

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière :

Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Guettaf Nour el houda

Guettaf Ghozleine

Chohri Nadhira Amel

Isolement et Caractérisation des Rhizobactéries Promotrices de la Germination et de la Croissance du Pois Chiche.

Soutenu publiquement le : 12/07/2021

Jury:

Président: Dr. DAHLIA

Encadrant: Dr. LAREDJ ZAZOU K.

Examineur : Dr. RAHMOUNE B.

Grade

MCA, faculté SNV, Université IBN Khaldoune, Tiaret

MAA faculté SNV, Université IBN Khaldoune, Tiaret

MCA, faculté SNV, Université IBN Khaldoune, Tiaret

Remerciements

*Nous remercions **ALLAH** le tout puissant..... de nous avoir le courage et la patience de mener au terme de ce travail.*

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Dr. LARADJ ZAZOU** Nous tenons vivement à lui exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension et son intérêt porté à ses sujets de recherche.*

*Nous exprimons des remerciements au présidente du jury **Dr. DAHLIA** professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie Université de Tiaret, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement de critiquer et de juger ce travail.*

*Nous tenons à remercier également **Dr. RAHMOUN** Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun – Tiaret d'avoir accepté ; malgré ses taches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail.*

*Nos plus vifs remerciements vont à **Dr. HOUCINE. Professeur** et chef de spécialité de microbiologie Appliquée à faculté de science de la nature et de la vie pour son aide dans toutes les années universitaires, pour toute l'année de fin d'étude.*

Enfin, nous tenons à remercier tous nos enseignants qui ont assuré notre formation et tout le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun Tiaret.

Dédicaces

*A nos chers parents pour leur
soutient, leur aide, et leur sacrifice*

*A nos amis Houria, Aicha et tous
nos collègues de
promotion.*

*A nos frères et sœurs Fatiha, Asma,
Iman et Aicha, Ahmed et,
Mohamed*

résumé

L'utilisation des PGPR (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) comme une approche biologique joue un rôle très important dans l'amélioration et l'augmentation du rendement végétal, elles agissent positivement sur la croissance des plantes en tant que biofertilisateur et dans la lutte biologique.

Dans l'objectif d'isoler des bactéries rhizosphériques à effet PGPR et d'étudier leurs effets stimulateurs de la croissance du pois chiche. Un totale de 12 souches bactériennes ont été isolées à partir de 3 rhizosphères différents (lavande, la veille et la mure) dans la région de Tiaret et examinées pour leur capacité de promotion de la croissance du pois chiche. La sélection des isolats les plus performants a été effectuée selon leur aptitude à produire des phytohormones (acide indole acétique), à solubiliser le phosphate et à fixer l'azote atmosphérique. Les résultats de l'identification des 3 isolats les plus performants par galerie classiques (des tests microscopique, biochimiques et physiologiques) ont montré leur appartenance au genre *Bacillus sp* et *Pseudomonas sp*.

Une évaluation *in vivo* de l'effet de la souche la plus performante sur la germination et la croissance du pois chiche a été réalisée, les résultats obtenus après 30 jours de culture ont montré que l'inoculation des graines du pois chiche par *Bacillus Sp* améliorent nettement les paramètres morphologiques de la plante (poids frais, et sec des racines et des feuilles, de la ramification racinaire et l'élongation de la plante). Ces résultats confirment l'effet bénéfique majeur de la souche PGPR isolée sur la croissance de la plante du pois chiche.

Mots clés : PGPR , promoteur ,*Bacillus Sp* , pois chiche, inoculation.

The use of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) as a biological approach play a very important role including the improvement and increase of plant yield, they positively act on plant growth and used as a biofertilisers

With the aim to isolate a large series of rhizospheric bacteria and the study of their stimulating effect on the growth of chickpea. Twelve (12) bacterial strains were isolated from three (3) different rhizospheres (lavender, eve and ripe) from the Tiaret region and were examined for their chickpea growth promoting effects by *in vitro* tests. The selection of the best performing isolates was made according to their ability to produce phytohormones (indole acetic acid), following their ability to solubilize phosphate and to fix atmospheric nitrogen. The identification of the 3 best performing isolates was carried out by using the classical gallery (biochemical tests, gram staining) and the results revealed their belonging to strains of *Bacillus Sp* and *pseudomonas*. An *in vivo* evaluation of the most efficient strain was carried out on chickpea seeds and which resulted in the inoculation seeds of chickpea by *Bacillus Sp*. clearly improve the morphological parameters of the plant (fresh and dry weight of roots and leaves, root elongation and plant elongation) .

These results confirm the major beneficial effect of PGPRs on the growth of the chickpea plant.

Keywords: PGPR, promoter, *Bacillus Sp*, chickpea, inoculation.

ملخص

يلعب استخدام PGPRs البكتيرية الجذرية التي تعزز نمو النبات) كنهج بيولوجي دوراً مهماً للغاية حيث يعمل على تحسين وزيادة محصول النبات بشكل إيجابي على نمو ه و صحته.

يهدف عزل سلسلة كبيرة من بكتيريا ريزوسفير ودراسة تأثيرها التحفيزي على نمو الحمص. تم عزل ما مجموعه 12 سلالة بكتيرية من 3 ريزوسفير مختلفة (الفيجل ، العليق والخزامى) من منطقة تيارت و تم فحص تأثيرها المعزز لنمو الحمص من خلال الاختبارات المعملية ، تم بعد ذلك اختيار العينات الأفضل أداءً وفقاً لقدرتها على إنتاج الهرمونات النباتية (حمض الأسيستيك الإندولي) ، بعد قدرتها على إذابة الفوسفات وتثبيت النيتروجين في الغلاف الجوي ، تم تحديد 3 العينات الأفضل أداءً بفضل التجارب الكلاسيكية (الاختبارات البيوكيميائية ، تلطيخ الجرام) والتي أظهرت من خلال هذه النتائج سلالات نقية من *Bacillus sp*، تم إجراء تقييم هذه السلالة الأكثر كفاءة على بذور الحمص والتي نتج عنها تلقيح هذه البذور بواسطة *Bacillus sp* تحسين المعلمات المورفولوجية للنبات (الوزن الطازج والجاف للجذور والأوراق ، واستطالة الجذر واستطالة النبات) تلك التي تضمن حقاً التأثير المفيد PGPRs على نمو نبات الحمص.

الكلمات المفتاحية مروج *Bacillus sp* التلقيح

Sommaire

Introduction.....	1
Revue bibliographique.....	1
1. La Rhizosphère.....	3
1.1 Généralité	3
1.2 La composition microbienne de la rhizosphère.....	3
2. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.....	4
2.1 Les mécanismes impliqués dans l'action des PGPR.....	4
2.1.1 Les modes d'action directe.....	5
a. La solubilisation de phosphate.....	5
b. Fixation de l'azote atmosphérique.....	6
c. La production des sidérophores	6
d. Production d'hormone de croissance.....	7
□ L'Acide indole acétique.....	7
e. Les Gibbérellines et les cytokinines	8
f. La réduction de la production de l'éthylène.....	8
2.1.2. Les modes d'action indirectes	8
Matériel et Méthodes.....	11
2. Prélèvement et échantillonnage	11
3. Isolement des souches bactériennes promotrices de la croissance des plantes	12
3.1 Sélection des souches bactériennes a effet PGPR.....	13
3.2 Conservation des souches.....	13
4. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des plantes <i>in vitro</i> par les souches bactériennes isolées et sélectionnées	13
4.1 Fixation de l'azote atmosphérique.....	13
4.2 Production de l'acide indole acétique.....	13
4.3 Solubilisation du phosphate sur milieu solide.....	13
5. Identification des isolats les plus performants	14
5.1 Caractères cultureux et morphologique	14
• Aspect des colonies	14
• Coloration de Gram.....	14 ma
5.2 Identification biochimique.....	15
5.2.1 Test catalase.....	15
5.2.2 Test d'oxydase.....	16
5.2.3 Identification biochimique par la galerie classique.....	16
a. Test urée indole.....	16
b. Test mannitol mobilité.....	16
c. Test citrate de Simon	16

d. Test triple Sugar Iron (TSI)	17
6. la mise en évidence de l'activité stimulatrice des souches isolées, sélectionné Promotrice de la croissance du pois chiche <i>in vivo</i>	17
6.1 Germination des graines de pois chiche	17
6.2 Préparation des traitements bactériens et semi.....	18
6.3 Semi des graines de pois chiche inoculées par les bactéries PGPR isolées.....	19
Résultat et Discussion.....	22
1. Isolement et purification des souches isolées sélectionnées promotrice de la croissance de pois chiche	22
2. Caractères Phénotypique et biochimique des souches isolées sélectionnées promotrices de croissance de pois chiche	23
2.1. Test de catalase et d'oxydase	23
2.2 Observation microscopique	24
2.3 Résultats des tests biochimiques réalisés	24
2.3.1 Test urée indole	24
2.3.2 Test mannitol- mobilité	25
2.3.3 Test citrate de simon.....	26
3. Caractérisation du potentiel de promotion de croissance <i>in vitro</i> par les souches isolées et sélectionnées	26
3.1 Résultat du test de la fixation de l'azote atmosphérique	26
3.2 Solubilisation du phosphate.....	27
3.3 Production de l'acide indole acétique	27
4. Evaluation de l'activité stimulatrice de croissance des pois chiches par les bactéries isolées <i>in vivo</i> ...	27
4.1 Traitement bactériennes des graines de pois chiche	27
4.2 Résultat de la germination des graines de pois chiche traitées par les isolats bactériens après 7 jours	28
4.3 Résultat de la culture des plantules de pois chiche inoculées par les souches bactériennes isolées après 4 semaines de culture.....	29
Discussion.....	31
Conclusion.....	35
Références bibliographique	37
Annexe.....	41

- Figure 1** Schéma de la rhizosphère.
- Figure 2** Présentation schématique des organismes du sol.
- Figure 3** Interaction entre les plantes et les bactéries coopératives dans la rhizosphère.
- Figure 4** Mécanisme d'action des bactéries solubilisant de phosphate.
- Figure 5** Rôle de l'acide indole dans l'amélioration de la croissance végétale.
- Figure 6** Présentation de l'origine de prélèvement effectué à partir de rhizosphère de lavande.
- Figure 7** Présentation de l'origine de prélèvement effectué à partir de rhizosphère de mure.
- Figure 8** Présentation de l'origine de prélèvement effectué à partir de rhizosphère de veillé.
- Figure 9** La technique de coloration de Gram.
- Figure 10** Les tests biochimiques pour l'identification des souches.
- Figure 11** Germination des graines de pois chiche.
- Figure 12** Préparation des traitements bactériennes sur bouillon nutritif.
- Figure 13** Un prétraitement des graines de pois chiche sur les boites de pétries.
- Figure 14** Plantation des plantules dans les gobelets.
- Figure 15** Forme des colonies après la 3^{ème} purification.
- Figure 16** Forme des colonies après 4^{ème} purification.
- Figure 17** Réaction de catalase positif.
- Figure 18** Observation microscopique après coloration de Gram.
- Figure 19** Résultat de test urée indole.
- Figure 20** Réponse bactérienne par test mannitol mobilité.
- Figure 21** Solubilisation de phosphate.
- Figure 22** Le complexe obtenu (le réactif salskowsky avec l'inoculum bactérien).
- Figure 23** Germination des graines de pois chiche.
- Figure 24** Prétraitement des graines de pois chiche après 2 jours d'incubation.
- Figure 25** Témoin négatif de croissance des plantules de pois chiche après 7 Jours.
- Figure 26** Résultat des plantules de pois chiche traité avec p₇ après 4 semaines d'incubation.
- Figure 27** développement des plantules de pois chiche traité avec Bv₇ après 4 semaines.

Introduction

Introduction

Introduction

Le développement du rendement des cultures est fortement influencée par plusieurs facteurs, parmi ses facteurs ; la flore bactérienne rhizosphérique qui influence favorablement la croissance des plantes, et connue sous l'acronyme "PGPR Plant Growth Promoting Rhizobactéria", ou rhizobactérie stimulatrice de la croissance des plantes (**Abdesselam ,2017**) .

Les PGPR appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* représentent environ 2-5 % des bactéries rhizosphérique (**Ahmad et al., 2008**) et montrent une capacité accrue d'améliorer la croissance des plantes (**Kloepper et Beachamp , 1992**) , le genre *Bacillus* offre un avantage par rapport ou autre bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes aux changement des conditions environnementales (**cavaglieri et al , 2005**) .

En effet, l'utilisation des PGPR est une approche très intéressantes et d'actualité dans l'application en agriculture comme biofertilisants et bio pesticides et dans la phytoremédiation(**Berg, 2009**).

En outre, de nombreuses propriétés des PGPR peuvent jouer le rôle en tant qu'indicateurs pour la sélection d'une souche PGPR performante, ces propriétés sont la production d'auxines, la fixation d'azote, l'antagonisme phytopathogènes, la solubilisation du phosphate, la production des sidérophores et l'activité Acc désaminase, **Cattelan et al., 1999**). L'effet bénéfique des **PGPR** peut être assuré par des mécanismes directes à travers la stimulation de la germination des graines, la stimulation de la croissance végétale, l'induction de la résistance systémique ISR ...etc ; des mécanismes indirectes par leur pouvoir compétitif à l'égard des autres communautés microbiennes, la production des sidérophores, l'antibiose, la production du cyanure d'hydrogène (HCN) et les composés volatiles (**Kirdi, 2011**).

Dans cette optique nous avons réalisé ce modeste travail dont les objectifs suivants :

- L'isolement et la caractérisation de bactéries stimulatrices de la croissance du pois chiche ou PGPR à partir du sol rhizosphérique de sites différents : Frenda, Sougueur et Tiaret.
- La sélection des souches stimulatrices de la croissance du pois chiche.
- L'évaluation des souches PGPR *in vitro* pour la germination des graines de pois chiche.
- L'évaluation des souches les plus prometteuses en pots sur la croissance de pois chiche par test *in vivo*.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1. Rhizosphère

1.1 Généralité

D'après le Biologiste Allemand Hiltner le terme rhizosphère a été introduit dès 1904 comme étant la zone du sol qui entoure les racines de la plante (Maougal, 2014) qui est soumise à son influence (Gobat *et al.*, 2004), c'est un site avec des interactions uniques entre micro-organismes bénéfiques et pathogènes modulé par les exsudats racinaires (Hartman, 2008).

On distingue généralement le rhizoplan qui est l'interface racine /sol et la surface qu'on en trouve des colonies fortement adhérentes (Maougal 2014), l'endorhizosphère qu'on trouve les bactéries pénétrant dans les tissus rhizodermique et corticaux et qui vivent au contact directe avec la racine (Khenaka, 2016) et l'exorhizosphère qui est le sol adhérent à la partie racinaire de la plante (Maougal, 2014). |

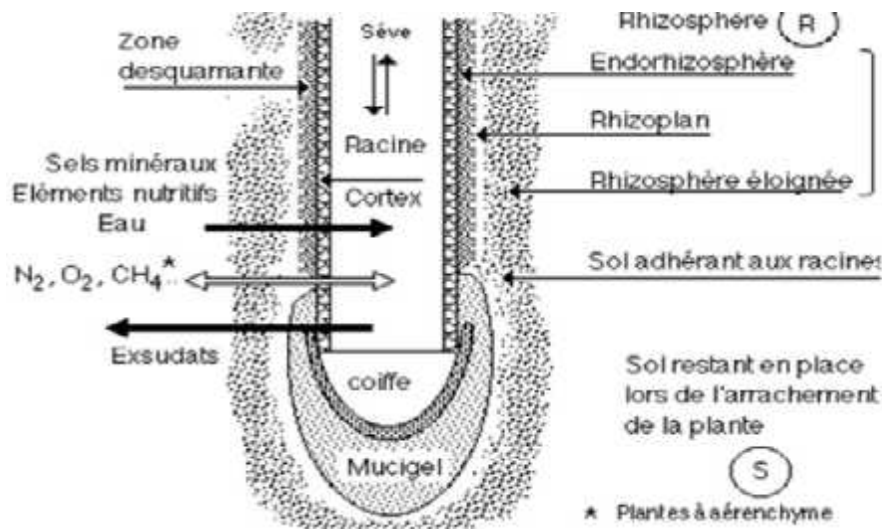


Figure 1. Schéma représentative de la rhizosphère (Gobat *et al.*; 2004).

1.2 Composition microbienne de la rhizosphère

Le sol est connu par sa complexité d'un grand nombre des micro-organismes (les algues, les champignons, les protozoaires ...) .Il est considéré comme l'habitat de ces derniers. La communauté la plus importante est la communauté bactérienne elle se représente en moyen

6.10^8 cellules /g du sol en poids de 10000kg/ha équivalent à 5 du poids sec des composés organiques du sol (Bouras,2018).

On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries qui sont les plus importantes (PGPR) des micro-organismes de la rhizosphère, ils sont des souches très compétitives ;qui colonisent les racines de façon intense (Schorth et SHancock, 1981) et des hétérotrophes typiques qui nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie (Bouras, 2018) .

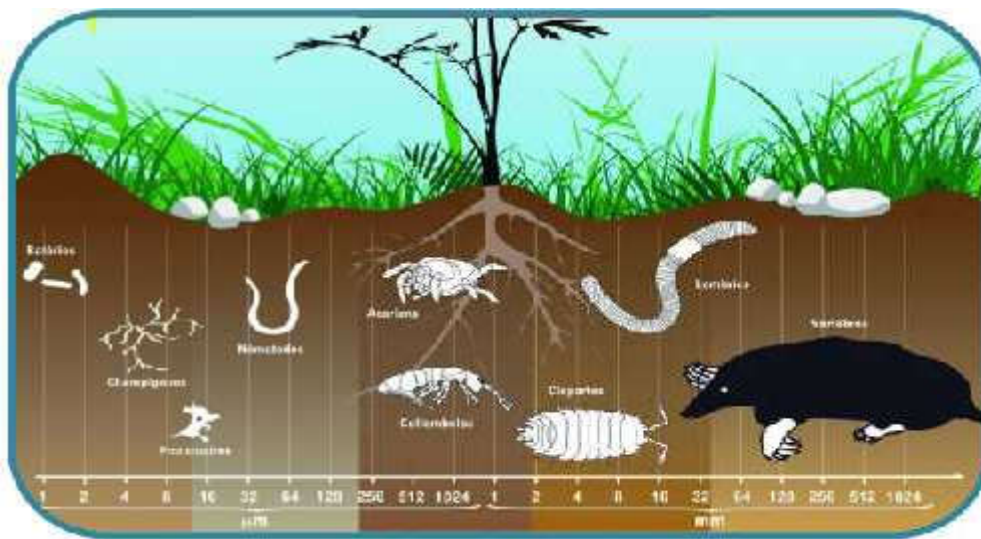


Figure 2. Présentation schématique des organismes du sol (Rovira, 1969)

2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les rhizobactéries connue sous le terme **PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)** stimulent directement la croissance des plantes en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol (Cherif, 2014) et stimulant indirectement la croissance végétale par protection contre les agents phytopathogènes

2.1 Mécanismes impliqués dans l'action des PGPR

Les modes d'actions directes ou indirectes des PGPR sur la plante résultant de

différents mécanismes exercés par les PGPR, dont les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur des plantes et affectent directement leur métabolisme, ils comprennent les processus de **bio fertilisation** (solubilisation de phosphate, fixation d'azote) et de **bio stimulation** (production des phytohormones ; **Khenaka, 2016**) et les mécanismes indirectes sont ceux qui se produisent en dehors de la plante (**Cherif, 2014**) et qui comprennent généralement le processus de bio-contrôle, la production des métabolites antifongiques et des composés volatiles (**Khenaka, 2016**).

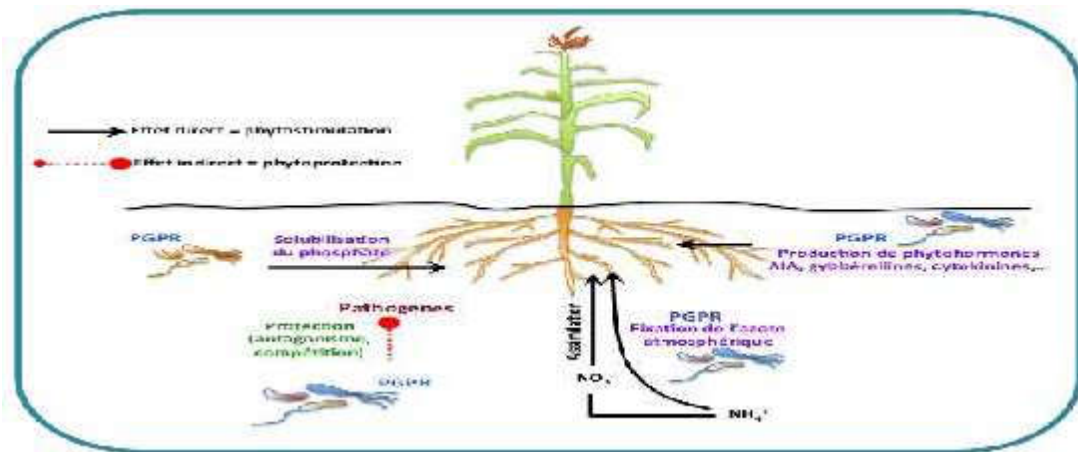


Figure 3 . Interaction entre les plantes et les bactéries coopérative (PGPR) dans la rhizosphère (**Glick, Patten, 1999**).

2.1.1 Les modes d'action directe

a. La solubilisation de phosphate

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour le développement et la croissance des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance (**Bouras, 2018**), il est largement disponible dans le sol sous deux formes organique et inorganique (**Khan et al, 2009**).

Les plantes absorbent la phosphate uniquement sous deux formes solubles : les ions monobasiques (H₂PO₄) et basique (**Gonvind et al, 2015**).

-La solubilisation microbienne du phosphate joue un rôle important dans la conversion du (P) insoluble en (P) soluble (**Abdessallam, 2014 ; Figure 2**)

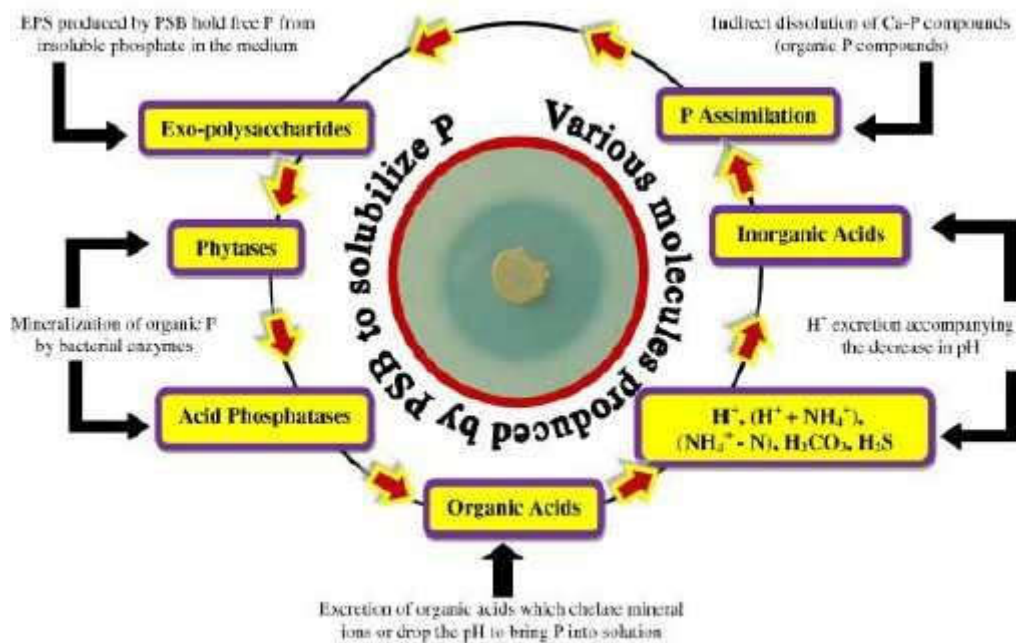


Figure 4. Mécanisme d'action des bactéries solubilisant le phosphate (khan *et al.*, 2009)

b. Fixation de l'azote atmosphérique

L'azote est un élément nutritif essentiel pour la croissance des plantes (Laradj, 2017), les bactéries fixatrices d'azote peuvent accroître la productivité et constitue une alternative viable qui participe à réduire la pollution aux applications chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production (Bouras, 2018). Les micro-organismes fixant l'azote en état libre ou par association symbiotique (Khenaka, 2016).

c. Production des sidérophores

Les PGPR, notamment le genre *Pseudomonas* sont connues pour leur faculté de produire des sidérophores dans la rhizosphère (Vasilva cattelan, 2007), ceux sont des substances chélatrices du fer avec une affinité au fer ferrique (Fe⁺⁺⁺) (Kirdi, 2011). La quantité de fer soluble dans le sol est beaucoup trop faible soit environ 10⁻¹⁰ à pH = 7.4, pour assurer la croissance microbienne les micro-organismes du sol secrètent les molécules de faible poids moléculaire (400-1000 daltons) appelés sidérophores qui lient le Fe³⁺ avec une très forte affinité.

d. Production d'hormone de croissance

Les phytohormones ont différents rôles dont la régulation de plusieurs étapes de croissance et de développement des plantes (la différenciation la division cellulaire, l'élongation).

De nombreux phytohormones sont produits par les PGPR, bien que le rôle de la biosynthèse de ces phytohormones par ces micro-organismes ne sont pas entièrement expliqué, il est noté que les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormone telles que : les cytokines, les auxines, les gibbérellines, et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Vanderlyden,1995 Glick,1995, Lucy *et al.*, 2004).

Acide indole acétique

L'AIA est la plus important du groupe des auxines (Ashraffuzzaman *et al.*, 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR ; bien qu'il favorise la nutrition des plantes dont le développement des tiges des fleurs et des racines, il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation de la croissance des plantes agissant sur la division des cellules, l'expansion, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et patten , 2008) .

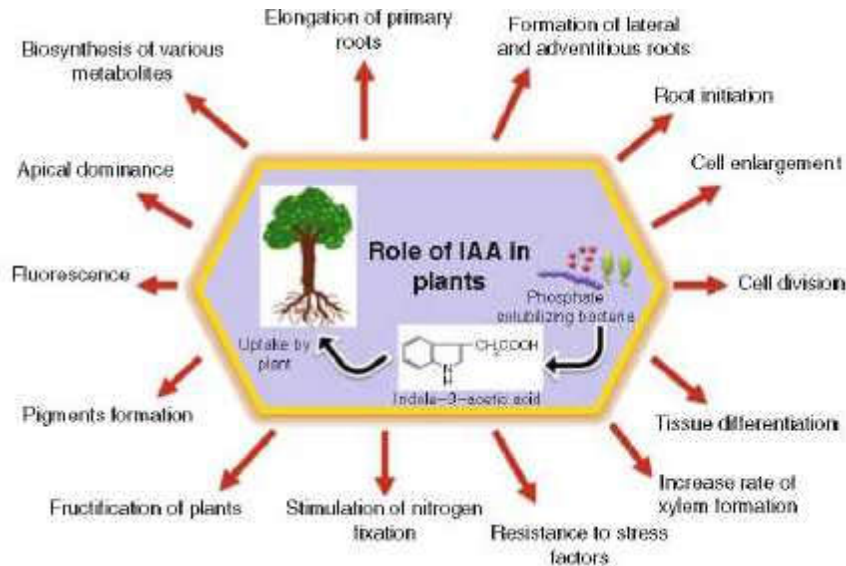


Figure 5.Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan *et al.*, 2009)

e. Gibbérellines et les cytokinines

Les Gibbérellines et les cytokinines ce sont des aminopurines N6 substituée qui jouent un rôle important dans les processus physiologiques :la division cellulaire, des plantes, la promotion de la ramification, le développement des racines, l'activation de la germination des graines, l'accumulation de la chlorophylle, le retard de la sénescence (**Salisbury et Ross, 1992**).

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

Les gibbérellines sont synthétisées par les plantes supérieures, les bactéries, et les champignons : ce sont des acides diterpénoïques constitué de résidus isopréniques : un nombre important (136) gibbérellines différentes sont identifiées et caractérisés (**Mac Millan ,2002**) sont également impliqué dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (**Bottini et al ,2004**).

f. Réduction de la production de l'éthylène

L'éthylène gazeux produit de manière endogène par les plantes a plusieurs effets sur leur développement et agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante (**Ecken ,1995**), il est impliqué dans beaucoup de processus physiologique comme la germination des graines de pois chiche comme exemple la différenciation tissulaire la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons.

Le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la sénescence d'organe, la maturation de fruit et l'abscission de la feuille et du fruit (**Frankenberger et Arshad 1995**).

2.1.2. Les modes d'action indirectes

Les **PGPR** peuvent supprimer un large spectre de maladie bactérienne, fongique et parasitaire des plantes, mais aussi peuvent procurer une protection contre les maladies virales (**Bouras,2018**).

De nombreux travaux présentent la diversité des agents microbiens implique dans la lutte biologique (**Weller ,1994, Siddiqui, 2006**).

On distingue dans le mode indirecte l'antibiose pour limiter l'invasion de pathogène dans les tissus des plantes hôtes(**Whipps,2001**),la production de certains enzymes lysant les cellules fongiques par les **PGPR** par exemple *Pseudomonas stutzeri* ;synthèse de la **chitinase** et l laminariale extracellulaire qui lyse les mycelia de *Fusarium* (**Bouras, 2018**) et les composés volatiles dont la production d'acide cyanhydrique (HCN),bien qu'il soit un inhibiteur métabolique général (**Cherif, 2014**) et qui joue un rôle dans la lutte biologique contre le mauvais herbes (**Heydari et al.,2008**).

Certain PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, chez les plantes l'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène et favorisant un allongement des racines.

Chapitre 2
Matériels et Méthodes

Matériel et Méthodes

1. Objectif

L'objectif de ce présent travail est l'isolement et la caractérisation des bactéries rhizosphériques dotées d'un potentiel promoteur de la croissance de pois chiche (*Cicer arietinum*).

Les principaux objectifs tracés pour la réalisation de cette étude sont :

1. L'isolement des bactéries à partir des rhizosphères des plantes et la caractérisation *in vitro* de leur potentiel PGPR.
2. L'identification biochimique des souches isolées et sélectionnées promotrices de la croissance des plantes.
3. L'évaluation *in vivo* du potentiel de promotion de la croissance du pois chiche par les souches isolées et sélectionnées.

2. Prélèvement et échantillonnage

Trois échantillons de rhizosphères sont prélevés à partir de 3 plantes saines dans différents sites de la Wilaya de Tiaret. A l'aide d'un scalpel stérile, les racines situées à une profondeur de 15 cm sont coupées, mises dans des sachets stériles et conservées à 4°C.

Echantillon 1 : Prélevé à partir de la mûre, région de Songeur (environ de 25 km de la Wilaya de Tiaret).

Echantillon 2 : Prélevé à partir de la lavande, région de Frenda (région située environ 55 km de la Wilaya de Tiaret)

Echantillon 3 : Prélevé à partir de la veillée, Wilaya de Tiaret ville (région d'EPLF).



Figure 6. Présentation de l'origines de prélèvement effectué à partir de rhizosphère de Lavande.



Figure 7. Présentation de l'origines de prélèvement effectué à partir de rhizosphère de mûre.



Figure 8. Présentation de l'origines de prélèvement effectué à partir de rhizosphère de Veillé.

3. Isolement des souches bactériennes promotrices de la croissance des plantes

Une pesée de 1 g du sol rhizosphérique de chaque échantillon est introduite dans 9 ml d'eau Physiologique stérile, ensuite des dilutions décimales sont préparées à partir de cette solution mère (de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7}), l'ensemble des tubes ont subi une agitation dans le vortex durant 60 secondes. L'isolement des souches bactériennes promotrices de la croissance des plantes est réalisé par étalement de 0.1 ml des dilutions de 10^{-4} et 10^{-7} sur milieu King B (**Annexe 1**). Les boîtes inoculées sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 48heures .

3.1 Sélection des souches bactériennes a effet PGPR

La sélection des souches bactériennes est basée sur l'aspect dominant de leurs colonies dans les boîtes de Pétri après incubation, en partant du principe que la plante sélectionne les bactéries qui en sont bénéfiques par la création d'un microenvironnement très favorable à leur croissance dans son rhizosphère. Les colonies des souches sélectionnées sont purifiées par repiquage successive 4 fois dans un milieu King B en utilisant la méthode des Cadrans (stries d'épuisement).

3.2 Conservation des souches

Les colonies isolées sont conservées dans des tubes à essai inclinés contenant la gélose nutritive (**Annexe 1**). Les souches isolées sont ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Les tubes manifestant une croissance sont conservés à une température de 4C pendant une durée de 4 à 6 Semaines.

4. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des plantes *in vitro* par les souches bactériennes isolées et sélectionnées

4.1 Fixation de l'azote atmosphérique

La mise en évidence de la fixation de l'azote atmosphérique par les souches isolées et sélectionnées est effectuée par inoculation de ces dernières dans des tubes à essai contenant un milieu dépourvu de toute source d'azote (*Nitrogen free medium*, **Annexe 1**) ; les tubes sont ensuite incubés à 30° pendant 4 jours. L'apparition de croissance bactérienne dans le *Nitrogen free medium* après la période de l'incubation se traduit par la capacité des bactéries inoculées à fixer l'azote atmosphérique.

4.2 Production de l'acide indole acétique

La capacité des souches isolées à produire l'acide indole acétique (une phytohormone) a été évaluée selon le protocole décrit par **Acuña et al., (2011)** avec des légères modifications. Les suspensions bactériennes des souches isolées sont ajustées à 0.5 Mc Farland, inoculées dans des Erlenmeyers contenant 50 ml de bouillon nutritif puis incubées à une température ambiante pendant 72 heures. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 10min, Un volume de 2 ml du réactif de Salkowsky(**Annexe 1**) est ajouté à un volume de 1ml du surnageant ; le mélange est ensuite incubé pendant 30 mn. La lecture est effectuée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 530 nm. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

4.3 Solubilisation du phosphate sur milieu solide

La capacité des souches isolées à solubiliser le tricalcium phosphate $Ca_3(PO_4)_2$ est mise en évidence selon la méthode décrite par **Nautiyal (1999)** et par **Adem et al. ; (2002)**.

Les bactéries isolées sélectionnées sont mises dans l'eau distillée stérile pendant un intervalle de temps de 5 minutes, pour l'élimination des débris du milieu de conservation. Les suspensions sont ajustées par la suite à une concentration de 0.5 Mc Farland, inoculées en spots (10µl) sur le milieu de culture solide de Pikovskaya (**Pikovskaya, 1948**) (**Annexe1**) et incubées à une température de 30°C pendant 7 jours. La mesure de l'index de solubilisation du phosphore est effectuée selon la formule suivante :

$$\text{Indice de solubilisation} = \frac{\text{le diamètre de la colonie} + \text{le diamètre de la zone claire}}{\text{Le diamètre de la colonie}}$$

5. Identification des isolats les plus performants

L'identification des souches bactériennes isolées est explorée par des observations macroscopique, microscopique, des tests biochimique et physiologique.

5.1 Caractères cultureux et morphologique

• Aspect des colonies

L'aspect des colonies (forme et couleur) est observé à l'œil nu, sous une loupe binoculaire, elle permet d'effectuer une première caractérisation avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

• Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique différentielle qui permet de déterminer la pureté, la forme la taille, l'arrangement et la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes et qui permet de distinguer 2 grands groupes bactériens ; des bactéries à Gram positive, et des bactéries à Gram négative, l'observation a été effectuée avec le microscope (**Marchal et Bourdon, 1982**).

La technique de cette coloration se déroule selon le protocole suivant : (Figure9)

- La suspension bactérienne est étalée en un film mince et régulier sur la lame avec une anse de platine par un mouvement régulier et circulaire.
- Le frottis est séché et fixé sur la flamme de bec benzène.
- Le frottis est recouvert avec le violet de gentiane pendant une minute puis il est lavé avec l'eau distillé.
- Le frottis est à nouveau recouvert avec le lugol (mélange d'iode et d'iodure de potassium) pour une minute.

- Une décoloration de frottis a été réalisé par lavage avec de l'éthanol pendant 30 Secondes.
- Enfin, le frottis est contre coloré par la fushine pendant une minute, c'est une colorant basique des bactéries a Gram – négative en rose et des bactéries a Gram + positive en violet foncé (**Prescott et Harley,2002**).
- Les lames sont ensuite lavées et séchées, puis observées avec l'objectif à immersion à un grossissement X 100.



Figure9.la technique de coloration de Gram

5.2 Identification biochimique

5.2.1 Test catalase

L'enzyme catalase est produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène (**Khenaka, 2016**).

La recherche de cette enzyme est effectuée par le dépôt d'une colonie pure sur une lame propre et l'ajout de quelques gouttes de H_2O_2 , le résultat positif se traduit par le dégagement de bulle d'air .

5.2.2 Test d'oxydase

Ce test permet la mise en évidence d'une enzyme la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu de culture gélosé, cette enzyme est capable d'oxydé un réactif ; le N diméthylparaphénylène diamine (Bouras, 2018).

Pour la recherche de l'oxydase, une suspension bactérienne est préparé dans l'eau physiologie, le disque d'oxydase est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur et mise dans la suspension bactérienne ; la lecture positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 20 seconde.

5.2.3 Identification biochimique par la galerie classique

La galerie classique est une méthode utilisée initialement pour l'identification et l'estimation de la souche bactérienne et qui est basé sur des tests a réalisé, l'appartenance des souches isolées au genre *Bacillus*, est explorée par la mise en évidence de 4 tests (Figure 10).

a. Urée indole

A l'aide d'une anse de platine stérile les souches ont été ensemencées dans des tubes stériles contenant 9ml de milieu urée indole. Les bactéries possédant une uréase + transformant l'urée en carbonate d'ammonium entrainant une alcalinisation et provoque la couleur rouge violacé du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur du pH) après 24h à 37C°.

b. Mannitol mobilité

Ce test est procédé par l'ensemencement de la colonie à l'aide d'une pipette pasteur par pique centrale, jusqu'au fond du tube de gélose incubé à 37C° pendant 24h, il est mis en œuvre pour l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate (enzyme respiratoire) ; la fermentation du mannitol est traduite par un virage ment de couleur du milieu de culture au orangé jaunatre.

c. Citrate de Simon

Ce test est généralement utilisé pour différencier entre les entérocoques, il permet de rechercher le citrate de Simon comme seule source de carbone, il est réalisé par l'ensemencement des colonies bactériennes dans des tubes stériles contenant le citrate de Simon 9ml par la méthode des stries puis incubé pendant 24h/37C°. La lecture positive se traduit par le viragement de couleur du milieu en bleue

d. Triple Sugar Iron (TSI)

Ce test est réalisé afin d'évaluer l'activité métabolique des souches bactériennes, un ensemencement des souches bactériennes a été réalisé sur le milieu TSI par piqure centrale, puis incubé à 24h à 37°C.



Figure10. Les tests biochimiques pour l'identification des souches isolées

6. la mise en évidence de l'activité stimulatrice des souches isolées, sélectionné Promotrice de la croissance du pois chiche *in vivo*

6.1 Germination des graines de pois chiche

La mise en évidence de l'activité stimulatrice de la croissance sur la germination de pois chiche est effectuée selon la méthode suivante :

Les graines de pois chiche à testés étaient désinfectées par trempage dans l'eau de javel pendant 5 minutes , puis rincées abondamment à l'eau distillé stérile pendant 2 minutes , l'opération a été répétée 2 fois à fin d'éliminer les pesticides utilisé lors de traitement de semence .Après séchage , les graines ont été transférées aseptiquement dans des boites de Pétri stériles contenant des papiers imbibés d'eau distillé stérile, elles sont réparties dans des boites de pétries à raison de dizaine graine par boite.

Les paramètres de germination tel que ; la longueur des tiges, des racines, le pois frais et sec sont évalués après 7 jours d'incubation dans une étuve à 25 °C(**Figure11**).



Figure 11. Germination des graines de pois chiche après 7 jours d'incubation.

6.2 Préparation des traitements bactériens et semi

Une inoculation des graines de pois chiches qui sont germées après 7 jours à été effectué avec des suspensions bactériennes préparées à partir des cultures jeunes (après 24 heures d'incubation) sur milieu King B. L'opération a été réalisée dans 3 béchers de 250 ml de volume correspondants au 3 souches les plus performantes , chaque bécher contenant de 50 ml de bouillon nutritif et ajusté à une biomasse bactérienne de 0,5 Mc Farland; les graines non inoculées par les souches (trempé seulement dans le bouillon nutritif) sont utilisées comme un contrôle (témoin négatif)



Figure12. Préparation des traitements bactériens sur bouillon nutritif

Un pré traitement a été réalisé des graines inoculées sur des boites de pétries stériles contenant des papiers filtres imbibé d'eau distillé stérile. L'incubation des boites a été effectué pendant 2 jours dans une température ambiante (**Figure 13**).



Figure 13. Un pré traitement des graines de pois chiche sur les boites de pétries.

6.3 Semi des graines de pois chiche inoculées par les bactéries PGPR isolées

Un traitement est mis en place des plantules : les plantules sont inoculées avec l'inoculum bactérien pour tester l'effet de promotion de la croissance.

Le sol a été stérilisé et bien homogénéisé et réparti dans des pots ou gobelets en plastiques, les semi des graines traitées de pois chiche a été réalisé à raison de 4 trous pour chaque 4 graines dans chaque gobelet sans oublié le témoin négatif, puis ils ont été placé à exposition bien ensoleillé. La culture est réalisée de 3 à 4 semaines. Les paramètres de croissance sont évalués par mesure de longueur des tiges, des racines, état des feuilles, le pois frais et sec des parties aériennes et racinaires.

Les plantules ont été arrosée de 2 à 3 fois par semaines avec l'eau minérale stérile (**Figure 14**).



Figure 14.Plantation des graines de pois chiche germinées et inoculées par les bactéries isolées dans des gobelets

Chapitre 3

Résultat et Discussions

Résultat et Discussion

1. Isolement et purification des souches isolées sélectionnées promotrice de la croissance de pois chiche

Les prélèvements rhizosphériques cultivés sur la gélose King B et incubés à 30 °C pendant 24 h ont permis l'isolement de 12 souches bactériennes à aspect dominant, les souches isolées sont purifiées 3 fois par des repiquages successifs sur gélose King B.

Le diagnostic macroscopique primaire effectué a montré que la majorité des souches isolées ont présenté des caractéristiques biochimiques et physiologiques du genre *Bacillus Sp.* telle que la coloration de Gram positive, catalase et oxydase positive, les colonies des souches sélectionnées sont rondes, lisses, de forme bacillaire et des extrémités rondes à l'exception de la souche P₇ qui est forme bacille à Gram -.



Figure 14. Forme des colonies obtenus après la 3^{ème} purification.



Figure 15. Forme des colonies obtenues après 4^{ème} purification des souches.

2. Caractères Phénotypique et biochimique des souches isolées sélectionnées promotrices de croissance de pois chiche

2.1. Test de catalase et d'oxydase

La formation des bulles d'air chez les souches isolées sélectionnées promotrice de croissance de pois chiche signifie de dégagement du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se traduit par la présence de la catalase +. Les résultats obtenus ont montré que les souches isolées sélectionnées promotrice de croissance de pois chich (*Bm₅*, *Bv₆*, *Bv₇*) sont de catalase positive +, (**Figure 16**). La réaction positive d'oxydase se traduit par le changement de couleur du disque vers le bleu violet chez les souches isolées sélectionnés.



Figure16. Réaction de catalase positif

2.2 Observation microscopique

L'observation des souches au microscope après la coloration de Gram a révélé que les 3 souches observées sont des formes bacillaires à Gram positive (de couleur violet), de taille variable, caractérisé par la présence des bords parallèles, des extrémités rondes. Une souche bactérienne a présenté un autre aspect, des bacilles roses à Gram négatif longues et regroupées en chainettes (**figure 17**).

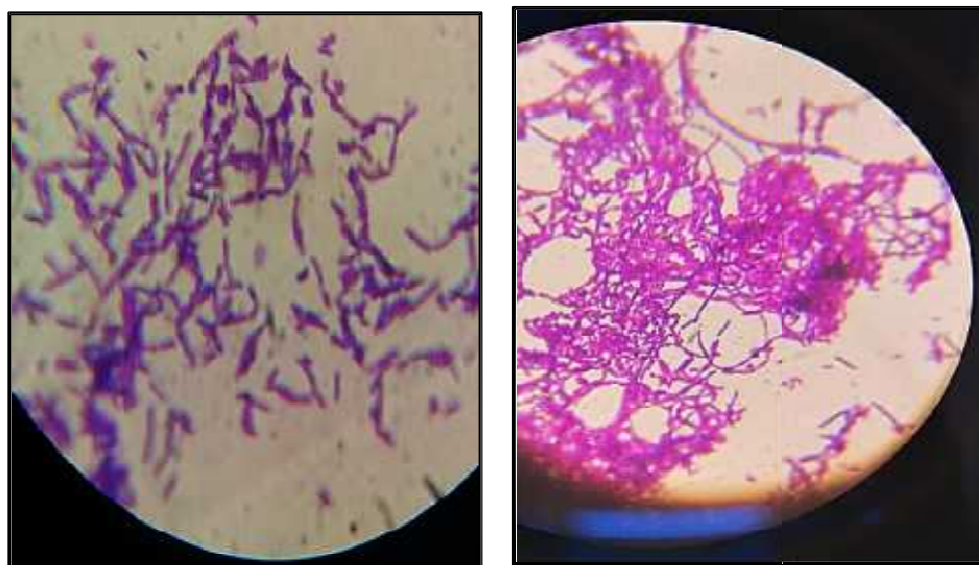


Figure 17. Observation microscopique après coloration de Gram X100

2.3 Résultats des tests biochimiques réalisés

2.3.1 Test urée indole

Un changement de couleur a été marqué avec une coloration rouge en surface après 24 heures d'incubation dans le tube inoculé par la bactérie, cette réaction est due à l'alcalinisation du milieu, la bactérie testée possède une uréase +. (**Figure 19**).



Figure 18. Résultat de test urée indole après 24 h d'incubation

2.3.2 Test mannitol- mobilité

Le résultat obtenu est positive selon la réaction observée ; il y'a un virage de couleur vers l'orange ; c'est-à-dire que les isolats testés sont aptes à fermenter le mannitol et à la réduction des Nitrates en Nitrites **.(Figure19).**



Figure 19 .la réponse bactérienne par test mannitol-mobilité

2.3.3 Test citrate de simon

Le résultat obtenu des 3 isolats est positive, il y a un virage de couleur du milieu vers la couleur bleu.

3. Caractérisation du potentiel de promotion de croissance *in vitro* par les souches isolées et sélectionnées

3.1 Résultat du test de la fixation de l'azote atmosphérique

La fixation de l'azote atmosphérique est évaluée par l'étude de la croissance bactérienne sur milieu de culture dépourvue d'azote .

Achouak et al 1999, Berg et al, 2002 ont montré que les souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* telle que *Bacillus megaterum* , *Bacillus Cereus*, *Bacillus pumilis* , *Bacillus circulans* , *Bacillus licheniformis* , *Bacillus subtilis* , *Bacillus Brevis* , *Bacillus firmus* a fixé l'azote atmosphérique .

Les résultats ont montré que les souches isolées, sélectionnées promotrice de la croissance **Bm5, Bv6, Bv7** ont manifesté un développement sur le milieu *free nitrogen medium* , cette capacité témoigne l'aptitude des bactéries testées à fixer l'azote atmosphérique (**Figure20**).



Figure 20. Le développement bactérien sur milieu dépourvu de l'azote et contenant le mannitol

3.2 Solubilisation du phosphate

L'inoculation des souches isolées, sélectionnées promotrice de la croissance de pois chiche (*Bm5*, *Bv6*, *Bv7*) sur milieu de culture Pikovskaya agar à une température 30 °C pendant 7 jours a montré la formation d'une zone claire développé, avec des indices de solubilisation de 0.5, 0.44 et 0.98 respectivement.

3.3 Production de l'acide indole acétique

La production d'AIA par les souches bactériennes a été évalué qualitativement par le réactif de Salkowsky, la coloration rose à la partie supérieure du milieu de culture indique directement à la présence de l'indole dans le milieu de culture(**Figure 21**).

Les résultats obtenus ont montré que les souches *Bv7*, *Bm5*, *Bv6* sont capables de produire de l'acide indole acétique avec des taux variés.



Figure 21. Le complexe coloré obtenus (le réactif Salkowsky avec l'inoculum bactérien après 20 minutes)

4. Evaluation de l'activité stimulatrice de croissance des pois chiches par les bactéries isolées *in vivo*

4.1 Traitement bactériennes des graines de pois chiche

Les résultats primaires de traitement bactérien des graines de pois chiche sur les boîtes de Pétri incubées après 2 jours à une température ambiante ont montrés une augmentation de la longueur des

racines des graines inoculées avec les suspensions bactériennes par rapport au témoin négatif (**Figure 23**).



Figure 22.Prétraitement des graines de pois chiche par les isolats bactérien après 2 jours d'incubation

4.2 Résultat de la germination des graines de pois chiche traitées par les isolats bactériens après 7 jours

L'étude de l'effet promoteur de germination par des souches isolées sélectionnées des graines de pois chiche est effectuée par l'évaluation des paramètres de croissance : la longueur des racines et des tiges, après 7 jours d'incubation.

Les souches isolées **Bm5**, **Bv6**, **Bv7**, ont montré une activité promotrice avec une longueur maximale des racines par la souche **Bm5** (**Bm5**= 4cm, **Bv6** = 3cm, **Bv7** = 2, 5 cm) par rapport au témoin négatif tandis que la longueur la plus faible est enregistrée chez la souche **P7**(1, 2 Cm). L'estimation de poids frais a montré une amélioration de la croissance des graines de pois chiche inoculé avec les 3 souches les plus performantes.



Figure 23. Germination des graines de pois chiche après 7 jours d'incubation

4.3 Résultat de la culture des plantules de pois chiche inoculées par les souches bactériennes isolées après 4 semaines de culture

Une amélioration nette des paramètres de croissance est observée chez les plantules traitées par les souches bactériennes isolées et sélectionnées. Les longueurs des tiges ont excédé 25 cm par rapport au témoin qui ont marqué une longueur de 12 cm. Cependant, la souche P3 n'a entraîné aucun effet de promotion de la croissance.



Figure24. Témoins négatif de croissance des plantules de pois chiche incubation à l'abri de lumière après 4 semaines de culture



Figure 25. Développement des plantes de pois chiche traité avec la souche Bv₇ après 4 Semaines de culture



Figure 26. Résultat de développement plantules de pois chiche traité avec p7 après 4 Semaines d'incubation.

Discussion

Le présent de ce travail a pour but d'isoler et de caractériser des bactéries à partir du sol rhizosphérique et de sélectionner les souches les plus performantes qui ont des aptitudes et affectent positivement sur la nutrition et la santé des plantes afin d'examiner leur effet stimulateur de la croissance sur le pois chiche.

Les résultats obtenues ont montrés que :

La sélection des souches isolés de différentes échantillons de 3 régions de Freneda ,Sougueur,et Tiaret nous a permis de marquer et d'identifier 12 souches rhizobactériennes comme résultat de 1^{er} screening des souches sur le milieu de culture gélosé .

La purification de ces 12 souches rhizobactériennes permis d'obtenir et d'identifier 6 Souches stimulatrices de la croissance végétale (ou **PGPR**) comme 2^{ème} résultat du 2^{ème} screening secondaire des souches (**PGPR**)

L'identification phynotypique et biochimiques des isolats les plus performante a été effectuée grâce à des testes réalisés comme galerie classique de ces souches .

Le résultat final obtenue après les tests a montré que le genre Bacillus est le genre le plus dominant de la population rhizobactérienne .

L'amélioration de germination et le développement de rendement de biomasse végétale des plantes par rapport au témoin(-)est le résultat de la stimulation de la croissance dès le traitement de pois chiche avec les 3 souches bactérienne isolés lors de la 2^{ème} sélection des souches rhizobactériennes .Les résultats obtenus dès le 2^{ème} screening ont permis la sélection de 4 souches bactériennes pures de genre Bacillus stimulatrice de la croissance de pois chiche qui ont une amélioration importante de rendement de la biomasse du pois chiche après 3 semaines de culture.

D'après **Kloepper et al., (1978)** l'amélioration de rendement de biomasse végétale est due essentiellement à la capacité des bactéries PGPR à faciliter l'assimilation des nutriments chez les plantes par la production des phytohormones agissant comme des régulateur (AIA) , a même instant , les travaux antérieurs réalisés par **Won – Il et al 2011, Schwachtje et al2012, Shrivastava and Kumar 2013** , ont rapportés sur les effets bénéfiques des bactéries rhizosphériques exercés sur les plantes par solubilisation du phosphore , la production des auxines et l'activation de l'enzyme de -1-aminocyclopropane -1- carboxylate désaminase (**Dostage et al , 2010**) .

Les résultats obtenus ont montrés que les 4 souches isolés sélectionnés stimulatrices de la croissance du pois chiche ont une excellente production de acide indole acétique allant jusqu'a 30µg / ml lors de comparaison avec d'autre souche PGPR isolé et examiner dans les études de **Ahmed et al , 2004**) ainsi que **Kapoor, 2012**, a montré que les isolats producteur des auxines lors du traitement des plantes se traduit par une amélioration considérable du volume et de la densité du chevelure racinaire due principalement à la modulation positive de son système hormonal. , ainsi que les travaux antérieur réaliser par **Dostage et al.,2010** , Patten et al 1996 Ont démontré que les exsudats racinaires sont une source naturelle de L- Tryptophane principales précurseur de la biosynthèse de IAA .

L'alimentation minérale en phosphate est également une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Plusieurs souches du genre *Bacillus* isolé sur milieu PVK additionné de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilisant les phosphates à des taux appréciables (**Cherif, 2014**).

Ces bactéries isolées sélectionnées sont aptes de libérer une quantité de P plus élevée à celle nécessaire à leur

métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus plus (**Kloepper et al., 1989**).

Des travaux antérieurs par **Miller et ses collaborateurs en 2008** ont rapportés sur le mécanisme de solubilisation du phosphore chez bactéries est la synthèse des acides organiques via l'oxydation extracellulaire de glucose entraînant son acidification et la libération des molécules de phosphate par chélation des molécules associées telles que Ca^{3+} , Al^{3+} , et Fe^{3+} .

Notre étude 3 isolats parmi les 4 isolats sélectionnés promotrices de la croissance de pois chiche testés ont formé une zone claire dans le milieu Pikovskaya additionné de TCP comme source insoluble de phosphate montrant ainsi une capacité à solubiliser ce dernier, ces résultats sont similaires à ceux trouvés chez 26 souches isolées par **Ruchi et al, 2012**.

Autre intérêt de ces bactéries rhizosphériques (PGPR) suite à la solubilisation du phosphore qui favorise directement la croissance des plantes c'est la fixation d'azote dont l'azote est l'élément nutritif le plus important pour la croissance et la productivité des plantes (**Alexandre, 2019**).

La croissance des 4 souches de *Bacillus* isolées sélectionnées promotrices de la croissance du pois chiche après ensemencement sur milieu dépourvu de toute source d'azote se signifie l'aptitude de ces dernières à fixer l'azote.

La production des sidérophores est aussi un mécanisme qui influence indirectement la nutrition des plantes, en liant le fer sous sa forme disponible Fe^{3+} (**Whipps, 2001**).

Par rapport à **Siddiqui, 2006**, ces fonctions procurent une protection des plantes contre plusieurs maladies fongiques ou bactériennes ces composés inhibent les champignons phytopathogènes (**Ramette et al, 2003**).

De nombreuses études réalisées par **Nelson et ses collaborateurs, 2004** ont rapporté sur l'effet bénéfique de *Bacillus* lors de leur utilisation dans l'agriculture comme agent inoculant (**Bouras, 2018**). L'inoculation des graines et des racines avec les bactéries PGPR de *Bacillus, paenibacillus*, a causé une modification considérable de la composition de la rhizosphère et l'augmentation de la croissance et le rendement de différentes cultures (**LI Alexander 1988, Vessy et Buss, 2002**).

Une excellente amélioration de la longueur des feuilles et des tiges a été marquée après 3 semaines chez les lots traités avec l'inoculum bactérienne par rapport au lots non traités suite a une accélération de germination par rapport au graines non traités. Selon ces résultats obtenus de la germination après le traitement avec l'inoculum bactérienne, on dit que la capacité des souches isolé sélectionné promotrice de la de la croissance de pois chiche de la réalisation de chaque test a un effet directe sur le développement du rendement des plantes de pois chiche.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Dans le but de connaître l'importance relative des rhizobactéries dans le développement des graines de pois chiche, des tests *in vitro* et *in vivo* sont fait afin d'étudier l'amélioration des PGPR et leur rôle qui constitue présentement un enjeu principal dans la croissance de pois chiche d'après les résultats obtenus.

Les bactéries rhizosphériques isolées de sol et ensemencées dans le pois chiche avaient la capacité de fixer l'azote atmosphérique, solubiliser le phosphate et produire l'acide indole acétique selon les résultats obtenues .

Les tests *in vivo* ont confirmé l'effet stimulateur puissant des souches isolées sur la germination et la croissance des plants de pois chiche traduit par une amélioration significative des paramètres morphologiques après 4 semaines de culture.

Tous les changements et les interactions développés soit au niveau des tests *in vitro* (solubilisation de phosphate, fixation de l'azote, production d'acide indole acétique) ou les tests *in vivo* (graines traité par inoculum bactérien) ont montré que la stratégie de la souche PGPR *Bacillus sp* et aussi avec *Pseudomonas sp* est très efficace et a influencé positivement sur l'amélioration de croissance des graines de pois chiche.

Finalement ,on peut dire qu'il y a une reponse comprehensive Pois chiche /PGPR *Bacillus spp* et une communication entre ces derniers (une sélectivité).

Références
Bibliographique

Reference Bébiloiographique

Références bibliographique

- A.Karnwal (2009)** Production of indole acetic acid by fluorescent pseudomonas in the presence of L
- Achouakw.,NormandP.,Heultin (1999)**.Comparative phylogeny of rrs and *nif* H genes in the
- AhmadF.,L.AhmadetM.S;Khan (2008)** screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities Microbial Research,163:173 – 81.
- Akram Adam (2008)** ;Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non- Pathogènes.
- Alexandre Bourles, (2020)**, les rhizo bactéries des sol ultramafique de Nouvelle-Caractérisation, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique et interaction avec les champignons mycorrhiziens à arbuscules.
- Ashrafuzzaman, M. F A Hossen MR Ismail , MA Hoque, MZ Islam , SM Shahidullah et S Meon (2009)** Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria PGPR for the enhancement of rice growth Afri J Biotechnol 1247 -1252.
- Bacillaceae . IntJ.SystBacteriol.
- Beauchamp CJ (1993)** Mode d'action des rhizobactéries favorisent la croissance des plantes et
- Berg, G.N.,Roskot A steidle l eberi AZock ET k S M All2002** Plant dependant Genotypic and phenotypic Diversity of Antagonistic Rhizobacteria Isolated from different verticillium Host plants Appl. Environ Microbiol 68 ; 3328–3338.
- Bottini,R.,F cassan et P p Colli(2004)** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion Appl Microbiol Biotechnol 65 ;497- 503 .
- BOURAS FATIMA,(2018)** isolement et caractérisation des rhizobactéries promotrice de croissance de lentille.
- Cattelan ,A .J.,P G Hartel et j . j Fushrmann (1994)** Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early Soybean growth Soil Sci Am j , 63. 1670- 1680.
- CattelanA.j.,HartelP.G,FuhrmannJ.J (1999)** screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth Soil growth. SoilSci. Soc AmJ., 63:1670 – 1680.
- Cavaglieri, I, J Orlando ML Rodrigurz, S chulze et M Echeveray(2005)** Biocontrol of Bacillus Subtilis against Fusarium verticillioides in vitro and the Maize root level Res Microbiol 156; 748- 754.
- CHERIF HAFSA,(2014)** amélioration de la croissance de la légumineuse en milieu salin par inoculation avec Bacillus Sp. Et *pantoeaag glomerans* isolées de sols arides.
- Dostager, S;G , C.K Deepa et A Pandey (2010)** Potential plant growth promoting activity of Seratia nematophyla NII O 928 on black papper pippernigrum L world j Microbiol Biotechnol 27- 259 N265.
- Downers, BP., Steinbaker CR.,Crowe IID.N (2001)** Expression and processing of a hormonally regulated bean expansion from soybean plant physiol, 126:244 –252.
- Downes,B.P CR Steinbaker , DN crowell (2001)** Expression and processing of a hormonally regulated bean expansion from Soybean plant physiol 125; 244- 252 .
- Ecker,J.R (1995)** the ethylene signal transduction pathway in plants Science, 268 ;667 -675
- Fluorescent Agronomie, 413 -437.
- Frankenberger,W .T.G, et M.Arsahad (1995)** Phytohormones in soil microbial production and function Marcel Dekker , New York , P 503 .

Reference Bébiliographique

- Glick BR, chenz, czarny j, Duanj (2007)** Promotion of plant growth producing.g. soil bacteria Eurj plant growth by ACC– desaminase producing.g. soil bacteria Eurj plant pathology, 119 :329 – 339 .
- Hamman , M AB. ,BA Nault et cd smart (2008)** Effects of plant growth- promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid in infestation in New Yorek crop prot 27; 996- 1002 .
- Heidary, S., P. R Mogahadem et SM Arab(2008)** hydrogen cyanide production Ability by Pseudomonas Fluorescence Bacteria and their Inhibition potential on weed proceeding competition for Resources in a changing world : New Drive for Rial Development Trop en t.a.g. Hohenheim.
- Khan, MsA ziadi et M javed (2009)** microbiol strategies for crop Improvement pp 1371sPRingerVerlag Berlin Heidelberg.
- Khenaka.k. ,2016 Evaluation et taxonomie numérique des bactéries promotrice des plantes isolées de rhizosphère du *Capsicumannuum* .
- KIRDI BILLAL, 2011** Rôle des PGPR“ Plant des PGPR” Growth promoting rhizobacteria dans la
- Kloepper ,JW; et cj Beauchamp (1992)** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria can G Microbiol 38, 1219– 1232.
- Kloepper, JW;Rlitshitz et R.M zablutowiez (1989)** Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity Tends biotechnol 739- 43.
- KLoepper.; j.WandM. Nschrot (1978)** Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic condition sphytopathology 71:642-644.
- LAREDJ ZAZOU, (2017)** Isolement des rhizobactéries et caractérisation de leur potentiel de promotion de la croissance des plantes.
- Liège: Faculty of Agricultural science of Gembloux.**
- Lucy,M, E. Reed et BR Glick (2004)** Application of free living plant growth promoting rhizobacteria Anton LeewInt j. G 86; 1- 25.
- Mac Millan , J 2002** Occurrence of gibberelins in vascular plants , Fungi , and bacterial j plant growth Regul 20. 387- 442.
- MAOUGAL RIM Tinhinen, 2014** Contribution des phytases bactériennes à l’adaptation de
- N.Khakipour,khavazy,HMojallali,E.pazira and H.Asadir ahmani (2008)** .Production of auxin hormone by Fluorescent pseudomonas American–Eurasian Jagric – &Environ Sci, 687– 692.
- NautigalCS1999** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms FEMS mIcrobiol Lett; 170; 260- 270 .
- O.Martinez viveros, M. AJorquera, D.ECrowley,G–Gajardo et M.LMora (2009)** Mechanisms and pratical consideration involved in plant growth promotion by rhizobacteria J.Soil Sciplant Nutr.
- PikovskayaA, R. I (1948)** Mobilization of phosphorus in soil In connection with the vital activity of some microbial species Mikrobiologiya 17 362- 370 .
- PLamanceau (1992)** Effet bénéfique de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *PseudomonasSpp* potential de leur utilisation comme agent de lutte biologique phytoprotection **74 (1) 19-27.**
- Rovira,A.D (1969)** Plant root exudat the botanical Review , 35, 35- 57.
- Ruy, R et C.L Patten (2008)** Aromatic amino acid dependent expression of indol pyruvate de carboxylase in regulated by 4 Tyrh in Enterobacter cloacae VWS Am Soc Microbiol , 19 ; 1 -35.
- Salisbury, FB et CW Ross(1992)** Plant physiology wads worth , Belmont CA.
- Siddiqui , Z (2006)** PGPR prospective Biocontrol Agents of plant pathogens PGPR Biocontrol and Biofertilization , 111- 142. tryptophan and rice roote xudates journal of plant pathology, 61-63.

Vanderlyden, et R.Remans (2007) Indole 3 acetic acid in microbial and microorganisms plant signaling FEMS Microbiol Rev, 31 4; 425- 448.

Weller, D Met LS Thomashow (1994) current challenges in introducing beneficial microorganism into the rhizosphere In ;O'Gar F Dowling DN Boesten Molecular ecology of rhizosphere microorganisms VCH weinheim Germany PP 1- 18 .

Whipps JM.(2001) mIcrobiol interaction and biocontrol in the rhizosphere g Exp Bot 52 . 487-511.

Annexe

Annexe

Annexe

1-Gélose King B

Composition par titre :

Protease peptone No3	20 g
K ₂ HPO ₄ anhydride	1.5 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O	1.5 g
Glycerol	15g
Agar purifier	12g
PH+ 7.2 à 25 C°	

2-Pikovskaya agar

Composition par titre

Extrait de levure	0.50 g
Glucose	10 g
Tricalcium phosphate	5g
Sulfate d'ammonium	0.5g
Sulfate de magnésium	0.10 g
Sulfate de manganèse	0.0001 g
Sulfate de fer	0.0001 g
Agar	
Ph 7.2 à 25 C°	

3- Nitrogen free medium

Mannitol	20g
Eau de robinet	900ml
NaCl	0,2 g
MgSO ₄ – 7H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g

KHPO ₄	1g
-------------------	----

Annexe

4- Préparation de réactif Salkowsky

HCl

150 ml Eau purifié

250 ml Fe cl₃ 0.5 M

7.5 ml