



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## **Université Amar Thelidji- Laghouat**

**FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES**

### **MEMOIRE DE MASTER**

**Présenté par Djillali Hadjira**

**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)**

**FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES**

**OPTION : PROTECTION DES VEGETAUX**

#### **Thème**

**Effets bénéfiques des rhizobactéries sur la stimulation de la germination blé bur (*Triticum durum*).**

#### **Jury de soutenance :**

Mr. Oubraham Farid  
M<sup>me</sup> Mallem Hamida  
M<sup>elle</sup> Ameer Djamila  
M<sup>elle</sup> Renane Zohra

Président  
Examineur  
Rapporteur  
Co- rapporteur

**Promotion : septembre – 2018**

# **Remerciements**

*Avant tout, je remercie dieu de me donner la force, et le courage  
d'aboutir à ce travaille.*

*Tout d'abord, mes remerciements vont à Monsieur « Oubraham  
Farid » d'avoir accepté de présider le jury et au Madame « Mallem  
Hamida » pour avoir accepté également d'examiner mon travail.*

*Je tiens particulièrement à remercier Madame le « Ameer Djamila »  
pour son engagement et pour avoir accepté de diriger mon mémoire  
ainsi que la co-promotrice Renane Zohra.*

*Je remercie également tous les enseignants du département des sciences  
agronomiques.*

Je dédie ce modeste travail :

### A mon Père

Qui a oeuvré pendant des années à notre bien être et qui a  
Consenti de bien lourds efforts pour nous permettre de mener  
à bien nos études. Je tiens à lui témoigner  
ma profonde affection

### A ma Mère

Son soutien tout au long de mes études  
sa bienveillance et ses conseils ont été très précieux, je tiens à lui témoigner  
ma profonde affection et reconnaissance

### A mon époux

Je ne saurai lui témoigner assez ma gratitude, d'un soutien  
indéfectible, il a su trouver les mots pour m'aider et me  
soutenir.

### Et ma petite *Anfel*

### A mes Frères et mes Soeurs

A qui je témoigne ma profonde affection, toujours présent, ils  
m'ont toujours assisté et cru en moi

### A mes amies : mebarka et Saadia.

Qui m'ont toujours entouré et soutenu.

### *A toute ma famille Djillali et Bensaada.*

## Résumé

Nous visons par ce travail la recherche de nouvelles souches efficaces de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), pour les utiliser en biostimulation, qui peut être considéré comme une éventuelle alternative plus écologique et durable que les fertilisants chimiques.

Nous avons utilisé huit souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, originaires de la rhizosphère des plantes spontanées de la wilaya de Laghouat (Algérie), afin de mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires. Tous les isolats concernés ont présenté une activité productrice des sidérophores, la capacité de fixer l'azote, de produire de l'ammoniac, de solubiliser les phosphates, et de produire de l'AIA, où le taux le plus élevé est enregistré chez l'isolat P12 (130µg/l).

Les deux souches (AZ4 et P12) choisies pour étudier leur effet sur la biostimulation de la germination de blé dur (*Triticum durum*), ont révélé une augmentation du taux de germination des graines de 20%, ainsi qu'une amélioration significative des paramètres morphologiques (la longueur des racines et la longueur des feuilles), ce qui a été confirmé par l'indice de vigueur.

**Mots clef:** PGPR, *Pseudomonas* spp fluorescents, métabolites secondaires, fertilisants.

## Abstract

By this work we aim to find new and efficient strains of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) for use in biostimulation, which can be considered as a possible alternative more ecological and sustainable than chemical fertilizers.

We used eight strains of *Pseudomonas spp.* fluorescent, isolated from the rhizosphere of the spontaneous plants of the wilaya of Laghouat (Algeria), for the demonstration of certain secondary metabolites. It synthesizes siderophores, it has the capacity to fix the nitrogen, to produce NH<sub>3</sub> and to solubilize the phosphates. It also produces AIA, with the highest rate recorded with P12 (130µg / l).

The two strains (AZ4 and P12) chosen to study their effect on the biostimulation of durum wheat germination (*Triticum durum*), they increase the germination rate by 20%, and significantly improve the morphological parameters (the length of the radicles and the length lemmas), which has been confirmed by the vigor index.

**Key words:** PGPR, *Pseudomonas spp.* fluorescent, secondary metabolites, fertilizers.

## ملخص

الهدف من هذا العمل البحث عن عزلات جديدة فعالة من اجل استخدامها في التحفيز البيولوجي والتي يمكن اعتبارها بديلا أكثر استدامة من الناحية البيئية مقارنة بالأسمدة الكيماوية.

ثمانية سلالات من *Pseudomonas spp. fluorescent* في الجذور الخاصة بالنباتات تلقائية النمو لولاية الاغواط للكشف عن بعض المستقبيلات الثانوية للعزلات حيث لديهم القدرة على تثبيت النيتروجين ونتاج  $NH_3$  واذابة الفوسفات ونتاج ال AIA حيث على معدل تم تسجيله في P12 (130 ميكروغرام/ل).

السلالات 4 و12 التي يتم اختبارها لدراسة تأثيرها على التحفيز لإنبات القمح الصلب لانها تزيد معدل الانبات بنسبة 20 وتحسن بشكل ملحوظ المعطيات المورفولوجية (طول الجذور وطول الساق) والتي تم تأكيدها من قبل مؤشر النشاط.

الكلمات المفتاحية PGPR , *Pseudomonas spp fluorescent* المستقبيلات الثانوية

# Table des matières

Remerciement	I
Dédicace	II
Résumé	III
Table des matières	VI
Liste des abréviations	IX
Liste des figures	X
Liste des tableaux	XI
<b>Introduction</b>	01
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
1. Généralité	04
1.1. La rhizosphère	04
1.2. La microflore rhizosphérique	04
1.3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)	05
1.3.1 Diversité taxonomique des PGPR	06
1.3.2 <i>Pseudomonas spp.</i> Fluorescents	06
2. Mécanisme d'action des PGPR	07
2.1. Biocontrôle des agents pathogène	07
2.1.1. Compétition pour l'espace et les nutriments:	07
2.1.2 Compétition pour le fer et production de sidérophores:	07
2.1.3. Dénitrification	08
2.1.4 .Antibiose	08
2.1.5 La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)	09
2.2 Phytostimulation	09
2.2.1 Fixation d'azote	09
2.2.2. Solubilisation du Phosphate	09
2.2.3. Production d'hormones de croissance	10
2.2.3.1. - Acide indole acétique (AIA)	11
2.2.3.2 Cytokinines	11
2.2.3.3. Les gibbérellines	12
2.1.4. L'éthylène	13
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>	
1. Les souches bactériennes	15

2. Production de métabolite secondaire	15
2.1 production de sidérophores	16
2.2 Fixation d'azote	16
2.3 Production de l'ammoniac NH <sub>3</sub>	16
2.4 Solubilisation des phosphates	16
2.5 production d'acide indole acétique (AIA)	17
2.5.1 quantification de l'AIA	17
2.5.2 Effet du PH sur la production de l'AIA	18
2.5.3 Extraction des hormones	18
3- Essai de la germination de blé ( <i>triticum durum</i> ) <i>in vitro</i>	18
3-1-Matériel Végétal	19
3.2. Inoculum bactérien	19
3.3. Bactérisation des graines de blé	19
3.4. Les paramètres étudiés	19
3.4.1. Le taux de germination en %	20
3.4.2. Cinétique de germination en %	20
3.4.3. La longueur des racines et la longueur des feuilles	20
3.4.4. Indice de vigueur	20
4. Analyse statistique	20
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b>	
1. PRODUCTION DES METABOLITES SECONDAIRE	21
1.1-Production de sidérophore	21
1.2- Fixation d'azote	22
1.3-La production de l'ammoniac NH <sub>3</sub>	23
1.4- Solubilisation de phosphate	24
1.5- Production d'acide indole acétique (AIA)	26
2- EFFETS DE PSEUDOMONAS SPP FLUORESCENTS SUR LA CROISSANCE VEGETALE	28
2.1 Effet de la bactérisation des graines sur la germination	29
2.1.1 Taux de germination du blé dur (Vitron)	29
2.1.2 la cinétique de germination du blé dur (Vitron)	30
2.1.3 Effet de la bactérisation des graines sur la longueur des racines	30

2.1.4 Effet de la bactérisation des graines sur la longueur t des feuilles	31
2.1.5 Indice de vigueur	32
2.1.6 Discussion	33
<b>Conclusion</b>	35
<b>Référence bibliographique</b>	36
<b>Annexe</b>	42

## Liste des abréviations

---

AIA : Acide indole acétique.

DO : densité optique.

mM: milliMolaire.

PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

rpm: rotation par minute.

# Liste des figures

---

<b>Figure 1.</b> Halo de Solubilisation des phosphates .....	<b>17</b>
<b>Figure 2.</b> résultats de production de sidérophore .....	<b>22</b>
<b>Figure 3.</b> résultat de solubilisation de phosphate .....	<b>25</b>
<b>Figure 4.</b> Résultat de production d'acide indole acétique (AIA) .....	<b>26</b>
<b>Figure 5.</b> l'Effet de pH sur la production de l'AIA par la R02 .....	<b>28</b>
<b>Figure 6.</b> Résultats du taux de germination du blé dur (Vitron).....	<b>29</b>
<b>Figure 7.</b> Résultats de la cinétique de germination du blé dur (Vitron) .....	<b>30</b>
<b>Figure 8.</b> Résultat de l'effet de la bactérisation des graines sur la longueur des racines...	<b>31</b>
<b>Figure 9.</b> Résultat de l'effet de la bactérisation des graines sur la longueur de feuilles.....	<b>32</b>
<b>Figure 10.</b> Résultat de l'indice de vigor.....	<b>33</b>

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1.</b>	Origine des souches de <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents	<b>15</b>
<b>Tableau 2.</b>	Résultats de production de sidérophore par le <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents.	<b>21</b>
<b>Tableau 3.</b>	Résultat de fixation d'azote par les <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents .	<b>23</b>
<b>Tableau 4.</b>	Résultats de production de NH <sub>3</sub> par les <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents.	<b>24</b>
<b>Tableau 5.</b>	Résultat de l'Effet de pH sur la production de l'AIA par les <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents.	<b>27</b>

## Introduction

---

Parmi les milieux naturels, le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement, il est aussi un véritable réservoir de micro-organismes essentiellement de bactéries, en termes de diversité et de densité (Joseph *et al.*, 2012).

Certaines bactéries appelées rhizobactéries ont l'aptitude à coloniser les racines de façon intense. Il s'agit par exemple des espèces de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus* et *Serratia* etc. (Saharan et Nehra, 2011). Elles sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, et elles ont été appelées «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» (PGPR) par Kloepper et Schroth (1978). L'association de ces bactéries avec les racines a des influences importantes sur la santé de la plante, la productivité et la qualité du sol (Konate, 2007).

L'augmentation de rendement d'une culture bactérisée résulte de deux effets bénéfiques principaux : la stimulation de croissance des plantes et la protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique. D'autres effets bénéfiques ont également été décrits. Certaines de ces bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculants pour améliorer directement le développement des racines via la production de certaines phytohormones, telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (El-Hadad *et al.*, 2010). En plus de la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates est également importante (Sharma *et al.*, 2007 ; Weyens *et al.*, 2010). Et indirectement en modifiant la fréquence des infections fongiques de la racine (Kloepper, 1993), par la synthèse de métabolites tels que les antibiotiques, sidérophores, acide cyanhydrique, lipopolysaccharides (Voisard *et al.*, 1989; Van Peer *et al.*, 1991).

L'utilisation de bio-engrais peut accroître la productivité et constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production. Ainsi, Figueiredo *et al.* (2008) ont rapporté l'utilisation de PGPR pour le développement

## Introduction

---

durable de l'environnement et de l'agriculture a considérablement augmenté dans plusieurs régions du monde. (Sahin *et al.*, 2004; Orhan *et al.*, 2006).

L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria)(Kloepper et Beauchamp, 1992; Glick, 1995 ).

Parmi les bactéries d'intérêt agricole (PGPR), les *Pseudomonas* spp. fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants offre un bon rendement même dans des conditions sévères (Ali *et al.*, 2009 ; Bano et Fatima, 2009). Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore ou par la production de sidérophores. Elles peuvent modifier la morphologie et la physiologie racinaire par la production de régulateurs de croissance comme les auxines) (Kloepper *et al.*, 1989; Zahir *et al.*, 2004). Certaines souches de *Pseudomonas* stimulent la germination des graines. D'autres influencent positivement les interactions entre les microorganismes symbiotiques (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, champignons mycorhiziens) et la plante hôte (Rinallo *et al.*, 1999).

Nous avons envisagé par le présent travail de mettre en évidence l'effet bénéfique de certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents originaire de la rhizosphère de certain plantes spontanés des régions aride et semi-aride de la wilaya de Laghouat (Algérie) sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* Desf.).

Sachant que Le blé, le riz et le maïs sont les céréales les plus importantes dans le monde. Le blé dur est la première céréale cultivée en Algérie, elle occupe environ deux millions d'hectares. Le blé fournit plus de calories et de protéines dans le régime alimentaire que n'importe quelle autre céréale (Susana *et al.*, 2008).

Cependant, la production nationale ne répond pas au besoin de la population étant donné le faible rendement ce qui classe l'Algérie comme l'un des plus importants pays importateurs des céréales. Selon les données officielles La production de blé en Algérie pour la campagne 2016/2017 a été de l'ordre de 32 millions quintaux. Malgré que les derniers chiffres pour la campagne 2017/2018, soient de l'ordre de 60 millions de quintaux, la demande annuelle dépasse largement les 80

## Introduction

---

millions de quintaux, soit 200Kg/habitant/an. Ceci est dû essentiellement à la dégradation du sol et à la sécheresse qui représentent des menaces pour la production agricole. En plus, la culture du blé nécessite des apports importants en engrais azotés, ce qui favorise la contamination des nappes souterraines.

La plupart des travaux de recherche, telle que les travaux de Bouzerzour et *al.* (1999) ; Mekhlouf et *al.* (2006) et Benmahammed et *al.* (2010), effectués sur le blé dur ont eu durant de nombreuses années pour objectif principal l'augmentation de la production, une approche basée essentiellement sur les performances agronomiques. Ces dernières années, un intérêt plus croissant a été porté sur les études qui concernent l'amélioration génétique de la tolérance au stress hydrique dans les programmes d'amélioration du blé (Bahlouli et *al.*, 2005 ; Bendjama et *al.*, 2014 ; Oulmi et *al.*, 2016 ; Fellahi et *al.*, 2017).

L'utilisation des PGPR comme une approche biologique semble être une solution prometteuse afin d'améliorer la production de blé dur (*Triticum durum*) en Algérie. Ce qui contribue à l'amélioration de la croissance des plantes et à la réduction de l'application des engrais chimiques à la fois coûteux et polluants (Joseph et *al.*, 2012 ; Behera et *al.*, 2013) .

Notre objectif est de mettre en évidence *in vitro* la production de quelques-uns des métabolites secondaires : la production des sidérophores, et la production de NH<sub>3</sub>, la fixation d'Azote, la solubilisation de phosphate, ainsi que la production des phytohormones (Auxine) chez un ensemble des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de la région de Laghouat. En plus, nous avons réalisé un essai préliminaire pour étudier l'effet bénéfique de deux souches sur la germination des grains de blé dur, touchant ainsi le premier maillon dans le système de production.

### **I. Généralité**

#### **I.1. La rhizosphère**

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "*rhizo*" ou "*rhiza*" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou d'influence. Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «l'effet rhizosphère» (Lemanceau, 1992; Whipps, 2001; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

#### **I.2. La microflore rhizosphérique**

La composition de la microflore rhizosphérique est contrôlée par le génome de la plante. La démonstration a été apportée par les travaux de Neal en 1973 sur les blés de printemps. Dans la rhizosphère, la quantité de microorganismes est au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^9$  par gramme de sol (Davet, 1996). La densité des champignons est estimée à  $10^6$  par gramme de sol. Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^3$  par gramme de sol.

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol (Paul et Clark, 1996). Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne  $6 \cdot 10^8$  cellules par gramme de sol et un poids de 10000 kg/ha équivalant à 5% du poids sec des composés organiques du sol. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches

très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). L'abondance des bactéries dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et d'éléments nutritifs (Glick, 1995).

L'effet visible des associations plante-microbe sur la croissance de plantes peut être positif, neutre, ou négatif. Certaines bactéries inhibent la croissance alors que d'autres la stimulent. Au cours des dernières décennies, un nombre très important de bactéries ont montré une capacité d'améliorer la croissance de la plante (Kloepper, 1992 ; Glick, 1995). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) Kloepper *et al.*, 1989; Zahir *et al.*, 2004).

## II. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme: sucres, acides aminés, acides organiques, hormones... Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes, incluant des espèces de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus* et *Serratia* ont montré une capacité d'améliorer la croissance de la plante (Kloepper et Beauchamp, 1992; Glick, 1995). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. (Haas et Defago 2005). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler en laboratoire.

### II.1 Diversité taxonomique des PGPR

Au cours des dernières années, le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative, principalement puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des PGPR ont été suffisamment étudiés. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants: Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002). De nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers (Kloepper, 1992).

### II.2 *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes appartiennent aux Proteobacteries possèdent tous une cytochrome oxydase c (Lelliot *et al.*, 1966 ; Bossis *et al.*, 2000). Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Toutefois, certaines sont chimio organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier. Elles peuvent utiliser des sources de carbones variables, et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (Stanier *et al.*, 1966 ; Bossis *et al.*, 2000 ; Ramalho *et al.*, 2002). Certaines peuvent causer des infections chez l'homme. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi *et al.*, 2001).

### **III. Mécanisme d'action des PGPR**

#### **III.1. Biocontrôle des agents pathogènes**

Les modes d'action des agents microbiens dans le biocontrôle ne sont pas toujours bien connus et peuvent varier pour un micro-organisme donné, en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles.

##### **III.1.1. Compétition pour l'espace et les nutriments**

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.* 1997; Reyes *et al.* 2004). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale.

On a beaucoup discuté l'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre *et al.* 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren *et al.* 2001; Gupta 2003; Grover 2004).

##### **III.1.2 Compétition pour le fer et production de sidérophores**

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des siderophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe<sup>3+</sup> (Duffy et Défago 1999). En

s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Sachant que un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température et la source de carbone) influence la production des sidérophores (Duffy et Défago 1999; Valdebenito *et al.* 2006).

### III.1.3. Dénitrification

La dénitrification est un processus microbien dans lequel les oxydes d'azote sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons, pour la production d'énergie en absence d'oxygène. La dénitrification est composée de quatre réactions par lesquelles les nitrates sont réduits en di nitrogène (N<sub>2</sub>), par des métallo-enzymes comme le nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont les dénitrifiants les plus communs des sols des régions tempérées (Gamble *et al.*, 1977). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont capable de s'adapter aux manque d'oxygène par l'utilisation des oxydes d'azote comme accepteurs alternatifs d'électrons (Stewart, 1988). La respiration sur nitrate et la réduction des nitrites sont impliquées dans la compétition des souches modèles de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol (Philippot *et al.*, 1995; Ghiglione, 2000).

### III.1.4 .Antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliquées dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza *et al.*, 2003 ; Haas *et Defago* 2005).

### III.1.5 La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

Cette résistance est stimulée par certaines rhizobactéries non-pathogènes (PGPR). Les rhizobactéries sont capables de réduire une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante (Van Loon et al. 1998). L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : Le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induisant l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy et al. 2001; Bent., 2005). La preuve du rôle d'une souche de PGPR en tant qu'inducteur de l'ISR dans la réduction d'une maladie est donc obtenue en garantissant une séparation spatiale de l'agent pathogène et de l'agent inducteur de la résistance, afin d'exclure toute interaction antagoniste directe. C'est le cas si l'on inocule les bactéries sur les racines et le pathogène sur la surface foliaire de la plante ou en utilisant des systèmes séparant les racines en deux groupements (Van Peer et al. 1991; Zhou et Paulitz 1994; Bakker et al. 2007).

### III.2 Phytostimulation

#### III.2.1 Fixation d'azote

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N<sub>2</sub>) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyens et al., 2010). Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres dans la rhizosphère (*Achromobacter*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*) (Tilak et al., 2005).

#### III.2.2. Solubilisation du Phosphate

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de

source biologiquement disponible (Ezawa *et al.*, 2002). Même dans les sols riches la plupart du phosphore n'est pas disponible pour les plantes, une grande quantité se trouve sous forme insoluble. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). Les micro-organismes permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités (Kucey *et al.*, 1989; Pradhan et Sukla, 2005). La capacité de quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture (Sharma *et al.*, 2007).

Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases (Kumar et Narula 1999; Whitelaw, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Parmi les communautés bactériennes du sol capable de solubiliser le phosphate les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas spp.* (Subbarao, 1988 ; Kucey *et al.*, 1989). *Pseudomonas chlororaphis*, *P. putida* (Cattelan *et al.*, 1999).

### **III.2.3. Production d'hormones de croissance**

Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaires, la différenciation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones. De nombreuses phytohormones sont produites par les PGPR. Bien que le rôle de la biosynthèse de ces phytohormones par ces micro-organismes ne soit pas entièrement expliquée, il est à noter que les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormones telles les

auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden 1995 ; Glick, 1995; Lucy *et al.*, 2004).

### III. 2.3.1. Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008). Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère (Narula *et al.*, 2006). Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Une grande proportion (80%) de bactéries colonisant la rhizosphère le synthétise (Loper et Schroth, 1986).

L'AIA est généralement produit sous forme de métabolite secondaire par les PGPR en utilisant les substrats riches exsudés par les racines des plantes. L'AIA et ses analogues actifs dans la plupart des plantes sont synthétisés à partir du tryptophane principal précurseur. Les exsudats des racines sont la source principale du tryptophane dans le sol (Spaenpen *et al.*, 2007).

### III.2.3.2 Cytokinines

Les cytokinines sont des aminopurines N6-substituées qui jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Salisbury et Ross,

1992). En outre, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansine, protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes en facilitant l'expansion de la cellule végétale et provoquant sa turgescence, ceci a un impact à la fois sur la taille et la forme des cellules (Downes et *al.*, 2001).

Le gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse des cytokinines a été initialement caractérisé chez *Agrobacterium tumefaciens* (Nester et *al.*, 1984). Depuis, de nombreuses PGPR y compris *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. sont productrices de cette hormone (Nieto et Frankenberger 1989; Timmusk et *al.*, 1999).

L'inoculation de graines avec des bactéries productrices de cytokinines conduit généralement à augmenter le contenu en cytokinines chez les plantes influençant ainsi simultanément la croissance et le développement des plantes (Arkhipova et *al.*, 2005).

### III.2.3.3. Les gibbérellines

Les gibbérellines sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries ; ce sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques. Un nombre important (136) de gibbérellines différentes est identifié et caractérisé .Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (MacMillan, 2002).

Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini et *al.*, 2004). La capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérellines a été initialement décrite chez *A. brasilense* (Tien et *al.*, 1979) et *Rhizobium* (Williams et De Mallorca, 1982 ) puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*,

*Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Mitter et al., 2002; Tsakelova et al., 2006; Joo et al., 2009). La promotion de la croissance des plantes par les PGPR productrices de gibbérellines est rapportée par plusieurs travaux et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux (Atzhorn et al., 1988; Gutierrez-Manero et al., 2001; Joo et al., 2009).

### III.2.3.4. l'éthylène

L'éthylène gazeux est la seule phytohormone gazeux produit de manière endogène par les plantes a plusieurs effets sur leur développement et agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante (Ecker, 1995). L'éthylène est impliqué dans beaucoup de processus physiologiques, comme la germination de la graine, la différenciation de tissus, la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons, le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la senescence d'organe, la maturation de fruit et l'abscission de la feuille et du fruit (Frankenberger et Arshad, 1995).

Il est connu pour être l'hormone des blessures, parceque sa production dans la plante peut être induite par n'importe quel perturbation physique ou chimique des tissus (Salisbury, 1994). Parmi ses nombreux effets sur la croissance et le développement de la plante, la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines. Glick et al. (1998) ont emit, une théorie selon laquelle le mode d'action de certains PGPR serait par l'intermédiaire d'une AAC-désaminase. Cette enzyme clive l'AAC précurseur immédiat de l'éthylène. L'AAC-désaminase diminuerait la production d'éthylène au niveau des racines de la plante hôte et résulterait en leurs allongements.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs d'AAC-désaminase (Glick et al., 1994). La transformation des *Pseudomonas* spp. par des gènes codant cette enzyme, permet à celles-ci de croitre sur un milieu dont la seule source de carbone et d'azote est le AAC, et de stimuler

l'élongation des racine (Shah *et al.*, 1998). Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations (Grichko et Glick, 2001), ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Burd *et al.*, 1998; Belimov *et al.*, 2001).

Ce travail est divisé en deux parties principales, la première est la mise en évidence la production de métabolites secondaires de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de la région de Laghouat et la deuxième comporte l'effet bénéfique de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la germination des grains de blé dur (*Triticum durum*) *in vitro*.

### 1. Les souches bactériennes

La recherche de la production de métabolites secondaires a été testée sur les 8 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (tableau1). Ces souches ont été isolées et identifiées à l'université Amar TELIDJI-Laghouat à partir de la rhizosphère de certain plantes spontanées (Wilaya de Laghouat).

**Tableau 01:** Origine des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

isoltas	Origine rhizosphérique	Origine	Année d'isolement
P12	<i>Ziziphus lotus</i>	El Assafia	2014
AZ4	<i>Pistacia atlantica</i>	El Ahouita	2015
R02	<i>Retama raetam</i>	Kasser El hiran	2016
R05	<i>Retama raetam</i>	Kasser El hiran	2016
P429	<i>Pistacia atlantica</i>	El Ahouita	2015
P430	<i>Pistacia atlantica</i>	El Ahouita	2015
P437	<i>Pistacia atlanica</i>	El Ahouita	2015
P438	<i>Pistacia atlanica</i>	El Ahouita	2015

Auteur, 2018

### 2. Production de métabolite secondaire

Un dépistage des activités *Pseudomonas* spp. fluorescents de l'ensemble des souches dans le but de sélectionner les souches les plus performantes est effectué :

### 2-1 Production de sidérophores

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents se distinguent des autres bactéries par le pigment vert jaune qu'elles produisent (Stanier et *al.*, 1966).

Le milieu King B liquide (annexe 1), étant donné sa composition exempte de fer, est préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores, pour cela nous avons préparé deux milieu de King B liquide, le premier est additionnée au 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  et le deuxième sans  $\text{FeCl}_3$ . Les milieux sont ensemencés par 100  $\mu\text{l}$  des cultures bactériennes âgées de 24 h et incubés à 28°C pendant 4jours sous agitation 150 rpm. Le développement d'une coloration vert jaune indique la production de sidérophore.

### 2-2 Fixation d'azote

La fixation d'azote est testée sur milieu winogradsky (annexe 1) solide exempt d'azote. Le milieu WS au sel est ensemencé par stries à partir des cultures bactériennes et incubé à 28°C pendant 48h. Toute croissance sur ce milieu traduit la capacité des bactéries à fixer l'azote.

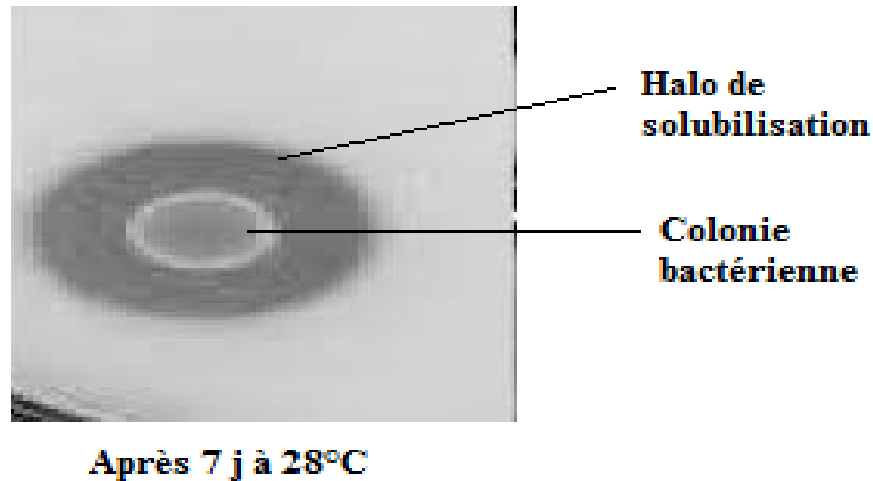
### 2-3 Production de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ )

La production de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) est testée sur eau peptonée. Elle est inoculée avec 100  $\mu\text{l}$  de la culture bactérienne (Cappuccino et Sherman, 1992) incubée à 28°C/48h. L'addition de 0.5 ml du réactif de Nessler donnant une couleur jaune à marron indique la production de l'ammoniac  $\text{NH}_3$ .

### 2-4 Solubilisation des phosphates

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate a été testée sur un milieu NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) (Annexe 1) contenant 0,5% de phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) comme source de phosphate insoluble selon la méthode décrite par Nautiyal (1999). Un volume de 10  $\mu\text{l}$  de suspensions bactériennes issues de précultures fraîches, a été

déposé à la surface du milieu NBRIP .Après incubation à 28°C pendant 7 jours, le diamètre de la colonie et du halo qui l'entoure ont été mesurés, le diamètre de la zone transparente autour de la colonie (diamètre total moins le diamètre de la colonie), c'est le diamètre du halo de la solubilisation (Fig.1).



Hassimi et *al.*, 2017

**Fig 1. Halo de Solubilisation des phosphates**

## **2-5 Production d'acide indole acétique (AIA)**

Parmi les régulateurs de croissance produits par les bactéries, nous avons étudié la production d'une auxine, l'acide indole acétique (AIA), ainsi que l'influence de pH sur cette production.

### **2-5-1 Détection et quantification de l'AIA**

La production d'AIA dans la culture liquide a été déterminée par la technique colorimétrique. En effet, des erlenmeyers de 250 ml contenant le milieu King B liquide additionné de tryptophane 0.2g/l, ont été inoculés avec 100µl de la culture bactérienne testé. Ensuite les erlenmeyers ont été incubés pendant 96 h à 28 °C sous agitation 150 rpm. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 4500 rpm pendant 20 min. 1ml du surnageant est mélangé à 2ml du réactif de Salkowski (1 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5 M dans 50 ml de 35% de l'acide perchlorique). Le développement d'une coloration rose-rouge indique la

production de l'acide indole acétique. L'absorbance a été mesurée à 530nm après 30 min à l'obscurité. La quantité de l'AIA est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage établi à partir d'AIA standard en µg/ml (Leveau et *al.*, 2005).

### **2-5-2 Effet du pH sur la production de l'AIA**

Pour évaluer la capacité des souches de *Pseudomonas* à produire l'AIA à différents pH. Nous avons choisi les souches (AZ4, P12, P437, et R02) en se basant sur les résultats du test de l'AIA, ce test a été réalisé en suivant les mêmes opérations précédentes (cf.1.5.1), avec une gamme de pH de 5, 6, 7, 9, et 12.

### **2-5-3 Extraction de l'AIA**

Dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu KB liquide et additionné de 0.2g/l de tryptophane, nous avons ajouté un volume de 100 µl d'une culture bactérienne jeune. En suite la culture bactérienne a été incubée à 28°C pendant 4 jours sous agitation permanente à 150 rpm. Après séparation des cellules par centrifugation (4500 /20 min). Au surnageant a été ajouté l'acétate d'éthyle (v/v), à l'aide d'une ampoule à décanter, la phase organique a été récupéré, puis évaporé au rota vapeur à 40°C. L'extrait sec a été récupéré dans 0.6 ml de méthanol puis conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation ultérieure. (Thomashow et Weller, 1988).

## **3 -Essai de la germination de blé (*Triticum durum*) *in vitro***

Les réponses de PGPR aux différents tests inhérents à la promotion de la croissance végétale permettent la mise en évidence des potentialités naturelles de *Pseudomonas* spp flueorescents. S'agissant dans cette partie de déterminer les propriétés ayant des effets bénéfiques directs sur la germination de blé *in vitro*.

### 3.1. Matériel Végétal

Nous avons utilisé dans cet essai la variété vitron de blé dur (*Triticum durum*), récolté à El-assafia (Laghouat) en 2017.

### 3.2. Inoculum bactérien :

Nous avons choisi pour cet essai les deux souches : AZ4 et P12 en se basant sur leur production de métabolites secondaires. À partir des cultures bactériennes jeunes âgées de 24h, nous avons préparé des inoculums bactériens à une concentration d'environ  $10^6$  UFC/ml, à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique (DO) de 600nm.

### 3.3. Bactérisation des graines de blé

La désinfection des grains a été réalisée dans une solution  $HgCl_2$  0,1% elles y sont immergées pendant 1 min afin d'éliminer toute trace de contamination superficielle préexistante ; puis rincées 5 fois dans l'eau distillée stérile durant 30 min (Simon et *al.*, 1996 ) , après séchage sur papier filtre stérile ; les grains désinfectés ont été transférés dans la suspension bactérienne , les témoins mis dans l'eau distillée stérile . Après 24h les grains sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre stérile à raison de 20 grains par boîte avec un totale de 10 boîtes par traitement, en suite le papier a été imbibé avec l'eau distillée stérile et incubé à la température ambiante.

### 3.4. Les paramètres étudiés

Nous avons réalisé ce test pour déterminer l'effet des souches rhizobactériennes sur le taux de germination des graines, sur la longueur des radicules et les feuilles des grains germées. L'évaluation de la germination des graines a été effectuée sur des paramètres suivants:

### 3.4.1. Le taux de germination en %

Le taux de germination est calculé sur la base du nombre de graines germes par rapport au nombre total de graines testées selon l'équation suivante:

$$\text{Le taux de germination (\%)} = (\text{Nombre de graines germer} / \text{nombre total de graines testées}) \times 100$$

### 3.4.2. Cinétique de germination en %

Après le premier jour, nous avons réalisé des observations visuelles des graines germés, puis nous avons procédé à la notation des graines germé quotidiennement, jusqu'à le septième jour. L'évaluation de la germination a été effectuée selon l'équation précédente (cf. III- 4-1).

### 3.4.3. La longueur des racines et la longueur des feuilles

À l'aide d'une règle, nous avons mesuré la longueur des racines et la longueur des feuilles en (cm) après le sixième jour.

### 3.4.4. Indice de vigueur

L'indice de vigueur est calculé sur la base de la longueur des racines et des feuilles et le taux de germination selon l'équation suivante:

$$\text{Indice de vigueur} = (\text{Longueur de racine} + \text{longueur de feuilles}) \times \text{taux de germination}$$

## 4. Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée en considérant l'essai aléatoire, à l'aide du logiciel StatBox végétale version 6.9. La comparaison des moyennes a été effectuée par le test de Newman-Keuls ( $\alpha=5\%$ ).

## 1- PRODUCTION DES METABOLITES SECONDAIRE

### 1-1-Production de sidérophores

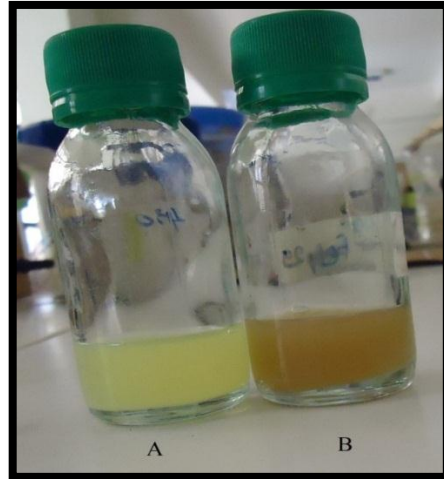
Le milieu King B liquide, étant donné sa composition exempte de fer, est préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores. Après 72 heures d'incubation, la totalité des souches ont synthétisé les sidérophores en milieu King B liquide dans le cas de l'absence de FeCl<sub>3</sub> par l'apparition d'un pigment fluorescent (fig. 3). Mais dans le cas de la présence de FeCl<sub>3</sub> à une concentration de 100 µM les souches n'ont pas synthétisé les sidérophores. Donc nous pouvons conclure que les *Pseudomonas* synthétisent les sidérophores dans le cas de carence en fer. De plus, elle tient la deuxième partie de son nom (fluorescens) du fait qu'elle est fluorescente. Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé fluorescéine. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 2.** Résultats de la production de sidérophores par le *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Souches	Milieu KB	Milieu KB+FeCl <sub>3</sub>
AZ4	+	-
P12	++	-
R02	++	-
R05	++	-
P429	++	-
P430	+	-
P437	++	-
P438	++	-

Auteur, 2018

(++) Production importante (+) Production faible (-) Aucun production



Auteur, 2018

**Fig 2.** Résultats de production de sidérophore

**A:** Production de sidérophore

**B:** Pas de production de sidérophore

Les sidérophores produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents dans des conditions de carence en fer sont de différents types ; les pyoverdines (aussi appelées pseudobactines) synthétisés par les *Pseudomonas* spp. fluorescents et les pyochélines sont des sidérophores synthétisés par les *Pseudomonas aeruginosa* (Bakker *et al.*, 2007 ; Meziane *et al.*, 2005). Par exemple, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena *et al.*, 2002).

### 1-2- Fixation d'azote

La fixation d'azote est testée sur milieu WS solide exempt d'azote. après quatre jours d'incubation, la majorité des souches ont montré une capacité fixatrice d'azote avec une fixation importante par les isolats; AZ4, P429, P430, P437, et P438 cela a été révélé par une croissance abondante, et la souche R05 avec une fixation moyenne, et la souche R02 avec une fixation faible, et nous n'avons pas observé de

croissance bactériennes chez la souche P12 ; les résultats sont représentés dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Résultat de fixation d'azote par les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Souches	Fixation d'azote
AZ4	+++
P12	-
R05	++
R02	+
P429	+++
P430	+++
P437	+++
P438	+++

Auteur, 2018

(+++) Fixation important      (++) Fixation moyenne  
 (+) Fixation faible            (-) Absence de fixation

L'azote (N) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes. Bien qu'il y ait environ 78% de N<sub>2</sub> dans l'atmosphère, il est indisponible pour les plantes en croissance. Le N<sub>2</sub> atmosphérique est converti en formes utilisables par la plante par la fixation biologique de N<sub>2</sub> par les bactéries en utilisant un système enzymatique complexe appelé nitrogénase (Kim et Rees, 1994). Les bactéries fixatrices de l'azote ont la capacité de récupérer l'azote atmosphérique et de le fournir aux plantes par deux mécanismes: symbiotiques et non symbiotiques. (Munees et Mulugeta, 2014).

### 1-3 La production de l'ammoniac

Après 4 jours d'incubation, sur les huit isolats bactérienne testées, six isolats ; AZ4, P12, R02, R05, P429, et P438, ont développé une couleur jaune-marron après addition du réactif de Nessler indiquant une production intense de NH<sub>3</sub>, à l'exception des isolats P437 et P403 ou le milieu de culture n'a subi aucun changement de couleur ce qui signifie que les deux souches sont incapable de produire la NH<sub>3</sub>. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.** Résultats de production de l'ammoniac par les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Souches	production de NH <sub>3</sub>
AZ4	++
P12	++
R02	++
R05	++
P429	++
P437	-
P430	-
P438	++

Auteur, 2018

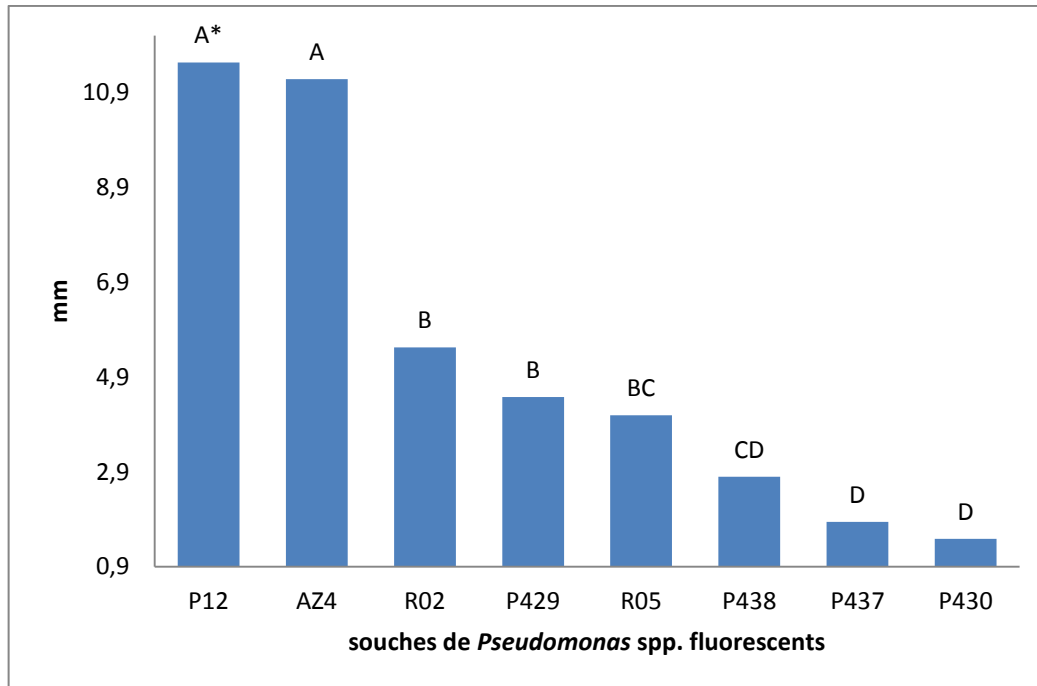
(+) capable de produire de l'NH<sub>3</sub> (-) incapable produire de l'NH<sub>3</sub>

La production d'ammoniac est considéré comme un élément important des rhizobactéries en améliorant indirectement la croissance des plantes (Joseph *et al.*, 2007) et en assurant un rôle dans la signalisation lors de l'interaction plante-rhizobactéries (Becker *et al.*, 2002). Il est bien établi que l'ammoniac libéré par les bactéries accélère l'activité de la glutamine synthétase (Sood *et al.*, 2002).

Ainsi, les bactéries convertissent l'azote moléculaire en azote minéral (NH<sub>3</sub>) directement assimilables par les plantes, qui en retour fournissent l'énergie et les hydrates de carbone. Ce qui contribue à l'amélioration de la croissance des plantes et à la réduction de l'application des engrais chimiques à la fois couteux et polluants.

### 1-4 Solubilisation de phosphate

L'ensemble des huit souches testés ont été capables de solubiliser le phosphate inorganique sur le milieu NBRIP solide. Cette solubilisation a été traduite par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne. La variation du diamètre de ce halo montre qu'il y a une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphate entre les différentes souches testées.



**Fig 3:** Résultat de solubilisation de phosphate

(\*) les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newman-keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

Les résultats de la figure 4 montrent que, Parmi les huit isolats, deux ont révélé une activité solubilisatrice, très efficaces avec une moyenne de 11.53mm pour la bactérie R02 et 11.18mm pour la bactérie R05, alors que la plus faible efficacité solubilisatrice a été observée chez la souche P430 avec une moyenne de 1.49mm.

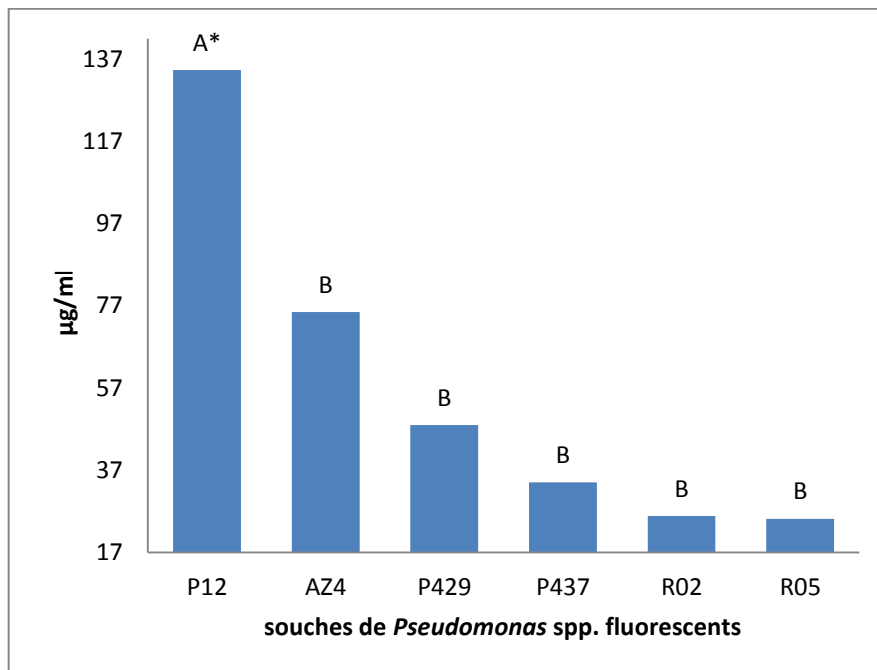
En effet, l'absence du phosphate soluble ou sa faible quantité chez certaines souches seraient expliquées par leur déficience enzymatique (Chaiharm et Lymyong, 2009). Les acides gluconiques et 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduisent à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique

Ce résultat pourrait être attribué à divers facteurs qui peuvent influencer la solubilisation des phosphates. D'une part, en milieu solide, les acides organiques responsables de l'acidification et la solubilisation des phosphates circulent difficilement. (Nautiyal, 1999).

### 1-5 Production d'acide indole acétique (AIA)

La production de l'AIA par les différentes souches étudiées a été testée sur un milieu liquide additionné de tryptophane (Khalid *et al.*, 2004).

Après addition du réactif de Salkowski, les six souches (AZ4, P12, R02, P437, P429, et R05) ont développé une couleur varie entre le rose clair et le rose foncé indiquant une production de l'acide indole acétique.



**Fig. 4:** Résultat de production d'acide indole acétique (AIA) en µg/ml

(\*) les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newman-keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

D'après les résultats de la figure 5, Parmi six isolats, la bactérie P12 présente une production important, par rapport aux autres, et avec une moyenne de 130 µg/l, tandis qu'elle est faible chez les isolats; AZ4, P429, P437, R02, R05; respectivement.

La synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est la plus efficace, est une faculté très commune chez les bactéries. Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats

racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2010)

La capacité de biosynthèse de l'auxine peut être utilisée comme un outil pour le dépistage des souches PGPR efficaces (Khalid *et al.*, 2004). En particulier, la production de l'AIA semble être une propriété de la promotion de la croissance de la plante la plus répandue parmi les PGPR

Pour l'effet de pH sur la production de l'AIA, nous avons mis en culture les souches (AZ4, P12, P437 et R02) dans des milieux à différents pH (5, 6, 7, 9, 12).

D'après, l'analyse statistique de la variance obtenu (tableau 4), montrent que le pH 6 est le pH optimal pour la production de l'AIA; et le pH=9 et 12 montrent une production très faible de la production de l'AIA.

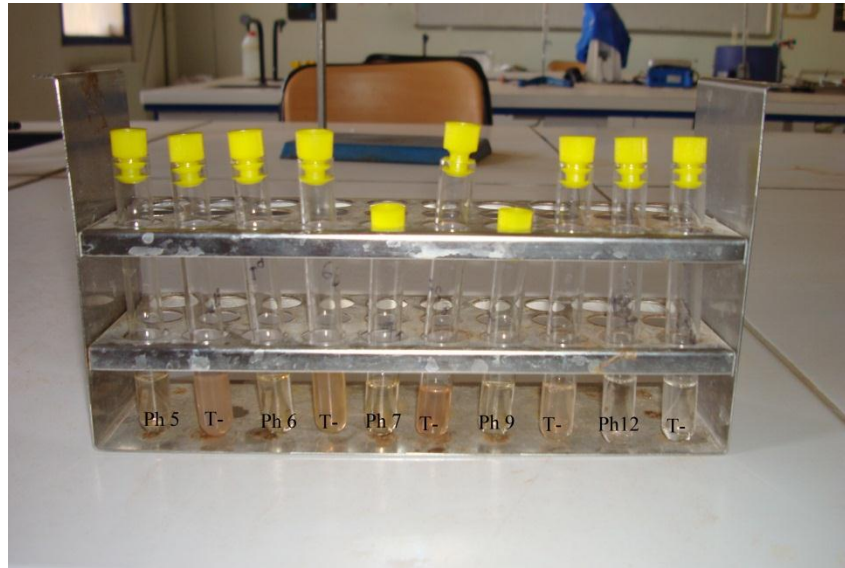
La souche R02 a donné l'effet le plus élevée dans le pH = 6 est classé dans le groupe homogène(A) avec une valeur de 214,55 µg/ml (fig. 6).

**Tableau 4.** Effet de pH sur la production de l'AIA

Souches	pH				
	pH=5	pH=6	pH=7	pH=9	pH=12
P12	132,20 abc*	189,05 ab	128,60 abc	50,45 c	10,25 c
AZ4	67,00 c	115,20 bc	76,35 c	22,10 c	8,45 c
P437	23,85 c	63,90 c	77,00 c	30,90 c	9,35 c
R02	33,15 c	214,55 a	40,45 c	24,85 c	9,35 c

Auteur, 2018 (\*)

les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newman-Keuls ( $\alpha = 5\%$ ).



Auteur, 2018

**Fig.5.** l'Effet de pH sur la production de l'AIA par la R02

Selon (Mirza et al., 2001), la production d' IAA par des micro-organismes peut varier au sein d'une même espèce, plusieurs facteurs peuvent influencer la production de l'IAA ,le pH du milieu peut modifier la biosynthèse de l' AIA.

## **2- EFFETS DE *PSEUDOMONAS SPP* FLUORESCENTS SUR LA CROISSANCE VEGETALE**

Dans cette partie, nous avons évalué l'influence de deux souches bactériennes appartenant aux espèces *Pseudomonas fluorescens* sur les paramètres de croissance, en l'occurrence, la longueur de la racicule, la longueur des glumelles et le taux de germination.

Elles peuvent affecter la croissance et le rendement d'une large gamme de cultures telles que les céréales ou les légumes. Les traitements avec les PGPR augmentent le pourcentage de germination, la vigueur des plantules, l'émergence, le développement des racines et des tiges, la biomasse totale des plantes, le poids des semences, la floraison précoce et les rendements de fruits et des graines (Van Loon *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

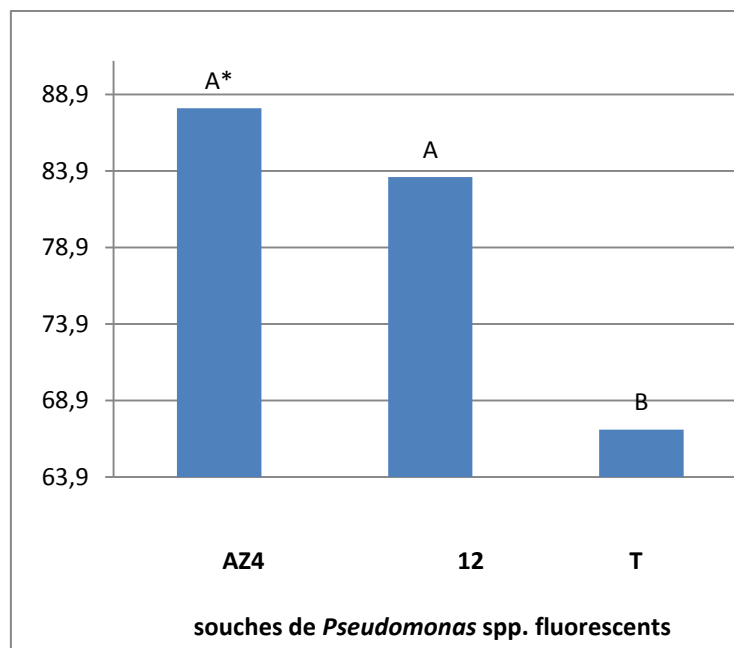
### 2.1 Effet de la bactérisation des graines sur la germination du blé dur (Vitron)

Les *Pseudomonas* fluorescents sont en mesure d'exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes telles que l'augmentation du taux de germination des grains.

Les PGPR pourraient favoriser l'absorption des nutriments, réduire ainsi la nécessité de l'apport d'engrais et prévenir l'accumulation de nitrates et de phosphates dans les sols agricoles (Yang *et al.*, 2009).

#### 2-1-1 Taux de germination (%)

D'après les résultats de l'analyse de variance ont révélé une augmentation hautement significative ( $p < 0,000$ ) par rapport au témoin avec des taux de germination entre 63.9 et 88.9% respectivement par les deux souches AZ4 et P12 (fig.6)..



**Fig.6.** Résultats du taux de germination du blé dur (Vitron)

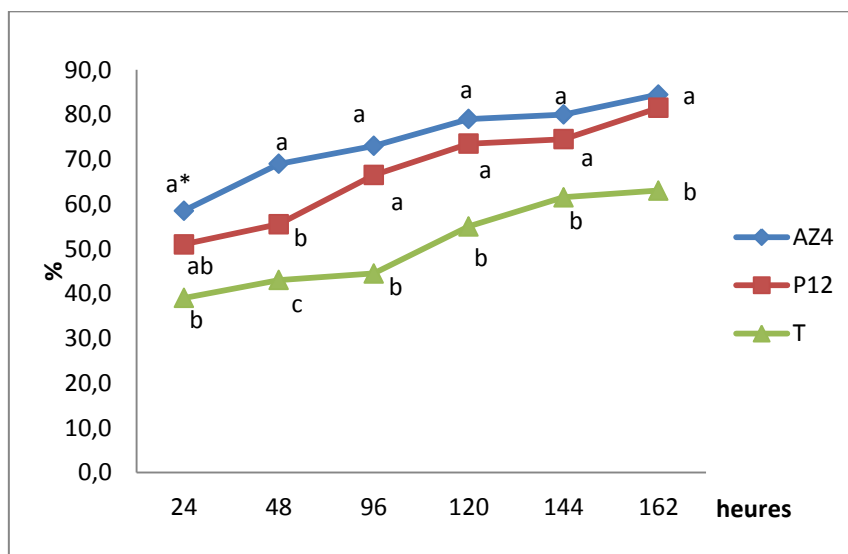
P12, AZ4 : souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents  
T : témoin non bacterisé

(\*) les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newman-keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

### 2-1-2- la cinétique de germination

D'après les résultats de l'analyse de la variance obtenus nous notons que les graines du blé inoculés avec la souche bactérienne *P. spp.* fluorescents AZ4 et P12 ont montré avec une augmentation hautement significative ( $p < 0,000$ ) avec des taux de germination entre 63.9 et 88.9% respectivement par rapport au témoin.

Dans notre essai, nous constatons que les deux souches (AZ4) et (P12) influe de la même façon sur la germination des graine du blé dans les six jours de l'expérience (fig.7).



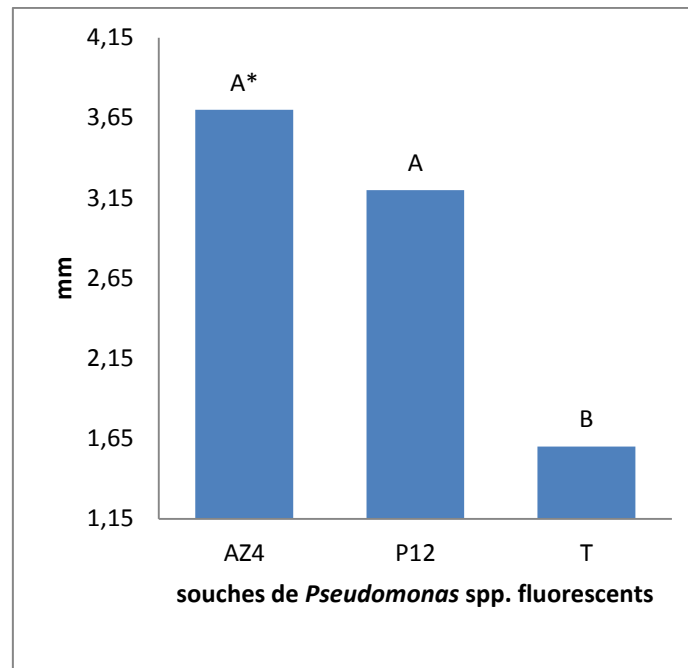
**Fig. 7.** Résultats de la cinétique de germination du blé dur (Vitron)

P12, AZ4 : souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents  
T : témoin non bactérié

(\*) les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newmen-keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

### 2-1-3- Effet de la bactérisation des graines sur la longueur des racicules

D'après les résultats de l'analyse de la variance obtenus nous remarquons que les deux souches bactériennes AZ4 et 12 ont stimulé significativement ( $p < 0,000$ ) la croissance en longueur de radicule pour atteindre à sept jours, des taux respectifs supérieurs au témoin avec longueur moyenne de 1.6 mm où il a été classé dans le groupe homogènes b et de 3.65mm et 3.15mm est classe dans le groupe a (fig.8).



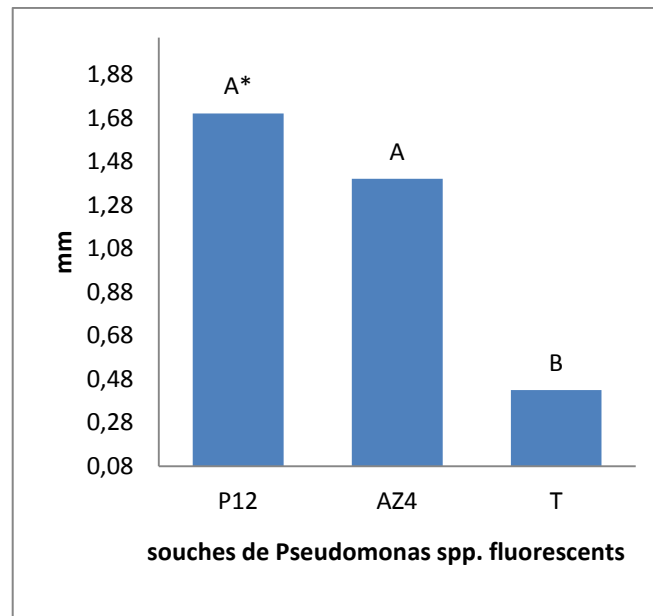
**Fig.8.** Résultat de l'effet de la bactérisation des graines sur la longueur des radicules

P12, AZ4 : souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents  
T : témoin non bacterisé

(\*) les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newman-keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

### 2-1-4- Effet de la bactérisation des graines sur la longueur des feuilles

D'après les résultats de l'analyse de la variance obtenus nous notons que les deux souches bactériennes AZ4 et 12 ont stimulé significativement ( $p < 0,000$ ) la croissance en longueur de glumelles pour atteindre à sept jours, des taux respectifs supérieurs au témoin avec longueur moyenne de 0,48 mm ou il a été classé dans le groupe homogène b et de 1.7mm et 1.46mm est classe dans le groupe a(fig.9).



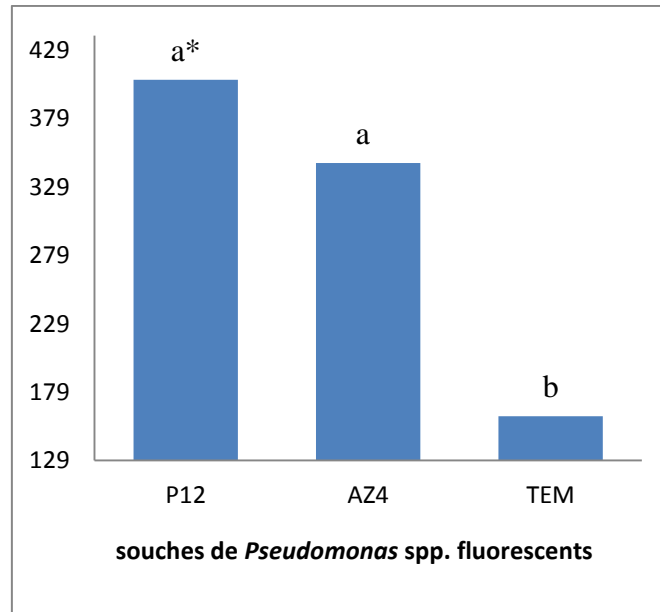
**Fig. 9.** Résultat de l'effet de la bactérisation des graines sur la longueur des feuilles

P12, AZ4 : souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents  
T : témoin non bacterisé

(\*) les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newman-keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

### 2-1-5 Indice de vigueur

D'après les résultats de l'analyse de la variance obtenus nous enregistrons que les deux souches bactériennes AZ4 et 12 ont stimulé significativement ( $p < 0,000$ ) la croissance en longueur de radicule et glumelle pour atteindre à sept jours, des taux respectifs supérieurs au témoin avec une moyenne de 150 ou il a été classer dans le groupe homogène b, et les souches P12 et AZ4 de moyenne (397 , 340) sont classe dans le groupe a(fig.10)..



**Fig. 10.** Résultat de l'indice de vigueur

P12, AZ4 : souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents  
TEM : témoin non bacterisé

(\*) les valeurs suivies de la même lettre appartient aux même groupe homogène ; selon test de Newman-keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

### Discussion

Dans cette partie nous avons discuté les résultats de la stimulation de la germination ensemble.

D'après l'analyse de la variance de test de germination *in vitro*, nous avons enregistré des résultats significatifs pour tous les facteurs étudiés. Cela signifie que les deux souches (AZ4 et P12) sont capables de sécréter une phytohormone qui stimule légèrement la germination des graines. Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents sont des producteurs d'AAC-désaminase (glick *et al.*, 1994) d'AAC-désaminase est une phytohormone capable de lever la dormance des graine.

D'après l'analyse de la variance, nous avons noté que la souche AZ4 donnée un effet significatif remarqué dans le paramètre de la longueur des racicules. Cela signifie que les bactéries sécrètent des substances qui ont un effet positif sur la longueur des racicules. Et nous avons remarqué que la souche P12 a donné un effet significatif remarquable sur le paramètre de la longueur des glumelles. Cela signifie

que les bactéries sécrètent des substances affectant aussi positivement la longueur des glumelles.

L'augmentation et la qualité de la production agricole sont indispensables. Les applications des PGPR sont les pratiques les plus fiables offrant de meilleurs rendements des cultures agricoles. Les souches *Pseudomonas* amélioré considérablement le rendement, la longueur des tiges et les racines par rapport au témoin (Pirlak *et al.*, 2007). Ainsi, En outre, *Pseudomonas* ont également donné un effet bénéfique sur la longueur, le rendement des cultures et la qualité par rapport au témoin non inoculé (Lee *et al.*, 2008).

Les PGPR sont en mesure d'exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes telles que l'augmentation du taux de germination des grains, leur utilisation en agriculture peut permettre de stimuler la croissance des plantes (Beauchamp, 1993). De plus, elles augmentent la capacité des plantes à se nourrir en développant leur système racinaire.

## Conclusion

---

L'axe que nous avons développé lors de cette étude est la biostimulation de la germination du blé dur (*Triticum durum*) variété Vitron par des PGPR, du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production de métabolites secondaires chez huit souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Toutes les souches ont synthétisé les sidérophores, la production de ces métabolites est dépendante de la composition des milieux de culture. L'incorporation des ions  $Fe^{+3}$  influe sur la synthèse des sidérophores, alors que leurs absences stimulent leur production, leurs présences par contre semblent la réprimer.

La majorité des souches se sont avérées des biofertilisants, elles ont la capacité de fixer l'azote, de produire de  $NH_3$  et de solubiliser les phosphates à des taux très élevés. Quant à la production de l'AIA, toutes nos souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents semblent productrices. Un taux élevé de l'AIA est enregistré chez P12 ( $130\mu g/l$ ), les pH les plus favorables à une bonne production de l'AIA pour cette souche entre 5 et 7, elle diminue à partir du pH 9.

L'étude relative à l'inoculation des graines de blé dur par *Pseudomonas* spp. fluorescents est réalisée dans le but d'apprécier l'effet positif des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria), les deux souches (AZ4 et P12) testées ont une activité positive sur le taux de la germination des graines par rapport au témoin non bactérié. Elles améliorent significativement les paramètres morphologiques (la longueur des racines et la longueur des glumelles), ce qui a été confirmé par l'indice de vigueur. Leur efficacité est peut être liée aux multiples activités PGPR telles que la production de phytohormones.

A l'issue de cette étude, nous pouvons conclure que les souches testées sont capables d'améliorer la germination de la variété Vitron, et permet de les classer comme phytostimulateurs.

## Conclusion

---

Il est souhaitable de poursuivre cette étude. Pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspective :

Etudier l'effet de d'autres souches sur la germination des graines, dans un essai de bio stimulation de la croissance des plantes.

Applique la souche AZ4 sur la croissance des plantes comme des bio-stimulation

L'utilisation des bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) comme une approche biologique semble être la solution prometteuse afin d'améliorer la production du blé dur (*Triticum durum* Desf.) en Algérie.

Faire des recherches plus approfondies sur les molécules sécrétées par les bactéries tel que le type des sidérophores, et étudier la qualité de ces dernières

Étudier l'effet de la bactérisation des graines *in vivo* et *in situ* afin de faire une comparaison entre les résultats du taux de germination

Étudier l'effet des bactéries sur la stimulation de l'induction de la résistance systémique chez les plantes.

Tester la valeur des isolats dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes afin de faire recourir à la production de ce biopesticide en cas de résultats positifs.

- **Ali, I.; Fontenot, J. P.; Allen, V. G., 2009.** Palatability and dry matter intake by sheep fed corn stover treated with different nitrogen sources. *Pakistan Vet. J.*, 29 (4): 199-201
- **Amir, HG, Shamsuddin ZH., Halimi MS., Marziah M. et Ramlan MF. 2005.** Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. *Commun Soil Sci Plant Anal* **36**:2059–2066.
- **Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen., M.R. Ismail., M.A. Hoque., M.Z. Islam ., S.M. Shahidullah et S. Meon (2009).** Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol.*, **8** : 1247-1252.
- **Atzhorn, R., Crozier A., Wheeler C.T. et Sandberg G. 1988.** Production of gibberellins and indole- 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* **175**:532–538
- **Bahlouli, F., Bouzerzour, H., Benmahammed, A. and Hassous K. L. 2005.** Selection of high yielding and risk efficient durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars under semi-arid conditions. *Pakistan Journal of Agronomy*, 4(4), 360-365.
- **Bakker, P.A.H.M., Pieterse C.M.J. et van Loon L.C. 2007.** Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. **97**:239-243.
- **Bassil, N.V.; Proebsting, W.M.; Moore, L.W. and Lightfoot, D.A. 1991.** Propagation of hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *HortScience* vol. 26, no. 8, p. 1058-1060.
- **Bendjama, A., Bouzerzour, H., and Benbelkacem, A. 2014.** Adaptability of durum wheat genotypes (*Triticum turgidum* L. var. durum) to contrasted locations. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 8(6): 390 - 396.
- **Benmahammed, A., Nouar, H., Haddad, L., Laala, Z., Abdelmalek, O. and Bouzerzour, H. 2010.** Analyse de la stabilité des performances de rendement du blé dur (*Triticum durum* Desf.) sous conditions semi-arides. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(1), 177-186.
- **Berggren, I., van Vuurde J. W. L. et Martensson A. M. 2001.** Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, *Appl. Soil Ecol.* **17**: 97-105

- **Bottini, R., Cassan F., et Picolli P. 2004.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**:497–503.
- **Boulal H., Zaghouane O., El Mourid M. et Rezgui S., 2007** - Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. TIGC, INRA, ICARDA, Algérie, 176 p.
- **Bouzerzour, H., Benmahammed A., Mekhlouf A. et Harzallah D., 1999** - Évaluation de quelques techniques de sélection pour la tolérance aux stress chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone semi-aride d'altitude. *Céréaliculture* 33: 27 - 33
- **Cappuccino, J. C. et Sherman N. 1992.** Microbiology: A Laboratory Manuel, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.
- **Costacurta, A., et Vanderleyden J. 1995.** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**:1–18.
- **Downes, BP., Steinbaker CR., Crowell DN. 2001.** Expression and processing of a hormonally regulated b-expansin from soybean. *Plant Physiol* **126**:244–252
- **Ecker, J.R. (1995).** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* ,**268**:667-675.
- **Ezawa, T., Smith, S.E. et Smith, F.A. 2002.** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, 244: 221–230.
- **Figueiredo MVB, Burity HA, Martinez CR, Chanway CP 2008** Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus xRhizobium tropici*. *Applied Soil Ecol* 40:182–188
- **Frankenberger, W.T.J., et Arshad M. 1995.** Phytohormones in soil. Microbial production and function. Marcel Dekker, New York, p 503.
- **Glick, B.R., Jacobson C.B., Schwarze M.M.K. et Pasternak J.J. 1994.** Does the enzyme 1-aminocyclopropane- lcarboaylate deaminase play a role in plant growth promotion by *Pseudomonas putida* GR12–2 *In*: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD (eds) Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. CSIRO, Adelaide, pp 150–152.
- **Glick, B.R., Patten C.L., Holguin G., et Penrose D.M. 1995.** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College Press*, London.
- **Glick, B.R., Cheng Z., Czarny J., et Duan J. 2007.** Promotion of plant growth by ACC-deaminase producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:329–339.

- **Glick., B.R., Penrose D.M. et Jiping L. 1998.** A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**:63–68.
- **Gupta, S.S. 2003.** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**(3):219-227.
- **Gyaneshwar, P., Kumar GN., Parekh LJ. et Poole PS. 2002.** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* **245**(1):83-93.
- **Hallman, J., Quadt-Hallman A., Mahaffee W.F. et Kloepper J.W. 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*,**43**: 895-914.
- **Hatta, M.; Beyl, C.A.; Garton, S. and Diner, A.M. 1996.** Induction of roots on jujube softwood cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *The Journal of Horticultural Science*, vol. 71, no. 6, p. 881-886.
- **Hugenholtz, P. 2002.** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* **3**, Reviews0003
- **Joseph, B., Patra R.R. and Lawrence R., 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152.
- **Kaymak HC, Yarali F, Guvenc I, Donmez MF 2008.** The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. *African Journal of Biotechnology* 7, 4479-4483
- **Khalid, A., M.Arshad. et Z.A. Zahir 2004.** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, **96**: 473-480(8).
- **Kloepper JW 1993.** Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. In “Soil Microbial Ecology” (F. B. Metting Jr., Ed.), pp. 255-274. Dekker, New York, USA.
- **Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN; 1980.** Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* 286:885–886.
- **Kloepper JW, Lifshitz R and Zablutowicz RM 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39-43.

- **Kloepper JW, Schroth MN 1978.** Plant growth promoting rhizobacteria on radishes, In: Proceed-ings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, Angers, France,pp 879–882
- **Kloepper, J.W. and C.J. Beauchamp, 1992.** A review of issues related to measuring colonisation of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 38: 1219 - 1232.
- **Konate , I. 2007 .** Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier(*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Université Mohammed V-Agdal Faculté des sciences, Rabat.
- **Kumar, V. et N. Narula 1999.** Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils*, 28(3):301-305
- **MacMillan, J. 2002.** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.*, 20: 387-442.
- **Mekhlouf, A., Bouzerzour, H., Benmahammed, A. et Hadj Sahraoui, A. 2006.** Adaptation des variétés de blé dur (*Triticum durum*Desf.) au climat semi-aride. *Sécheresse*, 17, 507-513.
- **Mitter, N., AC. Srivastava, AS. Renu, AK. Sarbhoy et DK. Agarwal 2002.** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* 153:187–193.
- **Nester, EW., Gordon MP., Amasino RM. et Yanofsky MF. 1984.** Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:387–413.
- **Ongena, M., Giger A., Jacques P., Dommes J. et Thonart P. 2002.** Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Euro. J. Plant Pathol.*, 108: 187-196.
- **Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2006.** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111, 38–43.
- **Oulmi, A., Salmi, M., Laala, Z., Fellahi, Z., Adjabi, A., Rabti, A. and Benmahammed, A. 2016.** Morpho-Physiological Variability Studies in F6Populations of Durum Wheat (*Triticum durum*Desf.) evaluated under Semi-arid Mediterranean Conditions. *Advances in Environmental Biology*, 10(3), 161-170.
- **Paul, E.A., et Clark F.E. 1996.** *Soil Microbiology and Biochemistry*, 2nd Edition. Academic Press, New York.

- **Piano, S., Neyrotti V., Migheli Q. et Gullino M.L 1997.** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* **11**(3):131-140.
- **Pirlak, L., Turan M., Sahin F et Esitken A. 2007.** Floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to apples increases yield, growth, and nutrient element contents of leaves. *J. Sustain. Agric.* **30**:145–155.
- **Rinallo, C., Mittempergher L., Frugis G. et Mariotti D. 1999.** Clonal propagation in the genus *Ulmus*: improvement of rooting ability by *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *J. Hortic. Sci. Biotech.* **74**:502–506.
- **Ryu, R. et C.L. Patten. 2008.** Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4 TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Am. Soc. Microbiol.*, **19**: 1-35.
- **Saharan, B.S. and Nehra V., 2011.** Plant Growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sci. Med. Res.*
- **Sahin F, Cakmakci R. et Kantar F. 2004.** Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil*, **265**:123–129.
- **Sahin, F., Cakmakci, R., Kantar, F., 2004.** Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* **265**, 123–129
- **Salantur, A., A. Ozturk. S. Akten, F. Sahin and F. Donmez, 2005.** Effect of inoculation with nonindigenous and indigenous rhizobacteria of Erzurum (Turkey) origin on growth and yield of spring barley. *Plant Soil*, **275**: 147-156.
- **Salisbury, F.B. 1994.** The role of plant hormones. Marcel Dekker, (ed.). New York, USA.
- **Sharma, K., G. Dak, A. Agrawal, M. Bhatnagar et R. Sharma 2007.** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed and seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, **1**: 61-63.
- **Sharma, K., Dak G., Agrawal A., Bhatnagar M. et Sharma R. 2007.** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed and seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, **1**: 61-63.
- **Spaepen, S., Vanderleyden J. et Remans R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31** (4): 425-448.

- **Subbarao, NS. 1988.** Phosphate solubilizing micro-organism. *In: Biofertilizer in agriculture and forestry.* Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, pp 133–142.
- **Van Loon, LC., Bakker PA. et Pieterse CM. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:453–483.
- **Van Peer, R., Niemann G.J. et Schippers B. 1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, **81**: 728–734.
- **Vessey, J.K. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, **255** : 571–586.
- **Voisard, C, Keel C., Haas D, et Defago G. 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO J.*, **8**: 351-358.
- **Weller DM 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol* 26:379–407
- **Williams, PM., Sicardi M. de Mallorca 1982.** Abscisic acid and gibberellin-like substances in root nodule of *Glycine max.* *Plant Soil* **65**: 19-26.
- **Yang, J, Kloepper JW. et Ryu CM. 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* **14**:1–4.
- **Zahir, A.Z., Arshad, M., Frankenberger, W.T., 2004.** Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.* **81**, 97–168.

## Annexe

### Les milieux de cultures utilisés et réactifs

<p><b>1. Milieu de King B</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 70%;">Agar</td><td style="text-align: right;">20g</td></tr> <tr><td>Peptone</td><td style="text-align: right;">20g</td></tr> <tr><td>Glycérol</td><td style="text-align: right;">15g</td></tr> <tr><td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydre)</td><td style="text-align: right;">1,5g</td></tr> <tr><td>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">1,5g</td></tr> <tr><td>Eau distillée</td><td style="text-align: right;">1000 ml</td></tr> <tr><td colspan="2">pH 7,2</td></tr> </table>	Agar	20g	Peptone	20g	Glycérol	15g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)	1,5g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5g	Eau distillée	1000 ml	pH 7,2		<p><b>4. milieu de Winogradsky exempté d'azote</b></p> <p><b>Solution mère</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 70%;">KH<sub>3</sub> PO<sub>2</sub></td><td style="text-align: right;">50g</td></tr> <tr><td>MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">25g</td></tr> <tr><td>FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">1g</td></tr> <tr><td>NaSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">1g</td></tr> <tr><td>Na Cl</td><td style="text-align: right;">25g</td></tr> <tr><td>L'eau distillée</td><td style="text-align: right;">1000ml</td></tr> <tr><td colspan="2">pH 7,2 ajusté avec du Na OH</td></tr> </table> <p><b>Préparation du milieu Winogradsky exempté d'azote</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 70%;">Solution mère</td><td style="text-align: right;">5ml</td></tr> <tr><td>D-Glucose</td><td style="text-align: right;">0,5g</td></tr> <tr><td>Ca Co<sub>3</sub></td><td style="text-align: right;">0,1g</td></tr> <tr><td>Agar agar</td><td style="text-align: right;">15g</td></tr> <tr><td>Eau distillé</td><td style="text-align: right;">1000ml</td></tr> <tr><td colspan="2">pH 6,2 ajusté avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></td></tr> </table>	KH <sub>3</sub> PO <sub>2</sub>	50g	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	25g	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1g	NaSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1g	Na Cl	25g	L'eau distillée	1000ml	pH 7,2 ajusté avec du Na OH		Solution mère	5ml	D-Glucose	0,5g	Ca Co <sub>3</sub>	0,1g	Agar agar	15g	Eau distillé	1000ml	pH 6,2 ajusté avec du H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Agar	20g																																								
Peptone	20g																																								
Glycérol	15g																																								
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)	1,5g																																								
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5g																																								
Eau distillée	1000 ml																																								
pH 7,2																																									
KH <sub>3</sub> PO <sub>2</sub>	50g																																								
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	25g																																								
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1g																																								
NaSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1g																																								
Na Cl	25g																																								
L'eau distillée	1000ml																																								
pH 7,2 ajusté avec du Na OH																																									
Solution mère	5ml																																								
D-Glucose	0,5g																																								
Ca Co <sub>3</sub>	0,1g																																								
Agar agar	15g																																								
Eau distillé	1000ml																																								
pH 6,2 ajusté avec du H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>																																									
<p><b>2. Milieu de NBRIP</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 70%;">Glucose</td><td style="text-align: right;">10 g</td></tr> <tr><td>Ca 3(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></td><td style="text-align: right;">5 g</td></tr> <tr><td>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">5 g</td></tr> <tr><td>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">0,25 g</td></tr> <tr><td>KCl</td><td style="text-align: right;">0,2 g</td></tr> <tr><td>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></td><td style="text-align: right;">0,1 g</td></tr> <tr><td>Agar agar</td><td style="text-align: right;">15g</td></tr> <tr><td>Eau distillée</td><td style="text-align: right;">1000 ml</td></tr> </table>	Glucose	10 g	Ca 3(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g	KCl	0,2 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g	Agar agar	15g	Eau distillée	1000 ml																									
Glucose	10 g																																								
Ca 3(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g																																								
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5 g																																								
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g																																								
KCl	0,2 g																																								
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g																																								
Agar agar	15g																																								
Eau distillée	1000 ml																																								
<p><b>3. Réactif de Nessler</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 70%;">KI</td><td style="text-align: right;">3,5g</td></tr> <tr><td>HgI<sub>2</sub></td><td style="text-align: right;">1,3g</td></tr> <tr><td>H<sub>2</sub>O</td><td style="text-align: right;">70ml</td></tr> <tr><td>NaOH 30%</td><td style="text-align: right;">30ml</td></tr> </table>	KI	3,5g	HgI <sub>2</sub>	1,3g	H <sub>2</sub> O	70ml	NaOH 30%	30ml																																	
KI	3,5g																																								
HgI <sub>2</sub>	1,3g																																								
H <sub>2</sub> O	70ml																																								
NaOH 30%	30ml																																								