

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{elle} ABADI Turkia

M^{elle} MAKHLOUF Asmae

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

Valorisation de quelques isolats du genre

Bacillus comme agent de biofertilisation

JURY

Président :	Mekhaldi Abdelkader	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur :	Djibaoui Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Co encadreur	Kreiri Senia	Doctorante	U. Mascara
Examineur:	Bekada Ahmed Mohamed Ali	Professeur	U. Tissemsilet

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Avant tout, nous remercions **Allah** le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons tout d'abord à exprimer nos grandes gratitudee et nos sincères remerciements à notre encadreur **Mr. Djibaoui .R** et notre co encadreur **Kreiri .S** qui nous ont énormément aidé et ouvert la voie par leurs conseils et leurs dévouements tout au long de l'élaboration de ce mémoire en mettant en œuvre tout le fruit de leurs expérience.

Nous remercions infiniment monsieur **MEKHALDI**. A d'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nous remercions également **Mr Bekada**. A d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Nous adressons nos remerciements à tous nos enseignants (es) pour tous leurs efforts au cours de toutes ces années et nous leur exprimons toute notre gratitude pour leur aide. Nous saluons également toutes leurs qualités humaines si rares de nos jours.

Un spéciale remerciement à **Mr Hamoum .H** pour ses efforts et sa disponibilité lorsque nous avons besoin de lui.

Un grand merci pour tous nos collègues. Nous avons partagé ensemble nos doutes et nos craintes, nous n'oublierons jamais tous les moments que l'on a partagés ensemble.

Nous tenons également à remercier tous les techniciens de labo : **Mr Abaidi , Mr Djilali, Mme Amir, Mme Hafida et Mme Saadia** et en particulier **Mr Mohamed** .

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi à toute personne qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail...

A celui qui m'a toujours nourrit d'amour et de tendresse, qui grâce à ses encouragements, son soutien et son compréhension et surtout son affection j'ai pu avancer dans la vie. L'être le plus cher à mon cœur, mon très cher « Papa »

A celle qui m'a toujours encouragée « à sa manière », et qui m'a appris de ne jamais me contenter du minimum et que dans les études comme dans la vie, il faut persévérer pour atteindre ses buts, m'a appris la soif scientifique et l'amour de la patrie, la prunelle de mes yeux ma très chère « Maman »

A mes chères sœurs : Hassiba, kheira, Asma, Saada et Nabila.

A mes chers frères : Abdellah, Kader, Boualem.

A mes petits neveux et nièces : Djawad , Ilyes , Rahim , Yanis , Malek , Hamza , Younes , Ahmed , Nihel , Marwa et Kais

A mes grands-parents, tantes, oncles, cousins et cousines

Spécial dédicace à ma chère binôme Asmae

A mes très chères amies et sœurs, celles qui m'ont aidé et soutenu : Fatima , Ilhem , Nafissa , Manel , Asma , Meriem et Fatima

Turkia



Dédicace

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite a :

Les deux êtres les plus chères au monde Mes parents pour toute leur tendresse et les sacrifices consentis à mon éducation et ma formation et qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

A mes chers frères : Said, Ahmed et Saber.

A mes chères sœurs : Sarah, Keltoum et Fozia.

A mes neveux : Youcef et Anes.

A tous mes oncles et mes tantes.

A tous mes cousins et mes cousines.

Surtout à ma très chère Turkia

A mes chères collègues amies : Imène, Fatima S, Aicha, fatima R, meriem, fatima B, Imane B, Mohamed

Asmae

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction générale

Introduction..... 1

Partie bibliographique

Chapitre I : *Bacillus*

1. Les *Bacillus*..... 3

1.1. Définition..... 3

1.2. Habitat des *Bacillus*..... 4

1.3. Taxonomie de *Bacillus*..... 4

1.3.1. Historique..... 4

1.3.2. Outils d'identification..... 5

1.4. Caractères bactériologiques du genre *Bacillus*..... 6

1.5. La lutte biologique..... 7

Chapitre II

Rôle des biofertilisants et effets PGPR des *Bacillus*

1. Les biofertilisants..... 9

1.1. Fabrication des biofertilisants (Biostimulant)..... 9

1.1.1. La fabrication des biostimulants à partir des micro-organismes..... 9

2. Catégories et biodiversité des biofertilisant microbiens..... 10

2.1. Microorganismes les plus importants utilisés dans les biofertilisants..... 11

2.2. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR)..... 11

2.2.1. Effet PGPR direct..... 12

2.2.1.1. Fixation d'azote..... 12

2.2.1.2. Solubilisation du Phosphate..... 13

2.2.1.3. Production d'hormones de croissance..... 13

I. Production d'acide indole-3-acétique..... 13

II. Production de Cytokinines..... 14

III. Production de Gibbérellines..... 14

IV. Régulation d'éthylène..... 14

V. L'activité ACC désaminase..... 15

2.2.2. Effet PGPR indirects..... 15

I. la compétition..... 15

II. Antibiose..... 15

III. Le parasitisme..... 15

IV. Résistance systémique induite (ISR)..... 15

V. Bioremédiation..... 16

3. Mode d'application des biofertilisants..... 16

• Application foliaire..... 16

• Application radiculaire..... 17

4. Rôle biotechnologique potentiel des biofertilisants.....	17
Partie expérimentales	
Chapitre I : matériels et méthodes	
Prélèvement des échantillons de sol et des plantes.....	18
I-Isolement des bactéries.....	18
- Préparation de la série des dilutions pour les bactéries endophytes.....	18
- Préparation de la série des dilutions pour les bactéries rhizosphériques.....	18
1- Le dénombrement.....	19
2 – La purification des souches.....	19
3 – L’identification.....	19
3.1. L’étude morphologique.....	19
3.1.1. L’observation macroscopique.....	19
3.1.2. L’observation microscopique.....	19
3.2. Les tests biochimiques.....	20
3.2.1. La recherche de la catalase.....	20
3.2.2. L’utilisation de citrate.....	20
3.2.3. La fermentation des sucres et production de gaz.....	20
3.2.4. L’étude de la mobilité et de la fermentation du mannitol.....	21
4. L’étude de l’activité PGPR des <i>Bacillus</i>.....	21
4.1. La préparation d’inoculum.....	21
4.2. La solubilisation du phosphate.....	21
4.3. La fixation de l’azote.....	21
5. Les analyses statistiques.....	22
Chapitre II : Résultats et discussion	
I-Le dénombrement, l’isolement et la sélection des bactéries.....	23
I-1. L’aspect macroscopique.....	23
I-1.1 Le dénombrement bactérien exprimé en Unité formant colonie (UFC).....	24
I-2. L’aspect microscopique.....	24
I-2-1. La coloration simple à la fuchsine de ziehl.....	24
I-2-2. La coloration de Gram.....	25
I-3 – L’identification.....	25
I-3-1- Les tests biochimiques.....	25
I-3-1-1- La Catalase.....	25
I-3-1-2- Utilisation du Citrate de simmons.....	27
I-3.1.3. La fermentation des sucres et production de gaz.....	28
I-3.1.4. Recherche de la mobilité.....	29
II- Activité PGPR des <i>Bacillus</i>.....	31
II-1- Solubilisation du phosphate.....	31
II-2- Fixation d’azote.....	33
Discussion.....	35
Conclusion et perspective	
Conclusion et perspective.....	36
Références bibliographiques	
Références bibliographiques.....	37
Annexe	

Liste des abréviations :

GRAS:	: general recognized as safe
N₂	: azote atmospherique
PGPR	: plante growth promoting rhizobacteria
PH	: Potentiel d'hydrogène
NH₄⁺	: ammonium
No₃⁻	: nitrate
P	: phosphore
AIA	: acide indole -3-acétique
ACC	: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ISR	: Résistancesystémique induite
EDS	: Eau distilléstérile
PBS	: Phosphate buffered saline
LB	: Luriaburtani
UFC	: Unité formant colonie
PVK	:Pikovskaya
µl	:Microlitre
C°	: Degré Celsius
g	: Gramme
min	: Minute
ml	: Millilitres
TSI	: Triple sugariron
(%)	: Pourcentage
DO	: La densité optique

Listes des figures

Figure 1 : Représentation schématique du domaine des Eubacteries.....	3
Figure 2 : Les différents Rôle des PGPR.....	12
Figure 3: L'aspect des colonies des isolats rhizosphériques sur milieu LB.....	23
Figure 4 : L'aspect des colonies des isolats endophytiques sur milieu LB.....	23
Figure 5: L'aspect microscopique des cellules des <i>Bacillus</i> sp par la coloration simple à la fuchsine de Ziehl.....	25
Figure 6 : l'aspect microscopique des cellules des <i>Bacillus</i> sp par la coloration de Gram (G100x).....	25
Figure 7: Résultat positif de catalase de l'isolat OD5 ₆	26
Figure 8 : Résultat négatif de catalase de l'isolat OR4 ₅	26
Figure 9 : Le résultat négatif du test de citrate de simmons.....	27
Figure 10: L'aspect des résultats positif de TSI des isolats.....	28
Figure 11: Aspect du milieu mannitol mobilité A (l'isolat OC 3 ₄) B (l'isolat OD6 ₃).....	30
Figure 12: L'aspect du halo de solubilisation phosphate sur milieu PVK de l'isolat OC6 ₄	31
Figure 13: L'aspect du halo de solubilisation du phosphate sur milieu PVK de l'isolat OD3 ₁	31
Figure 14: Taux de solubilisation de phosphate des isolats endophytiques..	32
Figure 15: Taux de solubilisation de phosphate des isolats rhizosphériques.....	33
Figure 16: Résultat positif de fixation de l'azote de l'isolat OC3 ₃	34
Figure 17: Résultat négatif de fixation de l'azote de l'isolat MD4.....	34
Figure 18: Taux de fixation d'azote des isolats endophytiques et rhizosphériques.....	34

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du genre <i>Bacillus</i>	5
Tableau 2 : les groupes de la classification des <i>Bacillus</i> selon la morphologie de la spore et du sporange.....	6
Tableau 3 : Activité des espèces de <i>Bacillus</i> dans la lutte biologique.....	8
Tableau 4 : les bactéries et les champignons utilisés comme biofertilisants.....	11
Tableau 5 : L'aspect morphologique des colonies obtenues sur LB après 48h d'incubation.....	23
Tableau 6: Le nombre des colonies des isolats de site O et site M exprimées en UFC/g.....	24
Tableau 7: Les résultats du test catalase pour les isolats endophytiques et rhizosphériques.....	26
Tableau 8: Les résultats du test citrate de Simmons des isolats endophytiques et rhizosphérique.....	27
Tableau 9: les résultats du TSI des isolats Rhizosphériques.....	29
Tableau 10: les résultats du TSI des isolats endophytiques.....	29
Tableau 11: les résultats du Mannitol des isolats endophytes et rhizosphériques.....	30
Tableau 12: les résultats de calcule de diamètre de solubilisation de phosphate pour les endophytes.....	32
Tableau 13: les résultats de calcule de diamètre de solubilisation de phosphate pour les isolats rhizosphériques.....	32
Tableau 14: résultat de fixation de l'azote.....	34

Résumé

Les rhizobactéries jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre du sol, parmi ces bactéries, il y a celles qui ont montré leur capacité à favoriser la croissance des plantes (**PGPR**), elles agissent positivement sur la croissance de la plante, L'objectif de notre travail est d'isoler les bactéries appartenant au genre *Bacillus sp* qui à été identifier comme telle, afin de démontrer qu'elle à la capacité de solubilisé le phosphate et fixé l'azote. Les résultats ont révélés à caractériser 60 isolats bactériennes isolées à partir de la rhizosphère et la rhizoplan de sol (région aride et semi-aride), à partir des deux sites de l'ouest algérien (Mostaganem et Oran).

Les résultats obtenus nous ont servi de sélectionner et de classer les *Bacillus* les plus performantes pour solubilisé le phosphate dont le diamètre de solubilisation varient entre $0,1 \pm 00^{\text{ed}}$ jusqu'à $0,63 \pm 03^{\text{j}}$. La souche OD6₂ est la plus performante avec une valeur de $0,63 \pm 03^{\text{j}}$.

On conclut que l'utilisation des *Bacillus sp* comme biofertilisant favorisant la croissance des plantes, fixant l'azote et solubilisant le phosphate peut présenter une approche biotechnologique importante pour réduire les problèmes liés à l'utilisation des engrais chimiques.

Mots clés: PGPR, *Bacillus*, fixation de l'azote, solubilisation de phosphate.

Abstract

Rhizobacteria play an important role in maintaining the balance of the soil, among these bacteria there are those which have shown their ability to promote plant growth (*PGPR*), they act positively on the growth of the plant. The objective of our work is to isolate bacteria belonging to the genus *Bacillus sp* which has been identified as such, in order to demonstrate that it has the capacity to solubilize phosphate and fix nitrogen. The results revealed to characterize 60 bacterial isolates isolated from the rhizosphere and the soil rhizoplan (arid and semi-arid region), from the two sites in western Algeria (Mostaganem and Oran).

The results obtained were used to select and classify the best performing *Bacillus* for solubilizing phosphate, the solubilization diameter of which varies between $0.1 \pm 00^{\text{ed}}$ up to $0.63 \pm 03^{\text{d}}$. The OD62 strain is the best performing with a value of $0.63 \pm 03^{\text{j}}$.

It is concluded that the use of *Bacillus sp* as a biofertilizer to promote plant growth, fix nitrogen and solubilize phosphate may present an important biotechnological approach to reduce the problems associated with the use of chemical fertilizers.

Keywords: PGPR, *Bacillus*, nitrogen fixation, phosphate solubilization.

الملخص

تلعب البكتيريا الجذرية دورًا مهمًا في الحفاظ على توازن التربة ، ومن بين هذه البكتيريا التي أظهرت قدرتها على تعزيز نمو النبات (PGPR) ، فهي تعمل بشكل إيجابي على نمو النبات ، الهدف من عملنا هو عزل البكتيريا التي تنتمي إلى جنس *Bacillus sp* الذي تم تحديده على هذا النحو ، من أجل إثبات قدرته على إذابة الفوسفات وتثبيت النيتروجين. كشفت النتائج عن توصيف 60 عزلة بكتيرية معزولة من منطقة الجذور وجذور التربة (المنطقة القاحلة وشبه القاحلة) من موقعين غربي الجزائر (مستغانم وهران).

تم استخدام النتائج التي تم الحصول عليها لاختيار وتصنيف العصيات الأفضل أداءً لإذابة الفوسفات، والتي يتراوح قطر الذوبان فيها بين 0.1 ± 0.00 و 0.63 ± 0.03 . السلالة OD62 هي الأفضل أداءً بقيمة 0.63 ± 0.03 .

استنتج أن استخدام *Bacillus sp* كسماد حيوي لتعزيز نمو النبات، وتثبيت النيتروجين وإزالة الفوسفات قد يمثل نهجًا حيويًا مهمًا لتقليل المشكلات المرتبطة باستخدام الأسمدة الكيماوية. الكلمات المفتاحية: PGPR ، العسوية ، تثبيت النيتروجين ، إذابة الفوسفات

Introduction

générale

Introduction

Pendant les trois dernières décennies, les agriculteurs sont devenus dépendants des produits chimiques comme méthodes relativement fiables de protection des récoltes contre les phytopathogènes (**Jan et al., 2011**). Malgré, les effets toxique qu'exercent ces produits chimiques sur la santé humaine et environnementale (en exposant la communauté microbienne bénéfique du sol à des concentrations excessives en produits chimiques), ajoutant à l'apparition de résistance chez les agents phytopathogènes vis-à-vis les composés chimiques utilisés, constituent des inconvénients majeurs pour la lutte chimique (**Corbaz, 1990 ; Botelho et Mendonça-Hagler, 2006**).

Ces inconvénients ont conduit à la recherche d'une méthode de lutte écologique et durable, et donc une méthode de lutte biologique. Cette dernière repose principalement sur L'introduction des microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère et par l'élimination d'un ravageur ou d'un agent pathogène par son ennemi naturel (**Lepoivre, 2003**).

Plusieurs travaux ont été rapportés sur l'utilisation des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) comme agents de lutte biologique et comme biofertilisants. (**Jeonet et al., 2003 ; Tabliet et al., 2014; Noumavoet et al., 2016**).

Ces bactéries adaptées à l'environnement de la racine ont soit un effet neutre, soit un effet négatif sur la croissance de la plante mais aussi peuvent être très bénéfique à la plante par des effets directes et indirectes (**Antoun, 2013**).

Parmi les PGPR, de nombreux genres sont recensés tels que *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*. (**Ahmad et al., 2008**)

Le genre *Bacillus* est devenu très exploité dans plusieurs applications biotechnologiques, grâce à sa diversité génétique et métabolique et sa présence dans la nature, il produit des biofertilisants, des insecticides et différents substances, enzymes antimicrobiennes. (**Choudhary et al., 2009**).

Dans ce travail le manuscrit est scindé en deux parties :

- Une partie bibliographique qui comprend une synthèse d'un ensemble de données sur les *Bacillus* et sur le rôle des biofertilisants et effet PGPR des *Bacillus*

- Une partie pratique, dans laquelle on a suivi les étapes suivantes :

Introduction

- isolement des espèces rhizosphériques et endo-phytique du genre *Bacillus* à partir des zones arides et semi arides.
- Identification par des tests biochimiques et par une étude morphologique.
- Mise en évidence de deux activités PGPR : la fixation d'azote et la solubilisation de phosphate.

Les résultats présentés sont discutés et comparés avec d'autres études.

Enfin, le manuscrit est achevé par une conclusion qui a permis de reprendre les résultats trouvés intéressants et de tirer quelques perspectives.

Partie

Bibliographique

Chapitre 1 : Les

Bacillus

1. Les *Bacillus*

1.1. Définition

Le genre *Bacillus* est parmi les bactéries telluriques à Gram positif les plus communs et les plus prédominants. Ses espèces qui représentent 95% des firmicutes, (Éric, 2008) sont aérobie stricte ou aéro-anaérobie facultative, de forme bacillaire, catalase positif, sporulées et généralement mobile par ciliature peritriche (Dédier, 1998). Il existe des espèces acidophiles et d'autres basophiles, mésophiles ou encore thermophiles (Schleifer, 2009).

L'hétérogénéité des *Bacillus* est retrouvée au niveau de leur ADN et aussi dans leur contenu en G+C qui est varié entre 32-66 % (Schleifer, 2009). En moyenne elle contient 4973 ± 923 gènes. Ainsi, l'analyse des séquences des ARNr 16S de 51 espèces permettait de caractériser cinq groupes phylogénétiques (Alcaraz *et al.*, 2010).

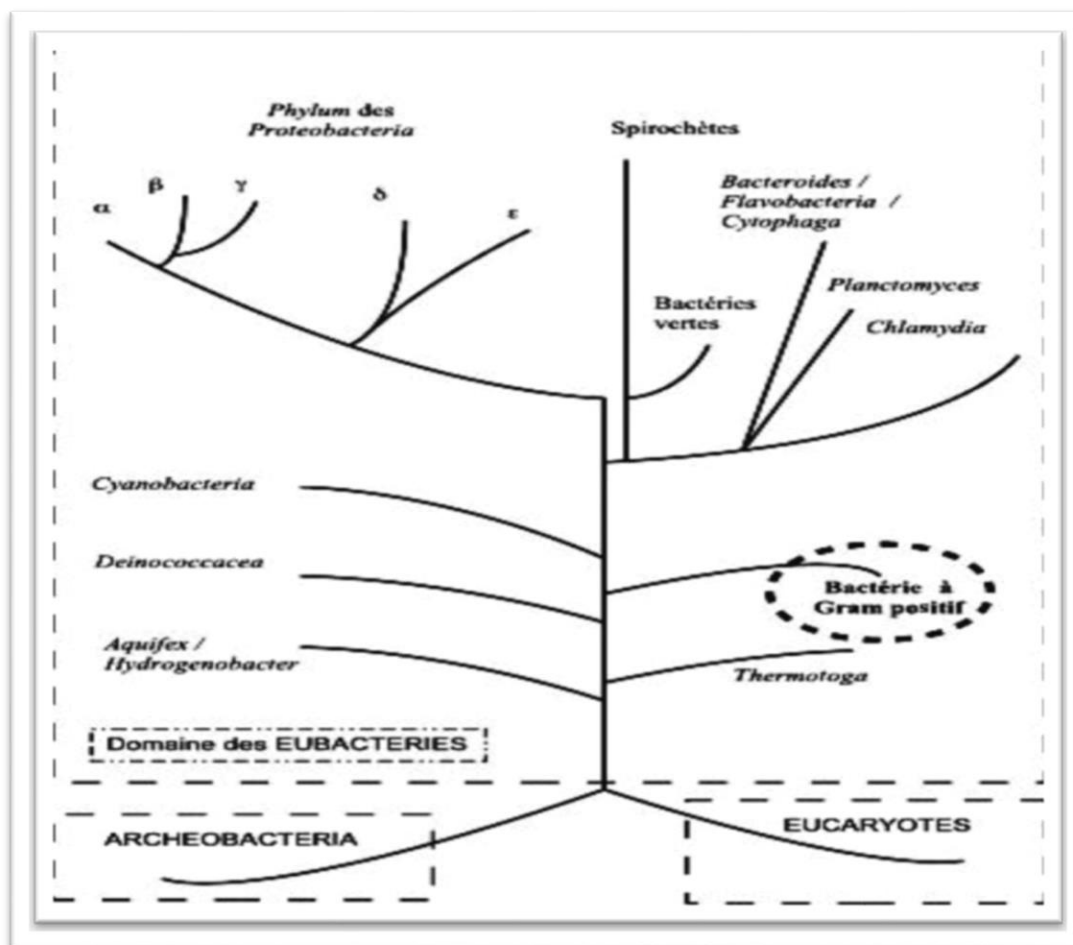


Figure 1: Représentation schématique du domaine des Eubactéries (Larpent, 2000)

1.2. Habitat des *Bacillus*:

Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondantes et omniprésentes dans la nature. Ce sont les organismes les plus nombreux parmi ceux qui se trouvent dans le sol. Il y a plusieurs espèces de *Bacillus*, dont la plupart sont des saprophytes des sols ou elles jouent un rôle important dans les cycles du carbone et de l'azote, mais également trouvées dans l'eau, l'air, les plantes, et les aliments (**Lowenfels et Lewis, 2008 ; Logan et De Vos, 2015**).

L'habitat naturel de *B. subtilis* est le sol, mais on le trouve également dans les eaux douces, les eaux côtières et les océans. L'ubiquité de la bactérie est probablement une conséquence de la formation d'endospores, qui permet la survie après une exposition même à l'environnement le plus hostile. *B. subtilis* est également associé aux plantes, aux animaux et aux aliments et se trouve dans les excréments d'animaux (**Schaechter, 2004**). *B. cereus* sont des bactéries endémiques du sol qui occupent divers habitats écologiques. Il a été rapporté que certaines souches de *B. cereus* favorisent la croissance des plantes et lutte contre leurs maladies (**Teyssou et al., 1998**).

1. 3. Taxonomie de *Bacillus* :

1. 3.1. Historique :

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des Bacillaceae, ordre des Bacillales, classe des Bacilli, et phylum des Firmicutes. Ce genre a une place très importante dans l'histoire de la bactériologie voire (Tableau 1) (**Claus et Berkeley, 1986**).

« *Vibriosubtilis* » est l'une des premières espèces bactériennes toujours en cours d'utilisation. Elle a été décrite par Ehrenberg en 1835. En 1872, Cohn l'a renommé *Bacillus subtilis*, et il a établi deux autres espèces « *Bacillus anthracis* et *Bacillus ulna* » (**Paul et al., 2011**). Depuis la création du genre *Bacillus*, beaucoup d'espèces décrites ont été transférées à d'autres genres. Cependant, ce genre est considéré comme l'un des plus grands genres et comprend plus de 200 espèces (**Zhang et al., 2009**).

La première étude taxonomique complétée sur le genre *Bacillus* a été publiée par (**Smith et al., 1952**), elle est basée sur la comparaison entre 1134 isolats représentant plus de 150 espèces.

Historiquement, les espèces ont été regroupées en six grands groupes basés sur de nombreux caractères biochimiques, morphologiques et physiologiques, et aussi sur la capacité à former des spores (**Sonenshein et al., 1993**)

Tableau 1: Classification du genre *Bacillus* (**Maughan et van ,2011**)

Domain	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacilliales
Family	Bacillaceae
Genus	<i>Bacillus</i>

1.3.2. Outils d'identification :

La caractérisation et surtout l'identification de ces microorganismes est cruciale vu l'intérêt qu'ils présentent. De nombreux auteurs ont montré que certaines souches des *Bacillus* sont reconnues comme des bactéries non pathogènes pour l'homme GRAS (General Recognized As Safe), ainsi que d'autres sont pathogènes et provoquent des infections et peuvent parfois être mortels (**Parry et al., 1983**). D'autres espèces de *Bacillus* ne sont pas pathogènes pour l'homme, mais le sont pour certaines catégories de parasites et d'insectes, par exemple, *B. thuringiensis* est utilisée dans la lutte contre les larves d'insectes dans le secteur agronomique (**Krieg et al., 1981**)

L'identification des microorganismes se base sur des méthodes classiques et présomptives de microbiologie (**Kobawila ,2003**). Conventionnellement, pour l'identification des bactéries du genre *Bacillus* les tests biochimiques sont utilisés (**Vaerewijck et al., 2001**).

Actuellement, les méthodes de biologie moléculaire ont compété les méthodes phénotypiques (**Li et al., 2009**) et sont devenues un outil complémentaire pour l'étude de la diversité bactérienne (**Adiguzel et al., 2009**). Maintenant on utilise le gène de l'ARNr 16S comme biomarqueur pour la classification moderne et l'identification. Cependant, les séquences de gènes de l'ARNr 16S présentent une variation limitée au sein des

groupes liés (Fox *et al.*, 1992). C'est pour cela qu'il est souvent difficile de faire la distinction entre les espèces qui sont très proches, tel est le cas des espèces appartenant au groupe I comme : *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amylolique faciens* et autres (Wang *et al.*, 2007)

En 1950, Smith propose une classification basée sur la forme de l'endospore et sur les modifications morphologiques qu'elle entraîne sur le corps bactérien, classés en trois groupes présentée en tableau ci-dessous (Teyssou *et al.*, 1998)

Tableau 2: Les groupes de la classification des *Bacillus* selon la morphologie de la spore et du sporange (Teyssou *et al.*, 1998).

groupe I : endospore ovale non déformante	groupe II : endospore ovale déformante	groupe III : endospore ronde déformante
<i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. sphaericus</i>
<i>B. anthracis</i> , <i>B. licheniformis</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. pasteurii</i>
<i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i>	<i>B. larvae</i>	<i>B. pantothenicus</i>
<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. subtilis</i>	<i>B. brevis</i>	
<i>B. thermodenitrificans</i> ...	<i>B. alcalophilus</i>	

1.4. Caractères bactériologiques du genre *Bacillus*:

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable, en forme de bâtonnets, se présentent isolées en chainettes ou en paires, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, la mobilité est variable selon les souches. Les espèces *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* et *B. subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique. Certaines espèces peuvent être anaérobies strictes, aérobies ou anaérobies facultatives, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase, ces bactéries forment des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température défavorable et les radiations. (Holt *et al.*, 1994)

Les *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique leurs permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être acidophiles, psychrophiles, thermophiles, halophiles ou halotolérants qui sont capables de croître à des températures, des

valeurs de pH et des concentrations de sel où peu d'autres organismes pourraient survivre. Elles sont chimio-lithotrophes ou chimio-organotrophes certaines sont auxotrophes et d'autres prototrophes, capable de pousser sur des milieux ordinaires tels que la gélose nutritive. (De Vos *et al.*, 2009).

B. cereus est une bacille à Gram positif, mobile par ciliature pérित्रiche, aéro-anaérobie facultatif, poussent sur les milieux ordinaires en 24 heures, possédant une gélatinase et une lécithinase, un cytochrome oxydase, et résistant à la pénicilline G. (Teysou *et al.*, 1998)

Bacillus thuringiensis se distingue de *Bacillus cereus* par la formation d'un corps parasporale et la pathogénicité pour des insectes. Elle est considérée comme le principal insecticide biologique commercialisé à grande échelle (Gourgau et sanglier, 1992).

B. subtilis bacille à Gram positif, en forme de bâtonnets, soit isolées soit groupées en paires ou chaînes, mobile par des cils pérित्रiches, capsulé, formant des spores ellipsoïdales ou cylindriques. Une colonie de *Bacillus subtilis* est de forme ronde à irrégulière, les bords varient de l'aspect ondulé à fimbrié, de couleur blanche, possède une catalase, utilise le citrate et gélatinase positif. Elle peut croître entre 10 et 55°C avec un optimum entre 28 et 30°C. La croissance se fait à pH entre 5.5 et 8.5. Des valeurs de pH élevées peuvent être tolérées (Bouhairi, 2017).

Bacillus anthracis est une bactérie Gram positif, sporulante, aérobie et anaérobie facultative, immobile, elle pousse sur les milieux usuels, l'aspect de ses colonies mycoïde, entouré d'une capsule, possède une gélatinase et elle est lécithinase négatif (Teysou *et al.*, 1998).

1.5. La lutte biologique :

La lutte biologique en agronomie est l'utilisation d'organismes vivants pour limiter la nocivité des ennemis de cultures (insectes, acariens, rongeurs et mauvaises herbes) (Lepoivre, 2003).

L'organisme vivant utilisé comme agent de lutte est dit « auxiliaire » de l'Homme. L'agent pathogène auxiliaire peut être : une Bactérie, un champignon, un virus et un Protozoaire. La lutte biologique est présente dans tous les écosystèmes. C'est une manière de la nature pour garder aux niveaux bas le nombre d'organismes parasites. (Van, 2006).

Tableau 3 : Activité des espèces de *Bacillus* dans la lutte biologique.

Espèce	Agents pathogènes	Plantes	Références
<i>B. lieheniformis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Tomate	(Lee <i>et al.</i> , 2006).
<i>Bacillus pumilus</i> INR 7	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Poivron	(Yi <i>et al.</i> , 2013).
<i>Bacillus cereus</i> AR156	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Tomate	(Teyssou <i>et al.</i> , 1998).
<i>B. subtilis</i> RRC 101 (5.994.117)	Fusarium moniliforme	Racines de jeunes plantes de maïs	(Bacon <i>et al.</i> , 2001).
<i>B. subtilis</i> AF1	- <i>Aspergillus niger</i> - <i>Puccinia arachidis</i>	-Le citronnier -arachide	(Van, 2006).
<i>B. megaterium</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i>	Graine de soja	(Nelson, 2004).
<i>B. cereus</i> UW 85	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Pythium ultimum</i>	éxudats de graine et de jeunes plantes	(Nelson, 2004).
<i>B. subtilis</i> , GA1,	<i>Botrytis cinerea</i>	Les pommes	(Toure <i>et al.</i> , 2004)
<i>Bacillus</i> spp	<i>F. oxysporum</i> dont <i>F.o. ciciris</i> , <i>F.o. phasioli</i> et <i>F.o. melonis</i>	pois chiche	(Landa <i>et al.</i> , 1997).

*Chapitre II : Rôle
des biofertilisants
et effets PGPR des
Bacillus*

1. Les biofertilisants

Un biofertilisant est un engrais naturel contenant une grande population d'organismes spécifiques ou un groupe d'organismes vivants ou dormants (les bactéries, les champignons, les algues, les actinomycètes) qui aident à fixer le N₂ atmosphérique ou solubiliser le phosphate du sol ainsi que la sécrétion de substances favorisant la croissance en augmentant la disponibilité des nutriments pour les plantes (**Simarmata *et al.*, 2017 ; Dineshkumar *et al.*, 2018**).

Un biostimulant microbien est une autre définition du biofertilisant décrit par **Du Jardin *et al.*, 2015**. C'est un composé d'origine biologique qui améliore l'efficacité de la nutrition des plantes, et agit aussi comme régulateurs de croissance et protecteur de plantes (**Yahkin *et al.*, 2017**).

1.1. Fabrication des biofertilisants (Biostimulant)

Les constituants des biofertilisants dépendent largement des ressources naturelles utilisées, les matières premières utilisées pour la fabrication des biofertilisants peuvent être de natures diverses (des feuilles, des graines, des racines et exsudats de plantes supérieures) et peuvent être également des bactéries, levures et champignons. On retrouve également diverses espèces d'algues, les extraits de déchets industriels ou alimentaires, composts et extraits de composts et les résidus d'aquaculture (**Yahkin *et al.*, 2017**).

Les effluents de traitements des hydrolysats de protéines, d'acides aminés d'origine animale incluant les déchets et les sous-produits, les substances humiques, les dérivés de chitine ou de chitosane des insectes, sont aussi utilisées pour la fabrication des biostimulants (**Du Jardin *et al.*, 2015**).

1.1.1. La fabrication des biostimulants à partir des micro-organismes :

La première phase de fabrication consiste à isoler les micro-organismes du sol, ou ils seront utilisés sur les systèmes de cultures, puis à assurer leur multiplication par fermentation anaérobie afin de favoriser le développement des micro-organismes bénéfiques.

La qualité du produit obtenu s'évalue d'une part par sa couleur indiquant la présence de micro-organismes bénéfiques, contrairement à une couleur noire ou rose. D'une autre part par l'absence d'odeur de putréfaction, caractéristique des micro-organismes nocifs qui produisent des sulfures, de l'ammoniaque, etc...

La deuxième phase, appelée phase d'activation, consiste à préparer le biostimulant en phase liquide à partir des micro-organismes concentrés en phase solide obtenus précédemment. Quatre à cinq cycles d'activation peuvent être conduits à partir du même inoculum ce qui augmente la capacité de production du biofertilisant (**Desfontaines et al., 2018**).

2. Catégories et biodiversité des biofertilisants microbiens

Le terme "rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR)" a été introduit par Kloepper et Schroth (**Kloepper et al., 1978**) ouvrant la voie à de plus grandes découvertes sur le PGPR. Les droits de propriété intellectuelle ne sont pas seulement associés à la racine pour exercer des effets bénéfiques sur le développement de la plante mais aussi pour avoir des effets positifs sur le contrôle des microorganismes phytopathogènes (**Kloepper et al., 1980 ; Son, 2014**).

La rhizosphère colonisatrice microbienne comprend des bactéries, des champignons, des actinobactéries, des protozoaires et des algues. Cependant, les bactéries sont les plus abondantes dans la rhizosphère (**Kaymak, 2010**), l'amélioration de la croissance des plantes par l'utilisation de ces populations microbiennes est bien connue et prouvée (**Saharan et al., 2011; Bhattacharyya et al., 2012**).

Un nombre croissant de recherches et d'études porte sur la gestion du système sol-végétal et micro-organismes ont permis notamment l'identification et la sélection de différents genres de rhizobactéries, telles que l'*Azospirillum* (**Krieg et Döbereiner, 1984**), *Raoultella* (**Van Elsas et al., 2007**) et *Bacillus* (**Siddiqui, 2006**). Le but de ces recherches est de développer des bio-engrais sous forme sèche et d'obtenir une concentration bactérienne nécessaire pour améliorer la croissance des plantes. D'autres microorganismes sont considérés également comme biofertilisants qui sont des champignons (**Vessey et Heisinger, 2001**).

2.1. Microorganismes les plus importants utilisés dans les biofertilisants

Le tableau 4 ci-dessous représente les bactéries et les champignons, utilisés comme biofertilisants :

		Références
Bactérie	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Moenne <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Bacillus pumilus</i>	(Benhamou <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Azospirillum brasilense</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Klebsiella</i> <i>Burkholderia</i>	(Alabouvette et Cordier, 2015)
Champignon	les mycorhizes à arbuscules et <i>penicillium bilaii</i>	(Vessey et Heisinger, 2001)
	<i>Trichoderma</i>	(Mhamdi, 2011)

2.2. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sont un groupe de bactéries que l'on peut trouver dans la rhizosphère et qui ont un effet positif sur la plante, pour ces effets on les considère comme rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (Dey *et al.*, 2004 ; Herman *et al.*, 2008 ; Minorsky, 2008), ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la fertilisation biologique des sols (Glick, 1995). Elles peuvent induire la croissance des plantes par la promotion directe ou indirecte et présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux. Les PGPR peuvent influencer la croissance des plantes de façon directe ou indirecte (Figure 2) (Verma *et al.*, 2010).

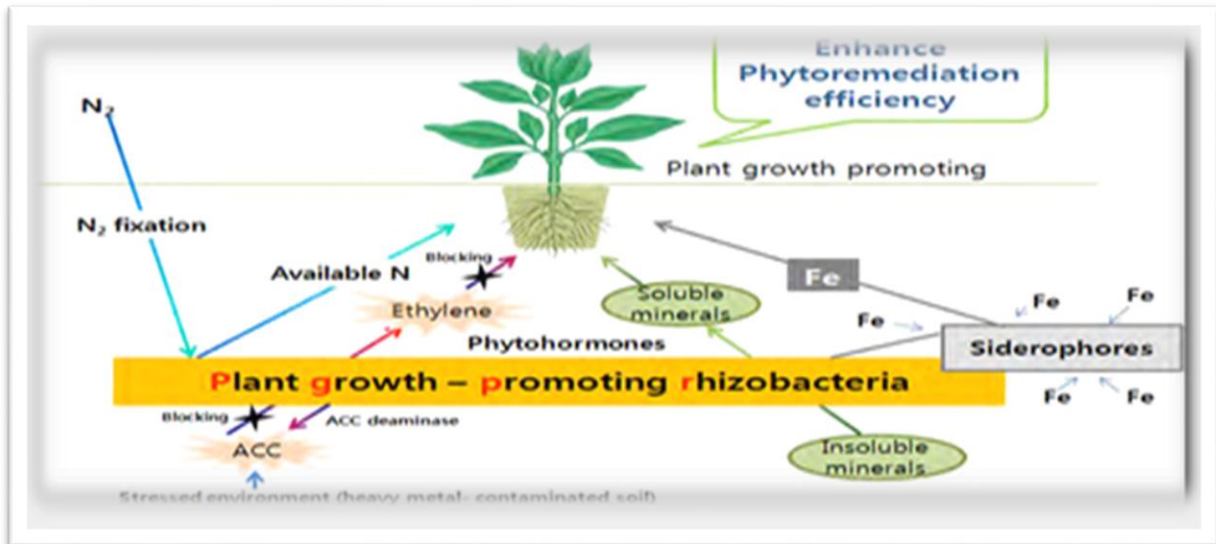


Figure 2: Les différents Rôle des PGPR (Macking, 2007)

2.2.1. Effet PGPR direct

2.2.1.1. Fixation d'azote

L'azote est un aliment essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes. La source la plus importante d'azote dans les écosystèmes naturels est celle fixée par les micro-organismes du sol (Burgmann *et al.*, 2004). Les plantes peuvent obtenir l'azote sous deux formes minérales, soit l'ammonium (NH_4^+) ou le nitrate (NO_3^-) (Mantelin et Touraine, 2004).

Il est impossible d'utiliser l'azote atmosphérique (N_2) sous sa forme moléculaire. Pour cette raison, il doit être incorporé dans des composés assimilables par les animaux et les plantes. Il peut être fixé chimiquement ou biologiquement. La fixation biologique de l'azote est possible grâce à certaines bactéries capables de transformer l'azote moléculaire en ammonium via la nitrogénase (Guillaume, 2004).

Les micro-organismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres (Graham, 1988).

Ding *et al.* (2005) disent que parmi les bactéries fixatrices d'azote on trouve : *Paenibacillus Azotofixans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus ciruclans* qui permettent à la plante d'acquérir l'azote nécessaire sous forme minérale.

2.2.1.2. Solubilisation du Phosphate

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour le développement des plantes mais aussi un nutriment limitant leur croissance, malgré son abondance dans le sol (**Singh et Satyanarayana, 2011**). Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologique disponible (**Ezawa et al., 2002**).

Moins de 10 % du phosphore total retrouvé dans le sol est accessible aux plantes (**Gunes et al., 2009**). On retrouve dans le sol le phosphore sous forme minérale comme l'hydroxyapatite, l'apatite et l'oxyapatite. ce phosphore minéral dans les sols acides, se précipite avec les oxydes et hydroxydes de fer ou d'aluminium tandis que, dans les sols alcalins, le phosphore est retrouvé fixé au calcium (**Rodriguez et Fraga, 1999**).

Le phosphore est aussi retrouvé sous forme organique qui est majoritairement retrouvé sous la forme d'inositol phosphate (phytate) (**Rodriguez et Fraga, 1999**). Le phosphore organique doit être déphosphorylé sous forme inorganique afin que son assimilation par les plantes soit possible (**Singh et Satyanarayana, 2011**).

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source favorable comme agent bio-fertilisant dans l'agriculture. La capacité de quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. (**Sharma et al., 2007**).

Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas* spp. (**Subbarao, 1988 ; Kucey et al., 1989**). *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. sircalmous* sont les plus performantes dans la solubilisation des phosphates (**Podile et Kishore, 2006**).

2.2.1.3. Production d'hormones de croissance

I. Production d'acide indole-3-acétique

L'AIA est le plus important du groupe des auxines et le plus produit par les PGPR (**Uzzaman et al., 2009**) et il est l'auxine la plus naturellement distribuée chez les plantes vasculaires, les mono et dicotylédones, les filicophyta et les gymnospermes (**Srivastava, 2002**).

La production d'AIA a été détectée chez plus de 80 % des bactéries de la rhizosphère, les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices (**Loper et Schroth, 1986**).

Les espèces bactériennes capables de produire de l'AIA sont : les genres *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Bacillus* (Yuan *et al.*, 2011).

II. Production de Cytokinines

Les cytokinines sont des aminopurines N₆ substituées qui jouent un rôle-clé dans l'activation de la germination des graines, la division cellulaire des plantes, la promotion de la ramification, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles (Salisbury et Ross, 1992). En effet, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansine, protéine qui facilite l'expansion de la cellule végétale, provoque sa turgescence et induit le relâchement des parois cellulaires des plantes (Downes *et al.*, 2001).

III. Production de Gibbérellines

Ce sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques, elles agissent sur la division cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement comme la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (MacMillan, 2002). Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini *et al.*, 2004).

La capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérellines a été initialement décrite chez *Azospirillum brasilense* (Tien *et al.*, 1979) et *Rhizobium* (Williams et Sicardi, 1982), puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Mitter *et al.*, 2002 ; Tsakelova *et al.*, 2006 ; Joo *et al.*, 2009).

IV. Régulation d'éthylène

L'éthylène est connu pour son rôle dans le développement et la régulation de la croissance des plantes et aussi dans la maturation des fruits, cette phytohormone gazeuse stimule la formation de racines adventives et des poils absorbants, favorise la germination par la levée de dormance des graines, et contrôle certains mécanismes systémiques de défense de la plante vis-à-vis des phytopathogènes. Cependant, si la concentration en éthylène est trop élevée, l'élongation racinaire est inhibée chez plusieurs plantes (Abeles *et al.*, 1992).

V. L'activité ACC désaminase

L'ACC désaminase est une enzyme présente dans de nombreuses bactéries rhizosphériques. Ces bactéries peuvent prendre l'ACC à partir de racine de la plante et de le convertir en a-ketobutyrate et de l'ammoniac (**Holguin et Glick, 2001**). Il en résulte une diminution des niveaux d'ACC et donc des taux d'éthylène dans la plante, et une diminution de stress des plantes (**Piiego *et al.*, 2011**).

2.2.2. Effet PGPR indirects

L'effet phytobénéfiques indirect des bactéries PGPR résulte d'interactions entre PGPR et des pathogènes et/ou parasites de la plante, à l'occasion desquelles les effets négatifs de ces derniers sont diminués (**Ramette *et al.*, 2006 ; Rezzonico *et al.*, 2007**). Ces interactions correspondent souvent à de la compétition ou de l'antagonisme (**Bally et Elmerich, 2007**).

En général, les principaux modes de biocontrôle attribués à ces rhizobactéries sont :

I. la compétition

C'est un mécanisme biologique utilisé par les PGPR pour éliminer les phytopathogènes. Elle se passe entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour leur croissance (**Dommergues et Mangenot, 1970 ; Shameer et Prasad, 2017**).

II. Antibiose

C'est le mécanisme le plus efficace par lequel les microorganismes peuvent contrôler les maladies des plantes par la production et la libération des molécules qui tuent ou réduisent la croissance des pathogènes cibles (**Harman et Shores, 2007**).

III. Le parasitisme

Ce mécanisme consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (**Helluy et Holmes, 2005**). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques telles que les glucanases, les chitinases et les lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène (**Corbaz, 1990**).

IV. Résistance systémique induite (ISR)

C'est la stimulation des défenses de la plante par la synthèse d'éliciteurs appartenant à la classe des antibiotiques (le 2,4- diacetylphoroglucinol DAPG, principalement), et des phytohormones liées au stress (l'acide jasmonique, l'acide salicylique, la cadavérine, etc.),

ainsi que la production d'enzymes liées au catabolisme d'éthylène (l'ACC désaminase) (Jourdan *et al.*, 2008 ; Parray *et al.*, 2015).

V. Bioremédiation

Les sols pollués par les métaux lourds toxiques et les pesticides (les composés xénobiotiques), décontaminés par l'immobilisation et la transformation des métaux les rendant inactifs pour tolérer leur absorption. Les cellules végétales sont étroitement associées aux cellules microbiennes qui se développent en biofilm sur la surface de la racine, générant des molécules de signaux et entraînant un phénomène nommé : « quorum sensing ». Cette capacité des microbes à sentir le milieu environnant joue un rôle impératif dans l'efficacité nutritive et peut contrebalancer les effets délétères des métaux lourds sur les plantes (Daniels *et al.*, 2004).

3. Mode d'application des biofertilisants

Il existe une grande variété de biofertilisants, ce qui implique des conditions de conservation et d'application spécifiques en fonction des organismes vivants qu'ils contiennent. Selon le type de micro-organismes utilisé, le mode d'application, ou encore la formulation (granulés, liquide et poudre), les recommandations d'utilisation et de conservation peuvent varier. Il est donc important de comprendre les spécificités et les mécanismes d'actions du produit employé, afin de maximiser ses chances d'implantation et optimiser son efficacité (Laureneau *et al.*, 2016).

- *Application foliaire*

La fertilisation foliaire est un outil qui peut s'avérer très intéressant si l'on comprend bien son fonctionnement. Un de ses principaux avantages, c'est que les éléments nutritifs sont absorbés plus rapidement que le cas d'une application au sol. De plus, dans certaines situations les éléments présents dans le sol ne sont pas disponibles pour la plante au moment où elle en a besoin (Bourbonnais, 2015).

La disponibilité des éléments pour la plante dépend de plusieurs facteurs, tels que la compaction, la profondeur, l'humidité et la température du sol. Ces facteurs limitants sont dépourvus de sens lorsque nous parlons d'application foliaire durant certains stades de croissance, la plante exige plus de nourriture que ce qu'elle est capable d'absorber, c'est pourquoi la fertilisation foliaire devient incontournable pour l'obtention de rendements supérieurs et de qualité (Bourbonnais, 2015).

- **Application racinaire**

Les plantes prélèvent les éléments minéraux du sol pour produire les composés organiques. Il est établi que plusieurs éléments sont nécessaires pour le fonctionnement normal de la machine biochimique de la plante. Ainsi, pour une croissance optimale de la plante, des éléments nutritifs doivent être disponibles :

- En solution dans l'eau du sol.
- En quantités adéquates et équilibrées, correspondant à la demande immédiate de la culture.
- Sous une forme qui soit accessible au système racinaire.

4. Rôle biotechnologique potentiel des biofertilisants

Les biofertilisants constituent une alternative naturelle à l'utilisation d'engrais chimiques pour un environnement sain et durable sans produits chimiques (Aadel, 2017).

Produit des micro-organismes qui libèrent dans leur environnement des molécules (les auxines, les gibbérellines, les cytokinines), ils permettent de limiter les phénomènes d'érosion et de lessivage. (Laureneau *et al.*, 2016).

Les bio-fertilisants ont le potentiel d'améliorer la santé et la productivité des plantes cultivées et réduisent également le coût de production car ils ont la tendance à diminuer les doses d'engrais chimiques utilisées. (Mohammadi, 2015)

Les bio-fertilisants permettent d'améliorer directement ou indirectement l'assimilation des éléments nutritifs par la plante, afin d'optimiser leur croissance et leur développement (Laureneau *et al.*, 2016)

Partie

Expérimentales

Chapitre 1 :
Matériels et
Méthodes

Cette étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. Elle a pour but d'isoler à partir du sol ou des racines de plantes des espèces du genre *Bacillus* sp et d'étudier leur activité PGPR.

Prélèvement des échantillons de sol et des plantes

Douze échantillons de sols et de plantes ont été prélevés dans diverses régions arides et semi-arides du sol salin à travers l'Ouest de l'Algérie plus précisément à Mostaganem et à Oran. Ce choix a été fait sur la base de la prédominance de ces plantes sauvages et indigènes dans les sites étudiés pour isoler les bactéries rhizosphériques et les endophytes. Les échantillons obtenus ont été prélevés et mis dans des sachets stomacher stériles. Ils sont gardés au frais et transportés au laboratoire.

I. Isolement des bactéries

- Préparation de la série des dilutions pour les bactéries endophytes

L'isolement des bactéries endophytes a été réalisée par un prélèvement de 1g de racines après élimination de l'excès de sol, la désinfection se fait par une succession d'étapes en commençant par un lavage des racines de chaque échantillon par l'eau de robinet, puis on les immerge dans 100ml d'éthanol (75%).

Après lavage avec l'eau distillé stérile (EDS) on les immerge dans la solution d'hypochlorite (1%) de sodium, ensuite on lave encore une fois avec EDS, et finalement les racines sont inondés dans un tampon phosphate salin PBS (**Annexe 01**). A l'aide d'un mortier on les écrase bien, puis on les immerge dans du PBS après une agitation au vortex.

Des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-6} sont réalisées à partir de la solution mère, 0,1ml de chaque dilution est étalé en surface sur le milieu Luria Burtani (LB) (**Annexe 01**).

- Préparation de la série des dilutions pour les bactéries rhizosphériques

L'isolement des bactéries à partir de la rhizosphère (appelée rhizobactérie) se fait par prélèvement de 1g des racines et du sol qui seront inondé dans PBS et agités pendant 10 min à l'aide d'un vortex, ensuite des dilutions ont été préparées et ensemencées sur milieu Luria Burtani (LB).

1- Le dénombrement

La densité microbienne a été estimée et exprimée en Unité Formant Colonie (UFC) par gramme de sol/racine après 2 à 3 jours d'incubation à 28 ° C.

2 – La purification des souches

Le criblage des *Bacillus* a été réalisée par observation macroscopique, les isolats qui présentent différentes morphologies de colonies ont été purifiés par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention de cultures pures. Les isolats de *Bacillus* seront par la suite confirmés par la coloration simple de fuchsine de Ziehl (la formation de l'endospore) et la coloration de Gram.

3 – L'identification

3.1. L'étude morphologique

Après l'incubation à une température de 28°C pendant 3 jours, les colonies bactériennes apparaissent et elles sont observées macroscopiquement et microscopiquement.

3.1.1. L'observation macroscopique

Elle se fait à l'œil nue, permet de voir la forme, la couleur, la transparence vis-à-vis de la lumière, le relief et la taille de la colonie.

3.1.2. L'observation microscopique

Deux types de coloration permettent de caractériser les bactéries ; la coloration simple à la fuchsine de Ziehl et la coloration de Gram. La fuchsine est un colorant qui permet de fixer et de colorer en rouge la membrane cytoplasmique de la bactérie et le tour de l'endospore.

La coloration de Gram est la coloration de base en bactériologie, qui a pour objectif de classer les micro-organismes en deux groupes (Gram+ et Gram-) en fonction de la composition chimique de leur paroi et son affinité aux différents colorants (**Perry et al ., 2004;Camille,2007**).

3.2. Les tests biochimiques

3. 2.1. La recherche de la catalase

Pour mettre en évidence la présence de cette enzyme, une suspension bactérienne est mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame propre. La présence de l'enzyme se traduit par un dégagement immédiat des bulles de gaz (**Anonyme, 2011**).

3.2.2. L'utilisation de citrate

Les bactéries capables d'utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone pourront se développer sur ce milieu. La fermentation du citrate de sodium entraîne alors une acidification qui provoque une coloration bleue du milieu en présence de bleu de bromothymol (indicateur de pH). La pente du milieu estensemencée avec une strie sur toute la surface. L'incubation se fait à 30°C, pendant 18 heures (**Simmons, 1926**).

3.2.3. La fermentation des sucres et production de gaz

La Triple Sugar Iron (TSI) contient trois glucides (glucose, lactose et saccharose), chaque colonie à étudier estensemencée en strie sur la pente (ensemencement sur la surface) puis en piqûre profonde dans le culot et incubées à 30°C pendant 24h (**Hajna, 1945**).

Après l'incubation, la lecture du milieu TSI se fait comme suit : la fermentation du glucose est négative si le culot est rouge alors qu'elle est positive si le culot est jaune. Pour la fermentation du lactose si la pente est rouge donc la bactérie est lactose et Saccharose (-), si la pente est jaune donc la bactérie est lactose et saccharose (+). La bactérie est gazogène s'il y a l'apparition de bulles de gaz dans le culot. Par rapport à la formation d'H₂S, la bactérie forme l'H₂S s'il y a la présence d'une coloration noire entre le culot et la pente ou tout au long de la piqûre.

3.2.4. L'étude de la mobilité et de la fermentation du mannitol

La mobilité bactérienne ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées en ensemençant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. La mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqure d'inoculation, l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune (Gerhardt *et al.*, 1994).

4. L'étude de l'activité PGPR des *Bacillus*

4. 1. La préparation d'inoculum

Pour la préparation de l'inoculum, des tubes à essai contenant 10ml d'eau peptonée (Annexe 03) ont été inoculés par quelques colonies bactériennes préalablement réactivées (culture jeune de 18-24h) pour préparer une suspension bactérienne ou sa densité optique a été ajustée à 0.8 à 600 nm en utilisant un spectrophotomètre 6715 UV-visible JENWAY (Kumar *et al.*, 2001)

4.2. La solubilisation du phosphate

Les cultures des souches isolées ont été déposées sous forme de spots de 5 μ l à la surface du milieu Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) (Annexe 01). Après sept à dix jours d'incubation à 30°C, l'apparition d'une zone claire autour de la colonie bactérienne indique une activité positive de solubilisation du phosphate.

La lecture des résultats se fait par mesure du diamètre de la solubilisation (colonie + halo) et celui de la colonie bactérienne. L'indice de la solubilisation est ensuite calculé par le rapport au diamètre totale (halo + colonie) et le diamètre de la colonie (Premono *et al.*, 1996)

4.3. La fixation de l'azote

Les bactéries fixatrices d'azote ont été inoculées sur milieu solide exempté d'azote « Burk's N-free » (Annexe 02) sous forme de spots avec 5 μ l de souche bactérienne et incubées à 30°C pendant sept à dix jours. Toute croissance bactérienne à la surface de ce milieu indique une activité positive de la fixation d'azote. (Wilson et Knight, 1952 ; Park *et al.*, 2005)

5. Les analyses statistiques

L'ensemble des résultats a été analysé à l'aide d'un programme statistique, SPSS (V.27) par l'utilisation du test de Tukey dont le seuil d'erreur alpha est $\leq 0,05$.

Chapitre II :

Résultats et

Discussions

I- Le dénombrement, l'isolement et la sélection des bactéries

Un total de 60 isolats montrant des différences macroscopiques (taille, contour, aspect...etc) ont été obtenues à partir des échantillons étudiés. L'ensemble des isolats croissent en aérobiose sur milieu LB pendant 48 à 72h à une température d'incubation de 28°C. Le nombre des bactéries endophytes est de 32 bactéries, il est plus élevé que celui de bactéries isolées du sol rhizosphérique qui est de 28 bactéries. Le dénombrement en UFC/g a révélé que la densité bactérienne des endophytes de 10^6 UFC /gramme de racines (grc) est plus importante par rapport à celle des bactéries rhizosphériques qui est de 40×10^4 UFC/ grc. Les *Bacillus* sont abondantes dans les deux sites successivement le site M ($4,1 \times 10^6$ UFC/ grc) et le site O ($7,6 \times 10^4$ UFC/ grc).

I-1. L'aspect macroscopique

Après l'isolement, les colonies bactériennes développées sur le milieu LB sont caractérisées selon leurs aspects macroscopiques (**Tab5**) (**figure 3-4**).



Figure 3: L'aspect des colonies des isolats rhizosphériques sur milieu LB



Figure 4: L'aspect des colonies des isolats endophytiques sur milieu LB

Tableau 5 : L'aspect morphologique des colonies obtenues sur LB après 48h d'incubation.

Bactérie	Forme	Contour	Relief	Taille	Surface	Couleur	Opacité
<i>Bacillus</i> sp1	Ronde	Régulier	Convexe	2mm	Lisse Brillante	Crémeuse	Translucide
<i>Bacillus</i> sp2	Ronde	Régulier	Bombé	1mm	Lisse Brillante	Blanchâtre jaunâtre	Translucide
<i>Bacillus</i> sp3	Ronde	Irrégulier	Convexe	4mm	Lisse Brillante	Blanchâtre jaunâtre	Translucide

I-1.1 Le dénombrement bactérien exprimé en Unité formant colonie (UFC)

Tableau 6: Le nombre des colonies des isolats de site O et site M exprimées en UFC/g.

	Site O		Site M	
	ED	R	ED	R
Site d'isolement	$3,6 \times 10^6$	$2,5 \times 10^1$	$1,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$
* Nombre de colonie ufc/grc	$1,1 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$1,01 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$
	$6,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
	$2,6 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$
	$2,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$4,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$
Moyenne	10×10^5	40×10^4	41×10^5	37×10^4

NB : UFC, Unité Formant Colonie. **R**, Rhizosphérique. **ED**, Endophytique

I-2. L'aspect microscopique

L'aspect microscopique a été observé à l'état frais et après la coloration simple à la fuchsine de ziehl et de Gram. Cette observation a révélé que la souche se présente sous forme de bâtonnets, de petites tailles droites. Leurs extrémités arrondies sont regroupées sous formes de diplobacilles ou chainettes à Gram positif (figure 8). Elles sont immobiles avec une endospore ovale, subterminale, non déformante (**Gugliandolo et al., (2003)**). Les *Bacillus* possèdent la capacité de produire les spores qui vont permettre de résister aux conditions défavorables. Ces cellules ont une forme d'une petite sphère dont la paroi est épaisse.

I-2-1. La coloration simple à la fuchsine de ziehl

Après réalisation de la coloration, il y'a eu une apparition des endospores sur le champ microscopique (**Figure 5**).

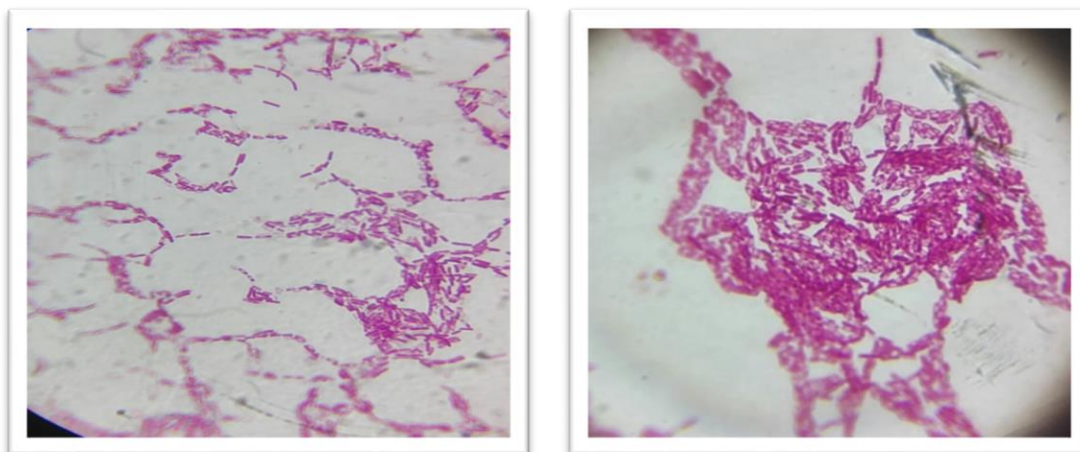


Figure 5: L'aspect microscopique des cellules des *Bacillus* sp par la coloration simple à la fuchsine de Ziehl.

I-2-2. La coloration de Gram

Après la réalisation de la coloration de Gram, les bactéries Gram positives apparaissent en violet foncé (**Figure 6**).

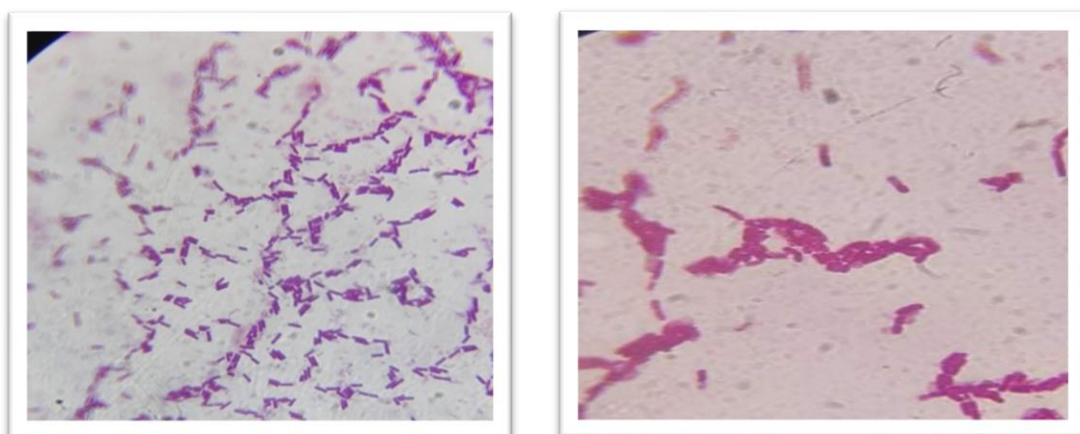


Figure 6 : l'aspect microscopique des cellules des *Bacillus* sp par la coloration de Gram (G100x).

I-3 – L'identification

I-3-1- Les tests biochimiques

I- 3-1-1- La Catalase

Le dégagement gazeux chez les isolats est expliqué par la présence du catalase, l'enzyme responsable de la dégradation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Les résultats obtenus ont montré que les isolats (**MD1, MD2, MD3, MD4, OD1₁, OD1₂, OD2₃, OD3₂, OD4₂**,

OD5₃, OD5₆, OD6₅, OD6₆, OR2₁, OR2₂, OR3₃, OR3₄, OR4₁, OR4₃, OR4₄, OR5₁, OR5₂, OR5₄, OR5₅, OR6₄, OR6₇, OR6₈, OR6₉) sont catalase positive. Par ailleurs, les isolats (OD3₁, OD6₁, OD6₂, OD6₃, OR4₅) sont catalase négative. La figure 7 présente une réponse nettement positive à ce test, puisque des bulles d'air sont observables dans la goutte de peroxyde d'hydrogène ajoutée.

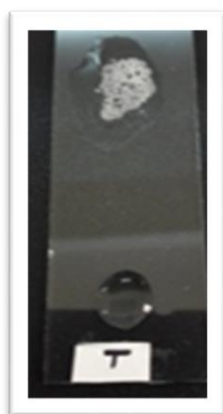


Figure 7: Résultat positif de catalase de l'isolat OD5₆



Figure 8 : Résultat négatif de catalase de l'isolat OR4₅

Tableau 7: Les résultats du test catalase pour les isolats endophytiques et rhizosphériques.

Isolat ED	Catalase	Isolat R	Catalase
MD1	+	OR2 ₁	+
MD2	+	OR2 ₂	+
MD3	+	OR3 ₃	+
MD4	+	OR3 ₄	+
OD1 ₁	+	OR4 ₁	+
OD1 ₂	+	OR4 ₃	+
OD2 ₃	+	OR4 ₄	+
OD3 ₁	-	OR4 ₅	-
OD3 ₂	+	OR5 ₁	+
OD4 ₂	+	OR5 ₂	+
OD5 ₃	+	OR5 ₄	+
OD5 ₆	+	OR5 ₅	+
OD6 ₁	-	OR6 ₄	+
OD6 ₂	-	OR6 ₇	+
OD6 ₃	-	OR6 ₈	+
OD6 ₅	+	OR6 ₉	+
OD6 ₆	+		

NB : Catalase+, apparition de bulles

Catalase-, absence de bulles

I- 3-1-2- Utilisation du Citrate de simmons

Les 33 souches sont citrate négatives donc aucune n'utilisent le citrate comme seule source de carbone

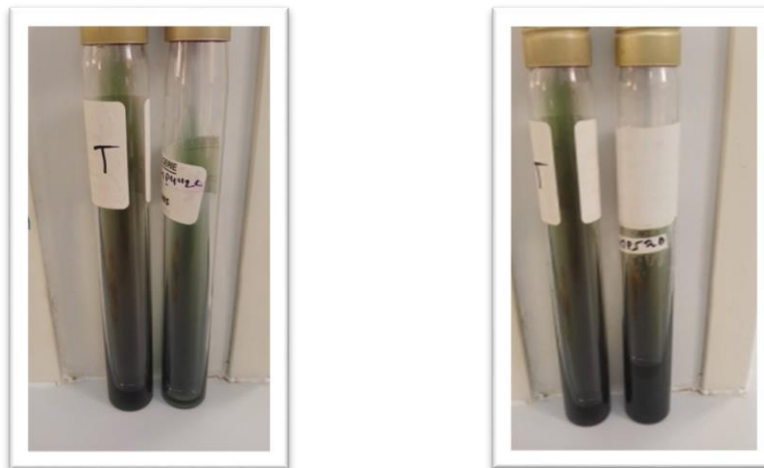


Figure 9 : Le résultat négatif du test de citrate de simmons.

Tableau 8: Les résultats du test citrate de Simmons des isolats endophytiques et rhizosphérique.

Isolat ED	Citrate	Isolat R	Citrate
MD1	-	OR2 ₁	-
MD2	-	OR2 ₂	-
MD3	-	OR3 ₃	-
MD4	-	OR3 ₄	-
OD1 ₁	-	OR4 ₁	-
OD1 ₂	-	OR4 ₃	-
OD2 ₃	-	OR4 ₄	-
OD3 ₁	-	OR4 ₅	-
OD3 ₂	-	OR5 ₁	-
OD4 ₂	-	OR5 ₂	-
OD5 ₃	-	OR5 ₄	-
OD5 ₆	-	OR5 ₅	-
OD6 ₁	-	OR6 ₄	-
OD6 ₂	-	OR6 ₇	-
OD6 ₃	-	OR6 ₈	-
OD6 ₅	-	OR6 ₉	-
OD6 ₆	-		

NB : ED, endophytique
R, rhizosphérique

I-3.1.3. La fermentation des sucres et production de gaz

L'étude de la fermentation des sucres et la production de gaz réalisée sur milieu de culture TSI a montré que sur un totale de 33 isolats seulement OR2₁, OR2₂, MD2, MD3, MD4, OD6₂, OD6₃ qui fermentent le glucose. Les 33 isolats sont lactose négatives donc aucune d'eux ne fermentent le lactose. Tous les souches sont H₂S négatives et ne dégagent pas de gaz. Les résultats de la caractérisation biochimique sont récapitulés dans les tableaux 9 et 10.

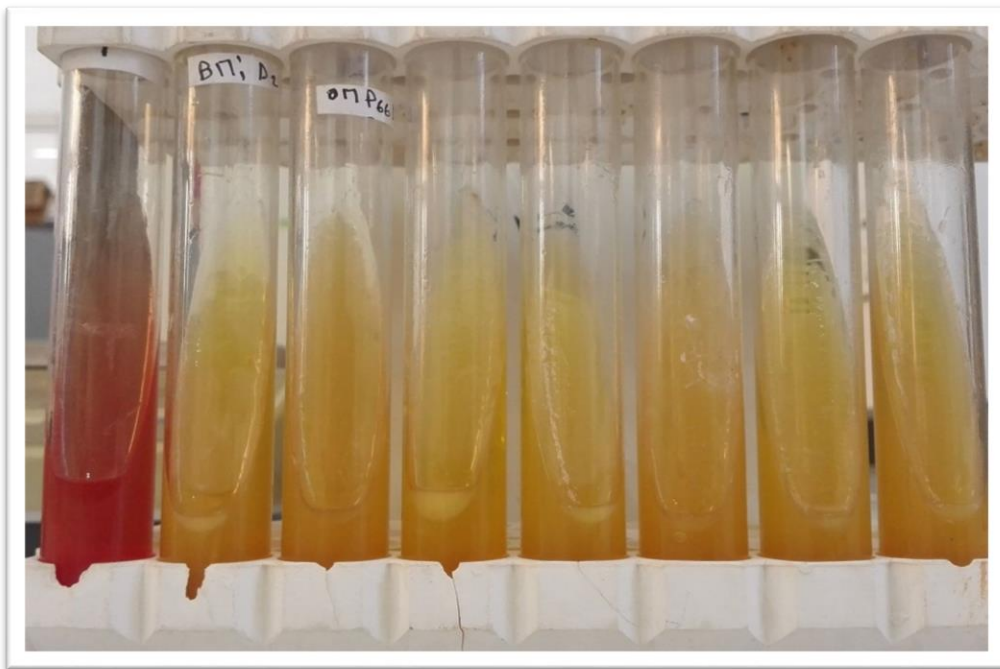


Figure 10: L'aspect des résultats positif de TSI des isolats.

Tableau 9: les résultats du TSI des isolats Rhizosphériques.

Isolat R	Glucose	Lactose	H ₂ S	Gaz
OR2 ₁	+	-	-	-
OR2 ₂	+	-	-	-
OR3 ₃	-	-	-	-
OR3 ₄	-	-	-	-
OR4 ₁	-	-	-	-
OR4 ₃	-	-	-	-
OR4 ₄	-	-	-	-
OR4 ₅	-	-	-	-
OR5 ₁	-	-	-	-
OR5 ₂	-	-	-	-
OR5 ₄	-	-	-	-
OR5 ₅	-	-	-	-
OR6 ₄	-	-	-	-
OR6 ₇	-	-	-	-
OR6 ₈	-	-	-	-
OR6 ₉	-	-	-	-

Tableau 10: les résultats du TSI des isolats endophytiques.

Isolat ED	Glucose	Lactose	H ₂ S	Gaz
MD1	-	-	-	-
MD2	+	-	-	-
MD3	+	-	-	-
MD4	+	-	-	-
OD1 ₁	-	-	-	-
OD1 ₂	-	-	-	-
OD2 ₃	-	-	-	-
OD3 ₁	-	-	-	-
OD3 ₂	-	-	-	-
OD4 ₂	-	-	-	-
OD5 ₃	-	-	-	-
OD5 ₆	-	-	-	-
OD6 ₁	+	-	-	-
OD6 ₂	+	-	-	-
OD6 ₃	+	-	-	-
OD6 ₅	-	-	-	-
OD6 ₆	-	-	-	-

NB : Glucose (+) fermentation de glucose
 Glucose (-) pas de fermentation
 Lactose (-) pas d'oxydation de lactose
 H₂S-, absence de précipité noir
 Gaz-, absence de bulles de gaz

I-3.1.4. Recherche de la mobilité

La mise en évidence de la mobilité des isolats réalisée sur le milieu de culture semi solide mannitol mobilité traduite par une diffusion des bactéries sur la gélose a montrée une réaction positive de la mobilité des isolats (OR34 et MD4) par contre, le reste des isolats (31) sont immobile et seulement les isolats (OR34, OR52, OR55, OR68, MD1, OD6₆) dégradent le mannitol (**Figure 11 -12**).

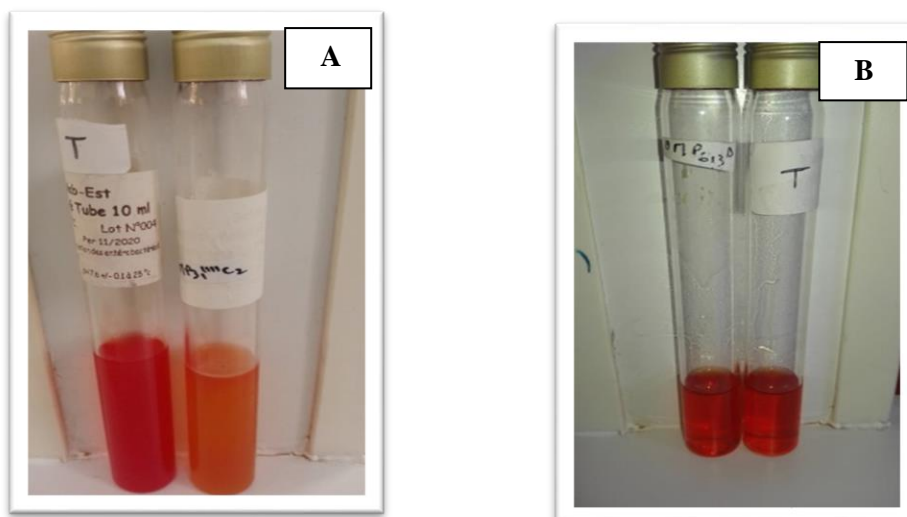


Figure 11: Aspect du milieu mannitol mobilité

A (l'isolat OC 3₄) B (l'isolat OD6₃).

Tableau 11: les résultats du Mannitol des isolats endophytes et rhizosphériques.

isolat R	Mannitol mobilité		isolat ED	Mannitol mobilité	
OR21	I	-	MD1	I	+
OR22	I	-	MD2	I	-
OR33	I	-	MD3	I	-
OR34	M	+	MD4	M	-
OR41	I	-	OD1 ₁	I	-
OR43	I	-	OD1 ₂	I	-
OR44	I	-	OD2 ₃	I	-
OR45	I	-	OD3 ₁	I	-
OR51	I	-	OD3 ₂	I	-
OR52	I	+	OD4 ₂	I	-
OR54	I	-	OD5 ₃	I	-
OR55	I	+	OD5 ₆	I	-
OR64	I	-	OD6 ₁	I	-
OR67	I	-	OD6 ₂	I	-
OR68	I	+	OD6 ₃	I	-
OR69	I	-	OD6 ₅	I	-
			OD6 ₆	I	+

NB : R, Rhizosphérique I, immobile
 ED, Endophytique M, mobile
 (+) fermentation
 (-) pas de fermentation

II- Activité PGPR des *Bacillus*

II-1- Solubilisation du phosphate

L'étude de la solubilisation de phosphate chez les isolats lors de l'inoculation sur milieu de culture PVK, et l'incubation à une température de 30°C pendant sept à dix jours a montré la formation d'un halo transparent au tour de la colonie. Nos résultats ont montré la capacité de 23 souches isolées à solubiliser le phosphate (**Tableau 12-13**). La lecture a été effectuée en mesurant le diamètre du l'halo et le diamètre de la colonie et en calculant l'indice de solubilité.



Figure 12: l'aspect de l'halo de solubilisation du phosphate sur milieu PVK de l'isolat OC64.

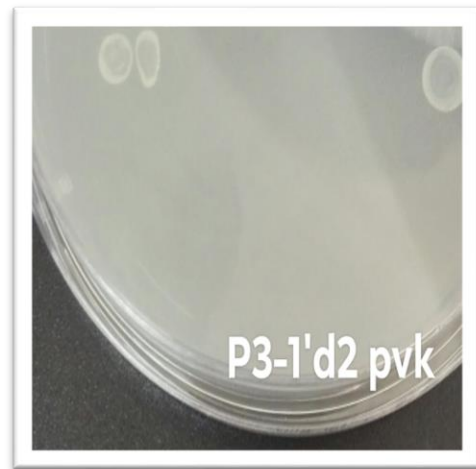


Figure 13: l'aspect de l'halo de solubilisation du phosphate sur milieu PVK de l'isolat OD31.

Tableau 12: les résultats de calcul de diamètre de solubilisation de phosphate.

ISOLAT ED	Diamètre de solubilisation
MD ₁	0,16 ±0,03 ^b
MD ₂	0,3 ±00 ^{cd}
MD ₃	0,23 ±03 ^e
MD ₄	0,33 ±03 ^d
OD ₁₁	0
OD ₁₂	0
OD ₂₃	0
OD ₃₁	0,13±03 ^a
OD ₃₂	0,20 ±05 ^b
OD ₄₂	0,16 ±03 ^h
OD ₅₃	00,20±0 ^{be}
OD ₅₆	0
OD ₆₁	0,36 ±03 ⁱ
OD ₆₂	0,63 ±03^j
OD ₆₃	0,4 ±00 ^{ik}
OD ₆₅	0,16 ±03 ^b
OD ₆₆	0

Tableau 13: les résultats de calcul de diamètre de solubilisation de phosphate.

ISOLAT R	Diamètre de solubilisation
OR ₂₁	0,26±0,03 ^b
OR ₂₂	0,33±0,03^c
OR ₃₃	0,13±0,03 ^d
OR ₃₄	0,1±00 ^{ed}
OR ₄₁	0
OR ₄₃	0,30±0,04 ^a
OR ₄₄	0
OR ₄₅	0
OR ₅₁	0,13±0,03 ^d
OR ₅₂	0,13±0,03 ^d
OR ₅₄	0,2±00 ^{hi}
OR ₅₅	0,16±0,03 ^h
OR ₆₄	0
OR ₆₇	0
OR ₆₈	0,1±0 ^{ed}
OR ₆₉	0,1±0 ^{ed}

NB : ED, Endophytique

R, Rhizosphérique

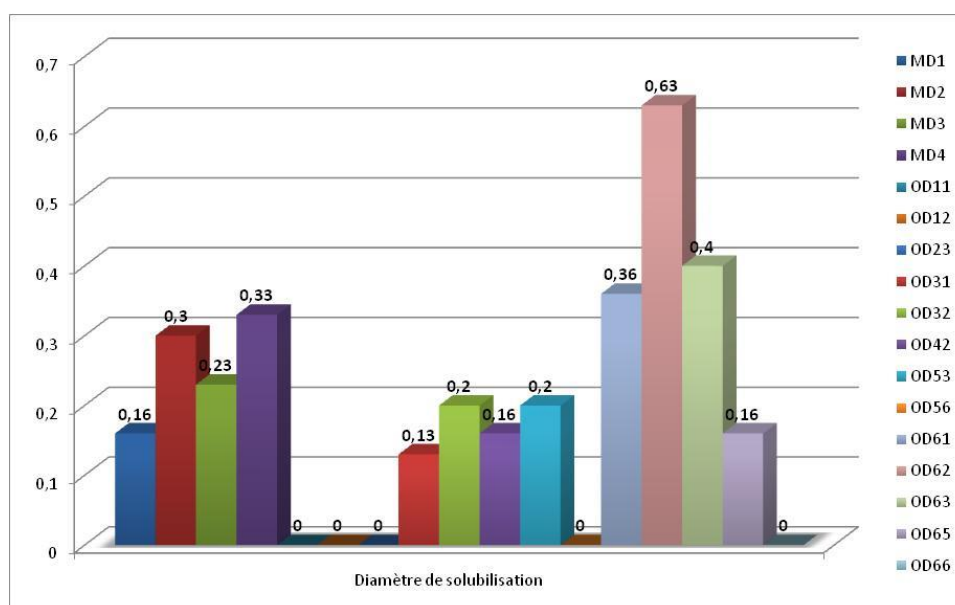


Figure 14: Taux de solubilisation de phosphate des isolats endophytiques

Nos résultats ont révélé que seulement 12 souches ont la capacité de solubiliser le phosphate, dont la plus performante est la souche OD6₂ avec une valeur maximale de **0,63 ± 0,03**. Par contre, les souches OD1₁, OD1₂, OD2₃, OD5₆, OD6₆ ne solubilisent pas le phosphate. (Figure 14)

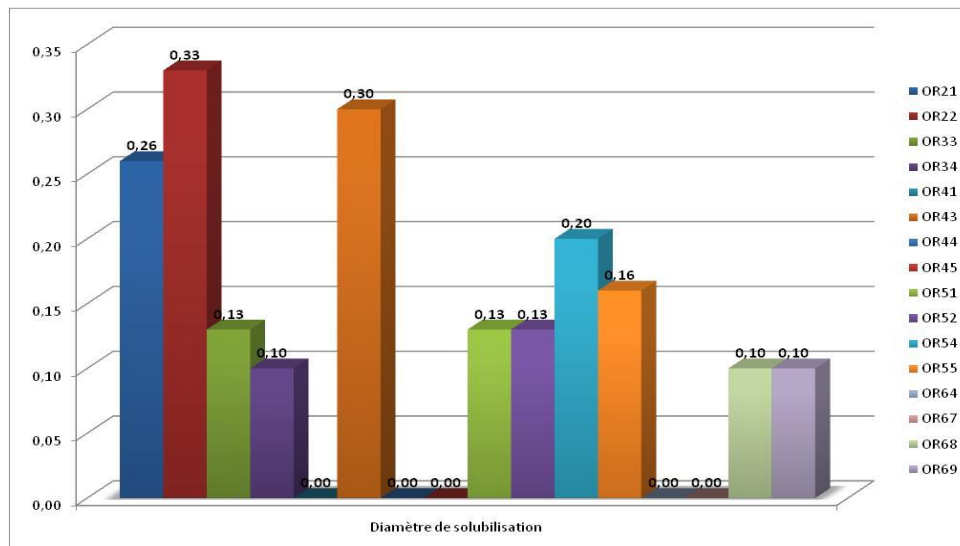


Figure 15: Taux de solubilisation de phosphate des isolats rhizosphériques

Les résultats de la capacité des souches rhizosphériques à solubiliser le phosphate sont présentés dans la figure 15. L'analyse statistique des résultats a montré la présence d'un effet significatif. Les 11 souches testées ont montré des activités maximales de solubilisation entre $0,1 \pm 0^{ed}$ et $0,33 \pm 0,03^c$ à l'exception de la souche OR2₂ qui a montré une activité maximale. Par contre, les souches OR4₁, OR4₄, OR4₅, OR6₄, OR6₇ ne solubilisent pas le phosphate.

II-2- Fixation d'azote

La fixation de l'azote est évaluée par l'étude de la croissance bactérienne sur un milieu de culture sur milieu solide exempté d'azote « Burk's N-free », les résultats obtenus ont montré que 18 isolats endophytiques et 39 isolats rhizosphériques ont manifesté une excellente croissance. (Figure 16-17)



Figure 16: résultat positif de fixation de l'azote de l'isolat OC33.

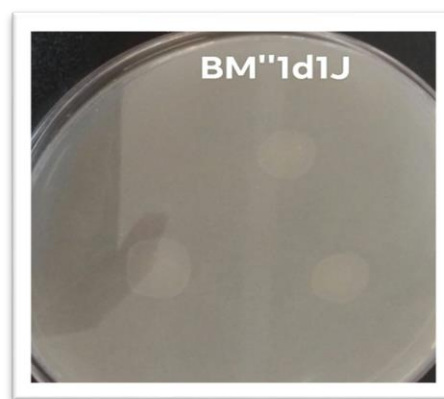


Figure 17: résultat négatif de fixation de l'azote de l'isolat MD4.

Tableau 14: résultat de fixation de l'azote

	ED	R
Positive	18	39
Négative	33	9
Totale	51	48

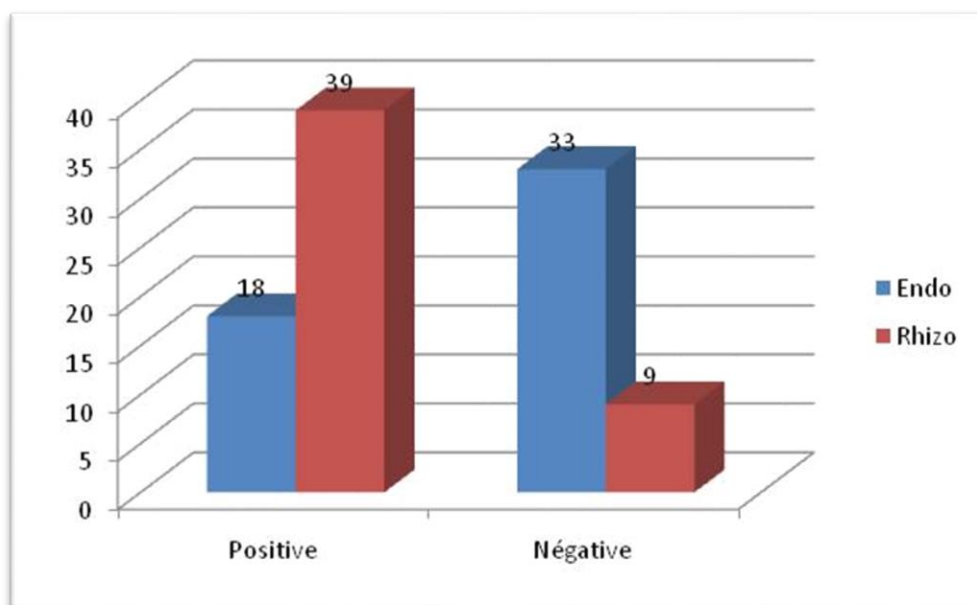


Figure 18: Taux de fixation d'azote des isolats endophytiques et rhizosphériques.

Nos résultats ont révélé que seulement 39 souches rhizosphériques ont fixé l'azote, par contre 18 souches endophytiques ont aussi la capacité de le fixer, donc les isolats rhizosphériques sont plus performants pour fixer l'azote par rapport aux isolats endophytiques.

Discussion

Les rhizobactéries sont des bactéries qui présentent l'aptitude à coloniser les racines de façon intense, les PGPR désigne les bactéries qui exercent un effet bénéfique sur la croissance et le développement des plantes par différents moyens (**Ahmed et al, 2013**).

Dans notre travail un totale de 60 bactéries isolées, parmi ces isolats 32 bactéries endophytiques et 28 bactéries rhizosphériques. Dont le nombre de colonie exprimé en UFC/g par rapport aux deux sites successive était de 10×10^5 UFC/ grc pour le site O et de 40×10^4 UFC/ grc pour le site M. Ces résultats sont similaires aux travaux de **Gdoura et al (2018)** qui ont obtenus un nombre de colonie supérieur à 10^4 UFC/ grc.

Les colonies sont circulaires, élevées à bords réguliers et irréguliers, crémeuses, de couleur blanchâtre translucide (**fig. 3 et 4**). Cette caractérisation est en accord avec la description qui a été établie par (**Madigan et al., 2006**).

Le diagnostique microscopique effectué a montré que la majorité des isolats ont présenté des caractéristiques morphologiques et physiologique du genre de *Bacillus* sp telle que la coloration de Gram positive, présence d'endospore, catalase positive.

Les souches de *Bacillus* sp isolées sont capable de solubilisés le phosphate; selon **Rodriguez et fraga (1999)** qui ont rapporté dans leurs travaux que certaines souches telles que *Bacillus* sp solubilisent le phosphate et augmentent la disponibilité du phosphore dans le sol. D'autres parts, des résultats similaires ont été rapportés par **Goldstein (2000)**, en confirmant que les *Bacillus* sp sont très efficaces dans la solubilisation du phosphate insoluble à des formes accessible aux plantes.

La croissance bactérienne sur un milieu de culture Burk's N Free (dépourvu d'azote) traduit la capacité des bactéries à fixer l'azote. Ceci à été confirmé par plusieurs travaux dont (**Park et al., 2005 ; Aouane et Haman, 2017**).

*Conclusion et
perspective*

Conclusion et perspective

L'utilisation des bactéries comme biofertilisant est une stratégie importante et une solution alternative à l'utilisation des engrais chimiques coûteux et polluants. De nombreuses bactéries dérivées de la rhizosphère telle que *Bacillus* sp ont la capacité d'améliorer la croissance des plantes par plusieurs caractéristiques PGPR. Les *Bacillus* solubilisant le phosphate jouent un rôle majeur dans la nutrition des plantes en améliorant la disponibilité du phosphate par la solubilisation des formes insolubles. Aussi Il a été montré dans plusieurs travaux que différents *Bacillus* étaient capables de fixer l'azote atmosphérique.

Dans ce travail, nous avons isolé des bactéries à partir des racines de plantes sauvages qui poussent dans des zones arides et semi arides. L'identification phénotypique de ces isolats nous a fait savoir qu'elle appartient au genre *Bacillus*. La caractérisation de quelques activités PGPR dans la présente étude nous a permis de confirmer que la plupart des souches isolées ont un fort potentiel pour solubiliser le phosphate et aussi pour fixer l'azote. Le screening réalisé a permis de sélectionner la souche OD6₂ a potentiel remarquable dans ces deux activités PGPR.

Il serait bien de vérifier si la capacité de promouvoir la croissance des plantes est plus grande lorsque ces bactéries sont employées seules ou en consortium. De plus il serait intéressant de poursuivre des études sur ces isolats en réalisant d'autres tests physiologiques et métaboliques afin de déterminer le meilleur moyen d'utiliser ces souches comme biofertilisant. Ainsi lorsque la meilleure formulation pour fertiliser les plantes sera déterminée, il serait bien de vérifier leurs capacités dans différentes conditions de culture stressante à grande échelle. Une fois ces essais montrent des résultats prometteurs, nous pouvons exploiter les *Bacillus* en tant que biofertilisant bénéfiques pour accroître la croissance des plantes ce qui réduira les problèmes liés à l'utilisation des engrais chimiques.

Références

Bibliographiques

(A)

AADEL K.2017. Les effets de certains biofertilisant et bio pesticides sur la croissance des plantes. Mémoire de fin d'étude en biotechnologie et valorisation des phyto-ressources.

Ahmad M et Kibret M. 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J King Saud Univer-Scien 26(01): 1-20.

Abeles F-B, Morgan P-W, Saltveit Jr- M-E. 1992. Ethylene in plant biology, 2nd edn. San Diego:Academic Press.

Adiguzel A, Ozkan H, Baris O, Inan K, Gulluce M and Sahin F. 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. Journal of MicrobiologicalMethods 79, 321-328.

Alabouvette C, Cordier C.2015. Les *Bacillus spp* des bactéries aux multiples usages.

Alcaraz L-D, Moreno Hagelsieb G, Eguiarte L-E, Souza V, Herrera Estrella L and Olmedo G.2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics.BMC Genomics II: 332-348.

(B)

Bacon C-W, Yates I-E, Hinton D-M and Meredith F.2001.Biological control of *Fusarium moniliforme*in Maize.Environmental Health Perspectives; vol 09:325-332.

Bally R, Elmerich C.2007. Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic

Benhamou N, Kloepper J-W and Tuzun S.1998.Induction of resistance aghainst*Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterialstrain: ultrastructural and cytochemistry of the host response. Planta 204: 153-168

Bhattacharyya P-N, Jha D-K.2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture.Wood J. Microb.Biotechnol. 28, 1327–1350

Bottini R, Cassanet F and Picolli P.2004.Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*65:497–503.

Bouhairi S. 2017. *Bacillus subtilis* caractères et applications.

Bourbonnais C.2015.Fertilisation foliaire Organisme, France Ministère des affaires étrangères, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad), France.

Burgmann H, Widmer F, Von Sigler W and Zeyer J. 2004.New molecular screening tools for analysis of free living diazotrophs in soil *Appl Environ. Microbiol.*, 70, 240-247.

(C)

Claus D, Berkeley R-C-W.1986.Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. Vol 2: 1105 -1139

Corbaz R.1990. Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes

Camille D.2007.Microbiologie Pratique pour les laboratoires d'analyse ou de contrôle sanitaire.

(D)

Daniels K, Harris C and Briner R-B.2004.Mise en relation travail conditions à désagréable affecter: la cognition, la catégorisation et buts. *Journal de Professionnel et Psychologie organisationnelle*, 77, 343-364.

De Vos P, Garrity G-M, Jones D, Krieg N-R, Ludwig W, Rainey F-A, Schleifer K-H and Whitman W-B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd. The Firmicute. Springer. New York. Volume 3. 63-67.

Dedier ,Raoult .1998.Dictionnaire des maladies infectieuses diagnostic, épidémiologie , répartition géographique ,taxonomie, symptomatologie . Paris. Elsevier, 121(107)

Desfontaines L, Rotin P, Ozier-Lafontaine H.2018. Les Biostimulants : Qu'en savons-nous ? Quelles alternatives pour l'agriculture Guyanaise ?Innovations Agronomiques 64, 31-46

Dey R, Pal K-K, Bhatt D-M and Chauhan S-M.2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbio.Res.* 159: 371-394.

Dineshkumar R, Kumaravel R-J, Gopalsamy MNA Sikder and Sampathkumar P.2018.Microalgae as Bio-fertilizers for Rice Growth and Seed Yield Productivity. *Waste Biomass Valor* 9, 793–800. DOI 10.1007/s12649-017-9873-5

Ding Y, Wang J, Liu Y and Chen S. 2005.Isolation and identification of nitrogen-fixing *bacilli* from plant rhizospheres in Beijing region.*J. Appl Microbiol* 99 :1271-1281.

Dommergues Y and Mangenot F. 1970.Ecologie microbienne du sol. La Belgique : MASSON ET C^{ie} , , 796 pages.

Downes B-P, Steinbaker C-R and Crowell D-N.2001.Expression and processing of a hormonally regulated b-expansin from soybean.

Du Jardin P.2015. Plant biostimulants : Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196, p. 3-14.

(E)

Eric ,Dromigny .2008. *Bacillus cereus* . Editions médicales internationales, Editions Tec & Doc,Paris .(page 1 LE domaine des eukaryote)

Ezawa T, Smith S-E and Smith F-A. 2002.metabolism and transport in AM *fungi*. *Plant Soil*, 244: 221–230.

(F)

Fox G-E, Wisotzkey J-D and Jurtshunk J - P.1992. How close is close: *16S rRNA* sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity.In : *J.Syst. Bacteriol.* 42, 166–170.

(G)

Gugliandolo C, Maugeri T, Caccamo D, and Stackebrandt E.2003. *Bacillus aeolius* sp. nov. a Novel Thermophilic, Halophilic Marine Bacillus Species from Eolian Islands (Italy). *System. Appl. Microbiol.* 26, 172-176.

Glick B.R.1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41: 109-117.

Gourgaud L-M and Sanglier J-J. 1992. *Biotechnologie*. DOIN Ed., Paris, 564 -569pp.

Graham P-H.1988. *Principles and Application of Soil Microbiology*, pp: 322–345. [32]

Guillaume D.2004. Valorisation de matières résiduelles pour la production de biofertilisants à base de *rhizobium* optimisation du procédé de fermentation avec *sinorhizobiummeliloti*.

Gunes A, Ataoglu N, Turan M, Esitken A, Ketterings QM 2009 Effects of phosphate-solubilizing microorganisms on strawberry yield and nutrient concentrations. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 385-392.

Gerhardt P, Murray R-G-E, Wood W-A and Krieg N-R.1994. *Methods for General.*

(H)

Helluy S and Holmes J-C.2005. Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural processes*, 68(3), 205-210.

Herman M-A-B, Nault B-A and Smart C-D.2008. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Prot.* 27:996–1002.

Herman M-A-B, Nault B-A, Smart C-D.2008. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop. Protect.* 27: 996-1002

Holguin G and Glick B-R. 2001. Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.* 41:281–288.

Holt J-G, Krieg N-R, Sneath P-H-A, Staley J-T and Williams S-T. 1994. Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology 9th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore,pp: 518-537

Hajna A-A. 1945. Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. J. Bacteriol. 49:516-517.

Health Protection Agency.2011.Catalase Test. UK Standards for Microbiology Investigations 8 Issue 2.2.

————— (J) —————

Joo G-J, KangS-M, Hamayun M, KimNa-C-I, Shin D-H and LeeI-J. 2009. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium.J Microbiol.47:167–171

Jourdan E, Ongena M, Thonart P.2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. BASE12(4) : 437-449.

Jourdheuil P and Grison P-A.1991. Fraval Département de Zoologie de l'INRA. La Minière, 78280 Guyancourt

————— (K) —————

Kaymak D-C.2010.Potential of PGPR in agricultural innovations. In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria;Maheshwari, D.K., Ed.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany,.

Kim C, Kecskés M-L, Deaker R-J, Gilchrist K, New P-B, Kennedy I-R, Kim S and SaT. 2005. Wheat root colonization and nitrogenase activity by Azospirillumisolates from crop plants in Korea. Canadian Journal of Microbiology .51 :948–956.

Kloepper J-W, Leong J, Teintze M, Schroth M-N.1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature, 286, 885–886.

Kloepper J-W, Schroth M-N.1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Station de Pathologie,Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Tours, France, 27 August–2 September; Végétale et Phyto-Bactériologie, Ed.; pp. 879–882.

Kobawila S-C. 2003. Les produits fermentés d'Afrique Centrale, Cas du Congo. Thèse, Doctorat d'Etat, UFR.S.V.T. Université de Ouagadougou.

Krieg A. 1981. insect pathogen in the prokaryotes, a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria: In The genus *Bacillus*. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. New York: Springer-Verlag. 2, 1743 -1755.

Kumar B-S-D, Berggren I and Martensson A-M.2001. Potential for improving production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant Soil*,229: 25-34.

Krieg N-R and Döbereiner J.1984. Genus *Azospirillum*. In Bergey's manual of systematic bacteriology ed. Krieg, N.R.a.J.G.H. 94–104. Baltimore, Md. : Williams and Wilkins.

Kucey R-M-N, Janzen H-H and Legget M-E.1989. Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199–228.

————— (L) —————

Landa B-B, Hervas A, Bethiol W, Jimenez-Diaz R-M.1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, N°25, pp305-318

Larpent J-P.2000. Introduction à la nouvelle classification bacterienne –Les principaux groupes bacteriens , Edition Tec & Dok Lavoisier , Paris .

LAURENDEAU G. and CARRIE F.2016. Site Internet : <https://www.biofertilisant.fr/utiliser-lesbiofertilisant/règle-repecter-bien-utiliser-biofertilisant>.

Lee J-P, Lee S-W, Kim C-S, Son J-H, Song J-H, Lee K-Y, Kim H-J, Jung S-J and Moon B-J.2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 37: 329-337.

Lepoivre P.2003. Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck. Ed. Première édition..125-291-292

Li W, Raoult D and Fournier P-E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 892-916

Logan N-A, De Vos P.2015. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. *Bacillus*.

Loper J-E and Scroth M-N. 1986. Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, 76: 386-389.

Lowenfels J, Lewis W. 2008. Collaborer avec les bactéries et autres micro-organismes. Guide du réseau alimentaire du sol à destination des jardiniers. édition du Rouergue.

(M)

M. Schaechter. 2004. Desk Encyclopedia of Microbiology. Elsevier academic press. J. Lederberg. 1149 pages.

Macking H. 2007. Phytoremediation of contaminated soil on plant efficiency, rhizosphere bacteria and the physical effects of chemical agents. *Korea society for Applied Microbiology and Biotechnology*. 35: 26-271.

MacMillan J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 20, 387-442.

Mantelin S and Touraine B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55: 27-34. [34]

Madigan M-T and Martino J-M. 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11 ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA

Maughan H, Van Der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, genetics and evolution*. 11

Mhamedi N. 2011. Étude d'un mélange *Sinorhizobium meliloti*-*Trichoderma viride* produit dans les eaux usées d'amidon : optimisation et effet sur la luzerne.

Minorsky P-V. 2008. On the inside. *Plant. Physiol.* 146: 323-324.

Mitter N, Srivastava A-C, Renu A-S, Sarbhoyet A-K and Agarwal D-K. 2002. Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* 153:187-193.

MoenneLoccoz Y, Naughton M, Higgins P, Powell J, O'Connor B and O'Gara F. 1999. Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens F113*. *Journal of Applied Microbiology* .86:108-116.

Mohammadi Jan-M.2015.Evaluation of the impact of chemical and biological fertilizer application on agronomical traits of safflower.

————— (N) —————

Nelson E-B.2004. Microbial dynamics and interactions in spermosphere. Ann. Rev. Phtopathol., 42: 271-309.Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations.Springer. 171-190 nitrogen-fixing bacteria. In: C. Elmerich, W.E. Newton (eds). Associative and Endophytic

————— (O) —————

Oren A.2002.Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and application. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology ; 28:56-63..0

————— (P) —————

Parray J-A, Jan S, Kamili A-N and Qadri R-A.2015.Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. J Plant Growth Regul121 : 325-334.

Parry J-M , Turnbull P-C-B. et Gibson J-R, 1983. A Color atlas of *Bacillus* species.Wolfe Medical Atlases.London . 19

Paul Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B and Whitman.2011. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes. 2nd edition Volume 3.

Pliego C, Kamilova F and Lugtenberg B.2011. Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. In Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems. Springer Berlin Heidelberg.pp. 295- 343

Pikovskaya R-I.1948.Mobilization of Pin connection with vital activity by some microbial species. Microbiologica,17,362-37.

Perry J-J, Staley J-T and Lory S.2004.Cours et questions de révisions. PCEM.PCEP.1^{er} cycle/licence 2eme cycle/master.Dunod.Ed.Paris.pp :480-481.

Podile A-R and KishoreG-K.2006.Plantgrowth-promotingrhizobacteria.In: Gnanamanickam SS (ed) Plant-associated bacteria: rhizosphere bacteria. Springer, Netherlands, pp 195–230

(R)

Ramette A, Moëgne-Loccoz Y and Défago G .2006.Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsisbasicola*-mediated black root rot of tobacco. FEMS Microbiol. Ecol. 55: 369–381.

Raton,FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Rezzonico F, Zala M, Keel C, Duffy B, Moëgne-LoccozYandDéfago G .2007. Is the ability of biocontrol fluorescent *pseudomonas* to produce the antifungal metabolite 2,4 di-acetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection. New Phytologist, 173: 861- 872.

Rodriguez H and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their rôle in plant growth promotion.Biotechnol. Adv.17: 319-339.

(S)

Saharan B-S, Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. Life Sci. Med. Res., 21,1–30.

Salisbury F-B and RossC-W. 1992. Plant physiology. Wadsworth, Belmont, CA.

Schleifer K-H. 2009. Phylum XIII.Firmicutes Gibbons and Murray 1978. In: Vos P, Garrity G, Jones D et al (eds) Bergey's Manual® of systematic bacteriology. Springer, New York, pp 19-1317.

Shameer S, Prasad TNVKV. 2018. Plante growth avec promotingrhizo-bactéries pour une pratiques agricoles avec référence spéciale aux stress biotique et abiotiques. Régulation de croissance des plantes 84: 603- 615.

Sharma K, Dak G, Agrawal A, Bhatnagar M and Sharma R. 2007. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed and seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, 1: 61-63

Siddiqui Z. 2006. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Dordrecht, The Netherlands: Springer

Simarmata T, Hersanti T, Turmuktini B-N, Fitriatin M-R, Setiawati and Purwanto. 2017. Bioameliorant and Biofertilizers Application to Springer International Publishing, Springer International Publishing Switzerland Cham, pp: 69– 80. doi:10.1007/978-3-319-14024-7_3,

SIMMONS J-S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J. Infect. Dis.*, 1926, 39 : 209.

Singh S-V, Tiwari A, Singh A-V, Singh P-K, Singh B, Kumar A, Gururaj K, Gupta S and Kumar N. 2012. Contamination of Natural Resources (Soil and River water) with *Mycobacterium avium subspeciesparatuberculosis* in three districts of Uttar Pradesh: A Pilot study. *Haryana Vet.* 51: 1–5

Smith N-R, Gordon R-E and Clark F. E. 1952. Isolation and Identification of Aerobic Endospore-Forming Bacteria.

Son J-S, Sumayo M, Hwang Y-J, Kim B-S, Ghim S-Y. 2014. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against grey leaf spot diseases in pepper. *Appl. Soil Ecol.*, 73, 1–8.

Sonenshein L, James A and Hoch Richard Losick. 1993. *Bacillus subtilis* et autres bactéries à Gram positif : biochimie, physiologie et génétique moléculaire.

Srivastava L-M. 2002. Chapter 6: Auxin in Plant Growth and Development: Hormones and Environment. CA: Academic Press

Subbarao N-S. 1988. Phosphate solubilizing micro-organism. In: Biofertilizer in agriculture and forestry. Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, pp 133–142.

(T)

Teyssou R, Hance P, Nicand E, Nizou J-Y, Buisson Y.1998. Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement .La Lettre de l'Infectiologue - Tome XIII - n° 3.104(100)

Tien T-M, Gaskin M-S, Hubbel D-H.1979. Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. Appl. Environ. Micro., 37(5): 1016-1024.

Toure Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A and Thonart P.2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology 96, 1151-60.

Tsvetkova G-E and Georgiev G-I.2003. Effects of phosphorous nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* soybean (*Glycine max* L. Merr.) symbiosis. Plant Physiol., (Special Issue), pp: 331-335.

(V)

Vaerewijck M-J, DeVos, Lebbe P, Scheldeman L, Hoste P and Heyndrickx M. 2001. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. J. Appl. Microbiol. 91, 1074–1084.

Van Elsas J-D, Jansson J-K and Trevors J-T.2007. Modern soil microbiology. Boca

Van Lentern J-C. 2006. IOBC Internet Book of Biological Control , 3:14-39p.

Vandamme P, Goris J, Chen W- M, De Vos P and Willems A .2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol. 68: 1132- 1136.

Verma J-P, Yadav J and Tiwari K-N.2010. Application of *Rhizobium* sp. BHURC01 and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Agric. Res., 5: 148-156. [71] Singh,

Vessey J-K and Heisinger K-G.2001. Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilization on root and shoot parameters of field-grown pea. Can. J. Plant Sci. 81:361-366.

Vessey J-K.2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571–586.

(W)

Wang L, Lee T-F-L, Tai C-J and Kasai H.2007. Comparison of gyr B gene sequences, *16S rRNA* gene sequences and *DNA-DNA* hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1846-1850.

Williams P-M, Sicardi de Mallorca M.1982. Abscisic acid and gibberellin-like substances in root nodule of *Glycine max.* *Plant Soil* 65: 19-26.

(Y)

Yakhin O-I, Lubyantsev A-A, Yakhin I-A, Brown P-H. 2017. Biostimulants in Plant Science: A global Perspective. *Frontiers in Plant Science* 7, p.1-32.

Yi H-S, Yang J-W and Ryu C-M.2013. ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR 7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. *Front. Plant Sci.* 4: 122.

Yuan C-L, Mou C-X, Wu W-L and Guo Y-B. 2011. Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *J Soils Sediments* 11: 322-329.

(Z)

Zhang L, Wang Y, Dai J, Tang Y, Yang Q, Luo X and Fang C. 2009. *Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1787–1792.

Annex

Annexe 01:

Gélose nutritive (GN) (g/L)

Peptone	5g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure	3g
NaCl	2g
Agar agar	18g
Eau distillé	1000 ml

pH = 7,2±0,2

Solution tampon phosphate saline (PBS) (g/L) :

NaCl	8g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
K ₂ HPO ₄	0,24g

Milieu LuriaBurtani (LB) (g /L) :

Hydrolysate de caséine	10 g
NaCl	5g
Extrait de levure	5g
Agar agar	15g
Eau distillé.....	1000 ml

PH = 7

Eau Peptonè (g/L) :

Peptone	20g
NaCl	5g
Na ₂ HPO ₄	3,5g
Eau distillé	1000ml

pH = 7,2

Milieu Pikovskaya (PVK) (g /L) :

Extrait de levure	0,5 g
Glucose.....	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄)SO ₄	0,5 g
KCl	0,2 g
MnSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄	0,2 g
Agar agar	15 g
Eau distillé	1000 ml

PH = 7,2

Annexe 02:

Milieu Burk's N-free (g /L) :

Phosphate de potassium..... monobasique	0,4 g
Phosphate dipotassique	0,5 g
Sulfate de sodium	0,05 g
Chlorure de calcium	0,2 g
Sulfate de magnésium (7H ₂ O)	0,1 g
Sulfate de fer (7H ₂ O)	0,005 g
MolybD, Ate de sodium	0,003 g
Agar bactériologique	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0 ± 0,1