

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE Présentée par

M<sup>me</sup> GHALEM Mimouna

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

SPECIALITE : BIOLOGIE

Option: Microorganismes Producteurs de Métabolites Secondaires et Enzymes.

Thème

**Isolement et caractérisation des bactéries promotrices de  
développement (PGPB) associées au pois chiche**

*(Cicer arietinum L.)*

Soutenu le 25/05/2016

Devant le Jury composé de :

**Président :**

Mr. BENALI Mohamed

(Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès)

**Examineurs :**

Mr. BELABID Lakhdar

(Professeur à l'Université de Mascara)

Mr. MEDDAH Boumèdiene

(Professeur à l'Université de Mascara)

Mr. BACHIR RAHOU Ghalem

(Maitre de conférences à l'Université de Mascara)

**Directeur de thèse :**

Mr. ABBOUNI Bouziane

(Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès)

**Co-Directeur de thèse :**

Mr. LABDI Mohamed

(Directeur de recherche, INRAA Sidi Bel Abbes)

**Année universitaire 2015/2016**

# Remerciement

Ce travail a été réalisé à l'unité INRAA de Sidi Bel Abbès.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect à mon encadreur **Mr ABBOUNI B.** (Professeur à l'université de Sidi Bel Abbès) et mon co-encadreur **Mr LABDI M.** (Directeur de recherche INRAA, Sidi Bel Abbès), pour le temps, la patience et la confiance qu'ils m'ont accordé.

Mes remerciements vont également à **Mr BENALI M.** (Professeur à l'université de Sidi Bel Abbès) pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie **Mr MEDDAH B.** (Professeur à l'université de Mascara), **Mr BELABID L.** (Professeur à l'université de Mascara) et **Mr BACHIR RAHOU G.** (Maître de Conférences à l'université de Mascara), pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté de faire partie du jury.

Mes remerciements s'adressent également à **M<sup>me</sup> BELAHCENE L.** pour l'assistance et le soutien qu'elle m'a apporté.

Je tiens à exprimer ma gratitude à **Mr HAMMOU M.** (Directeur de la Station INRAA, Sidi Bel Abbès) pour son aide aux analyses statistiques.

Mes remerciements vont aussi à **M<sup>me</sup> BELAHCENE N. F.** (attaché de recherche à l'INRAA, Sidi Bel Abbès) et **M<sup>me</sup> Wassila** (Ingénieure de laboratoire à l'INRAA-URO, Sidi Bel Abbès) pour leur aide dans les analyses du sol.

J'adresse à l'ensemble des membres de l'équipe INRAA Sidi Bel Abbès mes remerciements les plus sincères pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter et la convivialité dont ils ont fait preuve. Merci à **Mr DRKAOUI M.** pour son aide aux travaux de parcelle, à **M<sup>me</sup> HAMDI S.** et **Mr HADDAD** pour leurs conseils, à **M<sup>me</sup> LABDI N., Mr LABDI M., M<sup>me</sup> MAHBOUBI S.** et **M<sup>me</sup> BOUCHIKH Y.** pour leur aide au laboratoire.

*Je remercie du fond du cœur Mr MOUSTAFA (Ingénieur, Laboratoire de microbiologie générale) et M<sup>me</sup> HADDAD F (Ingénieur, Laboratoire de microbiologie appliquée) pour leurs aide et conseils.*

*Je remercie M<sup>me</sup> ABDELLOUI H.H. (Ingénieur principal au DSA de Ain Temouchent) pour son aide.*

*Je présente par avance mes excuses aux personnes que j'ai oublié de remercier.*

*Mimouna GHALEM*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail en premier lieu à mes parents et mon époux, qui ont toujours été présents à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Je ne saurais jamais vous remercier pour la patience dont vous faites preuve ni pour le réconfort que je trouve auprès de vous. Je n'aurais sûrement pas réalisé tout ce chemin sans votre aide constante.*

*Je le dédie à mes frères et sœurs.*

*A mes deux familles GHALEM et GUENFOUD.*

*A mes amies Zahira BOURAS, Houda ZEMMACHE, Souad MAKHLOUF, Iman REFFES, Badra KHODJA et Khadidja KADOUR BRAHIM qui m'ont soutenu et apporter aide, écoute et encouragements.*

*A toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu et encouragé, je vous remercie.*

*Enfin, je réserve une pensée particulière à toutes les personnes qui ont prié pour moi sans que je le sache.*

*Mimouna GHALEM*

### Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet des sols et des variétés sur le développement du pois chiche, l'enrichissement du sol avec de la microflore rhizosphérique bénéfique et l'isolement de bactéries PGPR diazotrophes. A cet effet, deux variétés de pois chiche ont été cultivées sur six sols provenant de l'Ouest de l'Algérie. Les résultats ont montré que le sol d'Ain Tolba est le plus favorable à la culture du pois chiche. Des deux variétés testées, la variété Flip 93.93C a présenté les niveaux de développement les plus stables.

Le sol de Ain Tolba est utilisé pour l'isolement des rhizobactéries associées au pois chiche. L'isolement effectué a permis l'obtention de 12 isolats bactériens diazotrophes. Un screening des isolats est effectué en s'appuyant sur l'étude de leur capacité de production de HCN, la solubilisation du phosphore, la production d'AIA, l'hydrolyse des protéines, de la chitine et de la cellulose et leur activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*.

La totalité des isolats a manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*. Par ailleurs, les isolats NfA, NfD et NfC, ont montré une bonne capacité à la solubilisation du phosphore, une activité antagoniste modérée et une bonne activité protéolytique, cellulolytique et chitinolytique. A l'exception de la souche Nf5, la majorité des isolats se manifeste capable de produire l'acide indole acétique à partir du L-tryptophane.

Le pouvoir PGP des isolats mis en évidence *in vivo* sur des graines de pois chiche, a montré l'excellente capacité des isolats Nf5, NfA, NfD et NfC à la promotion de la germination des graines et de la croissance des plantules issus. L'identification phénotypique de ses isolats a montré l'appartenance des isolats au genre *Azotobacter*. Enfin, afin d'évaluer l'effet de la souche NfA sur le développement et la résistance des graines du pois chiche au phytopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*, un essai d'inoculation comportant quatre traitements est effectué en utilisant la variété Flip 93.93C. Après 4 semaines de culture, la souche NfA a pu démontrer un effet phyto-stimulateur et phytoprotecteur en inhibant l'effet du phytopathogène sur la germination et le développement des plantes inoculées.

**Mots clés :** PGPR, bactéries diazotrophes, chitinase, activité antifongique, taux de germination, AIA, HCN, protéolyse.

### Abstract

The objective of this work is the study of the soil and varieties effect on the development of chickpea, soil enrichment with benefic rhizosphic microflora and the isolation of diazotrophic PGPR bacteria. To this end, two chickpea varieties were grown on six soils coming from the West Algeria. The results showed that the soil of Ain Tolba is most favorable for growing chickpeas. The variety Flip 93.93C presented the most stable development levels.

The soil of Ain Tolba is used for the isolation of 12 diazotrophic bacteria. The isolates have been screened for their capacity to hydrocyanic acid HCN production, inorganic phosphates solubilization, IAA production, proteins, cellulose and chitin hydrolysis and also for their antifungal activity against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*.

All isolates have presented a good antagonistic activity against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Compared with the others, isolates NfA, NfD and NfC manifested a good ability to phosphorus solubilization, moderate antagonist activity and a good proteolytic, cellulolytic and chitinolytic activity. Excepted isolate NF5, all isolates appears able to produce indole acetic acid from L-tryptophan.

The isolates were tested in vivo on seeds germination of chickpea, the isolates NF5, NfA, NfD and NfC showed excellent ability to promote seed germination and growth of seedlings from. This isolates have been phenotypic identified as *Azotobacter* isolates.

Finally, to assess the effect of NFA strain on the development and strength of chickpea seeds infested with *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, an inoculation test is performed using the Flip 93.93C variety. After 4 weeks of culture, the NFA strain was able to demonstrate a phyto-stimulator and phyto-protector effect on the germination and development of inoculated plants.

**Keywords:** PGPR, diazotrophes, antifungal activity, germination, AIA, HCN, proteolysis.

### ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير التربة وأصناف الحمص على نمو و تطوير هذا النبات ، اغناء التربة بالبكتيرية المفيدة للنبات وعزل البكتيريا PGPR المثبتة للنيتروجين . لتحقيق هذه الغاية، تمت زراعة نوعين من الحمص على ستة أنواع من التربة المستقدمة من الغرب الجزائري. أظهرت النتائج أن تربة عين طلبة هي الأكثر ملائمة لزراعة الحمص. قدمت نوعية الحمص flip 93.93 C مستويات النمو الأكثر استقرارا.

تم استخدام تربة عين طلبة لعزل 12 عزلة بكتيرية مثبتة لنيتروجين. وقد فحصت العزلات لقدرتها على إنتاج حمض الهيدروسيانيك HCN، إذابة الفوسفات غير العضوية ، إنتاج AIA، و هدم البروتينات، السليلوز والكتين ، وكذلك للنشاط المضاد ل *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*.

وقد اظهرت كل العزلات نشاط ضد الفيوزاريوم *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. مقارنة مع الأخرى، ابدت العزلات NfD، NfA، و NfC قدرة جيدة على إذابة الفوسفور و هدم كل من البروتينات، السليلوز والكتين. باستثناء العزلة NF5، كل العزلات ابدت قدرة على إنتاج ال AIA.

كما تم اختبار مفعول العزلات *in vivo* على إنبات بذور الحمص، العزلات NfD، Nf5، NfA، و NfC أظهرت قدرة ممتازة على تشجيع إنبات البذور ونمو الشتلات. وقد حدد التصنيف المظهري انتماء هذه العزلات الى نوع *Azotobacter*.

وأخيرا، لتقييم تأثير السلالة NfA على نمو ومقاومة بذور الحمص لل *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*، تم إجراء اختبار معالجة باستخدام نوعية الحمص فليب C93.93. بعد 4 أسابيع من الزرع، كانت السلالة NfA قادرة على إثبات قدرتها على تحسين نمو النباتية و حمايتها من تأثير الفطر ألمجهري *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*.

**الكلمات المفتاحية :** الريزوبكتيرية المحسنة لنمو النبات، تثبيت النيتروجين، الانتاش، هدم البروتين، هدم الكتين، AIA.

## *Liste des abréviations*

---

### Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
%	pourcent
°N	Degré Nord
qx/ha	Quintaux/ hectare
µl	Microlitre
RFCP	<b>R</b> hizobactéries, bactéries capables de Favoriser la <b>C</b> roissance des <b>P</b> lantés
HCl	Acide chlorhydrique
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
C%	Pourcentage de Carbone
Ca CO <sub>3</sub> %	Pourcentage de calcaire
CE	Conductivité électrique
Cell/ ml	Cellules par millilitre
cm	Centimètre
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	bichromate
CoCl <sub>2</sub>	Chlorure de cobalt
CuSO <sub>4</sub>	Sulfate de cuivre
Do	Densité optique
g/l	Gramme par litre
g	Gramme
ha	Hectare
HgCl <sub>2</sub>	Chlorure de mercure
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Potassium sulfate
kg	<b>kilogramme</b>
l	Litre
µl	Microlitre
h	Heure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
m	Mètre
cm	centimètre
mm	millimètre
µm	Micromètre
ml	Millilitre
mg	Milligramme
IU	Unité Internationale
MnCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MO%	Pourcentage de Matière Organique
N	Azote
min	minute
rpm	Rotation par minute
PDA	Potato dextrose agar
NS	Non significatif
P	Phosphore



## *Liste des abréviations*

---

<b>PGPR</b>	Plants Growth Promoting Rhizobacteria
<b>ePGPR</b>	Extracellular Plants Growth Promoting Rhizobacteria
<b>iPGPR</b>	Intracellular Plants Growth Promoting Rhizobacteria
<b>PGP</b>	Plants Growth Promotion
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>qsp</b>	Quantité suffisante pour
<b>MSP</b>	microorganismes solubilisateurs de phosphore
<b>ISR</b>	la résistance systémique induite
<b>AIA</b>	Acide indole acétique
<b>ACC</b>	1- aminocyclopropane -1- carboxylate
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>IS</b>	Indice de solubilisation
<b>IV</b>	Indice de vigueur
<b>V</b>	Volume
<b>v/v</b>	volume à volume
<b>m/v</b>	Masse/ volume
<b>VAR</b>	Variance
<b>Zn</b>	zinc
<b>Pb</b>	plomb
<b>Fe</b>	fer
<b>HCN</b>	cyanure d'hydrogène
<b>DAPG</b>	le 2,4-diacetylphloroglucinol
<b>µg</b>	Microgramme
<b>LPS</b>	lipopolysaccharides
<b>PHB</b>	poly-β-hydroxybutyrate
<b>kg/ ha</b>	Kilogramme / hectare
<b>INRAA</b>	Institut national de recherche agronomique d'Algérie
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de fer
<b>No</b>	Numéro
<b>VF</b>	Viande foie
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>UFC</b>	Unité formant colonie
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Acide sulfurique
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-1</sup></b>	le phosphate di basique
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	l'oxalate d'ammonium
<b>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	
<b>HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup></b>	le phosphate mono basique
<b>Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	tri-calcium phosphate

## Liste des tableaux

---

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Superficie, production, rendement de la culture de pois chiche par rapport aux autres légumineuses alimentaires dans le monde pour l'année 2013.....	10
<b>Tableau 2</b> : Superficie, production, rendement et importation de la culture de pois chiche par rapport aux autres légumineuses alimentaires en Algérie.....	13
<b>Tableau 3</b> : Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlés par les PGPR.....	16
<b>Tableau 4</b> : Affiliation taxonomique des genres contenant des espèces PGPR.....	31
<b>Tableau 5</b> : Caractéristiques microscopiques des espèces <i>d'Azotobacter</i> .....	33
<b>Tableau 6</b> : Quelques Caractéristiques distinctives des espèces <i>d'Azotobacter</i> .....	33
<b>Tableau 7</b> : Autres caractéristiques des espèces <i>d'Azotobacter</i> .....	36
<b>Tableau 8</b> : Les différentes compositions du réactif de Salkowski testées....	47
<b>Tableau 9</b> : Résultats des analyses physico-chimiques des différents échantillons de sols. ....	55
<b>Tableau 10</b> : Codification et description des colonies des isolats obtenus. ....	63
<b>Tableau 11</b> : Identification biochimique des isolats Nf5, NfA, NfD et NfC... ..	82

**Liste des figures**

<b>Figure 1 :</b> Types de cultivars de pois chiche.....	6
<b>Figure 2 :</b> Morphologie du pois chiche.....	7
<b>Figure 3 :</b> Répartition de la production mondiale en pois chiche pour l'année 2013.....	11
<b>Figure 4 :</b> Principaux pays exportateurs de pois chiche pour l'année 2012.....	11
<b>Figure 5 :</b> Principaux pays importateurs de pois chiche pour l'année 2012.....	12
<b>Figure 6 :</b> Evolution des superficies, productions et rendements de la culture de pois chiche durant la période 1962-2013 en Algérie.....	14
<b>Figure 7 :</b> Les différents types d'associations entre les racines des plantes et les PGPR.....	17
<b>Figure :</b> Diversité fonctionnelle chez les PGPR.....	18
<b>Figure 9 :</b> Rôle de l'IAA dans le développement des plantes.....	21
<b>Figure 10 :</b> Fonctions biologiques des sidérophores.....	23
<b>Figure 11 :</b> Aspect des cellules de <i>A. chroococcum</i> , <i>A. nigricans</i> et <i>A. paspali</i> .....	33
<b>Figure 12 :</b> Aspect des kystes des bactéries du genre <i>Azotobacter</i> .....	33
<b>Figure 13 :</b> Aspect macroscopique de culture de <i>Fusarium oxysporum</i> sur milieu PDA.....	38
<b>Figure 14 :</b> Aspect des variétés de pois chiche ( <i>Cicer arietinum.L</i> ) utilisées.....	39
<b>Figure 15 :</b> Localisation géographique des sites de prélèvement des sols.....	44
<b>Figure 16 :</b> Organisation des pots au niveau de la serre (condition non contrôlées).....	43
<b>Figure 17 :</b> Le Triangle des textures (d'après U.S. département of agriculture).....	56

## *Liste des figures*

---

<b>Figure 18</b> : Effet du sol sur le développement du pois chiche.....	58
<b>Figure 19</b> : Effet du facteur variétal.....	59
<b>Figure 20</b> : Effet des interactions sols × variété flip 93.93C.....	61
<b>Figure 21</b> : Effet des interactions sols × variété Kadri.....	62
<b>Figure 22</b> : Aspects des isolats sur milieu Norris N free. <b>A</b> : NfA, <b>B</b> : Nf1, <b>C</b> : Nf3, <b>D</b> : Nf2.....	22
<b>Figure 23</b> : Aspects microscopique des isolats Nf7, Nf3 et NfA et Nf9 (G* 100).....	23
<b>Figure 24</b> : L'effervescence obtenue de la réaction d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec la catalase bactérienne.....	65
<b>Figure 25</b> : Aspect de croissance de l'isolat Nf5 sur milieu mannitol mobilité.....	65
<b>Figure 26</b> : Exemple des résultats du test de solubilisation du tricalcuim phosphate par les isolats. <b>12</b> : NfA, <b>13</b> :NfC, <b>14</b> : NfD.....	66
<b>Figure 27</b> : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu Pikovskaya.....	67
<b>Figure 28</b> : Résultats obtenus pour les différentes compositions du réactif de Salkowski. <b>A</b> : réactif 1, <b>B</b> : réactif 2 + 2gouttes d'acide orthophosphorique, <b>C</b> : réactif 2. ....	67
<b>Figure 29</b> : Courbe standard pour le dosage de l'acide indole acétique.....	68
<b>Figure 30</b> : Production d'acide indole acétique par les isolats sur milieu luria- Bertani solide additionné de (1g/l) de L- tryptophane.....	69
<b>Figure 31</b> : Production d'acide indole acétique par les isolats sur milieu luria- Bertani liquide <b>A</b> : en absence de L tryptophane, <b>B</b> : additionné de (1g/l) de L- tryptophane.....	70.
<b>Figure 32</b> : Concentrations d'AIA produites par les isolats sur milieu luria- Bertani liquide additionné de (1g/l) de L- tryptophane.....	70
<b>Figure 33</b> : Exemple des résultats obtenus lors du test de l'activité protéolytique.....	71
<b>Figure 34</b> : Exemple des résultats obtenus lors du test de l'activité antifongique.....	71

## Liste des figures

---

<b>Figure 35 :</b> Taux d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum</i> par les isolats.....	72
<b>Figure 36 :</b> L'étude de l'activité chitinolytique des trois isolats (NfA, NfB et NfC).....	73
<b>Figure 37 :</b> Taux de production de chitinases par les isolats NfA, NfC et NfD.....	73
<b>Figure 38 :</b> Production de l'HCN par l'isolat Nf3.....	74
<b>Figure 39 :</b> Evaluation de l'activité cellulolytique par mesure de l'absorbance à 600 nm après 4 semaines de culture sur milieu cellulose.....	75
<b>Figure 40 :</b> Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote, sur le taux de germination du pois chiche.....	76
<b>Figure 41 :</b> Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (NfC, NfA, Nf10 et Nf11) sur la germination du pois chiche.....	76
<b>Figure 42 :</b> Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur la longueur des racines et des tiges des graines germées de pois chiche.....	77
<b>Figure 43 :</b> Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur l'indice de vigueur des graines de pois chiche.....	77
<b>Figure 44 :</b> Aspect des isolats sur milieu Norris N free après 24h d'incubation à 30°C.....	79
<b>Figure 45 :</b> Aspect des isolats sur milieu Norris N free après 5j d'incubation à 30°C.....	79
<b>Figure 46 :</b> Aspect des isolats sur milieu Norris N free après 15j d'incubation à 30°C.....	79
<b>Figure 47 :</b> Aspect microscopique des isolats après coloration des spores (G* 100).....	80
<b>Figure 48 :</b> Aspect microscopique des isolats après coloration de Gram, <b>A :</b> Isolat NfA et Nf5 après 24h d'incubation à 30°C, <b>B :</b> Aspect microscopique des isolats après 5j d'incubation à 30°C (G* 100).....	80
<b>Figure 49 :</b> Aspect des tubes de milieu VFensemencés par les isolats NfA, NfC et NfD.....	49

## *Liste des figures*

---

- Figure 50** : Résultats du test de mise en évidence de l'effet biofertilisant et biopesticide de la souche NfA.....84
- Figure 51** : Développement des plantes des différents traitements après 3 semaines de l'inoculation.....85
- Figure 52** : Développement des symptômes de fusariose sur les plantes inoculées par le phytopathogène après 3 semaines de l'inoculation.....86

# Sommaire

Page

## Introduction

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## Chapitre I : Revue bibliographique

1. Les légumineuses.....	3
1.1.Généralités.....	3
1.2.Intérêts des légumineuses.....	4
2. Le pois chiche.....	4
2.1.Le genre <i>Cicer</i> .....	5
2.2.Morphologie du pois chiche.....	6
2.3.Exigences culturales.....	7
2.4.Importance du pois chiche.....	8
2.4.1. Importance et valeur nutritionnelle du pois chiche.....	8
2.4.2. Importance industrielle.....	9
2.4.3. Importance agronomique.....	9
2.5.Production dans le monde.....	10
2.6.Situation et production du pois chiche en Algérie.....	12
3. Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes « PGPR ».....	15
3.1.Mécanismes d'action des PGPR.....	17
3.1.1. Mécanismes directes.....	18
3.1.1.1. Fixation de l'azote.....	18
3.1.1.2. Solubilisation du phosphore.....	19
3.1.1.3. Production des régulateurs de croissance.....	20
3.1.1.3.1. Production d'acide indole acétique.....	20
3.1.1.3.2. Cytokinines et gibbérellines.....	22
3.1.1.4. Régulation du taux de l'éthylène.....	22
3.1.2. Mécanismes indirectes.....	23
3.1.2.1. Production des sidérophores.....	23
3.1.2.2. Antibiose.....	25
3.1.2.3. Production d'enzymes lytiques.....	25
3.1.2.4. Induction de la résistance systémique chez les plantes.....	26
3.2.Taxonomie des PGPR.....	27
3.2.1. Les Cyanobacteries.....	27
3.2.2. Les Actinobacteries.....	27
3.2.3. Bacteroidetes.....	27
3.2.4. Les frimicutes.....	28

3.2.5.	Les Proteobacteries.....	28
4.2.5.1.	Les Alphaproteobacteries.....	28
4.2.5.2.	Les Betaproteobacteries.....	29
4.2.5.3.	Les Gammaproteobacteries.....	30
3.3.	Le genre <i>Azotobacter</i> .....	33
3.3.1.	Description du genre <i>Azotobacter</i> .....	33
3.3.2.	Habitat et écologie du genre <i>Azotobacter</i> .....	37
3.3.3.	Importance du genre <i>Azotobacter</i> .....	37

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

1.	Objectifs .....	38
2.	Isolats bactériens et souche fongique.....	38
3.	Matériel végétal.....	39
4.	Sols.....	39
5.	Analyse des sols.....	40
5.1.	Analyse granulométrique.....	40
5.2.	Mesure du pH.....	41
5.3.	Mesure de la conductivité électrique.....	41
5.4.	Dosage du calcaire total.....	41
5.5.	Dosage du calcaire actif.....	41
5.6.	Dosage du carbone et détermination du taux de la matière organique.....	42
5.7.	Dosage de l'azote.....	42
5.8.	Dosage du phosphore.....	43
6.	Etude des effets des sols et des variétés sur le développement du pois chiche.....	43
6.1.	Préparation des traitements et semi.....	43
6.2.	Récolte et Analyses statistiques.....	44
7.	Isolement des PGPR Diazotrophes associés au pois chiche.....	44
7.1.	Prélèvement et Echantillonnage.....	44
7.2.	Isolement et purification des bactéries diazotrophes.....	44
7.3.	Conservation des souches .....	45
8.	Caractérisation des isolats.....	45
8.1.	Examen macroscopique.....	45
8.2.	Aspect microscopique.....	45
8.3.	Test de catalase.....	45
8.4.	Test de mobilité des isolats.....	46
9.	Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance.....	46
9.1.	Screening des isolats pour la solubilisation du phosphate.....	46
9.2.	Production d'acide indole acétique (AIA).....	46
9.2.1.	Choix de la composition du réactif de Salkowski et préparation de la courbe étalon.....	46
9.2.2.	Screening des isolats pour la production d'acide indole acétique (AIA).....	47
9.2.3.	Quantification de la production d'acide indole-acétique.....	48



9.3.	Recherche de l'activité protéolytique.....	48
9.4.	Effet antagoniste anti <i>Fusarium</i> .....	48
9.5.	Screening des isolats pour la production d'acide cyanhydrique (HCN).....	49
9.6.	Recherche de la Chitinase.....	49
9.6.1.	Préparation de la chitine colloïdale.....	49
9.6.2.	Screening des isolats pour la production de Chitinase.....	50
9.7.	Test de Cellulase.....	50
9.8.	Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du pois chiche.....	50
10.	Identification phénotypique des candidats les plus performants.....	51
10.1.	Coloration de Gram et Coloration des spores.....	51
10.2.	Test d'oxydase.....	51
10.3.	Mise en évidence du type respiratoire.....	52
10.4.	Identification biochimique par la galerie Api 20E.....	52
11.	Mise en évidence de l'effet biofertilisant et biopesticide de la souche NfD.....	53

### Chapitre III : Résultats

1.	Analyse du sol.....	55
2.	Etude des effets des sols et des variétés sur le développement du pois chiche.....	57
2.1.	Effet des sols.....	57
2.2.	Effet variétal.....	58
2.3.	Effets des interactions sols × variétés.....	60
3.	Isolement et purification des bactéries diazotrophes.....	62
4.	Caractères biochimiques et physiologiques.....	64
4.1.	Test de catalase.....	64
4.2.	Test de mobilité des isolats.....	65
5.	Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance.....	66
5.1.	Solubilisation du phosphate.....	66
5.2.	Production d'acide indole acétique.....	67
5.2.1.	Choix de la composition du réactif de Salkowski et préparation de la courbe étalon.....	67
5.2.2.	Screening des isolats pour la production d'acide indole acétique.....	68
5.2.3.	Quantification de la production d'acide indole acétique.....	69
5.3.	Recherche de l'activité protéolytique.....	71
5.4.	Effet antagoniste anti <i>fusarium f. sp. Ciceris</i> .....	71
5.5.	Recherche de la Chitinase.....	72
5.6.	Production d'acide cyahydrique.....	73
5.7.	Test de Cellulase.....	74
6.	Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du pois chiche.....	75
7.	Identification phénotypique des candidats les plus performants.....	78
7.1.	Aspect macroscopique et microscopique des isolats et test d'oxydase.....	78
7.2.	Mise en évidence du type respiratoire.....	81

7.3. Identification biochimique par la galerie Api 20E.....	81
8. Mise en évidence de l'effet biofertilisant et biopesticide de la souche NfA.....	83

#### **Chapitre IV : Discussion**

<b>Discussion .....</b>	<b>88</b>
-------------------------	-----------

#### **Conclusion et perspectives**

Conclusion et perspectives.....	96
---------------------------------	----

<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>98</b>
---	-----------

<b>Annexes.....</b>	<b>97</b>
---------------------	-----------

### Introduction

Le pois chiche représente en Algérie, la seconde légumineuse alimentaire produite après les fèves. L'importance du pois chiche relève de sa richesse en protéines et sa composition en acides aminés (Gaur *et al.*, 2012). Sur le plan agronomique, son intérêt est lié à son aptitude à former des relations symbiotiques avec des bactéries de la famille des rhizobiaceae et à sa capacité de fertilisation du sol (Ben Mbarek, 2011 ; Ibsa, 2013).

La culture du pois chiche a connu, durant la décennie 1980-1990, une évolution progressive sur le plan de l'exploitation des superficies et l'augmentation de la consommation avec une régression de productivité (FAO, 2012).

Avec une production annuelle estimée à 34980 tonnes, l'Algérie recourt au marché extérieur pour combler le déficit en matière de besoins en consommation, elle importe plus de 64475 tonnes par an (FAO, 2013). La production du pois chiche en Algérie n'a pas augmenté en raison de la faible productivité et des rendements instables causés par des contraintes d'ordres agronomiques, abiotiques et biotiques (Labdi, 1995 ; Shahid *et al.*, 2008).

Les contraintes agronomiques se manifestent dans la date de semis et les adventices, le semis d'hiver provoque la coïncidence de la croissance des plantes avec les mauvaises herbes (Saxena, 1983). Les contraintes abiotiques sont généralement la sécheresse, les gelées printanières et les sols salins ou pauvres en phosphore et la contrainte biotique fréquemment rencontrée est l'inefficacité de la flore autochtone symbiotique du pois chiche.

L'établissement et la réussite de la culture de pois chiche dépendent de la qualité de la flore symbiotique, son efficacité à fixer l'azote atmosphérique et de la nature de la flore bactérienne rhizosphérique. Des études récentes ont rapporté l'implication des bactéries rhizosphériques bénéfiques, les bactéries promotrices du développement des plantes (PGPB) dans l'amélioration de la qualité des sols, de la croissance des légumineuses et de leur résistance aux agents pathogènes (Chaitanya et Meenu, 2015). L'utilisation des PGPB comme biofertilisants permet la réduction des apports en engrais et en produits phytosanitaires, la diminution des risques de pollution de l'environnement et l'amélioration de la production agricole. Les bactéries utilisées comme biofertilisants appartiennent essentiellement aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*...

Les mécanismes impliqués dans des effets phytobénéfiques des PGPB sont : la fixation d'azote utilisée par les plantes (Antoun et Prévost, 2005). La production des phytohormones (les auxines, les cytokinines et les gibbérellines), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, l'accroissement de la disponibilité des nutriments tels que le phosphate, le fer et l'induction des mécanismes de défense des plantes via la résistance systémique acquise (SAR pour Systemic Acquired Resistance) (Gupta *et al.*, 2015 ; Balaram Mohapatra *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2009 ; Hayat *et al.*, 2010).

Les PGPB sont largement utilisées dans les pays développés et les inoculums sont appliqués sur des millions d'hectares de cultures (Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

L'objectif du présent travail est la caractérisation de six sols de la région Ouest Algérie et l'étude de leur effet sur la croissance des plantes de deux variétés de pois chiche.

Dans un second temps, cette étude vise l'isolement de PGPR diazotrophes à partir de rhizosphère des plantes de pois chiche, la sélection des souches promotrices de la croissance végétative du pois chiche et l'étude de l'activité antagoniste des PGPR diazotrophes sélectionnées vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*, champignon phytopathogène de culture de pois chiche.

Enfin, les souches isolées sélectionnées promotrices de la croissance végétative seront appliquées sur les graines de pois chiche afin d'évaluer leur effet sur la germination, la croissance et la résistance de cette plante au phytopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*.

## 1. Les légumineuses

### 1.1. Généralités

Les légumineuses (Fabacées) constituent la troisième superfamille par ordre d'importance chez les angiospermes. Elles comprennent plus de 750 genres et 17000 à 20000 espèces de formes et types de croissance très diversifiées. Sur la base de leurs caractéristiques florales, les botanistes s'étendent à regrouper ces espèces en trois sous-familles (Doyle, 1994 ; Delajudie *et al.*,1998 ; Dommergues *et al.*,1999).

-La sous famille des Mimosoideae, comprend environ 3000 espèces regroupées dans 77 genres, caractérisée par la production des fleurs régulières regroupées en inflorescences denses. Les espèces représentées principalement par des arbres et des arbustes distribués dans les régions tropicales et subtropicales sur tous les continents. Les genres *Acacia*, *Calliandra*, *Mimosa* et *Prosopis* sont les plus représentatifs (Simon, 2005; Merabet, 2007).

-La sous-famille des Caesalpinoideae, considérée comme étant la plus primitive, regroupe environ 4200 espèces dans quelques 162 genres (Simon, 2005). Les espèces possèdent des fleurs aux corolles irrégulières et sont représentées par des arbres, arbustes et herbacées vivaces distribuées des régions tropicales aux régions tempérées. Les genres *Caesalpineae*, *Cassia*, *Cercis* et *Gleditzia* sont représentatifs de cette sous-famille (Simon,2005 ; Merabet, 2007).

-La sous famille Papilionoideae est d'une évolution plus récente, comprend quelques 14000 espèces avec fleurs irrégulières, regroupées dans environ 476 genres (Lewis *et al.*,2003). Parmi les tribus de cette catégorie les *phaseoleae*, à laquelle appartiennent de nombreuses espèces importantes utilisées pour l'alimentation humaine directe (soja, haricot, pois chiche ...) ainsi que les plantes de pâturage les plus utilisées par les agriculteurs (Simon, 2005; Lee *et al.*,2007).

Les taxons des Fabacées produisent la même sorte de fruit, la gousse, formée par un seul carpelle. Chez les espèces spontanées, les gousses s'ouvrent à maturité afin d'expulser les graines (Simon, 2005). De nombreux taxons de la famille des légumineuses sont capables de former des associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique de la famille des rhizobiaceae. La proportion de ces taxons varie d'une sous-famille à l'autre, elle est de l'ordre de 90% pour les Mimosoideae, 20% pour les Caesalpinoideae et 97 % pour les Papilionoideae (Merabet, 2007).

## **1.2. Intérêts des légumineuses**

L'intérêt agronomique des légumineuses provient de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an. Au total un champ de trèfle fixe entre 50-100 Kg d'azote par hectare/an. Le Soja et le Lupin, connus pour leur richesse en protéines, apportent au sol plus de 300 et jusqu'à 500 kg d'azote par hectare et par an (Frontieret *al.*, 2004).

Cette fixation leur permet de produire en abondance des protéines végétales, qui constituent une source l'alimentation humaine et animale très importante (Demol *et al.*,2002). Leurs graines sont des aliments d'une excellente qualité car leur contenu en protéines est plus élevé par rapport à toute autre plante destinée à l'alimentation. Ce qui représente le meilleur moyen de production des protéines végétales dans le cadre d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement.

En effet, leurs capacités de fixer l'azote atmosphérique rendent l'utilisation d'engrais azotés dont la synthèse, le transport et l'épandage consomment des combustibles fossiles (2 tonnes de fuel pour une tonne d'ammoniac) inutile et contribuent à l'effet de serre (Dénarié, 2000).

Leur utilisation joue également un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles. Leur utilisation en rotation ou en association dans les systèmes de culture permet d'apporter une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système (Babo, 2002).

Enfin, elles servent également de culture de fourrage, d'engrais verts et produisent un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures et des parfums (Baudoin, 2001).

## **2. Le pois chiche**

Le pois chiche originaire du Proche-Orient (Sud-est de la Turquie, Syrie) occupe la deuxième place dans la production mondiale après le haricot (FAO., 2013).L'utilisation du pois chiche comme aliment remonte à environ 7000 ans. Le pois chiche cultivé traditionnellement dans les zones semi-arides de l'Inde et du Moyen Orient est obtenu pour la première fois dans la région méditerranéenne (Goodwin, 2005 ; Maougal, 2004). Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) appartient au genre *Cicer*, la tribu des Ciceae à la famille des Fabaceae et la sous-famille des Papilionoideae. Le nom *Cicer* originaire du latin, dérivé du mot grec *kikus* signifie fort et solide (Singh et Diwakar, 1995).

Duschak et ses collaborateurs (1871) ont rapporté que l'origine du mot remonte au mot Hébreu *kirkes*, ou *kikar* qui signifie rond. Le mot *arietinum* traduit grec *krios*, représente un autre nom du bélier et du pois chiche, attribué au pois chiche en allusion à la forme de la graine qui ressemble à la tête du bélier (Van Der Maesen, 1987).

Le pois chiche a plusieurs autres noms tels que : le garbanzo (Espagnol), kichar ou chicher (German), chana (Hindi), chickpea, gram et/ou Bengal gram (Anglais) et hommos (Arabe). En Turquie, Roumanie, Bulgarie, Afghanistan, et dans les pays adjacents de la Russie, le pois chiche est appelé 'nakhut' ou 'nohut' (Van Der Maesen, 1987; Redden et Berger, 2007)

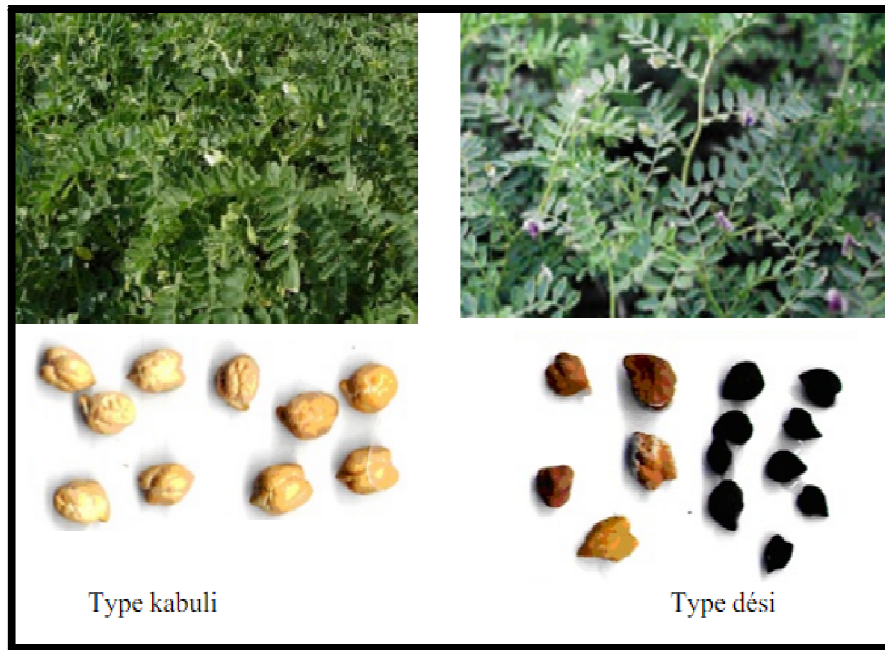
### 2.1. Le genre *Cicer*

Le genre *Cicer* comprend 44 espèces: 9 annuelles et 35 vivaces. Les taxons *C. uludereensis* Dönmez (Dönmez, 2011), *C. floribundum* Fenzl. var. *amanicola* M. Öztürk & A. Duran (Öztürk et al., 2011), *C. heterophyllum* Contandr., Pamukc. & Quezel var. *kassianum* M. Öztürk & A. Duran (Öztürk et al., 2011) et *C. incisum* (Willd.) K. Malysubsp. *Serpentinica* Öztürk & Duran (Öztürk et al., 2013) ont récemment été découverts en Turquie.

L'espèce *Cicer arietinum* L. est la plus connue de l'espèce cultivée du genre *Cicer*, qui manifeste une grande variabilité phénotypique et génotypique et se divise en deux types: le type "Kabuli" et le type "Desi". Les deux types se distinguent par les dimension et la couleur des grains et des fleurs ainsi que par la pigmentation de la plante (Smykal et al., 2015).

Le type Kabuli ou macrosperma (**Figure 1**): essentiellement cultivé et consommé dans le bassin méditerranéen. La plante, à croissance érigée et à fleurs blanches, donne des grains lisses à légèrement ridés, clairs (blanc à jaune pâle) moyen assez gros (P.M.G > 300g) recouvert d'un tégument mince (Singh et al., 2008; Bouras., 2010; Tlemsani, 2010 ; Smykalet al., 2015).

Le type Desi ou microsperma (**Figure 1**) (85% de la production mondiale) : fait partie des habitudes alimentaires de l'Inde où il y est essentiellement cultivé, mais il est également cultivé en Éthiopie, Iran, Canada, Mexique, Australie et Moyen-Orient. Ce sont des plantes buissonnantes à folioles et fleurs relativement petites, à tiges contenant des pigments d'anthocyane violacés et à fleurs d'un bleu violet, qui donne des petits grains lisses ou ridés de couleur sombre (Poids de Mille Graines < 300g) recouvert d'un tégument épais (Singh et Diwakar, 1995 ; Singh et al., 2008 ; Tlemsani, 2010 ; Bouras., 2010; Smykalet al., 2015).



**Figure 1 :** Types de cultivars de pois chiche (Ben Mbarek, 2011).

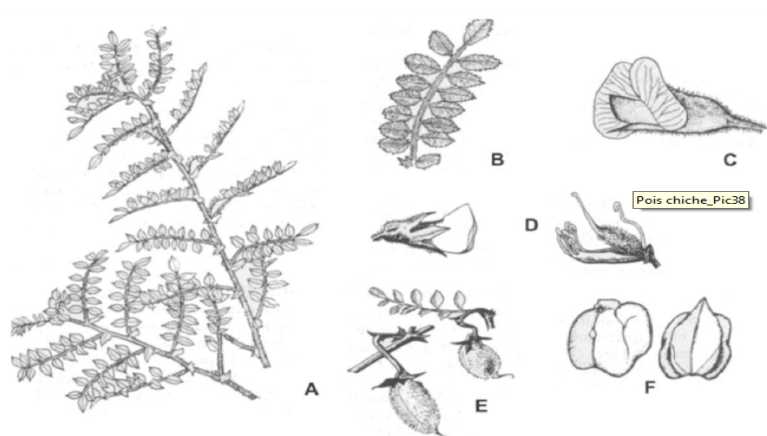
## 2.2. Morphologie du pois chiche

Le pois chiche est une légumineuses diploïde ( $2n = 16$  chromosomes), herbacée, annuelle et auto fécondé (Singh et Diwakar, 1995 ; Vailet *al.*, 2005), étalée, atteignant 100 cm de haut.

La plante du pois chiche (**Figure 2**) est caractérisée par :

- ✓ Une **tige** simple ou ramifiée de la base
- ✓ Des **racines** pivotantes atteignant 1-2 m de profondeur et des **racines secondaires** pour la plupart étalée sur une profondeur de 15-30 cm dans le sol (Singh et Diwakar, 1995 ; Bejiga et Van der Maesen, 2006 ; Bouras., 2010).
- ✓ **Les feuilles** du pois chiche sont alternées, imparipennées, composées de 7 à 17 folioles sessiles, ovales à elliptiques, de 5-20 mm x 2-15 mm, à bords fortement dentés dans les deux tiers supérieurs, pubescentes glandulaires des deux côtés (Singh et Diwakar, 1995 ; Bejiga et Van der Maesen, 2006 ; Bouras., 2010).
- ✓ L'**Inflorescence** est réduite à une fleur axillaire unique ; les **fleurs** sont bisexuées, papilionacées, de couleur blanche, rose, violacée ou bleu (Singh et Diwakar, 1995 ; Bejiga et Van der Maesen, 2006 ; Bouras., 2010).





**Figure 2 :** Morphologie du pois chiche (Gaid, 2015).

le pois chiche, *Cicer arietinum* L. : tige feuillue (A), feuille composée de 16 folioles (B), fleur zygomorphe (C), étamines, pistil et ovaire (D), gousses en développement (E), graines (F). (Zohary et Hopf, 1988).

- ✓ **Le fruit** est une Gousse renflée rhomboïde-ellipsoïde de 12-35 mm × 8-20 mm, densément pubescente glanduleuse, à 1,2 ou 4 graines (Singh et Diwakar, 1995 ;Bejiga et Van der Maesen, 2006 ; Bouras., 2010).
- ✓ **La graine** est globuleuse à anguleuse, obovoïde, crème à brune, verte ou noire, de surface lisse ou ridée (Singh et Diwakar, 1995 ;Bejiga et Van der Maesen, 2006 ; Bouras., 2010).

### 2.3. Exigences culturales

Le pois chiche pousse et produit sous un large éventail de conditions agro-climatiques, se cultive entre 20°N et 40°N dans l'hémisphère nord. Il est aussi cultivé entre 10°N et 20°N dans l'Inde et l'Ethiopie. Ces environnements différents dans la photopériode, la température et les précipitations (Singh et Diwakar, 1995). La température exerce une forte influence sur les phases végétatives et reproductrices du pois chiche (Bouras., 2010). La germination du pois chiche nécessite une température minimale de 5°C, des températures de 31.8°C à 33°C permettent l'accélération de la germination et reste possible jusqu'à une température de 45°C. La température optimale de la croissance se situe entre 18-29°C le jour et proches de 20°C la nuit (Singh et Diwakar, 1995 ; Skrypetz, 2001 ; Kechache., 2005). Selon Nilson, (2001), des températures supérieures à 32°C limitent le rendement. De même, les températures élevées de la floraison à la maturité des variétés semi retardées conduisent à la réduction de la taille des grains et le rendement (Lopez-Bellidoet al., 2004). L'intensité de la lumière et la durée

d'éclaircissement sont des facteurs importants pour la nodulation et la fixation d'azote dans le sol chez le pois chiche (Beddaret *et al.*, 1990).

La culture de pois chiche exige une faible quantité en eau, résiste assez bien au stress hydrique grâce à sa longue racine pivotante. La consommation en eau du pois chiche est estimée entre 100-250 mm par an pour produire des rendements en grains allant de 9-30 qx/ha. Cependant, le stress hydrique de la floraison à la maturité des variétés tardives de pois chiche conduit à l'accélération de la maturité (Singh et Bushan, 1979; Singh et Diwakar, 1995 ; Bejiga et Van Der Maesen, 2006).

Le pois chiche semble préférer les sols meubles, profonds, plus ou moins argileux avec une bonne capacité de rétention (Saxena, 1987 ; Singh et Diwakar, 1995), il ne supporte pas les sols mal drainés qui favorisent le développement de maladies cryptogamiques (Planquart et Wery , 1991). Il n'est pas bien adapté aux sols salins et les sols très calcaires sont à exclure, car ils donnent des graines qui cuisent mal (Skrypetz, 2001). Le pH du sol favorable à cette culture se situe entre 6 et 9 (Brauneet *et al.*, 1988).

## **2.4. Importance du pois chiche**

### **2.4.1. Importance et valeur nutritionnelle du pois chiche**

Le pois chiche est une des légumineuses les plus cultivées et consommées dans le monde et surtout dans les pays afro-asiatiques. L'importance nutritionnelle du pois chiche réside dans la composition des graines, qui constituent une excellente source de glucides, de protéines, avec un pourcentage de 80% du poids sec des graines (Gaur *et al.*, 2012 ).

les protéines de pois chiche sont riches en acides aminés essentiels non soufrés notamment le Tryptophane 185 mg, la Lysine 1291 mg, la Méthionine 253 mg, le Phénylalanine 1034 mg, la Thréonine 716 mg, le Valine 809 mg, la Leucine 1374 mg et l'isoleucine 828 mg (par 100g) (Bouras., 2010; Gaur *et al.*, 2012).

L'amidon est le composant glucidique majoritaire du pois chiche, les fibres constituent 17.4% de son poids sec (Gaur *et al.*, 2012; USDA, 2015 ). Le pois chiche contient également le Ca 105 mg, Mg 115 mg, P 366 mg, Fe 6.2 mg, Zn 3.4 mg (par 100g) (Gaur *et al.*, 2012 ; USDA, 2015 ). La composition en vitamines du pois chiche est assez variée et compte près de 13 vitamines, dont la vitamine A 67 UI, thiamine 0.48 mg riboflavine 0.21 mg, niacine 1.5 mg, vitamine B6 0.54 mg, folates 557µg et acide ascorbique 4mg (par 100g) (Bouras., 2010 ; Gaur *et al.*, 2012 ; Goodwin, 2005 ;USDA, 2015).

Les lipides présents en faible quantité et représentés par Acide linoléique 2593 mg, acide oléique 1346 mg, acide palmitique 501 mg, acide linolénique 101 mg et acide stéarique 85 mg (par 100g) (Bouras., 2010 ; Gaur *et al.*, 2012 ; USDA, 2015).

La consommation du pois chiche en association avec d'autres légumes et céréales, peut avoir un effet positif sur certaines maladies tels que les maladies cardio-vasculaires, le diabète du type 2, les maladies du système digestif et quelques cancers (Gaur *et al.*, 2012) .

Durant les dernières décennies, une attention particulière est attribuée à l'étude du rôle du pois chiche dans l'alimentation animale. La production de pois chiche engendre, en plus des grains, de quantités importantes de pailles (environ 400 kg/ha). Les pailles de pois chiche renferment plus de protéines et d'énergie que les pailles des céréales. Maheri-Sis *et al.*, (2008) et Aghajanzadeh-Golshani *et al.*, (2012) ont rapporté la digestibilité élevée des protéines (64%) et de la matière organique (62%) des pailles de pois chiche.

#### **2.4.2. Importance industrielle**

A côté, de l'utilisation du pois chiche dans l'industrie agro-alimentaire, son amidon est utilisé dans l'industrie textile, qui confère aux vêtements de soie, de laine ou de coton une légère couche de définition. Elle est employée dans la fabrication du contre-plaqué. Une teinture analogue à l'indigo s'obtient à partir des feuilles de pois chiche (Bejiga et Van Der Maesen, 2006).

#### **2.4.3. Importance agronomique**

Le pois chiche a un intérêt particulier dans le concept d'agriculture durable dans la mesure où son introduction dans l'assolement instaure la rotation des cultures, la diversification des productions et la protection de l'environnement par l'économie des engrais azotés et des désherbants chimiques (Ben Mbarek, 2011). Le pois chiche exerce une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches bactériennes des genres *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* (Liu *et al.*, 2003), Via cette symbiose il peut fixer plus de 140 kg N/ ha/ par saison de culture et satisfaire plus de 80% de ses besoin en azote. Les reliquats contribuent à l'amélioration de la fertilité des sols (Bacha *et al.*, 2003 ;Tlemsani, 2010 ; Ibsa, 2013)

L'introduction du pois chiche dans la rotation permet de rompre le cycle des insectes, des maladies des céréales et des mauvaises herbes qui posent problème dans les monocultures céréalières (Ibsa, 2013 ;Zemouli-Benfrehia *et al.*, 2014)

## 2.5. Production mondiale

La production mondiale de pois chiche est estimée à environ 13 millions de tonnes sur une superficie de 13 millions d'hectares. Le rendement mondial moyen de la culture de pois chiche reste faible comparé aux rendements des pois secs, lentilles et fèves sèches (**Tableau 1**) (FAO, 2013).

**Tableau 1:** Superficie, production, rendement de la culture de pois chiche par rapport aux autres légumineuses alimentaires dans le monde pour l'année 2013 (FAO, 2013).

Légumineuse	Superficie récoltée ha	Rendement Qx/ha	Production tonnes
Haricots secs	29052957	7.850	22806139
Pois chiches	13570375	9.667	13118699
Pois secs	6273201	17.791	11160856
Lentilles	4326782	11.500	4975621
Fèves sèches	2040542	17.168	3503300

Le pois chiche est actuellement cultivé dans 57 pays à travers le monde (**Figure 3**). Le continent Asiatique constitue un producteur potentiel du pois chiche avec un taux de 91%. Par ailleurs, les plus grands pays producteurs sont l'Inde, l'Australie, le Pakistan, la Turquie, le Myanmar, l'Iran, l'Ethiopie, le Mexique et le Canada.

L'Inde est le plus important producteur (67% de la production mondiale), le quatrième exportateur de pois chiche et également le plus important consommateur. L'Inde est responsable de 8% des exportations contre 33% des importations mondiales (FAO, 2013).

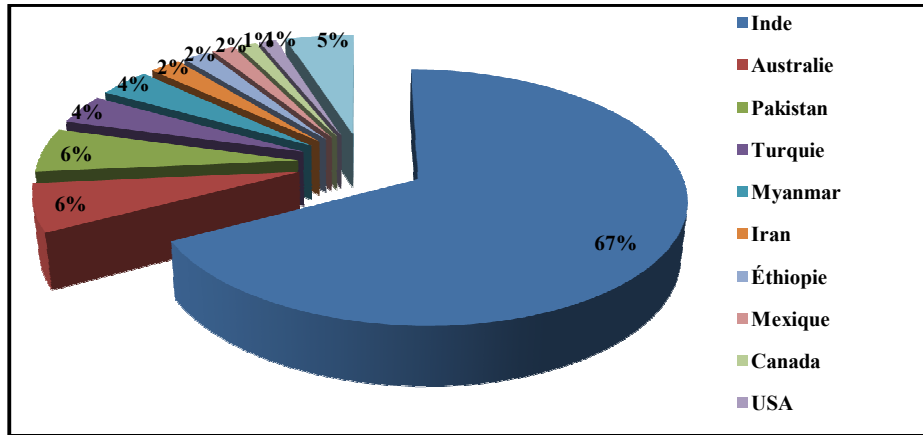


Figure 3 : Répartition de la production mondiale en pois chiche sur l'année 2013 (FAO., 2013).

Les pays du sous-continent indien, l'Australie, produisent à la fois du Desi et du Kabuli. Les autres pays produisent surtout du kabuli (Skrypetz, 2006).

En 2012, Les exportations mondiales en pois chiche ont atteint 1890448 tonnes soit 14.43% des exportations mondiales en légumineuses sèches. Les plus grands pays exportateurs de pois chiche sont (Figure 4), notamment, l'Australie, le Mexique, la Russie, l'Inde, l'Argentine, les Etats Unis d'Amérique, l'Ethiopie, le Myanmar, le Canada la Tanzanie et la Turquie (FAO, 2013).

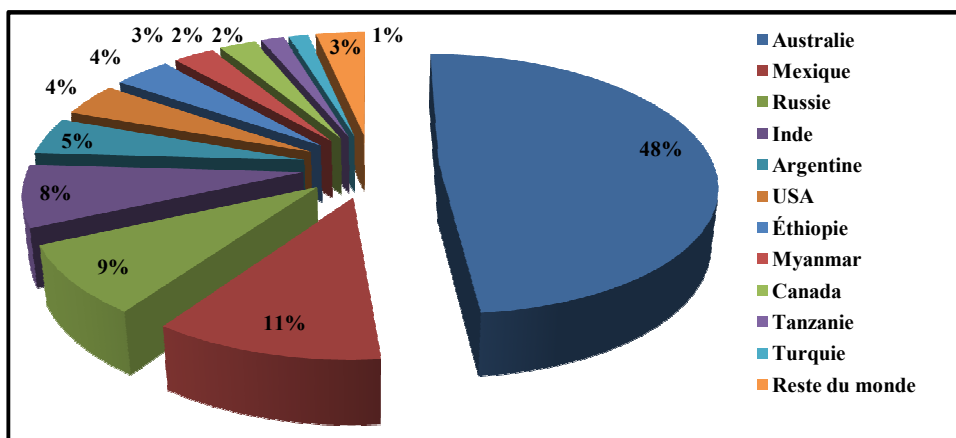
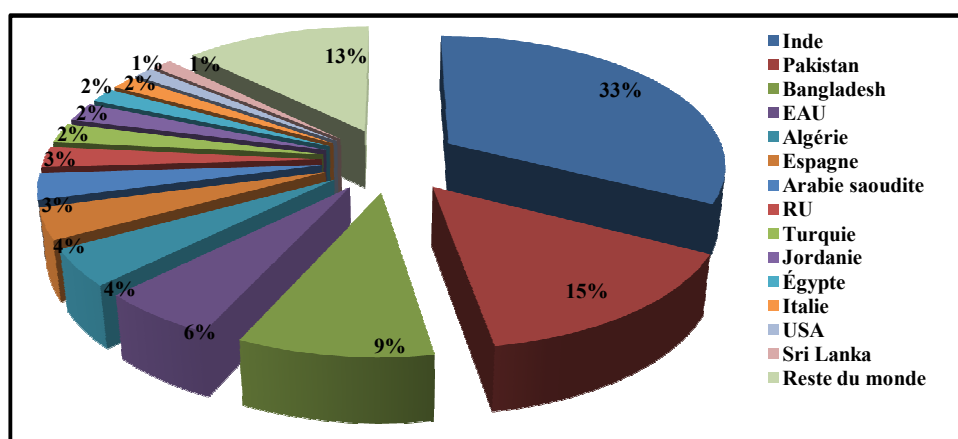


Figure 4 : Principaux pays exportateurs de pois chiche durant l'année 2012 (FAO., 2013).

L'Australie est le deuxième pays producteur (6% des productions mondiales) et le premier pays exportateur de pois chiche, qui contribue à 48% dans les exportations mondiales, dont ses exportations sont estimées à 588.45 millions de dollars. Après l'Australie, le Mexique et la Russie contribuent avec une part de 11% et 9% respectivement (FAO, 2012).

Le Canada est actuellement le huitième pays producteur du monde, il est devenu au cours des années 2000-2001 un important exportateur de pois chiches, avec des exportations estimées à 106 millions de dollars (Gaid, 2015).



**Figure 5 :** Principaux pays importateurs de pois chiche durant l'année 2012 (FAO., 2013).

La valeur des importations mondiales en pois chiche a atteint 1,33 milliards de dollars, un taux de 15.38% de la valeur des importations mondiales en légumineuses sèches.

## 2.6. Situation et production du pois chiche en Algérie

En Algérie, les espèces de légumineuses alimentaires cultivées sont la lentille (*Lens culinaris* L.), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), le pois (*Pisum sativum* L.), la fève (*Vicia faba* L.) et le haricot (*Phaseolus* L.). Le pois chiche occupe la deuxième place après la fève sèche en matière de production, de semence (Tableau 2).

La culture est localisée dans les régions nord à savoir Alger, Guelma, Annaba, Tiaret, Médéa, Sidi Belabes, Sétif, Constantine, Tissemsilt, Aïn Témouchent, Chlef, Relizane (Benzohra., 2009).

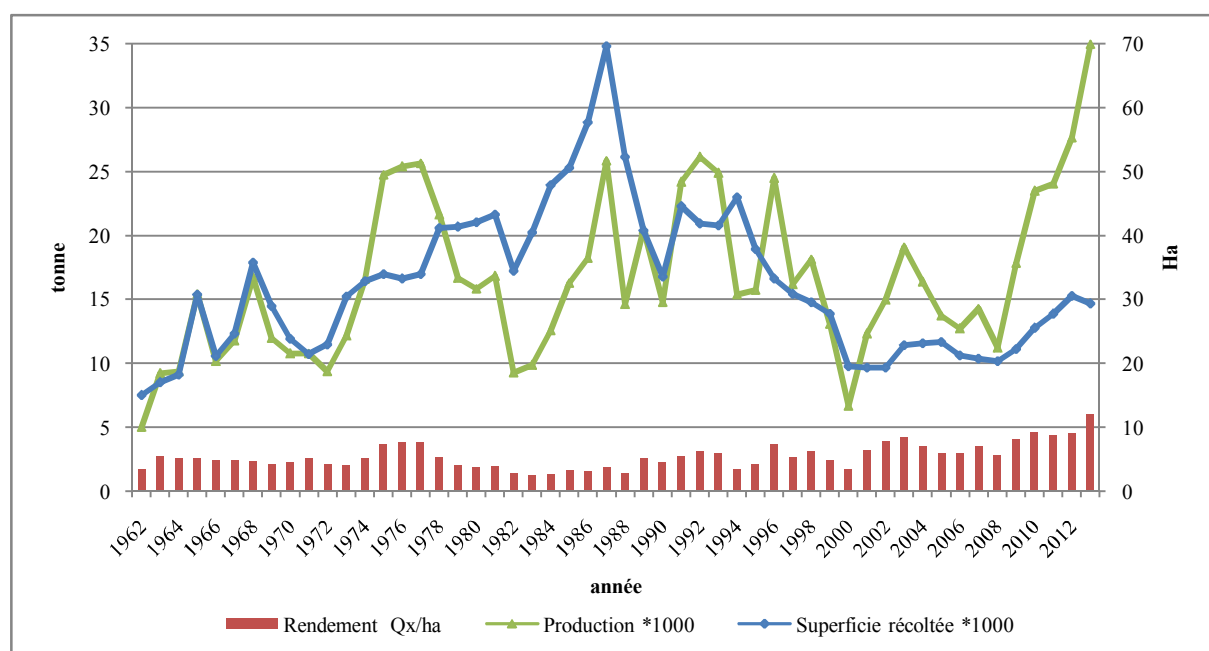
**Tableau 2:** Superficie, production, rendement et importation de la culture de pois chiche par rapport aux autres légumineuses alimentaires en Algérie (FAO, 2012, 2013).

légumineuses	Superficie récoltée (Ha)	Rendement (Qx/Ha)	Production (Tonnes)	Semences (Tonnes)	Importations	
					Quantité (Tonnes)	Valeur ×100 USD
Fèves sèches	37668	11.253	42386	1900	1911	1888
Pois chiches	29320	11.930	34980	1450	64475	94779
Pois secs	10808	9.795	10586	275	8866	10102
Lentilles	5543	11.398	6318	165	46484	38472
Haricots secs	1427	9.544	1362	42	54289	71729

L'analyse de l'évolution de la production et de la superficie cultivée sur 50 années (Figure 6), a montré une production variable durant la période 1962-1974 avec un rendement de 4 à 5 qx / ha. Ensuite, une production maximale sur les trois années (1975-1977), accompagnée d'une légère augmentation des superficies cultivées et un rendement moyen de 7.5 qx/Ha, est observée. La période de 1977-1983 est marquée par une réduction considérable de la production, due principalement à la diminution des superficies cultivées et le faible rendement avec 2 à 4 qx/ha.

La période de 1984-1989, caractérisée par l'augmentation des superficies cultivées, et a atteint 70000 ha. Cependant, la production a diminué en raison des faibles rendements.

La période de 1990-2008, la culture de pois chiche a connu une très grande variabilité dans la production qui fluctuait de 6000 tonnes à 24000 voire 26000 tonnes. Les rendements enregistrés à cette période variaient de 3.34 qx/ha à 8.36 qx/ha. Quant aux superficies, elles sont passées de 33560 ha en 1990 à 20361 ha en 2008.



**Figure 6 :** Evolution des superficies, productions et rendements de la culture de pois chiche durant la période 1962-2013 en Algérie (FAO, 2013).

Un développement exponentiel de la production est observé pendant les années de 2008 à 2013. Ensuite, la production est passée de 11211 tonnes en 2008 à 34980 tonnes en 2013, dont les rendements ont évolué pour atteindre 11.93 qx/ha et les superficies cultivées ont augmenté de 23361 ha en 2008 à 29320 ha en 2013. Malgré l'évolution remarquable de la production et des rendements de la culture de pois chiche, la production nationale de l'ordre de 34980 tonnes, ne parvient pas à couvrir les besoins internes du pays.

Une telle situation a incité l'Etat à faire recours à des importations, de l'ordre de 64475 tonnes, qui dépassent de loin la production nationale (184.31% de celle-ci) et qui valent 94.779 millions de dollars (FAO, 2012 ; FAO, 2013).

L'Algérie est actuellement le 19<sup>ème</sup> pays producteur, cinquième pays importateur, détient le 25<sup>ème</sup> meilleur rendement en pois chiche et paye la 3<sup>ème</sup> importante facture d'importation de pois chiche dans le monde. Le rendement en graines, estimé à 11.93Qx/Ha est supérieur au rendement mondial moyen (9.667Qx/Ha), mais, reste toujours faible pour satisfaire les besoins internes du pays (FAO, 2012 ; FAO, 2013). En effet, le pois chiche en Algérie souffre de nombreuses difficultés agro techniques. Les problèmes liés à l'installation de la culture (date, dose de semis), à la protection phytosanitaire (maladies, mauvaises herbes), aux pertes pendant la récolte et à la non disponibilité de variétés adaptées, sont les causes principales des faibles rendements (Benzohra., 2009; Bouras., 2010; Gaid, 2015).



### **3. Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes « PGPR »**

Les rhizobactéries sont capables de coloniser efficacement la rhizosphère et pouvant croître dans les tissus des plantes en exerçant un effet bénéfique sur leur développement et leur croissance sont appelées **Rhizobactéries**, bactéries capables de favoriser la croissance des plantes (**RFCP**) (Beauchamp, 1993), en anglais : **Plant Growth Promoting Rhizobacteria**; **PGPR** (Ahmad *et al.*, 2008 ; AmbreenAkhtaret *al.*, 2012). Ces bactéries améliorent la nutrition des plantes, leur développement, leur compétitivité et leur réponse aux stress environnementaux induit par différent mécanismes et sous différent agro-écosystèmes (Khan *et al.*, 2009).

Un candidat PGPR est capable de coloniser activement les racines, de survivre, se multiplier, concurrencer avec les microorganismes de la rhizosphère au moins le temps nécessaire à l'expression de ses activités PGP et de promouvoir la croissance et le développement de la plante (Ahemad et Kibret, 2014).

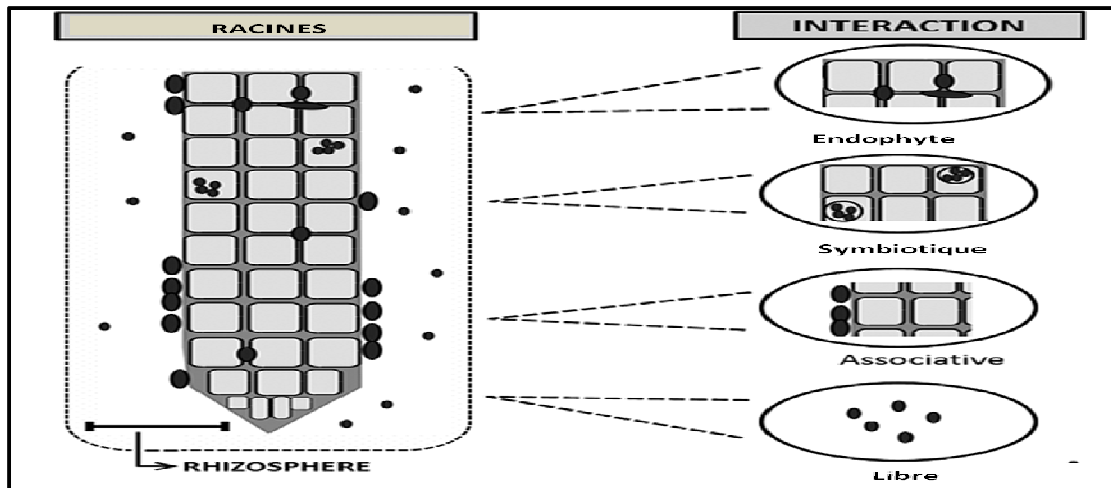
D'une manière générale, 2 % à 5 % des rhizobactéries, lorsqu'elles sont réintroduites dans un sol contenant une microflore compétitive, exercent un effet bénéfique sur le développement des plantes (Antoun et Prévost, 2005 ; Barriusoet *al.*, 2008 ; Ahemad et Kibret, 2014). Selon Barriuso *et al.*, (2008), la rhizosphère des plantes sauvages constitue la meilleure source pour l'isolement de bactéries PGPR.

Les mécanismes impliqués dans la promotion de la croissance des plantes par les PGPR (**Tableau 3**) : incluent la capacité à la production et changement de la concentration des hormones végétales tel que l'acide indole acétique (AIA), l'acide gibbérellique, les cytokinines et l'éthylène ; la fixation de l'azote ; l'antagonisme contre les microorganismes phytopathogènes par la production de sidérophores, de chitinases, d'antibiotiques et de cyanide, et la solubilisation du phosphore minéral et des métaux toxiques (Podile et Kishore, 2006 ; Khan *et al.*, 2009). Selon leur mécanisme de promotion, les PGPR sont réparties en trois groupes : les biofertilisants, le phytostimulateur et les biopesticides.

**Tableau 3 :** Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlés par les PGPR (Martinez-Viveros *et al.*, 2010).

Terme	Définition	Mécanismes	Référence
<b>Biofertiliseur</b>	Une suspension contenant des microorganismes vivants qui, une fois appliquée sur des graines, sur une plante ou dans le sol, colonisant la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et promeuvent la croissance par l'augmentation de la disponibilité des nutriments principaux pour la plante hôte.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La fixation biologique de l'azote.</li> <li>- L'utilisation des formes insolubles de phosphore.</li> </ul>	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004; Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado, 2006.
<b>Phytostimulateur</b>	Des microorganismes qui ont la capacité de produire ou de changer la concentration des régulateurs de la croissance comme l'acide indole acétique, l'acide gibbérellique, les cytokinines ou l'éthylène.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Production des phytohormones (Les auxines, les cytokinines et les gibbérellines)</li> <li>- Réduction de la concentration de l'éthylène à l'intérieur de la plante.</li> </ul>	Lugtenberger <i>et al.</i> , 2002; Somers <i>et al.</i> , 2004.
<b>Biopesticide ou agent de biocontrol</b>	Des microorganismes qui stimulent la croissance d'une plante via le contrôle des agents phytopathogènes, principalement par la production des antibiotiques et des métabolites antifongiques.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Production des antibiotiques (Siderophores, HCN, métabolites antifongiques)</li> <li>- Production des enzymes qui dégradent les membranes des cellules fongiques</li> <li>- La compétition</li> <li>- L'ISR et l'ASR</li> </ul>	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004; Chandler <i>et al.</i> , 2008.

Selon le degré de proximité avec les racines et le sol entourant, les PGPR peuvent être symbiotiques, endophytes ou associatives (Souza *et al.*, 2015) (Figure 7). Certains autres préfèrent répartir les PGPR en deux groupes, des bactéries symbiotiques (iPGPR) et des bactéries vivant librement dans la rhizosphère (ePGPR). Les iPGPR peuvent vivre à l'intérieur des cellules végétales et former des structures spécialisées appelées nodules, tandis que, les ePGPR, ne pénètrent pas les cellules végétales et ne produisent pas de nodules mais restent capables de favoriser le développement des plantes (Hayat *et al.*, 2010 ; Sarafet *et al.*, 2011 ; Gupta *et al.*, 2015). Les iPGPR les mieux connus sont les *Rhizobia*, qui produisent des nodules sur les racines des légumineuses.



**Figure 7 :** Types d'associations entre les racines des plantes et les PGPR (Souza *et al.*, 2015). En agriculture, La promotion de la croissance des plantes par les PGPR est synonyme d'une augmentation du taux de germination et d'émergence, de la vigueur, de la biomasse, de la prolifération du système racinaire et du rendement dans divers espèces de plantes (Podile et Kishore, 2006).

### 3.1. Mécanismes d'action des PGPR

Les mécanismes d'action des PGPR sont regroupés traditionnellement en mécanismes directs et mécanismes indirects (Antoun et Prévost, 2005) (Figure 8). Les mécanismes directs comprennent les processus de bio-fertilisation et de bio-stimulation tandis que les processus de bio-contrôle constituent les mécanismes indirects (Silini, 2012). Les mécanismes indirects surviennent lorsque les PGPR atténuent ou préviennent l'effet délétère d'un ou de plusieurs organismes phytopathogènes par : la synthèse d'antibiotique, la réduction du fer dans la rhizosphère, l'induction de la résistance systémique, la synthèse de métabolites à effet antifongique, la production d'enzymes lytiques, la compétition pour les sites d'attachement sur les racines, la stimulation des symbioses bénéfiques et la réduction de la toxicité des sols contaminés (Khan *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes directs, les PGPR améliorent la croissance et le développement des plantes en leur fournissant des composés qu'ils synthétisent, soit, en leur facilitant l'assimilation des nutriments présents dans leur environnement.

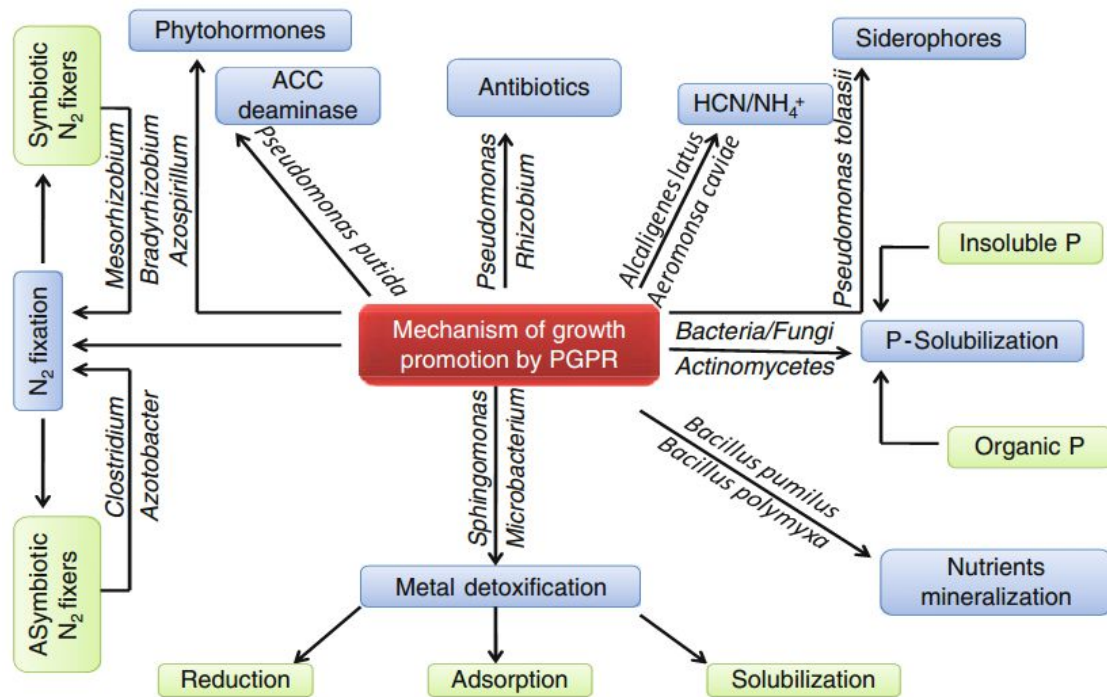


Figure 8 : Diversité fonctionnelle chez les PGPR (d'après Khan *et al.*, 2009).

### 3.1.1. Mécanismes directs

#### 3.1.1.1. Fixation de l'azote

L'azote élément essentiel pour les plantes, intervient dans la synthèse des enzymes, protéines, chlorophylle, ADN et de l'ARN ; il est indispensable pour la croissance des plantes et la production alimentaire et fourragère (Hayat *et al.*, 2010). La disponibilité réduite de l'azote, due à sa forte émission dans l'air, est un facteur limitant dans les systèmes agricole.

La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la présence de la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyenset *et al.*, 2010). Les bactéries diazotrophes, les premiers PGPR testés ont approuvé par leur capacité à améliorer la croissance et la production des cultures (Ahmad *et al.*, 2008). Beaucoup de bactéries symbiotiques (*Rhizobia*) et asymbiotiques (*Azotobacter*, *Azospirillum*) fixent l'azote pour satisfaire leurs besoins et fournissent l'excès d'azote fixé aux plantes sous forme d'ions ammonium, qu'elles utilisent pour leur métabolisme (Balaram Mohapatra *et al.*, 2014). Selon Balaram Mohapatra *et al.*, (2014), les bactéries symbiotiques fournissent plus de 45 millions de tonnes d'azote aux écosystèmes terrestres.

La fixation asymbiotique de l'azote est estimée de 23% à 32% du total d'azote assimilé par les plantes (Chaitanya et Meenu, 2015).

La promotion de la croissance des plantes par les PGPR diazotrophes est attribuée pendant longtemps, à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. Cependant, l'utilisation des techniques des isotopes d'azote a montré que l'effet bénéfique des bactéries diazotrophes est dû beaucoup plus à la production des phytohormones qu'à la fixation d'azote (Ahmad *et al.*, 2008).

### **3.1.1.2. Solubilisation du phosphore**

Après l'azote, le phosphore est l'élément nutritif le plus limitant des plantes (Ahmad *et al.*, 2008), il joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la productivité des plantes (Konate, 2007 ; Balaram Mohapatra *et al.*, 2014). Toutefois, les réserves du phosphore, quoique abondantes, ne sont pas disponibles sous forme assimilable par les plantes qui n'utilisent que les formes solubles de phosphore, le phosphate mono et di basique le  $\text{HPO}_4^{-2}$  et le  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  (Ahmad *et al.*, 2008). L'enrichissement du sol en phosphore, suite à des applications de fertilisants, dépend de leur caractéristique physicochimique. Dans les sols acides, les oxydes libres et les hydroxydes d'aluminium et de fer fixent le phosphate, tandis que dans les sols alcalins, le phosphore est fixé par le calcium, ce qui rend le fertilisant peu efficace (Konate, 2007 ; Chaitanya et Meenu, 2015).

Dans les sols agricoles, la solubilisation des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol (Konate, 2007). Plusieurs bactéries de différents genres sont capables de solubiliser le phosphore : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacter*, *Chryseobacterium* et *Erwinia* (Ahmad *et al.*, 2008). Ces bactéries solubilisent le phosphore via la sécrétion d'acides organiques qui diminuent le pH dans la rhizosphère et entraînent la dissociation des liaisons dans les composés phosphorés insolubles comme le tri-calcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  contenu dans les sols calcaires (Afzal et Bano, 2008 ; Chaitanya et Meenu, 2015). Les acides gluconiques et 2-cétogluconiques sont les acides les plus fréquemment produits par les microorganismes solubilisateurs de phosphore **MSP**. D'autres acides organiques, tels que l'acide glycolique, oxalique, malonique et succinique, sont également identifiés chez les **MSP** (Chaitanya et Meenu, 2015), ces acides sont produits par la voie d'oxydation directe au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries conduisant à l'acidification des cellules et leur

environnement et par conséquent à la libération du phosphate sous forme ionique (Silini, 2013).

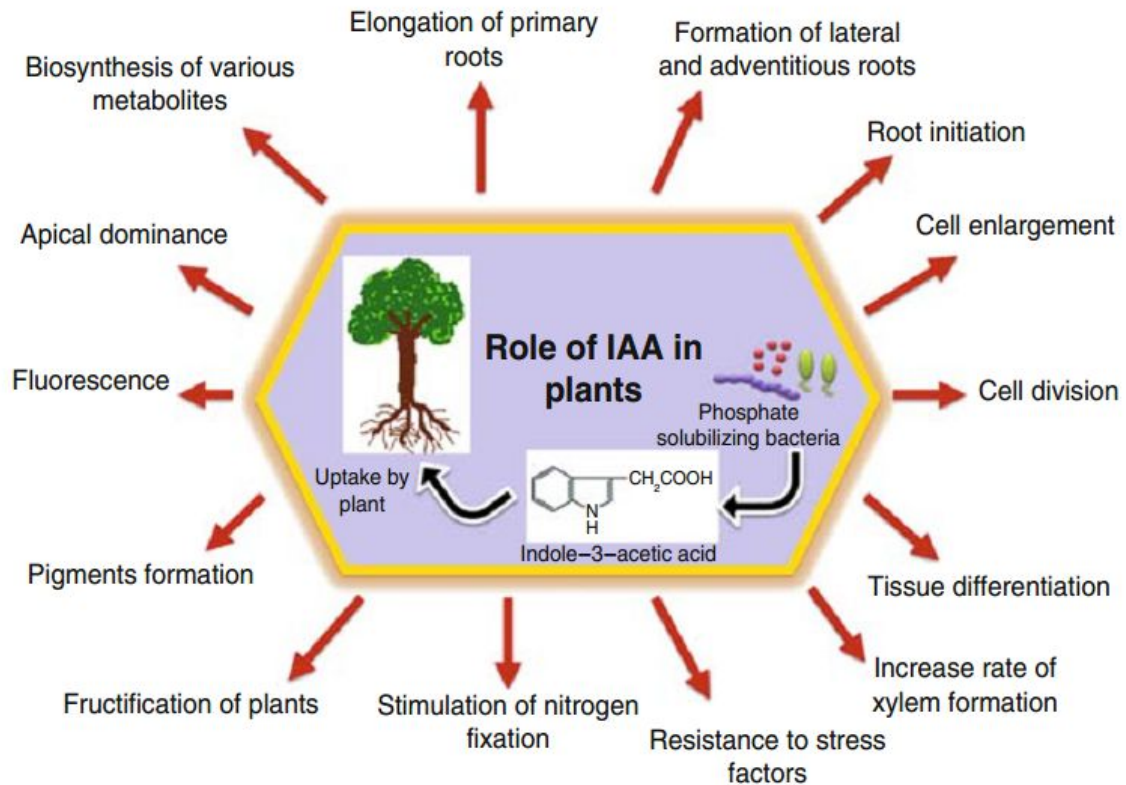
### **3.1.1.3. Production des régulateurs de croissance**

Les régulateurs de la croissance des plantes sont des substances qui peuvent, à de très faibles concentrations, influencer les processus physiologiques de la plante et modifier ou contrôler un ou plusieurs événements métaboliques de la plante en accélérant ou en retardant son taux de croissance ou de maturation. Ces substances sont aussi appelées phytohormones (Khan et al., 2009 ; Hayat et al., 2010).

De nombreux travaux ont indiqué que l'utilisation des hormones en tant que molécule signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres microorganismes tels que le « quorum sensing » ou la résistance systémique induite ISR (Spaepen et al., 2007). Il existe cinq principaux groupes d'hormones : les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique. L'acide indole-acétique (AIA) est le plus important du groupe des auxines (Silini, 2013 ; Hayat et al., 2010).

#### **3.1.1.3.1. Production d'acide indole acétique**

L'acide indole acétique (AIA), l'auxine active chez les plantes est la phytohormone la plus répandue et la mieux caractérisée. Il intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse et contrôle l'organisation du méristème apical (phyllostaxie), la ramification des parties aériennes de la plante (dominance apicale), la formation de la racine principale et l'initiation des racines latérales et adventives (rhizogénèse). Ces multiples effets sur les différents stades de la croissance de la plante résultent du contrôle que cette phytohormone exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation (Figure 9) (Silini, 2013).



**Figure 9** : Rôle de l'IAA dans le développement des plantes (d'après Khan *et al.*, 2009).

Diverses espèces bactériennes sont capables de produire l'acide indole acétique ou ses précurseurs. En effet, il est estimé que 80% des bactéries isolées de la rhizosphère des plantes sont capables de produire l'AIA (Hayat *et al.*, 2010). Le tryptophane est le principal précurseur pour la biosynthèse d'AIA. Les exsudats racinaires sont la ressource principale de tryptophane dans le sol (Spaepen *et al.*, 2007). Les PGPR utilisent les exsudats racinaires pour la biosynthèse de l'AIA, libèrent cette auxine dans la rhizosphère comme métabolite secondaire (Khan *et al.*, 2009), une partie de l'AIA est reprise par la plante qui s'ajoute à l'AIA endogène de la plante pour stimuler la prolifération cellulaire des plantes et l'allongement racinaire.

L'analyse du rôle de l'AIA a montré que les bactéries utilisent cette phytohormone pour établir des interactions avec les plantes dans le cadre de leur stratégie de colonisation notamment la phytostimulation et l'intervention dans les mécanismes de base de défense des plantes (Ryan *et al.*, 2008).

### **3.1.1.3.2. Cytokinines et gibbérellines**

Diverses bactéries PGPR telles que *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* et *Paenibacillus polymyxa* peuvent produire des cytokinines et/ou des gibbérellines pour promouvoir la croissance des plantes (Gupta *et al.*, 2015).

L'inoculation de graines avec des bactéries productrices de cytokinines et/ou des gibbérellines conduit généralement à l'augmentation du contenu en cytokinines et/ou en gibbérellines chez les plantes influençant ainsi simultanément la croissance et le développement des plantes (Arkhipova *et al.*, 2005 ; Pliego *et al.*, 2011 ; Gamalero et Glick, 2011).

### **3.1.1.4. Régulation du taux de l'éthylène**

L'éthylène synthétisé par de nombreuses espèces bactériennes est un puissant régulateur de la croissance des plantes, impliqué dans leur système de défense et leur réponse aux stress et peut affecter plusieurs aspects de la croissance des plantes, leur développement et sénescence (Ahmad *et al.*, 2008). Outre, son rôle d'hormone de maturation, l'éthylène favorise le développement des racines adventives et des poils absorbants, stimule la germination, et permet la levée de la dormance des graines (Ahmad *et al.*, 2008 ; Couillerot, 2009 ; Hayat *et al.*, 2010 ; Gupta *et al.*, 2015).

Toutefois, la persistance des concentrations élevées d'éthylène après germination provoque l'inhibition de l'élongation des racines et de la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses. Les PGPR favorisent la croissance des plantes en réduisant le taux d'éthylène dans les plantes, ceci est attribué à l'activité de l'enzyme 1- aminocyclopropane -1-carboxylate (ACC) désaminase, qui hydrolyse le ACC, le précurseur directe de la biosynthèse de l'éthylène dans les plantes. Les produits de cette hydrolyse, l'ammonium et l'alpha-ketobutyrate, peuvent être utilisés par les bactéries comme source d'azote et de carbone (Ahmad *et al.*, 2008 ; Hayat *et al.*, 2010).

Iqbal *et al.*(2012), ont rapporté une amélioration du nombre de nodule, du poids sec des nodules, de la biomasse fraîche, du rendement en graine et en pailles et du contenu en azote des graines de lentille inoculées par une souche de *Pseudomonas* sp. contenant une activité ACC désaminase.



### 3.1.2. Mécanismes indirectes

#### 3.1.2.1. Production des sidérophores

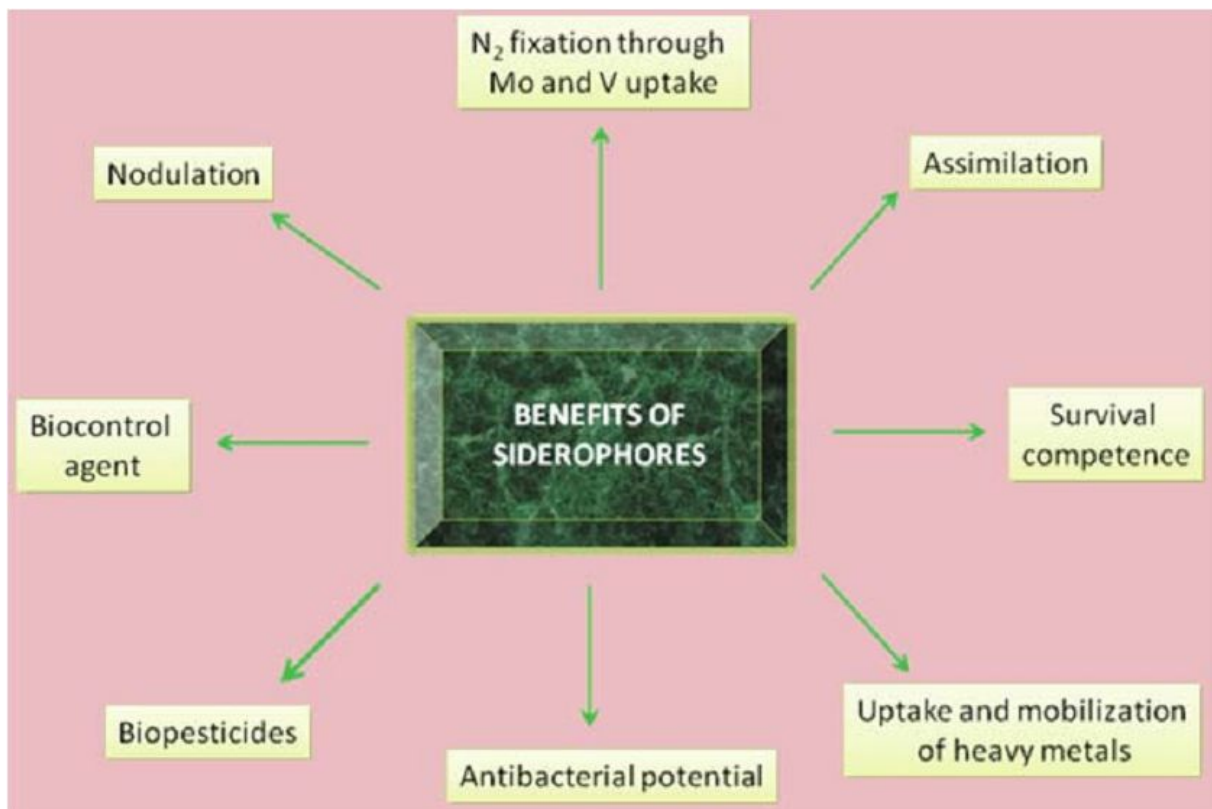
Le fer est un élément capital pour les bactéries, les champignons et les plantes et joue un rôle important dans divers processus biochimique et physiologique tels que la respiration, la photosynthèse, la réduction des nitrates, la synthèse de la chlorophylle et la fixation d'azote (**Figure 10**) (Khan *et al.*, 2009). Il agit aussi comme cofacteur ou est requis pour le fonctionnement approprié des enzymes et des protéines impliquées dans le transport d'électrons ou d'oxygène (Khan *et al.*, 2009 ; Balaram Mohapatra *et al.*, 2014 ; Gupta *et al.*, 2015).

Cet élément est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxyde de fer mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance de la flore bactérienne et de celle des plantes. La faible biodisponibilité du fer dans la rhizosphère entraîne une compétition accrue.

En présence des conditions limitantes en fer, les PGPR synthétisent des composés à faible poids moléculaire généralement inférieur à 1 kDA appelés " sidérophores" (Khan *et al.*, 2009), dont le rôle est la solubilisation, la chélation et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (Neilands, 1995 ; Khan *et al.*, 2009; Balaram Mohapatra *et al.*, 2014). L'utilisation des sidérophores représente chez les bactéries un système très efficace pour l'acquisition du fer (Saharan et Nehra, 2011).

Les sidérophores sont synthétisés par divers genres de bactéries rhizosphériques, dont *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Rhodococcus*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* *Bradyrhizobium*, *Serratia* et les genres rhizosphérique de *Streptomyces* (Ahmad *et al.*, 2008 ; Khan *et al.*, 2009 ; Hayat *et al.*, 2010 ; Gupta *et al.*, 2015).

Les sidérophores sont impliqués dans les deux types de mécanismes de promotion de la croissance des plantes, plusieurs plantes peuvent utiliser différentes sidérophores bactériennes comme source de fer, bien que les concentrations totales sont probablement faibles pour une contribution substantielle à l'alimentation des plantes en fer (Gupta *et al.*, 2015). Ces molécules jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels le Zn et Pb (Dimkpa *et al.*, 2009).



**Figure 10** : Fonctions biologiques des sidérophores(Khan *et al.*, 2009).

La production de sidérophores est aussi un des mécanismes permettant la promotion de la croissance des plantes par l'élimination des phytopathogènes de la rhizosphère (Saharan et Nehra, 2011). L'implication des sidérophores dans l'antagonisme entre les populations microbiennes est le résultat de la disponibilité limitante du fer qui affecte la croissance et le développement microbien dans la rhizosphère. Une compétition pour cet élément s'installe entre les microorganismes. La production de sidérophores et la capacité de les assimiler devient alors un avantage écologique dans la rhizosphère (Silini, 2013). Les sidérophores libérés par les PGPR chélatent le fer minéral par la formation d'un complexe soluble  $Fe^{3+}$ . Le fer complexé au sidérophore n'est assimilable que par les microorganismes producteurs ou possédant des récepteurs membranaires spécifiques capables de le reconnaître et de le transporter (Saharan et Nehra, 2011). Privée de fer, la flore tellurique nuisible ralentit sa croissance et sa densité diminue dans la rhizosphère (Loper et Buyer, 1991).

### **3.1.2.2. Antibiose**

Les stress biotiques tels que les maladies et les insectes causent de 15% à 20% des pertes de rendement et de productivité. La majorité des maladies touchant les plantes sont dues aux interactions entre les phytopathogènes de la rhizosphère et le système racinaire des plantes. Certains PGPR peuvent améliorer la santé et le développement des plantes par la production de substances antibiotiques et/ou antifongiques qui peuvent inhiber la croissance des phytopathogènes (Balaram Mohapatra *et al.*, 2014). La production d'antibiotiques par les PGPR biocontrôles est le mécanisme le plus puissant d'antibiose contre les phytopathogènes (Gupta *et al.*, 2015). Les antibiotiques produits par les PGPR peuvent avoir des effets antitumoraux, antiviraux, antimicrobiens anthelminthiques et cytotoxiques (Khan *et al.*, 2009).

Durant les deux dernières décennies, une variété de composés antibiotiques a été identifiée : l'amphisine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), l'oomycine A, les phenazines, les pyoluteorines, le pyrrolnitrine, la tensine, le tropolone, et les lipopeptides cycliques produits par les pseudomonads et l'oligomycin A, kanosamine, zwittermicin A, et xanthobaccin produit par les *Bacillus*, *Streptomyces*, et *Stenotrophomona ssp.* pour prévenir la prolifération des phytopathogènes notamment les champignons (Gupta *et al.*, 2015).

La production d'antibiotique par les PGPR peut améliorer leur compétitivité au niveau de la rhizosphère (Khan *et al.*, 2009). Cependant, le problème qui se pose lors d'une utilisation accrue de PGPR producteur d'antibiotiques comme agents de biocontrôle est que les phytopathogènes peuvent développer une résistance vis-à-vis de ces antibiotiques (Gupta *et al.*, 2015).

Mise à part la production d'antibiotiques, d'autres sous-produits microbiens peuvent aussi contribuer à la suppression des agents pathogènes. Le cyanure d'hydrogène (HCN) bloque efficacement la voie de la cytochrome oxydase et, par ailleurs, est très toxique pour tous les micro-organismes aérobies à des concentrations picomolaires (Khan *et al.*, 2009). La production d'HCN par certaines *Pseudomonas fluorescentes* est soupçonné d'être impliqués dans la suppression des pathogènes des racines (Pal et McSpadden, 2006).

### **3.1.2.3. Production d'enzymes lytiques**

La production d'enzymes lytiques est un autre mécanisme de promotion utilisé par les PGPR. Les PGPR peuvent produire des enzymes lytiques tels que les chitinases, les cellulases, peroxydases, déshydrogénase,  $\beta$ -glucanase, lipases, phosphatases et protéases...etc (Khan *et*

*al.*, 2009). ces enzymes permettent aux bactéries rhizosphériques la dégradation des substrats tels que la chitine, les protéines, la cellulose et l'ADN (Balaram Mohapatra *et al.*, 2014). Vivekananthan *et al.*, (2004) ont démontrés que la chitinase et la laminarinase synthétisées par *P. stutzeri* sont capable de lyser le mycélium de *F. solani*. Les enzymes secrétées détruisent les oospores des champignons phytopathogènes et affectent sévèrement la germination des spores (Balaram Mohapatra *et al.*, 2014). De plus, les oligomères de chitine et de glucane libérés durant la lyse de la paroi cellulaire des champignons agissent comme des éliciteurs de divers mécanismes de défense dans les plantes (Khan *et al.*, 2009).

La peroxydase représente une autre composante de la réponse précoce aux attaques des phytopathogènes, elle joue un rôle clé dans la biosynthèse de la lignine qui limite la diffusion du pathogène (Khan *et al.*, 2009). Il est suggéré que les PGPR, possédant la capacité à produire des enzymes lytiques, peuvent être utilisés pour gérer les phytopathologies et aident à réduire l'usage des pesticides (Khan *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2010).

#### **3.1.2.4. Induction de la résistance systémique chez les plantes**

En plus de l'antagonisme direct contre les organismes pathogènes, les PGPR peuvent induire une forme de résistance systémique chez les plantes. La résistance systémique induite ISR est un état physiologique de capacités défensives renforcées, induite en réponse à des stimulateurs environnementaux spécifiques. Cet état permet une potentialisation des défenses innées des plantes contre les adventices biotiques (Konate, 2007 ;Gupta *et al.*, 2015).

L'induction de la résistance systémique est due à plusieurs composantes bactériennes dont les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane des bactéries à Gram négative, les siderophores, les lipopeptides cyclique, le 2, 4-diacetylphloroglucinol, les homoserines lactones, l'acétoin et le 2, 3- butanediol, les LPS induisent une série de gènes protecteurs (Konate, 2007 ;Gupta *et al.*, 2015). Les mécanismes développés par les plantes leur permettent de se protéger contre un large spectre de pathogènes pas seulement fongiques, bactériens et viraux, mais aussi vis-à-vis de maladies causées par certains insectes et nématodes (Gupta *et al.*, 2015).

La colonisation efficace des racines par des PGPR est un événement essentiel pour l'ISR où la population des bactéries sur les racines doit atteindre un seuil suffisant pour déclencher le phénomène. Chez *Pseudomonas* par exemple, ce seuil doit être au minimum  $10^5$  cellules par gramme de racines (Raaijmakers *et al.*, 1995). De plus, les mécanismes de résistance dans l'ISR atteignent leur efficacité maximale entre 4 à 5 jours après l'application d'un agent induisant. Enfin, la durabilité de la résistance induite par les PGPR diffère d'une plante à

l'autre et aussi en fonction de la souche bactérienne utilisée, l'application combinée d'une souche particulière de *Pseudomonas* sur les graines, les racines, le sol et sur les feuilles a augmenté la durabilité de l'ISR chez le riz contre la maladie causée par *Rhizoctonia solani* (Nandakumaret al., 2001).

### **3.2. Taxonomie des PGPR**

Durant ces dernières décennies, le nombre de PGPR identifiés a augmenté considérablement, principalement à cause de l'intérêt croissant attribué au rôle de la rhizosphère comme écosystème dans le fonctionnement de la biosphère et aussi à cause des mécanismes d'action des PGPR (Barriuso et al., 2008). Certaines souches bactériennes, ont même été commercialisées sous forme d'inocula à usage agronomique (Podile et Kishore, 2006 ;Barriusoet al., 2008). Les PGPR forment un groupe taxonomique très hétérogène, ils présentent une grande diversité de genre et d'espèces (Tableau4). Ces bactéries appartiennent majoritairement aux cinq phylums suivants: Proteobacteries, Cyanobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes.

#### **3.2.1. Les Cyanobacteries**

Beaucoup de plantes ont développé des associations symbiotiques avec des cyanobactéries fixatrices d'azote, particulièrement les genres *Nostoc* et *Anabaena*. Les plantes hôtes des cyanobactéries sont diverses et vont des algues unicellulaires aux angiospermes. Ces bactéries peuvent être des symbiotes extracellulaires ou intracellulaires de divers organes végétaux. L'autotrophie combinée de ces bactéries à l'azote et au carbone, leur permet de coloniser un large éventail d'habitat pauvre en nutriments (Rodríguez-Díazet al., 2008).

#### **3.2.2. Les Actinobacteries**

Ce phylum contient 5 genres dont les souches sont des PGPR : *Frankia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Curtobacterium* and *Streptomyces*. Le genre *Frankia* est le mieux connu, les actinobactéries de ce genre sont capable de fixer l'azote en symbiose avec les plantes actinorhizienne pionnière de la colonisation des sols pauvres ou dégradés (Rodríguez-Díazet al.,2008).

#### **3.2.3. Bacteroidetes**

*Flavobacterium* est le seul genre confirmé comme PGPR pour ce phylum, les souches PGPR de ce genre sont des ePGPR capables de solubiliser le phosphore (Rodríguez-Díazet al., 2008).

### 3.2.4. Les frimicutes

Ce phylum contient 4 genres bactériens dont les souches ont été confirmées comme PGPR : *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* et *Clostridium*. Les souches PGPR appartenant à ces genres peuvent promouvoir la croissance par divers mécanismes dont la fixation d'azote, la production de phytohormones, l'apport de nutriment et/ou la suppression des microorganismes pathogène via des fonctions antagonistes (Rodríguez-Díaz et al., 2008).

Les espèces membres du genre *Bacillus* représentent 95% de la flore isolée, elles sont capables de former des endospores et donc de survivre dans des conditions défavorables (Rodríguez-Díaz et al., 2008).

### 3.2.5. Les Proteobacteries

Ce phylum regroupe le plus grand nombre de bactéries PGPR, ces bactéries sont réparties dans les différentes classes composant ce phylum.

#### 4.2.5.1. Les Alphaproteobacteries

Cette classe regroupe 17 genres de bactéries reconnus comme PGPR : *Caulobacter*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Devosia*, *Hyphomicrobium*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium/Ensifer*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* et *Swaminathania*, *Azospirillum* (Rodríguez-Díaz et al., 2008).

-Les rhizobia : Les rhizobia ont été, initialement, classés suivant leurs caractéristiques phénotypiques, les bactéries capables de fixer l'azote et produire des nodules sur les racines des légumineuses ont été regroupées dans un seul genre *Rhizobium*. En plus, les espèces de ce genre ont été regroupées en fonction du type de plant hôte infecté par le microsymbiote (spécificité d'hôte). L'avènement de la taxonomie polyphasique a permis une reconsidération des relations taxonomiques entre les genres de la famille des *Rhizobiaceae*. Ainsi, le genre *Rhizobium* contenait des souches qui, plus tard, ont été reclassées dans les nouveaux genres *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* et *Mesorhizobium* (Kennedy et al., 2004 ; Rodríguez-Díaz et al., 2008 ; Saharan et Nohra, 2011).

-Methylobacterium : ce genre, de la famille des *Methylobacteraceae*, est formé par des bactéries méthylophiles facultatives. Ce genre contient une seule espèce PGPR, *Methylobacterium nodulan* diazotrophe symbiotique des légumineuses (Rodríguez-Díaz et al., 2008).

-*Devosia* ce genre appartient à la famille des *Hyphomicrobiaceae*, il contient une seule espèce *D. neptuniae* capable de fixer l'azote en symbiose avec *Neptunianatans* (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008).

-*Gluconacetobacter*, *Acetobacter* et *Swaminathania* : le genre *Gluconacetobacter* est composé de bactéries endophyte obligatoire, l'espèce *G. diazotrophicus* colonise les racines, tiges et feuilles de la canne à sucre, ou elle occupe l'espace intercellulaire des parenchymes. Deux autres espèces diazotrophes ont été décrites dans ce genre, *G.johannae* et *G.azocaptans*. Ces espèces peuvent être associées à des plantes riches ou pauvres en sucre (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008).

Les genres *Acetobacter* et *Swaminathania* comportent des PGPR, ce sont des bactéries diazotrophes asymbiotiques. Le genre *Acetobacter* renferme 2 espèces PGPR qui sont : *A. peroxydans* et *A. nitrogenifigens*. Le genre *Swaminathania* a récemment été décrit, des souches de ce genre ont été isolées de la rhizosphère, racines et tiges d'une variété halotolérante de riz sauvage. Les isolats ont été capables de fixer l'azote et solubiliser le phosphore en présence du NaCl (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008).

-*Azospirillum* est le seul genre contenant des espèces PGPR de la famille des *Rhodospirillaceae*. Les souches de ce genre vivent librement dans le sol ou en association avec les racines, les tiges, les feuilles ou les graines des céréales et des fourrages gazonnés, bien qu'elles aient été isolées du cocotier, des légumes, fruits et légumineuses (Kennedy *et al.*, 2004 ; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008 ; Saharan et Nohra, 2011).

#### **4.2.5.2. Les Betaproteobacteries**

Cette classe regroupe 7 genres bactériens reconnus comme PGPR : *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Chromobacterium* et *Azoarcus*.

Les genres *Burkholderia* et *Ralstonia*, de la famille *Burkholderiaceae*, forment des groupes monophylétiques. Le genre *Burkholderia* contient diverses espèces ubiquistes ayant des propriétés physiologiques et écologiques variées. Quatre espèces de ce genre fixent l'azote en symbiose avec les légumineuses *Burkholderia tuberum* sp.nov., *B. phymatum* sp.nov., *B. mimosarium* sp.nov. et *B. nodosa* sp.nov. Cependant, une seule espèce du genre *Ralstonia*, *Ralstoniatai wanensis* est capable de fixer l'azote de façon symbiotique (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008).

#### **4.2.5.3. Les Gammaproteobacteries**

Cette classe regroupe 11 genres de bactériens reconnus comme genres hébergeant des espèces PGPR, ces genres sont répartis en trois familles : les *Moraxellaceae*, les *Enterobacteriaceae* et les *Pseudomonadaceae*.

Les genres inclus dans la famille des *Enterobacteriaceae* assurant la fonction de PGPR sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* et *Serratia* (Garrity, 2005).

Dans la famille des *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas* est le genre le plus abondant des bactéries Gram-négatif du sol. L'activité PGPR de certaines de ces souches est connue depuis de nombreuses années, résultant d'une large connaissance des mécanismes impliqués (Kennedy *et al.*, 2004 ; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008 ; Saharan et Nohra, 2011).



**Tableau 4 :** Affiliation taxonomique des genres contenant des espèces PGPR(Ahmad *et al.*, 2008).

<i>Genres</i>	<i>Phylum</i>	<i>Classe</i>	<i>Ordre</i>	<i>Sous Ordre</i>	<i>Famille</i>
<i>Nosctoc</i>	<i>Cyanobacteries</i>		<i>Nostocales</i>		<i>Nostocaceae</i>
<i>Anabaena</i>					
<i>Frankia</i>	<i>Actinobacteries</i>	<i>Actinobacteries</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae</i>
<i>Curtobacterium</i>				<i>Micrococcineae</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
<i>Arthrobacter</i>					<i>Micrococcaceae</i>
<i>Micrococcus</i>					
<i>Streptomyces</i>				<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteries</i>	<i>flavobacteriales</i>		<i>Flavobacteriaceae</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Frimicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>		<i>Bacillaceae</i>
<i>Paenibacillus</i>					<i>Paenibacillaceae</i>
<i>Staphylococcus</i>					<i>staphylococcaceae</i>
<i>Clostridium</i>		<i>Clostridia</i>			<i>Clostridiaceae</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>		<i>Caulobacteraceae</i>
<i>Blastobacter</i>			<i>Rhizobiales</i>		<i>Bradyrhizobiaceae</i>
<i>Bradyrhizobium</i>					<i>Bradyrhizobiaceae</i>
<i>Ochrobacterum</i>					<i>Brucellaceae</i>
<i>Devosia</i>					<i>Hyphomicrobiaceae</i>
<i>Hyphomicrobium</i>					<i>Hyphomicrobiaceae</i>
<i>Methylobacterium</i>					<i>Methylobacteraceae</i>
<i>Mesorhizobium</i>					<i>Phyllobacteraceae</i>
<i>Phyllobacterium</i>					<i>Phyllobacteraceae</i>
<i>Agrobacterium</i>					<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Rhizobium</i>					<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Azorhizobium</i>					<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Sinorhizobium/Ensifer</i>					<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Acetobacter</i>			<i>Rhodospirillales</i>		<i>Acetobacteraceae</i>
<i>Gluconacetobacter</i>					<i>Acetobacteraceae</i>
<i>Swaminathania</i>					<i>Acetobacteraceae</i>

## *Revue bibliographique*

---

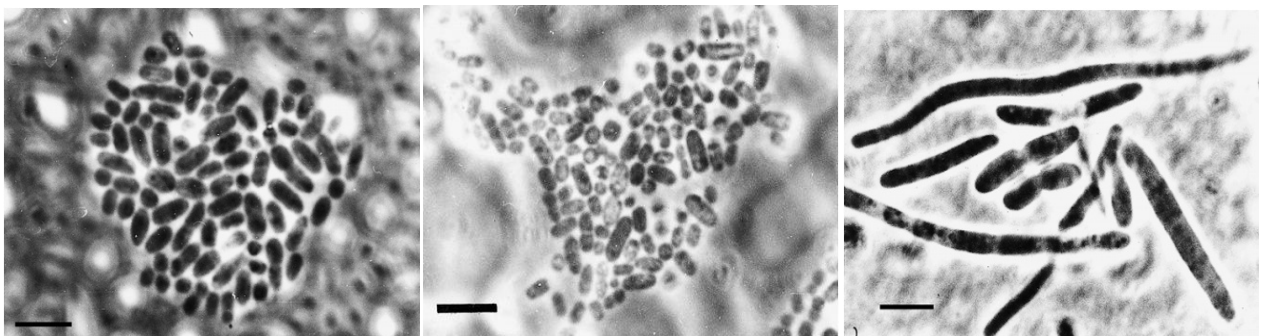
---

<i>Azospirillum</i>			<i>Rhodospirillaceae</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
<i>Alcaligenes</i>			<i>Alcaligenaceae</i>
<i>Burkholderia</i>			<i>Burkholderiaceae</i>
<i>Herbaspirillum</i>			<i>Oxalobacteraceae</i>
<i>Ralstonia</i>			<i>Ralstoniaceae</i>
<i>Chromobacterium</i>		<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>
<i>Azoarcus</i> ”“		<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i> ”
<i>Desulfovibrio</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>
<i>Citrobacter</i>		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Enterobacter</i>			
<i>Erwinia</i>			
<i>Klebsiella</i>			
<i>Kluyvera</i>			
<i>Pantoea</i>			
<i>Serratia</i>			
<i>Pseudomonas</i>		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Azotobacter</i>			
<i>Acinetobacter</i>			<i>Moraxellaceae</i>

---

### 3.3 Le genre *Azotobacter*

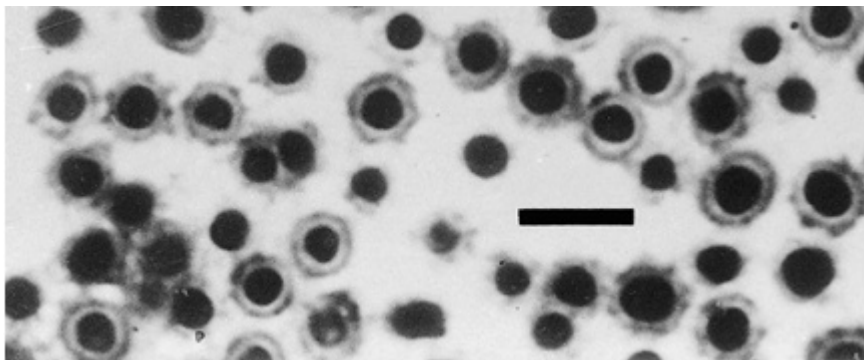
*Azotobacter* est un genre bactérien appartenant à la sous-classe des Gammaproteobacteria. Selon la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", le genre *Azotobacter* est transféré de la famille des *Azotobacteriaceae* à la famille des *Pseudomonadaceae* sur la base des séquences des ADNr 16S. Ce genre comprend sept espèces qui sont : *A. chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. paspali* et *A. salinestrus*, *A. vinelandii*. Ces espèces se distinguent par leurs caractéristiques microscopiques, biochimiques et la production de pigmentation (Tableau 5, 6 et 7)(Brenner *et al.*, 2005).



**Figure 11** : Aspect des cellules de *A. chroococcum*, *A. nigricans* et *A. paspali* (Brenner *et al.*, 2005).

#### 3.2.6. Description du genre

Les *Azotobacter* sont des bactéries aérobies strictes, hétérotrophes et non symbiotique qui fixent l'azote atmosphérique, *Azotobacter paspali* a été la première espèce décrite de ce genre par Dobereiner et Pedrosa, (1975), elle a été isolée à partir de la rhizosphère de *Paspalum notatum*, une herbe tropicale qui possède une grande spécificité d'hôte (Saharan et Nohra, 2011).



**Figure 12** : Aspect des kystes des bactéries du genre *Azotobacter* (Brenner *et al.*,2005).

**Tableau 5 :** Caractéristiques microscopiques des espèces *d'Azotobacter* (Silini, 2013).

	<i>A. chroococcum</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. nigricans</i>	<i>A. armeniacus</i>	<i>A. paspali</i>
Morpholog	Bâtonnets ovales ou cocci	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets long aux extrémités arrondies	Bâtonnetsaux extrémités arrondies
Dimension	3 à 7µmde long 1,5 à 2,3µmde large.	3,2 à 5,3µmde long 1,7 à 2,7µmde large.	3 à 4,5µmde long 1,5 à 2,4 µmde large.	4,1 à 4,9µm de long 1,5 à 2,7µm de large.	5à 5,7µmde long 1,7 à 2 µmde large.	7 à 10,9µm 1,3à 1,7µm Maisdes fois3,2 à 4,2µm
Disposition	En paire	Cellules isolées ou en paires parfois en petite chaînette.	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires

**Tableau 6 :** Quelques Caractéristiques distinctives des espèces *d'Azotobacter* (Brenner *et al.*, 2005).

	<i>A. chroococ cum</i>	<i>A. armeniac us</i>	<i>A. beijerinc kil</i>	<i>A. nigricans</i>	<i>A. paspali</i>	<i>A. salinestris</i>	<i>A. vinelandii</i>
<b>Mobilité</b>	+	+	-	-	+	+	+
Pigment hydrosolubles	<b>Fluorescencevert jaunâtre</b>	-	-	-	+	-	+
	<b>Fluorescenceverte</b>	-	-	-	-	-	d
	<b>Fluorescence marron –noir</b>	-	+	-	d	-	+
	<b>Fluorescence maroron –noire à rouge – violet</b>	-	+	-	+	-	-
	<b>Fluorescence rouge – violet</b>	-	+	-	d	+	-
<b>Réduction des nitrates en nitrite</b>	+	-	+	+	-	+	+
Sources de carbone	<b>D- Glucuronate</b>	-	-	+	-	-	+
	<b>D- Galacturonate</b>	-	+	+	-	-	nd
	<b>Glutarate</b>	-	d	-	-	-	nd
	<b>Glycolate</b>	-	-	-	-	-	nd
	<b>Phenol</b>	-	-	d	-	-	nd
	<b>Rhamnose</b>	-	-	-	-	-	-
	<b>Caproate</b>	+	-	-	-	-	nd
	<b>Caprylate</b>	-	+	-	-	-	nd
	<b>méso-Inositol</b>	-	+	+	-	-	nd
	<b>Malonate</b>	+	-	-	d	-	nd
	<b>Propan-1-ol</b>	-	-	d	d	-	nd
	<b>Tréhalose</b>	+	+	d	+	-	nd
	<b>Amidon</b>	+	+	d	d	-	nd

Les cellules du genre *Azotobacter* sont des bacilles à Gram négatif, ovoïdes et relativement larges (2 à 4 µm, jusqu'à 6 µm) et peuvent prendre plusieurs formes (cocci ou batonnets) non sporulés, mobiles grâce des flagelles multiples. Contrairement au genre *Azomonas*, *Azotobacter* a la capacité de former des cystes en absence de nutriments. Ceux-ci remplis de poly-β-hydroxybutyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux comme source d'énergie. L'enkystement augmente significativement la résistance des *Azotobacter* à la dessiccation et aux actions des agents physiques et chimiques (Brenner *et al.*, 2005).

**Tableau 7 :** Autres caractéristiques des espèces d'*Azotobacter* (Brenner *et al.*,2005).

	<i>A. chroococcum</i>	<i>A. armeniacus</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. nigricans</i>	<i>A. paspali</i>	<i>A. salinestris</i>	<i>A. vinelandii</i>
<b>Flagelles péritriches</b>	+	+	-	-	+	+	+
Fixation d'azote aux pH	5.0 -5.5	-	-	d	d	-	-
	6	-	-	+	d	d	d
	6.5 – 9.5	+	+	+	+	+	+
	10	+	d	+	+	+	-
		+	d	+	+	+	-
Les gènes de fixation d'azote	<b>Nif</b>	+	d	+	+	+	d
	<b>Vnf</b>	+	nd	+	+	+	d
	<b>Anf</b>	-	nd	-	-	+	nd
Températures de croissance	9°C	-	-	d	d	-	-
	14°C	d	-	+	d	+	-
	18°C	+	d	+	+	+	-
	32°C	+	+	+	+	+	d
	37°C	d	d	-	-	+	+
<b>Production de polysaccharides diffusibles</b>	+	d	d	+	-	d	
<b>Peroxydase</b>	d	d	d	d	-	+	
<b>Uréase</b>	+	+	+	+	+	+	
<b>Oxydase</b>	+	d	+	+	+	nd	

H <sub>2</sub> S à partir de	<b>Thiosulfate</b>	d	-	d	d	+	nd	+
	<b>Cysteine</b>	-	-	-	-	d	nd	d
	<b>Fructose, glucose, acetate, pyruvate, fumarate, malate, succinate, α-oxoglutarate, lactate, DL-gluconate, ou acetylmethylcarbinol.</b>	+	+	+	+	+	+	+
	<b>lactose, mannose, xylose, arabinose, ribose et fucose</b>	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Sucrose</b>	+	d	+	+	+	+	+
Utilisation comme seul source de carbone	<b>Propionate</b>	+	d	+	-	-	nd	+
	<b>β- phenylpropionate</b>	d	-	-	-	-	nd	+
	<b>n-Butyrate</b>	+	+	+	d	-	nd	+
	<b>Glutarate</b>	-	d	-	-	-	nd	+
	<b>DL-β- Hydroxybuterate</b>	d	+	+	d	-	nd	d
	<b>Benzoate</b>	d	-	+	-	-	+	+
	<b>Trehalose</b>	d	+	d	+	-	nd	-
	<b>Melibiose</b>	+	+	+	d	-	+	+
	<b>Maltose</b>	+	+	d	d	-	nd	+
	<b>Raffinose</b>	+	d	d	d	-	nd	d
	<b>Propane-1-ol</b>	d	-	d	d	d	nd	+
	<b>Butan-1-ol</b>	+	d	+	d	-	nd	+
	<b>Glycerol</b>	d	-	d	-	-	-	+
	<b>Manitol</b>	+	+	d	d	-	nd	+
	<b>Sorbitol</b>	+	+	d	d	-	nd	+
	<b>Sterptomycine 0.2 µg/ml</b>	S	S	S	S	S	S	S
	<b>Tetracycline 2µg/ml</b>	d	R	d	d	R	nd	d
	<b>Chloramphenicol 25µg/ ml</b>	d	d	d	R	d	nd	R
	<b>Sulfanilamide 25µg/ml</b>	d	R	d	d	S	nd	d
	<b>Pénicilline G 5U/ml</b>	d	S	d	R	R	nd	d
<b>Phenol, 0.05%</b>	R	S	d	d	d	nd	R	
<b>Sodium Benzoate, 0.5%</b>	d	R	d	R	d	nd	R	
<b>Sodium fluoride, 0.01M</b>	d	R	R	d	R	nd	R	
<b>Chlorure de Mercure e 10µg/ml</b>	d	R	d	d	R	nd	d	
<b>Iodoacetate, 1mM</b>	S	S	S	S	S	nd	S	
<b>Erythromycine, 2µg/ml</b>	S	R	d	R	d	nd	R	
<b>Néomycine ou kanamycine 1µg/ml</b>	S	S	S	S	S	S	S	

S, susceptible; R, résistante; nd, non déterminé. d, diffère suivant les souches.

### **3.2.7. Habitat et écologie du genre**

Les *Azotobacter* sont ubiquitaires et peuvent être isolés de l'eau et du sol où ils vivent librement. Cependant, ils sont beaucoup plus nombreux au voisinage des racelles. Bien qu'ils n'en soient pas dépendants, ils sont plus abondants près des racines et dans la rhizosphère qu'ailleurs dans le sol (Brenner *et al.*, 2005)..

Les *Azotobacter* préfèrent les sols neutres ou légèrement alcalins, bien oxygénés et moyennement humides. Ces bactéries fixent mieux l'azote atmosphérique dans les sols où les apports d'azote minéral sont réduits. Elles peuvent fixer au moins 10µg d'azote/g de glucose consommé. La fixation nécessite les ions molybdène (Brenner *et al.*, 2005).

Ces bactéries exigent néanmoins des apports organiques importants probablement comme source de carbone. Il semblerait que ces bactéries aient d'importantes facultés à utiliser les apports minéraux sous forme insoluble qu'il s'agisse de phosphates ou de nitrates (Saharan *et Nohra*, 2011).

### **4.2.1. Importance du genre *Azotobacter***

Les bactéries du genre *Azotobacter*, en plus d'être des diazotrophes, jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. *Azotobacter* étant qualifié de PGPR synthétise des substances biologiquement actives telles que les sédirophores et les phytohormones (les auxines) stimulant ainsi la croissance des plantes (Ahmed *et al.*, 2005). Ils facilitent également la solubilité de certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration des sols (Rajae *et al.*, 2007).

L'inoculation du riz par les *Azotobacter* permet une amélioration significative des rendements avec des augmentations atteignant les 20%. Elle permet, aussi, d'augmenter la contenance en azote des plantes jusqu'à plus de 15 kg/ ha (Saharan *et Nohra*, 2011).

Il a été prouvé que le genre *Azotobacter* affecte positivement la germination des graines et leur développement et que l'inoculation des cultures de blé par ce genre augmente le rendement de 30%. Aussi, l'inoculation par ces bactéries permet une réduction de plus de 50% sur les engrais azotés (urée) appliqués aux cultures de blé réalisées sous conditions contrôlées sous serre (Kennedy *et al.*, 2004).

L'inoculation par *Azotobacter* permet une amélioration de 15% à 28% du rendement du Coton. Ceci est attribué à la fixation biologique de l'azote, la production de sidérophores, de phytohormones, ainsi qu'à la production de molécules antibactériennes et antifongiques (Kennedy *et al.*, 2004).

### 1. Objectif

L'objectif de ce travail est la caractérisation de l'effet des sols des régions de Sidi Bel Abbes et Ain Témouchent sur la croissance et le développement du pois chiche, d'isoler des bactéries diazotrophes PGPR à partir de la rhizosphère des plantes de pois chiche cultivées sur ces sols, de caractériser les activités de promotion de la croissance végétative des isolats ainsi que leur effet antagoniste vis à vis d'un champignon phytopathogène modèle : *Fusarium oxysporum* agent de la fusariose chez le pois chiche, d'évaluer leur pouvoir de promotion sur la germination du pois chiche, d'en identifier les candidats les plus performants. Et enfin, d'évaluer l'effet biofertilisant et biopesticide de la souche la plus performante.

### 2. Isolats bactériens et souche fongique

Les isolats ayant fait l'objet de l'étude bactériologique proviennent du sol rhizosphérique des plantes de pois chiche, âgé de 3 mois, récolté lors de l'étude des effets des sols et des variétés sur le développement des plantes de pois chiche.

L'agent phytopathogène *Fusarium oxysporum* provient du laboratoire de l'unité de recherche INRA, les souches fongiques ont été fournies sous une forme de cultures sur milieu PDA (Annexe 1) en boîtes de pétri (Figure 13).



**Figure 13 :** Aspect macroscopique de culture de *Fusarium oxysporum* sur milieu de culture PDA.

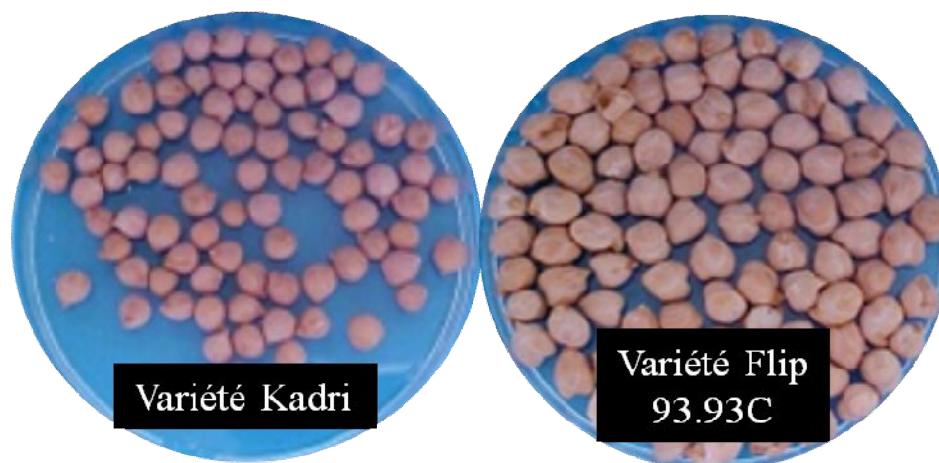


### 3. Matériel végétal utilisé

Les graines de deux variétés de pois chiches sont utilisées au cours de cette étude:

- La variété ( $V_1$ ) : Kadri.
- La variété ( $V_2$ ): Flip 93.93 C.

Ces variétés de pois chiche sont gracieusement fournies par le laboratoire de l'unité de recherche INRAA de Sidi Bel Abbes (**Figure 14**).



**Figure 14:**Présentation d' Aspect des variétés de pois chiche utilisées(*Cicer arietinum.L*).

### 4. Sols

Les sols utilisés proviennent de six différents sites situés dans la région Nord-Ouest de l'Algérie (**Figure 15**). Ces sites correspondent à des localités où les légumineuses sont couramment cultivées :

- $S_1$  : Ain Témouchent ;
- $S_2$  : Lamtar
- $S_3$  : Tessala
- $S_4$  : El Malah
- $S_5$  : Ain Tolba
- $S_6$  : Kaid Belarbi

La quantité de sol collectée de trois différents est de 110 Kg et le transfert vers l'unité INRAA de Sidi Bel Abbès est effectué dans des sachets en plastique d'une capacité de 25 Kg.



**Figure 15 :** Localisation géographique des sites de prélèvement des sols  
(Source : Google Maps 2015).

## **5. Analyse des sols**

L'analyse du sol représente une étape importante dans la détermination des caractéristiques édaphiques relatives à chaque site de collecte (voir Annexe 2).

### **5.1. Analyse granulométrique (méthode à la pipette de Robinson)**

L'analyse granulométrique (Annexe 2.A) permet de connaître, sous une forme pondérale, la répartition des particules minérales de moins de 2 mm de diamètre selon des classes de grosseur. L'analyse granulométrique est une opération qui nécessite la dissociation complète des particules de l'échantillon du sol et fondue sur la relation existante entre la taille des particules et les propriétés physiques de la suspension du sol. En effet, selon la loi de stock, la particule grosse tombe vite dans l'eau. Les particules de diamètre inférieur à 50  $\mu\text{m}$ , des prélèvements à différents intervalles de temps ont permis la récupération des particules restant en solution (Pansu et Gautheyrou 2003). Les fractions des particules de diamètre supérieur à 50  $\mu\text{m}$  sont déterminées par tamissage, après lavage des fractions fines déterminées par sédimentation (Pansu et Gautheyrou, 2003).

## 5.2. Mesure du pH

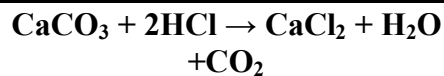
Du point de vue agronomique le pH est un indicateur de l'état de fertilité du sol et fournit des informations sur l'activité microbienne du sol, la présence de certains sels toxiques et le degré d'assimilabilité des éléments par les plantes (Pansu et Gautheyrou, 2003). Le classement des sols par rapport à leurs pH est déterminé selon les normes internationales (Annexe 3.A).

## 5.3. Mesure de la conductivité électrique

La mesure de la conductivité d'un sol renseigne sur sa salinité. Le principe de la méthodologie adopté (Annexe 2.E) consiste à déterminer la conductivité électrique d'une solution du sol au 1/10 (m/v). Les normes de salinité sont mentionnées dans l'Annexe 4.B.

## 5.4. Dosage du calcaire total

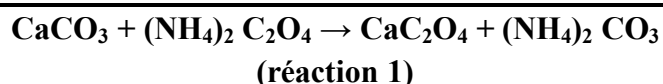
Le principe de la méthode de détermination du calcaire total (Annexe 2.B) repose sur la capacité de l'acide chlorhydrique à détruire le calcaire en générant du CO<sub>2</sub> selon la réaction suivante:



Le volume de CO<sub>2</sub> mesuré sous conditions contrôlées de température et de pression est proportionnel à la quantité de calcaire total renfermée dans l'échantillon de sol.

## 5.5. Dosage du calcaire actif

Le taux de calcaire actif est déterminé par titration selon la méthode de Loeppert et Suarez, (1996) (Annexe 2.C). Le principe de cette méthode repose sur la capacité du calcium à interagir avec l'oxalate d'ammonium (réaction 1) afin de donner de l'oxalate de calcium insoluble.



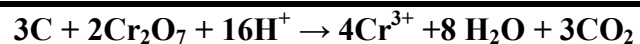
A la fin de la réaction l'excès d'oxalate d'ammonium est titré par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique.

## 5.6. Dosage du carbone et détermination du taux de la matière organique

### a- Dosage du carbone

Le carbone est déterminé par la méthode d'Anne, (1945) (Annexe 2.D), qui nécessite deux étapes principales : l'oxydation et la titration.

-L'oxydation: lors de cette étape, le carbone organique est oxydé en présence d'un excès de bichromate et la réaction est réalisée dans un milieu fortement acidifié par l'utilisation de l'acide sulfurique.



La quantité de bichromate réduite est proportionnelle à la quantité de carbone contenue dans l'échantillon de sol.

Dans la deuxième étape, la titration, l'excès de bichromate non réduit est titré par un agent réducteur, le sel de Mohr. La titration est réalisée en présence d'agent fixant, le fluorure de sodium, et d'un indicateur coloré du pH.

### b- Détermination du taux de matière organique

La matière organique joue un rôle important dans la détermination des propriétés du sol. Sa détermination passe par la détermination du carbone organique. On estime que le rapport matière organique/carbone est à peu près constant et égal à  $\text{MO/C} = 1.72$ .

## 5.7. Dosage de l'azote

La détermination de l'azote totale des échantillons de sol prélevés a été effectuée par la méthode de Kjeldahl, (1883). Cette méthode se déroule en deux étapes :

-La minéralisation : elle consiste à la transformation de l'azote organique en une forme minérale (des sulfates d'ammonium). La réaction est réalisée dans un milieu à forte concentration en acide sulfurique et en présence d'un catalyseur, le  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , qui permet l'augmentation et la stabilisation de la température de la réaction (Pansu et Gautheyrou, 2003).

-Lors de la deuxième étape, la titration, le milieu réactionnel est alcalinisé par l'addition de l'hydroxyde de sodium, la solution obtenue est distillée et l'ammonium entraîné par la vapeur est condensé puis collecté dans une solution d'acide borique additionnée de quelques goutte d'un indicateur coloré. La solution résultante est, enfin, titrée par une solution d'acide sulfurique (Pansu et Gautheyrou, 2003).

### **5.8. Dosage du phosphore**

La détermination du phosphore a été réalisée par la méthode d'Olsen, (1982). Dans le sol, le phosphore assimilable se trouve essentiellement sous forme de phosphate de calcium. Les phosphates de calcium sont extraits par une solution d'acide à faible concentration. En milieux acides, les phosphates donnent de l'acide phosphorique. Ce dernier, en présence de molybdate d'ammonium et en milieu acide, forme des complexes phospho - molybdiques.

Ces complexes ont la propriété d'être réduites par une solution de chlorure stanneux ; ils sont alors transformés en bleu de molybdène. En mesurant l'intensité de la coloration et en se référant à une courbe étalon, la concentration en acide phosphorique est déterminée.

## **6. Etude des effets des sols et des variétés sur le développement du pois chiche**

L'objectif de cette étude est évaluation de l'effet des facteurs sol et variété sur le développement du pois chiche.

### **6.1. Préparation des traitements et semi**

L'étude réalisée est portée sur six sols et deux variétés de pois chiche. Le sol bien homogénéisé est reparti dans des pots de 18 cm de diamètre, 25 cm de hauteur et d'une capacité de 2 Kg (**Figure 16**). Aucun type de fertilisation n'est appliqué aux différents traitements (sols). Les six traitements (sols) sont appliqués aux deux variétés de pois chiche : Kadri et Flip 93.93 C, et trois répétitions ont été réalisés pour chaque variété et chaque sol.



**Figure 16 :** Organisation des pots au niveau de la serre (condition non contrôlées).

Les graines sont préalablement stérilisées à l'hypochlorite de sodium à 13° puis rincées 10 fois à l'eau distillée stérile. Le semis est effectué à une profondeur de 2 cm à raison de 8 graines/pots. L'irrigation est réalisée régulièrement. Un désherbage manuel est procédé toutes les semaines.

### 6.2. Récolte et analyses statistiques

La récolte est réalisée 3 mois après le semis. Les plantes, au stade de formation de gousses, sont servies pour la mesure des paramètres suivants : poids sec, hauteur et poids des nodules. L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du logiciel STATITCF. Le seuil de probabilité utilisé est  $P < 0.05$ . Pour les effets significatifs, les moyennes sont comparées par le test de Newman & Keuls.

## 7. Isolement des PGPR Diazotrophes associés au pois chiche

### 7.1. Prélèvement et Echantillonnage

Les échantillons de sol sont prélevés à partir de la rhizosphère des cultures de pois chiche (**Figure 16**) à une profondeur de 15cm. Une pesée de 1 gramme des sols rhizosphérique est prélevée à partir du sol de Ain Tolba. Les prélèvements sont utilisés pour l'échantillonnage.

### 7.2. Isolement et purification des bactéries diazotrophes

L'isolement des bactéries diazotrophes du sol rhizosphérique est effectué par la méthode des suspensions-dilutions décrite par *Vidhyasekaran et al. (1997)*. Les racines sont d'abord débarrassées de la terre facilement détachable, ensuite de chaque échantillon est récupéré 1 g du sol adhérant aux racines. Les échantillons sont suspendus dans un volume de 9 ml d'eau physiologique stérile, agités pendant 15 mn, pour la récupération des bactéries rhizosphériques. Une série de suspensions-dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  est réalisée à partir de chaque échantillon. Les dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  sont préparées pour obtenir un inoculum avec une population bactérienne moyenne. Un volume de 0.1 ml des dilutions  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  est étalé sur des boites de Pétri contenant un volume de 10ml du milieu de culture de N-free (**Annexe1**), incubé à une température de 30°C pendant 24h. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. Les colonies retenues sont ensuite repiquées 4 fois par stries d'épuisements sur gélose Norris N-free (*Norris, 1959*).

### 7.3. Conservation des souches

Les colonies isolées sont conservées dans des tubes à essai inclinés contenant le milieu de culture gélosé de Norris-free. Les souches isolées sont ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Les tubes manifestant une croissance sont conservés à une température de 4°C pendant une durée de 4 à 6 semaines. Les souches isolées sont conservées dans un bouillon nutritif glycérolé à une concentration 20 % à une température de -20°C pour une longue durée (environ 1 an).

## 8. Caractérisation des isolats

### 8.1. Examen macroscopique

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

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

### 8.2. Aspect microscopique

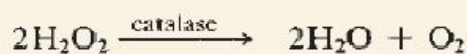
- Observation microscopique à l'état fixé :

La Coloration de Gram permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté et la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

La coloration de Gram et l'observation microscopique permet de distinguer deux grands bactériens : Les bactéries à Gram positif se colorent en violet et les bactéries à Gram négatif apparaissent roses (Marchalet Bourdon, 1982).

### 8.3. Test de catalase

La catalase est un enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Une réaction positive de la présence du catalase se manifeste par la production des bulles d'oxygène immédiat, après l'ajout d'une goutte de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes) à une colonie prélevée à partir du milieu solide sur une lame.

### 8.4. Test de mobilité des isolats

Le milieu mannitol mobilité (**Annexe1**) est une gélose molle conditionnée en tubes permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. Après incubation à une température de 30°C pendant 24 heures, la fermentation du mannitol se traduit par le virage de la couleur du milieu de culture et la mobilité des bactéries testées se manifeste par l'apparition des diffusions à partir de la ligne d'ensemencement.

## 9. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance

### 9.1. Screening des isolats pour la solubilisation du phosphate

La capacité des souches isolées à solubiliser le tricalcium phosphate Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> est mise en évidence selon la méthode décrite par Nautiyal (1999). Les bactéries isolées sélectionnées sont ajustées à une population bactérienne 0.5 Mc Farland, inoculées en spots (10µl) sur le milieu de culture solide de Pikovskaya (Pikovskaya,1948) (**Annexe1**) et incubées à une température de 30°C pendant 7 jours. Les bactéries solubilisant du tricalcium phosphate se manifestent par la formation d'un halo clair autour des colonies. Le taux de solubilisation est évalué par l'indice de solubilisation. La mesure de l'index de solubilisation (Sitepu *et al.*, 2007) est effectuée selon la formule suivante :

$$SI = \frac{(\text{le diamètre de la colonie} + \text{le diamètre de la zone claire})}{(\text{le diamètre de la colonie})}$$

### 9.2. Production d'acide indole acétique

#### 9.2.1. Choix de la composition du réactif de Salkowski et préparation de la courbe étalon

Devant la variété des compositions du réactif de Salkowski (**Tableau 8**) rapportée dans la littérature, un test des combinaisons de différentes variantes du réactif en présence d'une concentration connue d'acide indole acétique est mis en évidence.



**Tableau 8.** Les différentes compositions du réactif de Salkowski testées.

Réactif	Composition	Utilisation d'acide Orthophosphorique	Référence
<b>Réactif 1</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :429ml. FeCl <sub>3</sub> : 12g Eau distillée qsp 1000ml	Non	<i>Gutierrez et al., 2009</i>
<b>Réactif 2</b>	Acide perchlorique (35%) : 49 ml FeCl <sub>3</sub> (0.5 M) : 1.0 ml	2 gouttes	<i>Ngoma et al., 2013</i>
		Non	<i>Torres et al., 2000</i>

Les concentrations utilisées sont de l'ordre de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml et 5 µg/ml. Les concentrations sont préparées à partir de la solution-mère d'AIA à 125 µg/ml. Les solutions des différentes concentrations ont été réparties dans des tubes à essai d'un volume de 25 ml à raison de 1 ml/tube et les réactifs de révélation sont ajoutés avec une proportion 2 :1 (v:v). Les mélanges obtenus sont incubés à l'obscurité pendant 30 min et une comparaison de l'intensité de la coloration obtenue est réalisée. Le réactif chromogène est adopté pour l'établissement d'une courbe étalonnage.

### 9.2.2. Screening des isolats pour la production d'acide indole acétique

Le screening primaire des souches isolées sélectionnées productrices d'acide indole acétique est réalisé selon la méthode décrite par *Bric et al., (1991)* avec quelques modifications. Le milieu de culture solide de Luria-Bertani (**Annexe 1**) enrichi en présence et en absence du L-tryptophane (1g/l), additionné d'une concentration de 1% de glucose est utilisé pour l'identification des isolats producteurs de AIA ou des substances apparentées. Les bactéries isolées sont ensemencées en spots (10µl) sur le milieu de culture solide et un papier Whatman (No.1) stérilisé d'un diamètre de 9 cm est déposé sur la surface de la gélose, incubées en position inversée à une température de 30°C, pendant un intervalle de temps jusqu'à l'apparition des colonies d'un diamètre de 2 mm. Ensuite, le papier Whatman est prélevé et immergé dans le réactif de Salkowski (12gl<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub> dans un volume de 429ml<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), incubé à l'obscurité pendant 30 min. Les bactéries productrices de l'AIA sont caractérisées par la formation d'un halo rouge.

### 9.2.3. Quantification de la production d'acide indolo-acétique

La production de l'AIA est évaluée, selon la technique rapporté par [Acuña et al., \(2011\)](#), sur milieu Luria-Bertani liquide additonné de glucose à 1% en présence et en absence du L-tryptophane (1g/l) ([Annexe 2](#)). Le milieu de culture dilué à 1/10<sup>ème</sup> est inoculé avec un volume de 100 µl d'une suspension bactérienne d'une pré-culture bactérienne âgée de 24 heures, ajustée à 0.5 Mc Farland. Les tubes sont incubés à une température de 30°C pendant 72h. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 10min. Un volume de 2 ml du réactif de Salkowski (12g<sup>l</sup><sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub> dans 429ml<sup>l</sup><sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajouté à un volume de 1ml du surnageant. Le mélange est incubé pendant 30 mn. La lecture est effectuée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 535 nm. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

### 9.3. Recherche de l'activité protéolytique

L'hydrolyse de la caséine est mise en évidence sur un milieu de culture gélosé contenant une concentration de 5% de lait écrémé ([Annexe1](#)). La biomasse des isolats sélectionnés est ajustée à 0.5 Mc Farland, déposés en spots (10µl) sur la surface du milieu de culture gélosé et incubé à une température de 30°C pendant 48 heures. La présence d'une activité protéolytique se manifeste par la formation d'un halo clair autour de la colonie ensemencée ([De Voset al., 2009](#)).

### 9.4. Effet antagoniste anti *Fusarium*

L'étude de l'activité antifongique des 12 isolats sélectionnés vis-à-vis de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris* est mise en évidence par la méthode de confrontation par contact direct ([Gerbardo et al., 2012](#)). Un fragment mycélien d'un diamètre de 5 mm de phytopathogène, d'une pré-culture âgée de 7 jours est prélevé, est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant un volume de 20 ml de milieu de culture PDA ([Annexe 1](#)). Les cultures bactériennes ajustées à 0.5 Mc Farland, sont inoculées à 1 cm du bord de la boîte et à une distance de 3 cm du mycélium fongique. La boîte de Pétri contenant le milieu de culture PDA inoculée avec le fragment mycélien est utilisée comme témoin. Les boîtes sont incubées à température de 30°C jusqu'à l'envahissement de la surface du milieu de culture par le mycélium fongique. La croissance radiale du phytopathogène est mesurée et le taux d'inhibition est calculé par l'utilisation de la formule de [Sgroy et al., \(2009\)](#) comme suit:

$$I = (C - T) / C \times 100$$

**I** : le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, **C** : diamètre du mycélium dans la boîte contrôle (mm), **T** : diamètre du mycélium en présence de la bactérie (mm).

### **9.5. Screening des isolats pour la production d'acide cyanhydrique**

La capacité des isolats à produire l'acide cyanhydrique est vérifiée selon la méthode de [Lorck, \(1948\)](#). Ainsi, chaque isolat a été inoculé, à l'aide d'une anse, sur une boîte de pétri contenant le milieu gélose nutritive ([Annexe1](#)) additionné de 4.4 g/l de glycine. Un papier filtre stérile trempé dans 2 ml d'une solution stérile contenant 0,5 % d'acide picrique et 2% de carbonate sodium a été aseptiquement déposé dans les couvercles des boîtes de Pétrie. Les boîtes de pétri ont été scellées avec du papier parafilm et incubées à 30°C pendant 7 jours. Le potentiel de la production de l'HCN a été évalué comme suit ([Meliani, 2012](#)) :

- (1) Absence de changement de couleur: pas de production de HCN.
- (2) Une coloration brunâtre : une faible production de l'HCN.
- (3) Une coloration brune à orange : une production modérée de l'HCN.
- (4) Une coloration orange foncée: une forte production de l'HCN.

### **9.6. Recherche de la Chitinase**

#### **9.6.1. Préparation de la chitine colloïdale**

La chitine colloïdale est préparée à partir de la chitine commerciale par la méthode décrite par [Murthy et Bleakley, \(2012\)](#). Dans un bécher de 1L de capacité, une pesée de 20 g de chitine commerciale est traitée avec un volume de 150 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl 12M), ajouté lentement avec agitation pendant 5min. Le mélange est soumis à une agitation pendant 1 heure à des intervalles de temps de 5 min, filtré à travers 8 couches de filtre à café en plastique. Le filtrat obtenu est traité avec un volume de 2 L d'eau glaciale, afin de permettre une meilleure précipitation de la chitine colloïdale. La préparation est incubée à une température 4°C pendant 24h, filtrée à travers 2 couches de filtre à café en papier. La pâte de chitine colloïdale obtenue est rincée avec de l'eau de robinet jusqu'à neutralisation de son pH. Afin d'éliminer l'excès d'humidité, la chitine colloïdale est pressée entre plusieurs couches de filtres à café en papier. La chitine est conditionnée dans un récipient en

verre, stérilisée dans un autoclave à 120°C pendant 20 min et conservée à une température de 4°C.

### **9.6.2. Screening des souches productrices de la Chitinase**

Ce test est réalisé sur une gélose « chitine colloïdale agar » (**Annexe1**) selon la technique décrite par **Murthy et Bleakley, (2012)**. La biomasse des bactéries isolées est ajustée à 0.5 Mc Farland, déposée en spots (10µl) sur un milieu de culture solide et incubée à une température de 30°C pendant 7 jours. La présence des bactéries productrices de chitinase se manifeste par la formation d'un halo clair autour des colonies. Le test est réalisé en triplicata.

### **9.7. Test de Cellulase**

La production de cellulase est évaluée sur milieu de culture «Cellulose» (**Ahmadzadeh et Tehrani, 2009**). Un morceau de papier filtre stérile de 9 cm x 1cm est introduit dans un tube à essai contenant un volume de 10 ml de la solution de cellulose. Les tubes inoculés avec un volume de 100 µl d'une pré-culture ajustée à 0.5 Mc Farland sont incubés à une température de 30°C pendant 4 semaines. Le contrôle est effectué sur un milieu de culture cellulose vierge avec une bande en papier. Une lecture positive de la dégradation de la cellulose de papier se manifeste par l'apparition des troubles. La production de la biomasse bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### **9.8. Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du pois chiche**

Dans le but d'explorer l'effet des souches bactériennes sur la germination des graines du pois chiche, un essai d'appréciation est effectué. Les graines de pois chiche sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 18° pendant 5 minutes, rincées 8 fois avec l'eau distillée stérile.

Les suspensions bactériennes préparées à partir des pré-cultures sur milieu de culture de N-free âgées de 24h, sontensemencées dans des flacons de 250 ml contenant un volume de 50 ml de milieu de culture. Ensuite, la biomasse bactérienne est ajustée à 0.5 Mc Farland. Les graines de pois chiche sont introduites dans les flacons contenant l'inoculum bactérien, incubées pendant 30 min. Par ailleurs, Les graines trempées dans le milieu stérile sont utilisées comme témoin négatif. Les graines sont déposées dans des boîtes de Pétri d'un diamètre de 9 cm contenant un papier filtre imbibé avec

de l'eau distillée stérilisée. Chaque boîte recevant 5 graines, 4 répétitions du test sont réalisées et le test est lancé dix jours.

L'effet des isolats bactériens sur la germination des graines du pois chiche est évalué par le calcul des paramètres suivants: pourcentage de germination, la longueur de la radicelle, la longueur de la tige et l'index de vigueur. L'analyse statistique des résultats est effectuée par le logiciel STATITCF. Le seuil de probabilité utilisé est  $P < 0.05$ . Les moyennes sont comparées par le test de Newman & Keuls.

### **10. Identification phénotypique des candidats les plus performants**

#### **10.1. Coloration de Gram et Coloration des spores**

La coloration de Gram est effectuée pour l'étude de l'aspect microscopique des formes des bactéries après une incubation prolongée (plus de 5 jours à une température de 30°C).

La coloration des spores est réalisée afin d'apporter plus de précision à l'identification. La sporulation survient chez les bactéries sporo-formants, lorsque les conditions du milieu de culture deviennent défavorables. Le test consiste à déposer une colonie bactérienne sur une lame propre. Ensuite, le frottis est fixé à la chaleur, recouvert avec une solution aqueuse de vert de Malachite à une concentration de 5%, soumis à une agitation sur une plaque chauffante pendant 15 min à partir de l'émission de vapeur. Le frottis est ensuite lavé avec de l'eau courante, coloré avec une solution aqueuse de la Fuschine concentrée à 5% pendant 5 min, rincé, séché et observé au microscope photonique. Les spores apparaissent colorées en vert, les bactéries non sporulées sont colorées en rouge-rosé.

#### **10.2. Test d'oxydase**

La recherche de l'oxydase est utilisée pour l'identification des bactéries à Gram négatif et permet la mise en évidence de l'oxydation de la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées rose-violacées.

Le test consiste à étaler une colonie sur une bande imprégnée de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempée dans de l'eau distillée stérile. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rose violacée au bout de 30 secondes.

### **10.3. Mise en évidence du type respiratoire**

La détermination de type respiratoire des bactéries est effectuée sur milieu de culture Viande-Foie (VF). Dans des tubes à essai stériles, le milieu en surfusion est ensemencé aseptiquement par un volume 0.1 ml d'une pré-culture âgée 24 heures, ajustée à 0.5 du standard Mc Farland. Les tubes sont ensuite incubés à une température de 30°C pendant 24 heures. La lecture est effectuée par observation de l'apparition des troubles de la croissance bactérienne.

### **10.4. Identification biochimique par la galerie Api 20E**

Les 4 souches isolées sélectionnées d'important potentiel de promotion de la croissance des plantes *in vitro* et *in vivo* ont fait l'objet d'une identification phénotypique. Les galeries de test API sont préparées conformément aux instructions du fabricant (bioMérieux, France) pour la culture bactérienne des souches retenues :

Le fond et le couvercle des boîtes d'incubation sont réunis, un volume de 5 ml d'eau distillée stérile sont réparties dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide et les galeries sont placées dans les boîtes d'incubation. Des colonies bactériennes de chaque isolat ont été diluées dans une solution de NaCl 0.9%. L'inoculum est ajusté à une concentration cellulaire de  $10^8$  UFC/ml, qui correspond à un standard de 0.5 de Mc Farland, par mesure de la densité optique ajustée à 0.1 à une longueur d'onde de 600 nm. Les suspensions bactériennes sont introduites dans les tubes de la galerie à l'aide d'une micropipette en évitant la formation de bulles au fond des tubes. Les tubes et cupules sont remplis pour la réalisation des tests CIT, VP et GEL. Pour les autres tests, seuls les tubes sont remplis. Les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE nécessitent l'ajout d'huile de paraffine dans leurs cupules afin de créer une anaérobiose. Les galeries ainsi inoculées sont incubées à une température de 29°C pendant 18h- 24heures.

La lecture des résultats s'effectue en se rapportant au guide d'utilisation, soit directement en notant le changement de l'aspect de la cupule (couleur) ou indirectement en utilisant les réactifs de révélation (VP, NIT1 et NIT2, JAMES...). Les résultats de chaque galerie sont reportées sur les fiches d'identification sous forme de signes (+) pour les tests positifs et (-) pour les tests négatifs. Les résultats obtenus et l'identification des souches isolées sélectionnées sont interprétés en

s'appuyant sur les caractéristiques des isolats par l'utilisation du Bergey's manual of systematic bacteriology (Brenner *et al.*, 2005).

### **11. Mise en évidence de l'effet biofertilisant et biopesticide de la souche NfA**

Dans le but d'évaluer l'effet de la souche isolée sélectionnée NfA sur le développement et la résistance des graines du pois chiche aux phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, un essai de culture comportant quatre traitements est effectué :

- T<sub>1</sub>: culture des graines de pois chiche sans inoculation (Témoin négatif).
- T<sub>2</sub>: culture des graines de pois chiche inoculées avec la souche NfA.
- T<sub>3</sub>: culture des graines de pois chiche inoculées avec le phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*.
- T<sub>4</sub>: culture des graines de pois chiche inoculées avec la souche NfA et le phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris* (Témoin positif).

La réalisation des quatre traitements est procédée de la manière suivante :

Les graines de pois chiche sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 18° pendant 2 minutes, rincées 8 fois à l'eau distillée stérile et sont déposées dans des boîtes de Pétri d'un diamètre 9cm, contenant un papier filtre imbibé d'eau distillée stérilisée, soumises à une germination à une température de 25°C, à l'obscurité pendant 7jours. Les suspensions bactériennes préparées à partir des cultures sur milieu de culture N-free âgées de 24 heures sont inoculées dans des flacons de 250 ml contenant un volume 50 ml de milieu de culture avec une biomasse bactérienne ajustée à 0.5 Mc Farland. La suspension fongique préparée à partir des cultures sur un milieu de culture de PDA de *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris* est inoculée en grattant avec une pipette pasteur stérile en râteau la surface du mycélium fongique, les spores sont collectées par remplissage des boîtes de pétri avec de l'eau distillée stérile, récupérées ensuite dans des béchers stériles. La concentration des spores est ajustée à 10<sup>6</sup> spores/ml après comptage à l'aide de la cellule Malassez. Les graines de pois chiche sont trempées ensuite dans les flacons contenant les inoculations bactériennes ou fongiques pendant 30 min.

Le traitement comportant une double inoculation avec la souche fongique et la souche bactérienne, les graines de pois chiche sont trempées d'abord dans la suspension bactérienne puis dans la suspension fongique. Le semis des graines traitées est

effectué dans un mélange stérile de sol et de sable (1/3 sol+ 2/3 sable) humide dans des pots en plastique. Ensuite, chaque pot a reçu 4 graines et l'essai est réalisé en 4 répétitions. L'évaluation des résultats est effectuée après un mois du lancement du test par mesure des paramètres suivants : pourcentage de germination, la longueur de la racicelle, la longueur de la tige, la mesure du pois sec et du poids frais des parties racinaires et aériennes et le calcul de l'indice de vigueur (IV).

$$IV (\%) = (\text{longueur moyenne de la partie racinaire} + \text{longueur moyenne de la partie aérienne}) \times \text{le taux de germination } \%$$

L'analyse statistique des résultats est réalisée par l'utilisation du logiciel STATITCF. Le seuil de probabilité utilisé est de l'ordre de  $P < 0.05$ . Afin d'évaluer les effets significatifs, les moyennes sont comparées par le test de Newman & Keuls.



## 1. Analyse du sol

Les résultats des analyses physico-chimiques sur les différents échantillons de sols sont illustrées le **Tableau 9**. L'interprétation des résultats est procédée selon les normes présentées dans **l'Annexe 3**:

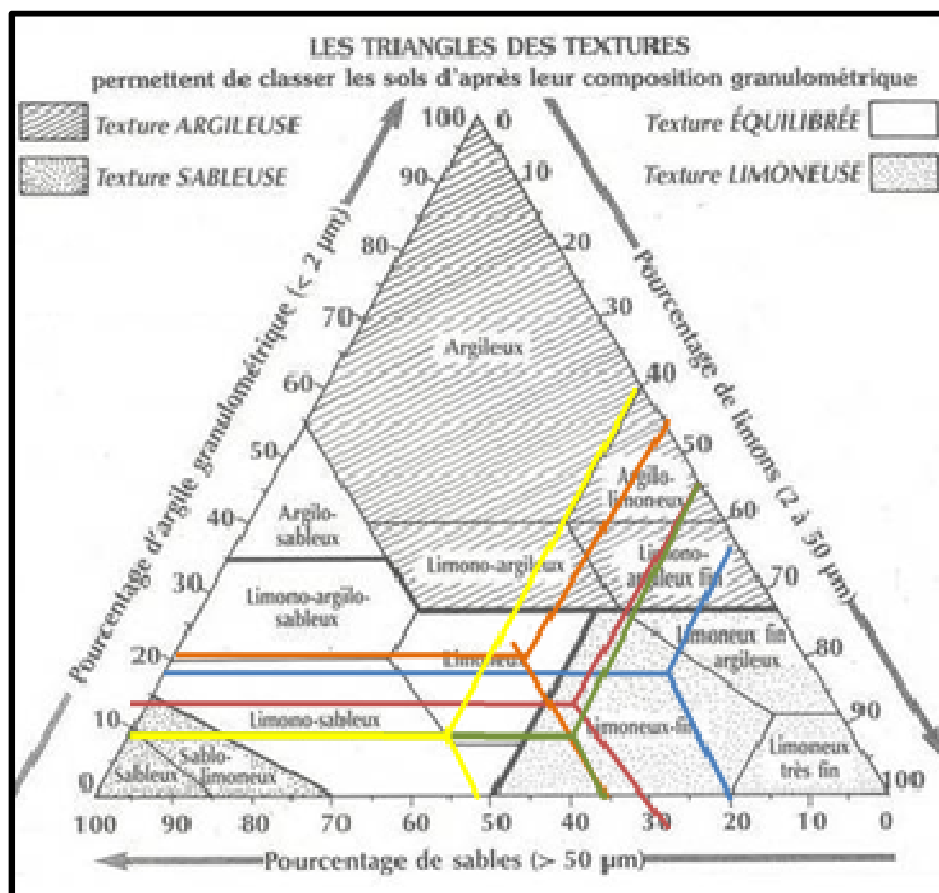
**Tableau 9** : Résultats des analyses physico-chimiques des différents échantillons de sols.

Site	willaya	pH	CE $\mu\text{s/m}$	Ca CO <sub>3</sub> %	Ca CO <sub>3</sub> actif %	M.O%	C%	N g/Kg	C/N	P assimilable mg/kg	Limons	Argile	Sable	Type de sol
AIN TOLBA	AIN TEMOUCHENT	7.96	72.40	9.6	8.75	2.48	1.44	1.27	11.33	0.64	65	15	20	Limoneux fin
AIN TEMOUCHENT		8.04	81.60	12	5.62	6.16	3.58	1.68	21.30	0.54	55	15	30	Limoneux fin
MALEH		7.86	66.50	10.4	7.5	6.77	3.93	1.61	24.40	0.56	45	20	35	limoneux
LAMTAR	SIDI BEL ABBES	7.95	83.30	9.2	6.25	3.85	2.23	1.65	13.51	0.25	55	10	35	Limoneux fin
TESSELA		7.81	59.90	8.4	5.62	3.03	1.76	1.59	11.06	0.54	55	15	30	Limoneux fin
KAID BEL-ARBI		7.70	73.40	10	6.25	1.55	0.90	1.27	7.08	0.57	40	10	50	Sablo-limoneux

L'analyse granulométrique a montré que les sols sont de différent type: Les sols d'Ain Temouchent, Ain Tolba, Lamtar et Tessala sont limoneux fins, sablo-limoneux pour le sol de Kaid Bel Arbi et limoneux pour le sol d'El Maleh (**Figure 17**).

D'une manière générale, les sols présentent des textures équilibrées pour les sols de Kaid Bel Arbi et d' El Maleh et une texture limoneuse des sols restants (**Figure 17**).

Le pH déterminé à partir de la suspension du sol a indiqué des valeurs comprises entre 7.70 - 8.04, ce qui explique que les sols sont légèrement alcalins, non salins avec des valeurs de la conductivité électrique inférieure à 0.25 mS. La détermination des valeurs de phosphore assimilable sont inférieures à 50 mg/Kg, ce qui signifie que les sols sont très pauvres en phosphore.



**Figure17** : Le Triangle des textures (d'après U.S. département of agriculture).

Le solde Ain Tolba ( $2 \leq \text{MO}\% < 3$  avec un taux d'argile inférieur à 22%) et les sols de Lamtar et Tessela ( $3 \leq \text{MO}\% < 4$ ) sont bien pourvu de matière organique. Le sol de Kaid Bel-Arbi ( $1.4 \leq \text{MO}\% < 2$ ) est pauvre en matière organique. Cependant, les sols d'Ain Temouchent et El Malah ( $\text{MO} \geq 4$ ) ont à teneur élevée en matière organique. Les teneurs en azote des sols d'Ain Tolba et de Kaid Bel-Arbi sont comprises entre 1 et 1.5, cependant les sols de Tessala, Lamtar, El-Maleh et Ain Temouchent, contiennent des teneurs comprises entre 1.5 à 2.5. Le rapport C/N du sol renseigne sur l'état de sol en matière organique. La valeur du rapport C/N du sol Kaid Bel Arbi ( $< 10$ ) est trop faible et indique un état de minéralisation avancé de la matière organique. Les valeurs du rapport C/N des autres sols sont satisfaisantes et correspondent à une matière organique bien décomposée. Selon le mémento technique de l'agronome (1970), la fertilité d'un sol croit toujours dans certaines limites avec le taux de matière organique et d'azote total pour un rapport C/N variant de 7 à 13. Selon leurs teneurs en calcaire total, les sols ( $5\% < \text{CaCO}_3 \leq 12.5$ ) sont faiblement calcaires. Les analyses ont révélé que les taux de calcaire actif dans les sols varient de 5.62 % à 8.75%.

## 2. Etude des effets des sols et des variétés sur le développement du pois chiche

### 5.8. Effet des sols

Les résultats obtenus ont montré que le changement du type de sol a un effet statistiquement significatif sur tous les paramètres étudiés (**Annexe 4. A, Figure 18**). Le sol d'Ain Tolba a permis l'obtention d'une meilleure production de la biomasse.

Le poids des nodules et le développement de la taille des plantes obtenues sur ce type de sol a donné d'excellents rendements (**Annexe 4. B, Figure 18**).

L'utilisation du test de NEWMAN-KEULS a permis de constater que ce type de sol forme un premier groupe homogène lors du classement des effets des paramètres suivants: poids sec des parties racinaire et aérienne, hauteur de la partie aérienne, taille des racines et poids des nodules.

L'étude des autres sols a montré que l'effet sur les différents paramètres est très variable.

Le sol d'Ain Temouchent utilisé a contribué à l'obtention du deuxième meilleur niveau de production des paramètres de poids sec et taille des tiges et des racines.

L'utilisation du test de NEWMAN-KEULS a permis de suggérer que ce type de sol forme le deuxième groupe homogène lors du classement des effets des paramètres : poids sec des parties racinaire et aérienne et longueur des racines et des tiges et forme le troisième groupe homogène du paramètre poids des nodules.

Les sols de Lamtar, Tessala, El Maleh et kaid Bel Arbi semblent avoir un effet négatif sur le développement végétatif et la production de la biomasse des plantes de pois chiche. Cependant, le sol de Tessala a permis l'obtention du deuxième meilleur niveau de production de paramètre poids sec de la partie racinaire avec 0.4g et le troisième niveau de production de paramètre poids sec de la partie aérienne et poids des nodules avec 1.62 et 0.3g, respectivement.

L'étude réalisée sur les autres sols a indiqué des résultats très variables et l'utilisation du test de NEWMAN-KEULS a permis de constater que les sol de Lamtar, El Maleh et kaid Bel Arbi forment souvent des groupes homogènes rapprochés au bas du classement des effets.

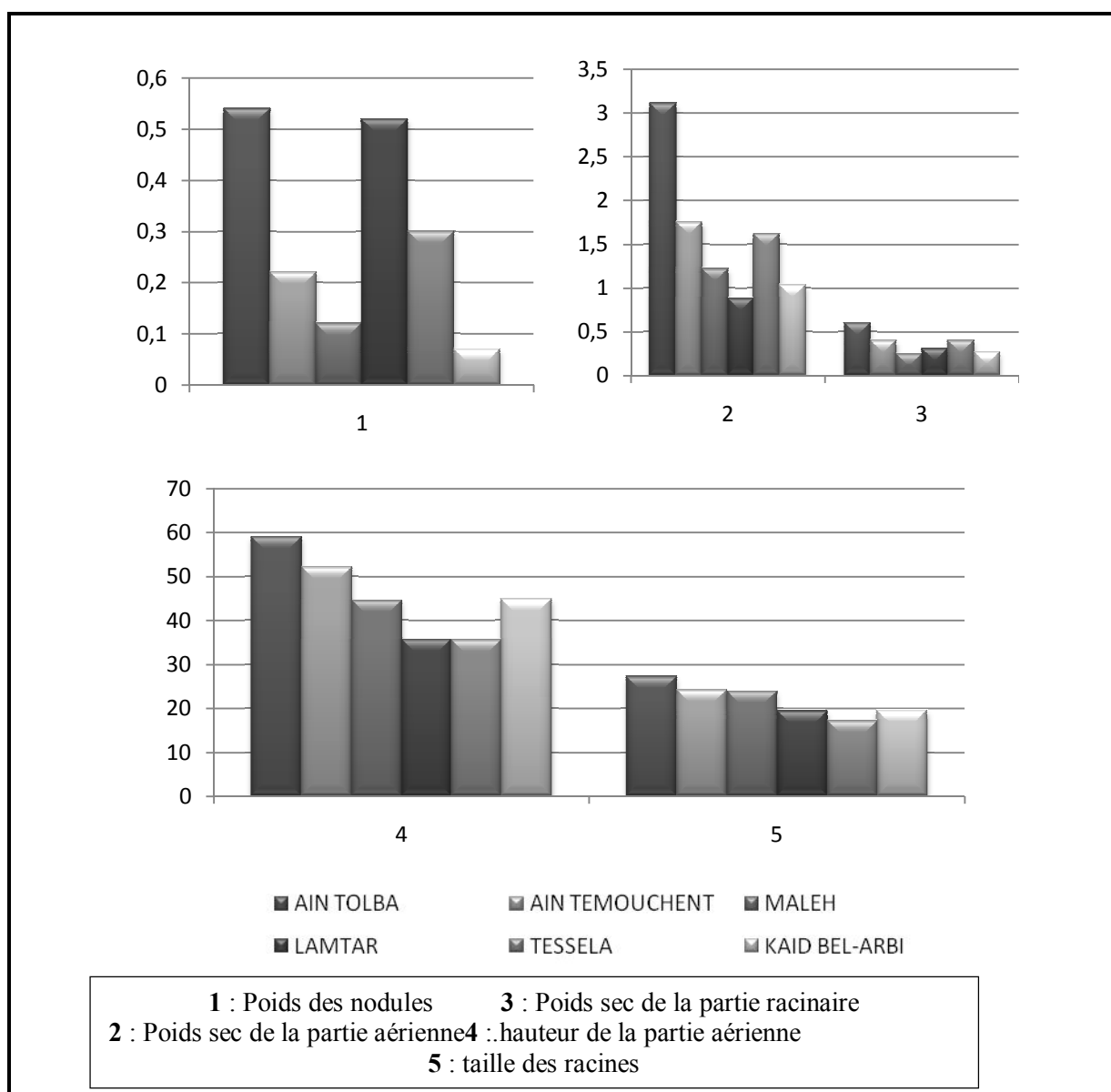
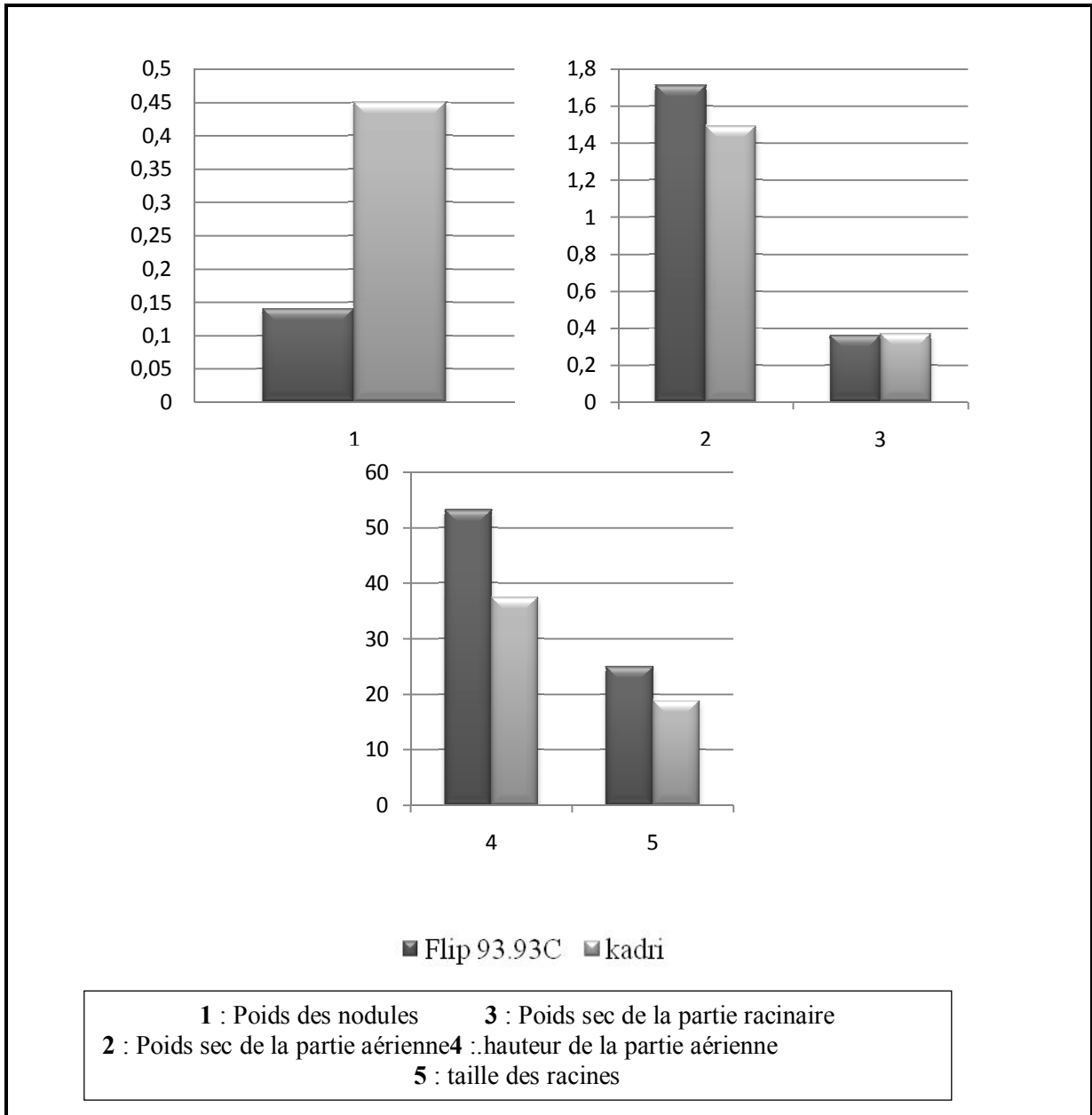


Figure 18 : Effet du sol sur le développement du pois chiche.

### 5.9. Effet variétal

L'étude de l'effet variétal a permis l'appréciation des capacités de développement propres à chacune des variétés étudiées. Les résultats obtenus des analyses de variances effectués du paramètre poids sec de la partie racinaire des plantes (Annexe 4. A) n'est pas affecté par l'effet variétal (Annexe 1. A et Figure 15). L'expression des autres paramètres varie significativement en fonction des variétés:



**Figure 19** : Effet du facteur variétal.

L’aptitude de la variété Flip 93.93 C à la production de biomasse (poids sec de la partie aérienne et racinaire) et au développement de la hauteur est nettement supérieure à la variété Kadri (Figure 19 et Annexe 4.B). Cependant, Le développement nodulaire est optimal chez la variété Kadri (Figure 19 et Annexe 4.B). Par ailleurs, les deux variétés présentent les même taux de production de poids sec racinaire.

### 5.10. Effets des interactions sols × variétés

L'étude des interactions sols × variétés a permis d'évaluer l'effet des sols utilisés sur les variétés utilisées. L'interaction sol × variété a contribué à une amélioration significative des paramètres de développement des deux variétés utilisées (**Annexe 4.A, Figure 20**).

L'effet des sols sur la croissance des plantes varie considérablement en fonction de la variété de pois chiche utilisée.

Les résultats obtenus ont montré que le type de sol d'Ain Tolba a affecté favorablement la majorité des paramètres impliqués dans le développement des plantes des deux variétés.

Ce type de sol a fourni les meilleures interactions des paramètres poids des nodules et poids sec et la hauteur de la partie aérienne de la variété Flip 93.93C. Pour la variété kadri, Le sol a donné les meilleurs rendements du poids sec et de la taille des parties aérienne et racinaire avec un meilleur développement nodulaire sur le sol d'El Maleh. (**Figure 21**).

L'utilisation du sol d'Ain Temouchent et El Maleh a donné une production maximale du poids sec racinaire et de la taille des racines de la variété Flip 93.93C, respectivement.

L'étude des interactions de sols avec les variétés ayant donné des faibles rendements sont :

- Interaction de la variété Flip 93.93C × Lamtar des paramètres poids des nodules, et poids sec des partie aérienne et racinaire.
- Interaction de la Flip 93.93C × Lamtar et Flip 93.93C × Maleh de paramètre hauteur de la partie aérienne et taille des racines,
- Interaction de la Kadri × Kaid Bel Arbides paramètres poids des nodules, poids sec et hauteur de la partie aérienne,
- Interaction de la Kadri × Ain Temouchentde paramètre poids sec de la partie racinaire,
- Interaction de la Kadri × El Maleh des paramètres poids sec de la partie racinaire et taille des racines.

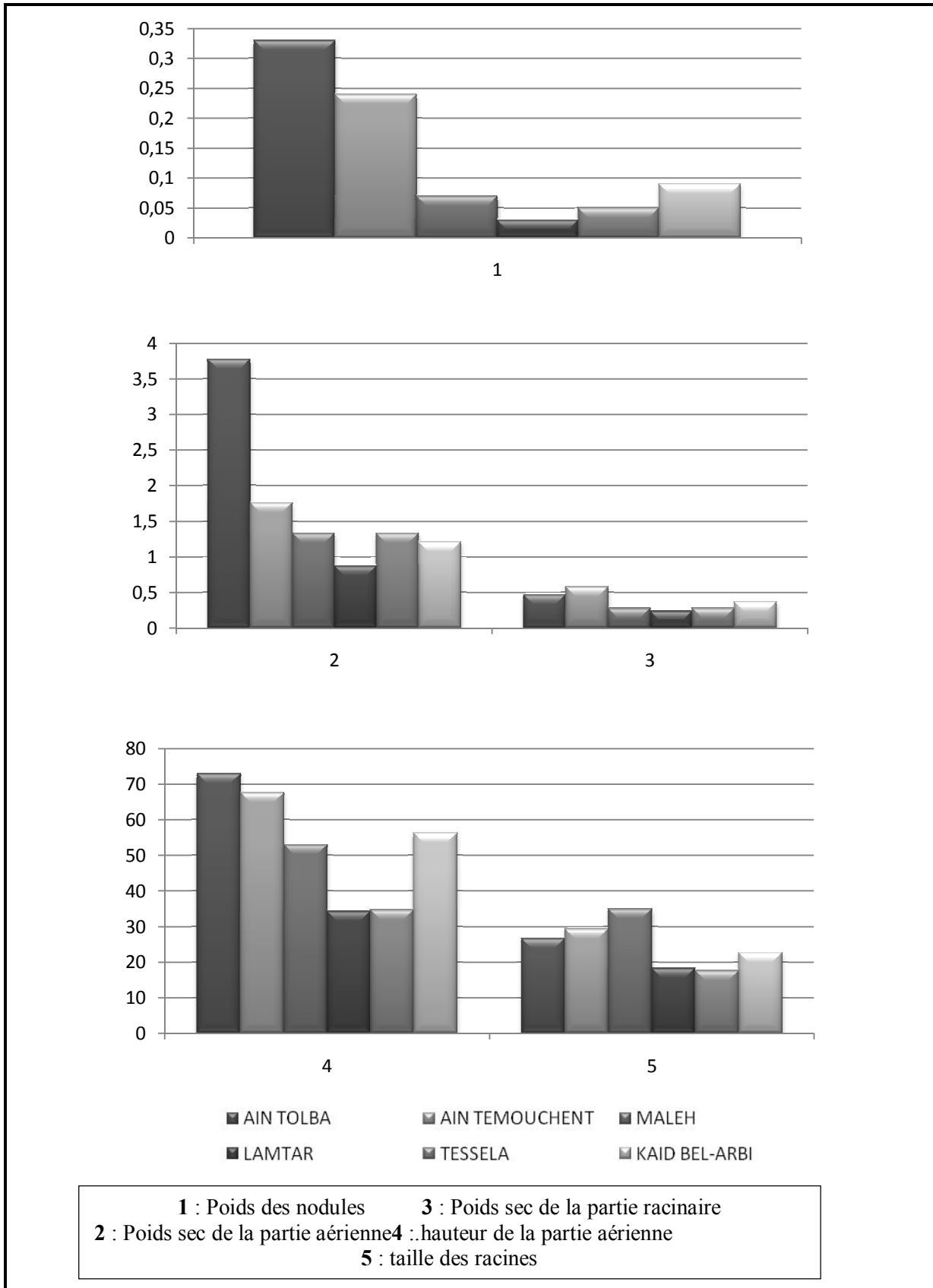


Figure 20 : Effet des interactions sols × variété flip 93.93C.

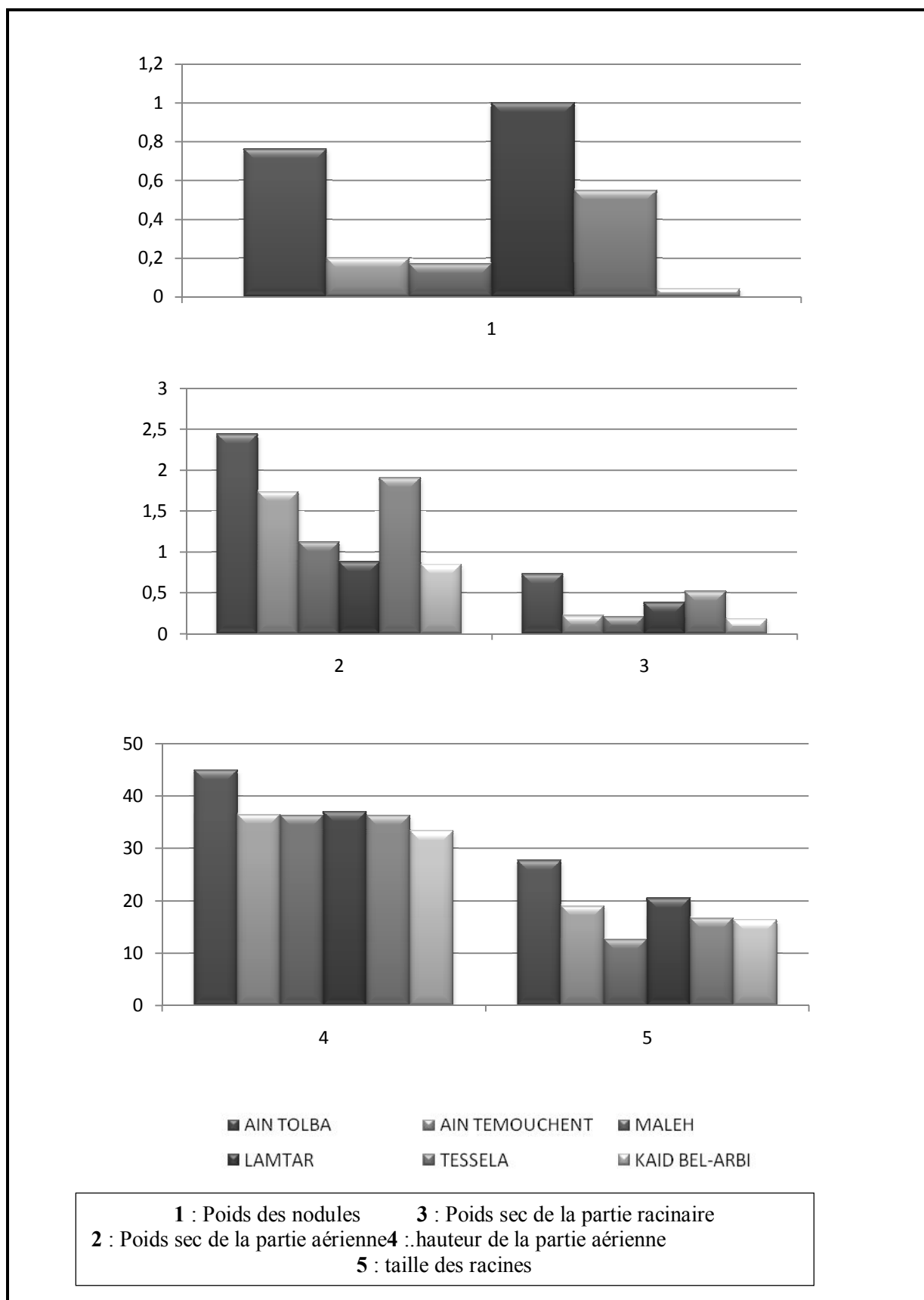


Figure 21 : Effet des interactions sols × variété Kadri.



### 3. Isolement et purification des bactéries diazotrophes

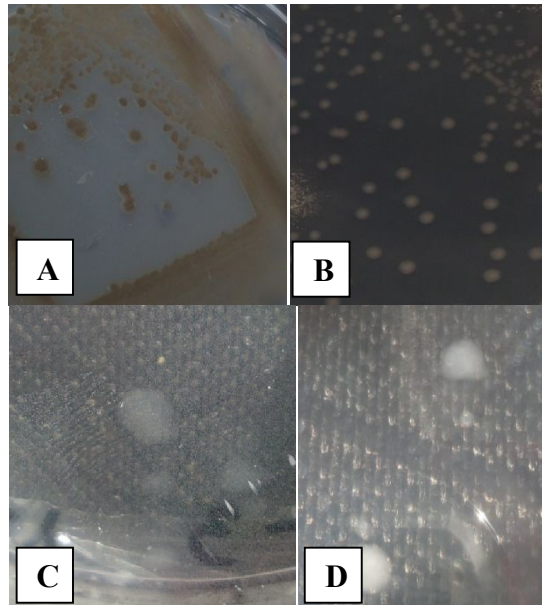
L'étude des effets des sols et des variétés sur le développement du pois chiche ont permis de sélectionner le sol d'Ain Tolba pour l'isolement des bactéries diazotrophes dans ce présent travail.

L'utilisation des prélèvements effectués à partir du sol d'Ain Tolba, l'ensemencement sur le milieu gélosé N-free et l'incubation à une température de 30°C ont permis l'isolement de 12 isolats bactériens sélectionnés fixateurs d'azote.

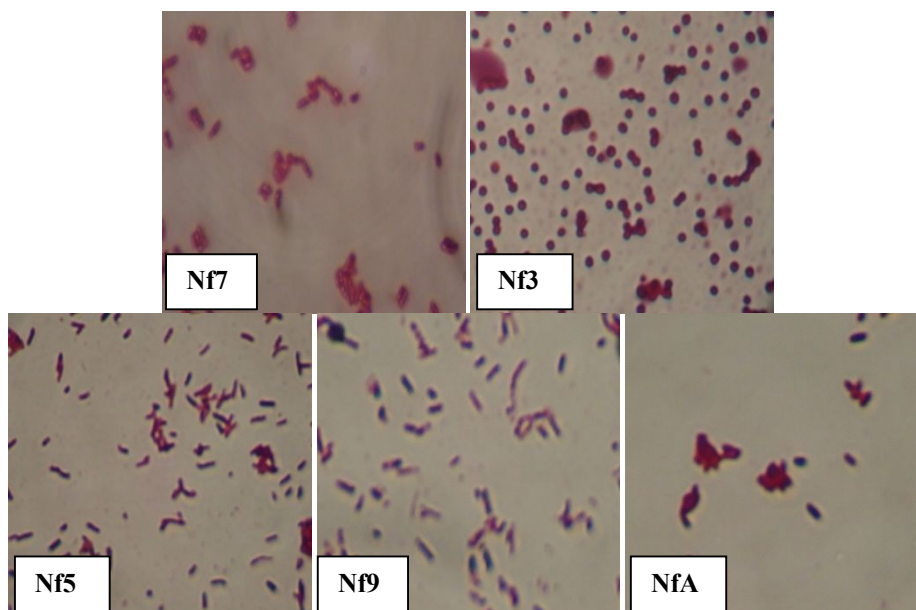
Les colonies des isolats obtenus apparaissent de couleurs et de formes différentes (**Tableau 4 et Figure 22**), La coloration de Gram effectuée et l'observation microscopique avec un grossissement de (G ×100) ont permis de distinguer les différentes formes cellulaires et leur mode d'association. Les isolats Nf11, Nf9, Nf10, Nf1 et Nf8 apparaissent des coccobacilles avec une coloration de Gram négative. Cependant, les isolats (NfA, NfC, NfD, Nf5 et Nf7) sont des bacilles à coloration de Gram négative. L'isolat Nf3 est un cocci à coloration de Gram négative et Nf2 un cocci à coloration de Gram positive (**Figure 23**):

**Tableau 10** : Codification et description des colonies des isolats obtenus.

Codification	Caractérisation des colonies
Nf1	Petites colonies crémeuses, de couleur blanche, à contour régulier et légèrement bombé de 1.5 mm de diamètre.
Nf2 et Nf3	Petites colonies crémeuses, de couleur blanche,translucide, à contour régulier plate et de 5mm de diamètre.
Nf7, Nf8, Nf9, Nf 10 et Nf11	Colonies à contour régulier, de coloration blanchâtre, de 1 mm de diamètre.
Nf C, NfD, NfA et Nf5	Colonies muqueuses de coloration marron à brune et à contour irrégulier de 2 mm à 6 mm de diamètre.



**Figure 22** : Aspects des isolats sur milieu Norris N free. **A** : NfA, **B** : Nf1, **C** : Nf3, **D** : Nf2.

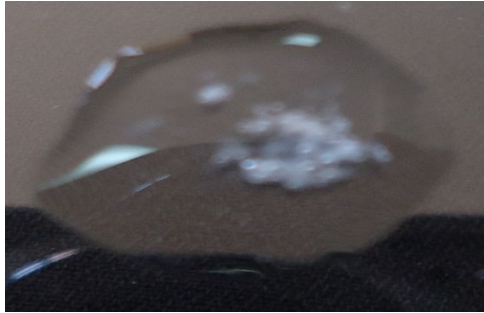


**Figure23** : Aspects microscopique des isolats (Nf7, Nf3 et NfA et Nf9) (G\* 100).

#### 4. Caractères biochimiques et physiologiques

##### 5.1. Test de catalase

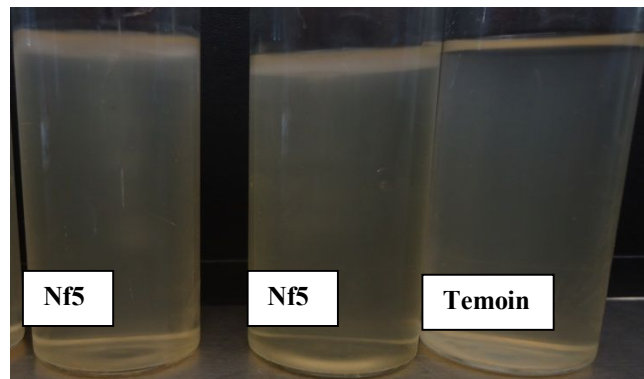
La constatation d'un dégagement gazeux chez les candidats est la preuve de la production de catalase (**Figure 24**), enzyme ayant servi à dégrader le composé cytotoxique: le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les résultats du test de la mise ne évidence de la présence du catalase ont montré que les isolats (Nf1, Nf3, Nf5, Nf8, Nf10, NfC, NfA et NfD) sont catalase positive et les isolats (Nf2, égatNf7, Nf9 et Nf11) catalase négative (-).



**Figure 24** :L'effervescence obtenue de la réaction d' $H_2O_2$  en présence du catalase bactérienne.

### 5.2. Test de mobilité des isolats

La mise en évidence de la mobilité des 12 isolats bactériens fixateurs d'azote est réalisée sur le milieu de culture mannitol-mobilité, elle se traduit par la diffusion des bactéries sur la gélose. Le test a montré que la majorité des isolats isolés sont mobiles à l'exception des deux isolats (Nf7, Nf8), qui sont immobiles.



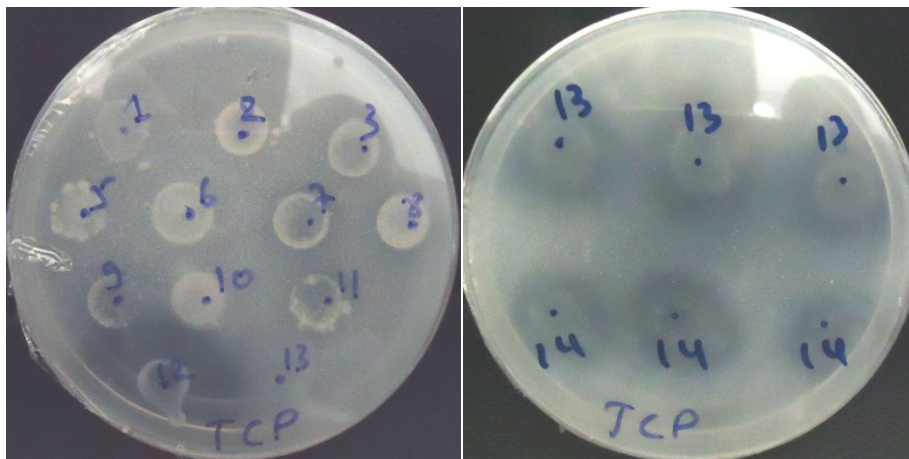
**Figure25** : Aspect de croissance de l'isolat Nf5 sur le milieu de culture de mannitol mobilité.

### 5. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance

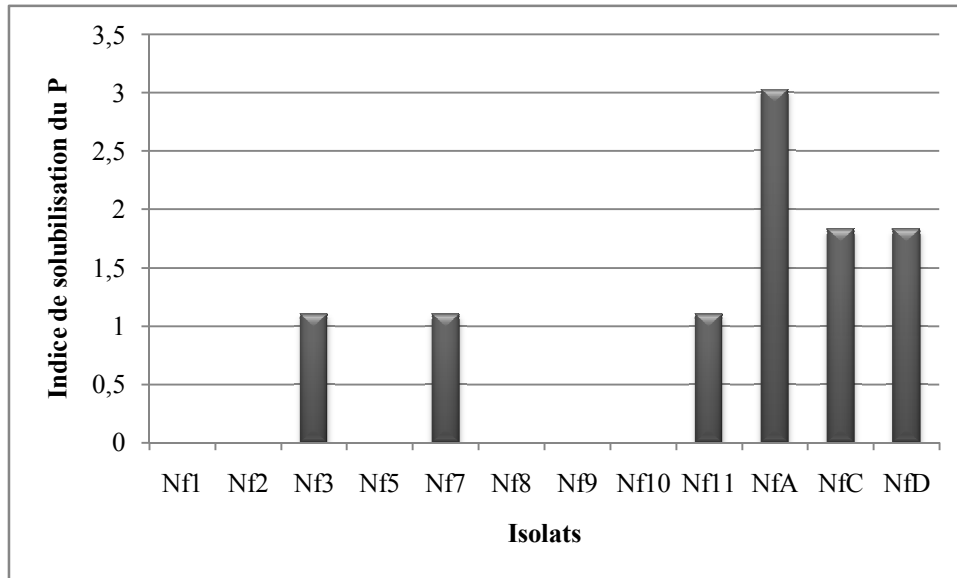
#### 5.1. Solubilisation du phosphate

Les isolats sont testés pour la solubilisation du phosphate inorganique sur milieu de culture de Pikovskaya solide contenant du tricalcium phosphate comme seule source de phosphore. Les résultats obtenus ont montré que six isolats, incubés à une température 30°C pendant 7 jours, ont produit une zone claire autour des colonies inoculées, ce qui explique une solubilisation du phosphore contenu dans le milieu de culture utilisé (Figure 26).

Les souches (NfC, NfD et NfA) présentant des indices de solubilisation du phosphore de (1.83, 1.83 et 3.03) respectivement, semblent être les plus performants (Figure 26 et Figure 27). Cependant, les isolats NF3 et NF7 ont solubilisé le phosphate modérément (indice de 1.1). Par ailleurs, les isolats (Nf5, Nf8, Nf9 et Nf10) ont manifesté une faible solubilisation du phosphore. Cependant, aucune activité de solubilisation du phosphore n'est observée chez les isolats (Nf1, Nf2).



**Figure 26** : Les résultats du test de solubilisation du tricalcuim phosphate par les isolats. 12 : NfA, 13 :NfC, 14 : NfD.

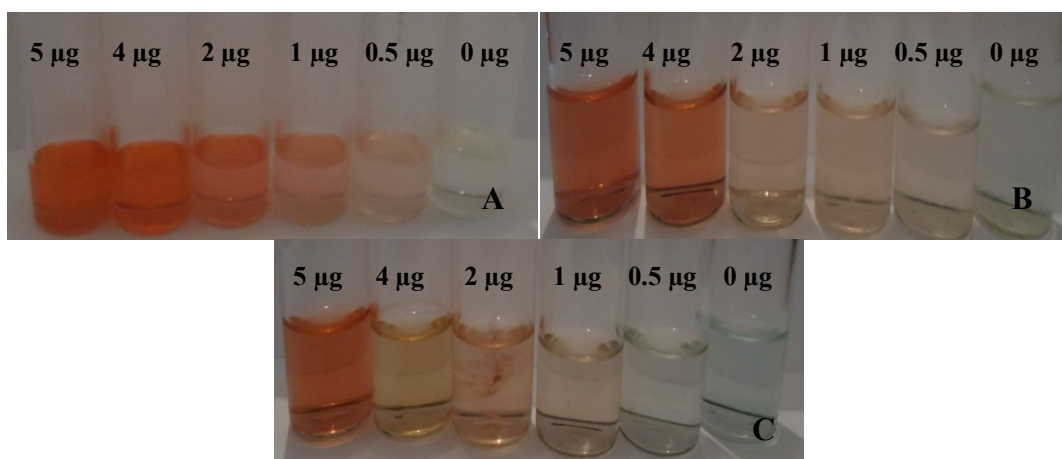


**Figure 27 :** Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture de Pikovskaya.

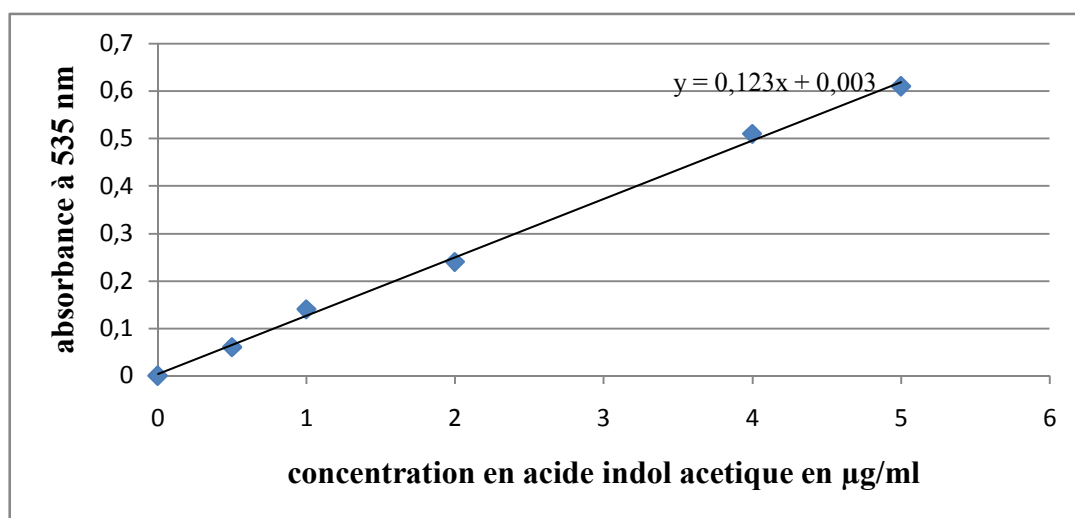
## 5.2. Production d'acide indole acétique

### 5.2.1. Choix de la composition du réactif de Salkowski et préparation de la courbe étalon

Devant la combinaison de la composition du réactif de Salkowski utilisée (**Tableau11**) rapportée dans la littérature et dans l'optique de trouver le réactif adéquat, différentes préparations du réactif en présence d'une concentration connue d'acide indole acétique sont testées (**Figure 28**). Après l'incubation à l'obscurité pendant 30 min, les différentes préparations sont examinées à l'œil nu et la composition la plus chromogène est utilisée.



**Figure 28:**Résultats obtenus des différentes compositions du réactif de Salkowski. **A :** réactif 1, **B :** réactif 2 + 2gouttes d'acideorthophosphorique, **C :** réactif 2.



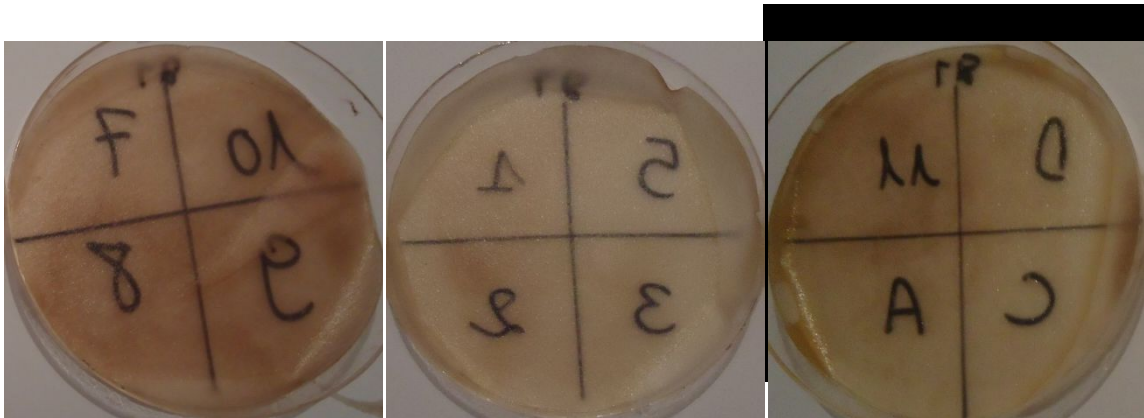
**Figure 29** : Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique.

La courbe d'étalonnage standard de l'acide indole acétique est préparée par l'utilisation des concentrations suivantes (0,5, 1, 2, 4 et 5 µg/ml) de l'acide indole acétique. Les étalons sont traités avec le réactif 1 de Salkowsky avec une proportion de 2 :1 (v:v), La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et les valeurs obtenues sont utilisées pour tracer une courbe de tendance (**Figure 29**) dont la formule de la droite obtenue est  $Y = 0.123x + 0.003$ .

### 5.2.2. Screening des isolats pour la production d'acide indole acétique

La capacité de production de l'acide indole acétique chez les souches isolées sélectionnées fixatrices d'azote est mise en évidence sur le milieu de culture de Luria-Bertani en absence et en présence de l'acide aminé L-tryptophane (1g/l) comme précurseur.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité de production de l'acide indole acétique est absente chez la totalité des isolats testés. Par ailleurs, l'ajout du L-tryptophane au milieu de culture de Luria-Bertani a permis la production d'acide indole acétique chez 11 des isolats testés (**Figure 30**). La production d'acide indole acétique est proportionnelle à l'intensité de la coloration rouge obtenue. Outre, l'isolat Nf5 se manifeste incapable de produire de l'acide indole acétique et ses substances apparentées, traduite par l'absence de virage de couleur.



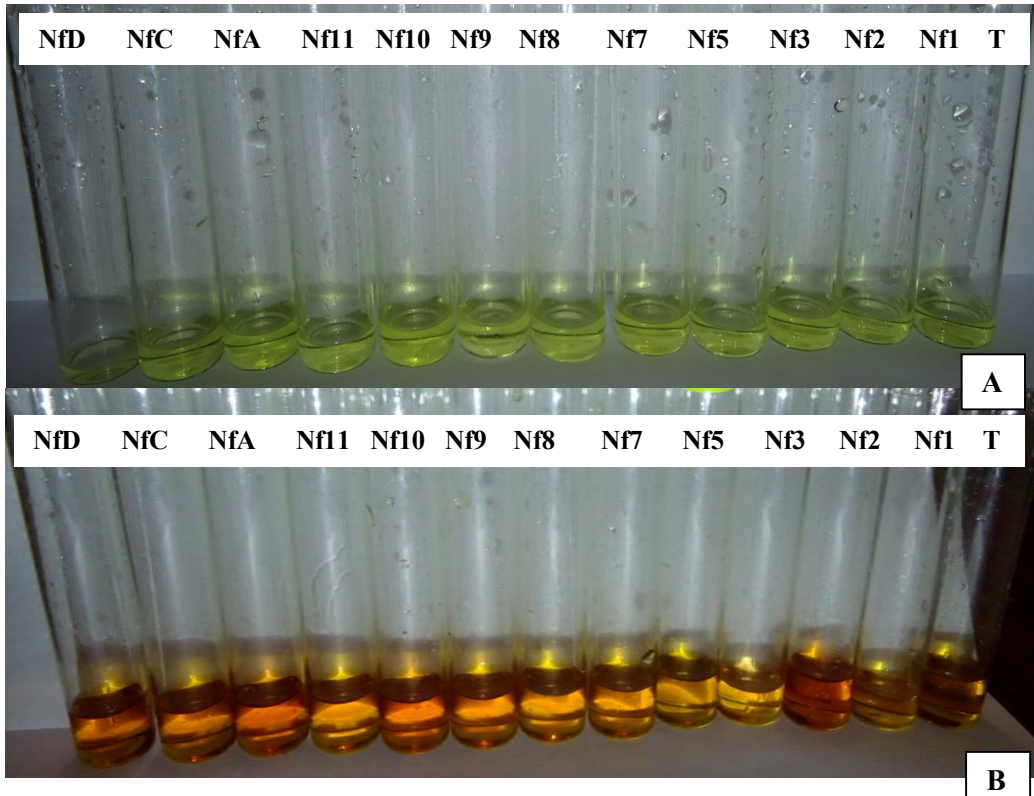
**Figure 30** : Production d'acide indole acétique par les isolats sur milieu Luria-Bertani solide additionné de (1g/l) de L-tryptophane. **1** : Nf1, **2** :Nf2, **3** : Nf3, **4** : Nf4, **5** :Nf5, **7** : Nf7, **8** : Nf8, **9** :Nf9, **10** : Nf10, **11** : Nf11, **A** :NfA, **C** : NfC, **D** : NfD.

### 5.2.3. Quantification de la production d'acide indolo-acétique

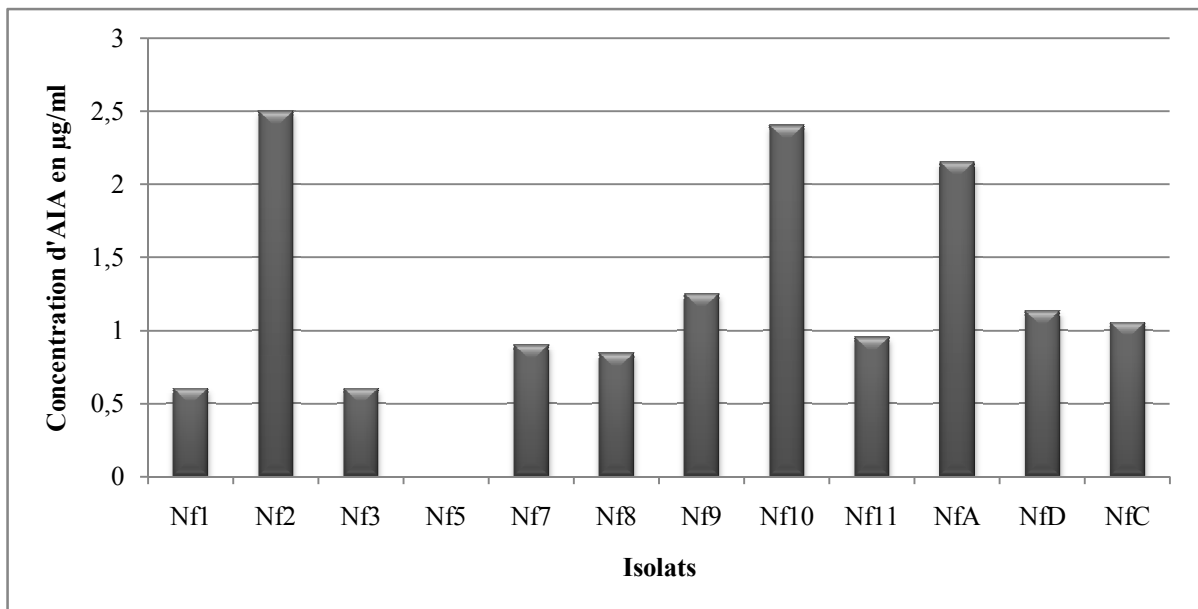
La production de l'acide indolo-acétique est évaluée, selon la technique rapporté par [Acuña et al., \(2011\)](#), sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence d'une concentration 1% de glucose, en présence et en absence du L-tryptophane (1g/l).

Après 72h d'incubation à une température de 30°C, les surnageants des différentes cultures d'isolats sont récupérés par centrifugation à une vitesse de 3000 rpm/10min, additionnés du **réactif 1** de Salkowsky à une proportion de 2 :1 (v:v). La lecture de la production de l'acide indolo-acétique est effectuée par mesure de l'absorption à une longueur d'onde de 535 nm à l'aide un spectrophotomètre. Les résultats obtenus n'ont montré aucune production d'acide indole acétique sur le milieu de culture de Luria-Bertani non additionné de L-tryptophane (**Figure 31.A**).

Par ailleurs, la culture des isolats sur le milieu de culture Luria-Bertani, additionné d'une concentration de (1g/l) de L-tryptophane, a montré une production de (2.5, 2.4 et 2.15 µg/ml)de l'acide indolo-acétique chez les isolats (Nf2, Nf10 et NfA) respectivement (**Figure 32**). Une faible production de l'acide indolo-acétique de 0.6 µg/ml est observée chez les isolats Nf1 et Nf3. Cependant, la souche l'isolat Nf5 ne manifeste aucun potentiel de production de l'acide indolo-acétique (**Figure 31.B**).



**Figure 31** : Production de l'acide indole acétique chez les isolats, inoculées sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide **A** : en absence de L tryptophane, **B** : en présence de (1g/l) de L-tryptophane.



**Figure 32** : Concentrations d'AIA produites par les isolats sur milieu luria-Bertani liquide additionné de (1g/l) de L- tryptophane.



### 5.3. Recherche de l'activité protéolytique

L'étude de l'activité protéolytique est effectuée sur milieu de culture Milk agar. La présence de cette activité est mise en évidence par l'utilisation de la caséine du lait écrémé comme substrat. Les résultats obtenus ont montré que dix isolats ont manifesté une activité protéolytique sur milieu de culture de lait écrémé (Figure 33). L'hydrolyse de la caséine est observée chez les isolats (Nf1, Nf 2, Nf 3, Nf 8, Nf 9, Nf 10, Nf 11, NfA et NfC), traduite par la formation d'un halo clair autour des coloniesensemencées. Par ailleurs, les isolats (Nf5, Nf7 et NfD) n'ont manifesté aucune activité protéolytique.

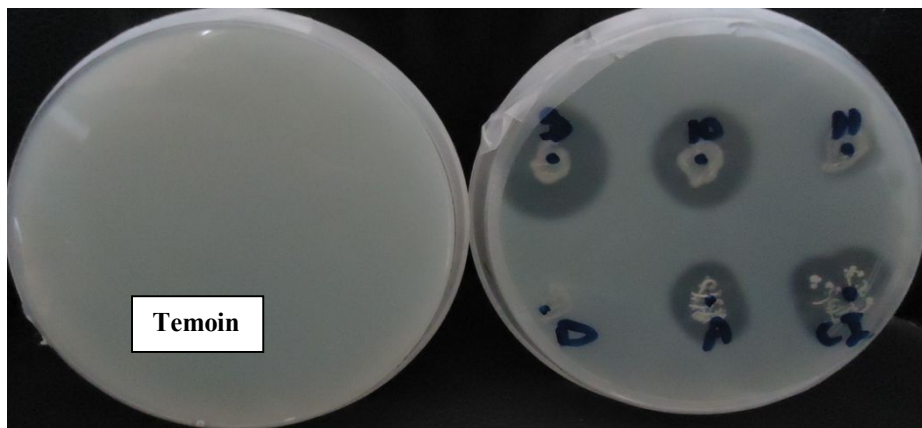


Figure 33 : Exemple des résultats obtenus lors du test de l'activité protéolytique.

10 : Nf10, 11 : Nf11, A :NfA, C : NfC, D : NfD.

### 5.4. Effet antagoniste anti *Fusarium oxysporium f. sp. Ciceris*

Après 10 jours d'incubation à une température 30°C, la totalité des isolats testés ont manifesté une activité inhibitrice vis-à-vis de *Fusarium oxysporium f. sp. Ciceris*(Figure 34).

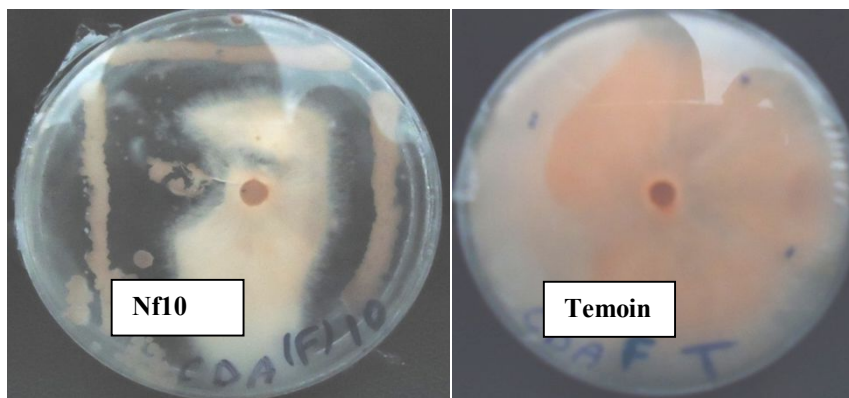
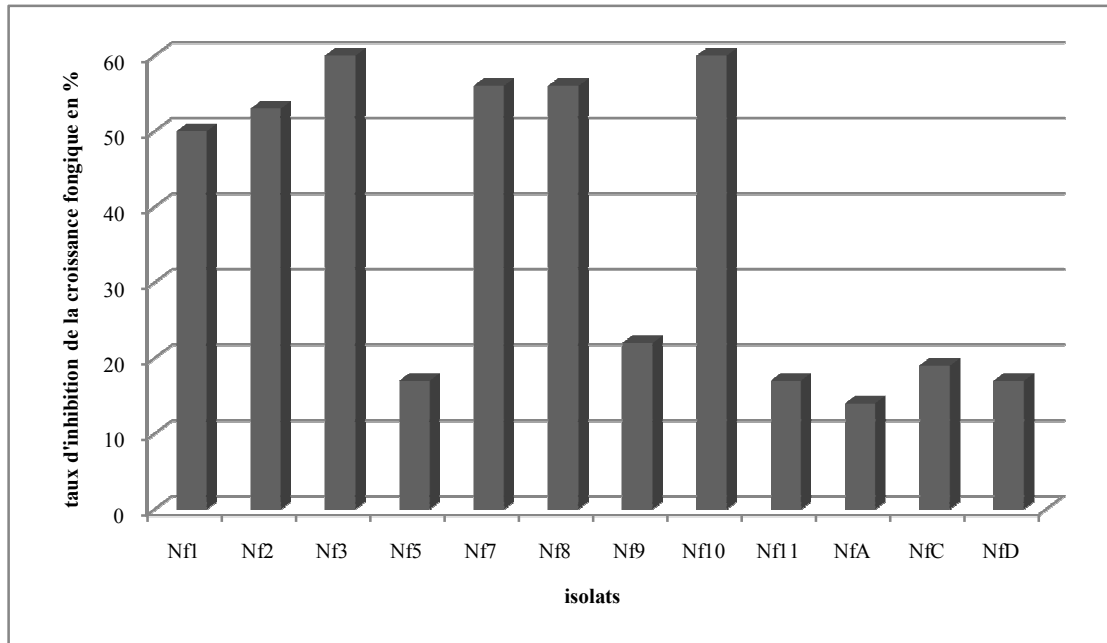


Figure 34 : Exemple des résultats obtenus lors du test de l'activité antifongique.



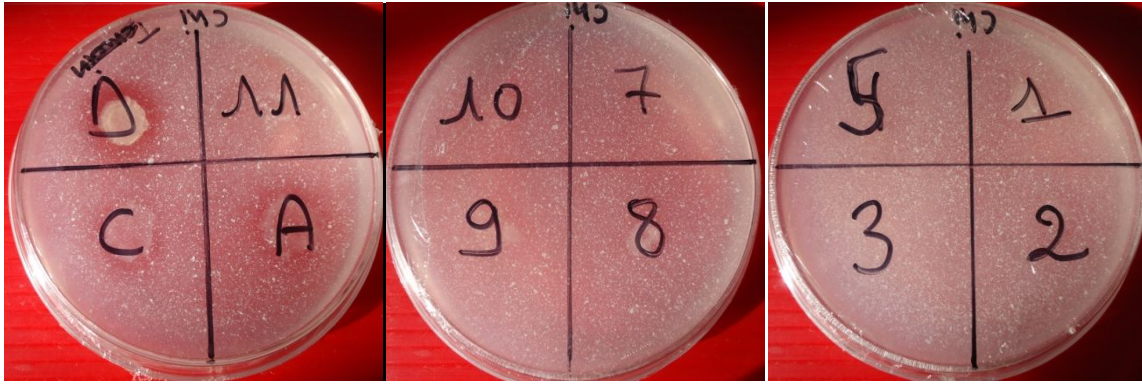
**Figure 35 :** Taux d'inhibition de *Fusarium oxysporum* par les isolats.

Le diamètre des colonies mycéliennes de *F. oxysporum f. sp. Ciceris* est fortement réduit en présence des isolats antagonistes, par rapport au témoin négatif. Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne observé chez les isolats Nf3 et Nf10 est de l'ordre de 61% (Figure 35). Cependant, les taux d'inhibition des isolats (Nf1, Nf2, Nf7 et Nf8) sont modérés (50, 53, 56 et 56 %) respectivement. Par ailleurs, les isolats (NfA, NfC, Nf9, NfD, Nf11 et Nf5), ont manifesté une faible activité antagoniste vis-à-vis des champignons avec un taux d'inhibition de 22%.

### 5.5. Recherche de la Chitinase

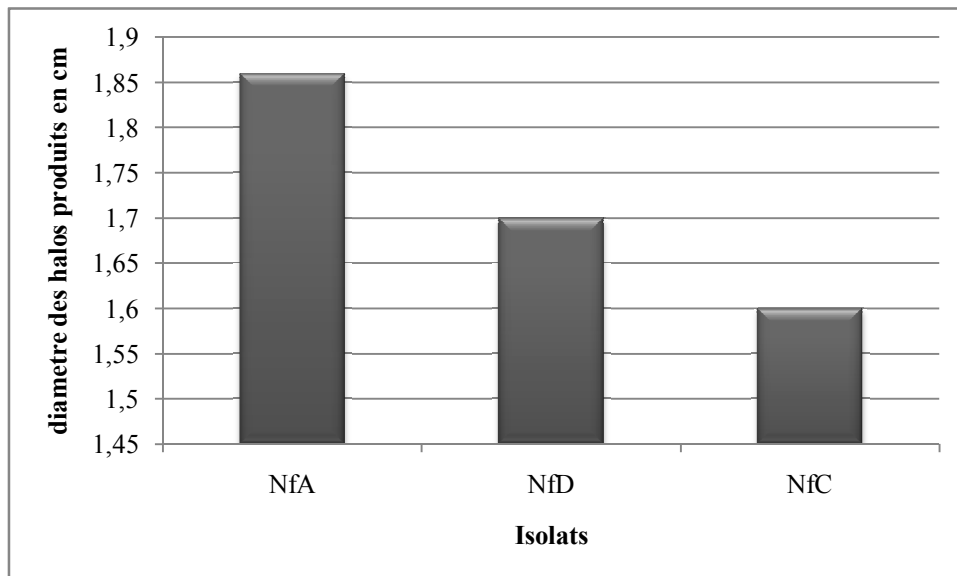
La recherche de la production de la chitinase est réalisée sur le milieu de culture contenant la chitine colloïdale comme seule source de carbone et d'azote. La présence d'une activité chitinolytique sur le milieu de culture utilisé se manifeste par la formation d'un halo clair autour des coloniesensemencées, incubées à une température 30°C pendant 7 jours.

Les résultats obtenus ont montré que les trois isolats (NfA, NfB et NfC) ont manifesté une excellente activité chitinolytique avec des diamètres des zones d'hydrolyse de (1.86 1.7, 1.6 cm) respectivement (Figure 36, Figure 37).



**Figure 36 :** L'étude de l'activité chitinolytique des trois isolats (NfA, NfD et NfC).

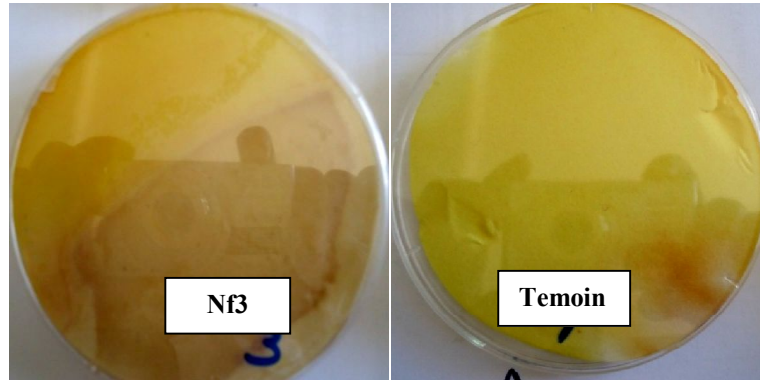
1 : Nf1, 2 : Nf2, 3 : Nf3, 4 : Nf4, 5 : Nf5, 7 : Nf7, 8 : Nf8, 9 : Nf9,  
10 : Nf10, 11 : Nf11, A : NfA, C : NfC, D : NfD.



**Figure 37 :** Taux de production de chitinases par les isolats NfA, NfC et NfD.

### 5.6. Production d'acide cyanhydrique

La recherche de la production de HCN est réalisée sur gélose nutritive, additionnée de 4.4 g/l de glycine. Les résultats obtenus ont montré une importante production d'acide cyanhydrique chez les isolats (Nf1, Nf2, Nf3 et Nf5), traduite par le virage de la couleur du papier filtre vers le brun foncé (Figure 38). Cependant, les autres isolats se manifestent incapables de produire du cyanure d'hydrogène.

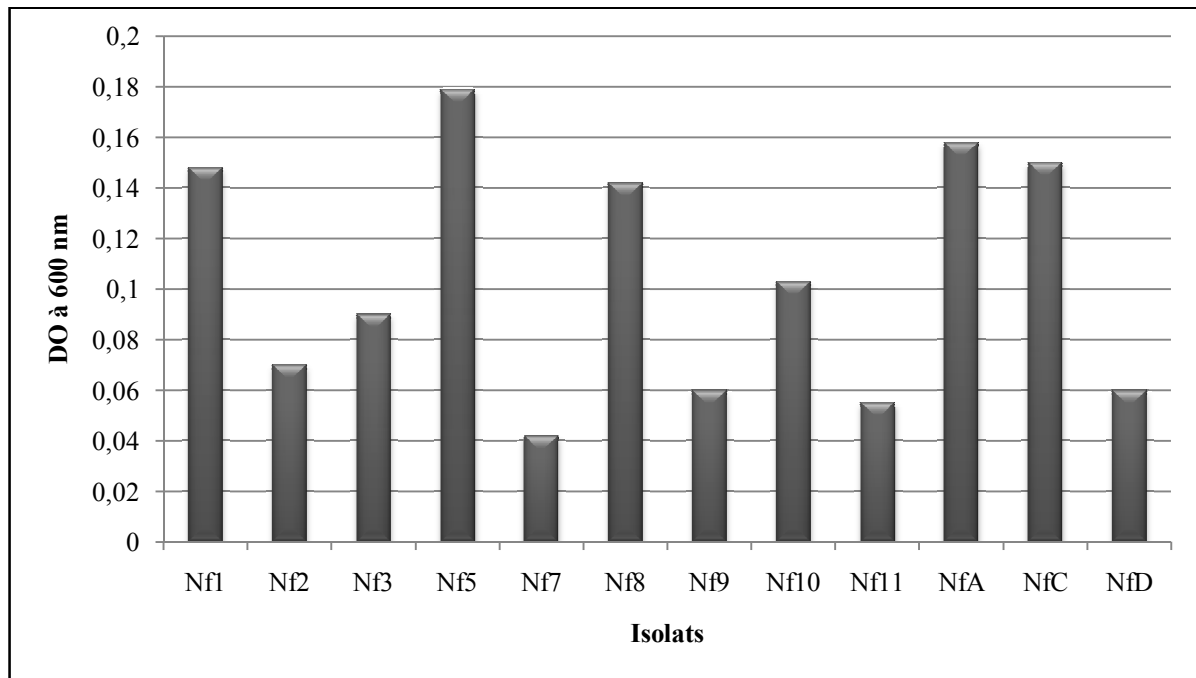


**Figure 38 :** Production de l'HCN chez l'isolat Nf3.

### 5.7. Test de Cellulase

La capacité des isolats fixateurs d'azote à dégrader la cellulose est mise en évidence sur un milieu de culture contenant la cellulose (bande de papier) comme seule source de carbone. L'étude de la production de la biomasse et la dégradation de la cellulose des isolats, est évaluée par la mesure de la densité optique à une longueur de 600 nm. Les résultats obtenus ont montré une importante production de la biomasse, traduite par l'augmentation de la turbidité dans les tubes à essai contenant la cellulose des bandes en papier par rapport au témoin négatif contenant une solution saline avec de la cellulose non inoculées, ce qui explique que le substrat contenu dans le milieu de culture est métabolisé par les isolats testés **(Figure 39)**.

Les isolats Nf1, Nf5, Nf8, Nf10, NfA et NfC ont manifesté une excellente production de la biomasse sur milieu de culture contenant la cellulose comme seule source de carbone. Par ailleurs, l'isolat Nf5 se manifeste très performant dans la dégradation de la cellulose.



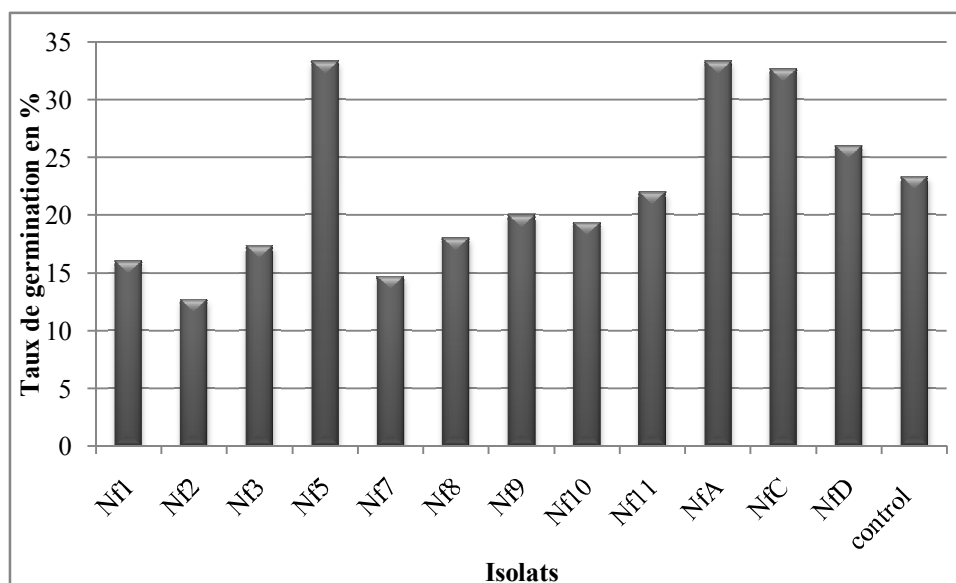
**Figure 39.** Evaluation de l'activité cellulolytique par mesure de l'absorbance à 600 nm, après 4 semaines d'incubation sur milieu de culture contenant la cellulose.

### 6. Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du pois chiche

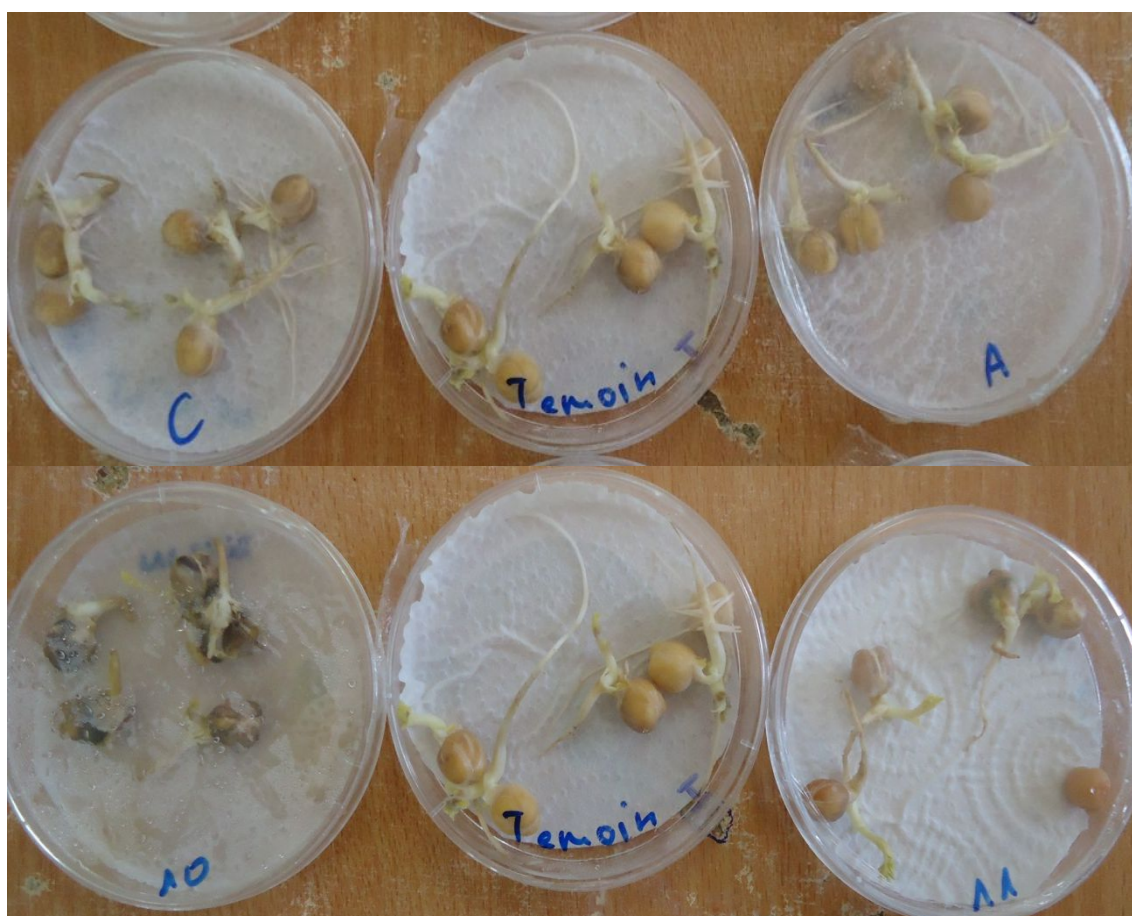
L'évaluation de l'effet des différents isolats sur la germination du pois chiche est faite par l'étude des paramètres pourcentage de germination et longueur des tiges et des racines des jeunes plantules, après 10 jours.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique à un seuil de probabilité de  $P < 0.05$ , à l'aide du logiciel STATITCF. Les effets significatifs sont comparés par le test de Newman & Keuls.

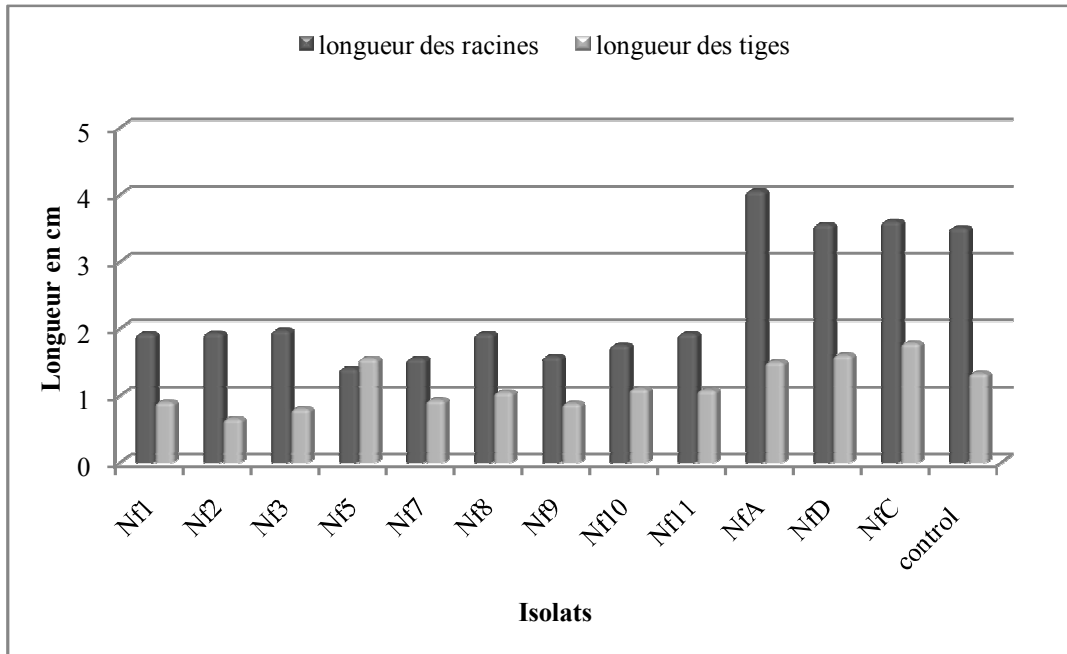
L'inoculation des graines a engendré des variations statistiquement significatives à un seuil de probabilité  $P < 0.01$  dans le pourcentage de germinations (**Annexe 5.A**). Les isolats ont exercé trois types d'effet sur le taux de germination des graines de pois chiche (**Figure 40, Figure 41 et Annexe 5.B**): un effet répressif, observé avec les isolats (Nf1, Nf2, Nf3, Nf5, Nf7, Nf8 et Nf9) avec le pourcentage de germination nettement plus faible par rapport au témoin. Un effet de promotion chez les graines inoculées par les isolats (NfA, NfC, NfD et Nf5) et un effet neutre chez l'isolat Nf11, avec un taux de germination proche du témoin.



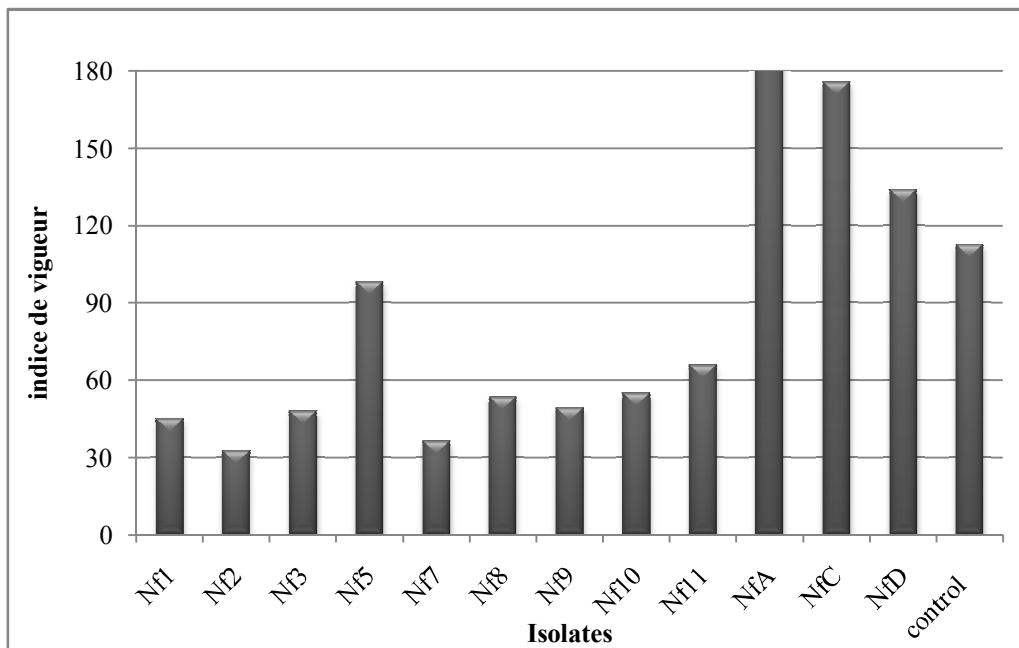
**Figure 40 :** Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote, sur le taux de germination du pois chiche.



**Figure 41 :** Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (NfC, NfA, Nf10 et Nf11) sur la germination du pois chiche.



**Figure42** : Effet des isolats sélectionnés fixateurs d’azote sur la longueur des racines et des tiges des graines germées de pois chiche.



**Figure 43** : Effet des isolats sélectionnés fixateurs d’azote sur l’indice de vigueur des graines de pois chiche.

L’inoculation des graines a engendré des variations statistiquement significatives à  $P < 1\%$  des paramètres de la longueur des racines et des tiges des graines germées ([Annexe 5.A](#)).

Les résultats obtenus des paramètres de la longueur des racines et des tiges des jeunes plantules sont en corrélation avec ceux obtenus sur le taux de germination (**Figure 42 et Annexe 5.B**). Ils ont montré que les isolats (NfA, NfC et NfD) ont témoigné d'une très bonne activité stimulatrice de la croissance des tiges et des racines.

Cependant, les isolats Nf11 et Nf5 ont manifesté une faible activité stimulatrice de la croissance des graines traitées par rapport au témoin.

Par ailleurs, les isolats (Nf1, Nf2, Nf3, Nf5, Nf7, Nf8, Nf9 et Nf10) ont montré un effet répressif sur le développement des graines inoculées et la croissance des racines et des tiges par rapport au témoin. Enfin, le calcul de l'indice de vigueur a montré la parfaite corrélation entre l'étude du taux de germination et de la longueur des racines et des tiges (**Figure 43**).

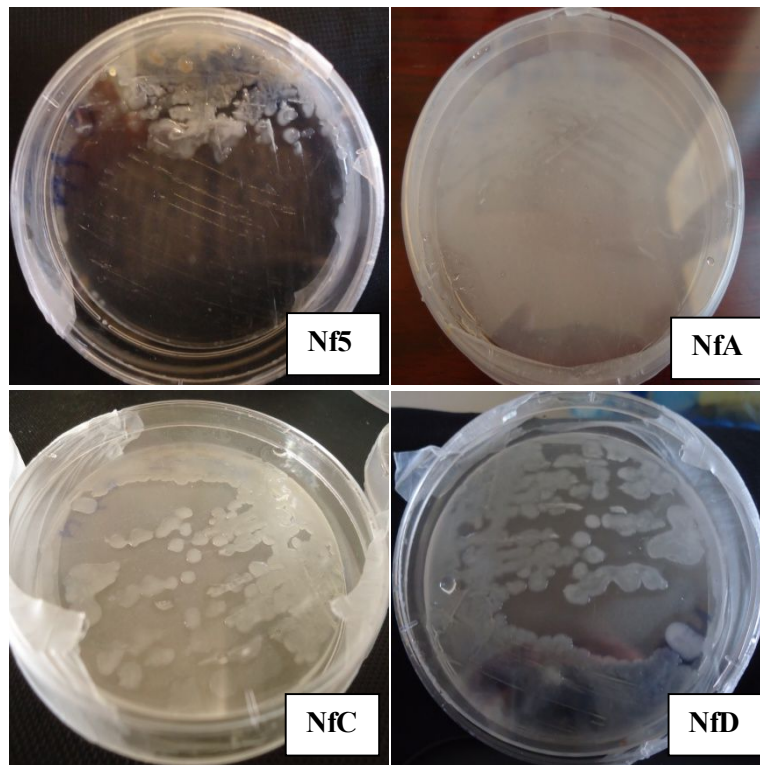
### **7. Identification phénotypique des candidats les plus performants**

#### **7.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats et test d'oxydase**

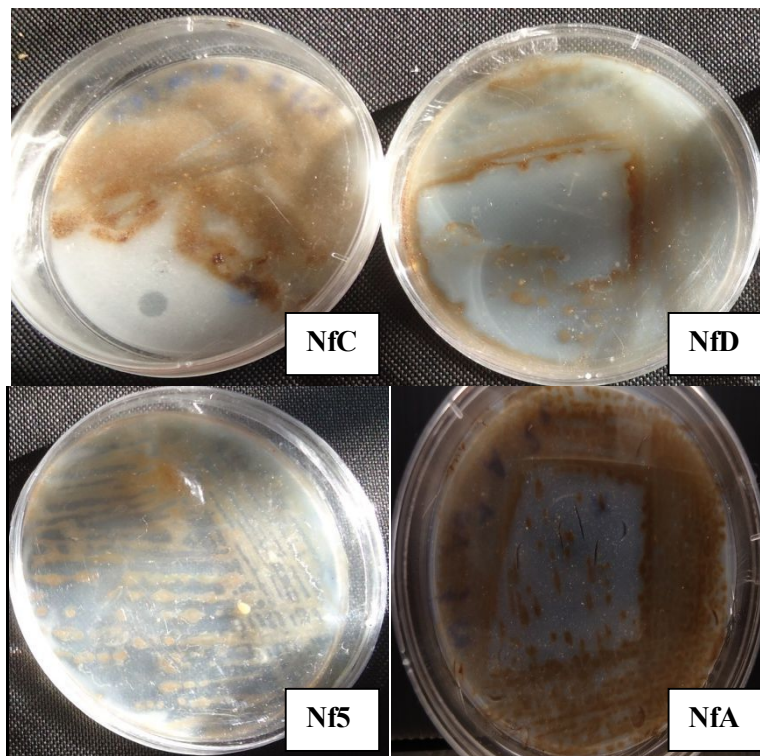
La coloration de gram, l'observation des caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats, la recherche des cystes et coloration des spores et la recherche de la cytochrome oxydase sont des éléments clé dans l'identification des bactéries.

Les résultats obtenus, lors de l'incubation des isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD), à une température 30°C pendant 24 heures ont montré des colonies, transparentes, brillantes, légèrement blanchâtres, légèrement convexes, à contour irrégulier, d'un aspect muqueux (**Figure 44**). Par ailleurs, l'incubation des isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD), à une température 30°C pendant 5 jours a montré que les colonies des quatre isolats produisent une pigmentation marron et deviennent plus en plus foncé et parfois noire (**Figure 45**). Les colonies peuvent prendre un aspect rugueux ou granulaire (**Figure 46**).





**Figure 44** : Aspect des isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD), ensemencées sur milieu de culture de Norris N free, incubé à une température de 30°C pendant 24 heures.



**Figure 45** : Aspect des isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD), ensemencées sur milieu de culture de Norris N free, incubé à une température de 30°C pendant 5 jours.



**Figure 46** : Aspect des isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD), ensemencées sur milieu de culture de Norris N free, incubé à une température de 30°C pendant 15jours.

A l'état frais, dans les cultures âgées de moins de 72 h, les quatre isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD) apparaissent en forme de bacilles très mobiles dans toutes les directions. Cependant, dans les cultures plus âgées, les isolats deviennent immobiles et prennent une forme plutôt sphérique.

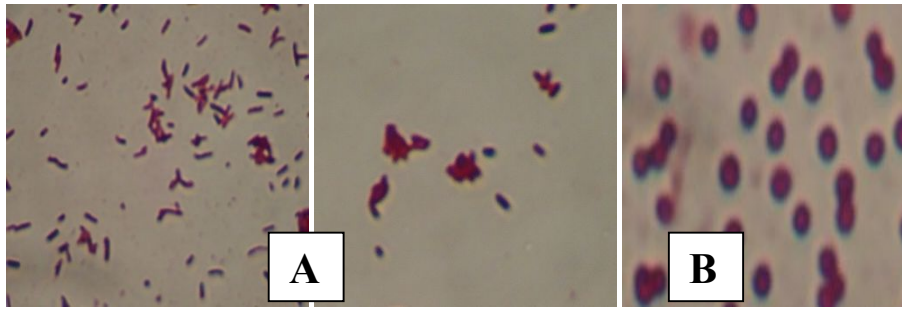
La coloration des spores a révélé l'absence des spores chez les quatre isolats (**Figure 47**).



**Figure 47** : Aspect microscopique des isolats après coloration des spores (G\* 1000).

La coloration de Gram et l'observation microscopique des quatre isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD), incubés à une température de 30°C pendant 24heures ont montré la présence de cellules bactériennes sous forme de bacilles courts à extrémités arrondies. Cependant, l'incubation des quatre isolats à une température de 30°C pendant 5 jours a montré que les cellules prennent une forme sphérique très proche de la forme des levures. Dans les deux cas, les cellules sont associées en paire (**Figure 48.A et Figure 48.B**).

Ce qui suggère que le changement de la forme des cellules et l'agencement des cellules est dû à la formation de Cystes par ces isolats.

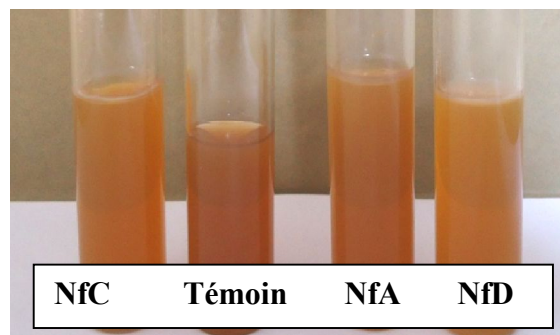


**Figure 48** : Aspect microscopique des quatre isolats après coloration de Gram, **A** : Isolat NfA et Nf5 incubés à une température de 30°C pendant 24h, **B** : Aspect microscopique des isolats incubés à une température de 30°C pendant 5 jours ( $G^* 1000$ ).

Les quatre isolats sélectionnés (Nf5, NfA, NfC et NfD) ont manifesté une réaction positive à la présence de l'enzyme d'oxydase, traduite par l'apparition d'une coloration violette.

### 7.2. Mise en évidence du type respiratoire

La mise en évidence du type respiratoire des bactéries isolées sélectionnées est effectuée sur milieu de culture Viande-foie. Les résultats obtenus ont montré que les 4 isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD) ont manifesté une croissance uniquement dans la partie supérieure du milieu de culture utilisé. A cet effet, les 4 isolats (Nf5, NfA, NfC et NfD) sont des bactéries aérobies strictes (**Figure 49**).



**Figure 49** : Aspect des tubes à essai contenant le milieu de culture VF, ensemencé avec les isolats NfA, NfC et NfD.

### 7.3. Identification biochimique par la galerie Api 20E

Les résultats obtenus lors de l'inoculation et incubation des isolats (Nf5, NfA, NfD, NfC) pendant 24-48 sur la galerie Api 20 E, rapportés dans le **tableau 11**, sont interprétés selon le Bergey's manual of systematic bacteriology (Brenner *et al.*, 2005).

## *Résultats*

Selon le Bergey's manual of systematic bacteriology (Brenner *et al.*, 2005), les isolats Nf5, NfA, NfC et NfD partagent les caractéristiques suivantes avec les bactéries du genre *Azotobacter* : le type respiratoire, la mobilité par des flagelles péritriches, l'incapacité à la production des spores, la forme des cellules, le changement de forme des cellules avec l'âge des cultures, la production de cystes, la production de pigment dans les cultures âgées de plus de trois jours, la transformation de l'aspect des colonies du lisse (dans les cultures jeunes) au rugueux, la production d'oxydase et de catalase, la dégradation du glucose, l'absence de la gélatinase, l'incapacité à la production de H<sub>2</sub>S et la dégradation variable du rhamnose, du manitol, du sorbitol, du melibiose et de l'Inositol. Cependant, avec l'indisponibilité des informations sur les caractères suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, TDA, IND et VP, les isolats sont identifiés comme étant des *Azotobacter sp.*

**Tableau 11:** Identification biochimique des isolats Nf5, NfA, NfD et NfC.

Morphological and biochemical characterization	Nf5	NfA	NfD	NfC
<b>Mobilité</b>	+	+	+	+
<b>Flagelles peritriches</b>	+	+	+	+
<b>Spore</b>	-	-	-	-
<b>Brown pigment</b>	+	+	+	+
<b>Cyste</b>	+	+	+	+
<b>Oxidase</b>	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	+	+	+	+
<b>ONPG</b>	-	-	+	-
<b>ADH</b>	+	+	+	+
<b>LDC</b>	-	-	+	-
<b>ODC</b>	-	-	-	-
<b>CIT</b>	+	-	+	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-
<b>URE</b>	-	-	-	+
<b>TDA</b>	+	+	+	+
<b>IND</b>	-	-	+	+
<b>V P</b>	-	-	-	-
<b>Gelatine</b>	-	-	-	-
<b>Glucose</b>	+	+	+	+
<b>Mannitol</b>	-	-	+	+
<b>Inositol</b>	-	+	+	+
<b>D-Sorbitol</b>	-	+	+	+
<b>L-Rhamnose</b>	-	-	+	+
<b>D-melibiose</b>	-	+	+	+
<b>D-sucrose</b>	-	+	+	+
<b>L-Amygdalin</b>	-	+	-	+
<b>L-Arabinose</b>	-	-	+	-
<b>Identification</b>	<i>Azotobacter sp.</i>	<i>Azotobacter sp.</i>	<i>Azotobacter sp.</i>	<i>Azotobacter sp.</i>

### 8. Mise en évidence de l'effet biofertilisant et biopesticide de la souche NfA

Dans le but d'évaluer l'effet de la souche NfA sur le développement et la résistance des graines du pois chiche au phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, un essai de culture comportant quatre traitements est effectué. Après 4 semaines de l'inoculation, les jeunes plantules ont permis d'explorer les paramètres suivants: pourcentage de germination, longueur des tiges et des racines, poids sec et poids frais des parties racinaires et aériennes. Les résultats obtenus ont permis de réaliser une analyse statistique à un seuil de probabilité de  $P < 0.05$ , à l'aide du logiciel STATITCF. Les effets significatifs sont comparés par le test de Newman & Keuls. Les quatre traitements réalisés ont significativement affecté la germination, le développement et la santé des plantules de pois chiche (**Annexe 6.A, Figure 51 et Figure 52**).

Le taux de germination des grains a varié considérablement d'un traitement à l'autre, les traitements comportant une inoculation avec la souche NfA ont donné un taux de germination maximal de 100%, par rapport à 9% du taux de germination du témoin (**Figure 50**) Cependant, l'inoculation avec la souche fongique a engendré une réduction du taux de germination supérieur à 16 % par rapport au témoin.

Malgré les variations observées sur le taux de germination, lors du test Newman & Keuls, les quatre traitements ont formé un seul groupe homogène (**Annexe 6.B**). Ce qui signifie que, les traitements effectués ont exercé un effet similaire sur le taux de germination du pois chiche.

Le développement de la longueur des plantules de pois chiche a varié considérablement en fonction des traitements effectués (**Figure 50**), l'inoculation avec la souche NfA a contribué à une importante amélioration de la longueur de tige avec une augmentation de 24.16% et 3.64% de la longueur des parties aérienne et racinaire, respectivement, par rapport au témoin négatif. La double inoculation avec la souche NfA et l'agent phytopathogène a permis une neutralisation de l'effet néfaste du phytopathogène observé chez le témoin positif et une stimulation du développement des plantes par rapport au témoin négatif (**Figure 50**). Les taux d'amélioration du développement de la taille des plantes issues de ce traitement est de l'ordre de 10% par rapport au témoin négatif et de 20% et 15% pour la longueur des tiges et des racines, respectivement, par rapport au témoin positif.

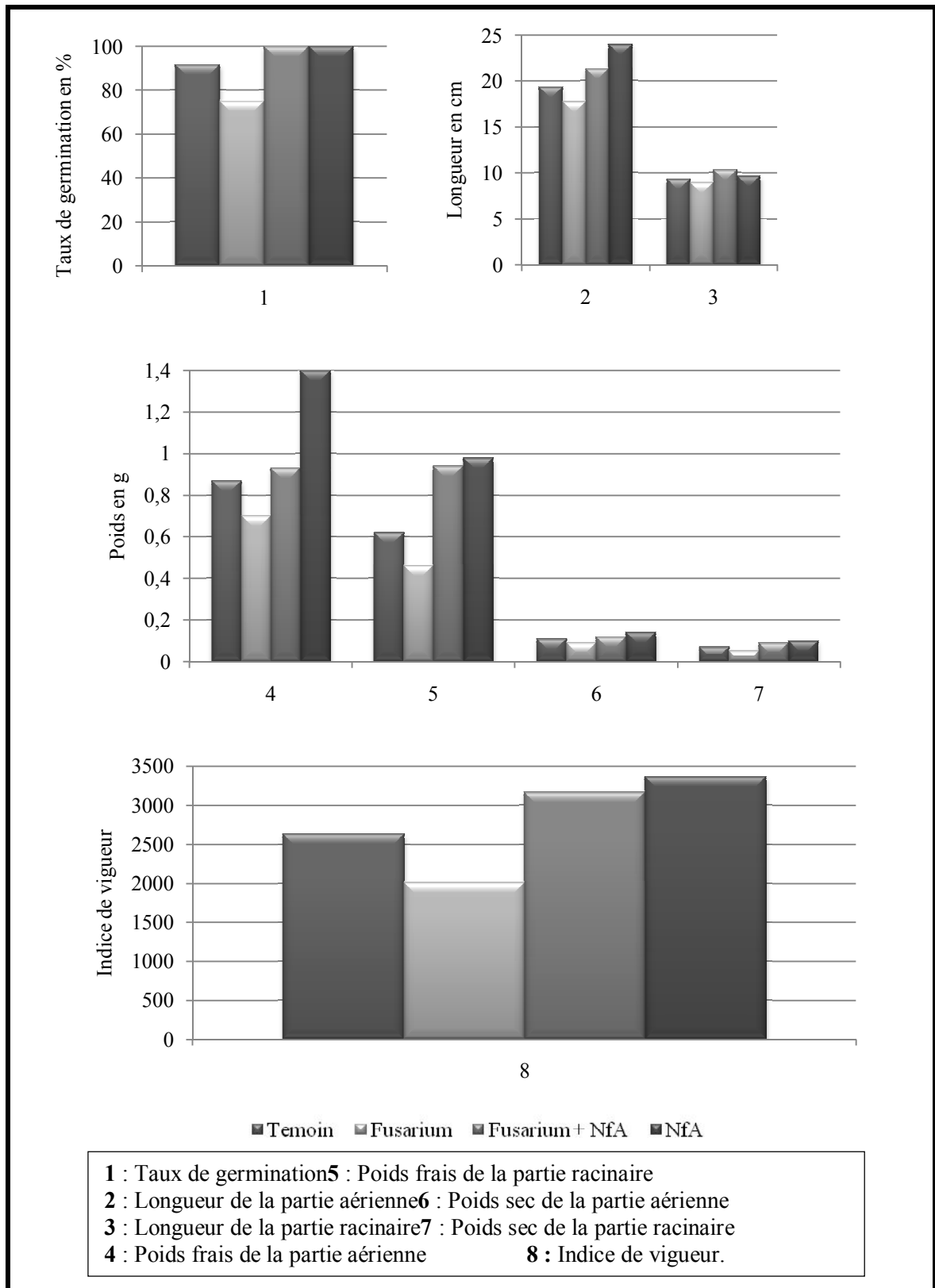


Figure 50 : Résultats du test de la mise en évidence de l'effet biofertilisant et biopesticide de la souche NfA.



**Figure 51** : Développement des plantes des différents traitements après 3 semaines de l'inoculation.

Le suivi de la production de la biomasse constitue un paramètre primordial dans l'évaluation de l'effet PGPR d'une souche candidate. Les résultats obtenus de l'étude des paramètres impliqués dans la production de la biomasse tels que le poids frais et le poids sec sont considérablement affectés par les différents traitements réalisés. La production de matière fraîche a nettement augmenté par rapport au témoin négatif après l'inoculation avec la souche NfA (**Figure 50**). Les taux de la production obtenus du poids frais de la partie aérienne et de la partie racinaire ont augmenté à 60% et 58% respectivement.

Les paramètres de la longueur des tiges et des racines, la double inoculation avec la souche NfA et l'agent phytopathogène ont engendré, outre la neutralisation de l'effet délétère du phytopathogène, une importante amélioration de la capacité des plantes à produire de la matière fraîche (**Figure 50**).



**Figure 52 :** Développement des symptômes de fusariose sur les plantes inoculées avec le phytopathogène après 3 semaines de l'inoculation.

Une corrélation entre les variations de la production de matière sèche et les résultats obtenus des autres paramètres est observée, expliquée par l'amélioration de l'accumulation de matière sèche lors de l'inoculation avec la souche NfA (**Figure 50**).

Lors de l'inoculation avec la souche NfA, la production du poids de la partie aérienne a augmenté de 27% par rapport au témoin négatif et de 55% par rapport au témoin positif et la production du poids de la partie racinaire a augmenté de 42% par rapport au témoin négatif et de 100% par rapport au témoin positif. La double inoculation a exercé un effet très bénéfique sur la production de matière sèche. Le taux de production de poids sec de la partie aérienne a augmenté de 0.09g chez le témoin positif et à 0.12 chez les plantes doublement inoculées (une augmentation de 33%). Cependant, le taux de production de poids sec de la partie racinaire a augmenté de 0.05g chez le témoin positif et à 0.09 chez les plantes doublement inoculées (une augmentation de 80%).

Lors de la réalisation du test de Newman & Keuls (**Annexe 6.B**), les traitements comportant une inoculation avec la souche NfA en présence et en absence du phytopathogène ont permis la formation des deux meilleurs groupes homogènes. Cependant, les autres traitements en présence des témoins positifs et négatifs ont permis la formation d'un groupe homogène, ce qui signifie que les traitements comportant une inoculation avec la souche NfA ont exercé un effet très favorable sur tous les aspects du développement des plantes de pois chiche.



## *Résultats*

---

Les résultats du calcul de l'indice de vigueur sont en parfaite corrélation avec le taux de germination et la longueur des racines et des tiges (**Figure 50**), ce qui explique l'effet positif de l'inoculation avec la souche NfA en présence et en absence du phytopathogène.

### Discussion

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet des sols et des variétés sur le développement du pois chiche, l'enrichissement du sol avec de la microflore rhizosphérique bénéfique et l'isolement des bactéries PGPR diazotrophes.

Les résultats obtenus ont montré que le sol d'Ain Tolba est le mieux adapté pour la culture du pois chiche. Par ailleurs, les sols d'Ain Temouchent et Tessala ont manifesté également un effet positif sur la croissance des variétés de pois chiche utilisées. Les résultats obtenus se concordent avec les travaux antérieurs rapportés par [Bouras, \(2010\)](#), qui suggère l'effet positif des sols d'Ain Temouchent et Tessala sur le développement des plantes de pois chiche.

Par ailleurs, les résultats obtenus sur le sol d'Ain Tolba sont en corrélation avec le taux élevé de phosphore assimilable et la faible teneur en azote. Le phosphore favorise le développement racinaire et la nodulation chez les légumineuses et les faibles teneurs en azote stimulent l'activité de la fixation d'azote par les bactéries diazotrophes ([Ghalem, 2010](#)).

Sur le plan variétal, les résultats obtenus se concordent avec les travaux réalisés par [Bouras, \(2010\)](#), qui a constaté la capacité de la variété Flip 93.93C à se développer en longueur avec une importante production de la biomasse.

[Roy, \(1970\)](#), [Graham, \(1973\)](#) et [Nutman, \(1976\)](#) ont rapporté la dépendance du développement nodulaire du pois chiche de son génotype. Les interactions sols  $\times$  variétés ont fourni des résultats semblables aux résultats des effets de sols et de variétés.

L'utilisation de Flip 93.93C, une variété de choix pour l'évaluation des effets des caractéristiques édaphiques sur la croissance du pois chiche, a montré un important potentiel de production sur les sols testés ([Bouras, 2010](#)).

L'utilisation du sol d'Ain Tolba a manifesté un effet très favorable sur le développement des deux variétés, due probablement aux caractéristiques physico-chimiques et à l'efficacité de la microflore.

Vue l'importance des caractéristiques physico-chimiques du sol et la présence d'une microflore dans le sol d'Ain Tolba, des échantillons sont prélevés pour l'isolement de bactéries diazotrophes libres performantes capables de stimuler la croissance du pois chiche.

Un choix d'isolement des bactéries diazotrophes est justifié par l'importance de l'azote, l'élément nutritif indispensable pour le développement des plantes et en présence limitée dans les sols (Martinez-Viveros *et al.*, 2010 ; Bhattacharyya et Jha, 2012). Le screening primaire des bactéries diazotrophes, basé leur capacité de fixer l'azote atmosphérique a permis l'isolement de 12 isolats de caractère morphologique, macroscopique et microscopique différent.

Les isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Nf5, NfA, NfC et NfD) sont des bacilles Gram négatives, mobiles, aérobies strictes, avec une réaction à la catalase et l'oxydase positive, produisent une pigmentation brune-noire avec un aspect granuleux sur milieu de culture N-free et se transforment en cocci immobiles dans les cultures âgées.

L'observation phénotypiques et l'identification biochimique des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Nf5, NfA, NfC et NfD) a montré leur appartenance au genre *Azotobacter* (Brenner *et al.*, 2005). La croissance d'*Azotobacter* est favorisée par la valeur très alcaline du pH des sols utilisés. Des travaux antérieurs réalisés par Dommergues et ses collaborateurs (1970) ont rapporté que les bactéries appartenant au genre *Azotobacter* sont largement rencontrées dans ce type de sol, avec une population de  $10^6$ - $10^7$  cellules/g de sol.

Joseph *et al.* (2007) ont rapporté sur l'abondance d'*Azotobacter* dans la rhizosphère du pois chiche, avec une population de  $0.3$ - $1.7 \times 10^6$  par gramme de sol. Nihorimbere *et al.*, (2011), ont suggéré que la mobilité des cellules constitue un trait important des PGPR et leur permet d'atteindre la surface des racines. L'activité du catalase est présente chez 66.66% des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (y compris les souches d'*Azotobacter*). Des études antérieures réalisées par Malleswari et Bagyanarayana, (2013) ont rapporté que les bactéries manifestant une activité du catalase sont hautement résistantes aux stress environnementaux.

Le screening primaire des isolats diazotrophes est procédé par la mise en évidence de la synthèse d'acide indole acétique, la solubilisation du tricalcuim phosphate, la production de HCN, la production d'enzyme lytiques et l'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum*.

Les bactéries PGPR contribuent à l'amélioration de l'alimentation des plantes par la solubilisation du phosphore. L'activité de la solubilisation du phosphore est observée chez les isolats sélectionnés fixateurs d'azote, traduite par la formation d'un halo clair

autour des colonies inoculées sur milieu de culture de Pikovskaya, additionnée d'une source de phosphate le TCP.

Beneduzi et Passaglia, (2011), ont rapporté sur la prédominance des bactéries solubilisatrices du phosphore dans la rhizosphère et ils les estimées à près de 20-40% de la population bactérienne du sol.

Les isolats sélectionnés fixateurs d'azote (NfA, NfC et NfD) ont manifesté des taux de solubilisation du phosphore très variables, avec des indices de solubilisation de (1.83, 1.83 et 3.03) respectivement. Cependant, la souche Nf5 a manifesté une très faible activité de solubilisation de phosphore.

Des travaux antérieurs réalisés par Narula *et al.*,(2002) ;Ahmad *et al.*,(2008a) ; Silini, (2013) ; Prakash et Karthikeyan, (2013) et Nosrati *et al.*,(2014) ont rapporté la présence d'une activité de solubilisation du phosphore chez les souches d'*Azotobacter*.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux rapporté par Silini, (2013) et Ahmad *et al.*, (2013), qui ont suggéré la présence d'une variabilité dans l'activité de solubilisation de phosphore chez des souches d'*Azotobacter*. Silini, (2013) a rapporté sur l'absence et la présence de solubilisation du phosphore chez *Azotobacter*, cultivée sur le milieu de culture solide et liquide respectivement, ce qui s'expliqué par le faite que les acides organiques sont difficilement libérés dans le milieu de culture solide.

L'activité de solubilisation du phosphore exprimé par les souches d'*Azotobacter* (NfA, NfC et NfD) est comparable aux résultats publiés par Narula *et al.*, (2002) et Nosrati *et al.*, (2014), qui ont trouvé des indices de solubilisation du phosphore compris entre 1.3-4 chez des souches d'*Azotobacter*.

La production de l'acide indole-acétique induit la formation des poils racinaires et des racines latérales, qui augmente la capacité d'absorption des nutriments des plantes à partir du sol (Ambreen Akhtar *et al.*, 2012).

La mise en évidence de la production de cette molécule est effectuée par des types de techniques qualitative et quantitative. L'inoculation des isolats sélectionnés fixateurs d'azote dans un milieu de culture Luria en absence du L-tryptophane a montré l'absence de la production de l'acide indole-acétique. Cependant, L'inoculation des isolats en présence du L-tryptophane a révélé la production de l'acide indole-acétique sur les milieux de culture utilisés (solide et liquide). Dans le sol, une proportion de 80% des rhizobactéries est productrice de l'acide indole-acétique (Ponmurugan *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux réalisés par El-Mahrouk et Belal, (2007) ;Sethi et Adhikary, (2012) et Ponmurugan *et al.*,(2012),qui ont rapporté que la production de l'acide indole-acétique est fortement liée à la présence du L-tryptophane, dans le milieu de culture utilisé, chez les bactéries diazotrophes notamment des *Azotobacter*.

Les isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Nf2, Nf10 et NfA) ont produit des taux de l'acide indole-acétique de (2.5, 2.4 et 2.15µg/ml) respectivement. Par ailleurs, les isolats (NfD et NfC) ont manifesté une production moyenne de (1.3, 1.05 µg/ml) respectivement. Des travaux réalisés par Narula *et al.*, (2002), Naz *et al.* (2012) et Esteban Julian Rubio *et al.* (2013) ont rapporté des taux similaires de la production l'acide indole-acétique chez des souches d'*Azotobacter*.

Ahmad *et al.*,(2008b),Vikram, (2011), Ponmurugan *et al.*,(2012) et Silini, (2013) ont suggéré que la production d'acide indole-acétique chez des souches d'*Azotobacter* a augmenté considérablement avec l'augmentation de la concentration du L-tryptophane ajoutée dans le milieu de culture de (1-5 mg/ml).

Les enzymes lytique telles que les cellulases, les protéases et les chitinases sont caractérisées par leur activités antagonistes contre les champignons phytopathogènes et les insectes (Naiket *et al.*, 2008).

La mise en évidence de la présence de protéases chez les isolats est effectuée sur milieu de culture Milk agar en présence de la caséine du lait écrémé comme substrat.

Les résultats obtenus ont montré que 10 isolats ont hydrolysé la caséine, dont 2 isolats (NfC et NfA) sont identifiées comme étant des *Azotobacter*. La présence des activités protéolytiques chez les bactéries PGPR a permis leur utilisation dans la lutte contre les champignons phytopathogènes. Dunne *et al.*,(1997), ont rapporté que le bio-contrôle exercé par *Stenophomonas maltophila* contre *Pythiumultimum* est dû principalement à la production des protéases extracellulaires.

Par ailleurs, Dunne *et al.*,(2000) ont suggéré que la surproduction des protéases extracellulaire chez une souche mutante de *Stenophomonas maltophila* a amélioré son activité antagoniste contre *Pythiumultimum*.

Shadia *et al.*,(2012),ont rapporté que la culture d'une souche de *B. alvei*, NCR-14 sur milieu de culture contenant la chitine fongique comme source d'azote et de carbone ont induit la production de divers enzymes telles que les protéases.

La cellulose peut constituer de 7% à 30% de la composition pariétale des champignons (Badreddine, 2008). L'activité cellulolytique des isolats est évaluée par

l'étude de la croissance sur un milieu de culture liquide en présence d'une bande en papier immergée (cellulose) comme seule source de carbone.

L'incubation à une température de 30°C pendant 4 semaines et la mesure de densité optique à une longueur d'onde de 600 nm a montré une importante activité cellulolytique chez la totalité des isolats testés. Les isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Nf1, Nf5, Nf8, Nf10, NfA et NfC) ont manifesté une activité cellulolytique, traduite par la dégradation de la cellulose contenue dans le milieu de culture.

Des travaux antérieurs réalisés par (Ramkumar, *et al.*, 2006 ; Belaouni, 2011; Djuric *et al.*, 2011 ;Kavitha *et al.*, 2013 ; Abdel-Aziez *et al.*, 2014et Reethaet *al.*, 2014) ont rapporté que les bactéries rhizosphériques telles que *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Azospirillum* et *Bacillus* peuvent manifester une activité cellulolytique. Par ailleurs, les souches d'*Azotobacter* peuvent être utilisées dans la formulation de bioinoculants des déchets cellulosiques et la production de biofertilisants (Ahmad *et al.*, 2013).

Les chitinases hydrolysent la chitine qui peut représenter jusqu'à 60 % du contenu pariétal des champignons (Badreddine, 2008). La recherche de l'activité chitinolytique des isolats est effectuée sur milieu de culture minimal en présence de la chitine colloïdale comme seule source d'azote et de carbone. Elle est évaluée par la mesure des diamètres des zones hydrolysées formées.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 12 bactéries fixatrices d'azote isolées, trois souches (NfA, NfC et NfD) ont manifesté une activité chitinolytique avec des diamètres d'hydrolyses de (1.83, 1.7, 1.6) respectivement. L'expression d'une activité chitinolytique par les souches (NfA, NfD et NfC) peut permettre la suppression des phytopathogène, les chitinases hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1.4 reliant le N-acetyl-D-glucosamine et le D- glucosamine (composantes de la chitine) en générant des polymères partiellement acétylés (Khan *et al.*, 2009). Ces polymères agissent comme des éliciteurs des réponses défensive des plantes (Saraf *et al.*, 2011).

Le HCN est un antibiotique volatile produit chez les bactéries PGPR et intervient dans l'inhibition de l'activité des cytochromes oxydases de nombreux organismes (Andrés *et al.*, 2011).

La mise en évidence de la production de HCN chez les isolats fixateurs d'azote est effectuée par l'étude de leur capacité de décoloration du picrate alcalin du jaune au brun, Les résultats obtenus chez les isolats (Nf1,Nf2, Nf3 et Nf5) ont manifesté une excellente production de HCN.

Des travaux réalisés par Yildiz *et al.*, (2012) et Ponmurugan *et al.*,(2012) ont rapporté sur la production de HCN chez les bactéries diazotrophes. Srivastava *et al.*,(2012) ; Silini, (2013) et Ahmed *et al.*,(2014) ont trouvé la production de HCN chez les bactéries appartenant du genre *Azotobacter*.

La production de HCN chez les souches d'*Azotobacter* semble être peu fréquente. Des études antérieures réalisées par Ahmed *et al.*, (2014) sur le screening de 24 souches appartenant au genre *Azotobacter*, ont permis la sélection de 13 isolats producteurs de HCN.

Silini, (2013), a rapporté sur l'absence de la production de HCN chez les 9 souches d'*Azotobacter* testées. L'incapacité des bactéries à la production du HCN est due à l'absence des gènes (*hcn*) responsables de la synthèse de cette molécule.

L'antibiose est le mécanisme utilisé par les PGPR pour la limitation de l'invasion de l'agent pathogène dans les tissus de la plante-hôte (Silini, 2013). L'inhibition de la croissance du phytopathogène *Fusarium oxysporum* par les isolats fixateurs d'azote est évaluée par le test de l'antagonisme.

La totalité des isolats fixateurs d'azote ont manifesté une activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*. Les isolats sélectionnés (Nf3 et Nf10) ont montré une forte activité antifongique avec des taux d'inhibition de 61 %. Par ailleurs, les isolats (NfA, NFC, NF9, NFD, NF11et NF5) ont manifesté une faible activité antifongique avec des taux d'inhibition de 22%.

Les isolats fixateurs d'azote ont manifesté une importante activité d'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum*, ce qui s'explique par la production de HCN. Par ailleurs, les taux d'inhibition sont fortement liés à la présence des activités lytiques. L'importance des activités protéolytique et cellulolytique des isolats sélectionnés (Nf8 et Nf10), laisse suggéré leur contribution dans les activités antifongiques. Cependant, l'activité chitinolytique exprimée par les souches NfA, NfC et NfD n'a induit une importante inhibition de *Fusarium oxysporum*.

L'élimination des agents fongiques phytopathogènes constitue un trait caractéristique de nombreux PGPR. Ahmad *et al.*, (2008a) ont examiné l'effet antifongique de six souches d'*Azotobacter* vis à vis *Aspergillus sp.*, *Fusarium solani*, *Fusarium ciceri*, *Fusarium oxysporum* et *Rhizoctonia bataticola*, les résultats obtenus ont montré que les *Azotobacter* ont inhibé la croissance des agents fongiques phytopathogènes à 100 % pour d'*Aspergillus sp.* et *Fusarium oxysporum*, 50% pour *Fusarium solani* et *Rhizoctonia bataticola* et 33.33% pour *Fusarium ciceri*. Des études antérieures

rapportées par Silini, (2013), sur l'activité antifongique de 9 souches d'*Azotobacter* ont montré que 80% des souches testées ont inhibé la croissance de *Phytophthora infestans*, 50% le *Fusarium solani*, 30% le *Fusarium* sp. et *Alternaria alternata* et moins de 20% le *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*.

En agriculture, la promotion de la croissance des plantes par les PGPR signifie l'augmentation du taux de germination et d'émergence, la production de biomasse et l'amélioration de la prolifération du système racinaire et du rendement dans diverses espèces de plantes (Podile et Kishore, 2006). L'effet sur la germination du pois chiche Les souches (Nf5, NfA, NfD et NfC) ont manifesté un excellent pouvoir de promotion sur la germination des graines et le développement des jeunes plantules. Les indices de la vigueur obtenus ont confirmé l'effet positif de l'inoculation du pois chiche par les souches (NfA, NfC et NfD). La germination est le stade le plus critique du développement des plantes (Almansouri *et al.*, 2001). Des travaux antérieurs réalisés par Dubeyet *et al.*, (2012) ; Silini, (2013) ; Bandhu Raj Baral et Parbati Adhikari, (2013) ; Abdel-Aziez *et al.*, (2014) et Faramawy, (2014) ont rapporté de l'effet stimulateur des *Azotobacter* sur la germination de diverse plantes.

Silini, (2013) a rapporté que l'utilisation des souches d'*Azotobacter* isolées à partir de sols algériens a amélioré la germination du blé significativement.

Lenin et Jayanthi, (2012) ont rapporté que la formulation de bactéries PGPR comportant *Azotobacter chroococcuma* amélioré significativement le taux de germination, l'indice de vigueur et la contenance en chlorophylle de *Catharanthus roseus*.

Saikia et Bezbaruah, (1995) ont constaté une augmentation significative du taux de germination du pois chiche, lors de l'inoculation par *Azotobacter*. L'effet de promotion induit par les souches d'*Azotobacter* inoculées dans le pois chiche est le résultat des activités des bactéries PGP, traduites par la production d'AIA. L'utilisation de souches d'*Azotobacter* productrices d'AIA comme inoculum a induit un effet bénéfique sur la germination et la croissance des plantes (Silini, 2013).

Magda *et al.*, (2012), le trempage des graines de blé stérilisées dans le filtrat des cultures d'*Azotobacter* producteur d'AIA a amélioré significativement le taux de germination et l'indice de germination des graines.

La fusariose est une maladie vasculaire causée par *Fusarium oxysporum*. Elle cause des pertes annuelles de rendement estimées entre 10% à 90% (Tlemsani, 2010).



L'évaluation de l'effet de la souche NfA sur le développement et la résistance des graines du pois chiche au phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, est effectué par l'inoculation du pois chiche. Pour cette opération la variété Flip 93.93C a été utilisée pour la réalisation de quatre traitements.

Les résultats obtenus ont confirmé l'effet phyto-stimulateur et phyto-protecteur de la souche NfA. L'inoculation de cette souche a amélioré considérablement le taux de germination de 9% et 25% par rapport aux témoins négatif et positif respectivement, accompagnée d'une augmentation de la production de la biomasse végétale (poids sec et poids frais) et la longueur des tiges, des racines.

Le calcul de l'indice de vigueur a révélé l'effet positif de la souche NfA sur l'état de santé des plantes en présence et en absence du phytopathogène.

Yadav *et al.*, (2010) ; Magda *et al.*, (2012) ; Silini, (2013) et El-Halmouch *et al.*, (2013) ont rapporté l'effet favorable des *Azotobacter* sur le développement et la santé des plantes inoculées. Les résultats obtenus se concordent avec les travaux publiés par Chauhan *et al.*, (2012), qui ont rapporté que les souches d'*Azotobacter* se manifestent comme des agents de biocontrôle efficace contre la croissance de *R. solani* coton et *R. solani* riz.

El-Halmouch *et al.*, (2013) ont rapporté la capacité des *Azotobacter* à réduire l'incidence d'*Orobanche crenata*, une herbe phytoparasite sur le développement de la fève. La souche NfA est une bactérie PGPR très appréciable, car elle a assuré deux effets bénéfiques pour le développement du pois chiche inoculé : la promotion de la croissance et une protection contre la fusariose. La probabilité que la souche soit capable d'induire les mécanismes défensifs de la plante hôte n'est pas à exclure vu sa capacité à produire des enzymes lytiques (cellulase, protéase et chitinase). Landa *et al.*, (2002) a rapporté que la stimulation de la croissance des plantes est due principalement à l'inhibition des phytopathogènes, et l'induction des mécanismes de défense de l'hôte contre les agents pathogènes.

### Conclusion & perspectives

Dans l'agriculture pratique, l'amélioration des rendements suscite une utilisation excessive des produits chimiques. Cette pratique n'est pas seulement coûteuse mais cause aussi des dégâts irrémediables à l'environnement. Actuellement et avec le développement des connaissances, une nouvelle alternative est apparue, celle de l'exploitation des ressources naturelles et de l'utilisation des microorganismes. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail.

Dans ce présent travail, six sols et deux variétés de pois chiche sont utilisés afin d'explorer l'effet des sols et des variétés sur le développement des plantes obtenues. Les six sols ont engendré une variabilité significative dans le développement du pois chiche. Le sol testé d'Ain Tolba se manifeste favorable à la culture du pois chiche.

Sur le plan variétal, la variété Flip 93.93C a montré une bonne croissance avec des niveaux de développement très stables.

Les 12 isolats bactériens sélectionnés fixateur d'azote isolés à partir du sol d'Ain Tolba sont testés *in vitro* pour la solubilisation du phosphore, la production d'AIA, la production d'enzymes lytiques (protéase, de la cellulase et de la chitinase), la synthèse de HCN et l'inhibition de la croissance du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*.

Toutes les bactéries isolées ont manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*. Par ailleurs, les isolats NfA, NfD et NfC, ont montré une bonne capacité de solubilisation du phosphore, une activité antagoniste modérée et une bonne activité protéolytique, cellulolytique et chitinolytique.

A l'exception de la souche Nf5, la majorité des isolats se manifeste capable de produire l'acide indole acétique à partir du L-tryptophane. L'identification phénotypique des isolats (NfA, NfC, NfD et Nf5) a montré leur appartenance au genre *Azotobacter*.

L'effet de la souche NfA sur le développement et la résistance du pois chiche au phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, est testé sur la variété Flip 93.93C en présence et en absence de l'agent phytopathogène. La souche NfA a assuré deux effets bénéfiques pour le développement du pois chiche : la promotion de la croissance, améliorant ainsi le rendement en biomasse végétale, et une protection contre la fusariose.

Des questions subsistent et de nouvelles perspectives s'ouvrent afin de compléter les connaissances sur la souche NfA :

- Identification moléculaire de la souche NfA.
- L'étude des mécanismes impliqués dans les capacités de biocontrôle de la souche NfA.
- l'expérimentation de l'effet de la souche NfA sur des cultures de diverse plantes d'intérêt,
- La production de bio-inocula des bactéries PGPR telles que les rhizobia et les bacilles sporo-formant.

**Acuña J. J., Jorquera M. A., Martínez O. A., Menezes–Blackburn D., Fernández M. T., Marschner P., Greiner R., Mora M. L. (2011).** Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 11 (3): 1-12.

**Ahemad M., Khan M.S. (2012).** Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata*(L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 451-459.

**Ahemad M., Kibret M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*. 26: 1-20.

**Ahmad B., Nigar S., Malik N. A., Bashir S. Ali J., Yousaf S., Bangash J. A., Jan I. (2013).** Isolation and Characterization of Cellulolytic Nitrogen Fixing *Azotobacter* species from Wheat Rhizosphere of Khyber Pakhtunkhwa. *World Appl. Sci. J.* 27 (1): 51-60.

**Ahmad F., Ahmad I., Aqil F., Khan M. S., Hayat S. (2008a).** Diversity and potential of non symbiotic diazotrophic bacteria in promoting plant growth. *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Edited by Iqbal Ahmad, John Pichtel, and Shamsul Hayat. Copyright 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

**Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. (2005).** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *fluorescent Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, 29: 29-34.

**Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. (2008b).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163: 173-181.

**Ahmad I., Pichtel J., Shamsul H. (2008).** *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Copyright 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 329.

**Ahmadzadeh M., Tehrani A. S. (2009).** Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control*. 48(2): 101- 107.

- Ahmed E. A., Hassan E. A., El Tobgy K. M. K., Ramadan E.M. (2014).** Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. *Annals of Agricultural Science*. 59(2): 273-280.
- Almansouri M., Kinet J.M., Lutts S. (2001).** Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant Soil*. 231:243-254.
- Ambreen Akhtar; Hisamuddin; Merajul Islam Robab; Abbasi, Rushda Sharf. (2012).** Plant growth promoting Rhizobacteria: An overview. *J. Nat. Prod. Plant Resour*. 2 (1):19-31.
- Andrés J. A., Rovera M., Guinazu L. B., Pastor N. A., Rosas, S. B. (2011).** Chapter 5: Role of *Pseudomonas aurantiaca* in Crop Improvement. In : D.K. Maheshwari (ed.). 2011. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-20332-9-5.
- Anne P. (1945).** Le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann. Agron*. 2: 161-172.
- Ansari M. F., Tipre D. R., Shailesh R. D. 2015.** Exploring the Multi-trait Plant Growth Promotion Capability of Commercial Liquid Biofertilizers Isolates. *International Journal of Life Sciences*. 9 (3) : 24 - 37.
- Antoun H. et Prévost D. (2005).** Chapter 1: ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: **Z. A. Siddiqui** (ed.). 2005. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* © 2005 Springer. 1-38.
- Babo B. V. (2002).** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkinafaso. Thèse Doctorat. Université Laval, Québec.
- Bacha F., Ounane S. M. (2003).** Etude de l'effet du stress hydrique sur les activités des enzymes nitrate réductase et nitrogenase de la culture du pois chiche (*Cicer arietinum* L). Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. 13 : 1111-1992.
- Badreddine I. (2008).** Etude des surfaces cellulaires d'*Aphanomyces euteiches*, parasite majeur de légumineuses. Thèse de doctorat. Université Toulouse III. France.
- Bais H.P., Weir T. L., perry L.G., Gilroy S., Vivanco J. M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Boil*. 57: 233- 66.

- Bandhu Raj Baral et Parbati Adhikari. (2013).** Effect of *Azotobacter* on growth and yield of maize. SAARC J. Agri. 11(2): 141-147.
- Barassi C.A., Ayrault G., Creus C.M., Sueldo R.J., Sobrero M.T. (2006).** Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Hort.*, 109: 8-14.
- Barriuso J., Solano B. R., Lucas J. A., Lobo A. P., García-Villaraco A., Gutiérrez Mañero F. J. (2008).** Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: **Ahmad I., Pichtel J., Shamsul, H. (2008).** Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth. Copyright 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 329.
- Baudoin J-P. (2001).** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 5(4): 221-230.
- Beauchamp C. J. (1993).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*. 74(1) : 19-27.
- Beauregard M-S. (2010).** Impacts de la fertilisation phosphatée sur la biodiversité microbienne de sols agricoles. Thèse de doctorat. Université de Montréal.
- Beddar N. (1990).** Analyse de l'effet de l'inoculation par différentes souches de *Rhizobium* sur l'élaboration du rendement chez les pois chiche (*Cicer arietinum* L) var ILC3279. Mémoire d'ingénieur agronome. Université de Sétif.
- Bejiga G., Van Der Maesen L. J. G. (2006).** *Cicer arietinum* L. In: Plant Resources of Tropical Africa 1: Cereals and Pulses. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands/Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands/CTA, Wageningen, Netherlands.
- Belahcene N. F. (2008).** Contribution au développement durable de l'agriculture dans les monts de Tessala wilaya de Sidi Bel Abbes, Algérie. Mémoire de magister. Université de Tlemcen.
- Belaouni H. A. (2011).** Screening et caractérisation du potentiel antifongique de rhizobactéries du sol Algérien pour la lutte biologique anti *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Mémoire de Magister. Université de Sidi Bel Abbes.

- Ben Mbarek K. (2011).** Comportement du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) du type «kabuli » vis-à-vis du stress hydrique et identification de génotypes tolérant la sécheresse. Thèse de doctorat. Université de Sousse.
- Beneduzi A., Passaglia L.M.P. (2011).** Chapter 1: Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Bacilli. In: **D.K. Maheshwari** (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, DOI 10.1007/978-3-642-20332-9-1.
- Benzohra I. (2009).** Contribution à l'étude de *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., agent causal de l'antracnose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.): Caractérisation morphologique et étude du pouvoir pathogène. Mémoire de magister. Université de Mostaganem.
- Bhattacharyya P. N. et Jha D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1327-1350.
- Bouras F. Z. (2010).** Les Rhizobium associés aux pois chiche (*Cicer arietinum*) : Etude agronomique et caractérisation phénotypique. Mémoire de magister. Université d'Oran.
- Braud A., Jezequel K., Bazot S., Lebeau T., (2009).** Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr-, Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore producing bacteria. *Chemosphere.* 74: 280-286.
- Braune P. H., Planquaert P. H., WERY J. (1988).** Pois chiche culture utilisation (Brochure) .Ed .ITCF.
- Brenner D. J., Krieg R.N., Staley J.T. (2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Michigan State University publishers.
- Bric J. M., Bostock R. M., Silverstonet S. E. (1991).** Rapid in Situ Assay for Indoleacetic Acid production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2):535-538.
- Brockwell J., Pilka A., Holliday R. A. (1991).** Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales *Aust J Exp Agric.* 31: 211-219.
- Cazorla F. M., Romero D., Perez-Garcia A., Lugtenberg B. J. J., de Vicente A., Bloemberg G. (2007).** Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1950-1959.

- Chaitanya K. J., Meenu S. (2015).** Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *E3 J. Agric.Res. Develop.* 5(2): 108-119.
- Chandler D., Davidson G., Grant W. P., Greaves J., Tatchell G. M. (2008).** Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends Food Sci. Tech.* 19: 275- 283.
- Chauhan S., Wadhwa K., Vasudeva M., N. Narula. (2012).** Potential of *Azotobacter* spp. as biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* in cotton (*Gossypium hirsutum*), guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) and tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Archives of Agronomy and Soil Science.* 58(12):1-21. DOI: 10.1080/03650340.2011.590134.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Ait Barka E., (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.
- Couillerot O. (2009).** Compatibilité des bactéries phyto-bénéfiques *Azospirillum* et *Pseudomonas* dans la rhizosphère. Thèse de Doctorat. Université LYON 1.
- Dastager S.G., Deepa C.K., Pandey, A. (2010).** Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.* 27: 259-265.
- De Ladjudie P., Dupuy N., Ndiaye A., Neyra M., Boivin C., Gillis M., Dreyfus, B. (1998).** Acacia : nodulation et rhizobium associés. Cité dans : **Merabet C. (2007).** Diversité et rôle des rhizobia des régions salées et arides d'Algérie. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (2009).** *Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition., Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.
- Demol J., Baudoin J. P., Louant B. P., Maréchal R., Mergeai G. (2002).** Amélioration des plantes application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Les Presses agronomiques de gembloux. Louvain-la-Neuve par communication. (ed).
- Dénarié J. (2000).** Texte de la 8<sup>ème</sup> conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier.



- Dimkpa C., Tanjaweinad I., Asch F. (2009).** Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* doi:10.1111/j.1365 - 3040.2009.02028.x. 1-13.
- Djuric S., Pavic A., Jarak M., Pavlovic S., Starovic M., Pivic R., Josic D. (2011).** Selection of indigenous fluorescent pseudomonad isolates from maize rhizospheric soil in Vojvodina as possible PGPR. *Romanian Biotechnological Letters.* 165: 6680-6691.
- Dobereiner J., Day J. M. (1975).** Nitrogen fixation in rhizosphere of grasses. In *Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms.* Cambridge: Cambridge University Press, Edited by Stewart WDP, 39-56.
- Dommergues Y., Duhoux E., Diem H. G. (1999).** Les arbres fixateurs d’azote, (Ed) CIRAD, ESPACE, FAO, IRD; Montpellier, Rome, Paris.
- Dommergues Y., Mangenot F. (1970).** *Microbial Ecology of Soil.* Masson and Cie (eds.), Paris. 33-45.
- Doyle J. J. (1994).** Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 325-349.
- Dubey R. C., Maheshwari Kumar Varun D. K., Pandey, R. R., (2012).** Growth enhancement of *Sesamum indicum* L. by rhizosphere-competent *Azotobacter chroococcum* and its antagonistic activity against *Macrophomina phaseolina*. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 45 (4): 437-454.
- Dunne C., Crowley J. J., Moenne-Loccoz Y., Dowling D. N., de Bruijn F.J., O’Gara F. (1997).** Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiol* 143:3921 - 3931.
- Dunne C., Moenne-Loccoz Y., de Bruijn F.J., O’Gara F. (2000).** Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. *Microbiology,* 146: 2069 - 2078.
- Duschak M. (1871).** Zur Botanik des Talmud . I. Neuer, Pest: 105-106. In: Singh, F. and Diwakar, B. 1995. Chickpea botany and production practices. Skill development series ICRISAT India. 16: 64.

- Dönmez A. A. (2011).** *Cicer uludereensis* Donmez: a new species of *Cicer* (Chickpea) (Fabaceae) from around the Fertile Crescent, SE Turkey. *Turk. J. Bot.* 35: 71 - 76.
- El-hilali I. (2006).** La symbiose rhizobium lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi- infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V.
- El-Halmouch Y., Mehesen A., El-Shanshoury A. R. (2013).** The Potential of Cell-free Cultures of *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum* and Compost Tea as Biocontrol Agents for Faba Bean Broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.). *J Plant Pathol Microb* 4: 205. Doi:10.4172/2157-7471.1000205.
- El-Mahrouk M. E., Belal, E. B. A. (2007).** Production of indole acetic acid (bioauxin) from *Azotobacter sp.* Isolate and its effect on callus induction of *Dieffenbachia maculate* cv. Marianne. *Acta biologica szegediensis*. 51(1): 53 - 59.
- Esitken, A. (2011).** Chapter 8: Use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Horticultural Crops. In: **D.K. Maheshwari (ed.). 2011.** *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-18357-7\_13.
- Esteban Julián Rubio, Marcela Susana Montecchia, Micaela Tosi, Fabricio Darío Cassán, Alejandro Peticari, and Olga Susana Correa. (2013).** Genotypic Characterization of *Azotobacter* Isolated from Argentinean Soils and Plant-Growth-Promoting Traits of Selected Strains with Prospects for Biofertilizer Production. *The Scientific World Journal*. Volume 2013, Article ID 519603. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519603>.
- FAO. (2012).** Food agriculture Organisation of The United nation, <http://faostat3.fao.org/download/T/TP/F>. FAOSTAT Date: 16 Oct CEST 2015.
- FAO. (2013).** Food agriculture Organisation of The United nation, <http://faostat3.fao.org/download/T/TP/F>. FAOSTAT Date: 16 Oct CEST 2015.
- Faramawy, F.M.K. 2014.** Response of *Prosopis Chilensis* to biofertilization under calcareous soil of RasSudr. 2-Pod production. *Annals of Agricultural Science*. 59(2): 263-271.
- Frontier S., Piched-Viale D., Leprêtre A., Davoult D., Luczak C. (2004).** *Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution*. 3<sup>ème</sup> Edition Dunod, Paris.

- Fuentes-Ramírez L. E., Caballero-Mellado J. (2006).** Bacterial biofertilizers. In: **Z.A. Siddiqui** (ed). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Netherlands. 143-172.
- Gaid S. (2015).** La tolérance à la salinité du pois chiche (*Cicer arietinum* L). Mémoire de magister. Université d'Oran.
- Gamalero E., Glick B.R. (2011).** Chapter 2: Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: **D.K. Maheshwari** (ed.). 2011. Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-21061-7\_2.
- Gaur P. M., Jukanti A. K., Gowda C. L. L., Chibbar R. N. (2012).** Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. British Journal of Nutrition. 108: 11-26.
- Gerbaldo G. A., Barberis C., Pascual L., Dalcero A., Barberis L. (2012).** Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. FEMS Microbiol Lett. 332: 27-33.
- Ghodsalavi B., Ahmadzadeh M., Soleimani M., Madloo P. B., Taghizad-Farid, R. (2013).** Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. AJCS. 7(3):338-344.
- Goodwin M. (2005).** Profil de la culture de pois chiche au Canada. Ed. AAFC (Agriculture et Agri-Food Canada). Ottawa, Ontario, Canada.
- Graham P. H. (1973).** Plant-*Rhizobium* interaction and its importance to agriculture. In **A. M. Srb**, (Ed.), Genes, enzymes and populations. New York, NY: Plenum Publishing. 321-330.
- Gupta G., Parihar S. S., Ahirwar N. K., Snehi S. K., Singh V. (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. J Microb Biochem Technol. 7: 096-102. doi:10.4172/1948-5948.1000188
- Gutierrez C. K., Matsui G. Y., Lincoln D. E., Lovell C. R. (2009).** Production of the Phytohormone Indole-3-Acetic Acid by Estuarine Species of the Genus *Vibrio*. Appl. Environ. Microbiol. 75 (8): 2253-2258.
- Haldar S., Sengupta S. (2015).** Plant-microbe Cross-talk in the Rhizosphere: Insight and Biotechnological Potential. The Open Microbiology Journal. 9:1-7.

- Hatim S. (2015).** Activités enzymatiques et pouvoir solubilisateur du phosphate chez les bactéries fixatrices d'azote nodulant quatre espèces d'*Acacia*. Mémoire de Master. Université de Fès.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. (2010).** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-010-0117-1
- Henkes G. (2008).** Plant-microbe interactions alter the allocation of carbon in barley (*Hordeum vulgare*). *Dipl. Biol.*
- Horner-Devine M. C., Leibold M. A., Smithe V. H., Bohannan B. J. M. (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* 6: 613-622.
- Ibsa A. A. (2013).** Agronomic and symbiotic characteristics of chickpea, *Cicer arietinum* (L.), as influenced by *Rhizobium* inoculation and phosphorus fertilization under farming systems of Wolaita area, Ethiopia. Wageningen University. 84
- Indiragandhi P., Anandham R., Madhaiyan M., Sa T.M. (2008).** Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Curr. Microbiol.* 56: 327-333.
- Iqbal M. A., Khalid M., Shahzad S. M., Ahmad M., Soleman N. (2012).** Integrated use of *Rhizobium leguminosarum*, plant growth promoting rhizobacteria and enriched compost for improving growth, nodulation and yield of lentil (*Lens culinaris* Medik). *Chilean J Agric Res.* 72: 104-110.
- Jahanian A., Chaichi M. R., Rezaei K., Rezayazdi K., Khavazi K. (2012).** The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). *Int. J. Agric. Crop Sci.* 4: 923-929.
- Joseph B., Ranjan Patra R., Lawrence R. (2007).** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production.* 2: 141-152.
- Joshi K. K., Kumar V., Dubey R. C., Maheshwari D. K., Bajpai V. K., Kang S.C. (2006).** Effect of chemical fertilizer-adaptive variants, *Pseudomonas aeruginosa* GRC2 and *Azotobacter chroococcum* AC1, on *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of *Brassica juncea*. *Korean J. Environ. Agri.* 25(3): 228-235.
- Karthikeyan M., Radhika K., Mathiyazhagan S., Bhaskaran R., Samiyappan R., Velazhahan R. (2006).** Induction of phenolics and defense-related enzymes in

coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. Brazil J Plant Physiol. 18:367-377.

**Kavitha T., Nelson R., Jesi, S. J. (2013).** Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Int J Pharm Bio Sci. 4(4):177 - 186.

**Kaymak H.C. (2010).** Potential of PGPR in Agricultural Innovations. In: **D.K. Maheshwari** (ed.), Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-13612-2-3.

**Kechache K., (2005).** Contribution à l'étude de l'effet de la fertilisation phosphatée à base des engrais SSP 20% et TSP 46% sur le pois chiche mémoire de fin d'études. Université de Sidi Bel Abbès.

**Kennedy I. R., Choudhury A. T. M. A., Mihaly Kecske L. (2004).** Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology & Biochemistry. 36: 1229-1244.

**Khan M. S., Zaidi A., Wani P. A., Ahemad M., Oves M. (2009).** Chapter 6: Functional Diversity Among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Current Status. In: **M. S. Khan et al.** (eds.). 2009. Microbial Strategies for Crop Improvement. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-01979-1-6.

**Kjeldahl J. (1883).** Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. Z. Anal. Chem. 22: 366- 382.

**Konate I. (2007).** Diversité phénotypique et moléculaire du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des bactéries endophytes qui lui sont associées. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V.

**Landa B. B., Mavrodi O. V., Raaijmakers J. M., Gardener B. B., Thomashow L. S., Weller D. M. (2002).** Differential Ability of Genotypes of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* Strains To Colonize the Roots of Pea Plants. Applied and Environmental Microbiology, 3226-3237.

**Lasanier-Lachaise, (1976).** cité dans **Belahcene, N. F. (2008).** Contribution au développement durable de l'agriculture dans les monts de Tessala wilaya de Sidi Bel Abbes, Algérie. Mémoire de magister. Université de Tlemcen.

**Lebereton J.C., Le graet S., Rocton L., Siron J., Rigaud P.J., Pierre P. (2004).** La fertilisation Phospho - Potassique. Chambre d'agriculture moyenne.

- Lee G. J., Wu X., Shannon J. G., Sleper D. A., Nguyen H. T. (2007).** Chapter 1: Soybean. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Oilseeds, Volume 2: 1-53. C. Kole (Ed.). © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lenin G., Jayanthi M. (2012).** Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on enhancement of growth, yield and nutrient content of *Catharanthus roseus*. Int J Res Pure Appl Microbiol. 2: 37-42.
- Lewis G. P., Schrire B. D., Mackinder B. A., Lock J. M. (2003).** Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Liu P. H., Gan Y., Warkentin T., McDonald C. (2003).** Morphological plasticity of chickpea in a semi arid environment. Crop Sci. 43:426-429.
- Loeppert R. H., Suarez D. L. (1996).** Carbonate and gypsum. In Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods, Bigham JM and Bartels JM ed. SSSA, ASA, Madison, Wisconsin, Etats-Unis, 437-474.
- Loper J. E., Buyer J. S. (1991).** Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Mol Plant-Microbe Interact. 4: 5-13.
- Lopez-Bellido L., Lopez-Bellido R. J., Castillo J. E., Lopez-Pellido J. F. (2004).** Chickpea response to tillage and soil residual nitrogen in a continuous rotation with wheat I. Biomass and seed yield. Field Corps Research. 88: 191-200.
- Lorck H. (1948).** Production of hydrocyanic acid by bacteria. Physiol. Plant. 1: 142-146.
- Lugtenberg B. J. J., Chin-A-Woeng T. F. C., Bloemberg G. V. (2002).** Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. Anton. Leeuw. 81: 373-383.
- Magda M. A., El Sayed, H. E. A., Jastaniah, S. D. (2012).** Synergistic Effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces sp.* Isolated From Saline Soil on Seed Germination and Growth of Wheat Plant. Journal of American Science. 8 (5): 667-677.
- Maheri-Sis N., Chamani M., Sadeghi A. A., Mirza- Aghazadeh A., Aghajanzadeh-Golshani A. (2008).** Nutritional evaluation of kabuli and desi type chickpeas (*Cicer arietinum* L.) for ruminants using in vitro gas production technique. Afr. J. Biotechnol. 7 (16): 2946-2951.
- Malleswari D., Bagyanarayana G. (2013).** In vitro screening of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of medicinal and aromatic plants for multiple plant growth promoting activities. J. Microbiol. Biotech. Res. 3 (1): 84- 91.

- Maougal R. T. (2004).** Techniques de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum.L*): Inoculation et nodulation. Mémoire de magister. Université de Constantine.
- Martínez-Viveros O., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G., Mora M.L. (2010).** Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr. 10 (3): 293 - 319.
- Meenakshi N., Ranjni H. (2010).** Plant growth promoting rhizobacteria : a review article. International Journal of Current Research. 5(12): 3863- 3871.
- Meliani A. (2012).** Contribution à l'étude de la diversité écologique des *Pseudomonas fluorescens*. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
- Merabet C. (2007).** Diversité et rôle des rhizobia des régions salées et arides d'Algérie. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
- Mohapatra Balaram, Deepak Kumar Verma, Himanshu Sekhar Dutta and Bipin Bihari Panda. (2014).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): as a sustainable way of organic agriculture. IJOMAS. 1(2):16-25.
- Murthy N., Bleakley B. (2012).** Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms. The Internet Journal of Microbiology. 10 (2).
- Naik P. R., Raman G., Narayanan K. B., Sakthivel N. (2008).** Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing *fluorescent Pseudomonads* isolated from rhizospheric soil. BMC Microbiology. 8: 230- 244.
- Nandakumar R., Babu S., Viswanathan R., Raguchander T., Samiyappan R. (2001).** Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biol. Biochem. 33(5): 603- 612.
- Narula N., Kukreja K., Kumar V., Lakshminarayana K. (2002).** Phosphate solubilization by soil isolates of *Azotobacter chroococcum* and their survival at different temperatures. Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics. 103(1): 81 - 87.
- Nautiyal C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS. Microbiol. Lett. 170: 265- 270.
- Naz I., Bano A., Rehman B., Pervaiz S., Iqbal M., Sarwar A., Yasmin F. (2012).** Potential of *Azotobacter vinelandii* Khsr1 as bio-inoculant. African Journal of Biotechnology. 11(45): 10368- 10372.

- Neilands J. B. (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem.* 270: 26723- 26726.
- Ngoma L., Esau B., Babalola O. O. (2013).** Isolation and characterization of beneficial indigenous endophytic bacteria for plant growth promoting activity in Molelwane Farm, Mafikeng. South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 12 (26): 4105- 4114.
- Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P. (2011).** Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15 (2): 327- 337.
- Nilson D. C. (2001).** Production functions for chickpea, field pea and lentil in the Central Great Plains. *Agronomic Journal.* 93: 563-569.
- Norris J. R. (1959).** Isolation and identification of *Azotobacter*. *Lab Practice.* 8: 239.
- Nutman P. S. (1976).** In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press: 211-231.
- Olsen S. R., Sommers L.E. (1982).** Phosphorus. *In: Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbial Properties.* Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), second ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Ozturk M., Duran A., Hakki E. E. (2011).** *Cicer floribundum* var. *amanicola* (Fabaceae), a new variety from south Anatolia, Turkey. *Biological Diversity and Conservation.*4/3: 44-51
- Ozturk M., Duran A., Hakki E. E. (2013).** Cladistic and phylogenetic analyses of the genus *Cicer* in Turkey. *Plant Syst. Evol.* Doi: 10.1007/s00606-013-0850-6
- Pal K. K., McSpadden Gardener B. (2006).** Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor.* 1- 25.
- Pansu M., Gautheyrou J. (2003).** Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods. (Ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Paul E. A., Clark F. E. (1996).** Soil Microbiology and Biochemistry, 2nd Edition. Academic Press, New York.
- Pikovskaya R. L. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil connection with vital activity of source microbial species. *Microbiologiya* 17: 362-370.
- Plancquaert P. H. Wery J. (1991).** Le pois chiche - Culture et utilisation. Brochure Ed. ITCF Paris France.



- Podile A. R., Kishore A. K. (2006).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: **Gnanamanickam, S. S. (ed.).** 2006. Plant-Associated Bacteria, Springer. Printed in the Netherlands.
- Ponmurugan K., Sankaranarayanan A., Naif Abdullah Al-Dharbi. (2012).** Biological Activities of Plant Growth Promoting *Azotobacter sp.* Isolated from Vegetable Crops Rhizosphere Soils. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 6 (4): 1- 10.
- Prakash P., Karthikeyan B. (2013).** Isolation and Purification of Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of *Acorus Calamus* grown soil. *Indian Streams Research Journal.* 3 (7). ISSN 2230-7850.
- Quan C. S., Wang X., Fan S. D. (2010).** Antifungal Compounds of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Its Action Mode. In: **D.K. Maheshwari (ed.),** Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs Springer-Verlag Berlin Heidelberg . DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2-6.
- Raaijmakers J. M., Leeman M., Van Oorschot M. M. P., van der Sluis, I., Schippers B., Bakker P. A. H. M. (1995).** Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas spp.* *Phytopathology.* 85 (10):1075- 1081.
- Rabhi N. H. (2011).** Isolement de *Pseudomonas spp.* Fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Mémoire de Magister. Université de Setif.
- Radif H. M., Hassan S. S. (2014).** Detection of hydrolytic enzymes produced by *Azospirillum brasiliense* isolated from root soil. *World Journal of Experimental Biosciences.* 2 (2): 36- 40.
- Rajae S., Alikham H. A., Raiesi F. (2007).** Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. *J. Sci. Technol. Agric. Nat. Resources.* 11: 297.
- Raju S., Jayalakshmi S. K., Sreeramulu K. (2008).** Comparative study on the induction of defense related enzymes in two different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum L.*) genotypes by salicylique acide, spermine and *Fusarium oxysporum f.sp. ciceri.* *Australienne Journal of Crop Science.* 3: 121-140.
- Ramkumar B. N., Nampootheri K. M. Sheeba U., Jayachandran P., Sreeshma N. S., Sneha S. M., Meenakumari K. S., Sivaprasad P. (2015).** Exploring Western

Ghats microbial diversity for antagonistic microorganisms against fungal phytopathogens of pepper and chickpea. *J. BioSci. Biotechnol.* 4 (2): 207- 218.

**Rani A., Souche Y. S., Goel R., (2009).** Comparative assessment of in situ bioremediation potential of cadmium resistant acidophilic *Pseudomonas putida* 62BN and alkalophilic *Pseudomonas monteilli* 97AN strains on soybean. *Int. Biodet. Biodegrad.* 63: 62- 66.

**Redden R. J., Berger J. D. (2007).** History and origin of chickpea. In: Bouras, F. Z. 2010. Les Rhizobium associés aux pois chiche (*Cicer arietinum*) : Etude agronomique et caractérisation phénotypique. Mémoire de magister. Université d'Oran.

**Reetha S., Selvakumar G., Bhuvaneswari G., Thamizhiniyan P., Ravimycin, T. (2014).** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences.*13: 75- 80.

**Rodrigues E. P., Rodrigues L. S., de Oliveira A. L. M., Baldani V. L. D., Teixeira K. R. S., Urquiaga S., Reis V. M. (2008).** *Azospirillum* amazonense inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub>fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 302: 249-261.

**Roy C. Dawson C. R. (1970).** Potential for increasing protein production by legume inoculation. *Plant and Soil.* 32: 655- 673.

**Saharan B. S., Nehra V. (2011).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research.* 21.

**Saima M. K., Roohi Ahmad I. Z. (2013).** Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 11: 39-46.

**Sakia N., Bezbaruah B. (1995).** Iron dependent plant pathogene inhibition through *Azotobacter* RRLJ203 isolated from rich acid soil. *Ind. J. Exp. Boil.* 35: 571-575.

**Santi C. Bogusz D., Franche C. (2013).** Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany.* Doi:10.1093/aob/mct048.

**Saraf M., Rajkumar S., Saha T. (2011).** Chapter 1: Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems. In: **D.K. Maheshwari** (ed.). 2011. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-18357-7-13.

- Saxena M. C. (1987):** Agronomy of chickpea. In : **Saxena M. C., Singh K.B. (1987).** Prospects for chickpea Oxon, U.K. Cece in Italia (Crino, P., ed.). Atti della Giornata tenuta presso il The Chickpea.
- Sekkour S. (2008).** Essai d'introduction d'un couple symbiotique *Rhizobium-Acacia saligna* pour la revégétalisation de la Sablière de Sidi Lakhdar (Wilaya de Mostaganem). Mémoire de magister. Université d'Oran.
- Selvakumar G., Mohan M., Kundu S., Gupta A. D., Joshi P., Nazim S., Gupta H. S. (2008).** Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). Lett. Appl. Microbiol. 46: 171-175.
- Sengupta C., Bhosale A., Malusare S. (2015).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling development of *Zea mays*. International Journal of Research in Advent Technology (E-ISSN: 2321-9637) Special Issue National Conference "ACGT 2015", 32-41.
- Sethi S. K., Adhikary S. P. (2012).** *Azotobacter*: A Plant Growth- Promoting Rhizobacteria Used as Biofertilizer. Dynaic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology. 6 (1): 68- 74.
- Sgroy V., Cassan F., Masciarelli O. Del Papa M. F., Lagares A., Luna V. (2009).** Isolation and characterization of endophytic plant growth promoting (PGPB) or stress homeostasis regulating (PSHB) bacteria associated to halophyte *Prosopis strombulifera*. Appl microbial biotechnol. DOI 10.1007/S00253-009-2116-3.
- Shadia M. A. A., Moharam M. E., Hamed H. A., Mouafi F. E. (2012).** Extracellular Metabolites Produced by a Novel Strain, *Bacillus alvei* NRC-14: Some Properties of the Chitinolytic System. New York Science Journal. 5 (1): 53- 63.
- Shaheena P., Venkateshwarlu M., Srinivas D., Jagan Mohan Reddy K., Ugandhar T. (2012).** Direct in vitro shoots proliferation on Chick pea (*Cicer arietinum* L.) from shoot tip explants induced by thidiazuron. Bioscience Discovery. 3: 01- 05.
- Shrestha R., Neupane R. K, Adhikari N. P. (2011).** Status and Future Prospects of Pulses in Nepal. Paper presented at Regional Workshop on Pulse Production held at Nepal Agricultural Research Council (NARC), Kathmandu, Nepal, from 24-25 October, 2011.

- Shrivastava S., Egamberdieva D., Varma A. (2015).** Chapter 1: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants: The State of the Art. **In : D. Egamberdieva et al.** (eds.). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants, Soil Biology 42, DOI 10.1007/978-3-319-13401-7-1.
- Silini A. (2013).** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de *Azotobacter* et sur la croissance du blé en milieu salin. Thèse de Doctorat. Université de Sétif.
- Simon J. P. (2005).** Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les légumineuses. préparés pour le département de Sciences biologiques. Université de Montréal.
- Singh F., Diwakar B. (1995).** Chickpea botany and production practices. Skill development series ICRISAT India. 16.
- Singh K. B., Bushan L. S. (1979).** Water use, water use efficiency and yield of dry land chickpea as influenced by fertilization, stored soil and crop season rainfall. Agricultural water Management. 2: 299 - 305.
- Sitepu I. R., Hashidoko Y., Santoso E., Tahara S. (2007).** Potent phosphate-solubilizing bacteria isolated from dipterocarps grown in peat swamp forest in central Kalimantan and their possible utilization for biorehabilitation of degraded peat swamp forest in Central Kalimantan. Proceedings of the International Symposium and Workshop on Tropical Peatland. Aug. 27-29, Yogyakarta, Indonesia.
- Skrypetz S. (2001).** Pois chiche : Situation et perspectives. Bulletin Bimensuel. Ed. DPS & DPC & AAC. Canada.
- Skrypetz S. (2006).** Pois chiches : Situation et perspectives. Bulletin Bimensuel. Ed. DAM & DPS & DPC & AAC. Canada.
- Smykal P., Clarice Coyne J., Mike J. Ambrose, Nigel Maxted, Hanno Schaefer, Matthew Blair W., Jens Berger, Stephanie Greene L., Matthew Nelson N., Naghme Besharat, Tomáš Vymyslický, Cengiz Toker, Rachit Saxena K., Manish Roorkiwal, Manish Pandey K., Jinguo Hu, Ying Li H., Li Wang X., Yong Guo, Li Qiu J., Robert Redden J., Rajeev Varshney K. (2015).** Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding, Critical Reviews in Plant Sciences, 34:1- 3. DOI: 10.1080/07352689.2014.897904.
- Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. (2004).** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade Veneta our feet. Crit. Rev. Microbiol. 30: 205- 240.

- Srivastava S., Upadhyay A. (2012).** Evaluation of multiple plant growth promoting traits of an isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Indian J Exp Biol.* 48: 601-609.
- Tank N., Saraf M. (2009).** Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. *J. Basic Microbiol.* 49: 195- 204.
- Tannieres M. (2012).** Interruption de la communication bactérienne dans la rhizosphère par la dégradation enzymatique des signaux *quorum sensing*. Thèse de Doctorat. Université Paris-Sud.
- Tarnawski S. (2004).** Réponse des populations de *Pseudomonas* à une augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique dans la rhizosphère de *Lolium perenne* et *Molinia coerulea*. Thèse de doctorat. Université de Neuchatel.
- Tlemsani M. (2010).** Contribution à l'étude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum L.*) causé par *Fusarium oxysporum* Schelcht. Emend. Snyd et Hans. f. sp. *ciceri* (Padwick) : caractérisation, lutte biologique et comportement variétal. Mémoire de Magister. Université d'Oran.
- Torres R. M. G., Valencia P. S. A., Bernal C. J., Martínez N. P. (2000).** Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología* .42:171- 176.
- USDA. (2015).** US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Version Current: September 2015. Internet: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Usha R. (2012).** Isolation, Characterization and Screening of PGPR traits and Antagonistic Traits of Bacteria from Soils and Composts and Evaluation of Plant Growth and Disease Resistance exhibited by *Cajanuscajan* with selected Bioinoculants. Doctorat Thesis. Osmania University.
- Van Der Maesen L. J. G. (1987).** Origin, history and taxonomy of chickpea. In: **Singh F., Diwakar B. (1995).** Chickpea botany and production practices. Skill development series ICRISAT India. 16.
- Vessey J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.

- Vidhyasekaran P., Sethuraman K., Rajappan K., Vasumathi K., (1997).** Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Bio. Control.* 8: 166- 171.
- Vikram P. (2011).** Production of Indole Acetic Acid by *Azotobacter sp.* *Recent Research in Science and Technology.* 3 (12): 14- 16.
- Vivekananthan R., Ravi M., Ramanathan A., Samiyappan R. (2004).** Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate defence against the anthracnose pathogen in mango. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 235- 244.
- Wani P. A., Khan M. S., Zaidi A., (2008).** Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended soil. *Biotechnol. Lett.* 30: 159- 163.
- Yadav J., Verma J. P., Tiwari K. N. (2010).** Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on seed germination and plant growth Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under in Vitro conditions. *Biological Forum.* 2 (2): 15-18.
- Yildiz H. N., Altinok H. H., Dikilitas M. (2012).** Screening of rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*, the causal agent of wilt disease of eggplant. *African Journal of Microbiology Research.* 6 (15): 3700- 3706.
- Zaim S., Belabid L., Bellahcene M. (2013).** Biocontrol of chickpea *Fusarium* wilt by *Bacillus spp.* Rhizobacteria. *Journal of Plant Protection Research.* 53 (2): 177- 183.
- Zemouli-Benfrehha F., Henni D., Merzoug A. (2014).** *Fusarium* wilt of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) in North-west Algeria. *Afr. J. Agric. Res.* 9 (1): 168 - 175.

**Annexe 1 : Composition des milieux et réactifs.**

**Pikovskaya agar :**

Extrait de levure		0.50g
Glucose		10g
Tricalcium phosphate		5g
Sulfate d'ammonium		0.50g
Chlorure de potassium		0.20g
Sulfate de magnésium		0.10g
Sulfate de manganèse		0.0001g
Sulfate de fer		0.0001g
Agar		15g
Eau distillée	qsp	1000ml
pH 7.2 ± 0.2 à 25°C		

**Nitrogen Free Medium :**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1.0 g
MgSO <sub>4</sub>		0.2 g
CaCO <sub>3</sub>		1.0 g
NaCl		0.2 g
Glucose		10.0 g
Agar		18.0 g
pH		7.2
Eau distillée	qsp	1000ml

**Gélose nutritive :**

Extrait de viande		1g
Extrait de levure		2g
Peptone		5g
Chlorure de sodium		5g
Agar		15g
Eau distillée	qsp	1000ml
pH = 7,4		

**Milieu luria-bertani dilué au 1/10<sup>ème</sup> :**

Tryptone		1g
NaCl		1g
Extrait de levure		0.5g
Agar		15g
pH=7		

**Gélose PDA :**

Agar		20g
Pomme de terre épluchée		200g
Glucose		20g
Eau distillée	qsp	1000ml
pH 7.0 ± 0.5 à 25°C		

**Milieu lait écrème**

Lait écrémé		10g
Peptone		5
Agar		18
Eau distillée	qsp	1000ml
pH 7.2		

**Milieu mannitol mobilité**

hydrolysate trypsique de caséine:		10,0 g
Mannitol		7,5 g
Rouge de phénol		0,04 g
Nitrate de potassium:		1,0 g
Agar		3,5 g
Eau distillée	qsp	1000ml
pH = 7,6		

**Milieu chitine colloïdale:**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.7;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.3
MgSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)		0.5;
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)		0.01;
ZnSO <sub>4</sub>		0.001
MnCl <sub>2</sub>		0.001
Chitine colloïdale		2%
Agar		2.0%
Eau distillée	qsp	1000ml

**Préparation de la solution du picrate alcalin :**

Acide picrique		2.5g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		12.5g
Eau distillée	qsp	1000ml



**Milieu « Cellulose »**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                    1.0g  
 NaNO<sub>3</sub>                        0.5g  
 KCl                                0.5g  
 FeSO<sub>4</sub>                        0.01g  
 Eau distillée            qsp    1000ml  
 pH 7.0 ± 0.5 à 25°C

**A. Composition des standards de turbidité de Mc Farland d'après NCCLS site dans Sekkour 2008 :**

Standard de turbidité numéro	Di hydrate de chlorure de baryum (1.175%), en ml	Acide sulfurique (1%), en ml	Densité approximative correspondante de bactéries /ml
<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>99.5</b>	<b>1.10<sup>8</sup></b>
<b>1</b>	0.1	9.9	<b>3.10<sup>8</sup></b>
<b>2</b>	0.2	9.8	<b>6.10<sup>8</sup></b>
<b>3</b>	0.3	9.7	<b>9.10<sup>8</sup></b>
<b>4</b>	0.4	9.6	<b>12.10<sup>8</sup></b>
<b>5</b>	0.5	9.5	<b>15.10<sup>8</sup></b>
<b>6</b>	0.6	9.4	<b>18.10<sup>8</sup></b>
<b>7</b>	0.7	9.3	<b>21.10<sup>8</sup></b>
<b>8</b>	0.8	9.2	<b>24.10<sup>8</sup></b>
<b>9</b>	0.9	9.1	<b>27.10<sup>8</sup></b>
<b>10</b>	1.0	9.0	<b>30.10<sup>8</sup></b>

## Annexe n° 2 : Analyse physicochimique du sol

### A. Analyse granulométrique :

La granulométrie a été déterminée par la méthode internationale à la pipette de Robinson.

- Dans un bécher de 600 ml, mettre 15g de terre fine séchée et tamisée.
- Ajouter 50 ml de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 20 volumes. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est utilisé pour éliminer la matière organique.
- Recouvrir le bécher afin d'éviter les projections pendant la période de l'effervescence.
- Mettre le bécher sur un bain de sable dont la température ne dépasse pas 85 à 90°C pendant 24h. Si une ébullition trop forte se manifestait, l'eau oxygénée se décompose très rapidement. Si la terre est humifère l'effervescence peut produire une mousse abondante risquant de déborder, ce phénomène peut être évité en ajoutant quelques gouttes d'alcool éthylique.

A la fin de l'effervescence, faucher pendant 2 h pour éliminer l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en excès et terminer par 10 min d'ébullition (on peut accélérer l'élimination de l'excès d'eau oxygénée en ajoutant quelques gouttes d'ammoniaque).

- S'assurer que toute l'eau oxygénée a disparu en versant quelques gouttes du liquide chaud 60°C dans une solution de permanganate de potassium, en présence d'eau oxygénée le permanganate de potassium se décolore.
- Laisser refroidir puis transvaser à l'aide d'un jet de pissette dans un flacon de sédimentation à large ouverture et jaugé de 750 ml.
- Verser dans le flacon, 15 ml d'hexa-métha-phosphate de sodium 50 g/l. Cette solution alcaline a pour rôle de disperser les particules qui ont tendance à s'agglomérer.
- Compléter avec de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge 750 ml.
- Agiter le flacon durant une heure sur un agitateur magnétique.
- Porter le flacon à proximité de la pipette de Robinson qui doit être placée dans une pièce à température constante.

*Prélèvement des argiles, des limons fins et des limons grossiers (particules à  $\varnothing < 50$  microns):*

- Maintenir la température à 20°C, agiter immédiatement par retournement répété de manière à mettre en suspension toute la terre.
- Poser très rapidement le flacon et laisser décompter pendant 46 secondes à 20°C.
- Au bout de 46 secondes et à 10cm de profondeur, Prélever 10ml de liquide.
- Transeverser les 10 ml prélèvements et l'eau de rinçage de la pipette dans une capsule en verre pyrex.
- Porter la capsule dans une étuve à dessiccation à température 105°C.
- Après évaporation totale, peser la capsule et son contenu sec.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P1 de sédiment. (Argile + limons fins + limons grossiers + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

*Prélèvement du mélange des argiles et des limons fins (particules à  $\varnothing < 20$  microns):*

- Après agitation et retournement du liquide, laisser déposer durant 4 min 48 seconds. Et de la même façon que précédemment, prélever 10 ml du liquide.
- Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
- Faire évaporer puis peser la capsule.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P2 du sédiment (Argile + limon fin + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

*Prélèvement des argiles (particules à  $\varnothing < 2$  microns):*

- Agiter et laisser sédimenter 8h.
- Effectuer le prélèvement de 10 ml.
- Peser comme précédemment P3 (Argile + hexaméthaphosphate de sodium) dans 10 ml de suspension.

*Prélèvement de l'hexaméthaphosphate de sodium :*

- Verser 15 ml d' hexaméthaphosphate de sodium dans un flacon jaugé de 750 ml. Compléter le volume au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée.
- Agiter puis faire un prélèvement à la pipette Robinson comme précédemment.

- Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
- Faire évaporer puis peser la capsule et son contenu sec P<sub>4</sub>.
- Déterminer comme précédemment le poids correspondant à la surcharge en hexaméthaphosphate de sodium contenu dans 10 ml de suspension.
- D'après les pesées P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> calculer les taux des Argiles, limons fins et limons grossiers.
- Tamiser et peser les sables fins et sables grossiers, pour les sables grossiers utiliser un tamis de 200 µm et pour les sables fins un tamis de 50µm.

**B. Dosage du calcaire total :**

Déposer 1g (P) de sol séché à l'air, dans un flacon puis remplir l'appendice latérale du flacon avec 5 ml de HCl 0.5N, après avoir lié le flacon au calcimètre de Bernard amener au zéro les niveaux de l'eau dans la colonne et dans l'ampoule, verser l'acide sur l'échantillon, ensuite à l'aide de l'ampoule, rétablir le niveau et lire le volume de CO<sub>2</sub> dégagé (en ml), une fois le dégagement du CO<sub>2</sub> terminé, baisser l'ampoule du calcimètre jusqu'à ce que le niveau de cette dernière soit dans un même plan horizontal que celui dans la colonne. Lire le volume (V). Enfin déposer 1g (p) de CaCO<sub>3</sub> pur pour l'étalonnage de l'appareil tel qu'il provoque un dégagement gazeux. Relever le volume (v) du gaz produit.

La teneur en CaCO<sub>3</sub> est exprimée en pourcentage et obtenue par la formule suivante :

$$\text{CaCO}_3 \% = [(p \times V) / (P \times v)] \times 100$$

**C. Dosage du calcaire actif :**

Peser 10g de sol séché à l'air, les introduire dans un flacon de 500ml et y ajouter 250 ml de la solution d'oxalate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> à 0.2N, agiter durant 2h, ensuite filtrer la solution en rejetant les premiers ml du filtrat. Prélever 10ml du filtrat qui sera versé dans un bécher de 100ml, ajouter à ce dernier 10ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> au 1/10, ensuite porter le contenu du bécher à une température de 60°C, puis placer le bécher sur un agitateur magnétique surmonter d'une burette graduée contenant le permanganate de potassium KMnO<sub>4</sub> en solution décimale, le titrage par le permanganate se fait jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante, soit n le nombre de ml de KMnO<sub>4</sub> versé.

- Titrer de la même façon 10ml de la solution d'oxalate d'ammonium utilisée, soit N le nombre de KMnO<sub>4</sub> versé pour le témoin.

Dans les 10g de la prise d'essai la quantité de CaCO<sub>3</sub> actif (%) est de :

$$\text{CaCO}_3 \text{ actif \%} = (N - n) \times 1.25$$

**D. Dosage du carbone et de la matière organique :**

Le taux de carbone :

- Utiliser un sol finement broyé et passé au tamis (0.2 mm).
- Peser 0.25g de sol, introduire la prise dans un ballon pyrex avec réfrigérant ascendant, ajouter 10 ml de solution de bichromate à 8% et 15 ml d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pure.
- Porter à ébullition douce pendant 5 min après la chute de la première goutte de condensation.
- Laisser refroidir puis transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml et ajuster le volume à 100ml avec de l'eau de rinçage du ballon.
- Homogénéiser le contenu de la fiole qui doit être à une température de 20°C puis prélever 20 ml de ce liquide.
- Mettre les 20 ml dans un bécher en verre ordinaire de 400ml et y ajouter :
  - 200 ml d'eau déminéralisée.
  - 1.5g de fluorure de sodium (FNa) en poudre.
  - 3 à 4 gouttes de diphénylamine.
- Placer le bécher sur un agitateur magnétique sur monté d'une burette graduée au 1/20 du millilitre.
- Agiter puis titrer l'excès de bichromate avec une solution de Mohr à 0.2N (la couleur passe du bleu foncé au bleu-vert).
- Soit X le volume (ml) de la solution de Mohr versée.
- Le témoin est réalisé avec ou sans sable calcimé. Soit Y le volume de solution de Mohr versée.

Le taux de carbone de l'échantillon est calculé par la formule suivante :

$$C\% = (Y - X) \times 0.615 \times (5 \times 100) / p$$

P: poids de la prise d'essai.

Le taux de la matière organique (MO%) :

Connaissant le taux de carbone, le taux de matière organique est calculé par la formule :

$$\text{MO}\% = \text{C}\% \times 1.72$$

**E. Mesure du pH et de la conductivité électrique :**

Mesure du pH: [AFNOR standard NF X-31-103 (1988)]

- Dans un bêcher, introduire 20g de terre fine séchée, ajouter 50 ml d'eau distillée, mélanger quelques minutes à l'aide d'un agitateur magnétique puis laisser reposer pendant 2h.
- Avant de procéder à la mesure du pH, procéder à l'étalonnage du pH mètre puis à la remise en suspension de la terre à l'aide d'un agitateur.

Mesure de la conductivité électrique:

- Dans un bêcher, introduire 10g de terre fine séchée, compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée, mélanger quelques minutes à l'aide d'un agitateur magnétique.
- Chauffer la solution à 25°C et lire la conductivité  $C_T$ .
- Chauffer la solution à 35°C et lire la conductivité  $C_{T'}$ .

Calculé le coefficient de température  $\beta$  comme suit :

$$\beta = \frac{(C_{T'} - C_T) \times 100}{(T' - T) \times C_T}$$

- Régler le conductimètre à la valeur  $\beta$  et lire la conductivité CE exprimé en milli-siemens.

**F. Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldhal**

	Echantillon examiné		
	Teneur en Azote	Ordre de la grandeur de prise d'essai	Solution titrante
Macrométhode.....	5 à 20 mg	500 mg	0.1 N
Semimicrométhode.....	0,5 à 4 mg	100mg	0.02 N
Microméthode.....	50à 50µg	< 10 mg	0.01 N

- Peser avec précision une partie du sol suffisante pour contenir environ 0.04 g d'azote et l'introduire dans une fiole de digestion de Kjeldhal à long col.
- Ajouter 0.7 g d'oxyde de mercure, 15 g de sulfate de potassium et 40 ml d'acide sulfurique concentré. Chauffer doucement la fiole en position légèrement inclinée. Il est probable que le contenu du récipient se mette à mousser, ce que l'on pourra empêcher en ajoutant un agent anti mousse. Quand la mousse a disparu, faire bouillir le mélange pendant 2 h. Après refroidissement, ajouter 200 ml d'eau et 25 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 0.5 mol/L.
- Bien mélanger, ajouter quelques granulés de pierre ponce (ou équivalent) et introduire doucement, au fond de la fiole, une quantité suffisante d'hydroxyde de sodium à 11 mol/L pour rendre le mélange fortement alcalin. (Environ 115 ml).
- Avant de mélanger les réactifs, relier la fiole à un appareil de distillation dont le tube de sortie plonge dans un volume connu d'acide chlorhydrique à 0.1 mol/L, juste au dessous de la surface. S'assurer que le contenu de la fiole s'est bien mélangé et porter à ébullition jusqu'à ce qu'au moins 150 ml du liquide aient été distillée. Ajouter l'indicateur rouge de méthyle à la solution d'acide chlorhydrique et titrer avec de l'hydroxyde de sodium à 0.1 mol/L (Volume d'agent titrant : *a* ml) .Effectuer un titrage à blanc sur un même volume d'acide chlorhydrique à 0.1 mol/l (Volume d'agent titrant : *b* ml)
- En prenant les quantités et les concentrations indiquées ci-dessus, on obtient le pourcentage d'azote dans l'échantillon par la formule suivante :

$$\frac{(b-a) \times 0.1 \times 14 \times 100}{\text{Masse de l'échantillon (g)}}$$

- On obtient un net changement de couleur en utilisant le mélange rouge de méthyle-vert de bromocrésol (préparé en mélangeant le rouge de méthyle à 0.2% dans l'éthanol et le vert de bromocrésol à 0.1% dans l'éthanol) dans le rapport 1:3 en volume.

### G. Dosage du phosphore assimilable :

Réactifs :

- Bicarbonate de sodium,  $\text{NaHCO}_3$  (0.5M).
- Charbon actif.
- Molybdate d'ammonium,  $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} (4\text{H}_2\text{O})$  : dissoudre 15 g dans 300 ml d'eau distillée chaude, laisser refroidir, ajouter 342 ml d'HCl concentré et remplir à 1 avec de l'eau distillée.
- Solution concentrée de chlorure d'étain (40%),  $\text{SnCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$ .
- Solution diluée de chlorure d'étain : prendre 1 ml de la solution concentrée de chlorure d'étain en ajoutant 33 ml d'eau distillée.
- Solution de phosphore (standard) (0.1 mg/ml) : 0.4393g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /litre.
- Solution diluée de phosphore (2 $\mu\text{g/ml}$ ) : diluer 2ml de la solution de phosphore (standard) à 100 ml avec de l'eau distillée.

Mode opératoire :

- Mettre dans un erlenmeyer de 250 ml, 5 g de terre fine, une cuillère de charbon actif et 100 ml de la solution d'extraction ( $\text{NaHCO}_3$  à 0.5 M).
- Agiter exactement 30 minutes avec un agitateur mécanique (15 tours par minute).
- Filtrer, refiltrer sur le même filtre si la solution n'est pas claire.
- Pipetter 5 ml du filtrat dans une fiole de 25 ml.
- Ajouter 5 ml de la solution de molybdate d'ammonium. Agiter. Lorsque tout le dégagement de  $\text{CO}_2$  sera terminé. Laver le col de la fiole.
- Diluer le contenu avec de l'eau distillée à 22ml.
- Ajouter 1 ml de la solution diluée de  $\text{SnCl}_2$ , remplir avec de l'eau distillée à 25 ml et agiter tout de suite.
- Lire la DO à 660 nm pendant les 10 premières minutes après l'ajout du  $\text{SnCl}_2$ .

Gamme étalon :

- Pipetter de 1 à 25  $\mu\text{g}$  de phosphore dans des fioles de 25 ml.
- Ajouter 5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  dans chaque fiole.
- Ajouter 5 ml de molybdate d'ammonium dans chaque fiole. Diluer à 22 ml.
- Ajouter 1 ml de  $\text{SnCl}_2$ .



- Remplir à 25 ml avec de l'eau distillée et agiter tout de suite puis lire la DO à 660 nm.

Calcule :

- Avec l'échantillon, on a une certaine extinction qui peut donner sur la courbe étalon tracée une concentration en phosphore.
- De 100 ml d'extraction, on a pris 5 ml du filtrat ce qui fait le 1/20. Puisque on a opéré sur 5 g de terre ( $5/20 = 0.25$ g de terre). Donc pour 1g de terre, il faut multiplier le résultat par 4.
- Les résultats sont en ppm= partie par million ( $\mu\text{g}$  de P/ g de terre soit en g de P/ Kg de terre).

**Annexe n° 3 : Les normes des sols****A. Les normes du pH du sol: (INRA, 1995)**

<b>pH</b>	<b>Type de sol</b>
<3.5	Hyper-acide
3.5-5.0	Très acide
5.0-6.5	Acide
6.5-7.5	Neutre
7.5-8.7	Basique
> 8.7	Très basique

**B. Les normes de salinité du sol : (Pansu et Gautheyrou 2003)**

<b>Conductivities (mmhos /cm)</b>	<b>Type de sol</b>
0-0.25	Non salin
0.25- 0.50	Légèrement salin
0.50-1	salin
1-2	Très Salin
> 2	Extrêmement salin

(1 S m<sup>-1</sup> = 10 dS m<sup>-1</sup> = 10 mS cm<sup>-1</sup> = 10 mmhos cm<sup>-1</sup> = 1,000 mS m<sup>-1</sup> = 10,000 μS cm<sup>-1</sup>)

**C. Les normes des taux de CaCO<sub>3</sub> :**

<b>Taux de CaCO<sub>3</sub> total</b>	<b>Qualification du sol</b>
CaCO <sub>3</sub> T ≤ 5%	Sol non calcaire
5 < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 12.5 %	Sol faiblement calcaire
12.5 < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 25 %	Sol modérément calcaire
25 % < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 50%	Sol fortement calcaire
CaCO <sub>3</sub> T > 50 %	Sol très fortement calcaire

Source : programme d'interprétation LANO/CA de Basse Normandie  
([http://www.lano.asso.fr/web/calcaire\\_actif.html](http://www.lano.asso.fr/web/calcaire_actif.html))

**D. Les normes des taux de matière organique :**

Teneur en MO %	Interprétation	
MO < 1,4	Sol très pauvre en matière organique	
1.4 ≤ MO < 2	Sol pauvre en matière organique	
2 ≤ MO < 3	Argile < 22%	Sol bien pourvu en matière organique
	22% < Argile < 30% (ou inconnu)	Sol moyennement pourvu en matière organique
	Argile >30%	Sol pauvre en matière organique
3 ≤ MO < 4	Sol bien pourvu en matière organique	
MO ≥ 4	Teneur élevée en matière organique	

Source : programme d'interprétation LANO/CA de Basse Normandie  
[http://www.lano.asso.fr/web/matiere\\_organique.html](http://www.lano.asso.fr/web/matiere_organique.html)

**E. Les normes des taux d'azote déterminés par la méthode de kjeldahl : (Anonyme 2).**

Teneur en N	Interprétation
0.5 -1	Trop faible
1 – 1.5	Satisfaisante
1.5 – 2.5	Un peu fort
Supérieure à 2.5	Trop fort

**F. Les normes des taux de phosphore : (Lebreton, 2004).**

Teneur en P assimilable (ppm)	Interprétation
<50	Pauvre
50-80	Satisfaisante
>80	forte



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2015, 7 (10):202-210  
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



## Effect of diazotrophic plant growth promoting rhizobacteria on seed germination of chickpea (*Cicera rietinum L.*)

M. Ghalem, A. Tifrit, K. Larbi Daouadji, M. Labdi and B. Abbouni

Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Djillali Liabès of SidiBel Abbes, Algeria.

### ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria are a group of free-living bacteria that colonize the rhizosphere. In the present study, 12 bacterial isolates have been isolated from the rhizosphere of chick pea cultures. The isolates have been screened for their capacity to produce particular metabolites (hydrocyanic acid production HCN, inorganic phosphates solubilization and the proteins hydrolysis) and also screened for their antifungal activity against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. All isolates have presented a good antagonistic activity against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Compared with the others isolates such as NfA, NfD and NfC have manifested a good proteolysis and phosphorus solubilization capacity, where the index varied from 1.83 to 3.03 and their antagonistic activity against *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris* has reached 20%. Finally, the selected isolates were tested *in vivo* on the seed germination of chickpea, where they manifested an interesting capacity to promote seed germination and plants growth. In conclusion, the selected isolates, NfA, NfD and NfC have presented an excellent effect for promoting germination of the chick pea, where the vigor index registered ranged from 140 to 180.

**Keywords:** PGPR, diazotrophes, antifungal activity, germination, AIA, HCN, proteolysis.

### INTRODUCTION

In Algeria, chickpea is the second legume crop produced after beans. The chickpea cultivated territories have progressively been extended during 1980 to 1990 [1], but the progressive evolution in consumption and the low productivity implicated the return of Algeria to the exterior market to make up the shortage in matter of consumption needs by the importation of more than 120 000 tons/year [2].

Algerian production of chickpea did not increase because of low productivity and unstable output. Causes of regression are agronomic, abiotic and biotic factors [3]. The establishment and the success of chickpea culture depend on the nature of the rhizobacteria flora. Lately, numerous authors have brought back the implication of beneficial rhizobacteria or plant growth promoting bacteria (PGPB) in the improvement of the soils quality, plants growth and plants resistance to pathogens. The use of those bacteria as biofertilizers reduces chemical products input and pollution risks. It also improves agricultural production.

Free living rhizospheric bacteria that have beneficial effects on plants belong essentially to genera: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, and *Bradyrhizobium*. Generally, 2% to 5% rhizospheric bacteria are PGPR [4]. PGPR may induce plants growth promotion by several direct and indirect mechanisms. Direct mechanisms include the production of stimulatory bacterial volatiles and phytohormones (such as auxins, cytokinins and gibberellins), lowering of the ethylene level in plant, improvement of the plant nutrient status (liberation of

phosphates and micronutrients from insoluble sources; non-symbiotic nitrogen fixation) and stimulation of disease-resistance mechanisms (induced systemic resistance). Indirect effects originate for example when PGPR act like bio control agents reduce diseases or stimulate other beneficial symbioses [6, 7].

From the first studies on PGPR in 1950 years, hundred PGPR genera have been screened and evaluated in laboratories and on field through the world. Today, PGPR are used in the developed country and their inocula are applied to million hectares of cultures [8].

The aim of the present work was the isolation of the diazotrophic PGPR from chickpea rhizosphere, and the screening of the isolates for their capacity to produce particular metabolites (hydrocyanic acid production HCN, inorganic phosphates solubilization and the proteins hydrolysis). Furthermore, the antifungal activity of the isolates strains has been investigated against pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*. and their effect on the germination and plant growth promotion have been studied on chick pea seed.

## MATERIELS AND METHODS

### Soil sampling and bacterial isolation

The rhizospheric soil samples (six) were collected from fields growing Chickpea (*C. arietinum* L.) from the region of west of Algeria (Table 1). For this purpose, 1g of rhizospheric soil sample was suspended in 9 ml of 0.9% NaCl sterile saline solution. Samples were serially diluted and a volume of 0.1 ml of each sample was spreaded on N-free Nourris agar plates, incubated at 28°C for 3 to 7 days.

Table 1: Physical and chemical characteristics of soil samples.

Soil samples	City	pH	Total limestone	Active limestone	Organic matter	Silt	Clay	Sand
AIN TOLBA	AIN TEMOUCHENT	7.96	9.6	8.75	2.48	65	15	20
AIN TEMOUCHENT		8.04	12	5.62	6.16	55	15	30
MALEH		7.86	10.4	7.5	6.77	45	20	35
LAMTAR	SIDI BEL ABBES	7.95	9.2	6.25	3.85	55	10	35
TESSELA		7.81	8.4	5.62	3.03	55	15	30
KAID BEL-ARBI		7.70	10	6.25	1.55	40	10	50

### Biochemical characterization of rhizobacteria

The isolated, selected isolates were primary biochemically characterized by Gram's reaction, catalase test, motility test, oxidase test, and the most interesting isolates were identified by the using of API E20 system identification.

### Characterization of rhizobacteria for PGP traits

#### Phosphate solubilization

The phosphate solubilization activity of the selected Isolates was carried out according to the described method by Nautiyal [9] by the using Pikovskaya agar plates containing tricalcium phosphate [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] as sole phosphorus source. The presence of the transparent halos around the grown colonies indicated the chsolubilization of phosphate. Furthermore, the phosphate solubilization activities were evaluated by calculation of phosphate solubilization index (SI):

$$SI = \frac{\text{colony diameter} + \text{halozone diameter}}{\text{Colony diameter}}$$

#### Production of hydrogen cyanide HCN

All the selected phosphate solubilization isolates were screened for the production of hydrogen cyanide by the using of the adapted described by method by [10]. Briefly, the used nutrient agar culture medium was supplemented with 4.4 g glycine/l and bacterial strains were streaked on the surface of the modified agar plate. A Whatman filter paper no 1 was soaked in a solution containing 2% sodium carbonate solved in 0.5% picric acid solution was placed at the top of the plate. Plates were sealed with parafilm, incubated at 28°C for 5 days. The development of orange to red color indicated the production of HCN.

#### Protease production

The determination of the Protease production by the selected phosphate solubilization isolates, inoculated in the skim milk agar culture medium containing the following components: pancreatic digest of casein 5 g, yeast extract 2.5 g, glucose 1 g, 7% skim milk solution 100 ml [11], incubated at 28°C for 2 days. The apparition of a clear zone around the grown colonies indicated the presence of the proteolytic activity [12].

**Antifungal activity**

The antagonistic activity of the selected phosphate solubilization isolates against pathogenic fungi was determined by the modified dual culture method on PDA plates [13]. The used *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* furnished by INRAA. For this purpose, a loopful of 3 days old bacterial cultures grown in nutrient agar media, was streaked on tow side leaving 1 cm from the margin, and then 6 mm disc of fungal pathogen culture was placed at the center of the Petri plates. Plates without antagonist were served as control. The plates were inoculated at 28°C for 7 days. The antifungal activity was estimated from the inhibition of mycelial growth of fungus in the direction of actively growing bacteria. The level of inhibition was calculated by subtracting the distance (mm) of fungal growth in the direction of an antagonistic isolate from the fungal radius. The percent inhibition was calculated by the using of the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = (R - r) / R \times 100$$

Where 'r' is radial growth of the fungal colony opposite the bacterial colony, **R** the radial growth of the pathogen in control plate [14].

**Seed germination assay**

Rhizobacterial isolates were assayed for their ability to promote seedling growth by the using the modified described methods by [15] and Elliot and [16]. The surface seeds were sterilized with 13° sodium hypochlorite for 3 to 5 min, washed with sterile distilled water for 8 times. The surface seeds were soaked with 3 days old bacterial broth cultures containing at least 10<sup>6</sup> cells/ml for 30 min. The seeds were kept on sterilized filter paper (in Petri plates), incubated at room temperature. After incubation times of 10 days, percent of seed germination, root and shoot lengths were recorded. The Vigor Index [17] was calculated as:

$$VI (\%) = (\text{mean root length} + \text{mean shoot length}) \times \text{germination} \%$$

Data were statistically treated using STATITC statistical program, Least Significant Difference (LSD) test at probability level 0.03 was used. Newman and keulstest was used to separate the means when treatments indicated a significant effect.

**RESULTS****Soil analysis and Bacterial isolation**

The primary analysis of samples indicated that the used soil has alkaline pH-value with low proportion of lime and good proportion of organic matter and presenting a silty-sandy texture. Twelve successfully isolated diazotrophic bacterial strains from chickpea rhizosphere were morphologically and biochemically identified. The obtained results indicated the selection of the ten motile isolates, where eight strains manifested a positive reaction with catalase (**Table 2**).

**Table 2: Morphological and biochemical characteristic of isolates**

Morphological characterization	Nf1	Nf2	Nf3	Nf5	Nf7	Nf8	Nf9	Nf10	Nf11	NfA	NfD	NfC
Shape	rod	rod	rod	oval	rod	rod	rod	rod	rod	oval	oval	oval
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigment brown	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Motility	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Catalase	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Oxidase												

The macroscopic observation of the isolated, selected phosphate solubilization strains indicated the presence of circular transparent, shining, viscous, white to yellowish colonies of 1 to 5 mm diameter. The bacterial isolates differed on cell-shape and colonies time apparition.

The microscopic observation of the isolates NfA, NfD, NfC and Nf5 indicated the presence of a oval cells, where their colonies appraised after 2 days incubation, where the isolates Nf1, Nf2, Nf3, Nf7 to Nf11 were rod and required 3 days for colonies apparition. Furthermore, the isolates NfA, NfD, NfC and Nf5 produced brown water insoluble pigment after 5 to 7 days incubation and their colonies took a granulated aspect.

**Plant growth promoting activities**

The isolates were screened for in vitro plant promoting activities. The obtained results of PGPR traits were illustrated in (**Table 3**). Hydrogen cyanide (HCN) production was observed only with isolates Nf1 to Nf5. Isolates Nf1, Nf2, Nf3, Nf8, eNf9, Nf10, Nf11, NfD and NfC exhibited protease (casein hydrolysis) activity. Four bacterial isolates

were able of solubilizing  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ . Phosphate solubilization index ranged from 1.1 to 3, the highest level of phosphatesolubilizationwas expressed by the isolate NfA.

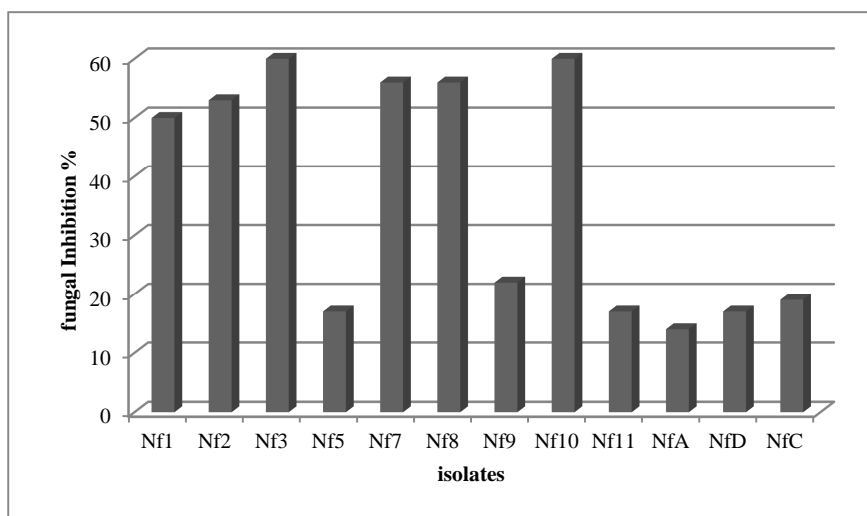


Figure1: The antifungal activity of the selected phosphate solubilization isolates against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*

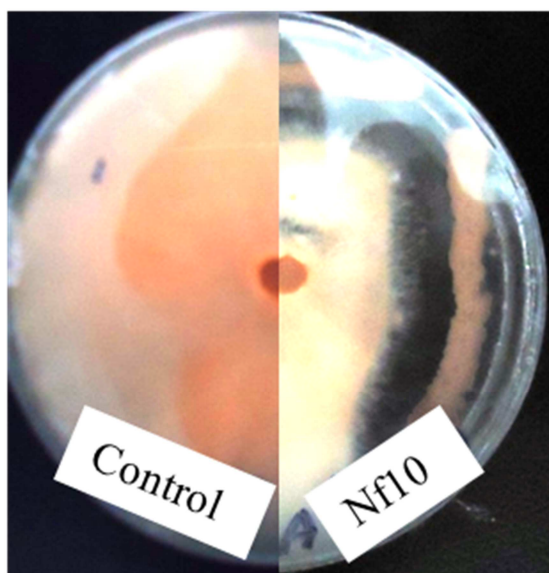


Figure2: The antifungal activity of the selected phosphate solubilization isolate Nf10

Table3: Diazotrophic isolates plant growth promoting characteristics

	Nf1	Nf2	Nf3	Nf5	Nf7	Nf8	Nf9	Nf10	Nf11	NfA	NfD	NfC
P solubilization	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
P solubilization index	/	/	1.1	/	1.1	/	/	/	1.1	3.03	1.83	1.83
Protease	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
HCN	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

The selected phosphate solubilization isolates were screened for antifungal activity against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. The obtained results showed that all the isolates have manifested antagonistic activity against *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, where the inhibition rate varied from 14% to 61%. The maximum antagonistic activity was observed by the by both selected phosphate solubilization isolates Nf3 and Nf10 with inhibition rate of 61%, followed by both selected isolates Nf8 and Nf10 with (56%). Furthermore, the lowest antagonistic activity was shown by isolate producing pigmentation (Nf5, NfA, NfB and NfC).

#### Seed germination assay

In order to explore the effect of the inoculation of the selected phosphate solubilization isolates, seed germination of chickpea has been investigated. The obtained results showed that the isolates seed inoculation has significantly

affected chickpea seed germination percent, shoot length, root length and seedling vigor. The highest response for seed germination percent, shoot length and vigor index has been recorded with isolates Nf5, NfA, NfC and NfD. The isolate Nf5 has manifested a negative effect on seed root length. Furthermore, the rest of the investigated isolates showed a negative effect on chickpea germination parameters, where the means recorded for these isolates were lower than control means. The lowest response has been observed with the isolate Nf2.

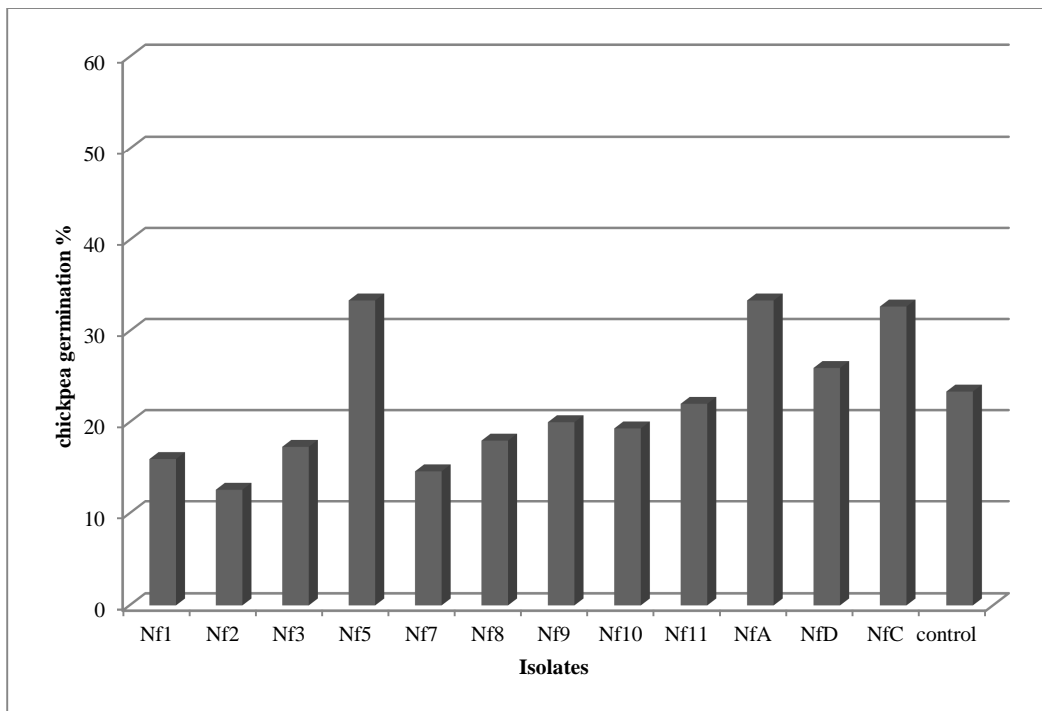


Figure 3 : Effect of the selected phosphate solubilization isolates seedling inoculation on germination percent

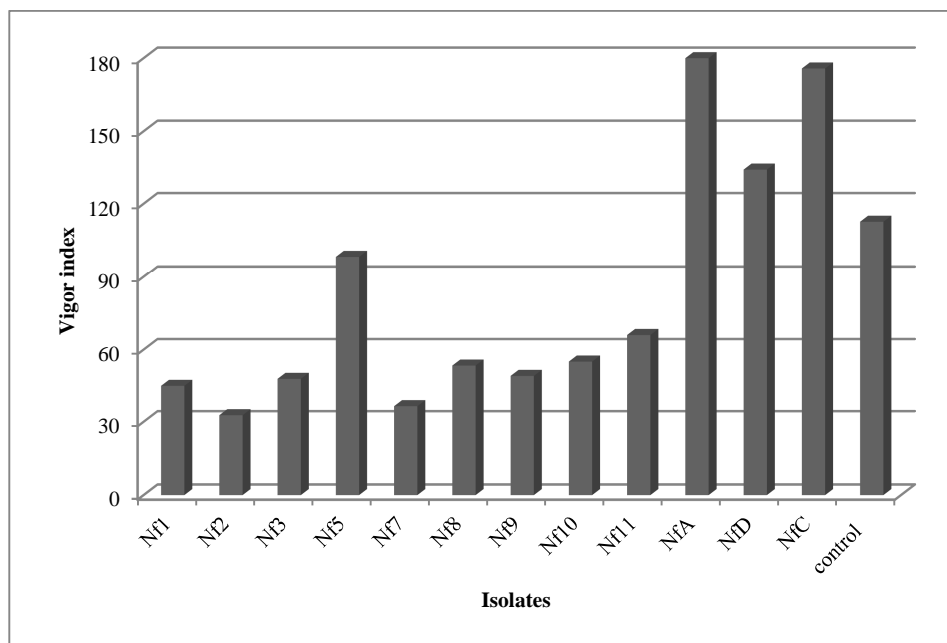


Figure4: Effect of the selected phosphate solubilization isolates seedling inoculation on vigor index





Figure 5 : Effect of the selected phosphate solubilization isolates seedling inoculation on chickpea germination.

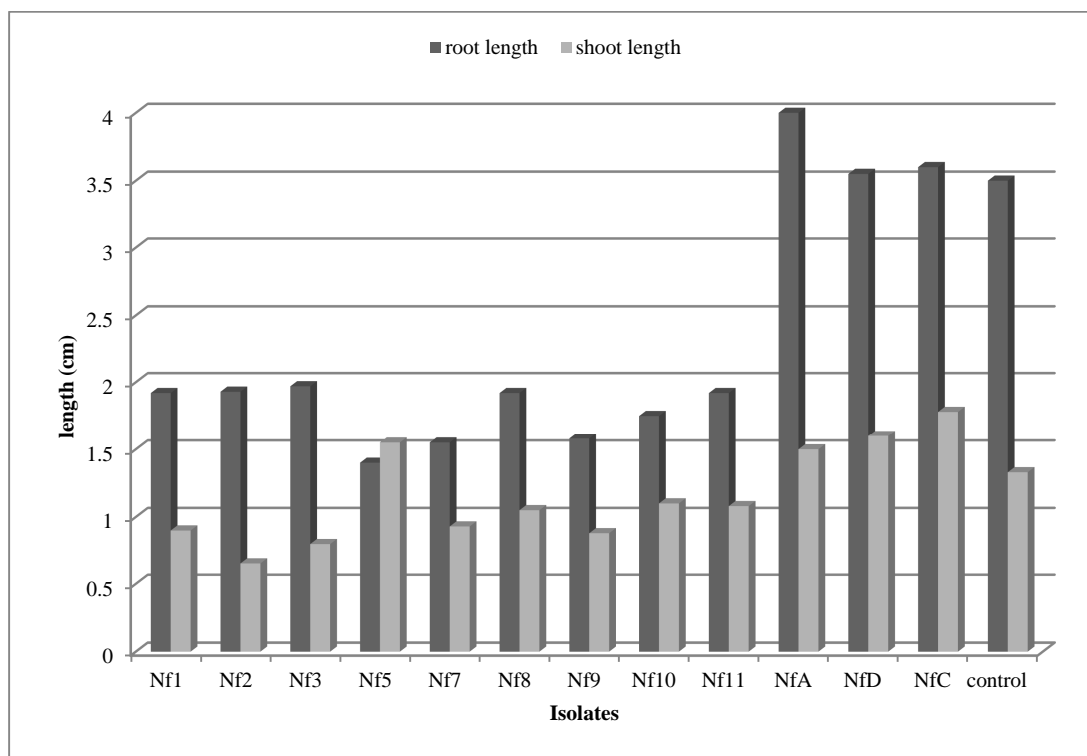


Figure 6: Effect of the selected phosphate solubilization isolates inoculation on chickpea seedling shoot and root length

### Bacterial identification

Based on their PGP traits and effect on chickpea germination, Isolates Nf5, NfA, NfC and NfD has been chosen to be identified by the using API E20 system identification, where the obtained results are presented in (Table 4).

The selected phosphate solubilization isolates (Nf5, NfA, NfD and NfC) were oval shape cells, no spore-forming, cyst forming and brown pigment producing. Their grown colonies presented in granulated aspect after several days incubation. Biochemically identification, indicated that the selected phosphate solubilization isolates (Nf5, NfA, NfD and NfC) were oxidase, catalase, ADH, TDA, glucose and arabinose positive and ODC, H<sub>2</sub>S, VP and gelatine negative. Furthermore, the isolates presented different reactions to the rest of tested substrats. According to the mentioned characteristics, isolates were identified as *Azotobacter sp.*

**Table 4: Biochemical characteristic of isolates Nf5, NfA, NfD and NfC**

Morphological and biochemical characterization	Nf5	NfA	NfD	NfC
Spore	-	-	-	-
Brown pigment	+	+	+	+
Kyst	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
ONPG	-	-	+	-
ADH	+	+	+	+
LDC	-	-	+	-
ODC	-	-	-	-
CIT	+	-	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
URE	-	-	-	+
TDA	+	+	+	+
IND	-	-	+	+
V P	-	-	-	-
Gelatine	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	-	-	+	+
Inositol	-	+	+	+
D-Sorbit	-	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	+	+
D-melibiosa	-	+	+	+
D-sucrose	-	+	+	+
L-Amygdalin	-	+	-	+
L-Arabinose	+	+	+	+
Identification	<i>Azotobactersp</i>	<i>Azotobactersp</i>	<i>Azotobactersp</i>	<i>Azotobactersp</i>

## DISCUSSION

Nonsymbiotic nitrogen fixation is known to be of great agronomic significance. Free Nitrogen-Fixing PGPR were the first investigated strains for the improvement of plant growth. The estimated contribution of free-living nitrogen-fixing prokaryotes to the nitrogen input of soil ranges from 0 to 60 kg ha<sup>-1</sup> year.

In the present study, 12 free nitrogen fixing bacteria has been isolated from chickpea rhizosphere, based on their aptitude to grow on the culture medium of Norris-Nitrogen free agar. The microscopic observation indicated that selected phosphate solubilization isolates were rod to oval Gram negative bacteria, where eight manifested a positive reaction of the catalase activity. The bacterial strains possessing catalase activity must be highly resistant to environmental, mechanical and chemical stress [18]. The isolates presented several PGPR traits; other than N<sub>2</sub> fixation, six isolates were able to solubilize inorganic P, phosphate-solubilizing microorganisms produce a major contribution to overall plant P nutrition and growth and have increased yields of many crops. They help to minimize the application of P-fertilizer, reduce environmental pollution, and promote sustainable agriculture [19]. Nine isolates manifested protease activity, where and only four isolates produced HCN. The selected phosphate solubilization isolates (Nf5, NfA, NfD and NfC) showed an excellent antagonistic activity against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. The isolated, cultivated *Azotobacter* on Muller-Hinton medium has manifested a broad spectrum antifungal activity against *Aspergillus*, and more species of *Fusarium* and *Rhizoctonia bataticola* [4]. Generally, the diazotrophs are able to decrease considerably the deleterious effects of plant pathogens mostly through the synthesis of antibiotic and fungicidal compounds, through competition for nutrients or by the induction of systematic resistance to pathogens [5]. The investigated isolates on mannitol motility agar indicated that nine of the twelve isolates were motile, where the motility was required for successful rhizosphere colonization [20]. Some of the above investigated isolates could exhibit more than two or three PGP traits, which may promote plant growth directly or indirectly or synergistically. Similar to our findings of multiple PGP activities among PGPR have been reported by many other workers [21]. The cultivation of selected phosphate solubilization isolates (Nf5, NfA, NfC and NfD) 3 days has produced a colonies with brown color with a granulated aspect. The microscopic observation indicated the presence of oval cells, kyst forming, motile, catalase and oxydase positive. Furthermore, the study of biochemical properties showed gelatin and H<sub>2</sub>S negative, glucose positive and mostly mannitol positive and isolates NfC and NfD were rhamnose positive. These cultural characteristics are similar to those reported in the literature for bacteria from the genus *Azotobacter* [22, 23]. The application of isolates Nf5, NfA, NfC and NfD has significantly improved chickpea germination, which was clearly expressed via the Vigor index obtained. The Vigor index reflected the health of the seedlings produced, where the high value indicated the best seedling health.

The Vigor index showed that, generally, PGPR inoculation had a positive influence on plant growth parameters [24]. Similarly results have been reported by Saikia and co-workers [25], where the seed germination of chickpea

*Cicerarietinum* has been increased. However, the yield improvement was attributed to the ability of *Azotobacter* to produce plant growth promoting substances such as phytohormone IAA and siderophoreazotobactin, rather than to diazotrophic activity [5].

### CONCLUSION

From the obtained results, the antagonistic activity of the selected phosphate solubilization isolates (Nf5, NfA, NfD and NfC) against *Fusariumoxysporum f. sp. Cicer* has been explored. The selected strains were identified as *Azotobacter*. It would be of interest to find out which functional group is responsible for the antagonistic activity of the selected phosphate solubilization isolates (Nf5, NfA, NfD and NfC) and also whether any of them is a novel compound with antagonistic activity which would use for plant growth promoting for seed germination of chickpea. Further studies involving the purification of the chemical compounds of the secondary metabolite produced by the selected phosphate solubilization isolates (Nf5, NfA, NfD and NfC), by the using of a modern technique such HPLC, IRM, will require for determination of this active molecules.

### Acknowledgement

We are thankful to the department head of the bacteriology laboratory of hospital of University of SidiBelAbbès Mr. Harrachi Abdelkader for providing us with the bacterial strains. We would like to thank Prof. Dr. Benali Mohammed, Director of Laboratory for Biotoxicology, for your encouragement, your support and your useful discussion. Without the kind cooperation of the above mentioned people the work could not have been possible.

### REFERENCES

- [1] RTMaougal. Techniques de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*) : Inoculation et nodulation. Mémoire de magister. Université Mentouri, Constantine, Algérie, **2004**, 163.
- [2] J Pluvillage. Chickpea in the Mediterranean production systems: two contrasting examples of possible developments in Algeria and France. Institut Agronomique Méditerranéen Montpellier, B.P. 5056, Montpellier. France, **1990**, 329.
- [3] M Labdi. Etude de la résistance à l'antracnose (*Ascochytaarabiei*) chez le pois chiche (*Cicer arietinum*L.). Thèse de Doctorat, ENSA de Montpellier, France, **1995**, 143.
- [4] F Ahmad ; I Ahmad ;MS Khan. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res*, **2008a**, 163:173-181
- [5] FAhmad ; IAhmad ; FAqil ; MSKhan ; SHayat. Diversity and Potential of Nonsymbiotic Diazotrophic Bacteria in Promoting Plant Growth. Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth. Edited by Iqbal Ahmad, John Pichtel, and Shamsul Hayat. Copyright 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008b.
- [6] CS Jacobsen. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil, *Plant Soil*, **1997**, 189:139-144.
- [7] LE Fuentes-Ramirez ; J Caballero-Mellado. Bacterial biofertilizers. In: Siddiqui Z.A., ed. PGPR: biocontrol and biofertilization. Dordrecht, the Netherlands: Springer, **2005**, 143-172.
- [8] O Martínez-Viveros ; MAJorquera ; DECrowley ; GGajardo ; ML.Mora. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **2010**, 10, 293-319.
- [9] CS Nautiyal. *FEMS. Microbiol. Lett.* , **1999**, 170: 265-270.
- [10] H Lorck. *Physiol. Plant*, **1948**, 1: 142-146.
- [11] KSunish ; R Ayyadurai ; N Pandiaraja ; P Reddy ; AV Venkateswarlu ; Y Prakash ; ONSakthivel. *Journal of Applied Microbiology*, **2005**, 98:145-154.
- [12] RM Smibert ; NRKrieg. Phenotypic characterization. In: Methods for General and Molecular Biology, ed. by P.R.G. Gerhardt, **1994**, E Murray ; WA Wood ; NR Krieg ; 607-654. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- [13] R Rabindran ; PVidhyasekaran. *Crop Prot.*, **1996**, 15, 715-721.
- [14] E Idris ; DIglesias ; M Talon ; R Borriss. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **2007**, 20(6), 619-626.
- [15] STShende ; RGApte ; TSingh. *Curr Sci.*, **1977**, 46(19): 675-676.
- [16] LFElliott ; JM Lynch. *Soil Biol. Biochem.*, **1984**, 16:69-71.
- [17] ISTA. *Seed Sci and Technol*, **1996**, 29: 321-335.
- [18] D Malleswari ; G Bagyanarayana. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, **2013**, 3 (1):84-91.
- [19] A Vikram ; HHamzehzarghani. *Res J Microbiol.*, **2008**, 3:62-72.
- [20] BJLugtenberg ; GVBloemberg. Life in the rhizosphere. In: .L.Ramos (Ed.) *Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, NY., **2004**, 1:403-430.
- [21] A Gupta ; AKSaxena ; GMurali ; KVBRTilak. *J. Sci. Ind. Res.*, **1998**, 57, 720-725.

- [22] ASilini. Effet des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de *Azotobacter* et sur la croissance du blé en milieu salin. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie, **2013**.
- [23] DJBrenner ; RN Krieg ; JTStaley. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Michigan State University publishers, **2005**, 384-402.
- [24] RUsha. Isolation, Characterization and Screening of PGPR traits and Antagonistic Traits of Bacteria from Soils and Composts and Evaluation of Plant Growth and Disease Resistance exhibited by *Cajanus cajan* with selected Bioinoculants. Doctorat Thesis. Osmania University, Hyderabad, **2012**.
- [25] N Saikia; BBezbaruah. *Indian Journal of Experimental Biology.*, **1995**, 33.571-575.