

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

Université de Ghardaïa



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

**Département de Biologie**

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

**MASTER**

**Domaine:** Sciences de la nature et de la vie

**Filière:** Sciences biologiques.

**Spécialité :** Biochimie appliquée

**Par :** BEN SAHA Samira

**HADJ AMAR Sarra**

**Thème**

**Solubilisation des phosphates inorganiques et production des  
sidérophores par quelques isolats rhizobiens nodulant  
l'arachide (*Arachis hypogaea* L.)**

Soutenu publiquement le : 01/10/2020

Devant le jury composé de :

M. BOURAS N.	Professeur	Univ. Ghardaïa	Président.
M. KRAIMAT M.	Maître des Conférences B	Univ. Ghardaïa	Encadrant.
M. BAKELLI A.	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examineur.

**Année universitaire : 2019 / 2020**



## *Remerciement*

Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans des bonnes conditions.

Nous tenons à remercier très profondément Mr. KRAIMAT Mohamed de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé et encouragé et de nous avoir permis de travailler dans un cadre très agréable, nous vous somme infiniment reconnaissantes.

Nos vifs remerciements sont adressés aux membres de jury Mr. BAKELLI et Mr. BOURAS pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger notre travail.

Nous aimerons remercier aussi Melle. DJEMOUAI.N ; Melle. BOUKHLIFA.L ; Melle. DJANI.H et l'équipe de laboratoire BIO3 pour leurs aides à réaliser ce travail.

Un grand merci à nos familles respectives pour leurs soutiens et leurs affections sans retenue au cours de nos longues années d'études.

Nous n'oublions pas de remercier toute personne ayant participé et aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicace

### *Je dédie ce travail*

- À mes très chers parents, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie, que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, Leur suivis Durant toutes mes années d'études, et aussi pour leurs sacrifices, Leur patience sans limite ,leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que Dieu les protège et leur donne le bonheur et la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.
  - À mes chers frères HOCINE, DJAMEL, MOHAMED, MOSTAFA; aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.
  - À mes belles-sœurs et leurs enfants HADIL, ACIL, ANES et ICHRAK merci pour vos encouragements permanents.
  - À ma binôme SARRA, à toutes mes chères amies qui me connaissent, en particulier : KARIMA, DJIHAD, SARA, FERIEL, KAOUTHER.
  - À tous les membres de ma promotion biochimie appliqué
- 2019/2020
- À tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.
  - À tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et m'ont Souhaité du bien de près ou de loin.

**SAMIRA**



## Dédicace

### *Je dédie ce travail*

■ À mes très chers parents, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie, que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, Leur suivis Durant toutes mes années d'études, et aussi pour leurs sacrifices, Leur patience sans limite ,leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que Dieu les protège et leur donne le bonheur et la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

■ À mes chers frères AHMAD et MOHAMED; aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

■ À mes chères sœurs KAWTHER et SOUMIA ; merci pour votre encouragements permanent.

■ À toutes mes chères amies, ma binôme SAMIRA et à toutes mes adorables copines et mes collègues.

■ À tous les membres de ma promotion biochimie appliqué

2019/2020.

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

■ À tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et m'ont Souhaité du bien de près ou de loin.



**SARRA**

## Résumé

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) représentent une partie des bactéries qui ont la capacité de favoriser la croissance des plantes et d'améliorer la performance et la tolérance des plantes aux stress environnementaux. Ce travail a été réalisé sur 14 isolats qui ont été isolés à partir des nodules racinaires d'*Arachis hypogaea* L., récoltés de trois régions différentes de la wilaya de Ghardaïa. Les isolats ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers des essais morphologiques, biochimiques et physiologiques, suivie d'une analyse numérique. Les résultats obtenus montrent que tous les isolats rhizobiens ont une croissance rapide et capables de croître dans des températures allant de 4°C à 45°C.

Les 14 isolats ont été sélectionnés et évalués pour leurs traits de la promotion de croissance des plantes telles que la solubilisation des phosphates, la capacité à fixer l'azote atmosphérique, la production des sidérophores, d'ammoniac et des enzymes. Les résultats montrent, en effet, que la solubilisation des phosphates, la production des sidérophores et d'ammoniac ont été démontrées par tous les isolats bactériens. De plus, parmi les isolats testés, trois (03) étaient capables de fixer l'azote. Par ailleurs, une variabilité phénotypique a été notée pour l'activité enzymatique de ces isolats.

**Mots clés:** Arachide, PGPR, solubilisation, phosphate, sidérophores, Ghardaïa.

## **Abstract**

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) are a part of bacteria which are the ability to promote plant growth and improve plant performance and tolerance to environmental stresses. This work was carried out on 14 isolates which were isolated from root nodules of *Arachis hypogaea* L., collected from three different regions of the wilaya of Ghardaïa. Isolates were subjected to phenotypic characterization through morphological, biochemical and physiological assays, followed by numerical analysis. The results obtained show that all rhizobial isolates are fast growing and capable of growing in temperatures ranging from 4 ° C to 45 ° C.

The 14 isolates were selected and evaluated for their plant growth promoting traits such as phosphate solubilization, the ability to fix atmospheric nitrogen, production of siderophores, ammonia, and enzymes. The results show, in fact, that the solubilization of phosphates, the production of siderophores and ammonia were demonstrated by all the bacterial isolates. Moreover, of the isolates tested, three (03) were able to fix nitrogen. In addition, phenotypic variability was noted for the enzymatic activity of these isolates.

**Key words:** Peanut, PGPR, solubilization, phosphate, siderophores, Ghardaïa.

## ملخص

تعد البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات (PGPR) جزءًا من البكتيريا التي لها القدرة على تعزيز نمو النبات وتحسين أداء النباتات وتحملها للضغوط البيئية. تم إجراء هذا العمل على 14 عزلة تم عزلها من العقيدات الجذرية لنبات *Arachis hypogaea* L ، تم جمعها من ثلاث مناطق مختلفة بولاية غرداية. تم إخضاع العزلات للتوصيف المظهري من خلال دراسة الخصائص المورفولوجية والكيميائية الحيوية والفسولوجية ، متبوعة بالتحليل العددي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن جميع العزلات الجذرية سريعة النمو وقادرة على النمو في درجات حرارة تتراوح من 4 درجات مئوية إلى 45 درجة مئوية.

تم اختيار 14 عزلة وتقييمها لصفاتها المحفزة لنمو النبات مثل إذابة الفوسفات والقدرة على تثبيت النيتروجين في الغلاف الجوي وإنتاج sidérophores والأمونيا والإنزيمات. أظهرت النتائج ، في الواقع ، أن جميع العزلات البكتيرية قادرة على إذابة الفوسفات ، وإنتاج sidérophores والأمونيا. بالإضافة إلى ذلك ، من بين العزلات المختبرة ثلاثة (03) كانت قادرة على تثبيت النيتروجين. كما لوحظ تباين النمط الظاهري للنشاط الأنزيمي لهذه العزلات.

**الكلمات المفتاحية:** الفول السوداني ، PGPR ، الذوبان ، الفوسفات ، sidérophores ، غرداية.

## *Liste des figures*

N°	Figure	Page
<b>01</b>	Arbre phylogénétique conçu selon la méthode d'Neighbor-Joining sous MEGA5 (Originale).	03
<b>02</b>	Localisation des points du prélèvement des isolats de la région de Sebseb et Djdid (Originale).	08
<b>03</b>	Localisation des points du prélèvement des isolats de la région de Mansoura (Originale).	08
<b>04</b>	L'isolat M3 après 1 repiquage (Originale).	09
<b>05</b>	Une galerie API 20 <sup>NE</sup> .	10
<b>06</b>	Fiche de lecture des résultats API 20 <sup>NE</sup> .	11
<b>07</b>	Test de production de sidérophores (Originale).	13
<b>08</b>	Test de production de l'ammoniac.	14
<b>09</b>	Hotte à flux laminaire (Originale).	15
<b>10</b>	Aspect macroscopique de quelques colonies après 02 jours de culture sur YMA à 28°C (Originale).	18
<b>11</b>	Dendrogramme de Classification Ascendante Hiérarchiques (CAH) des isolats en fonction des caractères morphologiques.	20
<b>12</b>	Croissance et réaction d'acidification des isolats sur YMA+BTB (Originale).	21
<b>13</b>	Croissance des isolats sur différentes températures (Originale).	21
<b>14</b>	Réaction de l'oxydase positive (Originale).	22
<b>15</b>	Résultats sur galerie API 20 <sup>NE</sup> de l'isolat S3(Originale).	22
<b>16</b>	Heatmap de regroupement des isolats en fonction des puits de tests API 20 <sup>NE</sup> .	23
<b>17</b>	Indice de solubilisation de phosphate.	24
<b>18</b>	Halo solubilisation autours des colonies sur milieu PVK (Originale).	25
<b>19</b>	Halo orange autour des colonies, critère caractéristique de la production de sidérophores (Originale).	26
<b>20</b>	Variation de la production de sidérophores en fonction des milieux LB et King B.	26

<b>21</b>	A : Fixation d'azote positif, B : Fixation d'azote négatif (Originale).	27
<b>22</b>	Production d' NH <sub>3</sub> (Originale).	28
<b>23</b>	A : Test de cellulase positif, B : Test cellulase de négatif (Originale).	29
<b>24</b>	Activité chitinasique des isolats (Originale).	29
<b>25</b>	A : Test d'uréase positif, B : Test d'uréase négatif (Originale).	30
<b>26</b>	Classification Ascendante Hiérarchique des propriétés PGPR et critères physiologiques des isolats.	32

## *Liste des abréviations*

**%** : Pourcentage.

**ACC** : Acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylate.

**AIA** : Acide Indole Acétique.

**ANOVA**: Analysis of variance.

**API** : Analytical Profile Index.

**BTB** : Bleu de BromoThymol.

**°C**: Degré Celsius.

**Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>** : Tricalcium phosphate.

**CAH** : Classification Ascendante Hiérarchique.

**CAS** : Chrome Azurol S.

**CO** : Monoxyde de carbone.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**FAO** : Food and Agriculture Organization.

**Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique.

**g** : gramme.

**h** : heure.

**H<sub>2</sub>O** : Monoxyde de dihydrogène.

**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : dihydrogénophosphate.

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>** : Acide phosphorique.

**Hplc** : High-performance liquid chromatography.

**HTDMA** : hexadécyltriméthyl ammonium.

**IS** : Indice de Solubilisation.

**K** : Potassium.

**L** : Lignée.

**LB** : Luria Bertani.

**M** : molaire.

**min** : minute.

**ml** : millilitre.

**mm** : millimètre.

**MSP** : micro-organisme solubiratrice de phosphate.

**N** : Azote.

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

**NaCl** : Chlorure de sodium.

**NF-MM** : Nitrogen-Free Malate-mannitol Medium.

**NH<sub>3</sub>** : Ammoniac.

**P** : Phosphore.

**pH**: Potentiel d'Hydrogène.

**PGP** : Plant Growth Promoting.

**PGPR**: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

**PSB** : Phosphate Solubilizing Bacteria.

**P** : P value.

**PVK** : Pikovsakaya.

**P/V** : poids par volume.

**sp** : espèce non déterminée (species).

**µL** : micro-litre.

**µm** : Micromètre (10<sup>-6</sup> mètre).

**UPGMA**: Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean.

**V/V** : Volume par volume.

**YMA**: Yeast Mannitol Agar.

**YMB**: Yeast Mannitol Broth.

## *Table des matières*

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
1. Symbiose Arachide- <i>Rhizobia</i>	01
1.1. L'Arachide	01
1.2. Les rhizobactéries	02
1.2.1. Taxonomie	02
2. Effets de PGPR	04

### ***Chapitre I: Matériel et méthodes***

1. Isolement et purification des isolats	08
1.1. Isolement des isolats	08
1.2. Purification des isolats	09
1.3. Conservation des isolats	09
2. Caractérisation morphologique	10
2.1. L'observation macroscopique	10
3. Caractérisation biochimique et physiologique	10
3.1. Identification par galerie API 20 <sup>NE</sup>	10
3.2. Test d'oxydase	11
3.3. Température de croissance	11
3.4. Vitesse de croissance	12
4. Étude des propriétés PGPR des isolats	12
4.1. Solubilisation du phosphate sur un milieu solide	12
4.2. Production des sidérophores sur un milieu CAS solide	12
4.2.1. Production des sidérophores sur les deux milieux solides King B et LB	13
4.3. Fixation d'azote	13
4.4. Production d'ammoniac NH <sub>3</sub>	14
4.5. Activités enzymatiques des isolats étudiés	14
4.5.1. Activité cellulolytique	14
4.5.2. Hydrolyse de l'urée	15

4.5.3. Activité chitinasique.....	16
5. Analyse statistique .....	16

## **Chapitre II : Résultats et Discussion**

Résultats.....	18
1. Caractérisation phénotypique.....	18
1.1. Caractérisation morphologique.....	18
1.1.1. Analyse macroscopique .....	18
1.1.2. Analyse numérique des critères morphologiques .....	19
1.2. Caractérisation physiologique et biochimique .....	20
1.2.1. Analyse physiologique.....	20
1.2.1.1. Test de la vitesse de croissance sur milieu BTB .....	20
1.2.1.2. Température de croissance.....	21
1.2.2. Analyse biochimique .....	22
1.2.2.1. Test d'oxydase.....	22
1.2.2.2. Identification biochimique par API 20 <sup>NE</sup> .....	22
1.2.2.3. Regroupement des isolats en fonction des puits de tests biochimiques API 20 <sup>NE</sup> .....	23
2. Résultats d'étude de la propriété PGPR des isolats.....	24
2.1. Solubilisation du phosphate.....	24
2.2. Production de sidérophores.....	25
2.3. Fixation d'azote.....	27
2.4. Production d'ammoniac.....	27
2.6. Activités enzymatiques des isolats étudiés.....	28
2.6.1. Activité cellulolytique.....	28
2.6.2. Activité chitinasique.....	29
2.6.3. Hydrolyse de l'urée.....	30
3. Analyse numérique des propriétés PGPR et critères physiologiques des isolats .....	30
3.1. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH).....	30
Discussion générale.....	32
Conclusion .....	41
Références bibliographiques.....	43
Annexes.....	

# *Introduction*

La production agricole mondiale a connu une augmentation importante sur les plans quantitatifs, qualitatifs et diversification des produits, afin de subvenir les besoins alimentaires d'une population humaine sans cesse croissante (FAO, 2010). L'intensification des systèmes de production par la mécanisation, l'utilisation des intrants chimiques sous forme de fertilisants et pesticides sont souvent considérés comme une solution optimale en matière d'amélioration de la qualité des sols et de celle des produits agricoles (Elmholt, 1991). Néanmoins, les effets négatifs de ces produits dans l'agriculture engendrent des problèmes majeurs tels que la détérioration des sols, la pollution de l'environnement, l'interruption du cycle naturel des nutriments écologiques et la destruction de communautés biologiques (Sivasakthi *et al.*, 2013).

Cela a motivé la communauté scientifique à chercher d'autres alternatives pouvant remplacer d'engrais chimiques parmi lesquelles une approche basée sur l'utilisation de microorganismes dans le sol afin d'assurer la durabilité de l'agriculture en augmentant sa rentabilité et en sauvegardant les ressources naturelles aux futures générations. En effet, la reconnaissance de l'importance de la symbiose *rhizobia* – légumineuse a joué un rôle important dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols et dans la réhabilitation des sols appauvris (Dekak, 2010; Kirdi, 2011).

la symbiose *rhizobia*– légumineuse est un phénomène complexe se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, où les bactéries sous leur forme différenciées, fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac (Perry *et al.*, 2004). La symbiose qui nous intéresse est l'association Arachide-*Rhizobia*.

## 1. Symbiose Arachide-*Rhizobia*

### 1.1. L'Arachide

L'arachide (*Arachis hypogea* L.), appartenant à la famille des légumineuses, sous famille des Papilionacées (Fabacée), tribu des Arachidinées (Krapovickas et Gregory, 1994). Ce dernier repartie en sept sections la plus importante est *Arachis* (Smartt *et al.*, 1978). La section *Arachis* comprend deux espèces (*Arachis monticola* et *Arachis hypogaea*). Elle peut utiliser l'azote atmosphérique grâce à la symbiose avec des bactéries de la famille des rhizobiaceae pouvant fournir jusqu'à 30 % de l'azote nécessaire à la plante (Wani *et al.*., 1995).

L'arachide est une culture majeure dans la plupart des régions tropicales et subtropicales notamment dans les régions arides et semi-arides de l'Afrique. Son succès réside dans le fait que c'est une oléo-protéagineuse aux nombreuses utilisations alimentaires et fourragères (graine, huile, tourteaux, fanes et coques) (Wani *et al.*, 1995). En Algérie, la culture d'arachide, malgré son importance économique, n'est pas pratiquée à grande échelle ce qui a imposé sa grande importation. La culture d'arachide n'a pas connu d'évolution significative depuis 1998 à 2005 tant sur le plan des superficies cultivées que des productions. Les wilayas productrices sont en nombre de cinq : El Tarf, Adrar, Ghardaïa, El Oued et Skikda (Laouid *et al.*, 2006).

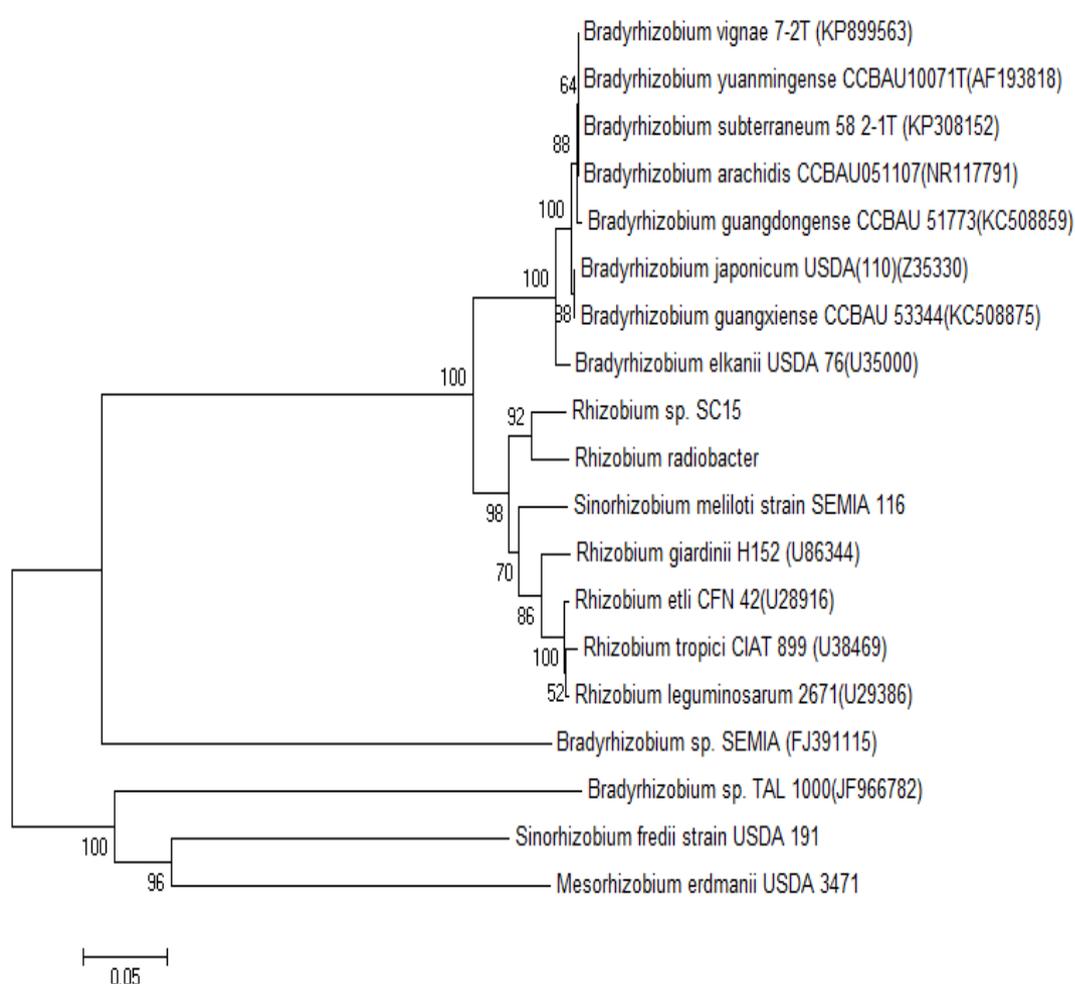
### 1.2. Les rhizobactéries

Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie qui sont caractérisées par leur compétitivité et leur grande capacité d'envahir le réseau racinaire riche en éléments nutritifs durant le cycle de développement de la plante (Campbell et Greaves, 1990; Kloepper, 1993; Cherif, 2014). On peut diviser les rhizobactéries selon leur relation avec la plante hôte en deux groupes essentiels: les rhizobactéries symbiotiques; qui peuvent envahir l'intérieur des cellules végétales tels que : les *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* ; les rhizobactéries non symbiotiques; qui restent à l'extérieur des cellules végétales comme: les *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*...etc (Vessey, 2003; Khan, 2005).

#### 1.2.1. Taxonomie

La capacité de certains *Rhizobia* d'infecter et de former de nodosités avec un groupe particulier d'espèces de légumineuses est importante dans la classification des *Rhizobia*. Les premières classifications des *Rhizobia* étaient basées sur des tests d'inoculations croisées entre les *Rhizobia* et leurs plantes hôtes (Fred *et al.*, 1933). Ensuite, la validité de la classification a été orientée vers la taxonomie polyphasique moderne qui a conduit à la description claire et vaste de nombreux microorganismes (Willems et Collins, 1993).

L'arachide forme principalement des nodules racinaires efficaces avec les *rhizobia* à croissance lente et rapide de Genres *Bradyrhizobium* et *Rhizobium* respectivement (Taurian *et al.*, 2002). Parmi les souches de *Bradyrhizobium* identifiées nodulant l'arachides : *Bradyrhizobium arachidis*, *Bradyrhizobium subterraneum*, *Bradyrhizobium guangxiense*, *Bradyrhizobium guangdongense*, *Bradyrhizobium vignae* et *Bradyrhizobium yuanmingense* (Wang *et al.*, 2013; Grônemeyer *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Grônemeyer *et al.*, 2016; Osei *et al.*, 2018). En outre, les *Rhizobia* à croissance rapide étaient étroitement apparentés aux types *Rhizobium gardinii*, *Rhizobium tropici* et *Rhizobium etli* (Taurian *et al.*, 2006). Les principales espèces nodulant d'arachide sont mentionnées dans la figure 1:



**Figure 1. Arbre phylogénétique conçu selon la méthode d'Neighbor-Joining sous MEGA5 (Originale).**

Lorsque les Rhizobactéries contribuent à la croissance des plantes, elles sont appelées: PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 2004). Les PGPR, sont essentiels pour le maintien et la durabilité des communautés végétales et animales en permettant la transformation des nutriments et en effectuant de nombreux processus biologiques importants (Hinsinger et Marschner 2006; Barriuso *et al.*, 2008; Ambrosini *et al.*, 2012).

## 2. Effets de PGPR

Les PGPR peuvent influencer la croissance des plantes de façon directe ou indirecte. Les mécanismes impliqués directement sont la sécrétion d'hormones (auxines, gibbérellines, cytokinines, etc.) ou en facilitant l'absorption de nutriments (fixation d'azote, solubilisation de phosphate et/ou de potassium et synthèse de sidérophores). Indirectement, les PGPR vont aider la croissance des plantes via la sécrétion d'antibiotiques ou d'enzymes limitant les phytopathogènes (Glick *et al.*, 2007).

L'azote (N) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes. (Kim et Rees, 1994). La partie majeure de cet élément se trouve sous forme gazeuse ( $N_2$ ), inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). Par ailleurs, il existe des bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère. Ces dernières peuvent vivre librement (*Azotobacter*, *Bacillus*, *Acétobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *diazotrophicus* et *Pseudomonas*) (Vessey, 2003); en revanche, d'autres sont en relation symbiotiques et elles fixent l'azote seulement en association avec certaines plantes. Il s'agit des *Rhizobia* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*) qui s'associent aux légumineuses (Tilak *et al.*, 2005 ; Gray et Smith, 2005).

Outre que l'azote, le phosphore est un élément nutritif indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes (Rfaki *et al.*, 2014). Les plantes sont incapables d'utiliser le phosphate car 95 à 99% de phosphate est présent sous forme triacide phosphorique ( $H_3PO_4$ ) insoluble, immobilisée et précipitée. Elles absorbent le phosphate uniquement sous deux formes solubles: les ions monobasiques ( $H_2PO_4^-$ ) et dibasique ( $HPO_4^{2-}$ ) (Govind *et al.*, 2015). Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* spp. *Bradyrhizobium* spp. *Enterobacter agglomerans*,

*Pseudomonas putida* et *Rhizobium spp.* sont des exemples de bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate inorganique en produisant de l'acide gluconique et l'acide 2-cétogluconique (Khan *et al.*, 2009). Elles sont aussi capables de minéraliser le phosphate organique par l'excrétion des enzymes extracellulaires comme les phosphatases (Kim *et al.*, 1997, Weyens *et al.* 2010) .

Le potassium (K) c'est le troisième nutriment majeur important pour les plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% de potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux de silicate (Parmar et Sindhu, 2013). Sans potassium adéquat, les plantes ont des racines mal développées, poussent lentement, produisent de petites graines et ont des rendements plus faibles (Kumar et Dubey, 2012). Les bactéries solubilisant de potassium peut dissoudre les minéraux silicatés et le potassium grâce à la production d'acides organiques et inorganiques, à l'acidolyse, à la chélation et à des réactions d'échange (Etesami *et al.*, 2017).

La compétition trophique s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer. En effet, le fer est un élément capital aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer ( $Fe^{3+}$ ) insoluble (Compant *et al.*, 2005) mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance des bactéries et des plantes. Pour assurer la croissance microbienne, les microorganismes du sol sécrètent les sidérophores. Ces derniers fixent le fer ferrique et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Les sidérophores sont utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes (Glick et Pasternak, 1998). Beaucoup des bactéries productrices de sidérophores appartiennent aux genres *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* ont été rapportées (Kuffner *et al.*, 2008).

Les PGPR aussi produisent des phytohormones telles que les auxines, les cytokinines, les gibbérellines et l'éthylène peuvent affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture racinaire (Arora, 2013). L'acide indole-3-acétique est une auxine considérée comme la phytohormone la plus répandue, la plus produite par les PGPR. Il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007). Les PGPR libèrent ces auxines dans la rhizosphère comme des métabolites secondaires (Khan *et al.*, 2009). Ces bactéries synthétisent et sécrètent l'AIA qui sera absorbé par la

graine ou la racine à partir du tryptophane et d'autres petites molécules présentes dans les semences ou les exsudats racinaires (Whipps, 1990; Fallik *et al.*, 1994).

En plus de ces effets, les PGPR ayant une activité enzymatique comme les phosphatases, uréases, cellulases, chitinases... etc. Ces enzymes jouent un rôle clé dans le processus global de la décomposition de la matière organique dans les écosystèmes en protégeant ainsi les plantes des stressés biotiques et abiotiques (Nadeem *et al.*, 2013).

L'objectif de notre étude est l'identification des bactéries associées aux nodules des racines des arachides des régions de Djdid, Sebseb et Mansoura (Ghardaïa). Pour ce fait, nous avons entrepris, dans ce présent travail, une caractérisation phénotypique : aspects morphologiques, tests biochimiques et physiologiques. En outre, les propriétés PGPR retenues dans le cadre de cette étude, concernent le potentiel de solubilisation de phosphate, la fixation d'azote, la production de sidérophores, la production d'ammoniac et la synthèse des enzymes d'intérêt agricole (cellulase, chitinase et uréase).

# *Chapitre I :*

## *Matériel et méthodes*

## 1. Isolement et purification des isolats

### 1.1. Isolement des isolats

Cette étude porte sur un stock d'isolats conservés (14 isolats), préalablement isolés à partir des nodules d'arachide collectés à partir de différentes régions du Ghardaïa : la région de Sebseb et Djdid (Figure 2) et la région de Mansoura (Figure 3). Une régénération a été effectuée sur un milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Annexe1.1).



Figure 2. Localisation des points du prélèvement des isolats de la région de Sebseb et Djdid (Originale)

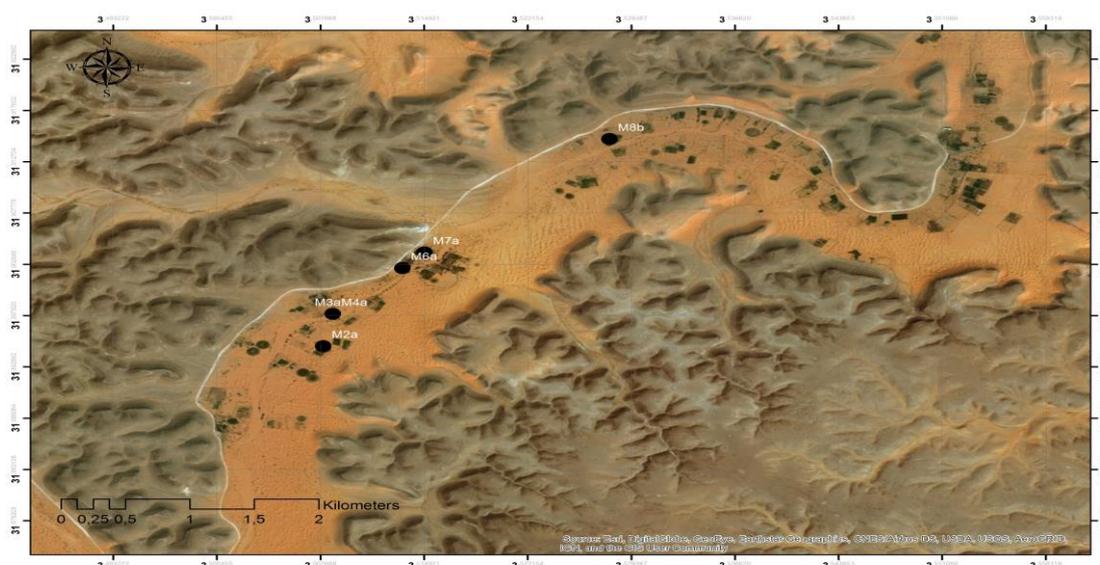
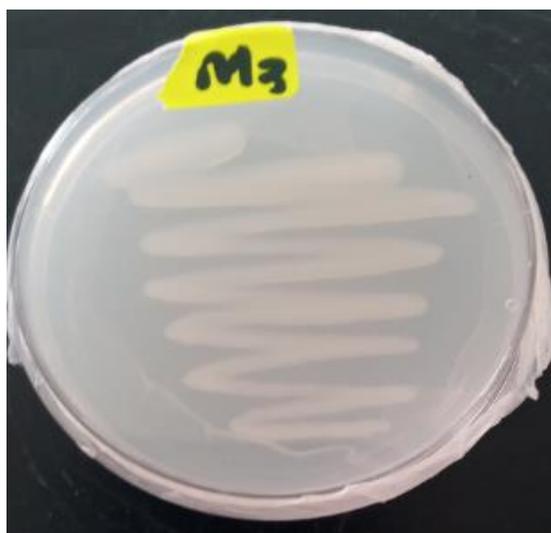


Figure 3. Localisation des points du prélèvement des isolats de la région de Mansoura (Originale).

## 1.2. Purification des isolats

L'opération a été réalisée dans des conditions d'asepsie totale. À l'aide d'une anse en platine flambée au bec Bunsen, les colonies des *Rhizobia* sont repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA. Ces colonies sont repiquées plusieurs fois sur ce milieu jusqu'à l'obtention de cultures pures et faciles à caractériser (Boudanga, 2011) (Figure 4).



**Figure 4. L'isolat M3 après 1 repiquage (Originale).**

## 1.3. Conservation des isolats

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

Préparer le milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) (Annexe 1.2) pour la conservation (composition de l'YMA sans ajout d'agar) puis répartir le milieu dans des tubes à Eppendorf stériles à raison de 0.6 ml/tube et inoculer les tubes par des colonies pures. Après 48 h d'incubation; ajouter 0.6 ml de glycérol à chaque tube inoculé, homogénéiser en évitant la formation des bulles d'air. En fin conserver sous une température de 4°C.

## **2. Caractérisation morphologique**

### **2.1. L'observation macroscopique**

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu YMA, après 07 jours d'incubation à 28°C. Ce test vise à étudier les caractères suivants : la taille, la forme, l'aspect, l'élévation, l'opacité et la couleur.

## **3. Caractérisation biochimique et physiologique**

### **3.1. Identification par galerie API 20<sup>NE</sup>**

Afin d'obtenir une orientation vers les genres et les espèces des isolats, une identification biochimique par galerie API 20<sup>NE</sup> a été effectuée. La galerie API 20<sup>NE</sup> est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La galerie API 20<sup>NE</sup> (Figure 5) comporte 20 micro-tube contenant des substrats déshydratés.



**Figure 5. Une galerie API 20<sup>NE</sup> (Guenoune, 2017).**

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline (NaCl à 1%) qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. Le test d'oxydase constitue le 21<sup>ème</sup>

test d'identification à noter sur la fiche de résultats (Figure 6) et effectuer hors galerie (Delarras, 2014).

La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe 3.4) et l'identification est réalisée à l'aide d'un catalogue analytique et d'un logiciel d'identification (apiweb).

**Figure 6. Fiche de lecture des résultats API 20<sup>NE</sup> (Benyoub, 2011).**

### 3.2. Test d'oxydase

La recherche de la phénylène diamine oxydase est un des critères les plus employés pour l'identification des bactéries surtout celles des bacilles à Gram négatif.

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

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

### 3.3. Température de croissance

Dans le but de déterminer la température maximale de croissance, les souches sont mise en culture sur le milieu YMA et incubées à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 45°C et 50°C. Les lectures sont effectuées après 24 et 72h d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture aller jusqu'à 10 jours.

### **3.4. Vitesse de croissance**

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMA + Bleu de BromoThymol (BTB) (Annexe 1.3) qui est un indicateur coloré de pH. Les boîtes mises en incubation pendant 05 jours. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration de milieu. Les bactéries à croissance rapide montrent une réaction acide dans ce milieu qui fait virer sa couleur vers le jaune (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...), alors que les bactéries à croissance lente effectuent une réaction alcaline qui change la couleur de milieu vers le bleu foncé (genre *Bradyrhizobium*) (Jordan, 1984; Somasegaran et Hoben, 1994).

## **4. Étude des propriétés PGPR des isolats**

### **4.1. Solubilisation du phosphate sur un milieu solide**

La capacité des isolats à solubiliser le phosphore inorganique a été testée selon la méthode décrite par Pikovskaya (PVK) (1948). Les isolats sont ensemencés par spot sur le milieu PVK solide contenant le  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme la seule source de phosphore (Annexe 1.4). Après 4 à 8 jours d'incubation à 28°C, la solubilisation du P complexé est mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie. La capacité solubilisatrice des isolats a été estimée par mesure du diamètre total (le diamètre du halo+le diamètre de la colonie) pour chaque colonie.

L'indice de solubilisation a été calculé par la formule suivante :

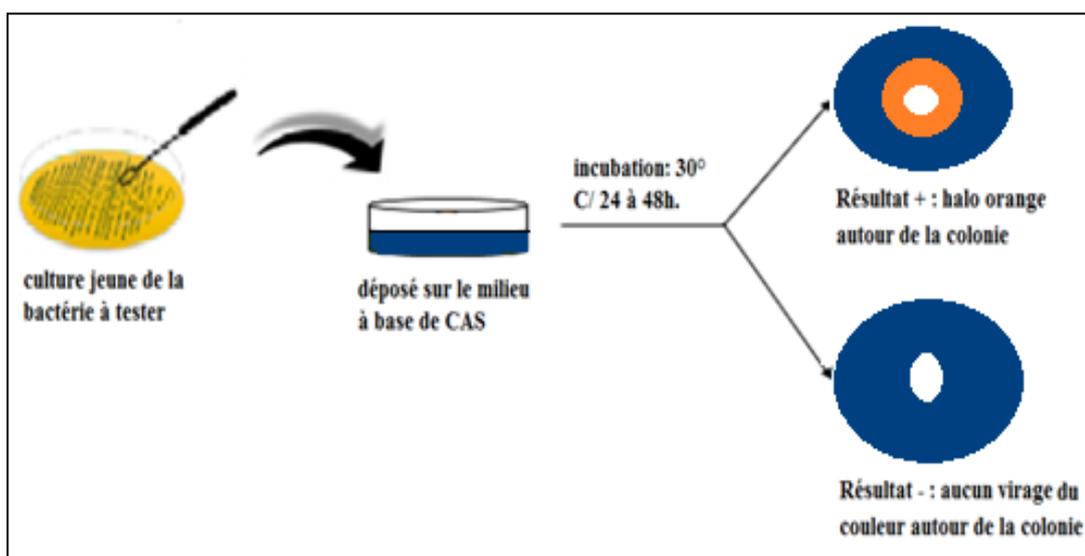
$$\text{IS phosphate} : \frac{\text{Diamètre de la zone halo (mm)} - \text{Diamètre de la colonie (mm)}}{\text{Le diamètre de la colonie (mm)}} \times 100$$

### **4.2. Production des sidérophores sur un milieu CAS solide**

Le principe de cette technique repose sur la présence du complexe fer –CAS-hexa décyl tri méthyl ammonium (complexe Fer/CAS/HDTMA) dans le milieu, ce complexe de couleur bleu peut se dissocier en présence des chélateurs de fer, qui captent le fer et libère ainsi le Chrome Azurol S qui a une couleur orange (Schwyn et Neilands, 1987).

#### 4.2.1. Production des sidérophores sur les deux milieux solides King B et LB

La production de sidérophores a été réalisée sur les deux milieux solides : King B et LB. Les cultures sont déposées en spot sur le milieu de détection Chrome Azurol Sulfate (CAS) selon la méthode de Schwyn et Neilands (1987) et Louden *et al.* (2011) modifiée et adaptée (Annexes 1.5.1 et 1.5.2). La visualisation de la production de sidérophores a été détectée par la formation d'un halo orange autour de la colonie productrice (figure 7). Le calcul du rapport (diamètre du halo/ le diamètre de la colonie bactérienne) permet de comparer les différences de production entre les souches bactériennes.



**Figure 7. Test de production de sidérophores (Originale).**

#### 4.3. Fixation d'azote

La détection visuelle de la fixation d'azote chez les isolats bactériennes a été réalisée en utilisant le milieu exempt d'azote NF-MM (Nitrogen-Free Malate-mannitol Medium) contenant BTB comme indicateur (Herman *et al.*, 1994) (Annexe 1.8). Le milieu solide a été ensemencé par touches à partir les isolats bactériennes et incubé à  $28 \pm 2$  °C pendant 24 h. Le virage de la couleur verte du milieu de culture vers la couleur bleue indique une fixation d'azote positif. La zone colorée a été calculée en sous trayant le diamètre des colonies à partir du diamètre de la zone bleue (Dobereiner et Day, 1976).

#### 4.4. Production d'ammoniac NH<sub>3</sub>

Ce test qualitatif est réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il consiste à inoculer 100 µl de la suspension bactérienne dans 10 ml d'eau peptonée (Annexe 1.9). Après incubation à 30°C /96 h, 0.5ml du réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube d'eau peptonée. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH<sub>3</sub> (Figure 8).

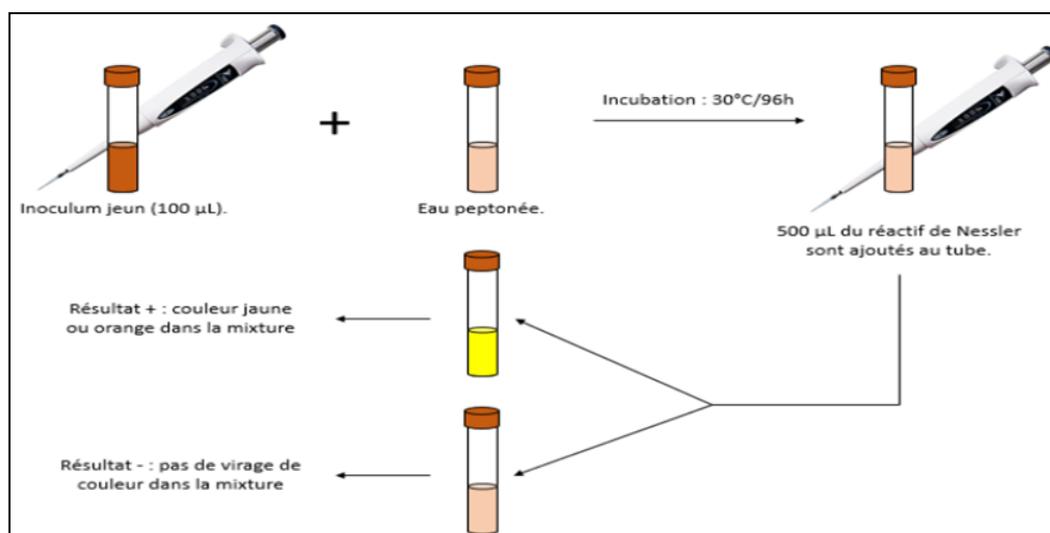


Figure 8. Test de production de l'ammoniac (Rai, 2017).

#### 4.5. Activités enzymatiques des isolats étudiés

Dans le but de déterminer l'utilité des isolats dans la fertilisation des sols et la lutte contre les champignons phyto-pathogènes, plusieurs enzymes sont recherchées.

##### 4.5.1. Activité cellulolytique

L'activité cellulasique est recherchée sur un milieu de Carder (1986) (Annexe 1.10). Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C pendant 07 jours. À la fin de l'incubation, une solution aqueuse de rouge de Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies (Elersy *et al.*, 2010). Après 20 min, la surface est inondée par une solution de NaCl à 1M puis conservée une nuit à 5°C (Jaradat *et al.*, 2008). L'activité cellulasique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

#### 4.5.2. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence de l'uréase, les isolats sont cultivés sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH. Le milieu solide sans l'urée est mis dans l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes puis refroidi jusqu'à environ 45°C. La solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22 µm) et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire (Figure 9) puis incubation à 28°C pendant 48 heures.

Les résultats sont évalués par un changement de la coloration du milieu. Une coloration rouge ou rose fuchsia indique l'hydrolyse de l'urée et donc l'alcalinisation du milieu alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative (Somasegaran et Hoben, 1994).



**Figure 9. Hotte à flux laminaire (Originale).**

#### 4.5.3. Activité chitinasique

Pour mettre en évidence la présence de chitinase. les isolats sont cultivés sur le milieu Chitine (Annexe1.11) et incubées à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'à 07 jours (Sridevi *et al.*, 2008). L'activité chitinasique se manifeste par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies.

### **5. Analyse statistique**

Les données recueillies ont fait l'objet d'une ANOVA à un seul facteur et d'une comparaison multiple des moyennes, en utilisant la méthode Tukey HSD (Tukey Honest significant difference). Un test de Student pour a été examiné pour deux échantillons indépendants au seuil de signification 0,05. Par ailleurs des analyses multi-variées, en l'occurrence: la fonction heatmap2 a été aussi réalisée à l'aide de logiciel R.3.5.2. Une analyse de similarité selon la méthode de Bray-Curtis (ANOSIM), en utilisant l'algorithme UPGMA a été établie sur le programme Past 3.

## *Chapitre II :*

### *Résultats et Discussion*

## **Résultats**

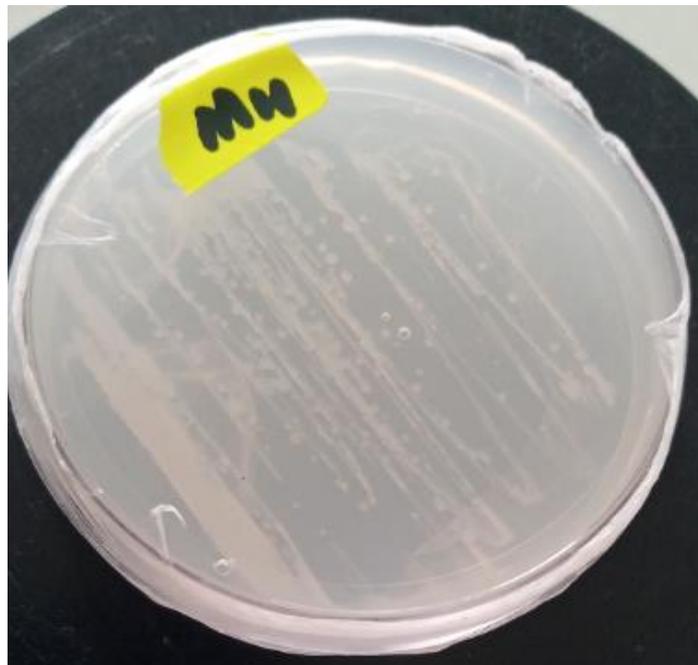
### **1. Caractérisation phénotypique**

Les 14 isolats ont subi quelques tests phénotypiques, basés sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, afin d'approcher au maximum le sommet de la hiérarchie taxonomique.

#### **1.1. Caractérisation morphologique**

##### **1.1.1. Analyse macroscopique**

Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur le milieu YMA. Les colonies sont toutes de couleur blanchâtre et d'un aspect lisse brillant. Cependant, nous avons noté une variation dans la taille, la forme, l'opacité, la consistance et le relief des colonies (Figure 10).



**Figure 10. Aspect macroscopique de quelques colonies après 02 jours de culture sur YMA à 28°C (Originale).**

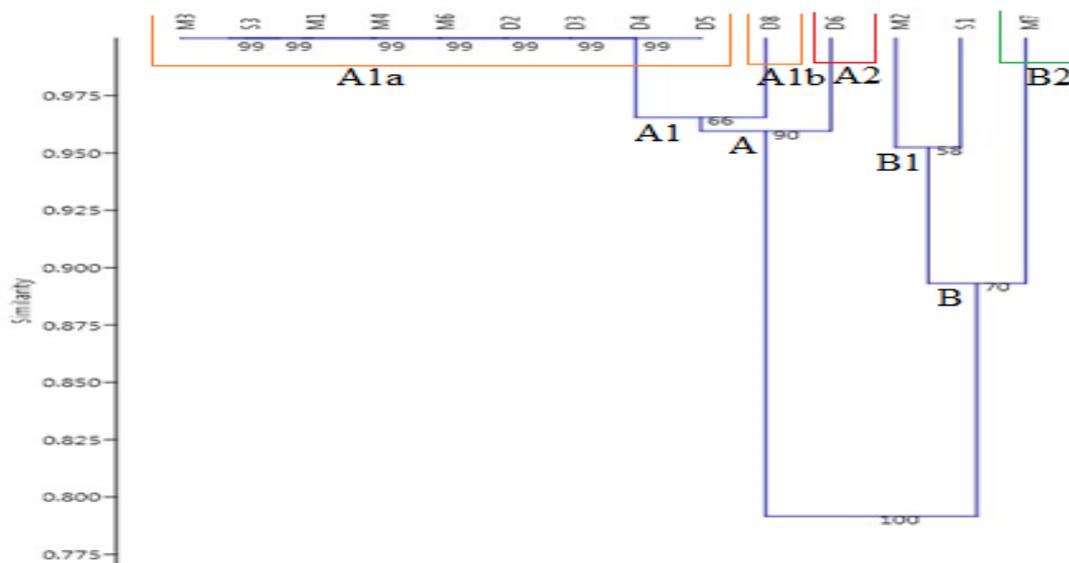
Par ailleurs, l'observation microscopique des mêmes isolats, inspirée du travail de Djani et Mehaya (2019), a montré que la majorité des isolats testés sont des Bacilles mobiles, à Gram négatif, à l'exception de M6 qu'est un Bacille de Gram positif et M7 qui est défini comme Cocci à Gram positif.

#### 1.1.2. Analyse numérique des critères morphologiques

La caractérisation morphologique des isolats bactériens isolés des racines d'arachide a été basée sur 10 caractères. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe 3.1). La classification ascendante hiérarchique établis par le calcul d'indice de similarité selon la méthode de Bray-Curtis, en utilisant l'algorithme UPGMA. L'indice de similarité entre tous les isolats représente dans le tableau (Annexe 3.8), nous a permis de distinguer les groupes suivants :

- Le groupe A, est divisé en deux sous-groupes A1 et A2. Le sous-groupe A1 est divisé en deux A1a et A1b. Le A1a est constitué en quatre isolats (D2, D3, D4 et D5) provenant de la région Djdid avec quatre isolats (M1, M3, M4 et M6), isolés essentiellement de la région Mansoura et l'isolat S3 de la région Sebseb. Ces isolats partagent des caractères morphologiques communs. En effet, ils se distinguent par une taille moyenne, une forme régulière, bombée, translucide avec une consistance crémeuse. Le A1b est composé de l'isolat D8 de la région Djdid, il est caractérisé par une taille envahissante, une forme régulière, bombée, translucide avec une consistance crémeuse. Le sous-groupe A2 est constitué de l'isolat D6 de la région Djdid, il se distingue par une petite taille, une forme régulière, bombée, translucide avec une consistance crémeuse.

- Le groupe B, est divisé en deux sous-groupes B1 et B2. Bien que le sous-groupe B1 renferme les isolats M2 et S1, ils se distinguent par une petite taille, une forme plate, transparente et sèche, le groupe B2 maintient l'isolat M7 dont la forme est en Cocci et de Gram positif.



**Figure 11. Dendrogramme de Classification Ascendante Hiérarchiques (CAH) des isolats en fonction des caractères morphologiques.**

## 1.2. Caractérisation physiologique et biochimique

### 1.2.1. Analyse physiologique

#### 1.2.1.1. Test de la vitesse de croissance sur milieu BTB

Le BTB est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du vert vers le jaune. Par contre, une réaction alcaline se traduit par l'apparition de la coloration bleue. En effet, les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu.

Pratiquement tout les isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB après 24 à 48h d'incubation, et provoquent une réaction acide sur ce milieu avec un virage de la couleur du milieu vers le jaune (Figure 12). Ce qui indique que ces isolats présentent une croissance rapide.

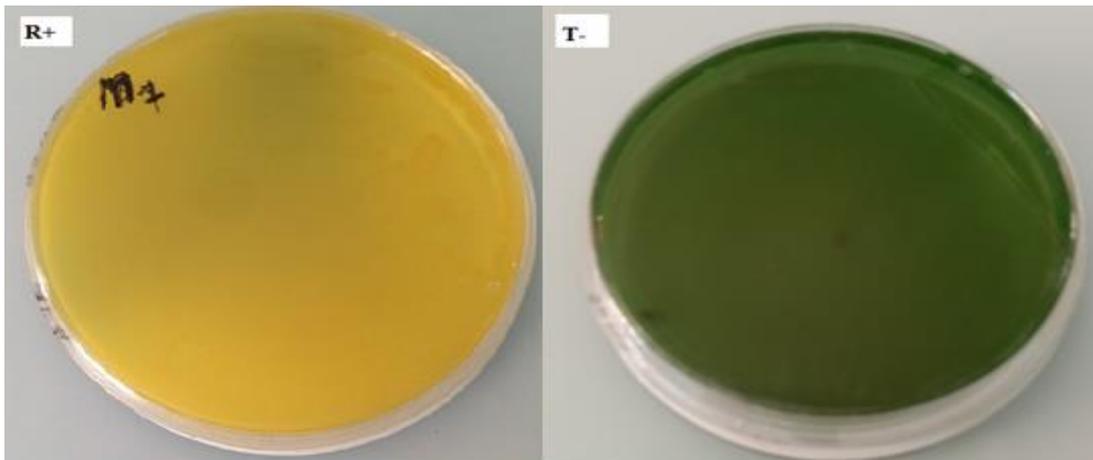


Figure 12. Croissance et réaction d'acidification des isolats sur YMA+BTB (Originale).

1.2.1.2. Température de croissance

Les résultats de l'étude de la température sont présentés dans le tableau (Annexe 3.2). Tous les isolats sont capables de croître à des températures de 4°C jusqu'à 45°C et montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 20 à 37°C. En outre, les isolats M2, M3, M7, S1, S3 sont capables de pousser à 50°C (Figure 13).

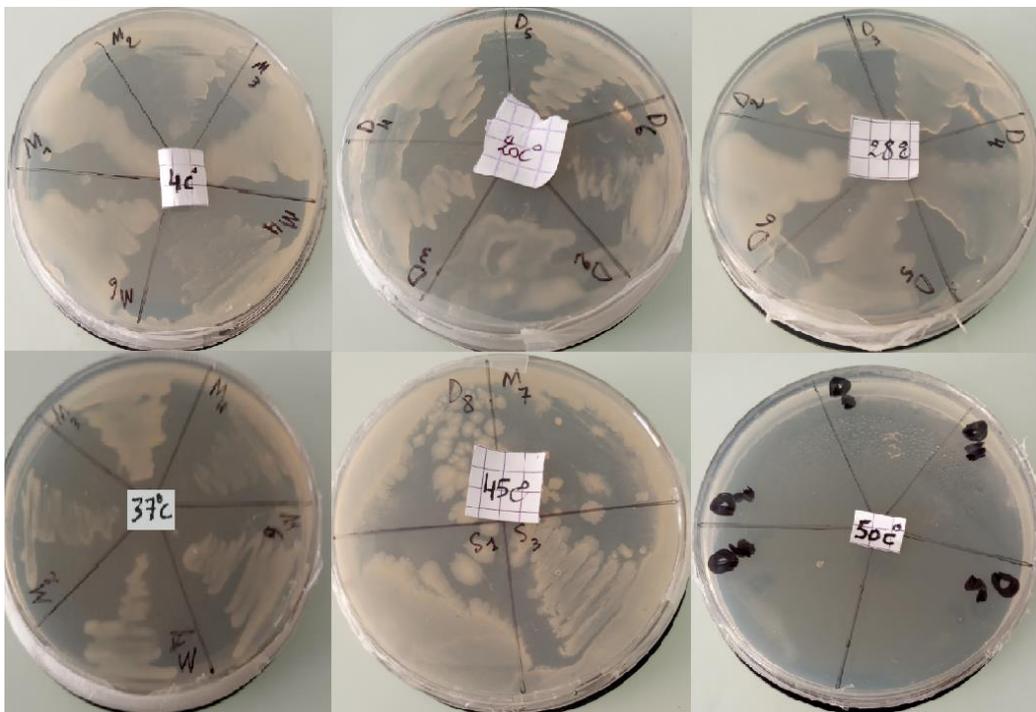
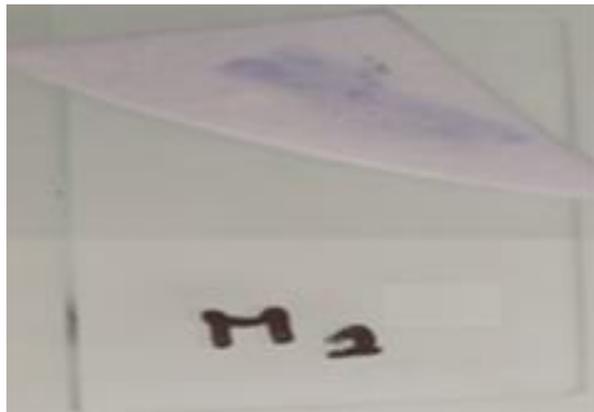


Figure 13. Croissance des isolats sur différentes températures (Originale).

### 1.2.2. Analyse biochimique

#### 1.2.2.1. Test d'oxydase

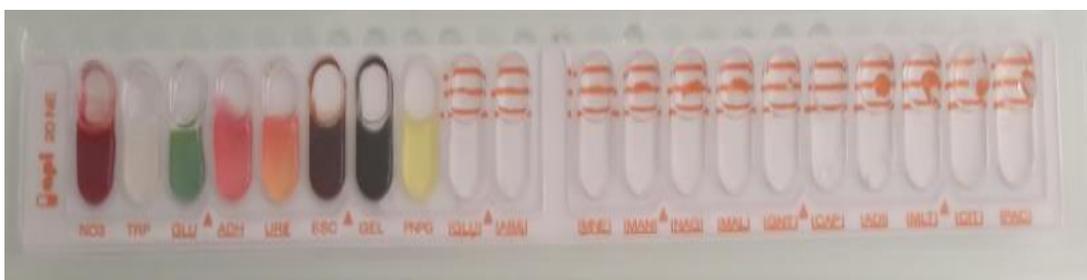
L'oxydase est l'un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles à Gram négatif. Une réaction oxydase positive se matérialise par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée (Figure 14). On estime que tout les isolats révélés oxydase positif.



**Figure 14. Réaction de l'oxydase positive (Originale).**

#### 1.2.2.2. Identification biochimique par API 20<sup>NE</sup>

Le test d'API 20<sup>NE</sup> est réalisé dans le but de mettre en évidence la source carbonée préférée par les différents isolats étudiés, qui constitue une base solide de l'identification biochimique. Les caractères de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau (Annexe 3.3). Le résultat représente dans la figure 15.



**Figure 15. Résultats sur galerie API 20<sup>NE</sup> de l'isolat S3 (Originale).**

1.2.2.3. Regroupement des isolats en fonction des puits de tests biochimiques API 20<sup>NE</sup>

Les résultats d'API 20<sup>NE</sup> illustrés dans la matrice heatmap, nous ont permis de distinguer deux principaux groupes d'isolats rhizobiens (Figure 16) :

- Le groupe A, lui-même se divise en deux sous-groupes A1 et A2. Le sous-groupe A1 est composé d'isolats D2, M6 et S1 qui ont montré une réaction positive pour les tests du glucose (GLU), β-glucosidase (ESC), et réduction de nitrites (NO3) pour l'isolat D2. Le sous-groupe A2 lui-même se divise en deux A2a et A2b: le A2a est représenté par l'isolat M4. Les observations montrent que l'isolat réagit positivement avec glucose (GLU), protéase (GEL), uréase (URE) et β-glucosidase (ESC) ; le A2b contient les isolats M1 et M7 qui ont réagi positivement avec (GLU), (GEL), (NO3), (PNPG), (URE) et (ESC). Néanmoins une variabilité est constatée entre les isolats pour le test de l'arginine dihydrolase (ADH).
- Le groupe B est constitué par la plupart des isolats, il est divisé en deux sous-groupes : le sous-groupe B1 contient les isolats D4, M2 et D6 qui ont montré une réaction positive pour les tests (NO3) et (ESC), avec une variabilité pour le (GEL) ; le sous-groupe B2 est sous groupé en deux : B2a et B2b. Le B2a comprend l'isolat S3 qui a réagi positivement avec (ADH), (GEL), (NO3), (PNPG), (URE) et (ESC). Le B2b comprend les isolats M3, D3, D5 et D8. Les observations montrent que les isolats réagissent positivement avec les tests (NO3), (PNPG), (URE) et (ESC). Néanmoins une variabilité est constatée entre les isolats pour le test de (GEL).

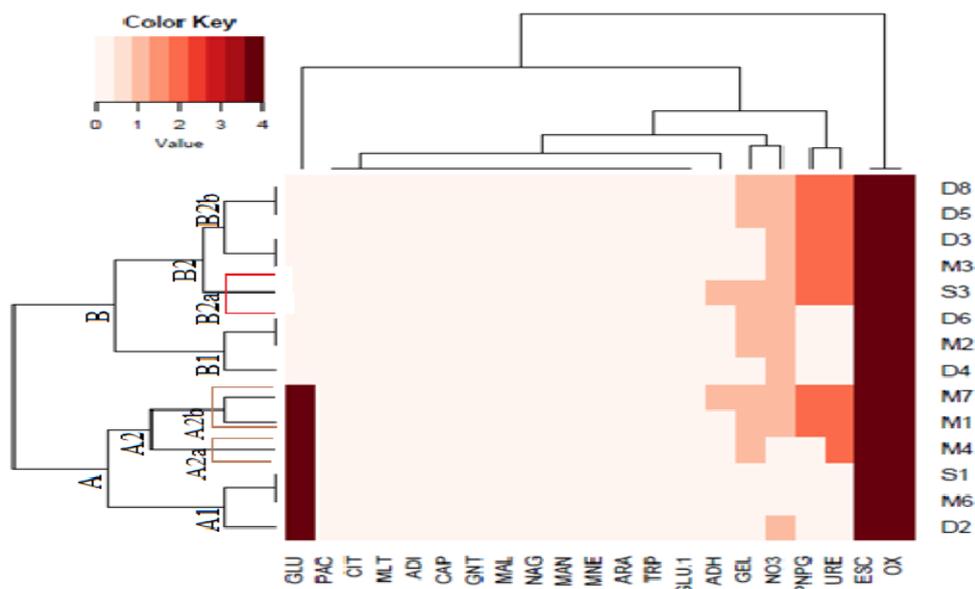


Figure 16. Heatmap de regroupement des isolats en fonction des puits de tests API 20<sup>NE</sup>.

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

L'objectif de cette partie est de mettre en évidence la capacité des différents isolats à produire de substances reconnues comme des agents impliqués dans la promotion de la croissance des plantes. Différents tests PGP (Plant Growth Promoting) ont été effectués à savoir: le pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphate, la production des sidérophores, la production d'ammoniac et des activités enzymatiques.

### 2.1. Solubilisation du phosphate

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate inorganique a été réalisée avec un test qualitatif sur milieu PVK solide contenant le phosphate tricalcique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphore, en calculant l'efficacité de cette solubilisation par mesure de différents diamètres des halos transparents autour des colonies.

Les résultats de l'analyse de la variance à un facteur (One-way ANOVA) révèle une différence hautement significative ( $p < 0.0001$ ) entre les isolats quant à leur indice de solubilisation (Annexe 3.5). Les 14 isolats testés sont capables de produire un halo de solubilisation autour de la colonie (Figure 17.18). L'isolat le plus performant est S1 et la production la plus faible est observée chez l'isolat D6.

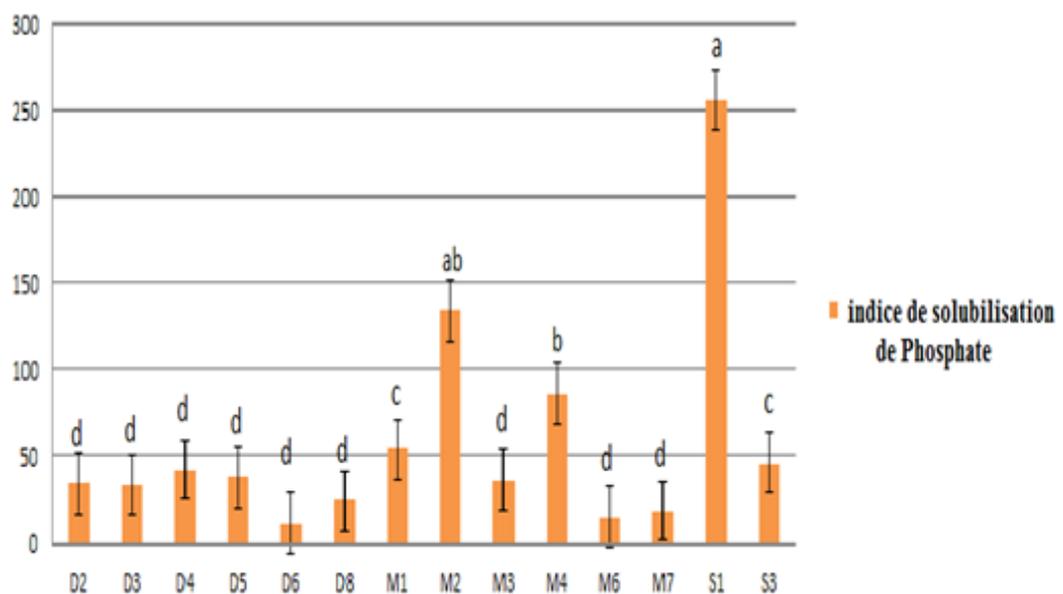


Figure 17. Indice de solubilisation de phosphate.

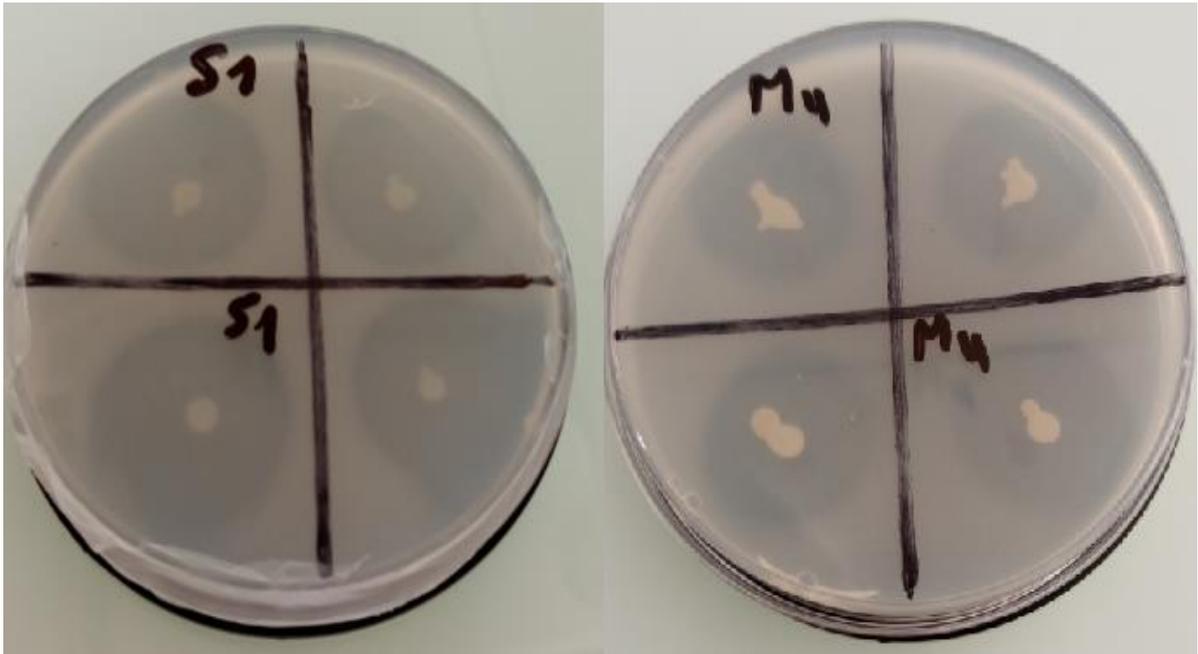


Figure 18. Halo solubilisation autour des colonies sur milieu PVK (Originale).

## 2.2. Production de sidérophores

La capacité des isolats bactériens à produire les sidérophores a été testée sur le milieu(CAS). L'estimation qualitative sur milieu au CAS solide se traduit par l'existence d'un halo orange formé autour de la colonie signifiant la production de sidérophores (Figure 19).

D'après le test de Student, nous a permis de comparer entre les moyennes de production de sidérophores sur les milieux LB et King B (Figure 20), en se basant sur les calculs du rapport :

$$\frac{\text{Diamètre du halo}}{\text{Diamètre de colonie}}$$

Nous constatons une différence n'est pas significative au niveau des moyennes de production de sidérophores entre le milieu King B (1.421214) et milieu LB (1.491571), a été également, détectée ( $p > 0.05$ ) (Annexe 3.6).

Pour le milieu King B, les isolats les plus performants sont S1, M7 et la production la plus faible est observée chez l'isolat D2. Pour le milieu LB, l'isolat le plus performant est S1, et la production la plus faible a été notée chez l'isolat M3.

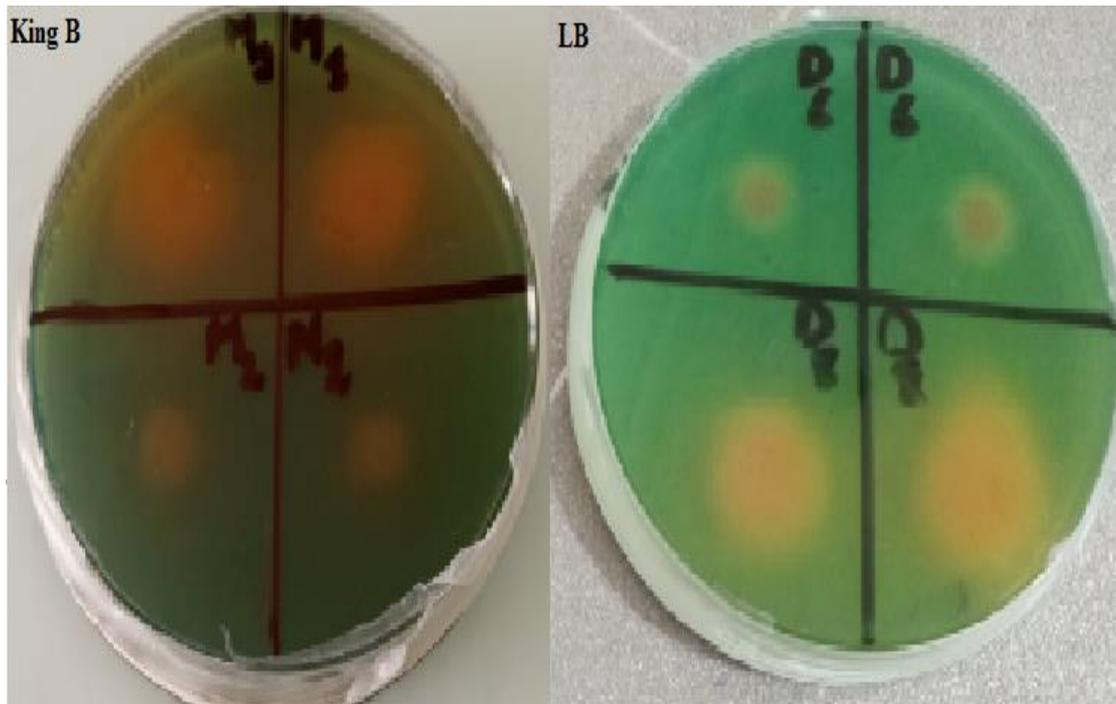


Figure 19. Halo orange autour des colonies, critère caractéristique de la production de sidérophores (Originale).

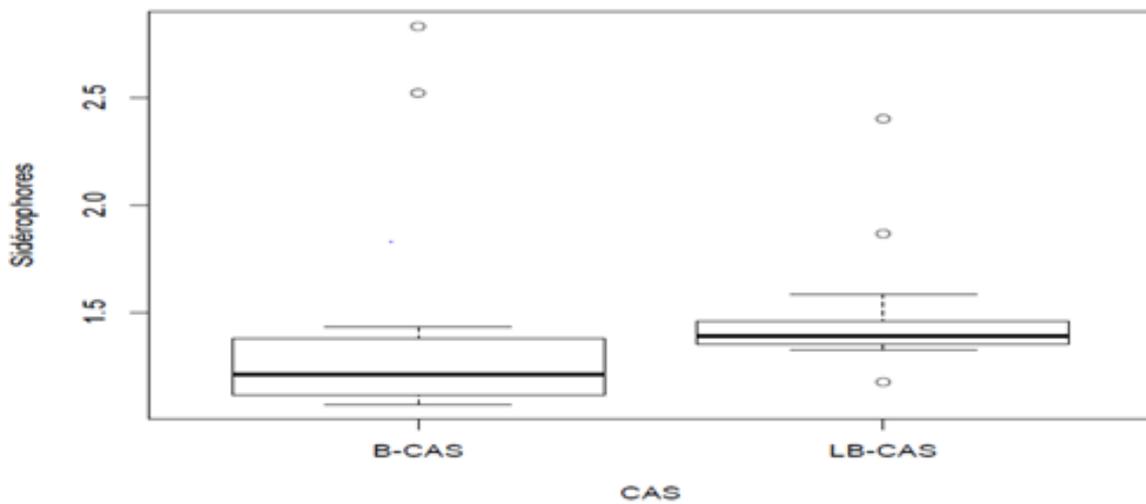
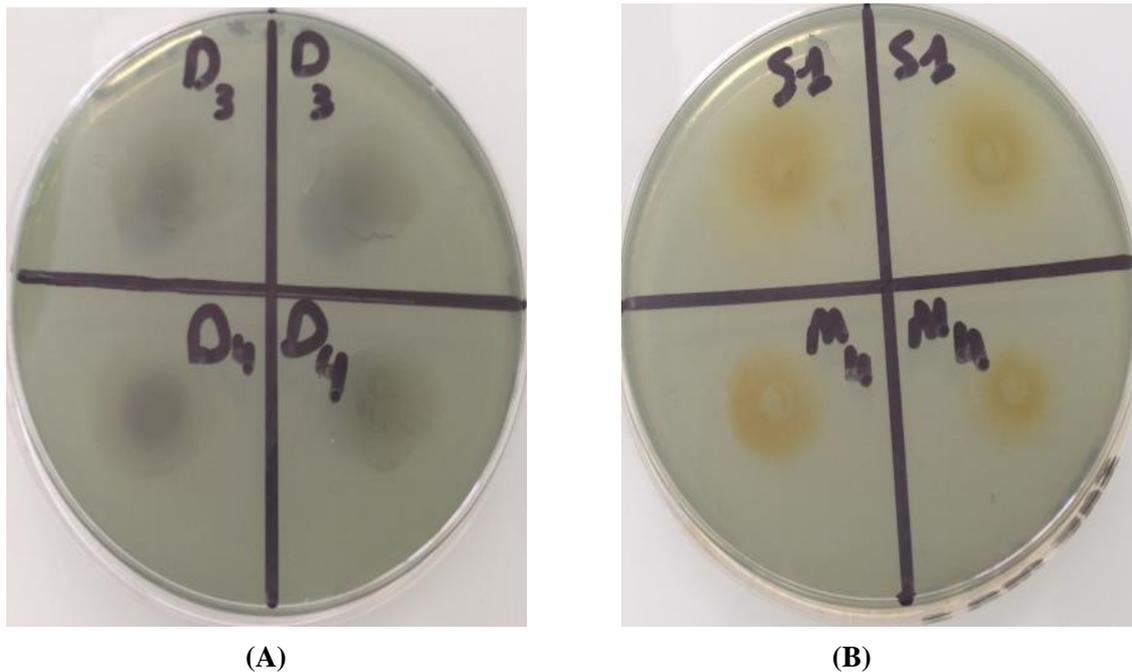


Figure 20. Variation de la production de sidérophores en fonction des milieux LB et King B.

### 2.3. Fixation d'azote

La capacité de la fixation d'azote atmosphérique est testée sur milieu NF-MM solide contenant le BTB comme indicateur coloré pour montrer la présence de l'ammonium libéré dans le milieu de culture. Les résultats obtenus ont montré que parmi les 14 isolats testés, seulement D3, D4 et M3, ayant la capacité de fixer l'azote en changeant la couleur verte du milieu en bleue (Figure 21). L'isolat le plus performant est D4.



**Figure 21. A- Fixation d'azote positif, B- Fixation d'azote négatif (Originale).**

### 2.4. Production d'ammoniac

Les isolats ont été testés pour la production de l'ammoniac par la méthode décrite par Cappuccino et Sherman (1992). Après 4 jours d'incubation à 30°C et l'ajout du réactif de Nessler, tous les isolats se sont révélés producteurs de l'ammoniac par le développement de la couleur jaunâtre ou orange, ce qui confirme la production de  $\text{NH}_3$  par les 100 % de ces isolats (Figure 22).



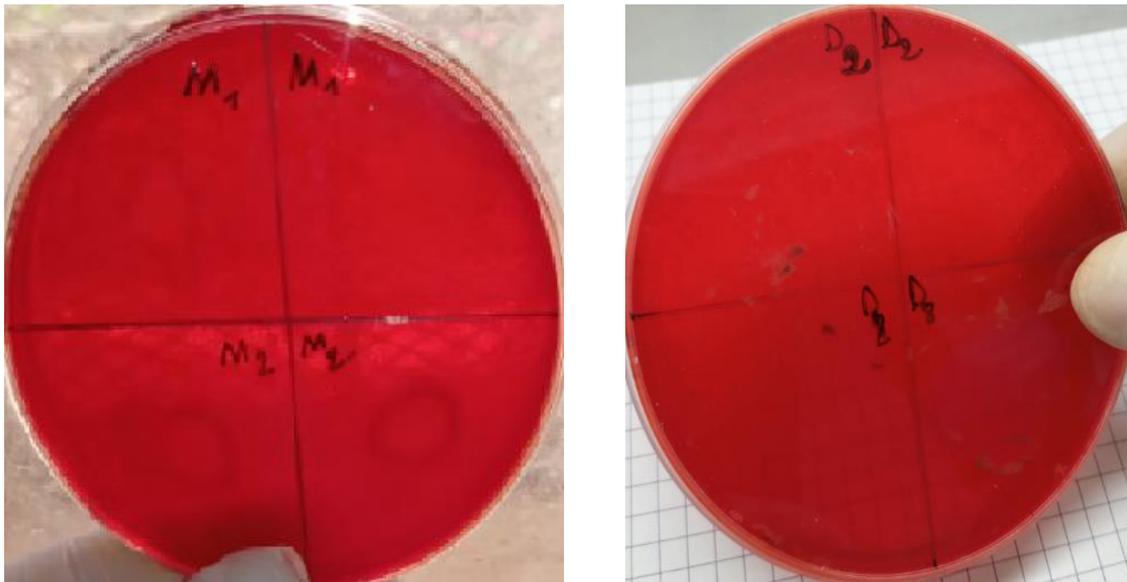
**Figure 22. Production d' NH<sub>3</sub> (Originale).**

## **2.6. Activités enzymatiques des isolats étudiés**

### **2.6.1. Activité cellulolytique**

L'hydrolyse de cellulose se manifeste par un halo clair autour les colonies après coloration au rouge Congo.

Pour les isolats : D3, D4, D5, M1, M2, M6, M7; nous observons un halo clair autour les colonies, donc ces isolats ont la capacité de dégrader la cellulose. Par contre, pour les isolats : D2, D6, D8, M3, M4, S1, S3; nous remarquons l'absence de halo clair donc l'activité cellulolytique est négative (Figure 23).



(A)

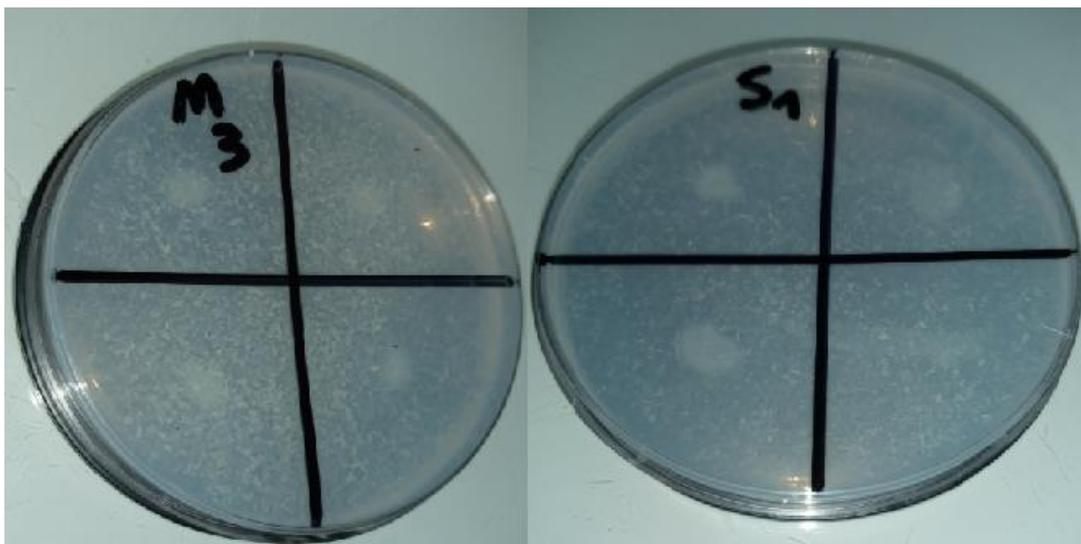
(B)

**Figure 23. A-Test de cellulase positif, B- Test de cellulase négatif (Originale).**

#### 2.6.2. Activité chitinasique

La chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. D'après le test, une activité enzymatique a été approuvée chez les isolats.

Les résultats font la sélection de chitinase (+) chez tous les isolats donc ils ont pu dégrader la chitine. L'activité se traduit par la présence d'un halo clair autour les colonies.

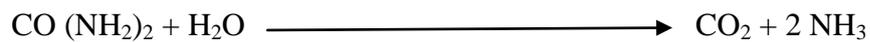


**Figure 24. Activité chitinasique des isolats (Originale).**

### 2.6.3. Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des isolats à hydrolyser l'urée a été testée sur milieu YMA additionné d'urée et rouge de phénol comme indicateur de pH.

Les isolats: D3, D5, D8, M1, M3, M4, M7, S3 alcalinisent fortement le milieu par un virage de sa couleur vers le rose fuchsia ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (uréase +) comme s'est montré dans l'équation (Guiraud, 1998) :



Par contre, les isolats: D2, D4, D6, M2, M6, S1 ont présenté une acidification marquée par changement de la couleur du milieu vers le jaune (uréase -).

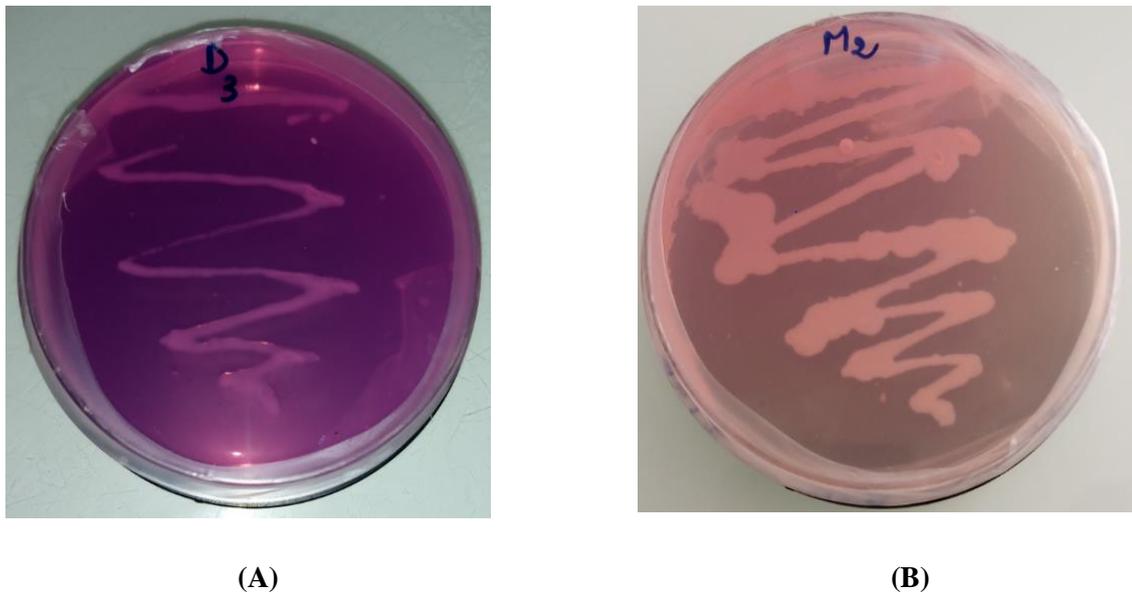


Figure 25. A - Test d'uréase positif, B- Test d'uréase négatif (Originale).

## 3. Analyse numérique des propriétés PGPR et critères physiologiques des isolats

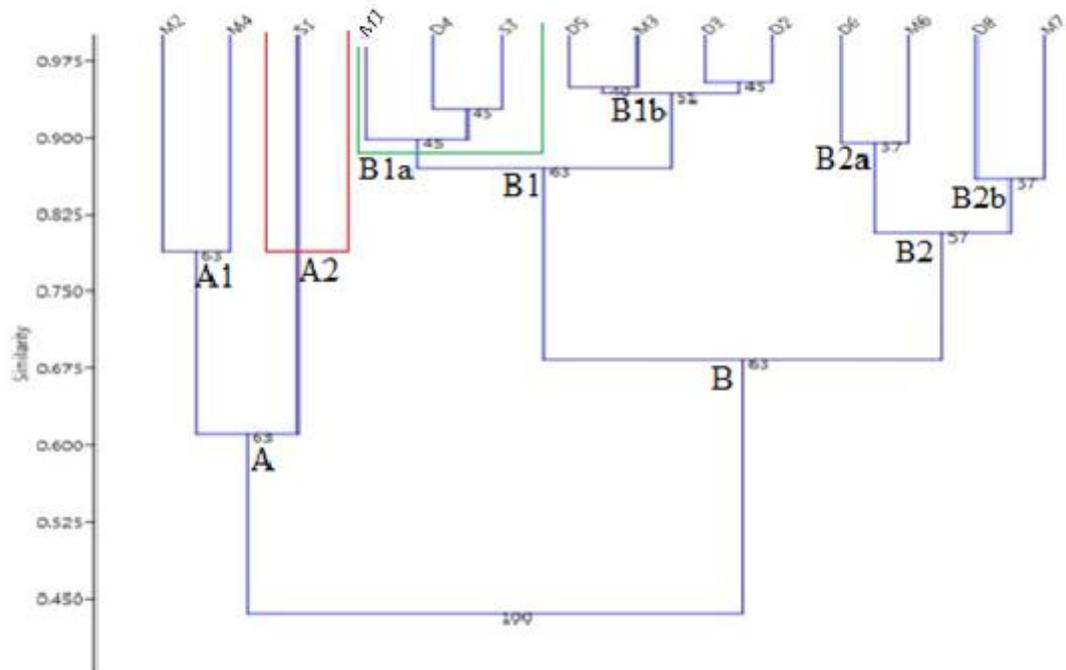
### 3.1. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

L'étude des propriétés PGPR des isolats a été basée sur 07 caractères (Annexe 3.7). En outre, les critères physiologiques des isolats ont été appuyés sur 02 caractères (Annexe 3.2).

Les résultats ont été récapitulés dans le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (C.A.H.), les isolats sont répartis en deux principaux groupes A et B. (Figure 26) :

- Le groupe A, lui-même se divise en deux sous-groupes A1 et A2 :
  - Le sous-groupe A1 est composé d'isolats M2 et M4 qui partagent la présence d'un caractère unique pour chacun. En effet, l'isolat M4 a fait preuve de la présence d'uréase, contrairement à l'isolat M2 qui a approuvé la présence de la cellulase avec une bonne croissance à température 50°C.
  - Le sous-groupe A2 est composé d'isolat S1 qui a d'avantage de bon solubilisateur du phosphate, de bon producteur de sidérophores, d'ammoniac, chitine, acidifiant et une bonne croissance à température 50° C, mais toutefois la fixation d'azote, la production d'uréase et la cellulase sont absentes.
- Le groupe B est composé de 11 isolats D2, D3, D4, D5, D6, D8, M1, M3, M6, M7, S3. Ce groupe est lui-même affilié en 02 sous-groupes B1 et B2. Chacun d'entre eux s'est divisé à son tour en B1a, B1b et B2a, B2b.
  - Le sous-groupe B1a regroupe les isolats D4, S3 et M1 qui partagent la présence d'un caractère unique pour chacun, par contre l'isolat D4 a confirmé la présence de la cellulase et fixation d'azote ; de même l'isolat S3 a approuvé la présence de l'uréase avec une bonne croissance à température 50°C ; par ailleurs l'isolat M1 n'a montré aucune croissance à température 50°C, ni pour la fixation d'azote.
  - Le sous-groupe B1b est composé d'isolats D5, M3 qui possèdent des caractères communs pour chacun. En effet, l'isolat M3 a caractérisé par l'absence de la cellulase; par ailleurs, l'isolat D5 n'a montré aucune croissance à température 50°C, ni pour la fixation d'azote. Alors que les isolats D2, D3 partagent la présence d'un caractère unique pour chacun, marque l'absence de l'uréase, cellulase et la fixation d'azote.
  - Le sous-groupe B2a contient les isolats D6, M6 qui possèdent des caractères communs pour chacun; mais avec une cellulase négative pour l'isolat D6.

- Le sous-groupe B2b est composé d'isolats D8, M7 qui partagent la présence d'un caractère unique pour chacun, par contre l'isolat D8 marque l'absence de cellulase et n'a montré aucune croissance à température 50°C.



**Figure 26. Classification Ascendante Hiérarchique des propriétés PGPR et critères physiologiques des isolats.**

## Discussion générale

Les résultats de la caractérisation phénotypique des isolats nodulant *Arachis hypogea* L. montrent une diversité remarquable au niveau de leur morphologie. Sur le milieu YMA, les colonies apparaissent d'une couleur blanchâtre, et d'une surface lisse et brillante à bord régulier, irrégulier plus au moins bombé, de taille variable et de différentes consistances et opacité. Ces colonies sont visibles après 48h-72h d'incubation. Les résultats de caractérisation morphologique est en concordance avec ceux trouvés par Abdesselam (2017); Vincent (1970); Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (2012). Cette description est valable pour la grande majorité des colonies, et ceci correspond à la description vers les genres *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* (Abdesselam, 2017).

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993; Pagano, 2008). Dans notre cas, tous les isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB après 24 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes, ce qui indique que les isolats présentent une croissance rapide. De même, Bel hadj aissa et Ben bitour (2017) ont constaté que la majorité des isolats testés isolés des nodules d'arachide, acidifient le milieu, ce qui est plus rassurant. En outre, Menna *et al.* (2006) ont rapporté que les souches testées de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* ont pu acidifier le milieu YMA, alors que toutes les souches de *Bradyrhizobium* ont donné des réactions alcalines. Toutefois, (Moreira *et al.*, 1993) ont montré que certaines souches de *Bradyrhizobium* peuvent se comporter comme le genre *Rhizobium* en ce qui concerne la production d'acides.

La température est l'un des facteurs environnementaux principaux. La résistance aux variations de température compte parmi les critères les plus importants pour la sélection des isolats les plus performants. En effet, divers travaux de recherche ont mis au point l'influence des températures sur la survie et le développement des *rhizobia* (Gouffi *et al.*, 1999; Hajjam, 2017) .

La capacité des isolats de croître à différentes températures a été déterminée dans un intervalle allant de 4°C à 50°C. Dans cette étude, tous les isolats sont capables de croître à une température de 4°C jusqu'à 45°C et ils montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 20°C à 37°C, alors que 35.71 % des isolats (05 isolats) peuvent croître dans une température extrême (50°C). Le comportement de nos isolats aux températures est en accord avec l'étude d'El-Hilali (2006) qui a rapporté que la plupart des souches isolées des plantes de lupin peuvent croître à 4°C. En revanche, d'autres travaux ont montré que les *rhizobia* cultivent bien entre 20°C et 40°C (Moawad et Beck, 1991; Jordan, 1984; Graham, 1992). Pour la thermo-tolérance, elle est très variable selon les espèces et les souches de *rhizobia* (Sebbane *et al.*, 2004). Abdelgadir et Alexander (1997) ont montré que *Rhizobium leguminosarum* Biovar *phaseoli* peut survivre à 45°C. Alors que beaucoup de *Rhizobia* de la plante *Prosopis cineraria* tolèrent des températures allant jusqu'à 55°C, d'autres isolats exceptionnellement peuvent croître dans une température de 65°C (Mahobia *et al.*, 2002) .

Néanmoins, les souches qui résistent aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique, cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räzänen, 2002).

Les résultats de l'identification préliminaire a permis de réaliser les tests de galerie API 20<sup>NE</sup>, qui nous amènent à confirmer que tous les isolats possèdent l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase). La majorité des isolats possèdent une nitrate réductase très active, capable de réduire les nitrates du milieu au-delà des nitrites sauf pour les isolats M4, M6 et S1 qui sont dépourvues de cette enzyme. La production d'indole à partir du tryptophane est absente chez les 14 isolats testés. Concernant l'oxydation de glucose et la dégradation de l'urée par l'enzyme uréase sont variées selon les isolats. Une réaction positive est obtenue pour les tests de  $\beta$ -galactosidase et l'hydrolyse de la gélatine chez la pluparts des isolats. L'hydrolyse de l'arginine est observée chez les isolats M7et S3 seulement. En effet, une réaction positive est obtenue pour le test de l'esculinase chez tous les isolats. Par contre, les tests d'assimilation montrent que les isolats n'assimilent pas le glucose, l'arabinose, le mannose, le mannitol, le N-acétyl-glucosamine, le maltose, le gluconate, le caprate, l'adipate, le malate, le citrate et le phenyl-acétate. Les différents résultats obtenus par la galerie API 20<sup>NE</sup> confèrent que les isolats sur lesquels les tests API 20<sup>NE</sup> ont été examinés n'appartiennent à aucun groupe répertorié. Ceci est lié à la vocation de l'utilisation de ces galeries qui est médicale, regroupent des souches de nature pathogène.

Le phosphore est un élément essentiel pour la croissance et la productivité des plantes. Il constitue le 2<sup>ème</sup> élément en importance pour la nutrition végétale (Willard, 1979). Dans les sols agricoles, la solubilisation des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes (Richardson, 2001 ; Przemieniecki *et al.*, 2015). Par ailleurs, les bactéries solubilisant le phosphate (phosphobactéries) secrètent une sorte d'acides organiques qui agissent sur les phosphates insolubles et les convertissent en une forme soluble, fournissant ainsi du phosphore assimilable à la plante (Ponmurugan et Gopi, 2006). Elles peuvent améliorer le développement des plantes en stimulant l'efficacité des bactéries fixatrices d'azote et en améliorant la disponibilité d'autres oligo-éléments (Suman *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2008; Zaidi *et al.*, 2009). Toutefois, l'activité des microorganismes solubilisant le phosphate est souvent affectée par une multitude de contraintes environnementales à savoir le pH, la salinité et la température des écosystèmes les plus

déficients tels que les sols alcalins ayant une tendance à fixer le phosphore (Johri *et al.*, 1999). Gull *et al.* (2004) ont aussi rapporté que les espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ont un grand potentiel de solubilisation du phosphate présent dans le sol.

La solubilisation des phosphates insolubles a été évaluée qualitativement sur milieu PVK en utilisant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore par plusieurs chercheurs (Ahmad *et al.*, 2008; Aarab *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Maheswar *et al.*, 2012 ; Cherif, 2014 ). Dans cette étude, les résultats confirment clairement la capacité des isolats à utiliser  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  disponibles en milieu PVK par la formation d'un halo clair autour les colonies. Les zones claires sont dues, par conséquent, à la production des acides organiques dans le milieu entourant les colonies en question (Hatim, 2015). Nos isolats nodulant l'arachide possèdent un indice de solubilisation arrivant à 256%. Les résultats obtenus au cours de ce test concordent avec plusieurs travaux précédents qui ont démontré la capacité des bactéries rhizosphériques de solubiliser les phosphates (Rodriguez et Fraga, 1999; Verma *et al.*, 2001). Ainsi, l'évaluation de cette activité solubilisatrice par une équipe iranienne chez différentes souches de *rhizobia* a révélé un IS compris entre 248 % pour *Rhizobium leguminosarum* bv. *Vicia* et 141% pour *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium mediterraneum* et *Sinorhizobium liloti* (Alikhani *et al.*, 2006). Ainsi, Pandey *et al.* (2005) ont pu identifier une espèce *Burkholderia* sp. MSP isolée à partir des nodules racinaires de *Mimosa pudica* caractérisée par un pouvoir de solubilisation du phosphate tricalcique élevé, avec un IS de 215%. Sridevi et Mallaiah (2008) ont décrit une solubilisation maximale chez un isolat de *rhizobia* isolé de *Chamaecrista absus* avec un IS de 150%.

Plusieurs études ont montré la présence de sidérophores dans le sol. La chélation du fer par l'intermédiaire de sidérophores bactériens est un caractère désiré à double intérêt; d'un côté, les sidérophores bactériens constituent une source importante de fer assimilable pour les plantes ; d'un autre côté, la chélation du fer par les PGPR constitue un caractère compétitif pour la colonisation spatiale contre les agents pathogènes des plantes (champignons, bactéries) (Sayyed *et al.*, 2005 ; Höfte et Bakker 2007 ; Miethke et Marahiel 2007 ; Tailor et Joshi 2012) .

Dans notre étude, 100% des isolats produisent des sidérophores sur les deux milieux King B et LB avec des rapports CAS variant de 2.83 à 1.072 et 2.4 à 1.175 respectivement. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Mezzaache (2012) qui a montré que

le genre *Pseudomonas* produit des sidérophores avec un pourcentage de 100%. Par ailleurs, Pérez-Miranda *et al.* (2007) ont démontré que 75% des isolats produisent les sidérophores. Cependant, un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température et la source de carbone) influence la production des sidérophores (Valdebenito *et al.*, 2006) .

La présence des bactéries fixatrices d'azote dans le sol et leur isolement ainsi que la possibilité de leur conversion en biofertilisant est une stratégie importante et une solution alternative à l'utilisation des engrais chimiques coûteux et polluants en particulier dans les sols pauvres en nutriments (Cakmakci *et al.*, 2006). La fixation d'azote est une propriété importante des PGPR qui influe considérablement la croissance des plantes. Elle est considérée comme l'un des principaux mécanismes directs par lequel la plante bénéficie de l'azote atmosphérique à travers l'association microbienne (Dobereiner et Day, 1976). Les souches bactériennes fixatrices d'azote telles que *Pseudomonas* et *Bacillus* présentent un grand intérêt dans le domaine de la fixation d'azote (Cakmakci *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que 21.43% des isolats bactériens étaient capables de fixer l'azote atmosphérique. Dans une autre étude menée par (Chibani, 2017), 75% des isolats étaient capables de fixer l'azote. Les travaux de Lwin *et al.* (2012) ont montré que des isolats rhizosphériques identifiés comme *Serratia spp.* et *Bacillus spp.* avaient une grande capacité à fixer l'azote sur milieu G-NFM solide avec le BTB comme indicateur coloré (Hongrittipun *et al.*, 2014; Habib *et al.*, 2016) .

La production d'ammoniac par les bactéries est l'un des mécanismes impliqués dans la lutte contre les champignons phytopathogènes (Kavitha *et al.*, 2013). Elle est considérée comme une caractéristique importante des rhizobactéries améliorant indirectement la croissance des plantes (Josephe *et al.*, 2012). Les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont de bons producteurs d'ammoniac (Ahmad *et al.*, 2008). Dans ce contexte, l'ammoniac est produit par tous les isolats. Ces résultats sont similaires à ceux d'Ahmad *et al.* (2008) et Gontia-Mishra *et al.* (2016). Dans une autre étude menée par Damodaran *et al.* (2013), (09) isolats sur 15 ont montré un résultat positif pour ce test, alors que 88% de résultats positifs sont obtenus par Dinesh *et al.* (2015).

La majeure partie de la matière organique dans le sol se trouve sous forme des polymères, ces derniers ne peuvent pas être assimilés directement par les bactéries. Cependant, grâce à l'activité des enzymes extracellulaires bactériennes, ces composés de haut

Les poids moléculaires peuvent être clivés en monomères et petits oligomères appropriés pour être assimilés par la cellule bactérienne (Rath *et al.*, 1993; Arnosti *et al.*, 2009). Parmi ces enzymes produites par les bactéries : les phosphatases, les uréases, les protéases, les cellulases (Przemieniecki *et al.*, 2015). La production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire est un autre mécanisme utilisé par les agents de biocontrôle pour éliminer les phytopathogènes (notamment les champignons) (Chet *et al.*, 1990 ; Kobayashi *et al.*, 2002), comme les chitinases, lipases et protéases sécrétées par des PGPR (Labuschagne *et al.*, 2010).

La cellulose est le composé organique le plus abondant dans la biosphère, comportant presque 50% de la biomasse synthétisée par la fixation photosynthétique du CO<sub>2</sub> (Eriksson *et al.*, 1990). Les *Rhizobia* produisent l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, ce qui facilite la pénétration des *rhizobia* à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos *et al.*, 1992.). En effet, cette enzyme peut aider certaines rhizobactéries notamment les *rhizobia* à pénétrer plus facilement dans l'espace intercellulaire de la cellule racinaire et induire l'infection symbiotique des racines de légumineuses (Robledo *et al.*, 2012).

La capacité des bactéries à décomposer la cellulose se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Verma *et al.*, 2007). Les résultats obtenus montrent que l'activité cellulolytique est observée chez 50% (07) des isolats. Ces résultats sont proches et corroborent avec ceux obtenus par (Adouane *et al.*, 2018) et qui ont indiqué 66.66 % des isolats ont produit la cellulase. Dans des études menées par Oliveira *et al.* (2007) et Sudto *et al.* (2008) ont trouvé que 100% de leurs isolats étaient cellulolytiques. On peut dire que l'activité des enzymes cellulolytiques dépend de l'origine de la souche et de la composition des milieux de culture (Howieson *et al.*, 2016).

La chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (Muzzarelli, 1999). Elle joue un rôle protecteur contre les champignons phytopathogènes en raison de leur capacité d'interférer leurs constituants en chitine (Gadelhak *et al.*, 2005). Les microorganismes produisant cette enzyme sont classés dans la catégorie des agents de lutte biologique, ces chitinases hydrolysent des polymères linéaires insolubles de  $\beta(1,4)$  de N-acétylglucosamine qui est un constituant majeur des cellules pariétales de plusieurs champignons, les coquilles des crustacées et l'exosquelette des insectes. Plusieurs

espèces du genre *Bacillus* sont connues pour la production de chitinases, c'est le cas de *Bacillus cereus* inhibant la croissance de *Botrytis elliptica* (Pleban *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005).

L'activité chitinasique est observée chez tous les isolats. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Nabti *et al.* (2014), alors que d'autres études réalisées par Tabli *et al.* (2013), Ahmad *et al.* (2013), 75% et 50% des isolats montrent une activité chitinasique respectivement. Ces résultats ne corroborent pas avec les nôtres. Avinash et Rai (2014) ont trouvé 04 souches sur 11 qui produisent la chitinase. Ces différences peuvent être dues au potentiel enzymatique des isolats et aux différences des lieux de prélèvement.

Une quantité énorme d'urée est constamment libérée dans l'environnement par les activités biologiques. L'uréase est une enzyme extracellulaire représentant 63% de l'activité totale du sol, son rôle réside dans l'hydrolyse de l'urée pour former l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) et le CO<sub>2</sub>. Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol, car sa concentration est intrinsèquement liée au taux de la matière organique (Martinez-Salgado *et al.*, 2010). Les uréases bactériennes jouent un rôle important dans la pathogenèse d'un certain nombre d'espèces bactériennes y compris *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Ureaplasma aurea liticum* et autres (Sirko et Brodzik, 2000).

La mise en évidence de la capacité des *Rhizobia* à hydrolyser l'urée grâce à l'uréase a été initialement décrite par Jarvis *et al.* (1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH (El Hilali *et al.*, 2006). Dans cette étude, l'activité uréasique est recherchée chez les 14 isolats, 57.14% (08 /14) des isolats ont révélé un résultat positif. Les résultats de ce test sont semblables à ceux qui sont trouvés dans l'étude réalisée par Hasan *et al.* (2014) où 50% des isolats montrent une activité uréasique. Dans des études menées par Tabli *et al.* (2013) et Nabti *et al.* (2014) ont trouvé que 75 % et 100% de leurs isolats possédaient l'uréase respectivement.

À partir des résultats de dendrogramme des caractères physiologiques et des PGPR, les isolats peuvent être répartis en deux principaux groupes A et B :

- Le groupe A est composé d'isolats M2, M4 et S1 qui sont d'avantage des bons solubilisateurs du phosphate, producteurs de sidérophores, d'ammoniac, chitine et acidifiant. En outre, une bonne croissance à une température 50° C est observée chez les isolats M2 et

S1, l'isolat M4 montre une activité positive d'uréase et l'isolat M2 présente une cellulase positive. Néanmoins, la fixation d'azote est négative chez tous les isolats.

- Le groupe B est constitué par la plupart des isolats, divisé en deux sous-groupes B1 et B2. Chacun d'entre eux est réparti à son tour en B1a, B1b, et B2a, B2b. Le sous-groupe B1a regroupe les isolats D4 et S3 qui partagent la présence d'un caractère unique pour chacun. En effet, l'isolat D4 possède la cellulase et la capacité de fixer l'azote ; alors que l'isolat S3 possède de l'uréase avec une bonne croissance à température 50°C. En revanche, l'isolat M1 n'a montré aucune croissance à une température 50°C, ni pour la fixation d'azote. Le sous-groupe B1b est composé d'isolats D5, M3 possédant des caractères communs pour chacun. En effet, l'isolat M3: la cellulase est négative. Par ailleurs, une fixation d'azote négative et une absence de croissance à 50°C ont été signalées chez l'isolat D5. Alors que, les isolats D2, D3 partagent la présence d'un caractère unique pour chacun : l'isolat D2 marque l'absence de l'uréase, cellulase et la fixation d'azote.

- Le sous-groupe B2a regroupe les isolats D6, M6 qui possèdent des caractères communs pour chacun mais avec une cellulase négative pour l'isolat D6.

- Le sous-groupe B2b est composé d'isolats D8, M7 qui partagent la présence d'un caractère unique pour chacun, En effet, l'isolat D8 manque la cellulase et la croissance à 50°C.

## *Conclusion*

À l'heure où les programmes agricoles s'engagent dans l'étude des écosystèmes, de nombreux chercheurs se focalisent sur l'action des microorganismes pour réduire l'usage des engrais chimiques. À ce titre, l'utilisation des PGPR sont très intéressantes pour l'application en agriculture comme biofertilisants et biopesticides, ils jouent un rôle très important dans le maintien de la fertilité des sols tout en réduisant le coût des engrais chimiques pour un meilleur rendement agronomique à l'échelle mondiale.

Cette étude avait pour objet l'évaluation des isolats pour estimer leurs traits de la promotion de croissance des plantes PGP telles que la solubilisation des phosphates, la capacité à fixer l'azote atmosphérique, la production des sidérophores, la production d'ammoniac et des enzymes telle que cellulase, chitinase et uréase.

Dans ce présent travail, nous avons essayé de mettre en évidence la variabilité phénotypique des souches bactériennes isolées à partir des nodules présents au niveau des racines d'*Arachis hypogaea* L., récoltés dans trois régions différentes de wilaya de Ghardaïa. L'étude phénotypique des isolats basée sur les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques, appuyée par une analyse numérique.

L'aspect morphologique des isolats a montré une grande diversité sur le milieu de culture YMA à 28°C.

La croissance des isolats sur milieu YMA+BTB provoque une acidification du milieu après 24 h et démontre que ces isolats ont une croissance rapide. D'autre part, les isolats présentent une bonne croissance dans l'intervalle de 20 à 37°C. Mais à une température élevée jusqu'à 50°C, la plupart des isolats sont incapables de pousser.

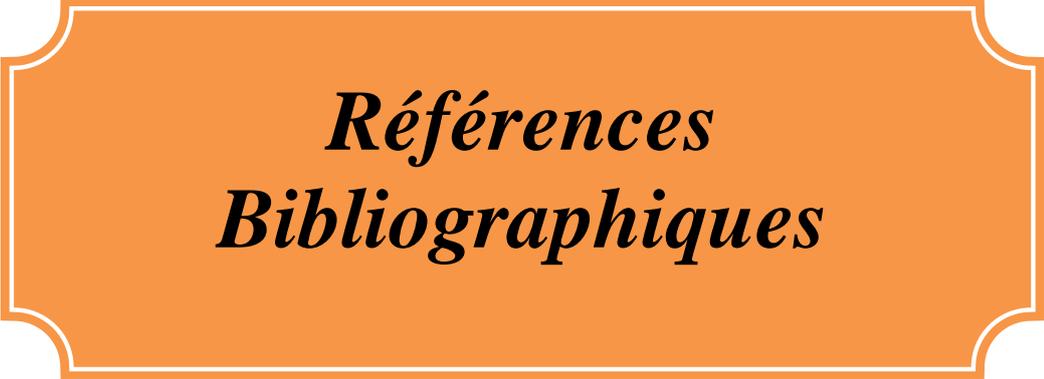
La capacité de solubilisation du phosphate inorganique insoluble pour les 14 isolats a été testée qualitativement sur milieu PVK solide. Tous les isolats sont capables de solubiliser le phosphate, avec un indice de solubilisation maximal de 256 % (l'isolat S1).

Tous les isolats sont capables de produire les sidérophores sur les deux milieux King B et LB avec un rapport 2.83 à 1.072 et 2.4 à 1.175 respectivement. En revanche, (100%) des isolats étaient positifs pour le test de l'ammoniac, par contre seulement 21.43% des isolats étaient capables de fixer l'azote atmosphérique. Ainsi, les isolats testés se caractérisent par une importante diversité enzymatique (cellulase, chitinase et uréase). Par conséquent, ils

peuvent être des candidats qualifiés pour promouvoir la production agricole chez les légumineuses.

À l'issue de ce travail, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives pour l'amélioration de l'utilisation des isolats obtenus :

- Une identification précise du phosphatase alcaline et sidérophores par HPLC, serait très utile.
- Étudier le pouvoir des isolats à produire des phytohormones (cytokinines, 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, gibbérellines .... etc.) et procéder à la caractérisation d'autres activités enzymatiques telles : pectinases, lipases, protéase .... etc.
- Élargir la caractérisation phénotypique vers d'autres tests d'assimilation des sources de carbone, d'azote et la résistance aux métaux lourds.
- Une caractérisation moléculaire des isolats, s'avère primordiale afin de confirmer leur statut taxonomique.

An orange decorative frame with a double-line border and rounded corners, containing the text.

*Références  
Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

- **Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., et Arakrak, A. (2009).** Sélection des isolats rhizobiens solubilisant le phosphate tricalcique: inoculation des graines du triticale (variété momtaz). *COVAPHOS*, 3(5), 147-152.
- **AbdelGadir, A. H., et Alexander, M. (1997).** Procedures to enhance heat resistance of *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 188(1), 93-100.
- **Abdesselam, N. (2017).** identifications et caractérisations des bactéries isolées à partir de différents sols (doctoral dissertation).
- **Adouane, H. Adjaoute, L (2018).** Isolement de bactéries telluriques « PGPR » productrices de substances antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes. Mémoire master, Université Bejaia.
- **Ahmad, F., Ahmad, I., et Khan, M. S. (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- **Ahmad, N., Shinwari, Z. K., Bashir, S., et Yasir, M. (2013).** Function and phylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with GM and non GM maize. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5), 1781-1788.
- **Alikhani H.A., Saleh-Rastin. N and Antoun .H. (2006).** phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In: first international Meeting on Microbial phosphate solubilization. *Developments in plant and soil sciences*, Vol 102. Springer, Dordrecht.
- **Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F. G., Vargas, L. K., Passaglia, L. M. (2012).** Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower, (*Helianthus annuus*). *Plant and soil* 356 (1-2), 245-264.
- **Arnosti, C., Ziervogel, K., Ocampo, L., et Ghobrial, S. (2009).** Enzyme activities in the water column and in shallow permeable sediments from the northeastern Gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84(2), 202-208.
- **Arora, N. K., Tewari, S., et Singh, R. (2013).** Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs. In *Plant microbe symbiosis: Fundamentals and advances* (pp. 411-449). Springer, New Delhi.
- **Avinash, T. S., et Rai, R. V. (2014).** Antifungal activity of plant growth promoting rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. of cucurbitaceae. In *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* (pp. 257-264). Springer, New Delhi.

- **Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. A., Lobo, A. P., García-Villaraco, A., Mañero, F. J.G. (2008).** Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Plant nutrition*, 1-17.
- **Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F. (1993).** Practical Rhizobium–Legume Technology Manual. Technical manual, No. 19, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria.
- **Belhadjaissa, M, M. et Benbitour, I. (2017).** Caractérisation de certains souches de Rhizobia associés à la culture d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) à haut potentiel de solubiliser le phosphore dans la région de Ghardaïa. Mémoire de master.université de Ghardaïa.
- **Benyoub K. (2010).** Isolement de souches de *Pseudomonas* à partir des sols et des nécroses d'oliviers de l'Ouest Algérien : Identification et caractérisation biochimique, sérotypique et phytopathologique. Recherche de l'antibiorésistance, d'antagonisme (bactériocine) et d'ADN plasmidique. Mém. Magis. Univ. Oran (Algérie).156p.
- **Boudanga, L. (2011).** Etude de la performance de la symbiose Vicia faba Rhizobia cultivée sous différents niveaux de phosphore du sol et sélection de souches locales à haut potentiel de solubilisation de phosphore. Mémoire de Master, Université Cadi Ayyad, Marrakech.
- **Cakmakçi, R., Dönmez, F., Aydın, A., et Şahin, F. (2006).** Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1482-1487.
- **Cakmakci, R., Dönmez, M. F., et Erdoğan, Ü. (2007).** The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(3), 189-199.
- **Campbell, R., et Greaves, M. P. (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere. *The rhizosphere.*, 11-34.
- **Capuccino J.C. et Sherman N. (1992).** Negative staining. *In: Capuccino J.C. et Sherman N. (Eds), Microbiology: A laboratory Manual. Redwood City, CA: Benjamin/Cummings. pp.125-179.*
- **Carder JH. (1986).** Detection and quantification of cellulase by congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. *Anal. Biochem.* **153**, 75-79.
- **Cherif, H. (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea* agglomérans isolées de sols arides. Thèse de doctorat, Université de Ferhat Abbas .Algérie, 134p.

- **Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., et Oppenheim, A. (1990).** Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and soil*, 129(1), 85-92.
- **Chibani, H. R. (2017).** Sélection et caractérisation des bactéries solubilisant le phosphate isolées du sol salin dans l'ouest Algérien: effet sur la promotion de la croissance du blé (*Triticum sp.*) (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).
- **Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., et 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(9), 4951-4959.
- **Damodaran, T., Sah, V., Rai, R. B., Sharma, D. K., Mishra, V. K., Jha, S. K., et Kannan, R. (2013).** Isolation of salt tolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomato under sodic environment. *African Journal of Microbiology Research*, 7(44), 5082-5089.
- **Dekak, A. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Mémoire de Master, Université de Tébessa.
- **Delarras, C. (2014).** Pratiques en microbiologie de laboratoire. Lavoisier, France.
- **Djani, H., Mehaya, E. (2019).** Réponses morphologiques, biochimiques et effets PGPR chez quelques isolats rhizobiens nodulant l'arachide (*Arachis hypogaea* L.). Mémoire de Master, Université de Ghardaïa.
- **Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y. K., Subila, K. P., et Aravind, R. (2015).** Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological research*, 173, 34-43.
- **Dobereiner, J. and Day, J. M. (1976).** Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation, (SNF' 75) Vol 2, Washington State University Press, Pullman, USA. pp. 518-538.
- **El Hilali, I. (2006).** La Symbiose Rhizobium–Lupin: Biodiversité des Microsymbiotes et Mise en Evidence d'une Multi-Infection Nodulaire chez *Lupinus luteus*.
- **Elmholt, S. (1991).** Side effects of propiconazole (tilt 250 EC TM) on non-target soil fungi in a field trial compared with natural stress effects. *Microbial ecology*, 22(1), 99.
- **El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A., et El-Toukhy, N. M. (2010).** Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6355-6364.

- **Eriksson KEL, Blanchette RA, Ander P. (1990)** Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- **Etesami, H., Emami, S., et Alikhani, H. A. (2017).** Potassium solubilizing bacteria (KSB):: Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17(4), 897-911.
- **Fallik, E; Sarig, S; Okon, Y. (1994).** Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum–Plant Associations*. Okon, Y. CRC Press, Boca Raton. 77-85.
- **FAOSTAT, (2010).** L'alimentation et l'agriculture (FAO). FAOSTAT .ligne à : <http://faostat.fao.org/default.aspx>.
- **Fred, E. B., I. L. Baldwin, and E. McCoy. (1933).** Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis. (in: Elkan, 1902).
- **Gadelhak, G. G., El-Tarabily, K. A., et Al-Kaabi, F. K. (2005).** Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. *Int J Agri Biol*, 7(4), 627-633.
- **Glick B.R, Todorovic B., Czarny 1., Cheng Z., Duan J., McConkey B. (2007).** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.*26: 227-242.
- **Glick BR et Pasternak JJ.(1998).** Plant growth promoting bacteria in molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. 2nd Ed., ASN press, Washington DC .glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and experimental Botany*. **60**, 121-126.
- **Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A., et Tiwari, S. (2016).** Alleviation of mercury toxicity in wheat by the interaction of mercury-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1000-1012.
- **Gouffi, K., Pica, N., Pichereau, V., et Blanco, C. (1999).** Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1491-1500.
- **Govind Gupta, Shailendra Singh Parihar, Narendra Kumar Ahirwar, Sunil Kumar Snehi and Vinod Singh. (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture, *MicrobBiochemTechnol*, 7:2.
- **Graham, P. H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 475-484.

- **Gray, E.J; Smith, D.L. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37:395-412.
- **Grönemeyer, J.L., Chimwamurombe, P., Reinhold-Hurek, B. (2015).** *Bradyrhizobium subterraneum* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of groundnuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3241–3247.
- **Grönemeyer, J.L., Hurek, T., Bünger, W., Reinhold-Hurek, B. (2016).** *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 62–69.
- **Guenoune, S. (2017).** Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine d'El Harrouch.
- **Guiraud J.P., (1998).** *Microbiologie alimentaire* .DUNOD, Paris. Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. p 234-256.
- **Gull, M., Hafeez, F. Y., Saleem, M., et Malik, K. A. (2004).** Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(6), 623-628.
- **Habib, K., Hamelin, L., et Wenzel, H. (2016).** A dynamic perspective of the geopolitical supply risk of metals. *Journal of Cleaner Production*, 133, 850-858.
- **Hajjam, Y. (2017).** Contribution à l'évaluation des performances des rhizobia nodulant la fève (*vicia faba* L.) Au maroc à solubiliser le phosphate inorganique.
- **Hasan, M., Bano, A., Hassan, S. G., Iqbal, J., Awan, U., Rong-ji, D., et Khan, K. A. (2014).** Enhancement of rice growth and production of growth-promoting phytohormones by inoculation with *Rhizobium* and other rhizobacteria. *World Applied Sciences Journal*, 31(10), 1734-1743.
- **Hatim S. (2015).** Activités enzymatiques et pouvoir solubilisateur du phosphate chez les bactéries fixatrices d'azote nodulant quatre espèces d'Acacia. Mémoire master sciences et techniques, FST FES Maroc.
- **Herman, R. P., Provencio, K., Torrez, R., Seager, G. M. (1994).** Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen-efficient guild in a desert bajada grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (4), 1160-1165.
- **Hinsinger, P., Marschner, P. (2006).** Rhizosphere--perspectives and Challenges--a Tribute to Lorenz Hiltner 12-17 September 2004--Munich, Germany. *Plant and Soil* 283 (1-2).

- **Höfte, M., et Bakker, P. A. (2007).** Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In *Microbial siderophores* (pp. 121-133). Springer, Berlin, Heidelberg.
- **Hongrittipun, P., Youpensuk, S., et Rerkasem, B. (2014).** Screening of nitrogen fixing endophytic bacteria in *Oryza sativa* L. *Journal of Agricultural Science*, 6(6), 66.
- **Howieson J.G., et Dilworth M.J (2016) :** Working with Rhizobia ; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale. p : 312.
- **Huang, X. D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B. R., et Greenberg, B. M. (2005).** A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*, 81(1), 139-147.
- **Jaradat Z, Dawagreh A, Ababneh Q et Saadoun I. (2008).** Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences*. 1, 141- 146.
- **Jarvis, B. D. W., Maclean, T. S., Robertson, I. G. C., et Fanning, G. R. (1977).** Phenetic similarity and DNA base sequence homology of root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20(2), 235-248.
- **Johri, J. K., Surange, S., et Nautiyal, C. S. (1999).** Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39(2), 89-93.
- **Jordan, D. C. (1984).** Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1, 234-254.
- **Joseph, B., Ranjan Patra, R., et Lawrence, R. (2012).** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, 1(2), 141-152.
- **Kavitha, T., Nelson, R., et Jesi, S. J. (2013).** Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4).
- **Khan M.S. et Zaidi A., (2005).** Interactive Effect of Rhizospheric Microorganisms On Growth, Yield and Nutrient Uptake of Wheat. *J Plant Nutrition*, 28 : 2079-2092.
- **Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., et Rasheed, M. (2009).** Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J agric biol sci*, 1(1), 48-58.

- **Kim, J., et Rees, D. C. (1994).** Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, 33(2), 389-397.
- **Kim, K. Y., Jordan, D., et McDonald, G. A. (1997).** Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and fertility of soils*, 26(2), 79-87.
- **Kirdi, B. (2011).** Rôle des PGPR «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites (Doctoral dissertation).
- **Kloepper J.W. (1993).** Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, In: Metting F.B. Jr., *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, N.Y. : 255-273.
- **Kloepper, J. W., Ryu, C. M., et Zhang, S. (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.
- **Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J., et Oudemans, P. V. (2002).** Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1047-1054.
- **Krapovickas, A., and W. Gregory, 1994:** Taxonomía del género *Arachis*(Leguminosae). *Bonplandia* 8: 1-186.
- **Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., et Sessitsch, A. (2008).** Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil*, 304(1-2), 35-44.
- **Kumar, P., et Dubey, R. C. (2012).** Plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens and yield enhancement of *Phaseolus vulgaris*. *J Curr Pers Appl Microbiol*, 1(6), 38.
- **Labuschagne N., Pretorius T. et Idris A.H. (2010).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. In: Maheshwari D.K. (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 211-230.
- **Laouid, A. Neftia, H. (2006).** isolement et identification des champignons de stockage des arachides cultivés à Oued souf (Doctoral dissertation).
- **Li, Y. H., Wang, R., Zhang, X. X., Young, J. P. W., Wang, E. T., Sui, X. H., et Chen, W. X. (2015).** *Bradyrhizobium guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium guangxiense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12), 4655-4661.
- **Louden, B. C., (2011).** "Use of blue agar CAS assay for siderophore detection." *Journal of microbiology et biology education: JMBE* 12(1): 51.

- **Lwin, K. M., Myint, M. M., Tar, T., et Aung, W. Z. M. (2012).** Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal*, 16(5), 137-144.
- **Maheswar, N. U., et Sathiyavani, G. (2012).** Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps, from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(8), 4007-4011.
- **Mahobia, V., et Mahna, S. K. (2002).** Characterization of rhizobia isolated from *Prosopis cineraria* in Jodhpur region, Rajasthan, India. *NFT News*, 5, 3-5.
- **Martinez-Salgado, M. M., Gutiérrez-Romero, V., Janssens, M., et Ortega-Blu, R. (2010).** Biological soil quality indicators: a review. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, 1, 319-328.
- **Mateos, P. F., Jimenez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martínez-Molina, E., et Dazzo, F. B. (1992).** Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1816-1822.
- **Méndez-Vilas, A. (2010).** Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology.
- **Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F. G., Bangel, E. V., Hess, P. N., et Martínez-Romero, E. (2006).** Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(4), 315-332.
- **Mezaache, S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre (doctoral dissertation, université de sétif 1-ferhat abbas).
- **Miethke, M., et Marahiel, M. A. (2007).** Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), 413-451.
- **Moawad, H., et Beck, D. P. (1991).** Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field-grown lentil. *Soil biology and biochemistry*, 23(10), 933-937.
- **Moreira, F. M., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., et Franco, A. A. (1993).** Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(1), 135-146.

- **Muzzarelli, M. G. (1999).** Guardaroba medievale: vesti e società dal XIII al XVI secolo. Bologna, Italy: Il mulino.
- **Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., et Hartmann, A. (2014).** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology*, 61, 20-26.
- **Nadeem, S. M., Naveed, M., Zahir, Z. A., et Asghar, H. N. (2013).** Plant–microbe interactions for sustainable agriculture: fundamentals and recent advances. In *Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances* (pp. 51-103). Springer, New Delhi.
- **Neilands, J. (1987).** Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. *Iron transport in microbes, plants and animals*, 3-34.
- **Oliveira, A. S. D., Campos, J. M. D. S., Valadares Filho, S. D. C., Assis, A. J. D., Teixeira, R. M. A., Renno, L. N., ... et Oliveira, G. S. D. (2007).** Replacing corn with coffee hulls or soyhulls in diets of dairy cows: chewing activity, ruminal metabolism, nitrogen utilization and microbial protein synthesis. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(1), 205-215.
- **Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., et Gomes, E. S. (2009).** MR; carneiro, np; guimarães, ct; schaffert, re et sá, nmh Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol oh the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*.
- **Osei, O., Abaidoo, R. C., Ahiabor, B. D., Boddey, R. M., et Rouws, L. F. (2018).** Bacteria related to *Bradyrhizobium yuanmingense* from Ghana are effective groundnut micro-symbionts. *Applied Soil Ecology*, 127, 41-50.
- **Pagano, M. C. (2008).** Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration. *Plant Soil and Environment*, 54, 498-508.
- **Pandey, N. K., Rana, R. K., Pandit, A., et Chandran, K. P. (2005).** Contribution of Uttar Pradesh towards Indian potato. *Potato Journal*, 32(3-4).
- **Parmar, P., et Sindhu, S. S. (2013).** Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *J Microbiol Res*, 3(1), 25-31
- **Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., et Fernández, F. J. (2007).** O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 127-131.
- **Perry J.J., staley J.J., Lory S. (2004).** Microbiologie : Cours et questions de révision. Ed.Dunod. Paris. p 891.

- **Pikovskaya, R. I. (1948).** Mobilization of phosphates in soil in connection with the vital activities of some microbial species. *Mikrobiologia*. 17: 362 – 370.
- **Pleban, S., Chernin, L., et Chet, I. (1997).** Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in applied microbiology*, 25(4), 284-288.
- **Ponmurugan, P., et Gopi, C. (2006).** In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 348-350.
- **Przemieniecki, W. S., Kurowski, P. T., et Karwowska, A. (2015).** Plant growth promoting potential of *Pseudomonas* sp. SP0113 isolated from potable water from a closed water well. *Archives of Biological Sciences*, 67(2), 663-673.
- **Pujic, P. et P. Normand. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*. 298: 26-29.
- **Rai, A. (2017).** Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous (Doctoral dissertation, universite de bouira).
- **Rath, J., Schiller, C., et Herndl, G. J. (1993).** Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the Caribbean Sea. *Marine ecology-progress series*, 102, 89-89.
- **Räzänen L.A. (2002) :** Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat. Université d'Helsinki. Finland.
- **Rfaki, A., Nassiri, L., et Ibjibijen, J. (2014).** Genetic diversity and phosphate solubilizing ability of *Triticum aestivum* rhizobacteria isolated from Meknes region, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 8(19), 1931-1938.
- **Richardson, A. E. (2001).** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28(9), 897-906.
- **Robledo, M., Rivera, L., Jiménez-Zurdo, J. I., Rivas, R., Dazzo, F., Velázquez, E., ... et Mateos, P. F. (2012).** Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11(1), 125.
- **Rodríguez, H., et Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.

- **Sayyed, R. Z., Badgujar, M. D., Sonawane, H. M., Mhaske, M. M., et Chincholkar, S. B. (2005).** Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads.
- **Sebbane, N., Boulila, A., Sahnoune, M., Ramdani, N., Lajudie, P., et Benallaoua, S. (2004).** Caractérisation phénotypique de souches de rhizobia isolées de quatre espèces de médicago dans la vallée de la Soummam (Algérie). *Sciences et Technologie. C, biotechnologies*, 5-10.
- **Sirko, A., et Brodzik, R. (2000).** Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4), 1189-1195.
- **Sivasakthi S., Kanchana D., Usharani G., Saranraj P., (2013).** Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolated from paddy rhizosphere soil of Cuddalore district, Tamil Nadu, India. *Int. J. Microbiol.*, 4 3 :227- 233.
- **Smartt, J., Gregory, W., et Gregory, M. P. (1978).** The genomes of *Arachis hypogaea*. 1. Cytogenetic studies of putative genome donors. *Euphytica*, 27(3), 665-675.
- **Somasegaran P., Hoben H. J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag New York.
- **Somasegaran, P., et Hoben, H. J. (2012).** Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Springer Science et Business Media.
- **Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews* 31 (4), 425-448.
- **Sridevi, M., et Mallaiah, K. V. (2008).** Factors affecting chitinase activity of *Rhizobium* sp. from *Sesbania sesban*. *Biologia*, 63(3), 307-312.
- **Sudto, A., Punyathiti, Y., et Pongsilp, N. (2008).** The Use of Agricultural Wastes as Substrates for Cell Growth and Carboxymethyl Cellulase (CMCase) Production by *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Rhizobium* sp. *current applied science and technology*, 8(2), 84-92.
- **Suman, A., Shasany, A. K., Singh, M., Shahi, H. N., Gaur, A., et Khanuja, S. P. S. (2001).** Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 39-45.
- **Tabli, N., Nabti, E. H., Dahel, D., Mokrane, N., Manyani, H., Dary, M., et Megias, M. G. (2014).** Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with bio-control effect, isolated from Algerian Soil. *J. Ecol. Health and Environ*, 2(1), 1-7.

- **Taylor, A. J., et Joshi, B. H. (2012).** Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. *Journal of Environmental Research and Development*, 6(3A), 688-694.
- **Taurian, T., Aguilar, O., M., Fabra, A., (2002).** Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba Argentina. *Symbiosis* 33,59–72.
- **Taurian, T., Ibanez, F., Fabra, A., et Aguilar, O. M. (2006).** Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central Argentinean soils. *Plant and soil*, 282(1-2), 41-52.
- **Tilak, K.V.B.R; Rauganayaki, N; Manoharachari, C. (2005).** Synergistic effects of plantgrowth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Europ. J. Soil Sci.* 57 :67-71.
- **Valdebenito, M., Crumbliss, A. L., Winkelmann, G., et Hantke, K. (2006).** Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *International journal of medical microbiology*, 296(8), 513-520.
- **Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., et Valero, J. R. (2007).** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. : panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.
- **Verma, SC., JK.Ladhaet AK. Tripathi. (2001).** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91:127–141.
- **Vessey, J.K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255 : 571–586.
- **Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- **Wang, R., Chang, Y. L., Zheng, W. T., Zhang, D., Zhang, X. X., Sui, X. H., et Chen, W. X. (2013).** *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and applied microbiology*, 36(2), 101-105.
- **Wani, S. P., Rupela, O. P., et Lee, K. K. (1995).** Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. In *Management of biological nitrogen fixation for the development of more productive and sustainable agricultural systems* (pp. 29-49). Springer, Dordrecht.
- **Weyens, N., Monchy, S., Vangronsveld, J., Taghavi, S., et Van Der Lelie, D. (2010).** Plant-Microbe Partnerships. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.

- **Whipps, J.M. (1990).** Carbon utilization. In: *The Rhizosphere*. Lynch J.M. Wiley Interscience, Chichester, UK. 59-97.
- **Willard, L. L. (1979).** *Chemical equilibria in soils*. Chichester, UK: John Wiley et Sons.
- **Willems, A., et Collins, M. D. (1993).** Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 305-313.
- **Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., et Oves, M. (2009).** Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.

# *Annexes*

## Annexe1.Milieu de culture.

### 1. Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar):pour un volume 1L

Mannitol .....	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.2g
NaCl.....	0.10g
Extraits de levures.....	0.5g
Agar.....	20g
pH.....	6.8

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

Mannitol .....	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.2g
NaCl.....	0.10g
Extraits de levures.....	0.5g
pH.....	6.8

### 3. Milieu YMA+ BTB (Bleu de BromoThymol) en g/l

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

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

### 4. Composition du milieu PVK: Pikovskaya (1948) en g/l

Glucose .....	10 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5 g
NaCl. ....	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g

KCl .....	0,2 g
Extrait de levure .....	0,5 g
MnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O.....	0,002g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0,002 g
Agar .....	15 g
pH .....	7

### 5. Milieu CAS :

2,7 mg de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dissous dans 10 ml de HCl 10 mM avec 0.06 g de Chrome Azurol S (CAS) dissous auparavant dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange, de couleur bleu foncée, est ajouté très lentement sous agitation à 0.073 g de HDTMA (Hexa méthylammonium bromure) dissous dans 40 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 7. La solution bleu foncé obtenue est autoclavée à 120 °C /20 min.

#### 5.1 Pour le milieu solide King B

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

#### 5.2 Pour le milieu solide LB

100ml de la solution CAS- HDTMA est ajouté à 900 ml de LB dans un erlenmeyer stérile (le mélange doit être homogénéisé). Couler ce milieu dans les boîtes de pétri, puis ensemencée les isolats.

### 6. Milieu King B (g/l)

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

### 7. Bouillon Luria Bertani LB (g/l)

Peptone.....	10 g
NaCl .....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
pH.....	7.2±0.2

**8. Milieu (NF-MM)g/l :**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,097g
NaCl .....	0,1g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,0196g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O.....	0,017g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0,002g
Extraits de levures.....	0,001g
L-acide malic.....	3,58 g
Mannitol .....	5g
Agar.....	15g
pH.....	7

**9. L'eau peptonée en g /l :**

Peptone .....	10g
Chlorure de sodium .....	5g
pH.....	7,2± 0,2

**10. Milieu de Carder(1986) en g /l :**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3g
NaCl .....	0,5g
NH <sub>4</sub> Cl .....	1g
Extrait de levure.....	3g
CMC.....	5g
Agar.....	15g
PH.....	7.2

**11. Milieu chitine en g /l :**

Chitine.....	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g

MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
NaCl .....	0,1g
Extrait de levure.....	0,5g
Agar .....	20g
pH.....	7

## Annexe 2. Les réactifs.

### 1. Préparation du réactif d'oxydase

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

### 2. Réactifs des API

#### ▪ Réactif NIT 1

Acide sulfanilique	0,4g
Acide acétique	30g
H <sub>2</sub> O	70 ml

#### ▪ Réactif NIT 2

N,N-diméthyl-1-naphtylamine	0.6g
Acide acétique	30g
H <sub>2</sub> O	70ml

#### ▪ Réactif JAMES

HCl 1N	100 ml
Composant J 2183	0,5 g
(confidentiel)	

## Annexe 3. Les résultats

Tableau1. Aspects morphologiques des isolats

souche	Taille	Forme colonie	Aspect	Relief	Opacité	Couleur	Consistance	Gram	Forme	Mobilité
S1	Petite	Régulière	Lisse et brillante	Plate	Transparent	Blanc cassé	Sèche	Négatif	Bacille	Mobile
S3	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
M1	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
M2	Petite	Irrégulière	Lisse et brillante	plate	Transparent	Blanc cassé	Sèche	Négatif	Bacille	Mobile
M3	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
M4	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
M6	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
M7	Petite	Irrégulière	Lisse et brillante	plate	Transparent	Blanc cassé	Sèche	Positif	Cocci	Mobile
D2	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
D3	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
D4	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
D5	Moyenne	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
D6	Petite	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile
D8	Envahissante	Régulière	Lisse et brillante	Bombé	Translucide	Blanc cassé	Crémeuse	Négatif	Bacille	Mobile

Tableau 2. Caractère physiologique des isolats.

Teste souche	Acidification BTB	Température					
		4°C	20°C	28°C	37°C	45°C	50°C
D2	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	-
D3	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	-
D4	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	-
D5	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	-
D6	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	-
D8	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	-
M1	+	+(6j)	+++	+++	+++	++	-
M2	+	+(6j)	+++	+++	+++	++	+
M3	+	+(6j)	+++	+++	+++	++	+
M4	+	+(6j)	+++	+++	+++	++	-
M6	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	-
M7	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	+
S1	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	+
S3	+	+(4j)	+++	+++	+++	++	+

(+): croissance ; (-) : pas de croissance ;(++) : croissance moyenne ; (+++): Fort croissance  
; +(6j) : croissance après 6 jours ;+(4j) : croissance après 4jours.

Tableau 3. Résultats de l'Api 20<sup>NE</sup>.

Isolat test	D2	D3	D4	D5	D6	D8	M1	M2	M3	M4	M6	M7	S1	S3
<b>NO3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
<b>TRP</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GLU</b>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
<b>ADH</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>URE</b>	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<b>ESC</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>GEL</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<b>PNPG</b>	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
<b>GLU</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ARA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MNE</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MAN</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NAG</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MAL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GNT</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CAP</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ADI</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MLT</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CIT</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PAC</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>OX</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : présence de réaction enzymatique.

- : absence de réaction enzymatique.

Tableau 4. Tableau de lecture (API 20<sup>NE</sup>).

	
<b>API 20 NE – SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES BACILLES À GRAM NÉGATIF NON ENTÉROBACTÉRIES</b>	
d'après bioMérieux sa	

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			incolore	rose-rouge
		réduction des nitrates en azote	Zn / 5 min	
			rose	incolore
TRP	tryptophane	formation d'indole	JAMES / immédiat	
			incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	glucose	fermentation	bleu à vert	jaune
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	uréase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (à l'encre de chine)	hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	β-galactosidase	incolore	jaune
[GLU]	glucose	assimilation	transparence	trouble
[ARA]	arabinose	assimilation	transparence	trouble
[MNE]	mannose	assimilation	transparence	trouble
[MAN]	mannitol	assimilation	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	assimilation	transparence	trouble
[MAL]	maltose	assimilation	transparence	trouble
[GNT]	gluconate	assimilation	transparence	trouble
[CAP]	caprate	assimilation	transparence	trouble
[ADI]	adipate	assimilation	transparence	trouble
[MLT]	malate	assimilation	transparence	trouble
[CIT]	citrate	assimilation	transparence	trouble
[PAC]	phényl-acétate	assimilation	transparence	trouble
OX	tétraméthyl-p- phénylène diamine	cytochrome-oxydase	OX / 1-2 min	
			incolore	violet

**Tableau 5. Analyse de la variance de la solubilisation des phosphates.**

	Df	SumSq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Isolat	14	170696	13130	52.63	$<2e^{-16}$ ***
Résiduels	34	8482	249		

	Mean	sd data	Groupe
D2	34.84667	1.3361262	d
D3	33.79250	4.3460279	d
D4	42.44667	4.1610255	d
D5	38.14500	6.4540039	d
D6	11.83750	3.8492023	d
D8	24.77250	6.4095885	d
M1	54.50000	8.5440037	c
M2	134.63000	7.2320398	ab
M3	36.66667	3.9322046	d
M4	86.31333	0.1250333	b
M6	15.38000	6.2788587	d
M7	18.79333	3.7248400	d
S1	256.25000	60.2728173	a
S3	46.37000	11.5716406	c

**Tableau 6. Test de student**

mean in group B-CAS	mean in group LB-CAS	t	df	p-value
1.421214	1.491571	-0.4198	20.304	0.679

Tableau 7. Résultats de propriétés PGPR d'isolats.

isolat	Solubilisation de Phosphate	Production de SDR sur milieu King-B	Production de SDR sur milieu LB	Fixation d'azote	Production d'Ammoniac	Présence de Uréase	Présence de Cellulase	Présence de Chitinase
D2	+	+	+	-	+	-	-	+
D3	+	+	+	+	+	+	+	+
D4	+	+	+	+	+	-	+	+
D5	+	+	+	-	+	+	+	+
D6	+	+	+	-	+	-	-	+
D8	+	+	+	-	+	+	-	+
M1	+	+	+	-	+	+	+	+
M2	+	+	+	-	+	-	+	+
M3	+	+	+	+	+	+	-	+
M4	+	+	+	-	+	+	-	+
M6	+	+	+	-	+	-	+	+
M7	+	+	+	-	+	+	+	+
S1	+	+	+	-	+	-	-	+
S3	+	+	+	-	+	+	-	+

+:réaction positive.

- : réaction négative.

Tableau 8. L'indice de similarité entre tous les isolats.

	S1	S3	M1	M2	M3	M4	M6	M7	D2	D3	D4	D5	D6	D8
S1	1	0,833333	0,833333	0,952381	0,833333	0,833333	0,833333	0,869565	0,833333	0,833333	0,833333	0,833333	0,869565	0,8
S3	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
M1	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
M2	0,952381	0,8	0,8	1	0,8	0,8	0,8	0,916667	0,8	0,8	0,8	0,8	0,833333	0,769231
M3	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
M4	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
M6	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
M7	0,869565	0,740741	0,740741	0,916667	0,740741	0,740741	0,740741	1	0,740741	0,740741	0,740741	0,740741	0,769231	0,714286
D2	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
D3	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
D4	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
D5	0,833333	1	1	0,8	1	1	1	0,740741	1	1	1	1	0,962963	0,965517
D6	0,869565	0,962963	0,962963	0,833333	0,962963	0,962963	0,962963	0,769231	0,962963	0,962963	0,962963	0,962963	1	0,928571
D8	0,8	0,965517	0,965517	0,769231	0,965517	0,965517	0,965517	0,714286	0,965517	0,965517	0,965517	0,965517	0,928571	1