



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi - Tébessa



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Etres vivants

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Sciences biologiques

Option: Biotechnologie Végétale

Thème:

**Isolement et caractérisation des *Pseudomonas sp.* stimulatrices
de la croissance des plantes (PGPR) à partir de la rhizosphère de
Citrullus colocynthis dans la région de Bir El-Ater**

Présenté par:

SLAMA Hicheme

CHERGUI Maroua

Devant le jury composé de :

Mme. SOUAHI Hana	MCA	Université de Tébessa	Présidente
M. DEKAK Ahmed	MCB	Université de Tébessa	Promoteur
Mme. SGHIR Hanane	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : **23 / 06 / 2019**

Note :.....

Mention :

Remerciements

Nous tenons à remercier notre cher promoteur, Dr Ahmed DEKAK, Maitre de conférences à l'Université de Tébessa, pour nous avoir dirigés. Ce travail ne pouvait voir le jour sans ses conseils avisés et sa disponibilité permanente, nous lui sommes très redevables et reconnaissants.

Nous remercions également les membres du jury de nous avoir honorés en ayant accepté de juger ce travail et de l'enrichir par leurs judicieuses propositions.

Nous témoignons aussi, notre profonde gratitude à l'égard des enseignants et des laborantins de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à notre formation et tous les efforts qu'ils ont déployés pour nous permettre de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

A tous ceux et celles qui nous ont aidés, de près ou de loin, nous disons Merci du fond du cœur.

Dédicace

Je dédie ce travail aux êtres les plus chers à mon cœur : mes parents, mon épouse et mes enfants qui m'ont apporté tant de tendresse et de dévouement infailibles. Je leur confirme mon attachement en espérant qu'ils trouvent ici le fruit de leur patience et de leur amour inconditionnel.

A mes amis et collègues, qui ont tout le temps cru en moi, et qui m'ont poussé vers l'avant, revenir après vingt ans aux études et à la recherche n'était guère aisé sans leurs encouragements.

Hichème

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, pour leur patience, leur Amour, leur soutien et leurs encouragements.

À mes frères et à mes soeurs

À tous mes collègues, et à tous mes enseignants.

Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

CHERGUI.Maroua

ملخص

ترتكز هذه الدراسة على استخدام البكتيريا المعززة لنمو النباتات (PGPR) و الكفيلة بتحويل الممارسات الزراعية نحو توجه مستدام وأكثر ملاءمة للبيئة.

تم استخدام 37 عزلة بكتيرية من أربع عينات من المنطقة الملاصقة لجذور نبات *Citrullus colocynthis* الذي ينمو تحت ظروف جفاف شديدة في منطقة بئر العاتر من أجل انتقاء وتحديد بكتريا PGPR وتقييم كفاءتها في إنتاج الهرمون النباتي IAA وإذابة الفوسفات و البوتاسيوم و هذا ما سيساعد على فهم آليات عملها واختيار سلالات فعالة.

سمحت لنا هذه الدراسة بتسجيل تنوع بيولوجي في الكائنات الحية الدقيقة المعزولة و الذي أكدته نتائج الاختبارات المختلفة ، خاصة إنتاج IAA الذي يعد سمة شائعة لهذه البكتيريا، 12 سلالة قادرة على إذابة P، 18 سلالة قادرة على إذابة K وأخيراً تم حصر 5 سلالات قيّمة من البكتيريا ذات فعالية كبيرة والتي من المرجح أن تستخدم في برامج تحسين الانتاج الزراعي.

كلمات مفتاحية :

Citrullus colocynthis , PGPR , Rhizosphere , هرمونات نباتية , إذابة المعادن.

Résumé

L'utilisation des bactéries promotrices de la croissance des plantes peut orienter les pratiques agricoles vers une perspective durable et plus respectueuse de l'environnement.

Trente sept isolats issus de quatre échantillons de la rhizosphère de la plante *Citrullus colocynthis* qui pousse dans des conditions d'aridité accrue au niveau de la région de Bir El-Ater, ont été utilisés pour isoler et identifier des bactéries à traits PGPR, en évaluant leur efficacité à produire l'IAA et à solubiliser le Phosphate et le Potassium ce qui permettra de comprendre leurs mécanismes d'action et de sélectionner des souches d'intérêt.

Ce travail nous a permis de constater une diversité de microorganismes traduite par les résultats des différents tests étudiés, notamment, la production d'IAA qui est un trait commun à ces PGPR, 12 souches capables de solubiliser le P, 18 souches capables de solubiliser le K et enfin 5 souches d'intérêt qui ont présenté un important potentiel PGPR et qui sont susceptibles d'être utilisés dans des programmes d'amélioration de la productivité agricole.

Mots clés :

Citrullus colocynthis , Rhizosphère , PGPR , Phytohormones , Solubilisation des minéraux.

Abstract

The use of plant growth promoting bacteria can orientate agricultural practices towards a sustainable and more environmentally friendly perspective.

Thirty seven isolates collected from four samples from the rhizospheric soil of *Citrullus colocynthis*, plant growing under severe aridity conditions in Bir El-Ater area, were used to isolate and identify these PGPR trait bacteria, evaluating their efficiency in producing IAA phytohormone and solubilizing Phosphate and Potassium which will help to understand their mechanisms of action and in order to select strains of interest.

This work allowed us to note a diversity of microorganisms, translated by the results of various tests studied, in particular, the production of IAA which is a common feature of these PGPR, 12 strains capable of solubilizing P, 18 strains able to solubilize K and finally 5 strains of interest that showed significant PGPR, which are likely to be involved in programs of agricultural productivity improvement.

Key words:

Citrullus colocynthis , PGPR , Rhizosphère , Phytohormone , Solubilization of minerals.

Liste des figures

Titre	Page
Figure1 : La consommation mondiale d'engrais chimiques	2
Figure 2: Schémas de classification des parties du sol racinaire	3
Figure 3 : Les microorganismes et les exsudats racinaires	4
Figure 4 : Schéma explicatif des interactions plantes – PGPR.	6
Figure 5 : Les effets directs et indirects des PGPR sur la plante	7
Figure 6 : La voie de biosynthèse d'IAA dépendante du tryptophane chez les micro-organismes.	8
Figure 7 : Résumé schématique du mécanisme de solubilisation du phosphate utilisé par les PGPR.	10
Figure 8 : Mécanismes de solubilisation du P et du K par les PGPR	11
Figure 9 : Production des composés organiques volatiles par les PGPR	12
Figure 10 : Schémas montrant l'effet des différents métabolites des PGPR	14
Figure 11 : <i>Citrullus colocynthis</i> (fruits, fleurs et tiges)	16
Figure 12 : Carte bioclimatique de la w. de Tebessa	17
Figure 13 : Paysage de la région de Bir El-Ater (Oued Frid)	18
Figure 14 : Carte géographique des zones de prélèvement	18
Figure 15 : Les sites de prélèvement	19
Figure 16 : Prélèvement des échantillons du sol de la rhizosphère de <i>Citrullus colocynthis</i>	20
Figure 17 : Spectrophotomètre à flamme	20
Figure 18 : Les séries de dilutions	21
Figure 19 : Aspect macroscopique des isolats sur milieux King A et King B	25
Figure 20 : Détection de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur milieu cétrimide	26
Figure 21 : Solubilisation du phosphate par les isolats testés	26
Figure 22 : Diagramme montrant les indices de solubilisation du phosphate par les isolats testés	27

Figure 23 : solubilisation du potassium sur milieu Aleksandrow	28
Figure 24 : Diagramme montrant l'indice de solubilisation du potassium dans le milieu Aleksandrow	28
Figure 25 : Solubilisation du potassium sur milieu modifié	29
Figure 26 : Figure montrant l'indice de solubilisation du potassium dans le milieu Aleksandrow modifié par les isolats testés	30
Figure 27 : Test de production d' IAA	31
Figure 28 : Diagramme représentant la production d'IAA par les isolats testés	32
Figure 29 : La répartition proportionnelle des isolats selon les traits PGPR étudiés	33
Figure 30 : Schémas représentant les traits PGPR chez les isolats testés	35
Figure 31 : Projection des isolats sur le plan biplot d'analyse des composantes principales (le cercle délimite les isolats à traits PGPR)	36
Figure 32 : Dendrogramme montrant les differentse classes des isolats testés à un seuil de similarité égale à 40 %	37

- Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau 1 : Position systématique du <i>Citrullus colocynthis</i>	16
Tableau 2 : Coordonnées géographiques des sites de prélèvements	19
Tableau 3 : Composition des milieux de différenciation des <i>Pseudomonas Sp</i>	21
Tableau 4 : Composition du milieu NBRIP liquide	22
Tableau 5 : Composition du milieu Aleksandrow	23
Tableau 6 : composition du milieu et du réactif du test de production d'IAA	24
Tableau 7 : résultats de l'analyse chimique des sols étudiés	25
Tableau 8 : Tableau de l'analyse de variance	27
Tableau 9 : Répartition des isolats en classes	37

Liste d'abréviations

°C : degré Celsius

µL : microlitre

Ca : calcium

COV : Composés Organiques Volatils

Fe : Fer

G : gramme

IAA : Indol Acid Acetic

KSB : Bactérie Solubilatrice du k (potassium)

MA : Mycorhizes Arbusculaires

ml : millilitre

mm : millimètre

Na : sodium

NBRIP : National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium

nm : nanomètre

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

pH : Potentiel d'Hydrogène

ppm : particule par million

PSB : Bactérie Solubilatrice du P (Phosphate)

RSA : architecture du système racinaire

T/MIN : tour par minute

Table de matières

Introduction	1
 Chapitre 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Les effets des fertilisants chimiques sur l'environnement	2
2. Les biofertilisants comme substitut des fertilisants chimiques	3
3. Rhizosphère	3
4. Les PGPR	4
5. Les interactions PGPR-Racines	5
6. Les mécanismes d'action des PGPR	7
6.1. Les mécanismes directs	7
6.1.1. Les régulateurs de croissance (phytohormone IAA)	7
6.1.2 La solubilisation des nutriments pour une absorption facile par les plantes	9
6.1.2.a. L'azote	9
6.1.2.b. Le phosphore	9
6.1.2.c. Le Potassium	10
6.1.2.d. Les composés organiques volatils (COV)	11
6.2. Les mécanismes indirects	12
6.2.1. Production d'enzymes	12
6.2.2. L'induction de la résistance aux agents pathogènes des plantes	13
6.2.3. Production d'antibiotiques	13
6.2.4. Production de sidérophores	14
6.2.5. La tolérance aux stress abiotiques	15

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Présentation du materiel végétal.....	16
2. Présentation de la zone de Bir El-Ater	17
3. Sites choisis pour les prélèvements	19
4. Prélèvement des échantillons du sol	20
5. Analyse chimique du sol	20
6. Préparation des milieux et mise en culture	21
6.1. Les séries de dilutions	21
6.2. Isolement de cultures pures	21
6.3. Stockage et préservation	21
6.4. Test cétrimide (milieu sélectif de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	22
7. Evaluation de l'efficience des microorganismes isolés comme de potentiels PGPR.....	22
7.1. Préparation des souches	22
7.2. Test de solubilisation du phosphate	23
7.3. Test de solubilisation de potassium	23
7.4. Test de solubilisation de potassium sur milieu modifié	24
7.5. Test de production d'IAA	24
8. Analyses statistiques	24

Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse du sol	25
2. isolement des souches pures	25
3. Le test cétrimide	26
4. Test de solubilisation du phosphate	26
5. Test de solubilisation de potassium	28
6. Test de solubilisation de potassium sur milieu modifié.....	29
7. Test de production d'IAA	30
8. Les traits PGPR des isolats testés	33
Conclusion	38
Références bibliographiques	39

Annexes

Introduction

La productivité agricole doit augmenter de manière significative dans les années à venir pour faire face à la croissance démographique mondiale ascendante et les dommages environnementaux. Pour résoudre ce problème et obtenir des rendements plus élevés, les agriculteurs sont devenus dépendants des sources d'engrais chimiques, qui en plus d'être coûteuses, épuisent les ressources d'énergie non-renouvelables et posent des risques pour l'homme et l'environnement (FAO, 2015).

Il serait évidemment avantageux d'utiliser des moyens biologiques efficaces pour fournir les minéraux indispensables à la croissance des plantes et d'orienter les pratiques agricoles vers une approche plus durable et plus respectueuse de l'environnement. Cela inclue l'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes (Glick, 1995).

Il est envisagé que dans un avenir assez proche, des bactéries promotrices de croissance des plantes (PGPR) commenceront à remplacer l'utilisation des produits chimiques, en effet, la production de biofertilisants contenant des souches bactériennes isolées de la rhizosphère des plantes a pris une importance considérable, vu qu' ils sont plus tolérants aux conditions abiotiques extrêmes, telles que la température, la salinité et la sécheresse et qu'ils améliorent la productivité en facilitant l'absorption des nutriments par les plantes sans afficher aucun danger pour l'environnement et les humains (Vessey, 2003).

La recherche des formes bactériennes, entre-autres les PGPR, à partir des plantes endémiques et spontanées appartenant au cortège floristique de l'Algérie, poussant dans des conditions environnementales extrêmes, est devenue un choix de qualité, vu que le nombre des travaux scientifiques reste très limité dans ce domaine.

Notre travail consiste donc à isoler des bactéries à partir de la rhizosphère de la plante *Citrullus colocynthis*, communément appelée coloquinte, connue pour ses vertus médicinales et sa haute résistance aux conditions extrêmes de l'environnement, en effet, elle pousse dans les régions désertiques en arrivant même à produire une biomasse impressionnante.

Dans le but d'isoler et d'identifier ces PGPR, quatre échantillons de la rhizosphère de cette plante localisée au niveau de la région de Bir El-Ater ont été utilisés afin d'évaluer la capacité de ces souches à promouvoir la croissance par le biais de mécanismes de production d'IAA et de solubilisation de phosphate et de potassium.

Chapitre 1

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les effets des fertilisants chimiques sur l'environnement

Les fertilisants chimiques ont été massivement utilisés dans le monde entier pour remédier à la déficience des nutriments (Figure 1) et bien que ces fertilisants améliorent le rendement, leur utilisation intensive constitue une menace majeure pour l'environnement vu qu'ils provoquent l'accumulation de métaux lourds et le durcissement du sol, réduisant ainsi sa fertilité, émettent des gaz à effet de serre et polluent l'air et l'eau (Aeron *et al.*, 2011).

L'utilisation continue de ces fertilisants chimiques amoindrit les minéraux présents de façon naturelle dans les sols fertiles. En plus, l'acidité des fertilisants chimiques a un impact sur le pH du sol, ce qui affecte l'écosystème des microorganismes qui jouent un rôle bénéfique pour la plante en l'immunisant naturellement contre plusieurs maladies. Ces mêmes fertilisants rendent les plantes susceptibles à d'autres maladies comme les infections virales de la mosaïque lorsque l'azote est surabondant dans le sol (Dordas, 2008 ; Fagard *et al.*, 2014), ou la brûlure d'engrais, causée par l'excès de sels d'azote, en effet, l'absorption rapide du nitrogène des fertilisants par le sol, entraîne un stress osmotique qui provoque la dessiccation des tissus végétaux, leur déshydratation et l'assèchement de la plante (Chan, 2018 ; Kumar *et al.*, 2019).

Enfin, cette utilisation intensive des fertilisants chimiques a des répercussions graves sur la santé des consommateurs car elle provoque une toxicité par des métaux lourds qui trouvent le chemin jusqu'aux cultures de fruits et de légumes (Chan, 2018).

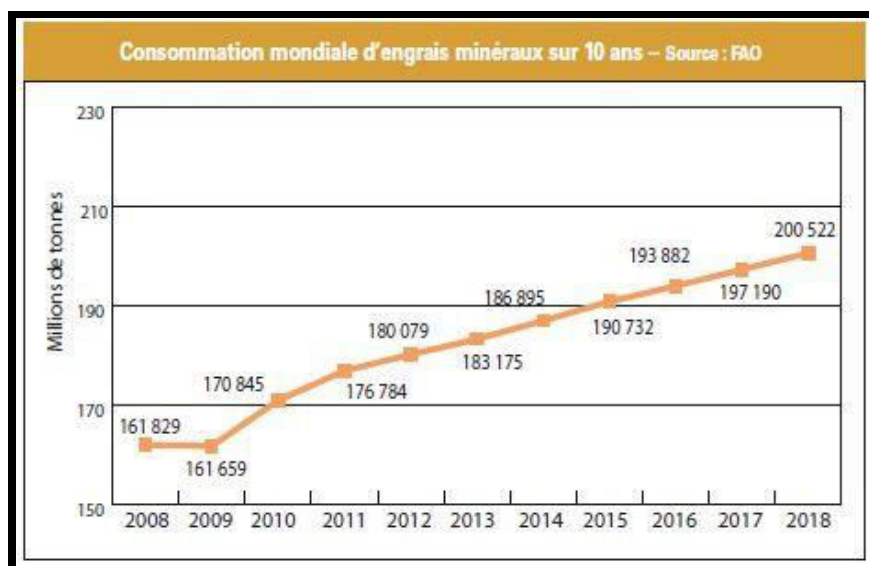


Figure 1 : La consommation mondiale d'engrais chimiques (Fao, 2015)

2. Les biofertilisants comme substitut des fertilisants chimiques

Les biofertilisants sont des fertilisants qui contiennent des bactéries et des champignons hautement efficaces, isolés à partir du sol. Ces microorganismes ont un rôle vital dans la solubilisation et la disponibilité des nutriments pour les plantes en permettant un apport amélioré et plus constant des éléments nutritifs majeurs : azote, phosphate et potassium ainsi que les microéléments ce qui résulte en un gain considérable de la productivité (Han et Lee, 2005).

La différence entre les fertilisants chimiques et les biofertilisants c'est que ces derniers n'apportent aucun nutriments pour les plantes cultivées mais seulement des cultures bactériennes et fongiques ce qui constitue une alternative attrayante des produits chimiques en raison des risques de pollution de l'environnement et de l'augmentation de la demande en aliments biologiques (Raza *et al.*, 2016).

3. La rhizosphère

Le terme rhizosphère (Figure 2) fait référence à cette fine couche du sol à proximité des racines marquée par une activité microbiologique très élevée (Hiltner, 1904).

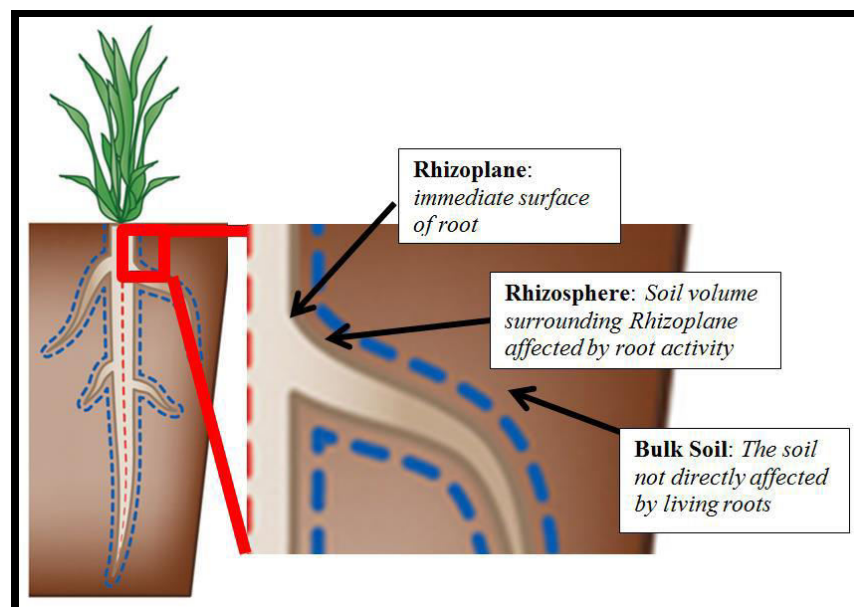


Figure 2: Schémas de classification des parties du sol racinaire (Hirsch et Mauchline, 2012)

En effet, les exsudats racinaires (Figure 3) constituent une source de nutriments qui rendent la population microbienne de la rhizosphère tellement différente des autres parties du sol environnant. Il a été prouvé que la zone rhizosphérique est plus abondante en microorganismes : de 10 à 100 fois plus que le reste du sol environnant alors que la biodiversité de ces microorganismes est moins importante dans la rhizosphère vu la rude concurrence pour les nutriments (Raynaud et Nunan, 2014).

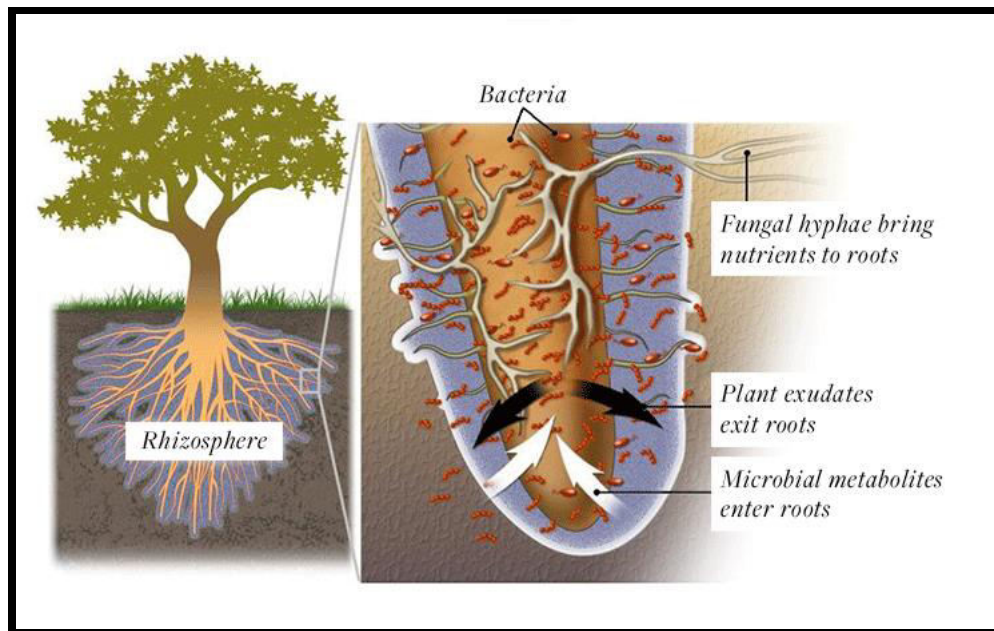


Figure 3 : Les microorganismes et les exsudats racinaires (Bikle et Montgomery, 2016)

Le produit photosynthétique des plantes (environ 5 à 30%) est sécrété par les racines sous forme de différents sucres qui à leur tour sont utilisés par les populations microbiennes (Glick, 2014). Ces bactéries de la rhizosphère possèdent une versatilité métabolique pour s'adapter et utiliser efficacement les exsudats racinaires (Govindasamy *et al.*, 2011).

4. Les PGPR

Les populations bactériennes du sol ont la capacité de croître rapidement et utilisent une très large gamme de substances différentes comme sources d'éléments nutritifs. La flore bactérienne est dispersée dans le sol, souvent liée aux particules du sol, beaucoup interagissent avec les racines des plantes (Jha *et al.*, 2010).

Les PGPR sont des bactéries vivant librement au sein de la microflore rhizosphérique des plantes, elles améliorent le développement des plantes, sans oublier leur pouvoir de lutte contre les microorganismes phytopathogènes, en effet certaines bactéries, notamment les bactéries du genre *Pseudomonas* sont de plus en plus utilisées comme bio-fongicides vu leur capacité à produire un vaste éventail de métabolites antifongiques, les recherches se sont focalisées sur *Pseudomonas putida* vu sa nature non-pathogène pour promouvoir le développement des plantes et les protéger contre les pathogènes (Kaur *et al.*, 2014).

Il existe donc deux types de collaboration des PGPR avec les plantes :

- Des rhizobactéries vivant librement en dehors des cellules de la plantes.
- Des bactéries symbiotiques vivant à l'intérieur des plantes et échangeant les métabolites directement avec la plante.

Le rôle de PGPR n'est pas mis en œuvre uniquement par l'effet direct d'une seule souche bactérienne mais par cet échange moléculaire (Figure 4) établi entre les microorganismes du sol et les plantes (Goswami *et al.*, 2016)

5. Les interactions PGPR-Racines

La plupart des plantes terrestres développent leur système racinaire pour explorer le sol et trouver les nutriments nécessaires à la croissance. La racine est un organe complexe constitué de régions distinctes telles que la pointe de la racine, le méristème de la racine, les zones de différenciation et d'élongation et les racines latérales émergentes (Scheres *et al.*, 2002). Ces régions ont des rôles distincts. Par exemple, les poils absorbants sont des cellules épidermiques différenciées importantes pour la nutrition minérale des plantes. La spécificité fonctionnelle des racines se reflète également au niveau des interactions plante-microorganismes : chez les Fabaceae, par exemple, l'extrémité de la racine est la région la plus importante pour initier le processus de colonisation rhizobienne, aboutissant finalement à la formation d'un nodule racinaire (Desbrosses et Stougaard, 2011). Chez les Poaceae, les poils absorbants et les racines latérales sont de préférence colonisés par les PGPR, où ils peuvent exprimer leurs propriétés bénéfiques pour la plante (Pothier *et al.*, 2007).

L'architecture du système racinaire (RSA) intègre la topologie du système racinaire, la distribution spatiale des racines primaires et latérales, ainsi que le nombre et la longueur des différents types de racines. Plusieurs facteurs abiotiques et biotiques peuvent influencer la RSA,

notamment les souches de PGPR. Les PGPR modifient la RSA et la structure des tissus racinaires principalement par leur capacité à interférer avec l'équilibre hormonal de la plante.

Il a été démontré que des composants spécifiques d'exsudats de racines, notamment les sucres, agissent sur la production de composés antimicrobiens sécrétés par les *Pseudomonas fluorescens*, avec certains effets dépendants de la souche (Duffy et Défago, 1999).

Des études ont révélé que les PGPR modifient les exsudats de racines directement ou indirectement par le biais d'autres microorganismes bénéfiques tels que les champignons mycorhiziens arbusculaires (MA), facilitant ainsi la colonisation des racines. Les PGPR améliorent la colonisation des racines en subissant une variation de phase. Les toxines produites par les agents pathogènes présents dans les racines et dans le sol peuvent également être dégradées par les PGPR (Dutta et Podile, 2010).

Outre les effets sur les exsudats racinaires, les PGPR peuvent entraîner des modifications de la composition en métabolites de la plante entière. Par exemple, les plants de riz inoculés avec *Herbaspirillum seropedicae* ont montré une teneur plus élevée en malate et en acides aminés essentiels que celles des plantes témoins (Curzi *et al.*, 2008). D'autres études ont porté sur les modifications des métabolites secondaires, ainsi une augmentation de la teneur en composés alcaloïdes et terpénoïdes d'intérêt pharmaceutique a été démontrée dans les plantes médicinales après inoculation avec des PGPR (Manero *et al.*, 2003 ; Jaleel *et al.*, 2007).

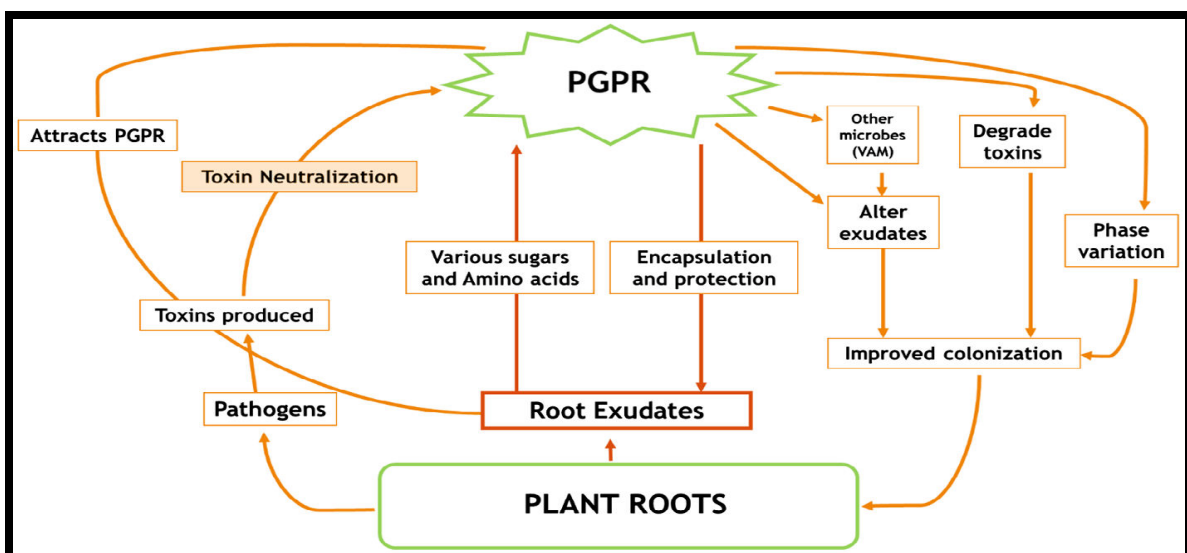


Figure 4 : Schéma explicatif des interactions plantes – PGPR (Goswami *et al.*, 2016)

6. Les mécanismes d'action des PGPR

Les mécanismes PGP ont été traditionnellement regroupés en mécanismes directs et indirects (Figure 5). La différence entre les deux n'est pas toujours évidente. Les mécanismes indirects sont, en règle générale, ceux qui se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et qui affectent directement son métabolisme (Antoun et Prévost, 2006).

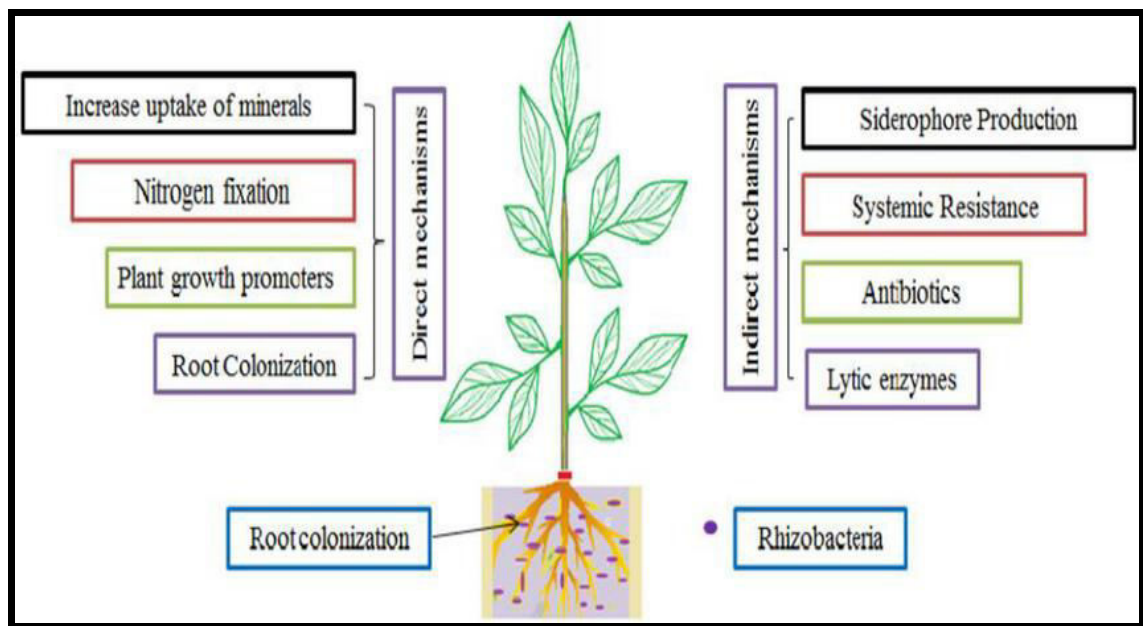


Figure 5 : Les effets directs et indirects des PGPR sur la plante (Goswami *et al.*, 2016)

6.1. Les mécanismes directs

6.1.1. Les régulateurs de croissance (phytohormone IAA)

Les micro-organismes du sol, en particulier les bactéries de la rhizosphère, ont le potentiel de produire des phytohormones bien connues, comprenant les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscisique, ce qui induit une réponse chez La plante par des processus tels que l'élargissement, la division et l'extension des cellules végétales (Glick, 2014).

L'indole-3-acétique acide (IAA) est une phytohormone importante produite par plusieurs souches de PGPR et il est bien connu que Les IAA libérées par les rhizobactéries

affectent principalement le système racinaire en augmentant sa taille, son poids, son nombre de ramifications et sa surface de contact avec le sol. Tous ces changements entraînent une augmentation de sa capacité à sonder le sol en vue d'un échange d'éléments nutritifs, améliorant ainsi la capacité de croissance des plantes (Gutierrez-Manero *et al.*, 2001 ; Glick, 2012).

La plupart de ces PGPR utilisent du L-tryptophane qui est sécrété dans les exsudats de racines en tant que précurseur de la production d'IAA (Figure 6). On connaît très peu d'exemples d'IAA produite par la voie indépendante du L-tryptophane, un des organismes les plus étudiés produisant de l'IAA par cette voie est *Azospirillum brasilense* (Jha et Saraf, 2015; Spaepen *et al.*, 2007).

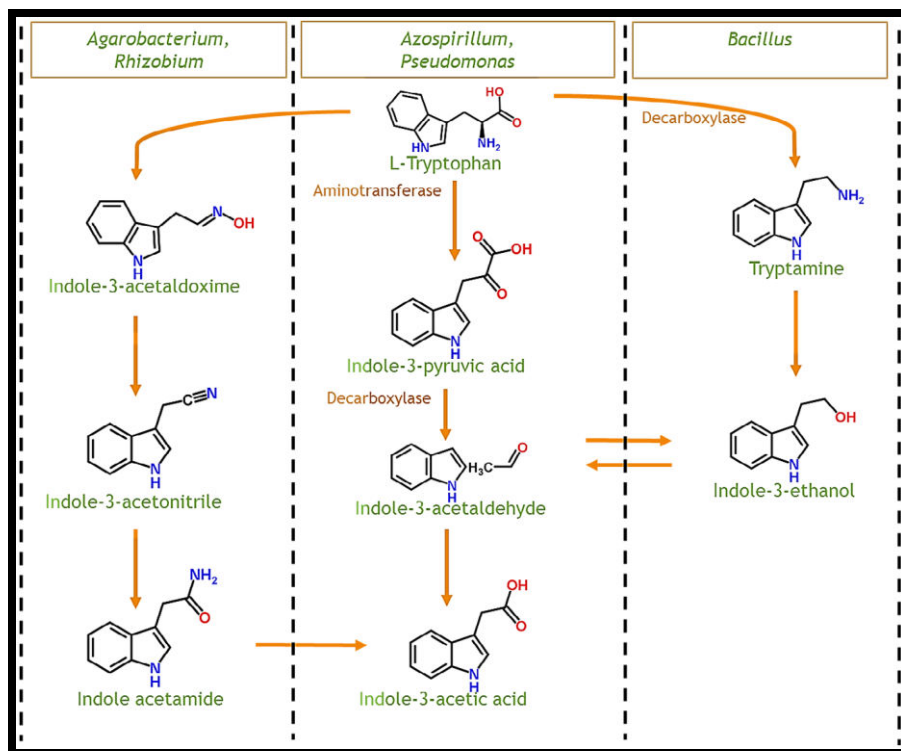


Figure 6 : La voie de biosynthèse d'IAA dépendante du tryptophane chez les micro-organismes (Goswami *et al.*, 2016).

Il faut ajouter aussi que l'IAA bactérienne facilite l'adaptation des plantes hôtes dans des sites contaminés par des métaux en provoquant des changements physiologiques dans le métabolisme des cellules végétales sous l'effet d'un stress métallique, de sorte que les plantes en croissance puissent supporter des concentrations élevées de métaux lourds (Glick, 2010).

6.1.2. La solubilisation des nutriments pour une absorption facile par les plantes

Des densités suffisantes de PGPR dans le biofertilisant jouent un rôle bénéfique dans la création d'une rhizosphère appropriée pour la croissance des plantes et la conversion d'éléments importants sur le plan nutritionnel par un processus biologique, par exemple en augmentant la disponibilité des minéraux N, P, K et en inhibant la croissance des agents pathogènes. La grande disponibilité de ces éléments pourrait améliorer la fertilité du sol, améliorer les effets de biocontrôle des isolats antagonistes et prolonger les taux de survie des micro-organismes dans le sol (Vessey, 2003).

6.1.2.a. L'azote

Les PGPR peuvent augmenter la disponibilité de la concentration en éléments nutritifs dans la rhizosphère en fixant ces éléments-là, les empêchant ainsi de s'échapper par lessivage. À titre d'exemple, l'azote, nécessaire à la synthèse d'acides aminés et de protéines, est le nutriment le plus déterminant pour les plantes. Les mécanismes par lesquels l'azote atmosphérique est ajouté aux formes organiques assimilables par les plantes sont exclusifs aux procaryotes (Raymond *et al.*, 2004). *Azospirillum* est un exemple rare d'organisme fixant l'azote vivant librement, souvent associé aux céréales dans les zones tempérées et qui pourrait également améliorer les rendements de la riziculture (Tejera *et al.*, 2015).

6.1.2.b. Le phosphore

Après l'azote, le phosphore est le nutriment le plus important pour les plantes et malgré les réserves abondantes de phosphore, cet élément n'est pas disponible sous une forme adaptée à l'absorption par les racines des plantes, cette faible disponibilité du phosphore pour les plantes est due au fait que la majorité du P du sol se trouve sous des formes insolubles, alors que les plantes n'absorbent que deux formes solubles du P : les ions monobasiques (H_2PO_4^-) et diabasiques (HPO_4^{2-}) (Glick, 2012 ; Jha et Saraf, 2015).

Le phosphate inorganique est indisponible à l'absorption par les racines des plantes à cause de sa tendance à réagir avec d'autres éléments comme l'aluminium et le fer dans les sols acides tandis qu'il se trouve dans les sols calcaires sous forme de phosphates de calcium ou de magnésium (Barber, 1995).

Le mécanisme principal que les PGPR utilisent afin de solubiliser le phosphate (Figure 7) est d'abaisser le pH du sol par sécrétion d'acides organiques (Patel *et al.*, 2015) : on rapporte que les bactéries des genres *Rhizobium* et *Bacillus* produisent de l'acide 2-céto gluconique (Banik et Dey, 1982 ; Halder et Chakrabartty, 1993 ; Jha et Saraf, 2015).

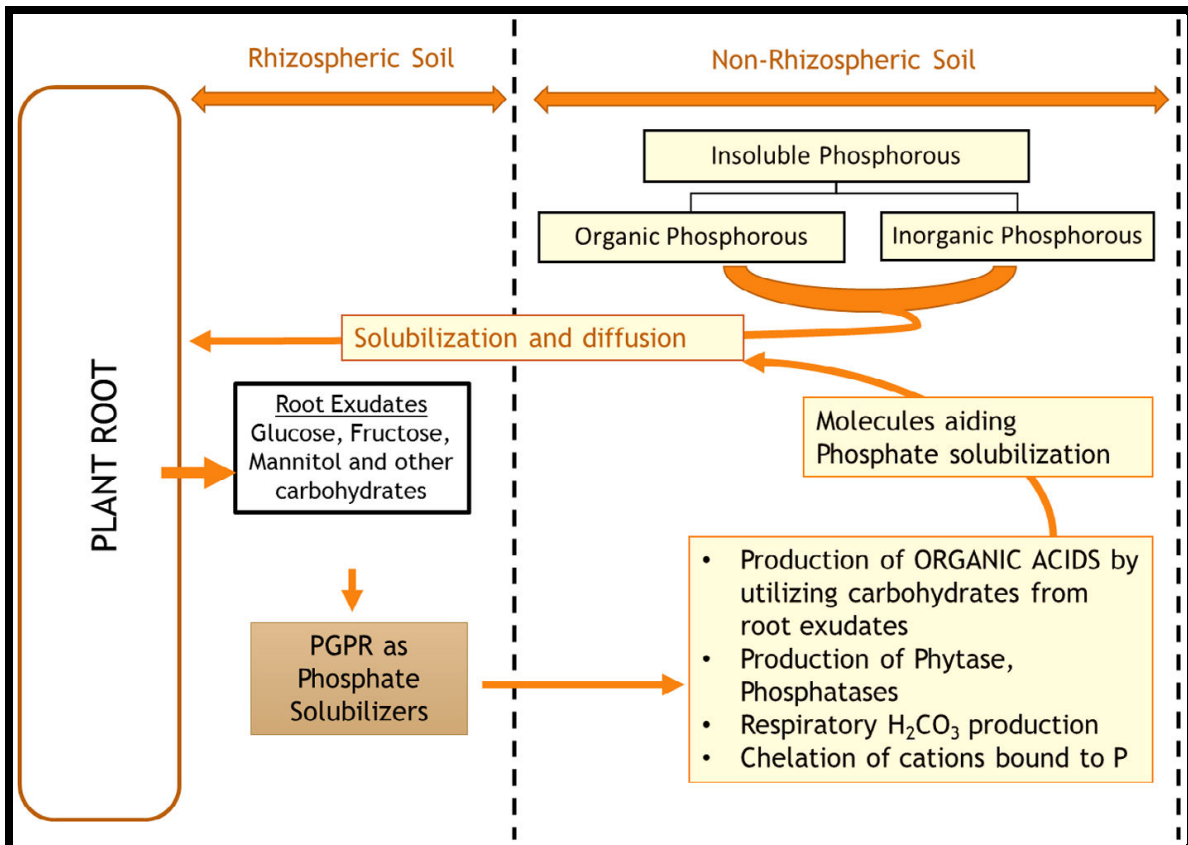


Figure 7 : Résumé schématique du mécanisme de solubilisation du phosphate utilisé par les PGPR (Goswami *et al.*, 2016).

6.1.2.c. Le Potassium

Le potassium (K) est un macronutriment essentiel, largement nécessaire au fonctionnement normal des plantes, cependant, les formes insolubles du K posent un réel problème limitant la production agricole (Etesami *et al.*, 2017). Certains microorganismes, en particulier les bactéries, convertissent la forme insoluble de K en formes solubles (Figure 8), à travers des réactions d'acidification, de chélation et d'échange (Meena *et al.*, 2013).

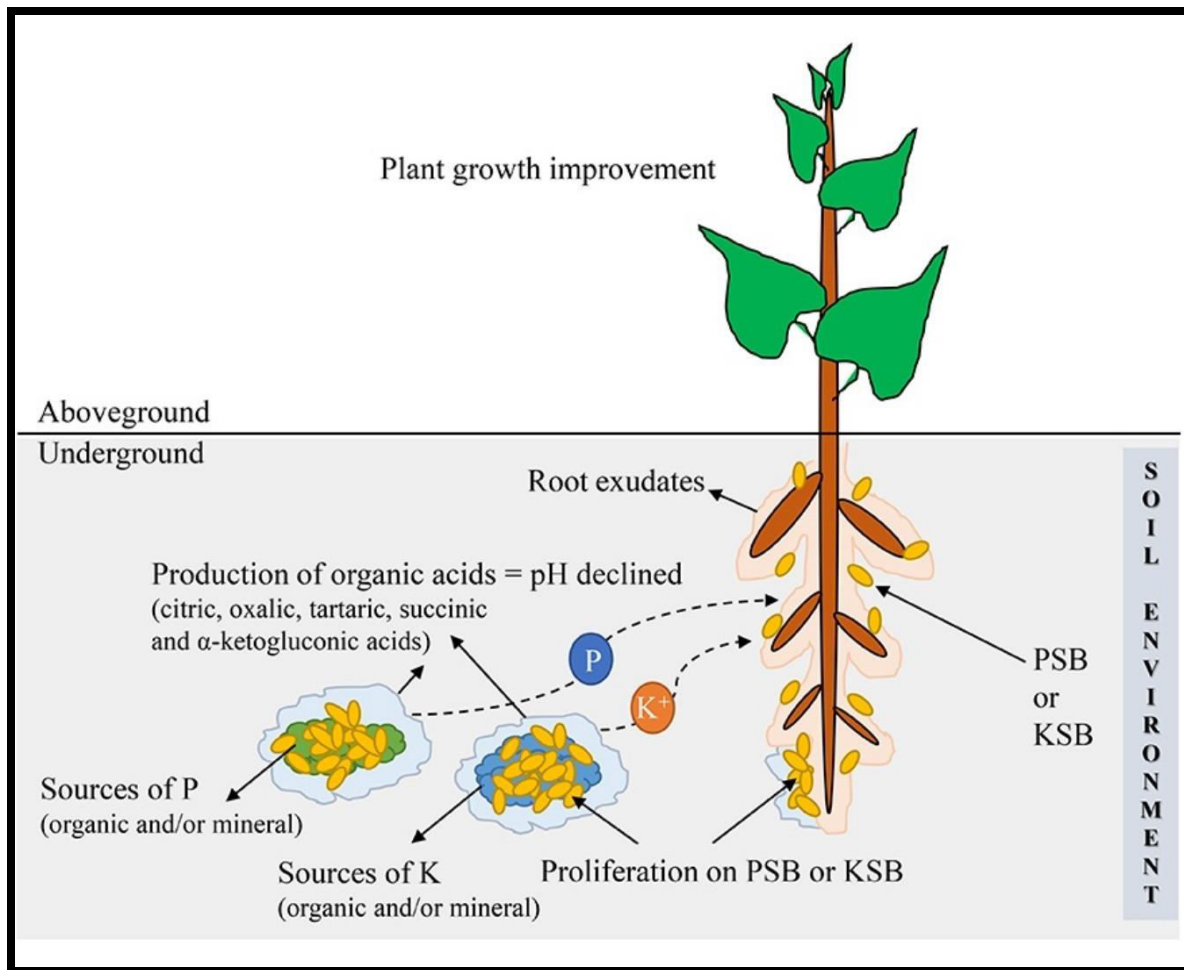


Figure 8 : Mécanismes de solubilisation du P et du K par les PGPR (Bakhshandeh *et al.*, 2017)

PSB = bactérie solubilisatrice du P , KSB = bactérie solubilisatrice du K

6.1.2.d. Les composés organiques volatils (COV)

Les COV (Figure 9), composés de faible poids moléculaire et de pression de vapeur élevée, sont généralement produits par les microorganismes du sol par voies cataboliques, notamment la glycolyse, la protéolyse et la lipolyse (Schulz et Dickschat, 2007). Il a été signalé que ces composés organiques volatils produits par les PGPR favorisent la croissance des plantes, présentent une activité antimicrobienne et nématocide et induisent une résistance systémique des cultures (Raza *et al.*, 2013 ; Audrain *et al.*, 2015).

L'acétoïne et le 2,3-butanediol synthétisés par *Bacillus* sont les plus connus de ces composés et sont responsables d'améliorations significatives de la croissance des plantes. Certaines autres souches de PGPR émettent des COV pouvant directement et / ou indirectement induire des augmentations de la biomasse végétale, de la résistance aux maladies et de la

tolérance aux stress abiotique. L'émission de COV est, en effet, une propriété commune à une grande variété de microorganismes du sol, bien que l'identité et la quantité de ces composés volatils émis varient d'une espèce à l'autre (Effmert *et al.*, 2012 ; Kanchiswamy *et al.*, 2015).

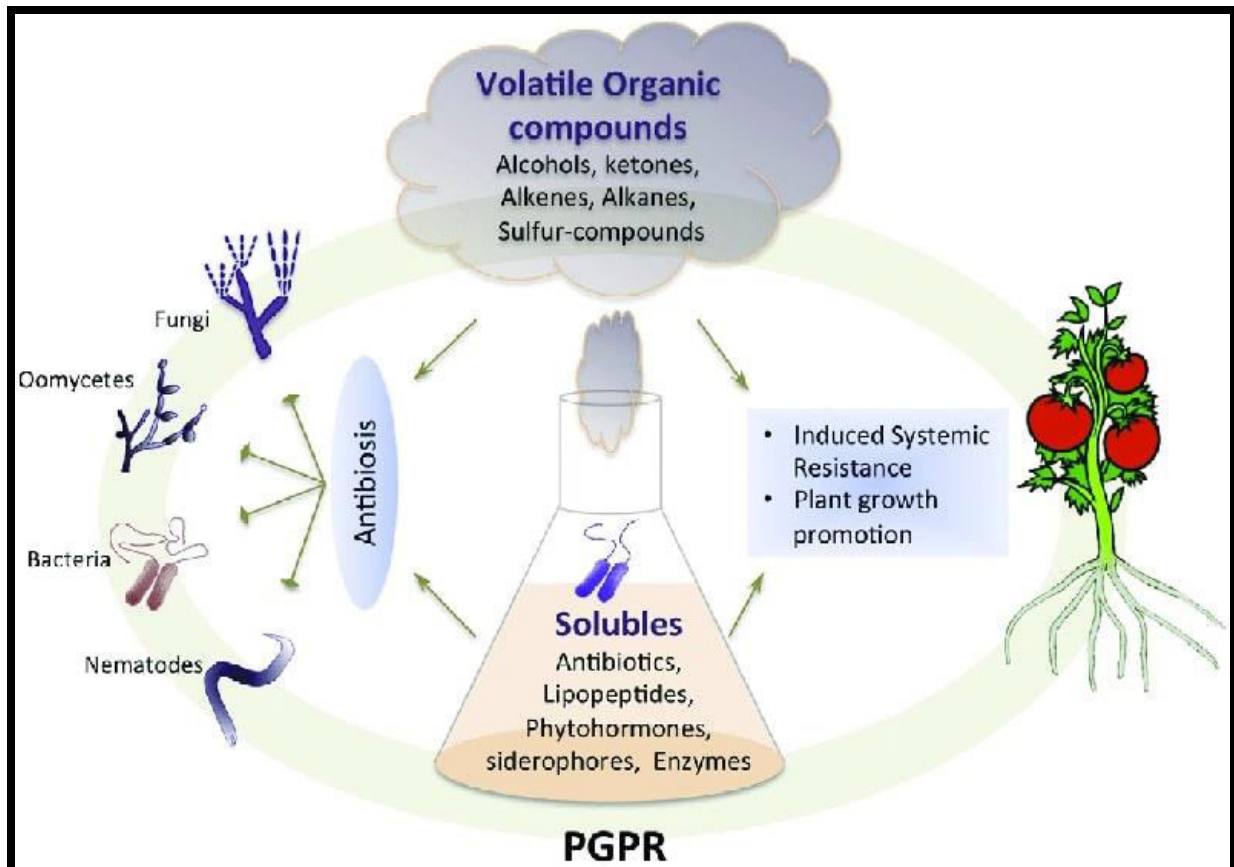


Figure 9 : Production des composés organiques volatiles par les PGPR (Raza *et al.*, 2016)

6.2. Les mécanismes indirects

Ces mécanismes indirects comprennent l'induction de la résistance systémique aux phytopathogènes (stress biotique) et la tolérance des mauvaises conditions environnementales (stress abiotique).

6.2.1. Production d'enzymes

L'un des principaux mécanismes utilisés par les agents de lutte biologique contre les agents pathogènes du sol implique la production d'enzymes (Figure 10) dégradant les parois cellulaires (Chet *et al.*, 1990). Les enzymes dégradant les parois cellulaires telles que la β -1,3-

glucanase, la chitinase, la cellulase et la protéase sécrétées par les souches de lutte biologique des PGPR exercent un effet inhibiteur direct sur la croissance hyphale d'agents pathogènes fongiques en dégradant leurs parois cellulaires (Neiendam-Nielsen et Sørensen, 1999).

Ainsi, les bactéries *Pseudomonas spp.*, par le biais de la production de chitinase et de bêta-glucanases, inhibent *Rhizoctonia solani* et *Phytophthora capsici*, deux des agents pathogènes des cultures les plus destructeurs au monde. (Arora *et al.*, 2008).

6.2.2. L'induction de la résistance aux agents pathogènes des plantes

L'inoculation de *Pseudomonas fluorescens* aux racines du pois a induit une accumulation de lignine dans les cellules des racines et une colonisation inhibée par l'oomycète *Pythium ultimum* (Benhamou *et al.*, 1996). Le même résultat a été observé avec une souche de *Pseudomonas putida* inoculée sur des racines de haricot (Anderson et Guerra, 1985). Ces modifications de la paroi cellulaire ont été rapportées dans le cas des PGPR protégeant les plantes contre les phytopathogènes, c'est donc le renforcement de la paroi cellulaire par une synthèse accrue de lignine et une apposition de callose (Figure 10) qui limite la progression des phytopathogènes dans les tissus végétaux (García-Gutiérrez *et al.*, 2013).

6.2.3. Production d'antibiotiques

L'utilisation d'antagonistes microbiens contre les phytopathogènes dans les cultures agricoles a été proposée comme alternative aux pesticides chimiques. Les RPGR appartenant aux espèces *Bacillus* et *Pseudomonas* jouent un rôle actif dans l'inhibition des micro-organismes pathogènes en produisant des antibiotiques, métabolites extracellulaires inhibitrices, même à faibles concentrations (Hammer *et al.*, 1997).

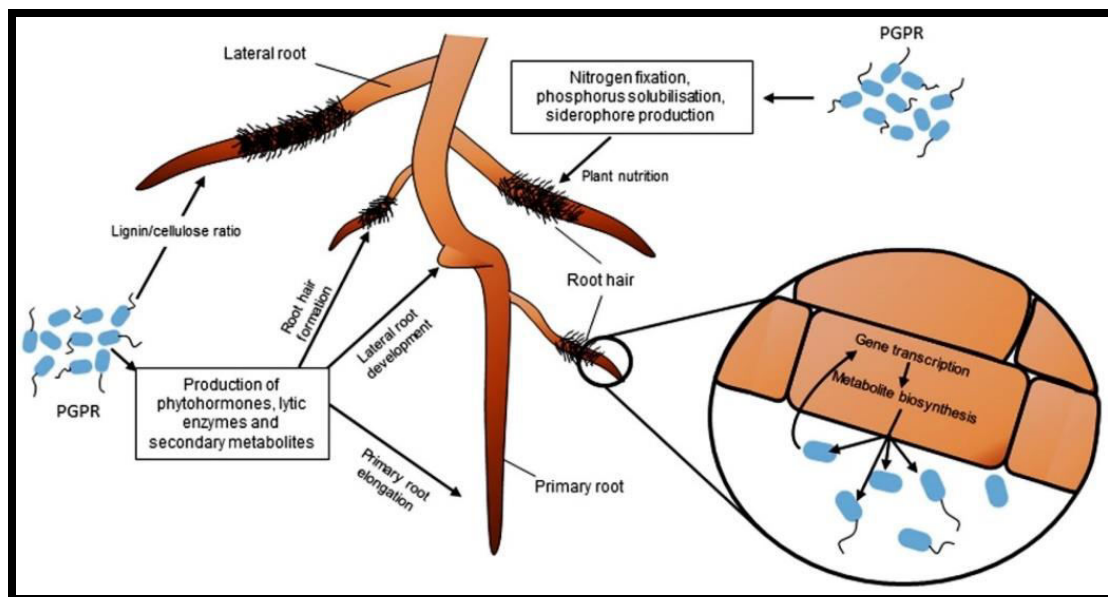


Figure 10 : Schémas montrant l'effet des différents métabolites des PGPR (Vacheron *et al.*, 2013).

6.2.4. Production de sidérophores

Le fer (Fe) est un nutriment essentiel pour les plantes. Il agit en tant que cofacteur dans plusieurs enzymes essentielles à des processus physiologiques importants tels que la respiration, la photosynthèse et la fixation d'azote, de sorte que sa déficience se manifeste par des modifications métaboliques graves, il est assez abondant dans les sols mais, souvent indisponible pour les plantes ou les micro-organismes du sol (des oxydes et des hydroxydes hautement insolubles), certaines bactéries de la rhizosphère sont capables de libérer des molécules chélatant le fer, dites sidérophores, dans la rhizosphère et servent donc à attirer le fer vers la rhizosphère où il peut être absorbé par la plante (Payne, 1994).

Les bactéries productrices de sidérophores appartiennent généralement au genre *Pseudomonas*, les organismes les plus étudiés sont les *Pseudomonas fluorescens* et *P. aeruginosa* libérant des sidérophores de type pyochéline et pyoverdine (Haas et Défago, 2005).

Ces Bactéries promeuvent la croissance des plantes à différents niveaux :

- Ils améliorent la nutrition des plantes en fer,
- Inhibent la croissance d'autres micro-organismes avec la libération de leurs molécules antibiotiques.
- Et entravent la croissance des agents pathogènes en limitant le fer disponible pour l'agent pathogène, généralement les champignons, qui sont incapables d'absorber le complexe fer-sidérophore (Shen *et al.*, 2013).

6.2.5. La tolérance aux stress abiotiques

Les plantes sont exposées à un large éventail de stress environnementaux tels que les températures élevées, le froid, la sécheresse, la salinité et l'alcalinité. Le stress abiotique est la cause principale des pertes de récoltes dans le monde (plus de 30%), la **salinité**, par exemple, limite le rendement des cultures en raison de la réduction de la photosynthèse, de la respiration et de la synthèse des protéines (Ahmad et Prasad, 2011). Elle provoque des troubles nutritionnels chez les plantes qui entraînent des carences nutritionnelles et une augmentation considérable des niveaux de Na⁺ (Zahedi *et al.*, 2012).

Selon plusieurs chercheurs, les PGPR modulent le niveau de marqueurs de stress chez les plantes soumises à un stress abiotique : la L-proline (un acide aminé) est un marqueur de stress qui s'accumule dans les tissus végétaux sous plusieurs stress abiotiques. Dans l'ensemble, la L-proline joue un rôle majeur dans l'ajustement osmotique chez les plantes. Un rapport de Razi et Sen (1996) a suggéré l'application foliaire d'un *Klebsiella sp.* Diazotrophique qui pourrait atténuer les effets du stress dû à la sécheresse sur le riz des zones humides.

Un autre effet majeur des PGPR est l'amélioration du statut hydrique des feuilles lors du stress dû à la **sécheresse** (Sarma et Saikia, 2013) ont rapporté que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* avait amélioré la croissance des plants de *Vigna radiata* (haricot mungo) dans des conditions de sécheresse (Ahmad *et al.*, 2013) ont prouvé que les plantes inoculées avec des PGPR ont tendance à améliorer leur efficacité d'utilisation de l'eau en élevant leur conductance stomatique, ce qui pourrait être bénéfique pour l'environnement en termes de réduction de l'utilisation excessive d'eau.

Certaines PGPR, notamment les *Pseudomonas*, peuvent également aider les plantes à résister aux **contaminations par les métaux lourds** ou d'autres polluants (Jing *et al.*, 2007). Par conséquent, l'utilisation des PGPR est une nouvelle approche prometteuse pour améliorer le succès de la phytoremédiation des sols contaminés.

Chapitre 2

Matériel

et méthodes

1. Présentation du matériel végétal

Citrullus colocynthis (Tableau 1) appartient à la famille des cucurbitacées, C'est une plante herbacée vivace qui pousse à l'état sauvage dans les rivages sableux, dans des conditions xérophiles, Les jeunes fruits sont charnus, marbrés de vert foncé et devenant généralement jaunes à maturité (Täckholm, 1974).

Tableau 1 : Position systématique du *Citrullus colocynthis* (Cronquist, 1988 ; APG, 2003).

Plantae	Tracheobionta (plantes vasculaires)
Super division	Spermatophyta (plantes à graines)
Division	Magnoliophyta (Angiospermae) , (plantes à fleurs)
Classe	Magnolipsida (Dicotylédones)
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Cucurbitales
Famille	Cucurbitaceae
Genre	<i>Citrullus</i>
Espèce	<i>Colocynthis</i>

Les fruits, les feuilles et les racines de *C. colocynthis* contiennent de grandes quantités de composants bioactifs ayant une valeur médicinale, ainsi, il a été utilisé traditionnellement pour le traitement du diabète, des maladies microbiennes, de l'ulcère, l'inflammation, la jaunisse et les maladies urinaires depuis l'antiquité. (N'mila *et al.*, 2000).

Citrullus colocynthis résiste aux températures élevées et pousse dans les régions désertiques d'Afrique du Nord, du Moyen-Orient et d'Asie occidentale. Elle contient probablement des gènes d'intérêt qui pourraient être explorés pour induire une résistance aux stress abiotiques chez les plantes : plusieurs recherches ont signalé que *C. colocynthis* avait une résistance élevée à l'oïdium (Davis *et al.*, 2007) et aux acariens de grande taille (Kousik *et al.*, 2007 ; Levi et Thomas 2005) ce qui donne un bref aperçu de ses perspectives biotechnologiques.



Figure 11 : *Citrullus colocynthis* (fruits, fleurs et tiges)

2. Présentation de la zone de Bir El-Ater

La région de Bir El-Ater appartient à l'extrémité orientale de l'Atlas Saharien et constitue la limite géographique naturelle entre les hauts plateaux constantinois et le domaine saharien (Benchebra et Mansoura, 2016).

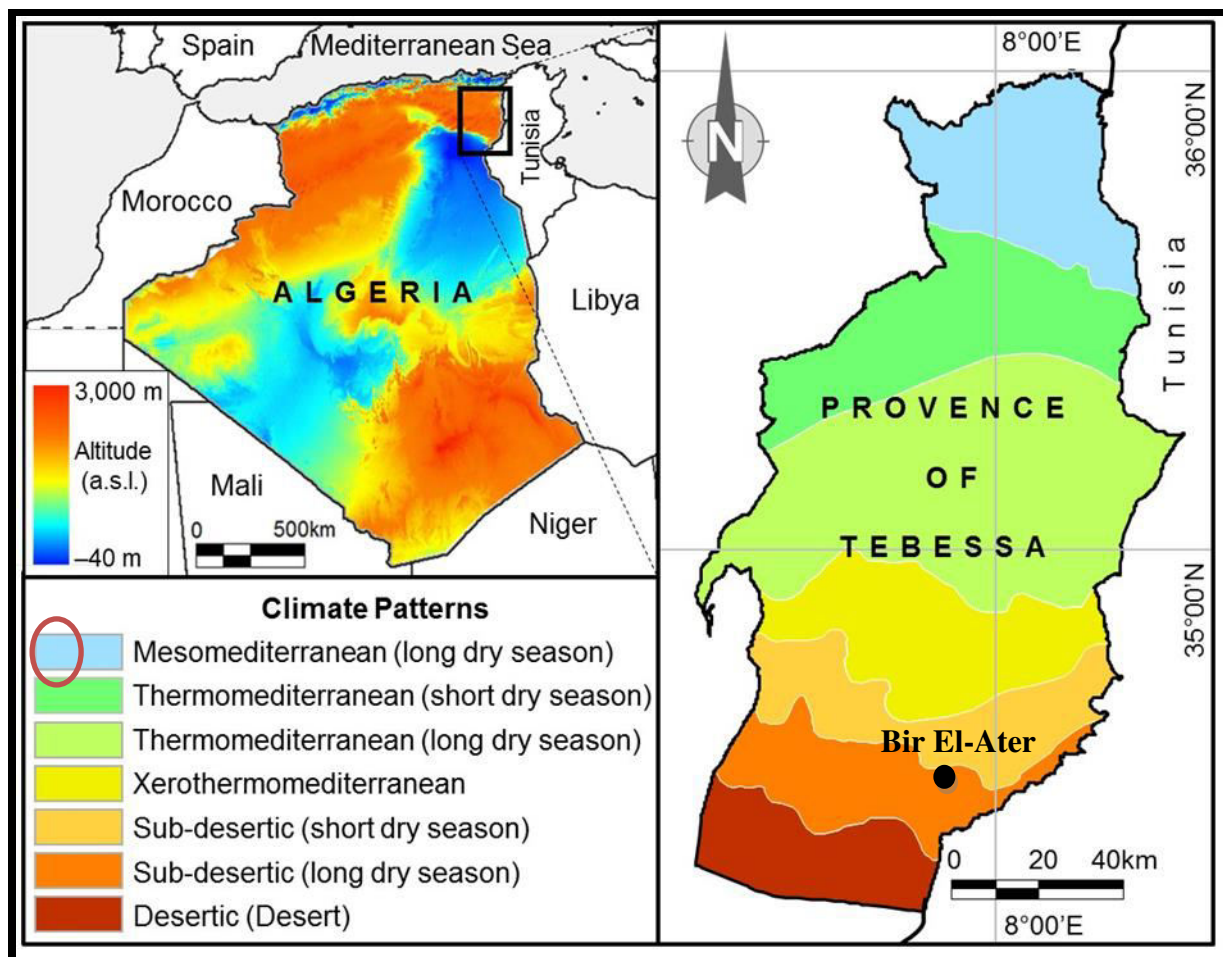


Figure 12 : Carte bioclimatique de la w. de Tebessa (UNESCO, 1963)

Le climat est subaride (Figure 12), caractérisé par un régime continental avec deux saisons très nettes : un hiver froid rigoureux et un été où les températures peuvent dépasser 45°C. Les précipitations sont peu abondantes avec une moyenne de 300 mm/an d'ailleurs la période sèche s'étale sur huit mois de l'année : d'avril à novembre.



Figure 13 : Paysage de la région de Bir El-Ater (Oued Frid)

Le sol de la région de Bir El-Ater se caractérise par une faible profondeur, ne dépassant pas 35 cm d'épaisseur, pauvre en matières organiques et en éléments fertilisants, l'exposant ainsi à l'érosion et la dégradation : détérioration de la structure du sol, un drainage souterrain insuffisant, la salinité et l'acidification du sol (Benmahmoud-Khattabi, 2012). La végétation peu dense et sporadique (Figure 13), formée surtout de variétés steppiques telles que l'Alfa et l'armoise et d'autres plantes qui s'adaptent à un climat plus aride comme *Pegalum harmala*.

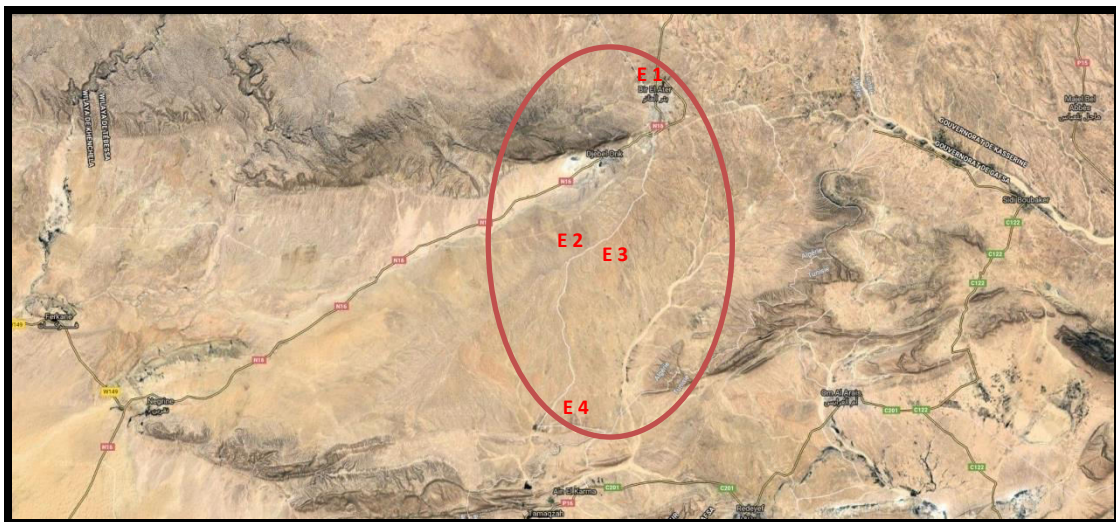


Figure 14 : Carte géographique des zones de prélèvement

E : Les zones de prélèvements Source : Google Maps

3. Sites choisis pour les prélèvements

Le 1^{er} sol étudié (E1) se situe au niveau de l'ancienne zone industrielle de Bir El-Ater, un terrain abandonné et non exploité. Le 2^{ème} sol étudié (E2) se trouve dans la région d'El-Azizia, un sol cultivé et irrigué : oliviers et autres arbres fruitiers alors que le 3^{ème} sol (E3) se situe à proximité de la rivière Oued Kebir (El-Azizia). Enfin, le 4^{ème} et dernier sol (E4) est localisé dans la région de Betita, sur les rives de Oued El-Frid (Tableau 2).

Tableau 2 : Coordonnées géographiques des sites de prélèvements

Les sols	Latitude	Longitude	Altitude
E1	N34.76°	E8.07°	866 m.
E2 et E3	N34.55°	E8.06°	582 m.
E4	N34.46°	E7.99°	490 m.



a- E1



b- E2



c- Oued Kebir



d- E3



e- Région de Betita



f- E4

Figure 15 : Les sites de prélèvements

4. Prélèvement des échantillons du sol

La technique de prélèvement (Figure 16) consiste à enfoncer une spatule stérile dans le sol à profondeur de 10 à 20 cm à proximité des racines et de placer les prélèvements dans des flacons stériles étiquetés et conservés à l'obscurité (Chen, 2018).



Figure 16 : Prélèvement des échantillons du sol de la rhizosphère de *Citrullus colocynthis*, Bir El-Ater, le 15 février 2019

5. Analyse chimique du sol

Afin de mesurer la teneur des sols étudiés en éléments NA, Ca et K, on agite trois échantillons de 10g de chaque sol étudié dans 100 ml d'eau distillée pendant 5 min, après filtration par papier filtre, on récupère le filtrat de chaque échantillon pour doser les minéraux ciblés : Na, Ca et K et pour mesurer la conductivité et le pH en utilisant respectivement un spectrophotomètre à flamme et un pH mètre à électrodes (Diallo *et al.*, 2015).



Figure 17 : Spectrophotomètre à flamme

6. Préparation des milieux et mise en culture

6.1. Les séries de dilutions

A l'aide d'une micropipette de 1000 μL , une série de dilutions (10^{-1} à 10^{-6}) a été préparée pour chaque échantillon en prélevant 1 g du sol et le plaçant dans 9 ml d'eau distillée stérile dans un tube à essai stérile pour obtenir une dilution 10^{-1} (Figure 18), puis on répète la même opération en ajoutant 9 ml d'eau distillée à 1 ml de chaque dilution jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6} .



Figure 18 : Les séries de dilutions

6.2. Isolement de cultures pures

On a opté à travailler avec les dilutions allant de 10^{-3} Jusqu'à 10^{-6} , ensemencés à la surface, 100 μL de chaque dilution ont été prélevés puis étalés sur les milieux King A et King B (Tableau 3) dans des boîtes de pétri stériles portant les indications nécessaires (dilution, milieu de culture et origine des souches) qui ont été incubées à 30°C pendant 72 heures.

Tableau 3 : Composition des milieux de différenciation des *Pseudomonas Sp* (King *et al.*, 1954).

Milieu King A :		Milieu King B :	
Ingrédients	g/l	Ingrédients	g/l
- peptone	20.0	- peptone	20,0
- Potassium sulphate	10.0	- Dipotassium hydrogen phosphate	1,50
- Magnesium chloride	1.4	- Magnesium sulphate heptahydrate	1,50
- Agar	15.0	- Agar	12,0
	pH 7.2±0.2		pH 7,2±0,2

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation selon l'aspect des colonies bien isolées qui seront repiquées sur le milieu NBRIP liquide (Tableau 4) et incubées à 30°C pour une durée de 72 heures avant de subir les différents tests.

Tableau 4 : Composition du milieu NBRIP liquide (Nautiyal *et al.*, 1999).

Milieu NBRIP liquide :	
Ingrédients	g/l
- Glucose	10,0
- Tricalcium phosphate	5,0
- Magnesium chlorure hexahydrate	5,0
- Magnesium sulfate heptahydrate	0,25
- Potassium chloride	0,2
- Ammonium sulfate	0,1
- Eau distillée	1000 ml

6.3. Stockage et préservation

1 ml de chaque souche isolée sera conservé à – 80°C dans des flacons Eppendorf additionnés de glycérol pour des études ultérieures (longue durée) ; Le reste de l'inoculum sera stocké dans des tubes à essai stériles à - 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les risques de variations pendant les différents tests de notre étude (Botton *et al.* 1990).

6.4. Test cétrimide (milieu sélectif de *Pseudomonas aeruginosa*)

La formule du milieu gélose cétrimide est dérivée de celle du milieu King A, contenant en plus l'antiseptique cétrimide qui agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les *Pseudomonas*, à part l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. : un léger jaunissement du milieu (après 48 h d'incubation à 30°C) révèle la présence de cette bactérie (Brown et Lowbury, 1965).

7. Evaluation de l'efficacité des microorganismes isolés comme de potentiels PGPR

7.1. Préparation des souches

37 isolats potentiels de cultures pures de *Pseudomonas Sp* ont été choisis pour subir les différents tests, ces souches ont été repiquées sur le milieu NBRIP liquide et conservées à -4°C.

7.2. Test de solubilisation du phosphate

On creuse 4 puits (répétitions) à l'aide d'une once de platine à la surface de chaque boîte de pétri contenant le milieu NBRIP agar, puis on dépose 10 μL de l'inoculum bactérien dans chaque puits, ces boîtes sont incubées à 28°C pour 3 jours.

La capacité de solubilisation est déterminée d'après l'existence d'un halo transparent qui correspond à la zone de lyse autour de la colonie bactérienne.

Cette efficacité de solubilisation est estimée comme un indice (Gonzalez *et al.*, 2018 ; Abiala *et al.*, 2015) : Diamètre de solubilisation / Diamètre de croissance.

7.3. Test de solubilisation de potassium

10 μL de chaque inoculum bactérien est transféré sur le milieu Aleksandrow (Tableau 5), les boîtes seront incubées à 30°C durant une période de 3 jours, la formation de zones claires prouve une solubilisation du potassium (Meena *et al.*, 2013).

Tableau 5 : Composition du milieu Aleksandrow (Meena *et al.*, 2013)

Milieu Aleksandrow	
Ingrédients	g/l
- Mg SO ₄ 7.H ₂ O	0,005
- Mica (source de K)	2,0
- Ca HPO ₄	2,0
- Ca CO ₃	2,0
- Fe Cl ₃	0,1
- Glucose	5,0
- Eau distillée	1000 ml
pH	7,2±0,2

L'indice d'efficacité de solubilisation est estimée comme suit :

Diamètre de solubilisation (zone claire) / Diamètre de croissance de la colonie bactérienne.

7.4. Test de solubilisation de potassium sur milieu modifié

Ce test a été expérimenté sous une autre variante plus stressante du milieu de solubilisation du potassium, en changeant la source de calcium, du CaCO₃ au CaO utilisé dans les amendements agricoles pour exterminer les microorganismes pathogènes afin de vérifier la réaction des isolats testés face à ce stress abiotique.

7.5. Test de production d'IAA

Les souches ont été inoculées dans un bouillon nutritif avec 500 µg ml⁻¹ de tryptophane, ces cultures ont été incubées à 28°C sous agitation constante de 150 t/min durant 4 jours, elles seront centrifugées à 13400 t/min pour une durée de 10 min, Le surnageant est mixé avec le réactif de Salkowski avec un ratio de 2:1, le tout est incubé dans l'obscurité totale durant 75 min à une température ambiante, puis lu au spectrophotomètre à 525 nm (Gonzalez *et al.*, 2018).

Tableau 6 : composition du milieu et du réactif du test de production d'IAA (Gonzalez *et al.*, 2018)

Le Bouillon nutritif		Réactif de Salkowski	
Ingrédients	g/l	Ingrédients	ml
- Peptone	5,0	- Fe Cl ₃ (0,5 M)	5
- Beef extract	3,0	- H ₂ SO ₄	150
- Eau distillée	1000 ml	- Eau distillée stérile	250
	pH 7,4±0,2		

8. Analyses statistiques

L'exploitation des résultats obtenus a été menée par le logiciel Mintab16 afin de réaliser l'analyse des variances et les comparaisons multiples entre les moyennes. Tandis que la classification hiérarchique ascendante (CAH) et l'analyse des composantes principales ont été réalisées avec Excelstat version 2014.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1. Analyse chimique du sol

L'analyse chimique du sol (Tableau 7) a montré que les sols des zones E3 et E4 sont riches en Na et en Ca, par rapport aux deux premières zones, il est à observer aussi que les 4 sols sont riches en K, spécialement le 2^{ème} sol, vu la spécificité agricole de la région qui peut être amendée par des engrais.

Tableau 7 : résultats de l'analyse chimique des sols étudiés

Zone de prélèvement	Teneur (concentration en ppm)			pH	Conductivité (μS)
	Na	Ca	K		
E1	2,67 ± 0,00	10.42 ± 0.93	746.35 ± 113.62	6,96±0,08	199,43 ± 8,45
E2	16.67 ± 8.08	9.35 ± 2.46	1000.41±164.37	7,19±0,26	197,80 ± 8,01
E3	69.56 ± 2.69	43.65 ± 0.00	755.46 ± 75.72	7,30±0,19	146,9 ± 11,85
E4	61.78 ± 2.69	42.58 ± 0.93	904.47 ± 67.02	7,05±0,17	220,00 ± 10,82

2. Isolement des souches pures

L'isolement des souches à partir des dilutions allant de 10^{-3} à 10^{-6} nous a permis d'isoler 37 isolats selon leur aspect macroscopique : couleur, forme, texture . Nous avons constaté une grande diversité de colonies dans les deux milieux utilisés (King A et King B) réputés pour permettre la différenciation entre les espèces du genre *Pseudomonas* (Figure 19), par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques.

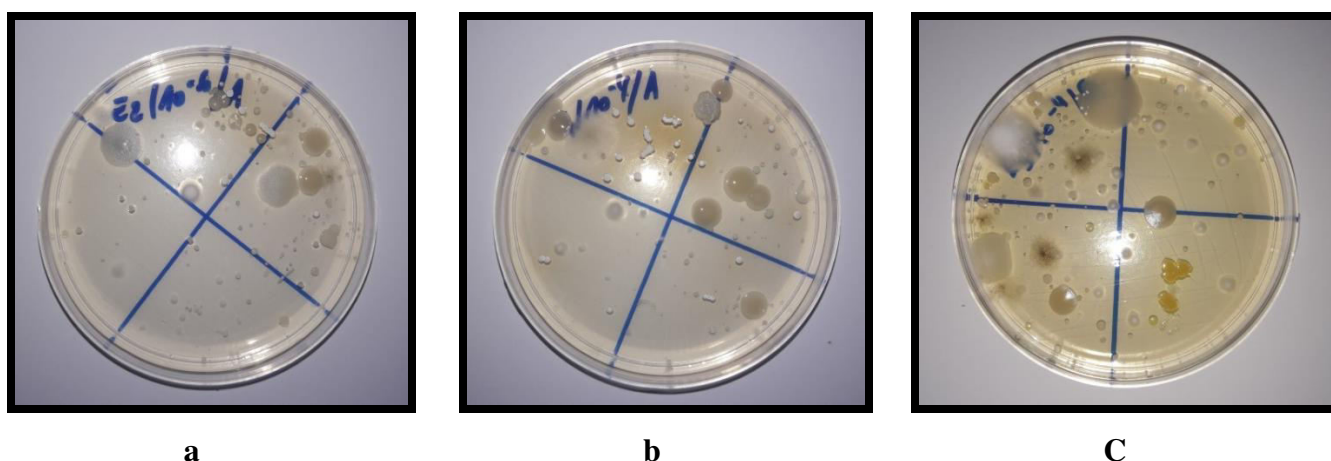


Figure 19 : Aspect macroscopique des isolats sur milieux King A (a et b) et King B (c)

3. Le test cétrimide

A partir du test cétrimide révélateur des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 20), on a pu distinguer la présence de deux isolats seulement (E 3B4 et E1B2) qui ont pu se développer sur le milieu spécifique cétrimide. Toutefois, on a remarqué que la coloration jaune vert est plus marquée chez l'isolat E3B4 comme il est signalé pour *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie pathogène opportuniste, responsable de pneumonies nosocomiales et d'infections respiratoires chroniques alors que le léger jaunissement non fluorescent de l'isolat E1B2 pourrait être synonyme de présence d'autres bactéries telles que *Klebsiella* ou *Enterobacter*, pour valider la présence de *P. aeruginosa*, des tests ultérieurs doivent être menés : gram -, oxydase +, Pyocyanine + et une culture à 42°C (Brown et Lowbury, 1965).



Figure 20 : Détection de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu cétrimide

4. Test de solubilisation du phosphate

La figure 21 montre la zone de lyse autour des colonies bactériennes qui démontre le pouvoir des isolats à solubiliser le phosphate notamment l'isolat E3B2 qui a montré le plus haut indice de solubilisation suivi des isolats E1B3 et de E1A6) .

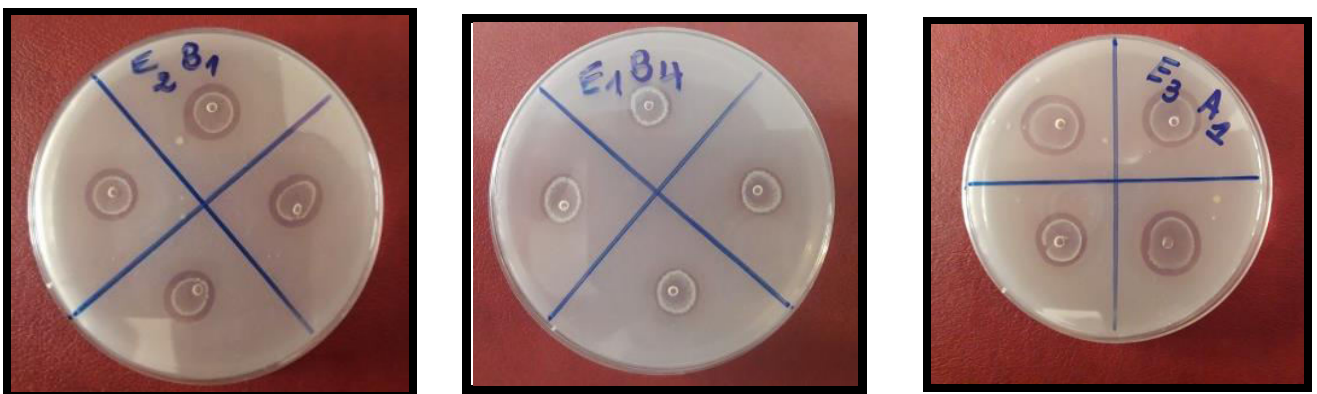


Figure 21 : Solubilisation du phosphate par les isolats testés

Tableau 8 : Tableau de l'analyse de variance

Paramètre	source	D.L	S.C	CM	F	P
S.P	Isolats	11	3,9061	0,3551	23,03	0.000***
	Erreur	36	0,5551	0,0154		
	Total	47	4,4612			
S.K	Isolats	17	3,5263	0,2074	5,48	0,000***
	Erreur	54	2,0426	0,0378		
	Total	71	5,5688			
S.K.M	Isolats	3	375,21	125,07	59,72	0.000***
	Erreur	12	25,13	2,09		
	Total	15	400,34			
IAA	Isolats	35	7,449388	0,212840	477,25	0.000***
	Erreur	72	0,032110	0,000446		
	Total	107	7,481498			

L'analyse statistique a révélé une différence très hautement significative entre les indices de solubilisation du phosphate enregistré par les 12 isolats (Figure 22) qui ont montré un pouvoir de solubilisation, ($P=0 < 0.001$) regroupés ainsi en six groupes par le test de Tukey à un risque $\alpha = 5 \%$ (annexe n°2). Ceci va dans le sens d'études antérieures qui ont estimé que les micro-organismes solubilisant les phosphates constituent 20 à 40% des populations de micro-organismes qui peuvent être isolées de la rhizosphère (Chabot *et al.*, 1993).

Pseudomonas fluorescens, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* et *Burkholderia cepacia* seraient des producteurs efficaces de gluconique acide qui est l'agent efficace le plus fréquent dans la solubilisation du phosphate minéral (Rodríguez et Fraga, 1999).

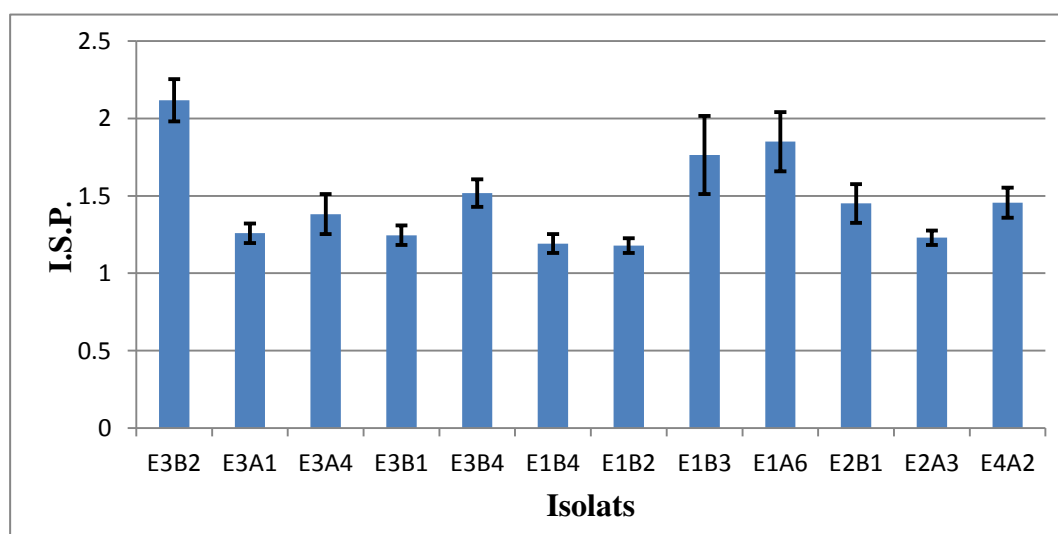


Figure 22 : Diagramme des indices de solubilisation du phosphate par les isolats testés

5. Test de solubilisation du potassium

La zone claire autour des colonies bactériennes (Figure 23) est signe de solubilisation du potassium



Figure 23 : solubilisation du potassium sur milieu Aleksandrow

La figure 27 montre les 18 isolats qui ont pu solubiliser le K à partir du milieu conventionnel Aleksandrow, l'isolat E1A3 (Figure 24) a montré le plus important taux de solubilisation suivi de E4B1 et E2A2. L'analyse statistique a révélé une différence très hautement significative entre les isolats ($p=0 < 0,001$) pour la solubilisation du potassium sur milieu Aleksandrow, regroupés en 4 groupes différents par le test de Tukey à un niveau de signification $\alpha = 5 \%$.

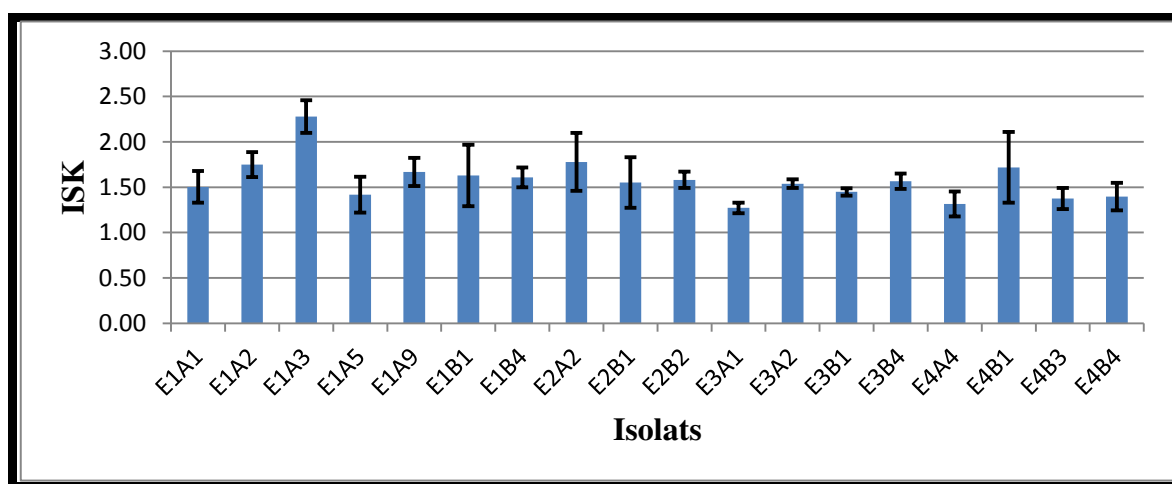


Figure 24 : Diagramme montrant l'indice de solubilisation du potassium dans le milieu Aleksandrow

Les résultats de ce test confirment les recherches antérieures (Meena *et al.*, 2013) qui ont démontré la présence d'une variété de bactéries dans le sol capables de solubiliser les différentes formes insolubles du potassium en produisant des acides organiques et inorganiques, pour améliorer ce test et le rendre plus fiable, Etesami *et al.*, (2017) proposent de modifier le milieu Aleksandrow en y incorporant un colorant indicateur : Le bleu de bromothymol.

6. Test de solubilisation du potassium sur milieu modifié

Cette variante du test de solubilisation du potassium, en changeant la source de calcium, du CaCO_3 au CaO vise à vérifier la capacité des bactéries étudiées à résister face à un stress abiotique, on a pu observer la réaction de 4 isolats qui ont pu solubiliser le K à partir du milieu Aleksandrow modifié (Figure 26), ce qui a donné des résultats différents de ceux du milieu conventionnel :

Ainsi deux isolats (E1A1, E1A2) ont pu solubiliser le potassium dans les deux milieux (conventionnel et modifié) par contre les deux isolats (E3B1 et E1B3) ont solubilisé le K seulement en condition de stress (milieu modifié), Ces résultats ont besoin d'être approfondies ultérieurement avec d'autres études pour élucider les mécanismes d'action impliqués notamment le fait que 75% des isolats qui ont réagit face au stress sont issus du 1^{er} site de prélèvement, ce qui pourrait avoir un lien direct avec la nature de ce site et ses conditions extremes auxquelles les bactéries se sont adaptées.

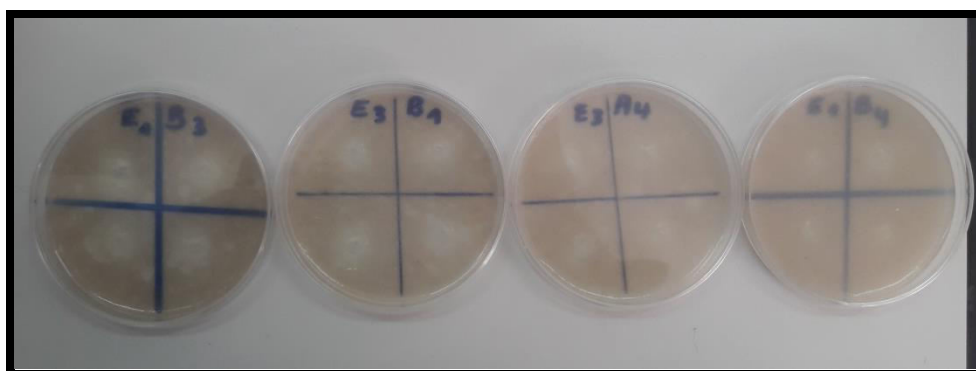


Figure 25 : Solubilisation du potassium sur milieu modifié

D'après la figure 26, l'isolat E1A1 a montré le plus important taux de solubilisation ; l'analyse statistique a révélé une différence très hautement significative entre les isolats pour la solubilisation du potassium sur milieu Alexandrow modifié regroupés en 3 groupes différents (annexe n°2) par le test de Tukey à un niveau de signification $\alpha = 5 \%$

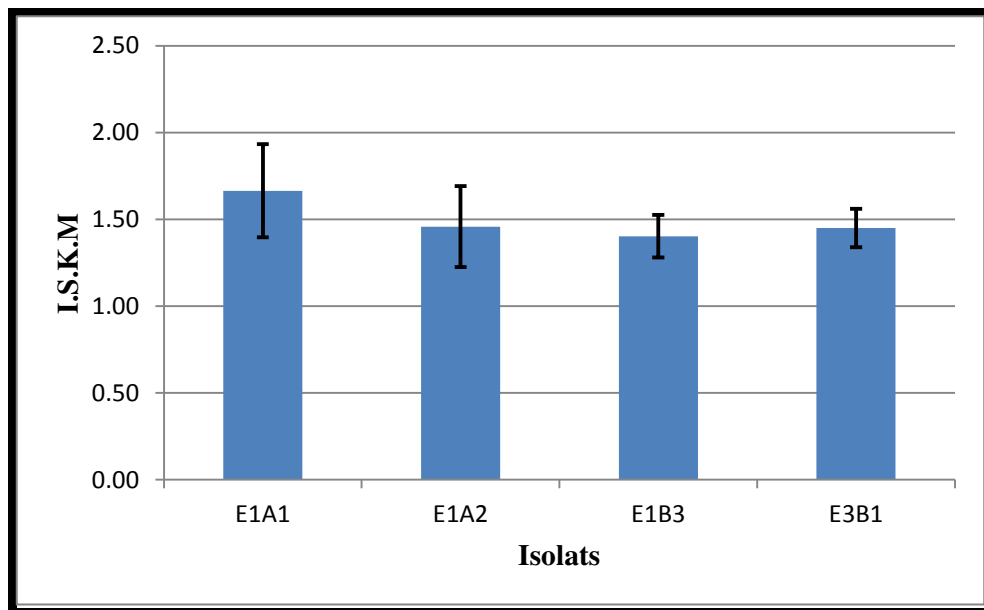


Figure 26 : Figure montrant l'indice de solubilisation du potassium dans le milieu Aleksandrow modifié par les isolats testés.

7. Test de production d'IAA

Le test qualitatif (Figure 27) marqué par le virage de la couleur du milieu de culture après l'ajout du réactif de Salkowski du rosâtre au marron indique une nette production de l'IAA par 36 isolats parmi les 37 testés en signalant que l'isolat E3B2 n'a pas pu transaminer le tryptophane en IAA.

Ceci nous pousse à juger la production d'IAA comme l'une des caractéristiques principales des PGPR comme l'ont avancé Aeron *et al.*, (2011), en signalant qu'environ 80% de la flore bactérienne de la rhizosphère produisent de l'IAA; ainsi, l'application de tels micro-organismes sur le terrain augmente les niveaux endogènes d'IAA de la plante et a donc un effet remarquable sur la croissance de cette dernière.

L'analyse statistique a révélé une différence très hautement significative entre les isolats pour la production d'IAA regroupés par le test de Tukey à un niveau de signification $\alpha = 5\%$ en 26 groupes différents (annexe n°2)

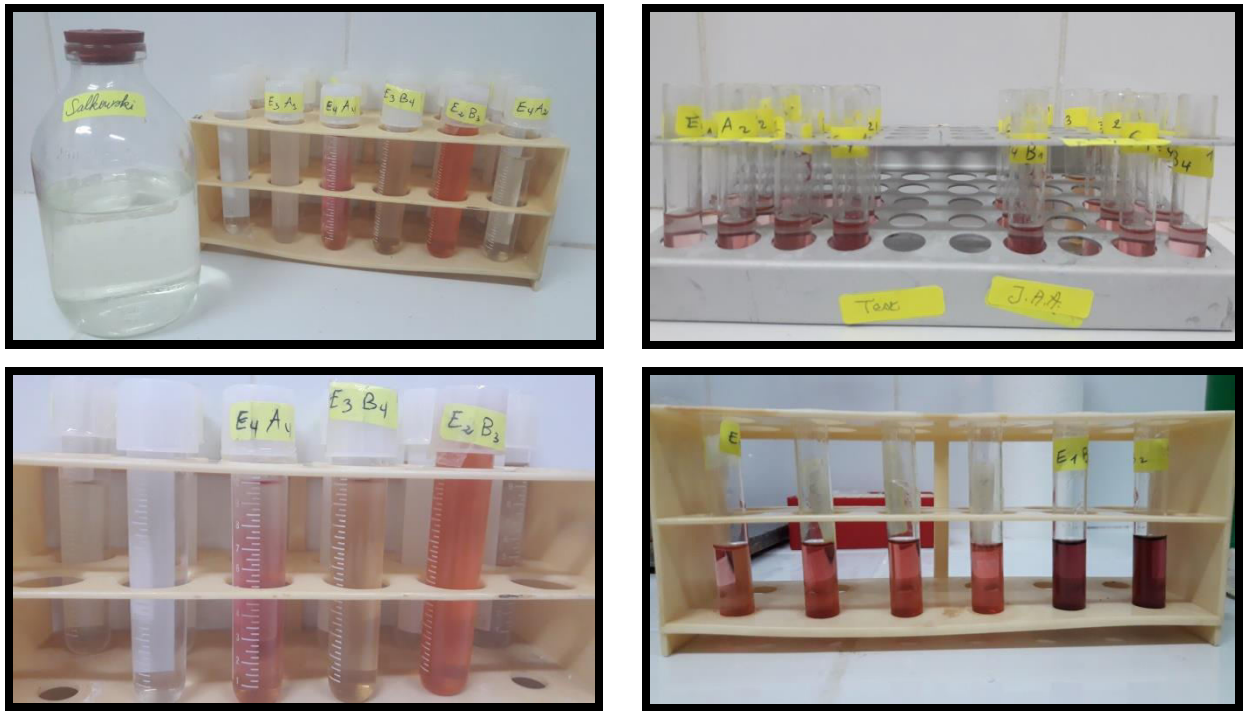


Figure 27 : Test de production d' IAA

Selon la figure 28, les isolats E1B2, E2A3, E2B4 et E2B3 sont les meilleures productrices d'IAA parmi les bactéries testées tandis que l'isolat E1A1 a montré la production la plus faible.

Le large éventail de taux de production d'IAA qui varie considérablement d'un isolat à un autre pourrait s'expliquer par le fait que les effets de concentrations variables en IAA varient selon les espèces de plantes : une concentration optimale d'IAA bactérienne a un effet stimulant, alors qu'une concentration élevée (supra-optimale) de celles-ci inhibe la croissance de ces racines primaires et stimulent la formation des racines latérales. (Spaepen *et al.*, 2007 ; Glick 2012).

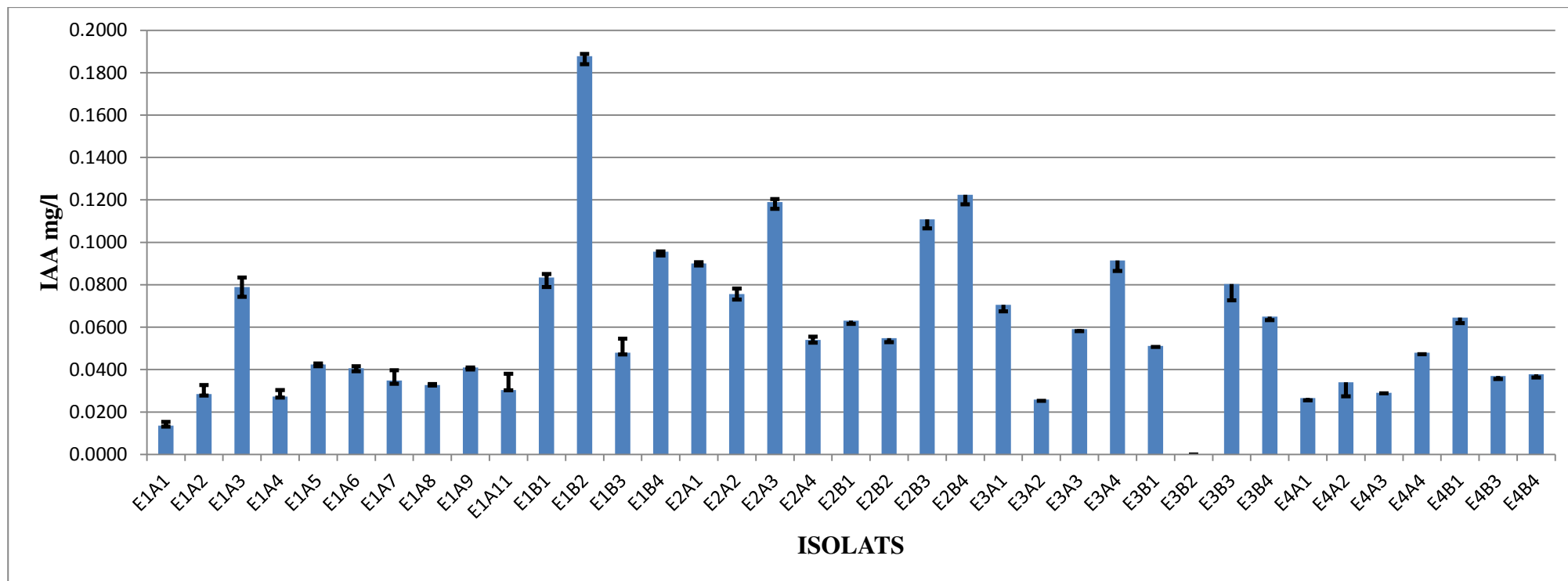


Figure 28 : Diagramme représentant la production d'IAA par les isolats testés

8. Les traits PGPR des isolats testés

D'autres part, la répartition proportionnelle des isolats selon les traits PGPR étudiés (Figure 29) nous permet de déceler la présence de onze isolats (30 %) productrices d'IAA seulement, cinq isolats (13 %) solubilisent le P et produisent l'IAA, treize isolats (35%) solubilisent le K et produisent l' IAA, quatre isolats (11%) produisent l'IAA et solubilisent le P et le K, un seul isolat (3%) capable de solubiliser le potassium dans le milieu modifié et le phosphate, deux isolats (5%) peuvent solubiliser le K dans le milieu modifié et le P et produisent l'IAA, enfin, un seul isolat (3%) caractérisé par une réaction positive dans l'ensemble des tests étudiés.

La figure 30 montre la capacité des isolats testés à présenter des traits PGPR intéressants notamment les isolats E3B4, E3B2, E3B1, E3A4, E3A1, E2B1, E1B4.

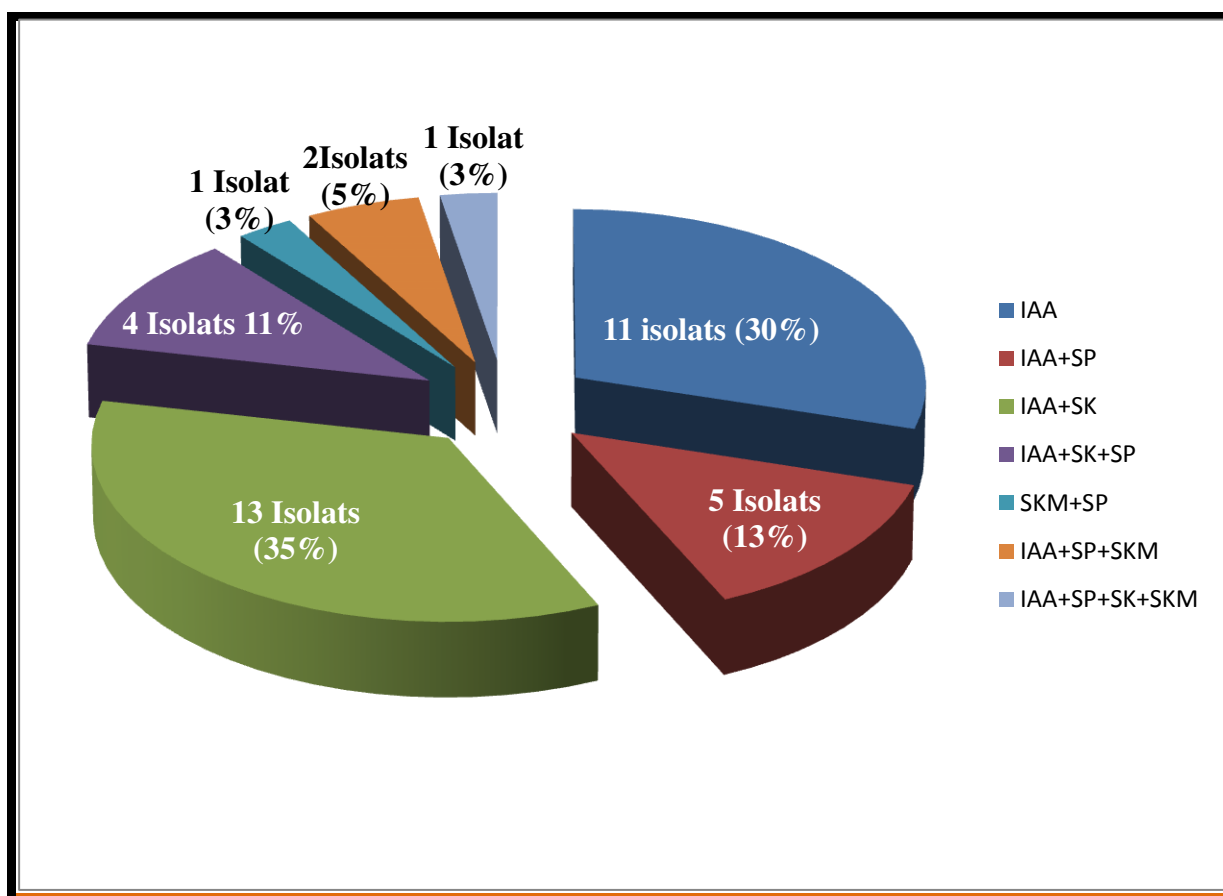


Figure 29 : La répartition proportionnelle des isolats selon les traits PGPR étudiés

La figure 31, montrant un schémas de la projection des isolats sur le plan biplot d'analyse des composantes principales, répartit l'ensemble des bactéries testés en quatre groupes distincts :

- le 1^{er} groupe caractérisé par la production de l'IAA (E1A11, E1A7, E1A4, E1A8, E2A1, E2B4, E2B3, E2A4, E3B3, E3A3, E4A3, E4A1), le 2^{ème} groupe relié à la solubilisation du potassium (E1B1, E1A9, E1A5, E1A1, E1A2, E1A3, E2B2, E2A2, E3A2, E4B4, E4B3, E4A4, E4B1), Le 3^{ème} groupe caractérisé par la solubilisation du phosphate et se composant des isolats (E1B3, E1B2, E1A6, E2A3, E3B2, E3A4 et E4A2).

En dernier lieu, il est très important de noter que le 4^{ème} groupe caractérisé par tous les traits PGPR étudiés est constitué des isolats (E1B4, E2B1, E3B4, E3B1 et E3A1).

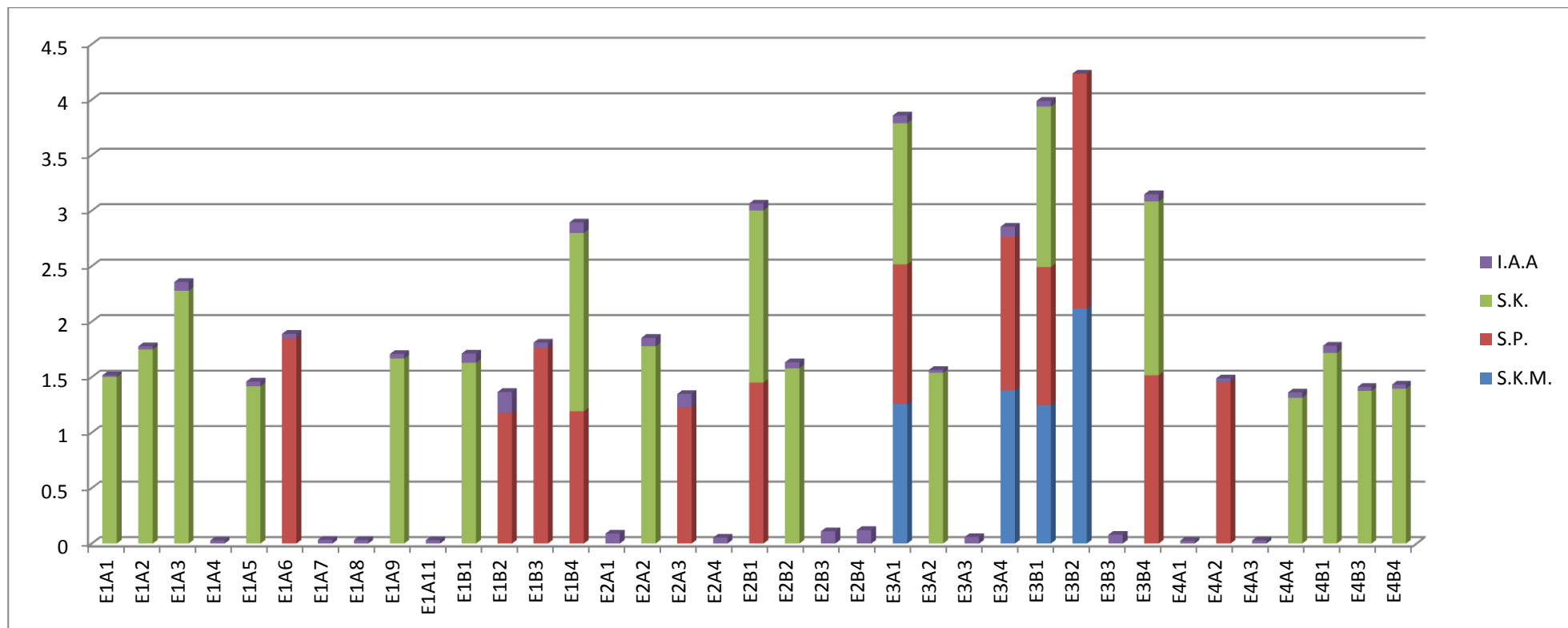


Figure 30 : Schémas représentant les traits PGPR chez les isolats testés

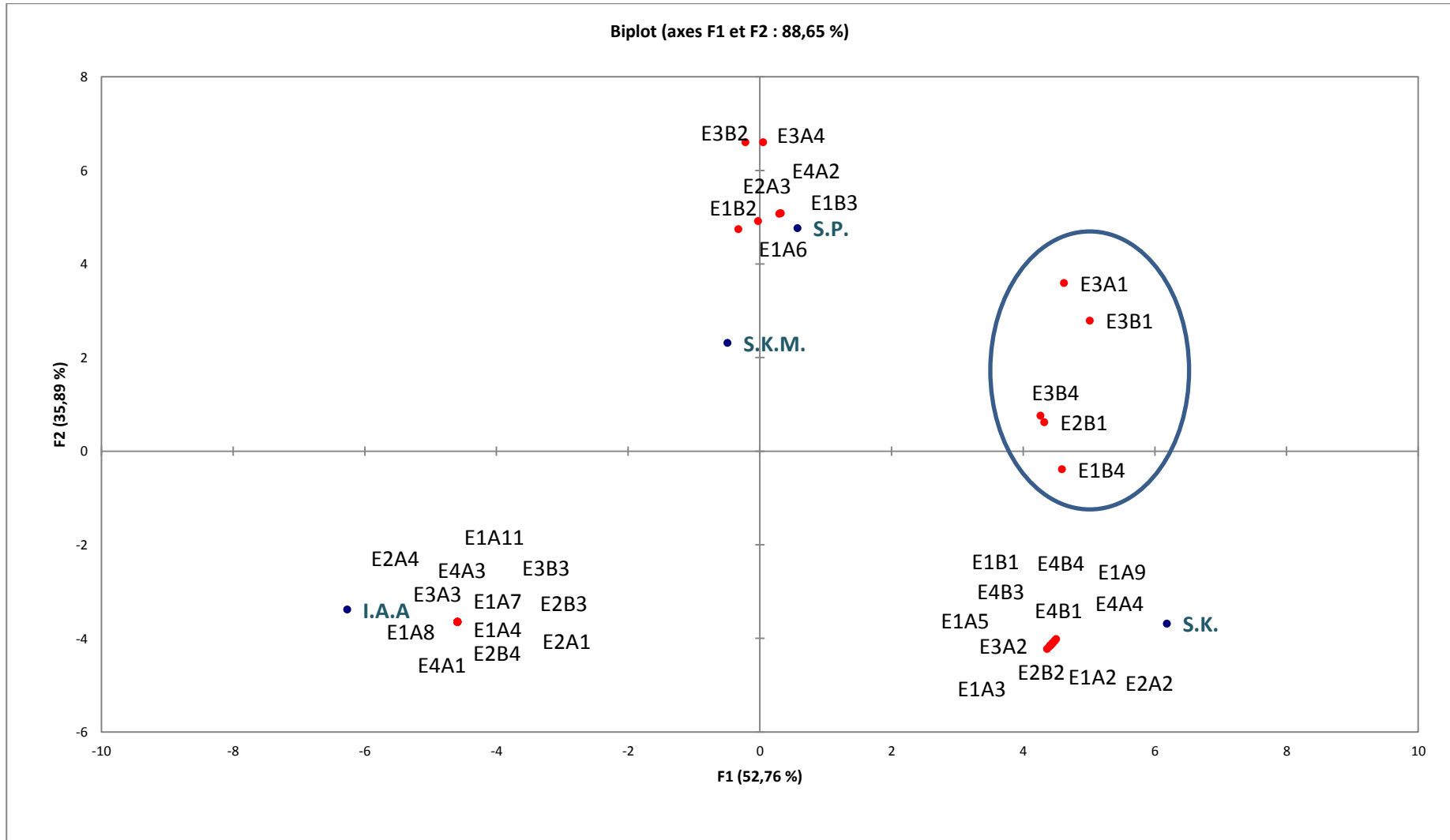


Figure 31 : Projection des isolats sur le plan biplot d'analyse des composantes principales (le cercle délimite les isolats à traits PGPR)

La diversité des isolats a été testée en utilisant une classification hiérarchique ascendante (Figure 32), (annexe 3) a fait répartir les bactéries de la rhizosphère de *Citrullus colocynthis* en 9 classes différentes comme mentionné dans le tableau 9.

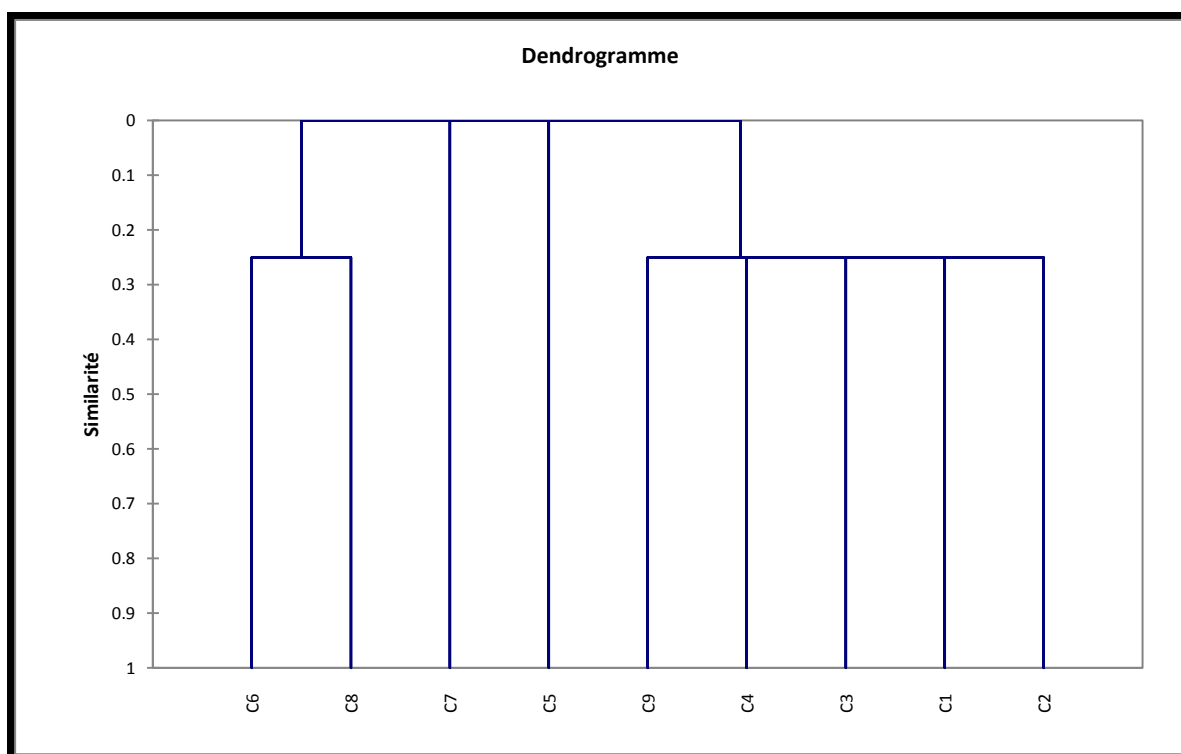


Figure 32 : Dendrogramme montrant les différentes classes des isolats testés à un seuil de similarité égale à 40 % (Annexe 3).

Tableau 9 : Répartition des isolats en classes

Classes	ISOLATS
1	E4B4, E4B3, E4B1, E4A4, E3A2, E2B2, E2A2, E1B1, E1A9, E4A3, E4A1, E3B3, E3A3, E2B4, E2B3, E2A4, E2A1, E1A11, E1A8, E1A4, E1A7, E1A5, E1A3, E1A1, E1A2.
2	E4A2, E2A3, E1B3, E1A6, E1B2.
3	E1B4.
4	E2B1.
5	E3A1.
6	E3A4.
7	E3B1.
8	E3B2.
9	E3B4.

Conclusion

Cette contribution à isoler des PGPR à partir de la rhizosphère de *Citrullus colocynthis* dans la région de Bir El-Ater, nous a permis d'identifier certaines bactéries caractérisées par des traits PGPR intéressants.

La majorité des bactéries isolées sont productrices d'IAA, même si le taux de production varie considérablement d'un isolat à l'autre. 12 isolats ont montré un pouvoir de solubilisation du phosphate alors que 18 isolats ont pu solubiliser le potassium, certains isolats ont même réagit dans le milieu de solubilisation de potassium modifié caractérisé par des conditions plus stressantes. Ce qui confirme la biodiversité des bactéries isolées de la même rhizosphère.

On a pu identifier 5 souches à intérêt agronomique, capables de produire l'IAA et de solubiliser le K et le P, ces souches-là peuvent être incorporées dans des programmes d'amélioration des rendements des végétaux à large consommation en les introduisant comme biofertilisants pour faciliter l'absorption des minéraux et réduire les besoins en engrais chimiques.

Il est très judicieux de signaler que ce travail doit être approfondi par des tests sous serre en inoculant d'autres espèces végétales par nos isolats à traits PGPR afin de tester leur potentiel à promouvoir la croissance des plantes, à induire la tolérance aux différents stress biotiques et abiotiques ainsi que la phytoremédiation des sols pollués et dégradés.

En dernier lieu, il est nécessaire d'identifier la position taxonomique de nos isolats par le séquençage génomique de la sous-unité ribosomale 16S rRNA et de séquencer les gènes de ménage comme les gènes responsables de la solubilisation du phosphate et du potassium.

Références bibliographiques

A

- 01 **Aeron A.**, Kumar, S., Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2011). Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiology. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiology: Crop ecosystems* (pp. 1–36). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-18357-7_1
- 02 **Abiala M. A.**, C. Odebode, S. F. Hsu, C. B. Blackwood, (2015) , Phytobeneficial Properties of Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Maize in Southwestern Nigerian Soils, *Applied and Environmental Microbiology* July 2015 Volume 81 Number 14
- 03 **Ahmad M.**; Zahir, Z.A.; Khalid, M. (2013) Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiol. Biochem.* 2013, 63, 170–176.
- 04 **Ahmad P.**, Prasad, M. N. V. (2011). Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Berlin: Springer Science & Business Media.
- 05 **Alexander M.** (1977). Introduction to soil microbiology (2nd ed.). New York, NY: Wiley.
- 06 **Anderson A. J.**, and Guerra, D. (1985). Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. *Phytopathology* 75, 992–995. doi:10.1094/Phyto-75-992
- 07 **Angiosperm Phylogeny Group** (2003), An update of the angiosperm phylogeny classification for the families of flowering plants, APG II, *Botanical Journal of The Linnean Society*, 141 : 399-436
- 08 **Antoun H.**, Prévost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1–38). Springer Netherlands.
doi:10.1007/1-4020-4152-7_1
- 09 **Arora N.K.**, Khare, E., Oh, J.H. (2008) Diverse mechanisms adopted by *Pseudomonas fluorescent* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24, 581–585.
- 10 **Audrain B.**, Frag, M.A., Ryu, C.M., Ghigo, J.M., (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 222–233.

B

- 11 **Bakhshandeh E.**, Pirdashti H., Lendeh K. S., (2017) Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice, *Ecological Engineering* Volume 103, Part A, June 2017, Pages 164-169 <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.03.008>
- 12 **Banik S.**, Dey, B. K. (1982). Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*, 69, 353–364. doi:10.1007/BF02372456
- 13 **Barber S. A.** (1995). Soil nutrient bioavailability: A mechanistic approach. New York, NY: Wiley.
- 14 **Benchebira A.**, Boumansoura L., (2016). Etude géostatistique d'un projet minier : cas du gisement de phosphate sus à Bled El-Hedba (w. Tébessa), Master en mines, Université de Béjaia
- 15 **Benhamou N.**, Belanger, R.R., and Paulitz, T.C. (1996). Pre-inoculation of RiT-DNA transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* Trow : an ultrastructural and cytochemical study. *Planta* 199, 105–117. doi: 10.1007/BF00196887
- 16 **Benmahmoud-Khattabi A.**, (2012). Espaces sub-arides : 40 ans de gestion traditionnelle et projets de développement (w. Tébessa) Magister en aménagement du territoire, Université de Constantine
- 17 **Bikle A.** , Montgomery, D. R., (2016), in <http://nautil.us/issue/34/adaptation/junk-food-is-bad-for-plants-too> , le 31/03/2016 (site internet)

18 **Botton B.**, Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P, (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (ed) Masson, Paris.

19 **Brown V. I.** , Lowbury E. J. L., (1965). Use of an improved cetrinide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*, J. clin. Path. (1965), 18, 752

C

20 **Chabot R.**, Antoun, H., Cescas, M. P. (1993). Stimulation in the growth of corn and romaine lettuce by microorganisms dissolving inorganic phosphorus. Canadian Journal of Microbiology, 39, 941–947. doi:10.1139/m93-142

21 **Chan W. L.**, (2018) Exploring growth enhancing rhizospheric microorganisms for silviculture of *Eucalyptus pellita*. Swinburne Univers of Tech

22 **Chet I.**, Ordentlich, A., Shapira, R., Oppenheim, A. (1990). Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. Plant and Soil, 129, 85–92. doi:10.1007/BF00011694

23 **Compant S.**, Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71, 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005

24 **Cronquist A.**, (1988), The evolution and classification of flowering plants. 2nd ed. Bronx, N.Y., USA : New York Botanical Garden

D

25 **Davis AR,** Levi A, Tetteh A, Wehner T, Russo V, Pitrat M. (2007). Evaluation of watermelon and related species for resistance to race 1W powdery mildew. J Am Soc Hortic Sci. 132:790–795.

26 **Desbrosses G. J.**,and Stougaard, J. (2011). Root nodulation : a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host development al pathways. Cell Host Microbe. 10, 348–358. doi: 10.1016/j.chom.2011.09.005

27 **Diallo M.D.**, Ngamb T., Tine A.K., Guisse M., Ndiaye E., Mahamatsalah M., Diallo A., Seck E., Diop A., Guisse A., (2015) Caractérisation agropédologique des sols de Mboltine dans la zone des Niayes. Agro. Afric. 27 (1) : 57-67

28 **Dordas C.** Agron. Sustain. Dev. (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review 28: 33. <https://doi.org/10.1051/agro:2007051>

29 **Dutta S.**, Podile, A. R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. Critical Reviews in Microbiology, 36, 232–244. doi:10.3109/10408411003766806

E

30 **Effmert U.**; Kalderás, J.; Warnke, R.; Piechulla, B. (2012) Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. J. Chem. Ecol. 2012, 38, 665–703.

31 **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, 2017, 17 (4), 897-911

32 **Etesami H.**, Alikhani, H. A., & Hosseini, H. M. (2015). Indole-3-acetic acid and 1 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: Bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. In D. K. Maheshwari (Ed.), Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem (pp. 183–258). Springer International. doi:10.1007/978-3-319-24654-3_8

F

33 **Fagard M.**, Launay A., Clément G., Courtial J., Dellagi A., Farjad M., Krapp A., Soulié M.C. Masclaux-Daubresse C. (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology, Journal of Experimental Botany, Volume 65, Issue 19, Pages 5643–5656, <https://doi.org/10.1093/jxb/eru323>

34 **FAO**, (2015), World fertilizer trends and outlook to 2018

G

- 35 **García-Gutiérrez L.**, Zerriouh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., and Pérez-Gracia, A. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb. Biotechnol.* 6, 264–74. doi:10.1111/1751-7915.12028
- 36 **Glick B. R.** (1995). The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109–117. doi:10.1139/m95-015
- 37 **Glick B. R.** (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica Volume 2012, Article ID 963401, 15 pages.
- 38 **Glick B. R.** (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
- 39 **Gonzalez A.H.**, Morales L. D., Da Silva E.P., Nascimento F.X.I, De Souza L.F., Da Silva B.G., Canei A.D., De Armas R.D., Giachini A.J. , Soares C.R., (2018), *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* strains obtained from coal-mining areas nodulate and promote the growth of *Calopogonium muconoides* plants used in the reclamation of degraded areas , *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072, doi:10.1111/jam.14117
- 40 **Goswami D.**, Janki N. Thakker , Pinakin C. Dhandhukia (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review article *Cogent Food & Agriculture* (2016), 2: 1127500
- 41 **Govindasamy V.**, Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., Annapurna, K. (2011). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for sustainable agriculture. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 333–364). Berlin: Springer-Verlag.
- 42 **Gul A.** Norman, D. El Sayed, A. (2015). Soluble and Volatile Metabolites of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPRs): Role and Practical Applications in Inhibiting Pathogens and Activating Induced Systemic Resistance (ISR). 10.1016/bs.abr.2015.07.004.
- 43 **Gutiérrez-Manero F. J.**, Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehrouachi, J., R.Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111, 206–211. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x
- ## H
- 44 **Haas D.**, et Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307–319. doi:10.1038/nrmicro1129
- 45 **Halder A. K.**, & Chakrabartty, P. K. (1993). Solubilization of inorganic phosphate by *rhizobium*. *Folia Microbiologica*, 38, 325–330. doi:10.1007/BF02898602
- 46 **Hammer P. E.**, Hill, D. S., Lam, S. T., Van Pée, K. H., Ligon, J. M. (1997). Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2147–2154. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/63/6/2147>
- 47 **Han H.S.**, et K.D. Lee, (2005) Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(2): 176-180
- 48 **Hernández-León R.**, Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M.C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Cont.* 81, 83–92.
- 49 **Hiltner L.** (1904). About recent experiences and problems the field of soil bacteriology with special Consideration of green manure and fallow. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59–78.
- 50 **Hirsch P. R.** , Mauchline, T. H. (2012) 'Who's who in the plant root microbiome', *Nature Biotechnology*, 30, pp. 961-962.

J

- 51 **Jaleel** C.A., Manivannan ,P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R.,et al. (2007). *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under Water deficit stress. *Colloids Surf. B Bio interfaces* 60, 7–11. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.05.012
- 52 **Jha** C. K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *E3 Journal of Agricultural Research and Development*, 5, 108–119.
- 53 **Jha** C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M. (2011). Enterobacter: Role in plant growth promotion. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses* (pp. 159–182). Berlin: Springer Berlin Heidelberg. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9>
- 54 **Jing** Y., Zhenli H., Xiao-e Y., (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University. Science. B.* 8. 192-207. 10.1631/jzus.2007.B0192.

K

- 55 **Kanchiswamy**, C.N.; Malnoy, M.; Maffei, M.E. (2015) Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 151.
- 56 **Kelman** A., (1998). One hundred and one years of research on bacterial wilt. In: Prior, P., Allen, C., Elphinstone, J. (Eds.), *Bacterial Wilt Disease. Molecular and Ecological Aspects*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 1–5.
- 57 **King** E.O., M. WARD y, D.E. RANEY (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J.Lab.Clin.Med.* 44:301-307.
- 58 **Kousik** C.S, Shepard B.M, Hassell R, Levi A, Simmons AM. (2007). Potential sources of resistance to broad mites (*Polyphagotarsonemus latus*) in watermelon germplasm. *J Am Soc Hortic Sci.* 42:1539–1544.
- 59 **Kumar** R., Ravendra, Shandini & Prakash, Om. (2019). The Impact of Chemical Fertilizers on our Environment and Ecosystem. In book : *Research Trends in Environmental Sciences*, 2nd, Chapter: 5, pp.69-86

L

- 60 **Levi** A, Thomas C.E. (2005). Polymorphisms among chloroplast and mitochondrial genomes of *Citrullus* species and subspecies. *Genet Resour Crop Ev.* 52:609–617.
- 61 **Lingaiiah** S., Umesha, S., (2013). *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Can. J. Plant Prot.* 1,147–153.

M

- 62 **Manero** F.J.,Algar, E.,Martin Gomez, M. S., Saco Sierra, M.D.,and Solano, B.R. (2003). Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* By rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedling sand shoot cultures. *Pharm.Biol.* 50, 1201–1209. doi: 10.3109/13880209.2012.664150
- 63 **Meena** O.P., Maurya B.R., Meena V.S., (2013), Influence of K solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica, *Agriculture for sustainable Development* 1(1):53-56, 2013/article
- 64 **Meena** V.S., B.R. Mauryaa, Jay Prakash Verma (2014) Does a rhizospheric microorganism enhance K+ availability in agricultural soils? *Microbiological Research* 169 (2014) 337–347 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>
- 65 **Murthy** K.N., Uzma, F., Srinivas, C.C., (2014). Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. *Am. J. Plant Sci.* 5, 1799–1811.

N

- 66 **N'mila** R., Gross R., Rchid H., Raye M., Manteghetti, M. Petit P., Tijane M., Ribes G., Sauvaire Y (2000) Insulinotropic of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. *Planta Med*, 66: 418-423

67 **Nautiyal C. S., (1999)**, An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, FEMS Microbiology Letters, Volume 170, Issue 1, January 1999,

Pages 265–270, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>

68 **Naveed M., Z. A. Zahir, M. Khalid, H. N. Asghar, M. J. Akhtar, M. Arshad, (2008)** “Rhizobacteria containing acc-deaminase for improving growth and yield of wheat under fertilized conditions,” Pakistan Journal of Botany, vol. 40, no. 3, pp. 1231–1241.

69 **Neendam-Nielsen M., Sørensen, J. (1999)**. Chitinolytic activity of isolates from barley and sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 30, 217–227. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00650.x

P

70 **Park H.B., Lee, J., Kloepper, W.B., Ryu, C.M., (2013)**. Exposure of *Arabidopsis tohexadecane*, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. Plant Signal. Behav. 8, e24619.

71 **Patel K., Goswami, D., Dhandhukia, P., Thakker, J. (2015)**. Techniques to study microbial phytohormones. In D. K. Maheshwari (Ed.), Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem (pp. 1– 27). Springer International. doi:10.1007/978-3-319-24654-3_1

72 **Payne S. M. (1994)**. Detection, isolation, and characterization of siderophores. Methods in Enzymology, 235, 329–344. doi:10.1016/0076-6879(94)35151-1

73 **Pothier J.F., Wisniewski-Dyé, F., Weiss-Gayet, M., Moëne-Loccoz, Y., and Prigent Combaret, C. (2007)**. Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. Microbiology 153, 3608–3622. doi: 10.1099/mic.0.2007/009381-0

R

74 **Raynaud X, Nunan N (2014)** Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. PLoS ONE 9(1): e87217. doi:10.1371/journal.pone.0087217

75 **Raza W., Ning Ling, Dongyang Liu, Zhong Wei, Qiwei Huang, Qirong Shen (2016)** Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. Microbiological Research 192 (2016) 103–113

76 **Raza, W., Faheem, M., Yousaf, S., Rajer, F.U., Yamin, M., (2013)**. Volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. Sci. Lett. 1, 21–24.

77 **Raza W., Yang, W., Yuan, J., Shakoor, F., Huang, Q., Shen, Q., (2012)**. Optimization and characterization of a polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 and its antioxidant activity. Carboh. Polym. 90, 921–929.

78 **Razi S. S., & Sen, S. P. (1996)**. Amelioration of water stress effects on wetland rice by urea-N, plant growth regulators, and foliar spray of a diazotrophic bacterium *Klebsiella* sp. Biology and Fertility of Soils, 23, 454–458. doi:10.1007/BF00335922

79 **Rodríguez H., Fraga, R. (1999)**. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17, 319–339. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2

S

80 **Sadfi N., Cherif M., Fliess I., Boudabbous A., Antoun, H. (2001)**. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. Journal of Plant Pathology, 83, 101–117. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/41998046>

81 **Salisbury F. B. (1994)**. The role of plant hormones. In R. E. Wilkinson (Ed.), Plant–environment interactions (pp.39–81). New York, NY: Marcel Dekker.

- 82 **Sarma R. K. et Saikia R., (2013)**, Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21, *Plant Soil* 2013, 377, 111–126. DOI 10.1007/s11104-013-1981-9
- 83 **Scheres B., Benfey, P., and Dolan, L. (2002)**. Root development. *Arabidopsis Book* 1,e0101. doi:10.1199/tab.0101 PMCID:PMC3243376
- 84 **Schulz S., Dickschat, J.S., (2007)**. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* 24, 814–842.
- 85 **Seleim M.A.A., Saeed F.A., Abd-El-Moneem K.M.H., Abo-E. Lyousr, K.A.M., (2011)**. Biological control of bacterial wilt of tomato by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Pathol. J.* 10, 146–153.
- 86 **Shen X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., & Zhang, X. (2013)**. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics*, 14, 271. doi:10.1186/1471-2164-14-271
- 87 **Silva H. S. A., Romeiro R. D. S., Macagnan D., Halfeld-Vieira B. D. A., Pereira M. C. B., Munteer A. (2004)**. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29, 288–295. doi:10.1016/S1049-9644(03)00163-4
- 88 **Soufane S., (2018)** Etude de la toxicité de *Citrullus colocynthis*, doctorat en sciences, Univ. de Setif
- 89 **Spaepen S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007)**. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 425–448. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- 90 **Szentes S., Gabriel-Lucian, R., Laslo, É., Lányi, S., Mara, G., (2013)**. Selection and evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from a raised bog environment. *Crop Prot.* 52, 116e124.
- T**
- 91 **Täckholm V. (1974)** : Student's Flora of Egypt, ed. 2. – Cairo
- U**
- 92 **UNESCO (1963)** : Bioclimatic map of the Mediterranean region, Prepared by Emberger *et al.*, and established by Bagnouls, drawn by Rinaldo. Ed. UNESCO-FAO.
- V**
- 93 **Vacheron J.; Desbrosses, G.; Bouffaud, M.L.; Touraine, B.; Moëgne-Loccoz, Y.; Muller, D. Plant (2013)** growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 2013, 4.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- 94 **Vessey J.K. (2003)** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 2003, 255, 571–586.
- Y**
- 95 **Yuan J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., (2012)**. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f sp. cubense. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5942–5944.
- Z**
- 96 **Zahedi A. M., Fazeli, I., Zavareh, M., Dorry, H., & Gerayeli, N. (2012)**. Evaluation of the sensitive components in seedling growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) affected by salinity. *Asian Journal of Crop Science*, 4, 159–164. <http://dx.doi.org/10.3923/ajcs.2012.159.164>
- 97 **Zhu Q., Muyue Z., Haonan C., Chao F., Peng G., Xuezheng W., (2017)**, The complete chloroplast genome sequence of the *Citrullus colocynthis* L. (Cucurbitaceae) <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1361351>; Pages 480-482 | Published online: 31 Jul 2017

Annexes

1- Les courbes d'étalonnage :

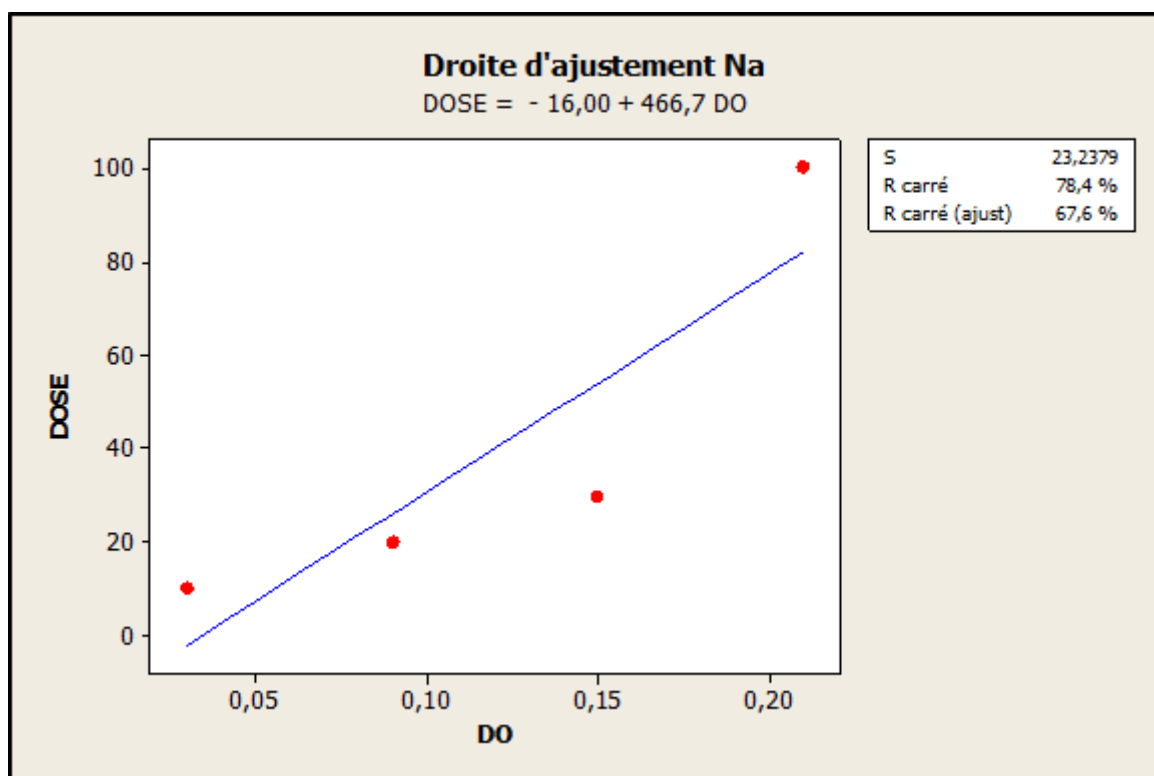


Figure 1 : Droite d'ajustement du sodium

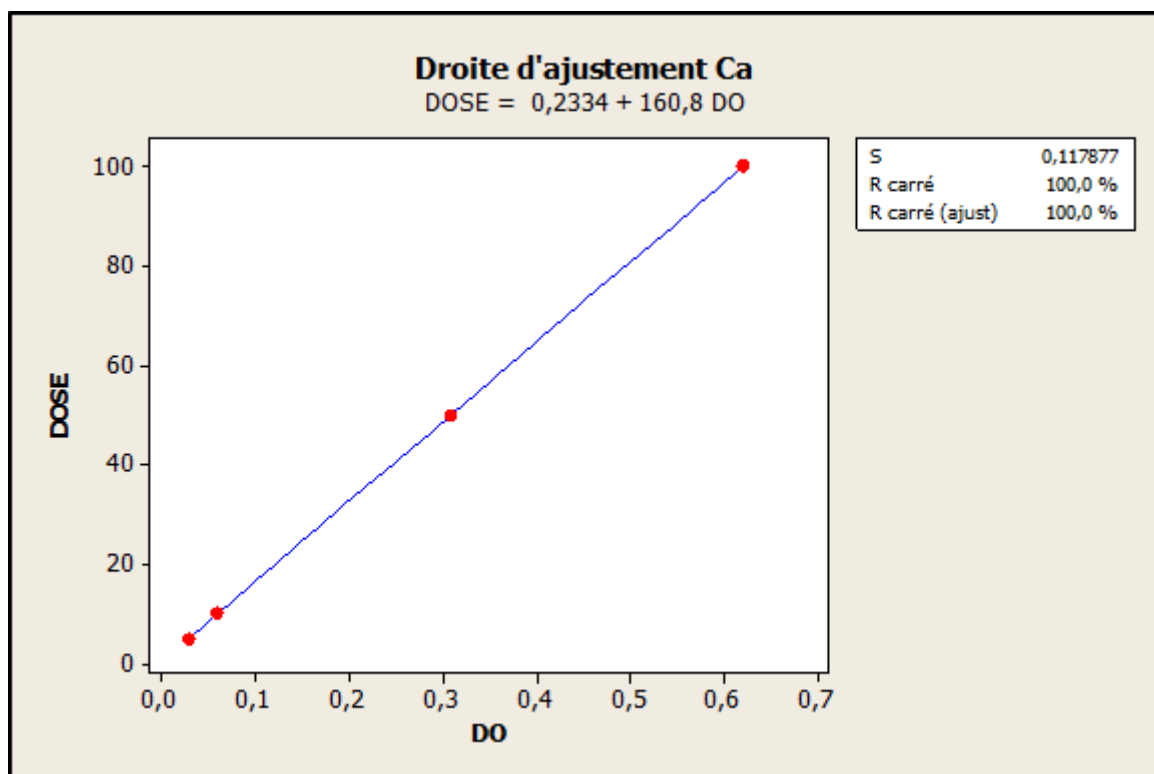


Figure 2 : Droite d'ajustement du calcium

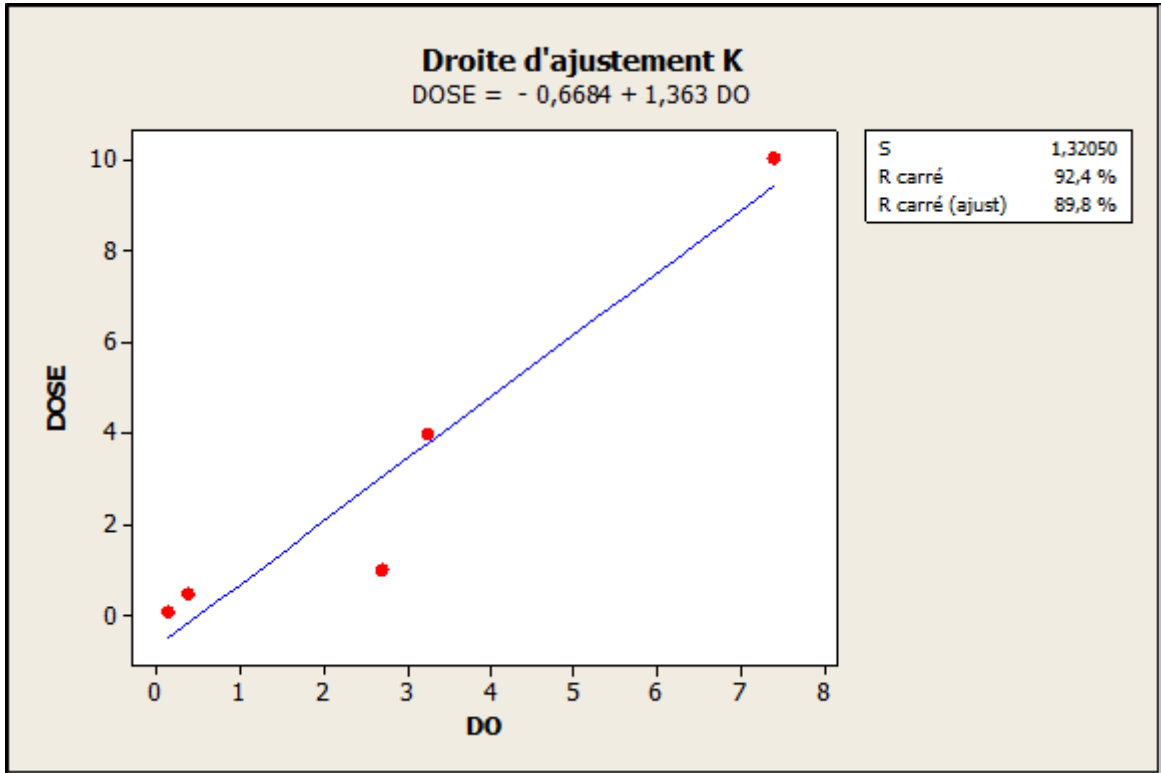


Figure 3 : Droite d'ajustement du potassium

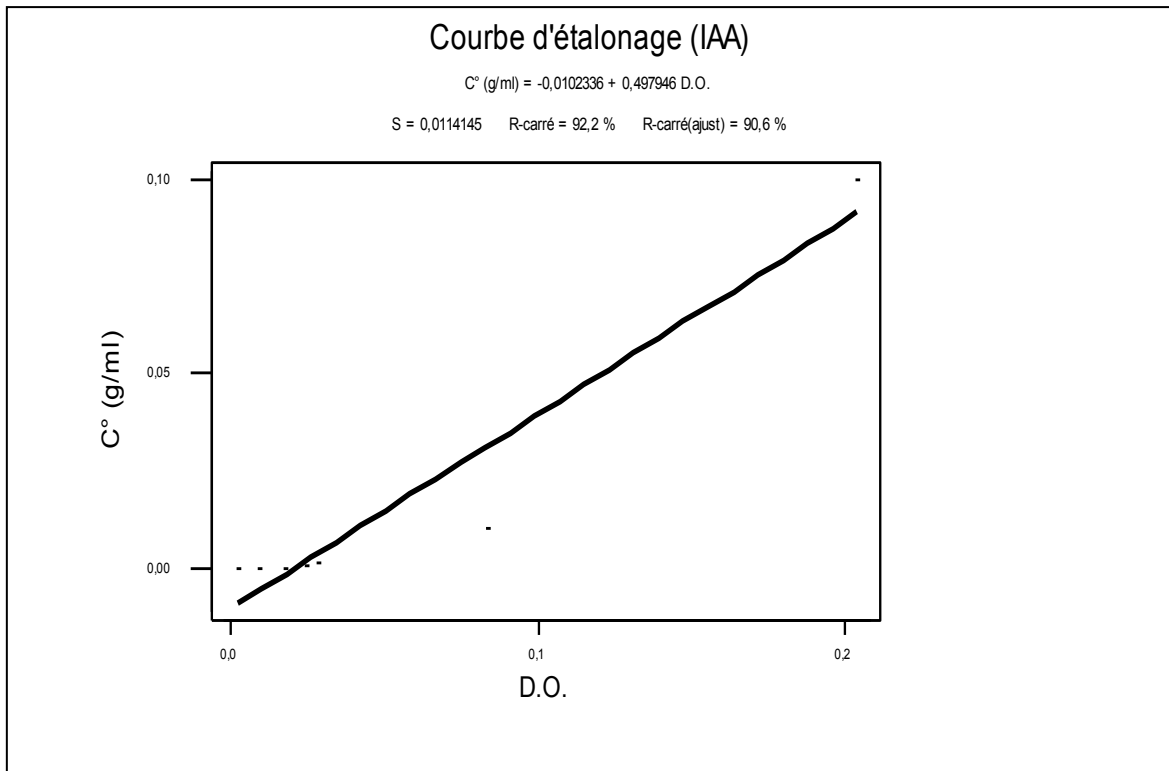


Figure 2 : Droite d'ajustement de l' IAA

2- L'analyse statistique :

ANOVA à un facteur contrôlé : SP en fonction de Isolats

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Isolats	11	3,9061	0,3551	23,03	0,000
Erreur	36	0,5551	0,0154		
Total	47	4,4612			

Informations de groupement avec la méthode de Tukey

Isolats	N	Moyenne	Groupement
E3B2	4	2,1181	A
E1A6	4	1,8500	A B
E1B3	4	1,7639	B C
E3B4	4	1,5174	C D
E4A2	4	1,4554	D E
E2B1	4	1,4507	D E
E3A4	4	1,3821	D E
E3B2	4	1,2583	D E
E3B1	4	1,2458	D E
E2A3	4	1,2294	D E
E1B4	4	1,1917	E
E1B2	4	1,1788	E

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

ANOVA à un facteur contrôlé : SK en fonction de Isolats_1

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Isolats_1	17	3,5263	0,2074	5,48	0,000
Erreur	54	2,0426	0,0378		
Total	71	5,568			

Informations de groupement avec la méthode de Tukey

Isolats_1	N	Moyenne	Groupement
E1A3	4	2,2792	A
E2A2	4	1,7783	A B
E1A2	4	1,7497	B C
E4A4	4	1,7188	B C
E1A9	4	1,6679	B C
E1B1	4	1,6295	B C
E1B4	4	1,6076	B C
E2B2	4	1,5799	B C
E3B1	4	1,5665	B C
E2B1	4	1,5512	B C
E3A2	4	1,5389	B C
E1A1	4	1,5036	B C
E3A2	4	1,4472	B C
E1A5	4	1,4179	B C
E4B4	4	1,3960	B C
E4B3	4	1,3755	B C
E3B4	4	1,3139	B C
E3A1	4	1,2708	C

ANOVA à un facteur contrôlé : SKM en fonction de Isolats_2

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Isolats_2	3	375,21	125,07	59,72	0,000
Erreur	12	25,13	2,09		
Total	15	400,34			

Informations de groupement avec la méthode de Tukey

Isolats_2	N	Moyenne	Groupement
E1B3	4	12,750	A
E1A2	4	9,000	B
E1A1	4	1,664	C
E3B1	4	1,458	C

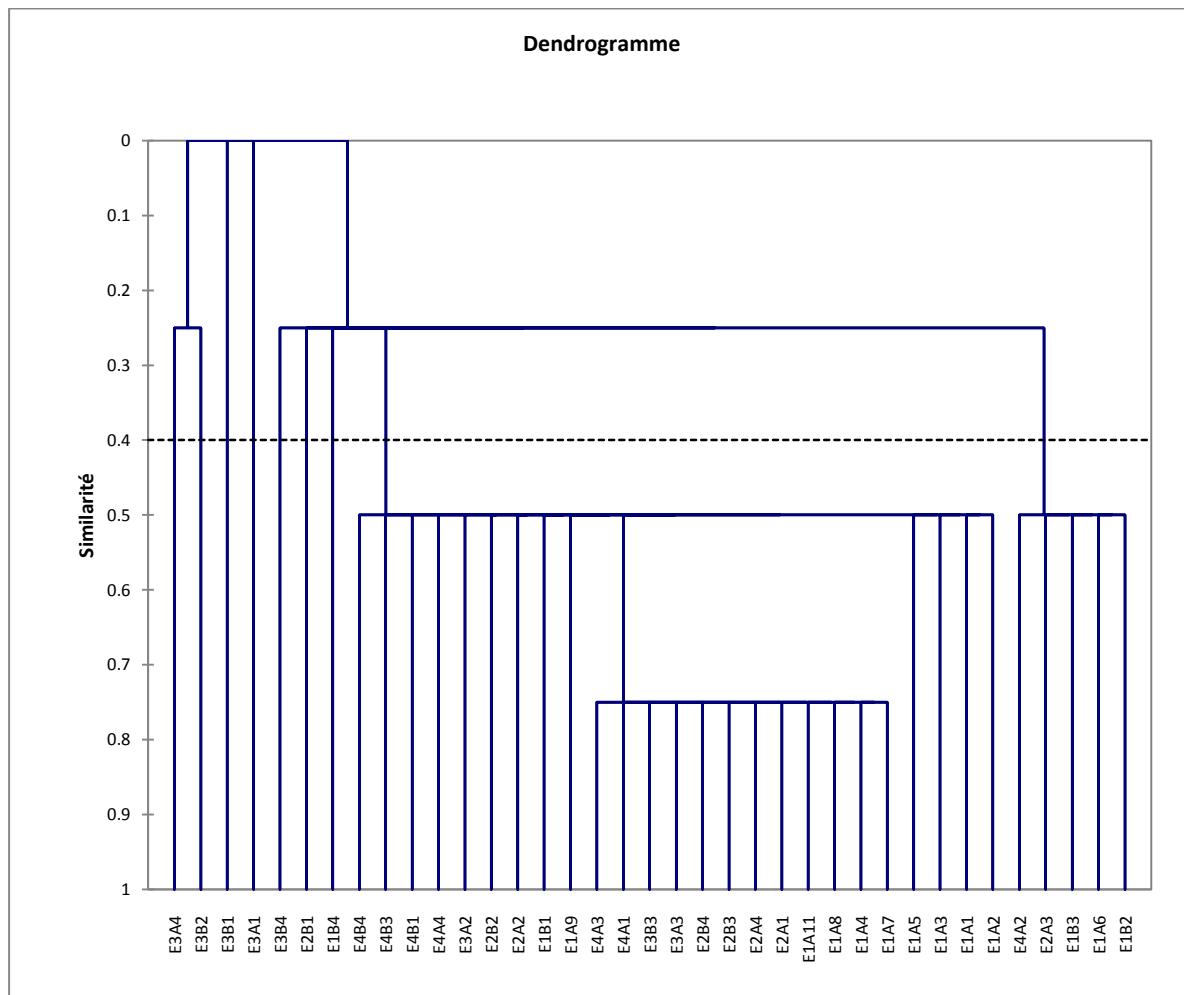
ANOVA à un facteur contrôlé : D.O.I.A.A. en fonction de Isolats_3

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Isolats_3	35	7,449388	0,212840	477,25	0,000
Erreur	72	0,032110	0,000446		
Total	107	7,481498			

Informations de groupement avec la méthode de Tukey

Isolats_3	N	Moyenne	Groupement
E1B2	3	1,4233	A
E2B4	3	0,9327	B
E2A3	3	0,9063	B C
E2B3	3	0,8457	C
E1B4	3	0,7310	D
E3A4	3	0,6997	D E
E2A1	3	0,6893	D E
E1B1	3	0,6397	E F
E3B3	3	0,6163	F
E1A3	3	0,6060	F G
E2A2	3	0,5807	F G
E3A2	3	0,5430	G H
E3B4	3	0,5007	H I
E4B1	3	0,4977	H I
E2B1	3	0,4870	H I J
E3A3	3	0,4570	I J K
E2B2	3	0,4243	J K L
E2A4	3	0,4183	J K L
E3B1	3	0,3973	K L M
E4A4	3	0,3730	L M N
E1B3	3	0,3730	L M N
E1A5	3	0,3313	M N O
E1A9	3	0,3213	N O P
E1A6	3	0,3180	N O P
E4B4	3	0,2973	O P Q
E4B3	3	0,2910	O P Q R
E1A7	3	0,2747	O P Q R S
E4A2	3	0,2690	O P Q R S
E1A8	3	0,2590	P Q R S
E1A11	3	0,2410	Q R S
E4A3	3	0,2310	Q R S
E1A2	3	0,2270	R S
E1A4	3	0,2180	S
E4A1	3	0,2127	S
E2A3	3	0,2073	S
E1A1	3	0,1153	T

Annexe 3:



Classification hiérarchique des isolats testés selon les traits PGPR étudiés à un seuil de similarité égale à 40 %