Springer Science & Business Media.
- **Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, **31**(4), 425-448.
- **Sujatha, N. and K. Ammani (2013).** "Siderophore production by the isolates of fluorescent *Pseudomonads*." International Journal of Current Research and Review **5**(20): 1.
- **Tabli, N., Nabti, E.-H., Dahel, D., Mokrane, N., Manyani, H., Dary, M., & Megias, M. (2014).** Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with bio-control effect, isolated from Algerian Soil. *J Ecol Health Env*, **2**, 1-7.
- **Tang-um, J., & Niamsup, H. (2012).** Extracellular amylase activity from endophytic *Streptomyces griseoflavus* P4. *Chiang Mai J. Sci*, **39**(2), 346-350.
- **Tatum, H., Ewing, W., & Weaver, R. (1974).** Miscellaneous gram-negative bacteria. *Manual of clinical microbiology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC*, 270-294.
- **Thakore, Y. (2006).** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, **2**(3), 194-208.
- **Thoma, J. A., Spradlin, J. E., & Dygert, S. (1971).** 6 Plant and animal amylases *The enzymes* (Vol. 5, pp. 115-189): Elsevier.
- **Tian, C. F., Wang, E. T., Wu, L. J., Han, T. X., Chen, W. F., Gu, C. T., . . . Chen, W. X. (2008).** *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**(12), 2871-2875.
- **Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.-M., Rivas, R., Ludena, D., . . . Velázquez, E. (2005).** Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(3), 1318-1327.
- **Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.-M., De Vos, P., & Willems, A. (2002).** *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and applied microbiology*, **25**(4), 507-512.
- **Velázquez, E., Peix, A., Zurdo-Piñero, J. L., Palomo, J. L., Mateos, P. F., Rivas, R., . . . Martínez-Molina, E. (2005).** The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Molecular plant-microbe interactions*, **18**(12), 1325-1332.

Références bibliographiques

- **Verma, J. P., et al. (2010).** "Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production." *Int J Agric Res* 5(11): 954-983.
- **Vernié, T. (2008).** Analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- **Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- **Villegas, M. D. C., Rome, S., Mauré, L., Domergue, O., Gardan, L., Bailly, X., . . . Brunel, B. (2006).** Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. *Systematic and applied microbiology*, 29(7), 526-538.
- **Vincent, J. M. (1970).** "A manual for the practical study of the root-nodule bacteria." A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- **Viollet, A. (2010).** *Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-Pseudomonas spp. fluorescents non pathogènes.* Université de Bourgogne, P:364.
- **Wani, S., Rupela, O., & Lee, K. (1995).** Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes *Management of biological nitrogen fixation for the development of more productive and sustainable agricultural systems* (pp. 29-49): Springer.
- **Wasaki, J., Rothe, A., Kania, A., Neumann, G., Römheld, V., Shinano, T., . . . Kandeler, E. (2005).** Root exudation, phosphorus acquisition, and microbial diversity in the rhizosphere of white lupine as affected by phosphorus supply and atmospheric carbon dioxide concentration. *Journal of Environmental Quality*, 34(6), 2157-2166.
- **Willems, A., & Collins, M. (1993).** Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 305-313.
- **Williams, S. and T. Cross (1971).** Chapter XI actinomycetes. Methods in microbiology, Elsevier. 4: 295-334.
- **Whipps, J. M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 52(suppl_1), 487-511.
- **Young, J., Kuykendall, L., Martinez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001).** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.

Références bibliographiques

- **Yang, D.-C., Im, W.-T., Kim, M. K., & Lee, S.-T. (2005).** Pseudoxanthomonas koreensis sp. nov. and Pseudoxanthomonas daejeonensis sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 787-791.
- **Zakharova, E. A., Shcherbakov, A. A., Brudnik, V. V., Skripko, N. G., Bulkhin, N. S., & Ignatov, V. V. (1999).** Biosynthesis of indole-3-acetic acid in Azospirillum brasilense: Insights from quantum chemistry. *European journal of biochemistry*, 259(3), 572-576.
- **Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.-C., Gillis, M., . . . De Lajudie, P. (2004).** Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and applied microbiology*, 27(3), 380-395.
- **Zeller, S. L., Brandl, H., & Schmid, B. (2007).** Host-plant selectivity of rhizobacteria in a crop/weed model system. *PLoS One*, 2(9), e846.
- **Zhang, X., Li, F., Young, J., & Turner, S. (2002).** What does a bacterial genome sequence represent? Mis-assignment of MAFF 303099 to the genospecies Mesorhizobium loti. *Microbiology*, 3330-3331.

➤ Sites web:

(<https://dna.macrogen.com/eng/>) visite: 18.04.2019.

(<https://www.ezbiocloud.net/identify>) visite: 20.04.2019

Annexe1. Milieu de cultureur.

1. Milieu YMA (yeast Mannitol Agar): Pour un volume de 1L

Mannitol10g
K₂HPO₄.....0.5g
MgSO₄ 7H₂O.....0.2g
NaCl.....0.10g
Extraits de levures.....0.5g
Agar.....20g
pH.....6.8

2. Milieu YMB (yeast Mannitol Broth) : Pour un volume de 1L

Mannitol10g
K₂HPO₄.....0.5g
MgSO₄ 7H₂O.....0.2g
NaCl.....0.10g
Extraits de levures.....0.5g
pH.....6.8

3. Milieu YMA+ BTB (bleu de Bromothymol) en g/l

YMB.....1000ml
Solution stock de bleu de Bromothymol.....10 ml
Agar.....15g
pH.....6.8

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de Bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar. Autoclavage 120°C pendant 20minutes

4. Milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's phosphate)

Glucose 10 g
Ca₃(PO₄)₂ 5 g
MgCl₂.6H₂O 5 g
MgSO₄.7H₂O 0,25 g
KCl 0,2 g
(NH₄)₂SO₄ 0,1 g
Agar agar 15g
Eau distillée q.s.p 1000 ml

5. Milieu CAS :

2,7 mg de FeCl₃.6H₂O dissous dans 10 ml de HCl 10 mM avec 0.06 g de chrome Azurol S (CAS) dissous auparavant dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange, de couleur bleu foncée, est ajouté très lentement sous agitation à 0.073 g de HDTMA (Hexa méthylammonium bromure) dissous dans 40 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 7. La solution bleu foncé obtenue est autoclavée à 120 °C /20 min.

À 900 ml de King B, 100ml de la solution CAS- HDTMA est ajouté dans une erlenmeyer stérile (le mélange doit être homogénéisé). Couler ce milieu dans les boites de pitre, puis ensemencée les isolats

6. Milieu King B (g/l)

Peptone.....	20 g
Glycérol.....	10ml
Phosphate dipotassique.....	1.5g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O.....	1.5g
Agar.....	15g

7. Bouillon Luria Bertani LB (g/l)

Peptone	10 g
Extret de levure	5 g
Sodium Chloride	10 g

8. Milieu gélose nutritive contenant 1% d'amidon g /l

Peptone	5g
Extrait de viande	3g
Amidon	10g
Agar	15g
Eau distillé	1000 ml
pH	7 à 8

9. Milieu gélose nutritive contenant gélatinase g /l

Peptone	5g
Extrait de viande	3g
Gélatine	15g
Agar	15g
Eau distillé	1000 ml
pH	7 à 8

10. Préparation des tubes de cultures (Gibson)

Milieu de culture pour légumineuses méditerranéennes (Bertrand, 1997) Dans un litre de solution : 1 mL de KH₂PO₄ (solution à 13,609 g/L), 1 mL de KCl (solution à 223,65 g/L), 1 mL de CaCl₂ (H₂O)₂, (solution à 294,04 g/L), 1 mL de MgSO₄(H₂O)₇ (solution à 246,48 g/L). 0,04 mL d'une solution de micro éléments (Cette solution contient : H₃BO₃ (6,25 g/L), MnSO₄ (H₂O) (25 g/L), ZnSO₄(H₂O)₇ (6,25 g/L), CuSO₄, (H₂O)₅ (6,25 g/L), Na₂MoO₄ (H₂ O)₂ (0,625 g/L), CaCO₃ 1 g/L).

1 mL de séquestrène de fer (solution à 16,6 g/L). 1 mL de Ca(NO₃)₂ (82 g/L). Qsp : 1000 mL H₂O. Ajouter du CaCO₃ : 1 g/L. Ajuster le pH à 7. Ajouter de l'agar : 20 g/L. Le milieu est stérilisé pendant 20 min à 120°C.

Annexe 2. Les solutions et réactives.

1. Préparation du réactif d'oxydase

- Dans un petit tube à hémolyse de 5 ml, dissoudre une pointe de couteau de N, N, N', N' tétraméthyl 1-4 phénylène diamine dans 5 ml d'eau distillée.
- Boucher puis agiter.
- Recouvrir le tube de papier aluminium, il est très sensible à la lumière.
- Le réactif conservé au réfrigérateur à l'abri de la lumière, il est stable 6 h.

2. Réactive des API

- **Réactif VP 1**
KOH : 40 g
H₂O : 100 ml
- **Réactif VP 2**
Alpha-naphtol : 6 g
Ethanol : 100 ml
- **Réactif TDA**
Chlorure de fer FeCl₃ 1 g
Eau distillée 10 mL
- **Réactif NIT 1**
Acide sulfanilique 0,4g
Acide acétique 30g
H₂O 70mL
- **Réactif ZYM B**
Fast Blue BB 0,35g
2-méthoxy-éthanol 100mL

3. Réactif de salkowski

H ₂ SO ₄	150 ml
FeCl ₃ , 6H ₂ O 0,5 M	7.5 ml
Eau distillée	250 ml

4. Solution du picrate alcalin

Acide picrique	2.5 g
Na ₂ CO ₃	12.5 g
Eau distillée qsp	1000 ml

5. La solution de chlorure de mercure (le réactif de Frazier)

HgCl ₂	15g
HCl concentré	20 ml
Eau distillée	100 ml

Annexe 3. Les figures.

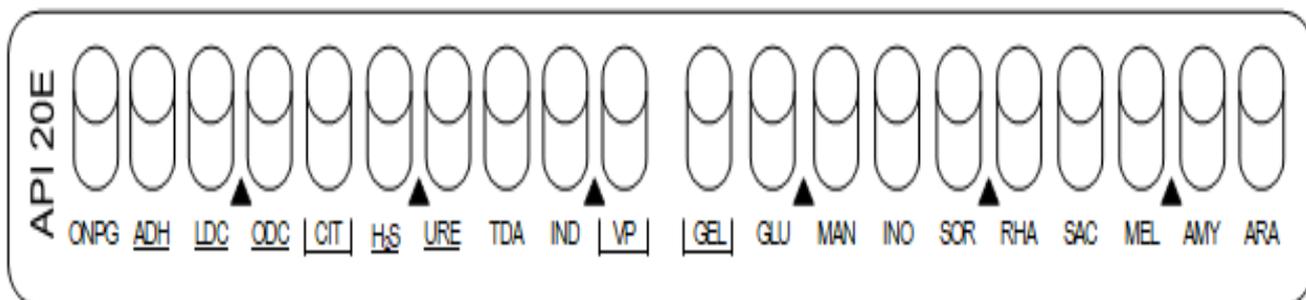


Figure 1. triplette de lecteur de API 20^E.

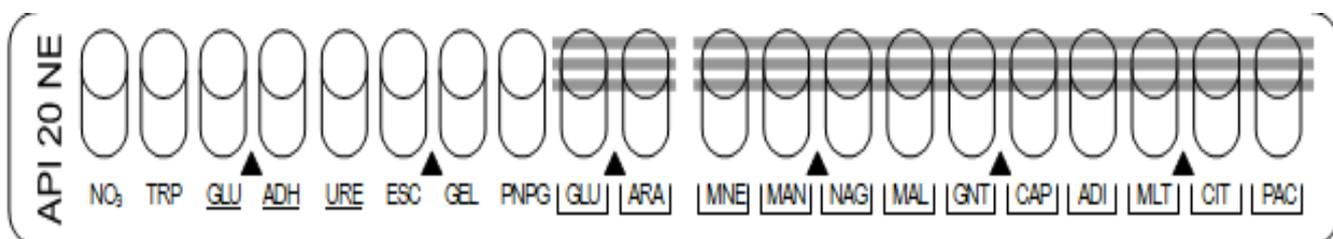


Figure 2. Triplettes de lecteur d'API 20^{NE}.

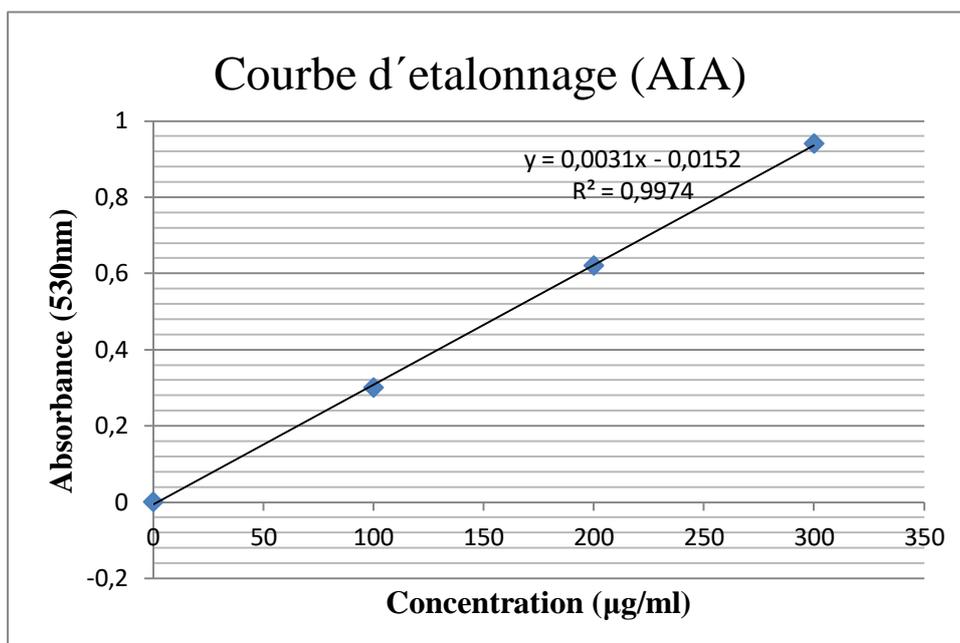


Figure 3. Courbe d'étalonnage d'Acide Indole Acétique (AIA) à 530nm.

API 20 E V5.0 [Printout](#) [Export](#) [New test](#) [Modify](#)

REFERENCE: DATE: 5/21/19
 COMMENT:

GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 20 E V5.0
Profile	0 0 2 1 0 0 6
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against					
Ochrobactrum anthropi	96.4	0.39	TDA	1%	VP	15%	ARA	10%

Next taxon	% ID	T	Tests against					
Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp	1.5	0.09	TDA	1%	VP	25%	ARA	0%

API 10S
 API 20 A
 API 20 C AUX
 API 20 E
 API 20 NE
 API 20 STREP
 API 50 CHB
 API 50 CHE
 API 50 CHL
 API CAMPY
 API CANDIDA
 API CORYNE
 API LISTERIA
 API NH
 API STAPH
 RAPID 20 E

ID32

Figure 4. Profile d'API20^E d'isolat M2.

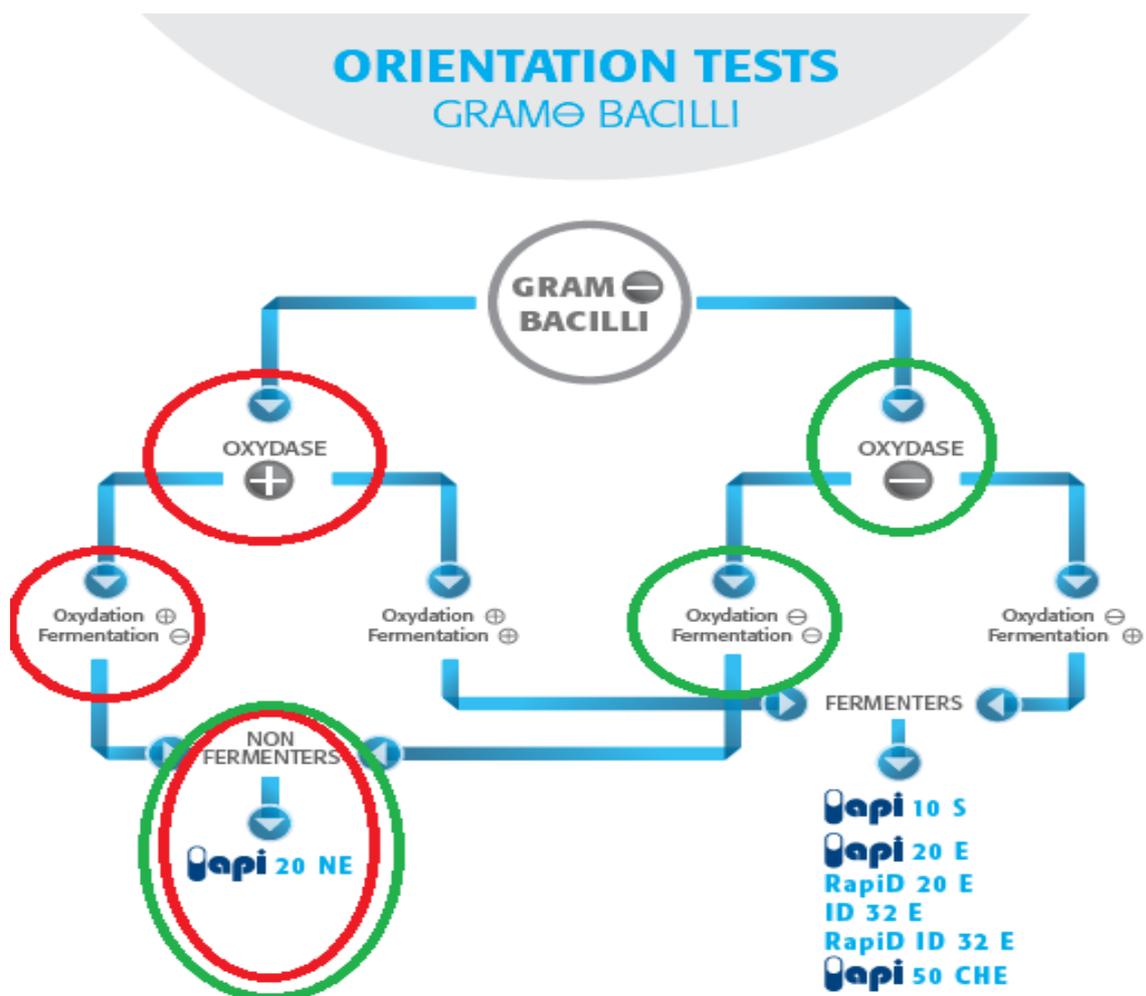


Figure 5. Test d'orientation d'API 20^{NE}.

API 20 NE V8.0 [Printout](#) [Export](#) [New test](#) [Modify](#)

REFERENCE: DATE: 5/21/19
 COMMENT:

GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 20 NE V8.0		
Profile	1 4 7 7 7 4 4		
Note			

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Rhizobium radiobacter	98.9	0.63	GEL	1%		

Next taxon	% ID	T	Tests against							
Aeromonas hydrophila/caviae	0.8	0.36	TRP	89%	GLU	99%	ADH	78%	CAPa	84%

Figure 6. Profil d’API20NE d’isolat D4.

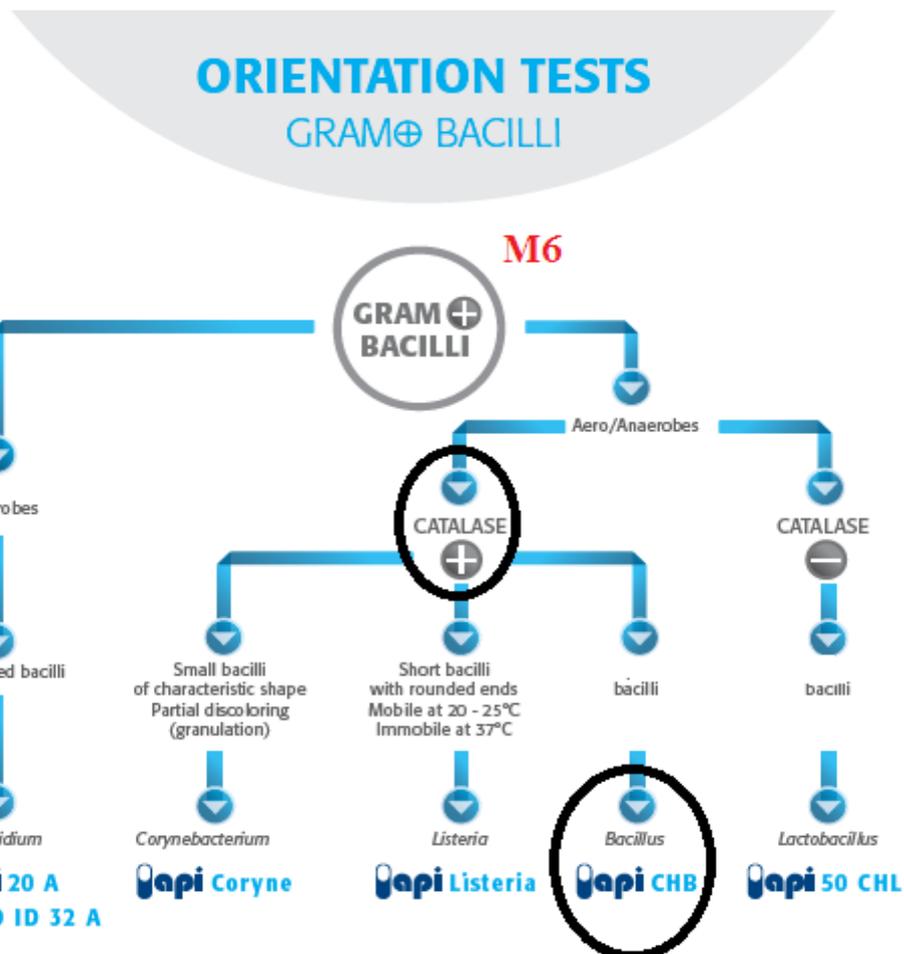


Figure 5. Test d’orientation d’API 50 CHB.

API 20 E V5.0 [Printout](#) [Export](#) [New test](#) [Modify](#)

REFERENCE: DATE: 5/21/19
 COMMENT:

GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 20 E V5.0
Profile	0 0 2 1 0 0 6
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against					
Ochrobactrum anthropi	96.4	0.39	TDA	1%	VP	15%	ARA	10%

Next taxon	% ID	T	Tests against					
Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp	1.5	0.09	TDA	1%	VP	25%	ARA	0%

API 10S
 API 20 A
 API 20 C AUX
 API 20 E
 API 20 NE
 API 20 STREP
 API 50 CHB
 API 50 CHE
 API 50 CHL
 API CAMPY
 API CANDIDA
 API CORYNE
 API LISTERIA
 API NH
 API STAPH
 RAPID 20 E

ID32

Figure 10. Profile d'API20E d'isolat M2.

EZ BioCloud [DASHBOARD](#) [APPS](#) [TOOLS](#) [RESOURCES](#) [HOW TO CITE](#) [ABOUT](#) [HELP CENTER](#) [SUPPORT](#) [LICENSES](#)

Organism	Accession 1	Accession 2	% ID	T	Tests against	Similarity
Pseudoxanthomonas koreensis	TR7-09(T)	AY550263	94.06	83/1398	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Pseudoxanthomonas	96.3
Pseudoxanthomonas wuyuanensis	CGMCC 1.10978(T)	OCND01000005	93.96	87/1440	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Pseudoxanthomonas	100.0
Pseudoxanthomonas gei	ZFJR-3(T)	KF387628	93.47	93/1425	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Pseudoxanthomonas	98.1
Lysobacter silvestris	AM20-91(T)	KP899165	93.26	92/1365	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Lysobacter	93.9
Pseudoxanthomonas kaohsiungensis	J36(T)	AY650027	93.07	97/1399	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Pseudoxanthomonas	96.4
Stenotrophomonas bentonitica	BII-R7(T)	LT622838	93.06	96/1383	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Stenotrophomonas	94.4
Pseudoxanthomonas mexicana	AMX 26B(T)	AF273082	93.06	100/1440	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Pseudoxanthomonas	100.0
Pseudoxanthomonas helianthi	roo10(T)	AB905612	93.06	100/1440	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Pseudoxanthomonas	100.0
Xanthomonas maliensis	M97(T)	KF992843	93.01	97/1388	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Xanthomonas	95.5
Pseudoxanthomonas sacheonensis	BD-c54(T)	EF575564	92.99	101/1440	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Lysobacterales;Lysobacteraceae;Pseudoxanthomonas	100.0

Figure 12. Résultat de recherche d'homologie par EzBioCloud.

Annexe 4. Les tableaux

Tableau 1. Aspects morphologique des isolats.

Isolat	Forme colonie	Aspect	Relief	Opacité	Couleur	Consistance	Gram	Forme	Mobilité	Taille
M1	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Transparent	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Envahissante
M2	Régulière	Lisse brillant	Plat	Transparent	Blanc cassé	Sèche	Négatif	Bacille	Mobile	Moyenne
M3	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite
M4	Régulière	Lisse brillant	Plat	Transparent	Blanc cassé	Sèche	Négatif	Bacille	Mobile	Moyenne
M6	Irrégulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Envahissante
M7	Irrégulière	Lisse brillant	Plat	Transparent	Blanc cassé	Sèche	positif	Cocci	Mobile	Petite
S1	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite
S3	Régulière	Lisse brillant	Plat	Transparent	Blanc cassé	Sèche	Négatif	Bacille	Mobile	Moyenne
D2	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite
D3	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite
D4	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite
D5	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite
D6	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite
D8	Régulière	Lisse brillant	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile	Petite

Tableau 2. caractère physiologique et biochimique des isolats.

Isolat	Oxydase	Catalase	Respiration	Fermentation	Acidification-BTB
M1	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Positif
M2	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif
M3	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif
M4	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif
M6	Positif	Négatif	Aérobie facultative	Négatif	Positif
M7	Positif	Négatif	Aérobie facultative	Négatif	Négatif
S1	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif
S3	Négatif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif
D2	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Positif
D3	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Positif
D4	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif
D5	Négatif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Positif
D6	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif
D8	Positif	Positif	Aérobie stricte	Négatif	Négatif

Tableau 3. Résultats de l'Api 20E.

isolats	D2	D3	D4	D5	D6	D8	M1	M2	M3	M4	M6	M7	S1	S3
TEST														
ONPG	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
ADH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LDC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ODC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CIT	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
H2S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
URE	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
TDA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IND	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
VP	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1
GEL	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
GLU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RHA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARA	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1

1 : présence de réaction enzymatique. 0 : absence de réaction enzymatique.

Tableau 4. l'indice de similarité entre tous les isolats dans API 20^E.

	D2	D4	D5	D6	D8	M1	M2	M3	M4	M6	M7	S1	S3
D2	1	0,7	0,4	0,66666667	0,88888889	0,93333333	0,82352941	0,64	0,85714286	0,7	0,93333333	0,82352941	0,8
D4	0,7	1	0,63157895	0,90909091	0,72727273	0,63157895	0,66666667	0,82758621	0,66666667	1	0,73684211	0,66666667	0,63157895
D5	0,4	0,63157895	1	0,70588235	0,35294118	0,42857143	0,25	0,58333333	0,30769231	0,63157895	0,28571429	0,25	0,57142857
D6	0,66666667	0,90909091	0,70588235	1	0,6	0,70588235	0,63157895	0,74074074	0,75	0,90909091	0,70588235	0,63157895	0,58823529
D8	0,88888889	0,72727273	0,35294118	0,6	1	0,82352941	0,73684211	0,74074074	0,75	0,72727273	0,82352941	0,73684211	0,70588235
M1	0,93333333	0,63157895	0,42857143	0,70588235	0,82352941	1	0,75	0,58333333	0,92307692	0,63157895	0,85714286	0,75	0,71428571
M2	0,82352941	0,66666667	0,25	0,63157895	0,73684211	0,75	1	0,53846154	0,8	0,66666667	0,875	0,77777778	0,625
M3	0,64	0,82758621	0,58333333	0,74074074	0,74074074	0,58333333	0,53846154	1	0,52173913	0,82758621	0,58333333	0,69230769	0,58333333
M4	0,85714286	0,66666667	0,30769231	0,75	0,75	0,92307692	0,8	0,52173913	1	0,66666667	0,92307692	0,8	0,61538462
M6	0,7	1	0,63157895	0,90909091	0,72727273	0,63157895	0,66666667	0,82758621	0,66666667	1	0,73684211	0,66666667	0,63157895
M7	0,93333333	0,73684211	0,28571429	0,70588235	0,82352941	0,85714286	0,875	0,58333333	0,92307692	0,73684211	1	0,875	0,71428571
S1	0,82352941	0,66666667	0,25	0,63157895	0,73684211	0,75	0,77777778	0,69230769	0,8	0,66666667	0,875	1	0,625
S3	0,8	0,63157895	0,57142857	0,58823529	0,70588235	0,71428571	0,625	0,58333333	0,61538462	0,63157895	0,71428571	0,625	1

Tableau 5. Résultats de l'Api 20NE.

isolats	D4	D5	M2	M4	S1	S3
TEST						
NO3	1	1	1	0	1	0
TRP	0	0	0	0	0	0
GLU	0	0	0	0	0	0
ADH	0	0	0	0	0	0
URE	0	0	0	0	0	1
ESC	1	1	1	1	1	1
GEL	1	0	0	0	0	0
PNPG	1	1	0	0	0	1
GLU	1	1	0	0	1	1
ARA	1	1	0	1	0	1
MNE	1	1	0	1	1	1
MAN	1	1	0	0	1	1
NAG	1	1	0	1	1	0
MAL	1	1	0	0	0	1
GNT	1	1	0	1	1	0
CA	0	0	0	0	0	0
ADI	0	0	0	0	0	0
MLT	1	1	0	1	1	1
CIT	0	0	0	0	0	0
PAC	0	0	0	0	0	0

1 : présence de réaction enzymatique.

0 : absence de réaction enzymatique

Tableau 6. l'indice de similarité entre tous les isolats

	D4	D5	M2	M4	M6	S1	S3
D4	1	0,92063492	0,41860465	0,74074074	0,98507463	0,90322581	0,78571429
D5	0,92063492	1	0,26315789	0,65306122	0,93548387	0,84210526	0,8627451
M2	0,41860465	0,26315789	1	0,55172414	0,42857143	0,48648649	0,19354839
M4	0,74074074	0,65306122	0,55172414	1	0,75471698	0,83333333	0,57142857
M6	0,98507463	0,93548387	0,42857143	0,75471698	1	0,91803279	0,8
S1	0,90322581	0,84210526	0,48648649	0,83333333	0,91803279	1	0,76
S3	0,78571429	0,8627451	0,19354839	0,57142857	0,8	0,76	1

Tableau 7. Résultats de l'Api 50 CHB.

N° test	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sub	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX
24 h	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
48 h	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
N°	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Sub	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOA
24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48h	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
N°	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Sub	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC
24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48h	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
N°	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Sub	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN
24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48h	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
N°	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Sub	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
24h	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
48h	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-

+: présence de réaction enzymatique.

- : absence de réaction enzymatique.

Tableau 8. Résultats de l'Api Strep d'isolat M7.

Test	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH
M7	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-

RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INE	RAF	AMD	GLYG	βHAEM
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

+: présence de réaction enzymatique.

- : absence de réaction enzymatique.

Tableau 9. Regroupement d'analyse de la variance de la solubilisation des phosphates

Isolat	D2	D3	D4	D5	D6	D8	M1	M2	M3	M4	M6	M7	P	S1	S3
Groupe	"ab"	"ac"	"a"	"ac"	"a"	"ac"	"ac"	"d"	"ac"	"bc"	"a"	"ac"	"ac"	"ac"	"c"

Tableau 10. Corrélation entre la modalité témoin P et les autres modalités de la solubilisation de phosphate (P).

Modalité	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Différence critique	Pr > Diff	Significatif
P vs M2	-98,958	-6,4297	2,9973	46,1309	0	Oui
P vs S3	-18,9347	-1,2303	2,9973	46,1309	0,8656	Non
P vs M4	-12,581	-0,8174	2,9973	46,1309	0,9911	Non
P vs M6	55,8493	3,6287	2,9973	46,1309	0,011	Oui
P vs D4	51,9753	3,377	2,9973	46,1309	0,0205	Oui
P vs D6	44,566	2,8956	2,9973	46,1309	0,0628	Non
P vs D2	43,72	2,8406	2,9973	46,1309	0,0709	Non
P vs D8	36,025	2,3407	2,9973	46,1309	0,196	Non
P vs M3	34,5927	2,2476	2,9973	46,1309	0,2325	Non
P vs D5	32,1033	2,0859	2,9973	46,1309	0,3079	Non
P vs M7	31,932	2,0747	2,9973	46,1309	0,3137	Non
P vs D3	29,2007	1,8973	2,9973	46,1309	0,4152	Non
P vs M1	3,2193	0,2092	2,9973	46,1309	1	Non
P vs S1	2,5303	0,1644	2,9973	46,1309	1	Non

Tableau 11. Analyse de la variance ANOVA de la production des sidérophores.

	D2	D3	D4	D5	D6	D8	M1	M7	S1	S3	
Isolat											
Groupe		"a"	"a"	"a"	"a"	"b"	"a"	"a"	"a"	"b"	"ab"

Tableau 12. Analyse de la variance de la production d'AIA.

Isolat	D2	D3	D4	D5	D6	D8	M1	M2	M3	M4	M6	M7	S1	S3
Groupe	"a"													

Tableau 13. Résultats de propriétés PGPR d'isolats.

isoat	Solubilisation De phosphate	Solubilisation de potassium	Production de sidérophore	Production de HCN	Production d'AIA	Présence d'amylase	Présence de gélatinase
D2	+	-	+	+	+	+	-
D3	+	-	+	-	+	-	-
D4	+	-	+	-	+	-	-
D5	+	-	+	+	+	+	-
D6	+	-	+	-	+	-	+
D8	+	-	+	+	+	+	+
M1	+	-	+	-	+	+	+
M2	+	+	-	+	+	+	+
M3	+	-	-	+	+	-	-
M4	+	+	-	-	+	+	-
M6	+	-	-	+	+	+	-
M7	+	-	+	+	+	-	+
S1	+	+	+	+	+	-	-
S3	+	-	+	+	+	-	-

+: réaction positive.

- : réaction négative.