

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

NEDDER Djaafar & L'ASSEL Nour El Houda

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Science biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Isolement et caractérisation du potentiel
PGP des PSB rhizosphérique**

Devant le Jury

Président : *Mekhaledi.A*

Pr

Université de Mostaganem

Examineur : *Bouzned.A*

MCB

Université de Mostaganem

Encadreur : *Hamoum.H*

MCB

Université de Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire Pédagogique de Microbiologie N°01

Année Universitaire 2021/2022

Remerciement

Allah, merci de m'avoir guidé sur le bon chemin et de m'avoir montré la lumière dans mes moments les plus difficiles, et toutes vos bénédictions.

Nous remercions *nos parents*, pour leur soutien et leur amour qui m'ont donné la volonté de poursuivre mes études.

Nos grands remerciements au *Dr Hamoum Hakim* pour avoir accepté d'être notre encadreur, ses conseils, ses encouragements et ses critiques constructives nous a vraiment aidés à donner le meilleur de nous-mêmes et à faire de notre rêve une réalité.

Nous remercions *Mr Bouzned. H* et *Mr Mekhaldi. A* d'avoir accepté d'être le jury de ce modeste travail.

Nous remercions tous les professeurs et les chefs de département qui ont contribué à notre formation au cours des cinq dernières années.

Nous remercions Mme *Hafida*, *Mr Abaidi*, *Mr Saouane* et tous les responsables du laboratoire, pour leur assistance.

Nous remercions *Beddani Sara* et *Medjahed Saadia* pour leur aide lors de la réalisation de ce travail.

Pour finir, Nous remercions tous ceux qui nous ont aidés dans la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents la source de la vie, d'amour, ma mère qui a toujours cru en moi, mon père qui m'a toujours protégé et qui s'est assuré que j'avais tout ce que je voulais, et de faire de moi l'homme que je suis aujourd'hui.

À mon frère Mohammed, qui a toujours été là pour moi, son soutien, ses encouragements, son amour, et compréhension, mon frère qui ne m'a jamais laissé me sentir seul.

À mes amis, Anes, Oussama, Youcef, Kamel, Mehdi, Mohamed, Roufaïda, Amina et Lamia, Bouchra pour leur soutien.

À mes amis, Yassine, Ramy, Yanis, Abdelkader et mon meilleur ami Anis pour avoir cru en moi, et d'être toujours à mes coté.

A ma cousine Nedder.S, pour leur soutien.

Le club scientifique BIOTECHNO, ainsi que tous ces membres.

À la famille Nedder, et la famille Belckacem.

À ma binome Lassel Nour El Houda.

- Nedder Djaafar

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ma très chère maman, qui a été et sera toujours un exemple pour moi par ses qualités humaines et sa responsabilité. Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui. Quoique je fasse maman, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi.

Merci ma mère pour votre soutien et de m'avoir supportée dans les moments difficiles, que dieu te protège et te donne longue vie a fin que je puisse te combler à mon tour.

A ma famille spécialement, mon grand-père et ma grand-mère.

Une pensée émue pour mes chères copines :

Bouchra, Sara, Nessrine, Louisa.

A mon binôme : Nedder Djaafar.

Lassel Nour El Houda

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Résumé	
Abstract	
الملخص	
Introduction	1

Chapitre I. Revue bibliographique

1. Diversité microbienne dans le sol	2
1.1. La rhizosphère	2
1.2. Rôle de la rhizosphère	3
1.3. L'effet rhizosphérique	3
1.4. Interaction plante-microbe	3
1.5. Les bactéries promotrices de la croissance des plants (PGPR)	4
1.5.1. Diversité des PGPR	5
1.5.1.1. <i>Pseudomonas</i>	5
1.5.1.2. <i>streptomyces</i>	6
2. Comment fonctionnent les PGPR ?	6
2.1. Les effets directs des PGPR	7
2.1.1. La solubilisation du potassium	7
2.1.2. Fixation de l'azote	8
2.1.3. Solubilisation du phosphate	8
2.1.4. Solubilisation du zinc	9
2.1.5. Production des phytohormones	9
2.1.5.1. Auxine	9
2.1.5.2. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA)	9
2.2. Effets indirects des PGPR	10
2.2.1. La production des sidérophores	10
2.2.2. Production de l'ACC-Désaminase	11
2.2.3. Antibiose	11
3. Généralité sur le phosphore	11
3.1. Le phosphore dans le sol	12
3.2. Les formes du phosphore	13
3.2.1. Phosphore solide inorganique	13
3.2.2. Phosphore organique	13
3.2.3. Phosphore soluble	14
3.3. Le rôle du phosphore dans la plante	15
3.4. Les bactéries solubilisant le phosphate (BSP)	15
3.4.1. Mécanisme de solubilisation du phosphore	15
3.4.1.1. Solubilisation du phosphate minéral	16
3.4.1.2. Solubilisation du phosphore organique	16
3.5. Rôle des BSP dans l'agriculture	17

Chapitre II. Matériel et méthodes

1. Objectif de travail	18
2. Échantillonnage	18
2.1. Prélèvement des échantillons	18
3. Isolement des BSP	19

3.1. Milieu de culture utilisé	19
3.2. Isolement	20
3.3. La conservation des isolats	22
4. Identification et caractérisations des BSP	22
4.1. Caractérisation macroscopique	22
4.2. Caractérisation microscopique	22
4.2.1. Test de sporulation	22
4.3. Caractérisation biochimique	23
4.3.1. Type respiratoire	23
4.3.2. Test Mannitol mobilité	23
4.3.3. Recherche de la catalase	23
4.3.4. Recherche de l'oxydase	23
5. Evaluation des activités PGP	24
5.1. Réactivation des isolats	24
5.2. Évaluation de la production de l'Acide Indole Acétique (AIA)	24
5.3. Fixation de l'azote	25
5.4. Solubilisation du phosphate	25
5.5. Production d'HCN	26
5.6. Solubilisation du zinc	26
6. Analyse statistique	26

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Résultats.....	27
1.1 Isolement et identification des isolats	27
1.2. Test de sporulation	28
2. Caractère biochimique	29
2.1. Test Mannitol mobilité	31
3. Evaluation des activités PGP	33
3.1. Évaluation de la production de l'acide Indole acétique (AIA)	33
3.2. Fixation d'azote	34
3.3. Solubilisation du phosphate	36
3.4. Production de l'HCN	37
3.5. Solubilisation du zinc	38
Conclusion	41
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

ACC : Aminocyclopropane 1-carboxilique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adenosine triphosphate

AIA : Acide Indole -3- Acétique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adenosine di-phosphate

BSP : Bactéries solubilisant le phosphate

DAPG : diacétylphloroglucinol

DO : Densité optique

HCN : de l'anglais « Hydro cyanidric acid »

LB : Milieux Luria-Bertani

mg : milligramme

ml : millilitre

MSP : Microorganismes solubilisant le phosphate

N : Azote

NBRIP : De l'anglais "National botanical research institut of phosphate medium"

P : Phosphore.

PGP : De l'anglais "plant growth promonte"

PGPR : De l'anglais "Plant growth promoting rhizobacteria"

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PI : Phosphore inorganique

PO : Phosphore organique

PVK : Pikovskaya

RRM : rotation par minute

Tr/min : Tour par minute

Zn : Zinc

µg : Microgramme

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Quelques acides organiques produits par les PSB	14
Tableau 2 :	Coordonnées cartographique des plantes	19
Tableau 3 :	étude macroscopique, microscopique et biochimiques des isolats	32
Tableau 4 :	Activité PGP des isolats	40

Liste des figures

Figure 1 :	Représentation schématique d'une section de racine montrant la structure de la rhizosphère et ses différentes zones	2
Figure 2 :	Interactions dynamiques entre les micro-organismes et les plantes	4
Figure 3 :	Le rôle des rhizobactéries qui favorisent la croissance dans le développement de systèmes durables de production végétale	5
Figure 4 :	Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère	7
Figure 5 :	Rôle des PGPR et mécanisme de solubilisation du phosphate	8
Figure 6 :	Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale	10
Figure 7 :	Structure générale des siderophores citrate-hydroxamate	10
Figure 8 :	le cycle du phosphate dans la nature	12
Figure 9 :	Diverses substances organiques/inorganiques produites par les BSP responsables de la solubilisation du phosphate dans le sol	17
Figure 10 :	carte géographique du site d'échantillonnage	18
Figure 11 :	prélèvement d'échantillon de sol	19
Figure 12 :	Schéma représentatif de l'isolement	21
Figure 13 :	Types respiratoires des bactéries, (A : aérobie strict B : aéro-anaérobie, C : anaérobie strict	23
Figure 14 :	Schéma représentatif de la réactivation des isolats	24
Figure 15 :	Schéma représentatif de la technique de l'AIA	25
Figure 16 :	Isolement sur gélose PVK	27
Figure 17 :	Aspect microscopique (observation microscopique (G :10X100) après coloration de Gram)	28
Figure 18 :	Pourcentage des isolats de Gram -, et Gram +	28
Figure 19 :	Observation des spores après coloration	29
Figure 20 :	Le type respiratoire de quelques isolats	29
Figure 21 :	Pourcentage des isolats qui possèdent l'enzyme respiratoire	30
Figure 22 :	Résultats positive de test d'oxydase	30
Figure 23 :	Pourcentage des isolats qui possèdent l'enzyme de la catalase	30
Figure 24 :	Réaction de test de catalase positive	31
Figure 25 :	Le changement de couleur du rouge vers orange (VAY111)	31
Figure 26 :	Production de l'AIA pour quelque isolat	33
Figure 27 :	Histogramme des quantités d'AIA produites par les 14 isolat	34
Figure 28 :	Pourcentages de la fixation d'azote par les isolats	35
Figure 29 :	Le changement de la couleur pour la fixation d'azote (VAZ7)	35
Figure 30 :	Observation de quelques isolats qui la capacité de solubiliser le phosphate ..	36
Figure 31 :	Efficacité de solubilisation du phosphate par les isolats	37
Figure 32 :	Le changement de la couleur vers le marron qui indique la production d'HCN.....	38
Figure 33 :	Pourcentage de la production d'HCN par les isolats	38
Figure 34 :	Résultats de la solubilisation du zinc pour quelques isolats (VBY4, VBZ14)	39
Figure 35 :	Efficacité de solubilisation du zinc par les isolats	39

Résumé

Les BSP jouent un rôle très important pour la croissance et le développement des plantes, leur action est nécessaires pour la disponibilité du P, ce qui augmente et améliore la productivité végétale, tant qu'ils sont communs dans la rhizosphère. Ils font parties des PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria), leur activité PGP montre un intérêt bénéfique pour l'agriculture, à cause de la favorisation de certain caractère dans la rhizosphère. A travers notre travail nous avons isolé des bactéries solubilisant le phosphate, à partir des 3 compartiments de la rhizosphère de 4 échantillons du sol de la région de Douar Shaibia de la Wilaya de Mostaganem par la sélection des isolats ayant présenté un halo claires autour des colonies, et faire des test d'identification qui nous a montré que la majorité des isolats sont Gram⁻, forme Bacille, et de différents couleur et consistance, et de type respiratoire Aérobie strict pour la majorité des isolats. L'analyse des résultats obtenus, à partir des tests d'activités PGP nous a montré que nos isolats ont la capacité de produire de l'AIA avec une production maximale de $12.33^a \pm 0.3$, et tous les isolats étaient capables de fixer l'azote. 11% des isolats ont la capacité de produire l'HCN et pour la solubilisation du zinc nous avons marqué le taux de solubilisation le plus élevé avec une valeur de $699,66^g \pm 35,1$ chez l'isolat VAY12. La solubilisation du phosphate de ces isolats a permis de marquer une quantité de phosphate allant jusqu'à 349^k , 33 pour isolat VAY110, et solubilisation minimale $188,66^f \pm 32,1$, chez isolat VCZ8.

Mots clé : Phosphate, PGPR, Rhizosphère, AIA, HCN

Abstract

The PSBs plays a very important role in the growth and development of plants, their action is necessary for the availability of P, which increases and improves the plant productivity, as long as they are common in the rhizosphere. They are part of the PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria), their PGP activity shows a beneficial interest for agriculture, because of the promotion of certain character in the rhizosphere. Through our work we isolated phosphate solubilizing bacteria, from the 3 compartments of the rhizosphere of 4 soil samples from the region of Douar Shaibia of the Wilaya of Mostaganem by selecting the isolates having presented a clear halo around the colonies, and making identification test which showed us that the majority of the isolates are Gram⁻, Bacillus form, and of different color and consistency, and of strict Aerobic respiratory type for the majority

of the isolates, The analysis of the results obtained, from the PGP activity tests showed us that our isolates have the capacity to produce IAA with a maximum production of $12.33^a \pm 0.3$, and all isolates were able to fix nitrogen. 11% of the isolates have the ability to produce HCN and for zinc solubilization we scored the highest solubilization rate with a value of $699.66^g \pm 35.1$ in isolate VAY12. The phosphate solubilization of these isolates allowed to mark a quantity of phosphate up to 349^k , 33 for isolate VAY110, and minimal solubilization $188.66^f \pm 32.1$, in isolate VCZ8.

Key words: Phosphate, PGPR, Rhizosphere.IAA, HCN.

المخلص

تلعب BSP دورًا مهمًا جدًا في نمو النباتات وتطورها، كما أن عملها ضروري لتوفر الفوسفور، مما يزيد ويحسن إنتاجية النبات، طالما أنها شائعة في منطقة الجذور. (هي جزء من) PGPR البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات)، يُظهر نشاط PGP الخاص بهم فائدة كبيرة للزراعة، بسبب تعزيز بعض الخصائص في منطقة الجذور. من خلال عملنا، قمنا بعزل البكتيريا التي تذوب الفوسفات من 3 أقسام من منطقة الجذور لأربع عينات من التربة من منطقة دوار الشعيبية بولاية مستغانم عن طريق اختيار العزلات التي قدمت هالة واضحة حول المستعمرات، وإجراء اختبارات تحديد الهوية. مما أوضح لنا أن غالبية العزلات هي - Gram ، عصوية الشكل، وألوانها وقوامها مختلفين ، ومن النوع التنفسي الهوائي الصارم لغالبية العزلات. أظهر تحليل النتائج التي تم الحصول عليها من اختبارات نشاط PGP أن عزلاتنا لديها القدرة على إنتاج AIA بأقصى إنتاج قدره $0.312.33 \pm a$ ، وكانت جميع العزلات قادرة على تثبيت النيتروجين. 11% من العزلات لديها القدرة على إنتاج HCN ولإذابة الزنك حددنا أعلى معدل للذوبان بقيمة $699.66 g \pm 35.1$ في العزلة VAY12. أتاح ذوبان الفوسفات لهذه العزلات تحديد كمية من الفوسفات تصل إلى 349 ميكروغرام، 33 لعزل VAY110 ، والحد الأدنى للذوبان $188.66 \pm f$ ، في عزلة VCZ8.

الكلمات الأساسية: فوسفات، PGPR، ريزوسفير. IAA, HCN ,

INTRODUCTION

Introduction

Le phosphore (P) est l'un des éléments nutritifs essentiels les plus importants pour la production végétale, et le plus limitatif après l'azote dans la majorité des sols du monde entier, une grande partie (95% à 99%) se trouve sous nombreuse forme inaccessible aux végétaux (**khan *et al.*, 2009**).

Généralement, l'application des engrais à base de phosphore vient comme une réponse à la déficience du phosphore, mais malheureusement l'utilisation et l'ajout d'engrais en excès de la quantité favorise par les plantes peut provoquer des problèmes environnementaux nocifs (**Kang *et al.*, 2011**).

Certaines bactéries sont capables de solubiliser et minéraliser le phosphate insoluble dans le sol pour la croissance des plantes, c'est le seul moyen d'augmenter sa disponibilité pour la plante dans l'environnement naturellement (**Bhattacharyya *et Jha* 2012**).

Le groupement des bactéries qui ont la capacité de solubiliser le phosphate est dénommé comme les BSP (Bactéries solubilisant phosphate) (**Zhu *et al.*, 2011**), et donc améliore le développement des plantes (**Alori *et al.*, 2012**). Ces bactéries sont considérées comme PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria)

Les bactéries PGPR facilitent la croissance des plantes directement en aidant l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétales (**Munees *et Mulugeta*, 2014**). La caractérisation de ces propriétés comme la solubilisation du phosphate, zinc, la fixation d'azote par exemple est liée à la sélection des souches PGPR efficaces (**Cattelan *et al.*, 1999**).

L'objectif de notre travail est l'isolement des bactéries capables de solubiliser le phosphate, et de faire des tests d'identification sur ces bactéries. En suite l'évaluation de leur activité PGP.

CHAPITRE I :
Revue bibliographique

1. Diversité microbienne dans le sol

1.1. La rhizosphère

Le terme "rhizosphère" a été donné par le physiologiste des plantes allemand, Lorenz Hiltner, en 1904. "Rhizosphère" est un mot grec : "Rhiza" signifie racines, et "sphère" signifie zone environnante. Elle est définie comme une zone autour des surfaces des racines où l'activité biologique d'un microorganisme est la plus élevée, elle est due à la sécrétion d'une grande quantité de métabolites à partir des poils vivants des racines ou des systèmes fibreux des racines, cette dernière est une zone écologique essentielle unique du sol qui est extrêmement enrichie en nutriments reçus des racines des plantes par la rhizodéposition, qui est facilitée par les rhizobactéries (Prashar *et al.*, 2013).

Selon (Pinton *et al.*, 2001) la rhizosphère est classée en trois grandes zones mentionnant (Fig.1). L'endo-rhizosphère est la zone intracellulaire entre le cortex et l'endoderme, dans laquelle les microbes et les cations peuvent occuper l'espace libre entre les cellules (espace apoplastique) qui ne forment pas de structures symbiotiques (Bowen *et Rovira*, 1999).

Le rhizoplane est la zone médiane directement liée à la racine, comprenant l'épiderme et le mucilage de la racine. Ça veut dire Il est constitué de l'épiderme, du cortex et de la couche de polysaccharides mucilagineux (Pinton *et al.*, 2001).

L'ecto-rhizosphère est la zone la plus externe, qui s'étend du rhizoplane vers le sol en général. Comme les microbes endophytes s'infiltrent dans les tissus internes de la racine, la racine elle-même est considérée comme une partie de la rhizosphère (Bowen *et Rovira*, 1999).

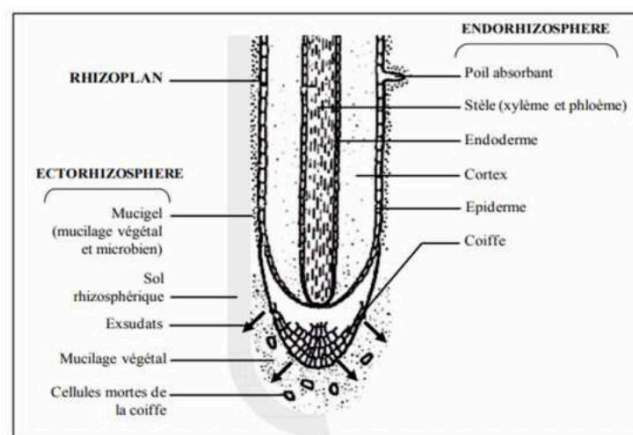


Figure 1 : Représentation schématique d'une section de racine montrant la structure de la rhizosphère et ses différentes zones (Lynch 1983).

1.2. Rôle de la rhizosphère

La rhizosphère joue un rôle actif dans la régulation des interactions entre plantes et microorganismes (**Hirsch *et al.*, 2003**). Comme ces interactions jouent un rôle majeur dans l'équilibre entre les microorganismes saprophytes et les microorganismes pathogènes, leur étude est susceptible d'applications importantes dans le contrôle biologique des infections végétales bactériennes et fongiques (**Dommergues *et Mangenot*, 1970**). La rhizosphère est aussi un lieu d'échange de signaux chimiques d'une plante à l'autre (**Gobat *et al.*, 2010**).

1.3. L'effet rhizosphérique

L'effet rhizosphérique est la croissance accrue d'un microorganisme du sol résultant de l'altération physique et chimique du sol et de la contribution des excréments et des débris organiques de l'exsudation, de la sécrétion et du dépôt des racines dans une rhizosphère par rapport au sol en général. La diversité des microorganismes est plus grande à proximité de la rhizosphère car les plantes exsudent généralement une grande partie de leur carbone fixé par photosynthèse (estimé généralement entre 5 et 30 %) par leurs racines, ces exsudats agissent comme une source de nourriture bactérienne, ce qui est la raison principale pour laquelle le nombre est 10-1000 fois que celles que l'on trouve dans le sol en général. La population microbienne diminue avec une augmentation de la distance par rapport à la rhizosphère (**Chowdhury *et al.*, 2009**).

1.4. Interaction plante-microbe

Les interactions entre les végétaux et les microorganismes (**Fig.2**), se manifestent avec une intensité accrue dans la zone du sol qui est en contact avec les racines, à l'intérieur de cette zone appelée Rhizosphère, la microflore tellurique est profondément modifiée par les influences des exsudats racinaires et des apports de débris tissulaires, ces modifications consistent dans une stimulation préférentielle et considérable de certains secteurs de la microflore ou des espèces microbiennes, les organismes du sol ont un impact aussi sur la production végétale que ce soit de façon directe ou indirecte (modification des cycles de carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites pathogènes) (**Lynch, 1990 ; Cherif, 2014**).

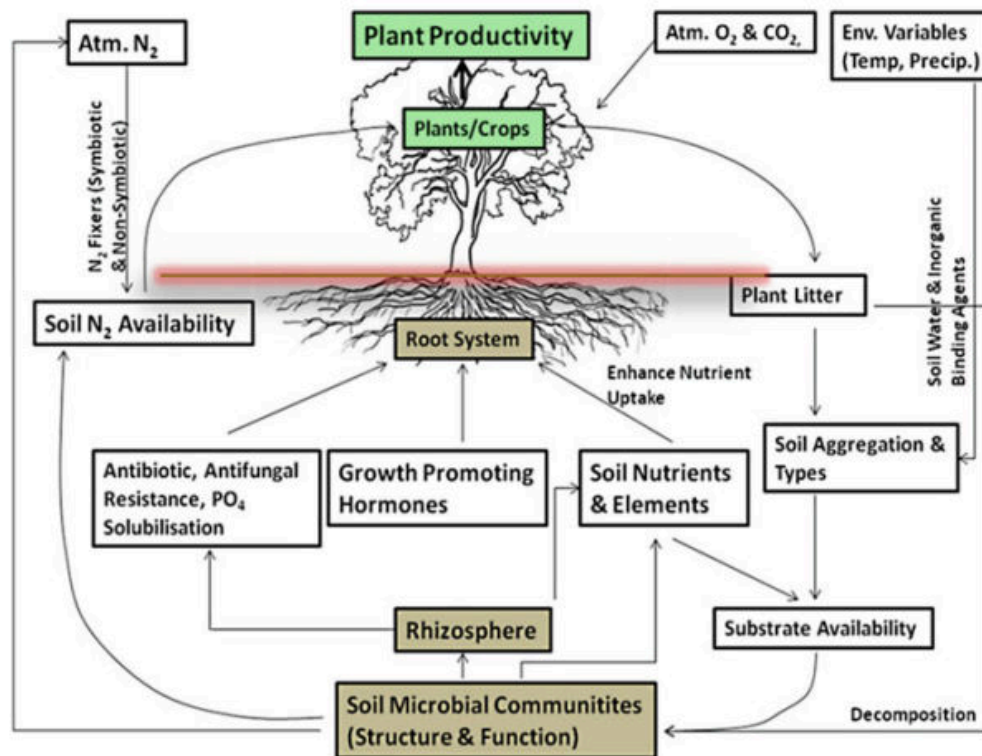


Figure 2 : Interactions dynamiques entre les microorganismes et les plantes (Lynch,1990).

1.5. Les bactéries promotrices de la croissance des plants (PGPR)

Kloepper *et* Schroth (1978), proposent le terme "PGPR" pour un groupe important de bactéries rhizosphériques qui ont des effets bénéfiques sur la croissance des plantes lorsqu'elles colonisent les racines. Les PGPR apportent des éléments nutritifs dans l'écosystème à partir des réserves atmosphériques ou minérales sous forme soluble les racines absorbent les éléments nutritifs, décomposent les détritiques et protègent également les racines des agents pathogènes (Prasad *et al.*, 2015).

Les PGPR améliorent la croissance des plantes en raison de divers facteurs (Fig.3), notamment la libération de phytohormones, la fixation de l'azote et la régulation de la production d'éthylène dans les racines, la solubilisation des nutriments tels que le phosphate, la production des sidérophores, la promotion de la fonction mycorhizienne et la diminution de la toxicité des métaux lourds sont les facteurs les plus importants et donc le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative.

coloniser la rhizosphère, et capables de former des associations intimes avec leurs hôtes (Höfte *et devos*, 2006), ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes (Reyes *et al.*, 2004).

1.5.1.2. streptomyces

Les *streptomycètes* sont des membres aérobies à Gram positif de l'ordre des *actinomycétales*. au sein de la classe des *actinobactéries* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Les *streptomycètes* produisent un substrat ramifié et un mycélium aérien, la croissance se produit au niveau des apices hyphales et accompagnée de ramifications, produisant ainsi une matrice complexe d'hyphes pendant la phase de croissance végétative (Wildermuth *et Hopwood*, 1970).

2. Comment fonctionnent les PGPR ?

Les PGPR peuvent modifier la structure des racines et favoriser le développement des plantes (Kloepper *et al.*, 2007), et leur croissance par l'un des deux mécanismes direct ou indirect. Les mécanismes indirects sont en général produits en dehors de la plante, par contre les mécanismes directs se produisent à l'intérieur de la plante (Gupta *et al.*, 2000). Les PGPR sont capables d'augmenter la disponibilité des nutriments dans le sol (Ghignone *et al.*, 2012; Pii *et al.*, 2015), (Fig.4).

Les stress biotiques et abiotiques constituent l'une des principales limites à l'efficacité de l'agriculture dans le monde, et ces problèmes s'aggravent de jour en jour. Les PGPR pourraient jouer un rôle important dans l'atténuation de divers stress chez les plantes (Kumar *et al.*, 2015, 2016 ; Ahmad *et al.*, 2016). Ces microorganismes colonisent la rhizosphère des plantes et introduisent la tolérance en produisant des exopolysaccharides, des hormones végétales et des composés volatils et en favorisant l'accumulation d'osmolytes, d'antioxydants et d'enzymes, la production de sidérophores, la synthèse d'antibiotiques et des composés fongicides, la régulation ascendante ou descendante de gènes respectifs et la modification de la morphologie des racines en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Verma *et al.*, 2013; Vurukonda *et al.*, 2015).

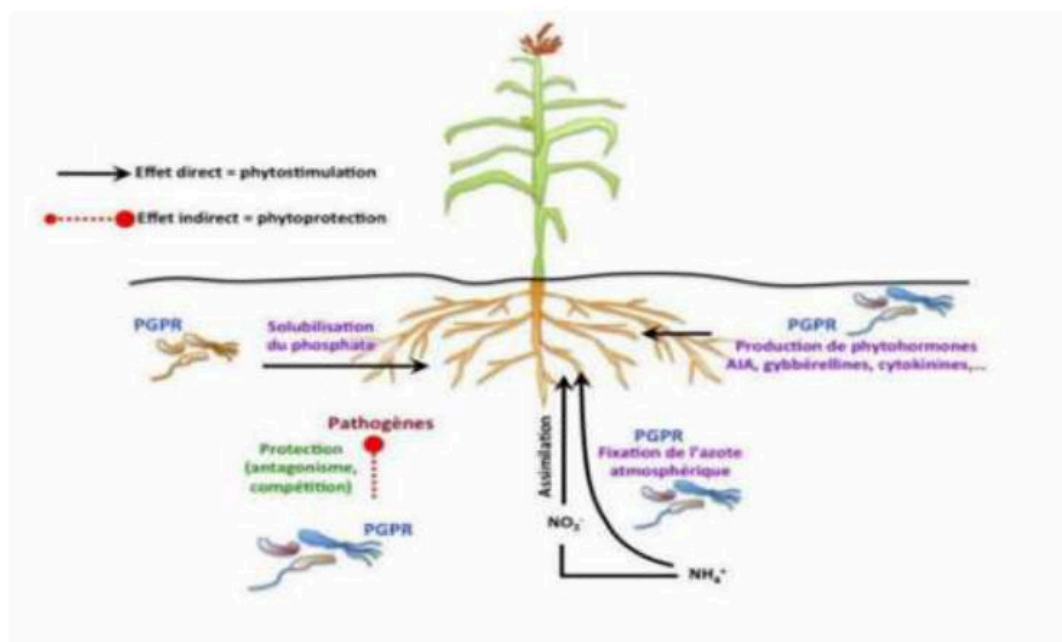


Figure 4 : Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère (Khan *et al.*, 2009).

2.1. Les effets directs des PGPR

Les bactéries PGPR facilitent la croissance des plantes directement en aidant l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétale (Munees *et Mulugeta*, 2014).

2.1.1. La solubilisation du potassium

La solubilisation du potassium résulte de la production microbienne d'acides minéraux (carbonique, sulfurique, nitrique) ou organiques. Lorsque les produits de métabolisme présentent des propriétés complexes, la solubilisation est encore plus active ; tel est le cas de l'acide 2-ceto-gluconique synthétisé par les *pseudomonas* fluorescents (WEBLEY *et coll*, 1963), les microorganismes des sols jouent un rôle clé dans le cycle K naturel et par conséquent les microorganismes solubilisant du potassium présents dans le sol pourraient fournir une technologie alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes (Rogers *et al.*, 1998).

2.1.2. Fixation de l'azote

L'azote est un élément nutritif principal des plantes et le plus important, il est également un facteur limitant dans l'écosystème agricole en raison de sa perte par les pluies et le lessivage des minéraux. Les souches de PGPR telles que *Klebsiell apneumoniae*, *Pantoeaagglomerans* et *Rhizobiumsp*, sont connues pour fixer le N₂ atmosphérique dans le sol et le fournir aux plantes (Antoun *et al.*,1998; Riggs *et al.*, 2001), Ils favorisent l'amélioration de la hauteur des plantes et l'augmentation de la capacité de fructification et de floraison. La capacité des microorganismes à fixer l'azote de manière symbiotique ou non symbiotique dans le sol et d'améliorer le rendement des cultures (Vessey, 2003) (Fig.5).

2.1.3. Solubilisation du phosphate

Le phosphore c'est un nutriment très important limitant la croissance des plantes après l'azote, il est disponible dans le sol sous deux forme organique et inorganique (khan *et al.*, 2009), la faible disponibilité du phosphore aux plantes est due au fait que la grande majorité du P du sol se trouve sous des formes insolubles, alors que les plantes ne peuvent l'absorber que sous deux formes solubles le monobasique et le dibasique H₂PO⁴⁻ et HPO₄²⁻ respectivement (Glass., 1989). Plusieurs bactéries solubilisant le phosphate convertir la forme insoluble du phosphore enforme soluble par acidification, sécrétion d'acides organiques ou des protons (Fig.5),(Richardson *et al.* 2009).

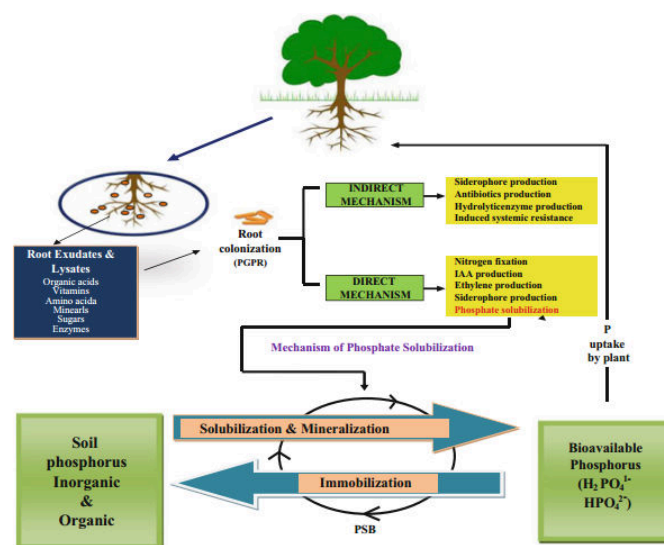


Figure 5 : Rôle du PGPR et mécanisme de solubilisation du phosphate (Pradhan *et al.*, 2017).

2.1.4. Solubilisation du zinc

Le zinc est un micronutriment essentiel qui joue un rôle vital dans divers processus métaboliques des plantes, et sa déficience affecte négativement la croissance et le développement des plantes. Les pratiques de gestion des cultures et des sols extraient de grandes quantités du zinc du réservoir naturel du sol. En outre, la teneur totale en zinc est considérablement élevée bien qu'il existe sous des formes fixes comme $ZnCO_3$, ZnS , ZnO , $ZnFe_2O_4$, qui sont peu solubles. Par conséquent, d'importants apports d'engrais à base de zinc doivent être ajoutés au sol pour satisfaire les besoins en zinc des cultures. Cependant, l'application exogène de sulfate de zinc se transforme également en différentes formes non disponibles (**Gandhi et al., 2014**).

2.1.5. Production des phytohormones**2.1.5.1. Auxine**

Les microorganismes qui font partie de la rhizosphère contribuent également au quantité d'auxines de la plante. Auxines synthétisées par la plante et les microorganismes ne diffèrent que par la voie de biosynthèse. Les principales bactéries productrices d'AIA appartiennent à *Aeromonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Kocuriavarians* et *Rhizobium* (**Gangwar et al., 2018**).

2.1.5.2. Production de l'Acide Indol Acétique (AIA)

Les plantes ont développé des systèmes élaborés pour réguler les niveaux cellulaires de l'AIA (**Fig.6**), (**Normanly et Bartel, 1999**). L'AIA représente l'une des hormones végétales les plus importantes, ce qui renforce de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes tout au long du cycle cellulaire de la plante, de la division cellulaire, de l'allongement cellulaire et de la différenciation (**Guilfoyle et al., 1998**). Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en limitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines, les poils des tiges et des racines des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (**Cherif, 2014**).

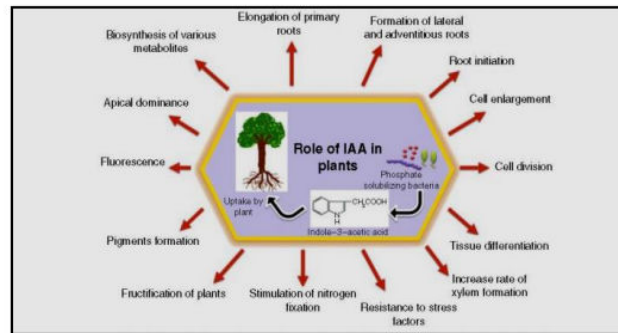


Figure 6 : Rôle de l’acide indole acétique dans l’amélioration de la croissance végétale (Khan *et al.*, 2009).

2.2. Effets indirects

2.2.1. La production des sidérophores

Dans un environnement oxygène, le fer inorganique se trouve sous sa forme oxydée (Fe^{+3}) qui donne des composés quasi insolubles (ex. oxydes, phosphates) (Gobat *et al.*, 2010). Il est indisponible pour l’assimilation directe par les microorganismes car l’ion ferrique (Fe^{+3}), forme prédominante dans la nature est peu soluble (Neilands *et al.*, 1987). Pour s’en procurer, les organismes doivent produire des petites molécules capables de chélater le Fe^{+3} et qui ont une haute affinité pour cet élément. Ces molécules sont appelées sidérophores qui sont capables de complexer le fer (littéralement : porte-fer), elles sont secrétées par un organisme en vue d’assurer son alimentation en fer à partir des composés inorganiques quasi insolubles du fer trivalent (Gobat *et al.*, 2010), ensuite ils transportent ces complexes vers la cellule microbienne où il est reconnu par des récepteurs membranaires situés sur la membrane externe de la bactérie qui seront utilisés durant la croissance microbienne (Neilands *et* Leong, 1986). (Fig.7).

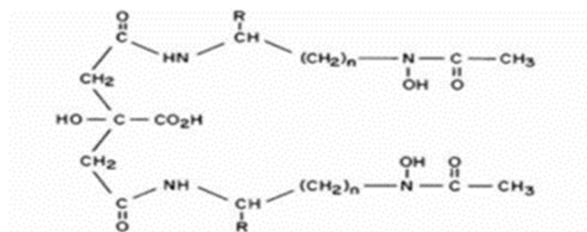


Figure 7 : Structure générale des siderophores citrate-hydroxamate (Gibson *et* Magrath, 1969).

2.2.2. Production de l'ACC-Désaminase

Les plantes réagissent en synthétisant du 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), qui est un précurseur de l'éthylène (**Glick et al., 2007**). L'éthylène joue un rôle important en déclenchant le développement des racines, en inhibant leur élongation, en favorisant la maturation des fruits, en favorisant un moindre flétrissement, en stimulant la germination des graines, en favorisant l'abscission des feuilles et en activant la synthèse d'autres hormones végétales. Il est parfois produit dans des conditions de stress, telles que le stress dû aux métaux lourds, aux phytopathogènes, l'inondation, la sécheresse et une concentration élevée de Na (**Das et al., 2013**).

Il a été signalé que certains PGPR possèdent également une activité ACC-désaminase qui transforme l'ACC en alpha-céto-butyrates et en ammoniac et réduisent ainsi le niveau d'éthylène dans la plante, les rhizobactéries ayant une activité ACC-désaminase appartiennent aux genres *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, plus précisément les *pseudomonades* fluorescentes. Les plantes inoculées avec des PGPR ayant ACC désaminase sont plus résistantes aux effets néfastes de l'éthylène de stress qui est produit dans des environnements stressés (**Saini et al., 2015**).

2.2.3. Antibiose

Synthèse des composés antibiotiques est le mécanisme le plus efficace et le plus puissant pour empêcher la prolifération des phytopathogènes (**Shilev, 2013**). Différents métabolites comme l'amphisine, les butyrolactones, le diacétylphloroglucinol (DAPG), lipopeptide cyclique, (cyanure d'hydrogène (HCN), kanosamine, oligomycine A, sont produits par des rhizobactéries (**Akhtar et Siddiqui 2010**).

3. Généralité sur le phosphore

Le phosphore (P) est un nutriment essentiel primaire qui joue un rôle à la fois structurel et métabolique dans les plantes. Il est le constituant structurel de plusieurs biomolécules, notamment les acides nucléiques, ADN et ARN (**Marschner, 1995**). Il est également un constituant structurel des phospholipides présents dans les biomembranes, le phosphore est également impliqué dans le mécanisme de transfert d'énergie dans les systèmes biologiques. La réaction lumineuse de la photosynthèse est utilisée pour synthétiser l'adénosine triphosphate (ATP) à partir de l'adénosine di-phosphate (ADP) avec la formation d'une liaison pyrophosphate riche en énergie. Il joue également un rôle dans la photosynthèse et la

remobilisation de l'amidon. Chez les légumineuses, le P joue un rôle dans les premiers stades de l'initiation et du développement des nodules et dans l'activité azotase des nodules et également dans l'activité de la nitrogénase des nodules (Marschner,1995).

3.1. Le phosphore dans le sol

La teneur en P de la lithosphère terrestre est d'environ 0,12 % dans les sols de surface, la teneur totale de P varie de 0,02 à 0,15% avec une moyenne de 0,06% (Lindsay 1979), dans les sols minéraux, environ 20-80% du P total du sol est sous forme organique, tandis que le reste est sous forme inorganique, le P inorganique du sol peut exister sous forme de P non occlus (dans la solution du sol, sous forme échangeable et adsorbée et P présent dans les minéraux). Le phosphore libéré par les minéraux P primaires et secondaires entre dans la solution du sol d'où il peut être soit absorbé par les plantes, soit adsorbé par les colloïdes inorganiques du sol, soit précipité sous forme de minéraux P secondaires, soit utilisé par les microorganismes du sol, ou être perdu par ruissellement (Fig.8) (Sharpley *et al.*, 1999; Sharma, 1992).

Le phosphore est présent en faibles concentrations dans la plupart des sols (Hinsinger, 2001; Raghothama, 1999 ; Vance *et al.*, 2003).

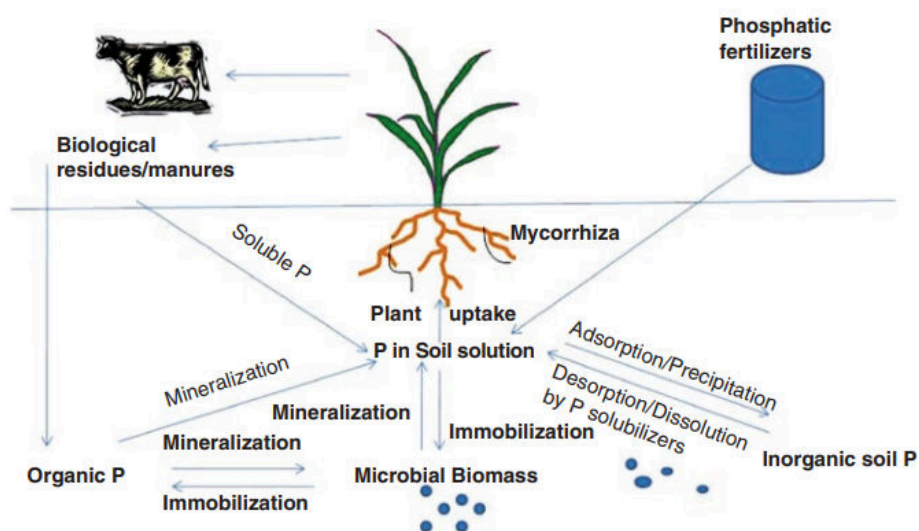


Figure 8 : le cycle de phosphate dans la nature (Shrivastava *et al.*, 2018)

3.2. Les formes du phosphore dans le sol

La présence de chacune de ces formes de phosphore dans le sol dépend de l'acidité, de l'alcalinité et de l'activité biologique du sol. L'absorption du phosphore par les racines des plantes est généralement directement proportionnelle à la concentration en phosphore à la surface des racines (**Olsen *et al.*, 1961**). Les racines des plantes absorbent non seulement l'eau et les nutriments nécessaires à leur croissance, mais elles libèrent également des composés organiques et inorganiques dans la rhizosphère. Ces composés entraînent plusieurs changements chimiques dans l'environnement racinaire, affectant la population microbienne et la disponibilité des nutriments. (**Neumann *et Romheld*, 2001; Fageria *et Stone*, 2006**).

3.2.1. Phosphore solide inorganique

Dans les sols le phosphate dicalciquedihydraté, le phosphate dicalcique, sont principalement présents dans les sols neutres et calcaires. Dans les sols calcaires, le P à faible concentration est retenu par la surface du CaCO_3 grâce à remplacement du CO_3^{2-} par le phosphate, puis a une concentration plus élevée du P, une précipitation de surface du phosphate de calcium se produit à la surface du CaCO_3 (**Yin *et al.*, 1989**). Initialement, le phosphate de calcium formé est amorphe, mais il se transforme progressivement en une structure cristalline de faible solubilité (**Parfitt, 1978**).

3.2.2. Phosphore organique

Stevenson (**1986**) a indiqué que 15 à 80 % du P dans les sols se trouve sous forme organique, la quantité exacte dépendant de la nature du sol et de sa composition. D'après (**Hon *et Yuan*, 1990**) ce dernier est présent sous forme de phosphate d'inositol (12,1-32,3 %), de phospholipides (1,9-5,8 %) et d'acide nucléique (0,7-3,7 %).

Pour l'utilisation Pour que l'absorption soit possible, le P contenu dans la matière organique du sol doit être converti en anions ortho-phosphates par les microorganismes du sol (**Darouband Snyder, 2007**). La libération du P par la matière organique dépend du matériau parental, de la culture de la profondeur du sol, de la température du sol, de l'humidité, de l' O_2 , et du PH. Lorsque les sols sont mis en culture pour la première fois, la teneur en C et en N organiques diminue généralement, cela est appliqué pour le PO (**Stevenson, 1986**).

Tableau 1 : Quelques acides organiques produits par les BSP (Hansali et Banouh, 2020).

Acide organique	Bacterieproductrice	Référence
Acide gluconique	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Oteino et al., 2015
	<i>Pseudomonas cepacia</i> ,	Babu-Khan et al., 1995
	<i>Erwiniaherbicola</i> ,	Liu et al., 1992
	<i>Burkholderiacepaci</i>	Kim et al., 2002
	<i>Enterobacter intermedium</i>	Zhao et al., 2014
	<i>Bacillus spp</i>	Saeid et al., 2018
Acide acétique	<i>Pseudomonas sp.</i>	Rfaki et al., 2020
	<i>Enterobacter sp.</i>	
Acide propionique	<i>Bacillus megaterium</i>	Gull et al., 2004
		Chen et al., 2006

3.2.3. Phosphore soluble

Le phosphore dans la solution du sol peut varier de 0,02 à 5,46 mg PL⁻¹ (Morel et Planchette., 1994), avec une valeur moyenne autour de 0,05 mg P L⁻¹ dans la solution du sol.

Le P peut exister sous forme de H₂PO₄⁻, HPO₄⁻² ou PO₄⁻³ en fonction des conditions de Ph. Sur un pH de 7.2 tant H₂PO₄⁻ et HPO₄⁻² sont presque égales, et une augmentation supplémentaire du pH augmente la proportion de HPO₄⁻² une forme moins préférée par la plante pour l'absorption par rapport à H₂PO₄⁻. Des traces de certains composés organiques de P de faible poids moléculaire peuvent également être présentes dans la solution du sol. Selon (Hedley et al., 1982; Sharpley et moyer, 2000).

3.3. Le rôle du phosphore dans la plante

Le P est essentiel pour la croissance des plantes, où le transfert d'énergie dans les plantes est bien connu, car c'est un composant essentiel du composé organique souvent appelé la monnaie d'énergie de la cellule vivante (ATP) (**Brady et Weil, 2002**).

Le P influe sur la croissance et le rendement des plantes, puisqu'il affecte la maturité des cultures, donc la capacité des plantes à faire face aux stress environnementaux, comme la sécheresse et les maladies, il interagit aussi avec d'autres éléments nutritifs, telle que N et K, pour augmenter le rendement des céréales (**Bundy et al., 2005**).

3.4. Les bactéries solubilisant le phosphate BSP

Les bactéries solubilisant le phosphate sont des bactéries bénéfiques qui est classer parmi les PGPR capable de tourner et hydrolyser les formes inaccessibles inorganique et organique en forme accessible qui se trouve majoritairement dans la rhizosphère (**Chen et al., 2006**). Les BSP jouent un rôle important dans la nutrition du P en améliorant sa disponibilité par la conversion du P insoluble ou lié en forme disponible à l'aide de certains mécanismes (**Khan et al., 2009; Sundaram et al., 2016**).

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate constituer une source importante comme agent biofertilisant dans ce domaine d'étude (**Sharma et al., 2007**). Les microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) et leur utilisation comme inoculant augmentent simultanément l'absorption de P par la plante et le rendement de la culture.

Les BSP comprennent les genres *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Rhodococcus*, sont utilisés comme inoculant du sol pour améliorer la croissance et le rendement des plantes selon (**Bhattacharyya et Jha 2012; Pradhan et al., 2014**). Les effets bénéfiques de l'inoculation avec microorganismes solubilisateurs de P utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres microbes rhizosphériques ont également été signalés d'après (**Zaidi et al., 2009**).

3.4.1. Mécanisme de solubilisation du phosphore

Les processus impliqués dans la libération du P solide du sol dans la solution du sol sont la dissolution-précipitation, minéralisation et immobilisation a impliqué (**Sims et Pierzynski, 2005**). Les bactéries du sol assurent la solubilisation du P par le biais de la libération de composés complexant ou dissolvant les minéraux comme les anions d'acides

organiques, ou la libération d'enzymes extracellulaires comme les phosphatases (**Fig.9**), (**McGill et Cole, 1981**).

3.4.1.1. Solubilisation du phosphate minéral

Selon (**Whitelaw, 2000; Maliha et al., 2004**) ce mécanisme fonctionne grâce à la production d'acides organiques par les microorganismes, qui conduisent à la diminution du pH dans la rhizosphère.

Les acides organiques produits dissolvent directement le P minéral à la suite d'un échange d'anions de phosphate par un anion acide ou peuvent complexer des cations comme Fe, Al et Ca dans la rhizosphère (**Omar, 1998**). Les acides organiques couramment libérés par les BSP sont l'acide gluconique (**Di-Simine et al., 1998; Bar-Yosef et al., 1999**), acide oxalique, acide citrique (**Kim et al., 1997**), acide lactique, acide tartrique et acide aspartique (**Venkateswarlu et al., 1984**).

3.4.1.2. Solubilisation du phosphore organique

Minéralisation du P organique du sol qui constitue 4 à 90 % du P total du sol, joue un rôle important dans le cycle du P dans un système de production agricole (**Khan et al., 2009**). La minéralisation des composés organiques du P dépend principalement de leur propriétés physico-chimiques et biochimiques, les acides nucléiques, les phospholipides et les phosphates de sucre sont les plus facilement minéralisée que l'acide phytique, les polyphosphates et les phosphonate. Les composés organiques du P du sol sont associés aux particules d'argile est facilement minéralisés car une fraction d'entre eux est accessible pour une utilisation microbienne rapide (**Ruback et al., 1999**).

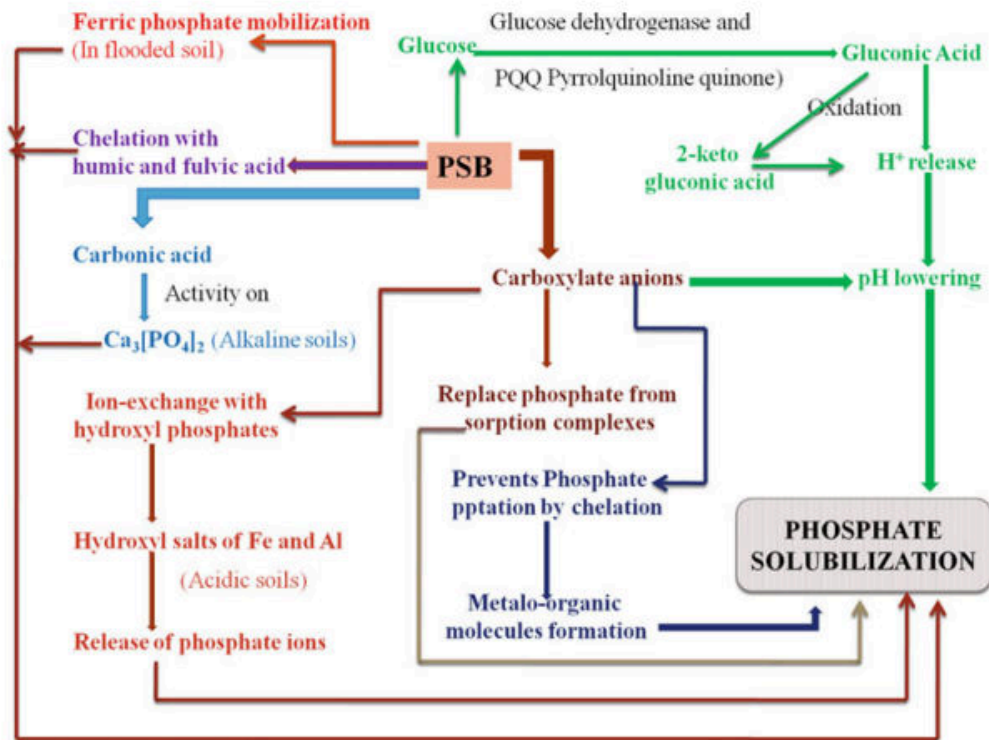


Figure 9 : Diverses substances organiques/inorganiques produites par les PSB responsables de la solubilisation du phosphate dans le sol (Gangwar *et al.*, 2017).

3.5. l'interet des BSP dans l'agriculture

Récemment, l'utilisation des bactéries bénéfiques et les BSP comme biofertilisants en agriculture a connu une ampleur majeure, à cause de leur rôle clé dans la dynamique du P du sol et sa disponibilité pour les plantes, et constitue une alternative prometteuse à l'utilisation massive d'engrais chimiques (Yang *et al.*, 2009), l'utilisation des BSP est l'une des options les plus écologiques et naturel pour l'environnement (Vijayalakshmi *et al.*, 2016).

CHAPITRE II :
Matériels et méthodes

Matériel et méthodes

1. Objectif de travail

Le but de ce travail est d'isoler et d'identifier des rhizobactéries solubilisant le phosphate à partir du sol rhizosphérique et évaluation de leur activité PGP.

Pour atteindre cet objectif, les étapes suivantes ont été réalisées :

- Échantillonnage.
- Isolement des BSP à partir des trois compartiments de la rhizosphère.
- Purification, identification et conservation des isolats.
- Etude des activités PGP des isolats.

2. Échantillonnage

2.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons du sol ont été collectés de la rhizosphère de différentes plantes à savoir : ail, haricots verts, betterave, courgette dans les régions de Douar Shaibiya de la wilaya de Mostaganem (**Fig.10**). Les coordonnées cartographiques sont montrées dans le tableau 2 (**Tab.2**), le prélèvement a été effectué le 20 avril 2022 après-midi.

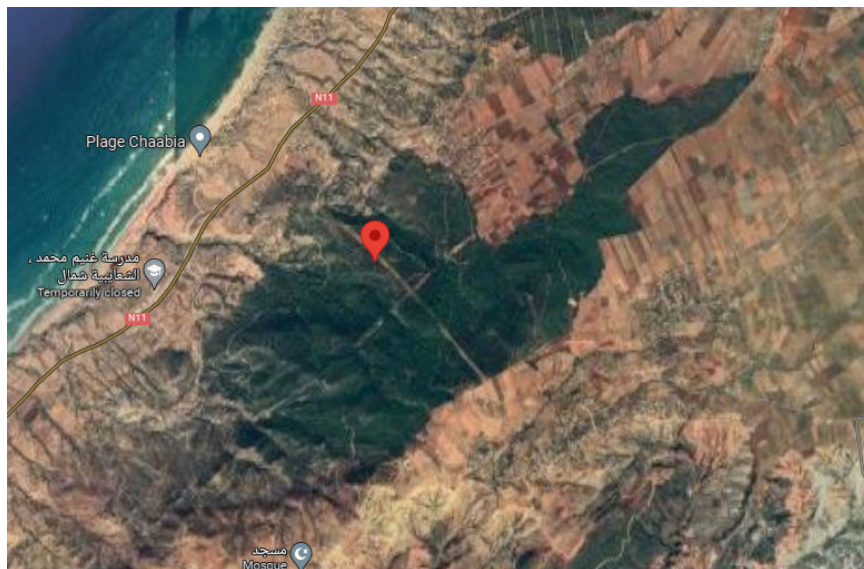


Figure 10 : Carte géographique du site d'échantillonnage (Google maps).

Tableau 2 : Coordonnées cartographique des plantes.

Echantillon	Plante	Coordonnées cartographique
A	Courgette	36° 08' 34.05 N 0° 21' 16.92 E
B	L'ail	36° 08' 36.19 N 0° 21' 17.36 E
C	Betterave	36° 08' 34.05 N 0° 21' 16.92 E
D	Haricot vert	36° 08' 34.05 N 0° 21' 16.92 E

Les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol ont été enlevés à l'aide d'une spatule stérile, puis des échantillons de sol de 100 à 150 g sont prélevés entre 5 et 15 cm de profondeur (**Fig.11**) et déposés dans des sacs en plastique stériles, puis transportés au laboratoire pour le reste de travail.



Figure 11 : Prélèvement d'échantillon de sol.

3. Isolement des BSP

La rhizosphère est une zone étroite présente dans le sol à proximité des racines, qui constitue une interface entre les racines des plantes et le sol. Il est composé de trois compartiments à partir des quel l'isolement a été fait.

3.1. Milieu de culture utilisé

Le milieu de culture utilisé pour isolement est la gélose Pikovskya (PVK) (**Annexe 1**).

3.2. Isolement

Des solutions mères ont été préparé à partir des trois compartiments de la rhizosphère : l'ectophyte, l'épiphyte et l'endophyte. Suivant ce protocole :

- Pour l'ectophyte une solution mère a été préparé par dissolution de 10g du sol dans un flacon qui contient 90ml de l'eau physiologique, bien mélangé avec un vortex, ensuite le mélange a été utilisé pour faire des dilutions décimales ensuite 0,1ml des deux dernières dilutions (10^{-5} et 10^{-6}) ont été utilisé pour ensemencé en surface des boîtes de pétri contenant la gélose PKV (**Fig. 12**) (LIU *et al.*, 2011).
- Concernant la partie épiphyte, les racine ont été coupée d'une manière aseptique après être rincée avec l'eau du robinet a des tailles qui varie entre 2-5mm, puis placée dans des tubes qui contint de l'eau physiologique ensuite bien agité au vortex. Le mélange a été utilisé pour faire des dilutions décimales. La solution mère et la dilution 10^{-1} ont été utilisées pour ensemencer en surface la gélose PKV (**Fig.12**) (Dasri1 *et al.*, 2014).
- Les racines ont été coupées a des petites tailles pour l'isolement de l'endophyte puis rincée avec l'eau de robinet, stériliser avec l'éthanol pour 2 minute et rincée trois fois avec l'eau stérile, puis ont été broyées a des petites tailles à l'aide d'un mortier, ensuite le mélange a été utilisée pour faire des dilutions décimales ensuite le mélange a été utilisée pour faire des dilutions décimales. La solution mère et la dilution 10^{-1} ont été utilisées pour ensemencer en surface la gélose PKV (**Fig. 12**) (Furini, 2015).

L'incubation a été faite à 30°C pendant 7jours.

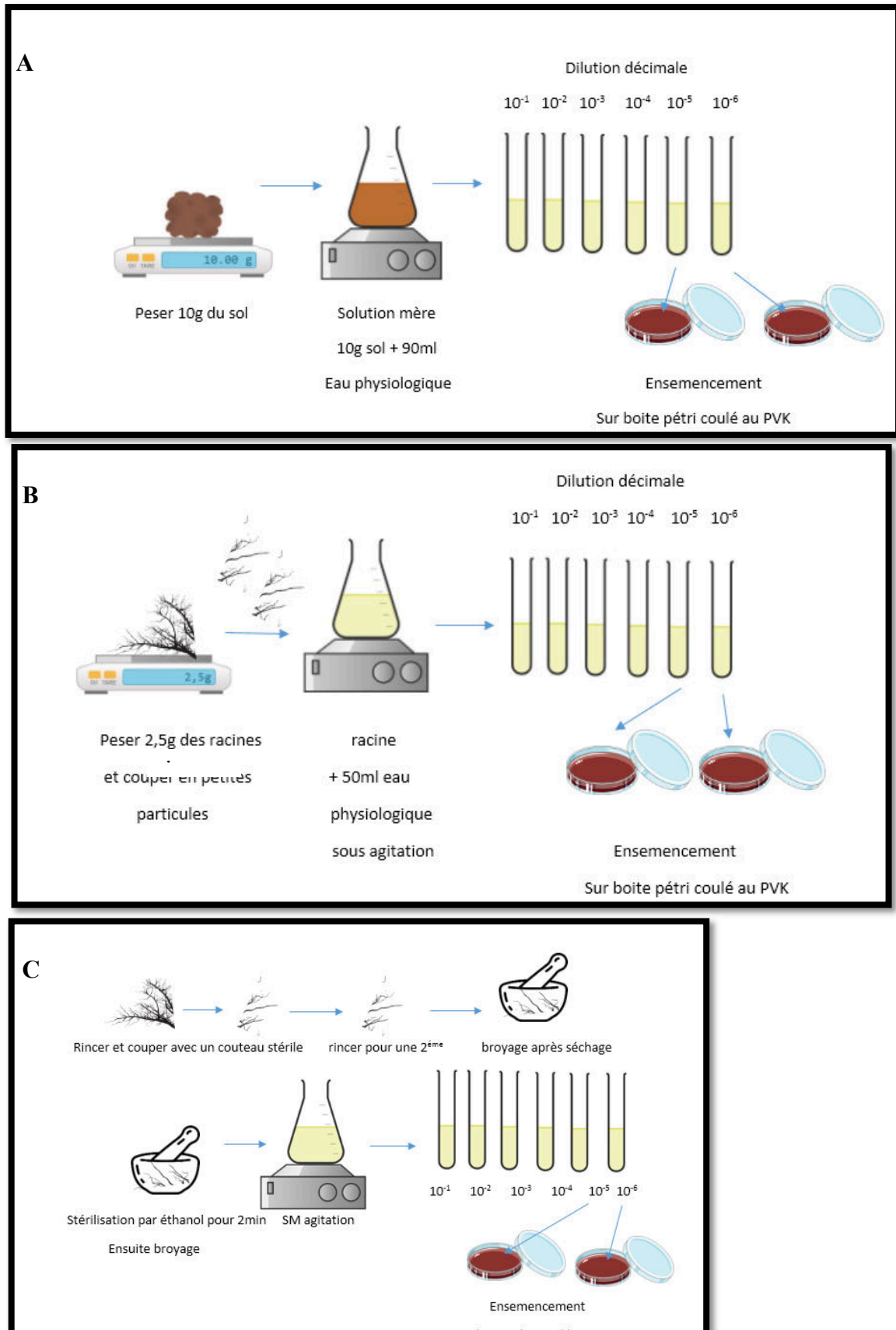


Figure 12 : Schéma représentatif de l'isolement.

A: ectophyte, B: epiphyte, C: endophyte

Après incubation, les isolats ayant présenté un halo clair ont été repiqués par la méthode de strie d'épuisement sur des boîtes de pétri coulées avec le milieu de culture gélose nutritif GN (**annexe 1**), puis ils ont été incubés à 30°C pendant 24h, l'opération a été répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

3.3. La conservation des isolats

La conservation des isolats a été faite dans des tubes contenant GN incliné à 4°C (**El Karkouri., et al., 2019**).

4. Identification et caractérisations des isolats

Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des rhizobactéries isolées ont été déterminées par des méthodes classiques.

4.1. Caractérisations macroscopiques

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies isolées permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification sur les éléments suivants : la taille et la forme des colonies, la couleur des colonies, l'élévation, l'opacité et la surface des colonies étudiées. (**Joffin et Leyral, 2006**).

4.2. Caractérisation microscopique

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de distinguer les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif sur la base de la structure de leur paroi cellulaire et leur forme, cet examen a été fait sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolat obtenu. Ces frottis sont colorés, après observation à l'aide d'un microscope optique à grossissements (x100), les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose (**Annexe 2**).

4.2.1. Test de sporulation

Ce test a été réalisé pour les isolats ayant présenté des formes bacille et de Gram +. Pour le faire, un traitement thermique a été effectué à 80°C /10min, puis des frottis ont été préparés, ils ont été recouverts par le vert malachite à 0,5% chauffés pour quelques minutes (répète pour 2 ou 3 fois), en suite laver avec l'eau distillée et colorer par la fushine (**Annexe 2**). La coloration des spores facilite et permet de préciser la forme de la spore et sa position dans le sporangium les cellules végétatives apparaissent colorées en rose et confirmé si la bactérie est *Bacillus* (**Delarras., 2014**).

4.3. Caractérisation biochimiques

4.3.1. Type respiratoire

Les isolats ont été ensemencée par piqûre central spiral sur des tubes contenant la gélose viande foie VF (semi-solide à 45°C) (**Annexe 1**), puis incubée à 30°C pendant 24-48h, le mode de croissance indique le type respiratoire de la bactérie (**Fig.13**), (**Delarras, 2014**).

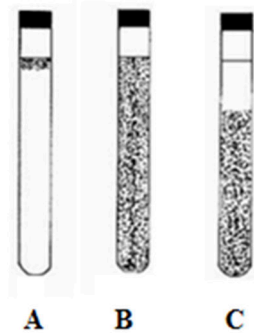


Figure 13 : Types respiratoires des bactéries
(A : aérobie strict B : aéro-anaérobie, C : anaérobie strict).

4.3.2. Test Mannitol mobilité

Les tubes de mannitol ont été inoculée par piqûre centrale avec une pipette pasteur stérile et incubés à 30°C pendant 24 heures, l'utilisation du mannitol (**Annexe 1**) est mise en évidence par un changement de couleur de pH du rouge au jaune et la mobilité se manifeste par un trouble toute autour de la piqure centrale (**Joffin et Leyral, 2006**).

4.3.3. Recherche de la catalase

La révélation de la catalase qui est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau métabolique (H_2O) et oxygène (O_2), en déposant sur une lame en verre propre une colonie bactérienne en présence de H_2O_2 . Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (**Lévy et al., 1992**).

4.3.4. Recherche de l'oxydase

C'est une enzyme qui intervient dans divers couples d'oxydoréduction, l'enzyme recherchée est la phényle-diamine-oxydase. Pour cela, un disque d'oxydase est déposé sur une lame, il est imbibé avec une goutte d'eau physiologique stérile, puis une partie de la

colonie à étudier est étalée, une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque indiquant une oxydase positive, l'absence de coloration indique que l'oxydase est négative (Flandroits *et* Chomarat, 1988).

5. Evaluation des activités PGP

Nous avons sélectionné les isolats ayant présenté un halo clair sur gélose PVK qui indique leur capacité de solubiliser le phosphate pour les analyser et mettre en évidence leurs activités PGP.

5.1. Réactivation des isolats

Pour la réactivation des isolats, ils ont été ensemencés dans des boîtes pétri contenant la GN, et incubés à 30°C pendant 24h, les cultures ont été utilisées pour préparer l'inoculum des différents test (fig.14).

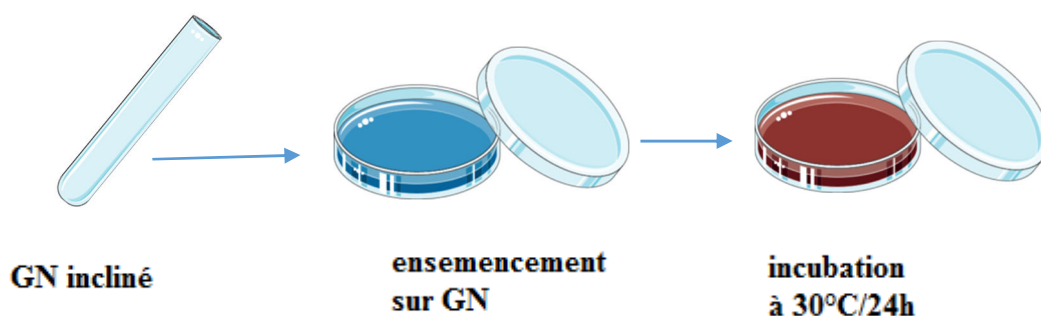


Figure 14 : Schéma représentatif de la réactivation des isolats.

5.2. Évaluation de la production de l'Acide Indole Acétique (AIA)

Après la réactivation des isolats les inoculum (DO=0,8) des isolats ont été inoculée dans des flacons contenant 50ml du milieu de culture LB (Annexe 1) additionné de 0,1 g/L⁻¹ de L-tryptophane et incubé à 30°C pendant 5 jours sous agitation constante (à 160rpm). Ensuite 5 ml de chaque culture a été transféré dans des tubes et centrifugée à 6000 rpm pendant 20 minutes, puis 1ml du surnageant a été transféré dans des tubes contenant 2ml du réactif de Salkowski(Fig.15).(Annexe 3),(Boubekri, 2021)

Les lectures des résultats ont été effectuées à 530 nm, en utilisant un spectrophotomètre (JENWAY 6760), une couleur rose rougeâtre indique la production de l'Acide Indole-

Acétique. Pour établir une courbe standard d'étalonnage (**Annexe 4**), une solution commerciale d'AIA a été utilisée.

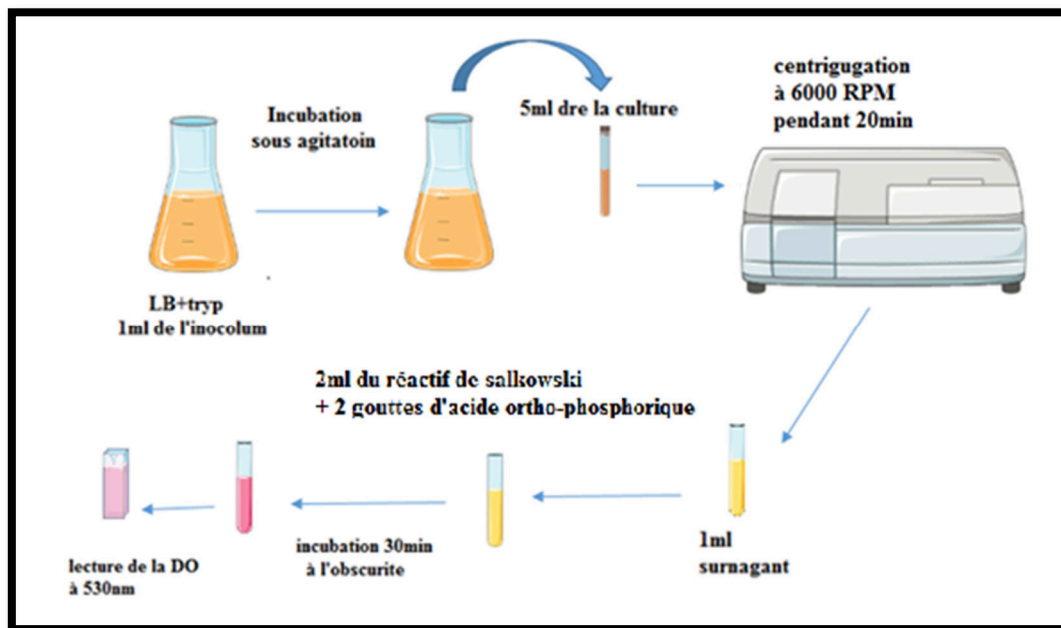


Figure 15 : schéma représentatif de la technique de l'AIA.

5.3. Fixation de l'azote

Après la réactivation des isolats, selon le protocole de (**Park *et al.*, 2004**) pour montrer les bactéries fixatrices de l'azote, l'inoculum (DO=0,8) a été utilisé pour ensemencée un milieu exempt d'azote Burk'N-free (**Annexe 1**) additionné par 20mg/l de Blue de bromothymol, et incubée à 30°C pendant 48h, la croissance des bactéries sur ce milieu affirme la capacité de ces derniers à fixer l'azote. (**Park *et al.*, 2004**).

5.4. Solubilisation du phosphate

Après la réactivation des isolats, une colonie a été utilisé pour ensemercer par touche centrale sur des boites pétri contenant le milieu de culture PVK et incubée à 30°C pendant 7jours (**Pikovskaya, 1948**), les colonies formant des halos ont été enregistrées comme résultats positives.

L'indice de solubilisation a été calculé comme le rapport entre le diamètre total (colonie + halo) et le diamètre de la colonie (**Kumar *et Narula*, 1999**).

$$ES = \frac{\text{diamètres de solubilisation} + \text{diamètres de croissance}}{\text{diamètres de croissance}} \times 100$$

5.5. Production de l'HCN

Après la réactivation des isolats, la capacité des BSP à produire de l'acide cyanhydrique a été testée pour chaque isolat, l'inoculum (DO=0,8) de chaque isolat a été utilisé pour ensemercer la surface de milieu de culture (LB) (**Annexe 1**) additionné de 4,4 g/L de glycine, en plaçant sous les couvercles de chaque boîte de Pétri un papier filtre Whatman inondé par (une solution d'acide picrique à 0,5% dans carbonate de sodium à 2%) (**Annexe 3**), scellées avec du para film et incubée à 30°C pendant 96h, un changement de couleur du jaune au orange/rouge sur le papier filtre Whatman indique une production positive (**Ajit et al., 2015**).

5.6. Solubilisation du zinc

Après la réactivation des isolats, une colonie a été utilisée pour ensemercer par touche centrale sur des boîtes pétri contenant le milieu de culture Bunt et Rovira BR (**Annexe 1**), et incubée à 30°C pendant 5 jours, la croissance a été observée par la formation d'un halo autour des colonies formées (**Javed et al., 2018**).

L'indice de solubilisation a été calculé comme le rapport entre le diamètre total (colonie + halo) et le diamètre de la colonie (**Sadiq et al., 2014**).

$$ES = \frac{\text{diamètres de solubilisation} + \text{diamètres de croissance}}{\text{diamètres de croissance}} \times 100$$

6. Analyse statistique

Les résultats de différents paramètres ont été réalisés en triplicata et traités par analyse de variance par l'utilisation de logiciel *STATBOX 6.4*, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux par le test *Newman & Keuls*.

CHAPITRE III :
Résultats et discussion

1. Résultats

Le travail présenté dans ce mémoire porte sur l'identification des différents isolats bactériens isolés à partir de la rhizosphère de quatre variétés de plantes, la première c'est une caractérisation basée sur l'aspect macroscopiques, microscopiques et les caractères biochimiques, la deuxième partie consiste à faire une évaluation de certains caractères PGP.

1.1 Isolement et identification des isolats

Après incubation à 30°C pendant 72h sur le milieu d'isolement (PVK), 14 isolats ont été sélectionnés après avoir présentés des halos.

L'identification des isolats est basée sur leur étude macroscopique, microscopique et leur caractérisation biochimique (**Tab.3**).

L'étude macroscopique a révélé des isolats de différents couleurs ; jaune comme VAZ6 et VDY13, blanche VAZ7 et orange VCZ8, l'ensemble des isolats étaient marquée avec une consistance visqueuse et plate à part l'isolat VAZ7 était rigide et plate (**Fig.16**), (**Tab.3**).



Figure 16 : Isolement sur gélose PVK.

L'observation microscopique a été faite après coloration de Gram qui nous a permis de différencier les bactéries selon leur forme et leur coloration, tous les isolats observés avaient une forme bacille (100%). Parmi les 14 isolats, 2 isolats (VBY3, VAZ7), (14,29%) ont été gram⁺ avec une couleur violette, et le reste avec un pourcentage important (85,71%) ont été Gram⁻ avec une couleur rose, telle que (VAY111 et VBY4), (**Fig.17**), (**Fig.18**), (**Tab.3**).

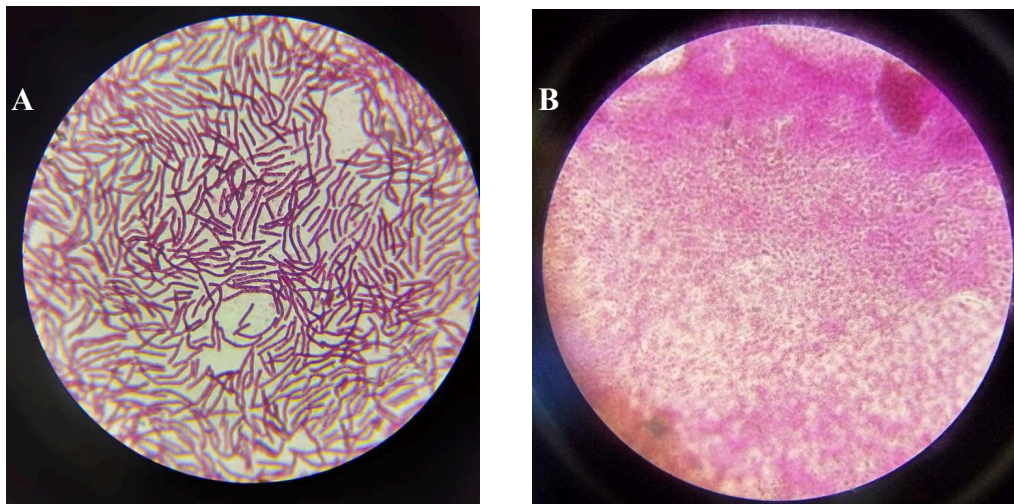


Figure 17 : Aspect microscopique (G X100) après coloration de Gram.
A : Gram positive B : Gram négative.

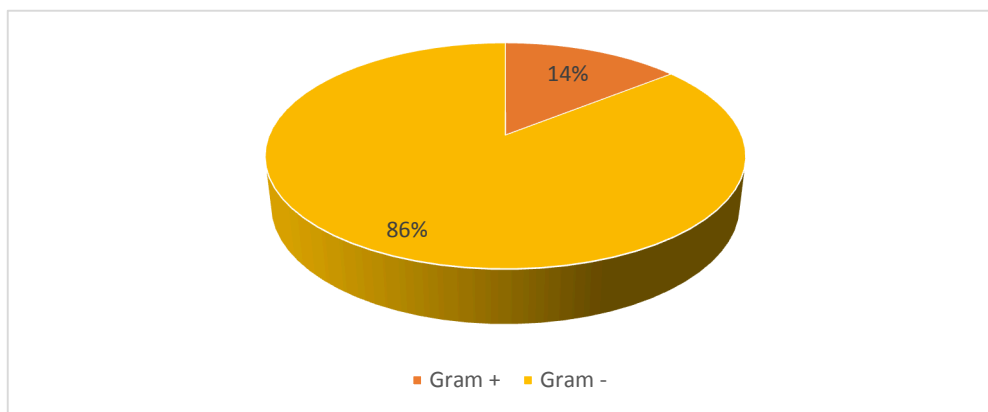


Figure 18 : Pourcentage des isolats de Gram⁻ et Gram⁺

D'autres tests d'identification des BSP ont été faits par Gupta et *al.*, (2012), où ils ont montré que tous leurs BSP ont été Gram⁻ des colonies plates et de différentes couleurs et de forme bacille.

1.2. Test de sporulation

Après un traitement thermique à 80°C /10min, les deux isolats (VBY3 et VBY7) ont été ensemencés en surface sur gélose nutritif, après coloration des spores le cytoplasme s'est coloré en rose par contre les spores en vert (**Fig.19**).

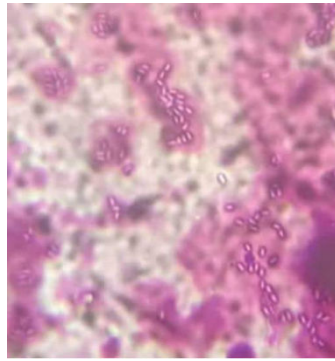


Figure 19 : Observation des spores après coloration.

2. Caractère biochimique

Les 14 isolats ont été inoculés sur des tubes contenant le gélose VF pour savoir leur type respiratoire par rapport à leur mode de croissance autour du tube, après incubation 2 isolats (VAZ6, VAY12) (14,29%) ont un type respiratoire Aéro-anaérobie facultative, le reste des isolats (85,71%) ont un type Aérobie strict (**Fig.20**), (**Tab.3**).

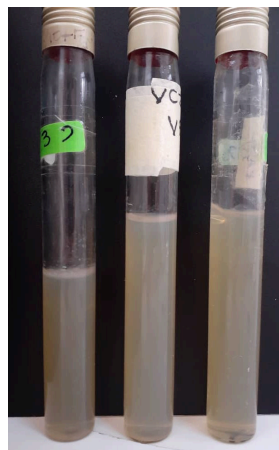


Figure 20 : Le type respiratoire de quelques isolats.

La recherche de l'oxydase est parmi les tests biochimiques d'identification des isolats, les résultats de ce test ont montré que (64,28%) des isolats sont oxydase⁺ tels que (VBY1, VDZ10), et (35,72%) (**Fig.21**) sont oxydase⁻ tels que (VAZ7, VBY4), (**Fig.22**), alors la majorité des isolats sur lesquels nous travaillons possèdent l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

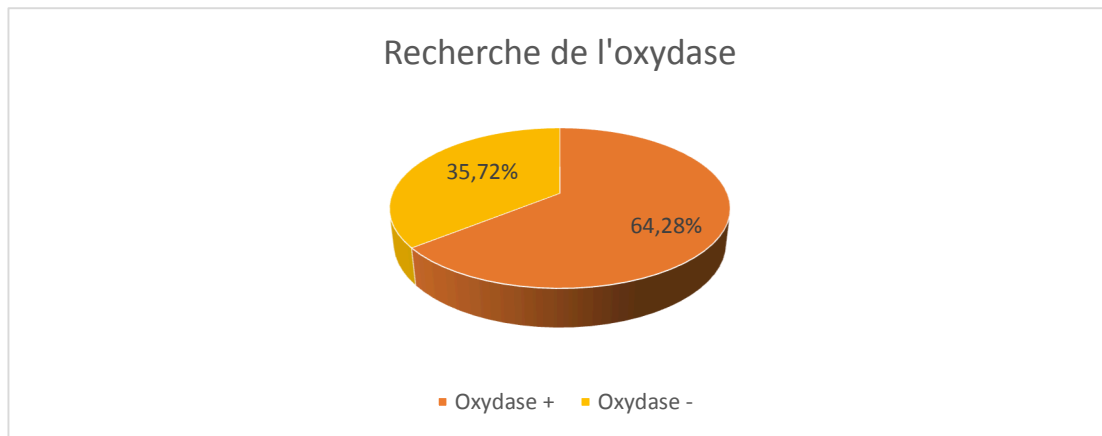


Figure 21 : Pourcentage des isolats qui possèdent l'enzyme respiratoire.



Figure 22 : Résultats positive de test d'oxydase.

Le test catalase a montré que (78,57%) des isolats étaient catalase⁺ telle que (VDZ9, VDZ10), par contre 21,43% des isolats étaient catalase⁻ telle que (VBY2 et VBY3) (**Fig.23**), (**Tab.3**).

La formation des bulles d'air indique que les bactéries possèdent l'enzyme de la catalase et donc de pouvoir décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) ainsi qu'en oxygène (O_2) (**Fig.24**)

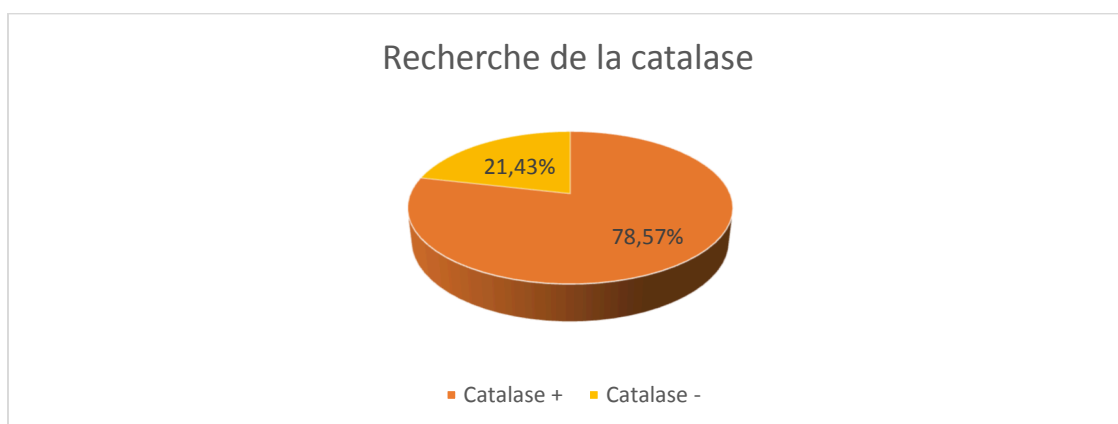


Figure 23 : Pourcentage des isolats qui possèdent l'enzyme de la catalase.

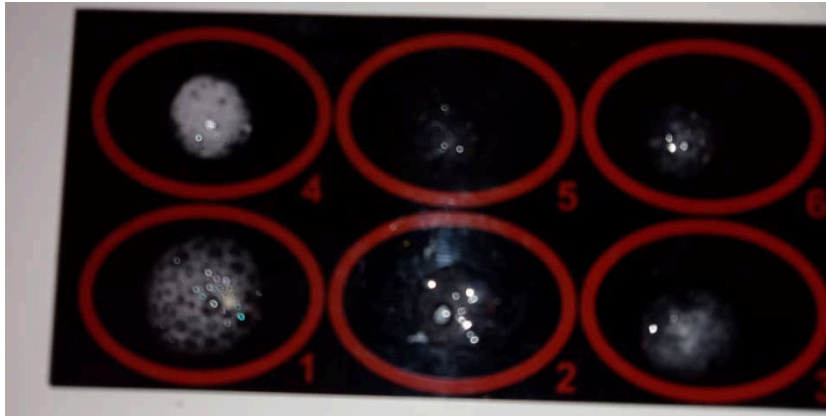


Figure 24 : Réaction de test de catalase positive.

2.1. Test Mannitol Mobilité

Les isolats ont été inoculée sur des tube contenant le milieu de culture Mannitol pour mettre en évidence la mobilité des bactéries qui se manifeste par un trouble autour de la piqûre centrale, on a observé un changement de couleur de pH au jaune sur 9 tubes (64,29%), qui se traduit par la fermentation du glucose, et 8 isolats (57,14) ont été marquée mobile (Fig.25), (Tab.3).

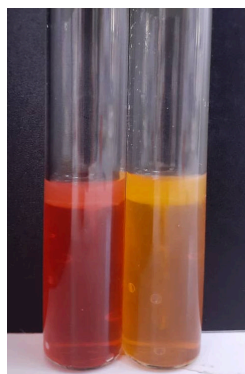


Figure 25 : Le changement de couleur du rouge vers orange (VAY111).

D'autres teste d'identification des BSP ont été faite par Baliah, et *al.*, (2016), ont montré que tous leur BSP isolé ont été Gram⁻, et des formes Bacille.

Concernant les tests d'identification des BSP de Gupta *et al.*, (2012), ont montré que tous leur BSP isolats ont été oxydase⁻, et catalase⁺, ils ont identifié leurs isolats comme *pseudomonas*.

Tableau 3 : caractères macroscopique, microscopique et biochimiques des isolats.

Isolat	Aspect Macroscopique	Aspect Microscopique (Forme)	Gram	Type Respiratoire	Oxydase	Catalase	Mannitol	Mobilité
VBY1	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	+	-	-	-
VBY2	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	+	-	+	+
VBY3	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille sporulé	+	Aérobie strict	+	-	-	+
VBY4	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	-	+	+	+
VAZ6	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aéro-anaérobie facultative	-	+	-	+
VAZ7	Colonie blanche, rigide, plate	Bacille sporulé	+	Aérobie strict	-	+	+	+
VCZ8	Colonie orange, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	-	+	+	+
VDZ9	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	+	+	-	-
VDZ10	Colonie blanche, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	+	+	+	+
VAY12	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aéro-anaérobie facultative	-	+	+	+
VDY13	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	+	+	+	-
VBZ14	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	+	+	+	-
VAY110	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	+	+	-	-
VAY111	Colonie jaune, visqueuse, plate	Bacille	-	Aérobie strict	-	+	+	-

3. Evaluation de l'activité PGP

3.1. Évaluation de la production de l'Acide Indole Acétique (AIA)

Pour mettre en évidence la production de l'acide Indole acétique (AIA), les 14 isolats ont été inoculée sur milieu de culture LB additionnée de Tryptophane, l'apparition d'une couleur rose après l'ajout du réactif de Salkowski indique un résultat positif (**Fig.26**),



Figure 26 : Production de l'AIA pour quelque isolat.

L'analyse de la variance a montré un effet hautement significatif du facteur isolat sur la production d'AIA ($P = 0$) (**Annexe 5**).

La comparaison des moyennes deux à deux par le test de *Newman & Keuls*, a montré une production maximale chez les 2 isolats VBY1 et VBZ14 avec des valeurs de $12,33^a \pm 0,3$ et $12,99^i \pm 0,2$ respectivement, une production moyenne a été observé chez les 9 isolats VBY2, VBY3, VBY4, VAZ7, VCZ8, VDZ9, VDZ10, VAY12, VDY13 avec des valeurs variant de $6,71^k \pm 0,20$ à $10,71^f \pm 0,20$, et une production minimale chez les 3 isolats VAZ6, VAY110, VAY111 avec des valeurs de $6,98^e \pm 0,2$, $4,30^j \pm 0,1$, $6,71^k \pm 0,2$ respectivement (**Tab.4**) (**Fig.27**).

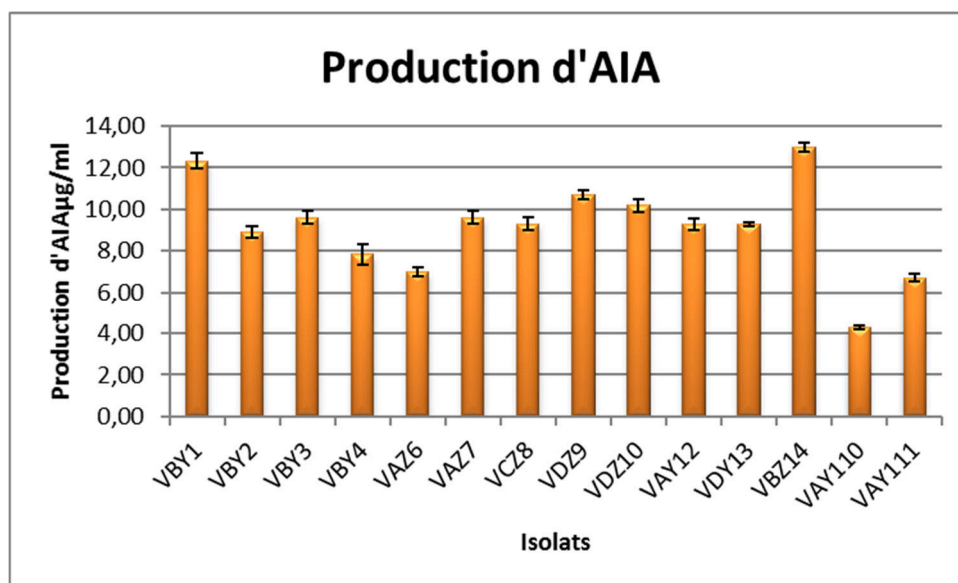


Figure 27 : Histogramme des quantités d'AIA produites par les 14 isolats.

Des résultats similaires ont été mentionné par Chaiharn, *et Lumyong (2011)*, qui ont trouvé qu'environ 80% des bactéries de la rhizosphère peut sécréter l'AIA.

D'autres tests ont été faite par Elhaisoufi.W *et al., (2020)* qui ont marqué des taux de production d'AIA qui varient entre 10.46 et 36.41 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, ce qui est en accords avec nos résultats.

La capacité à synthétiser l'AIA est une activité commune aux bactéries rhizosphériques, (*Shao et al.,2015*). La production d'AIA rend les PSB plus adaptés comme biofertilisants (*Koo et Cho., 2009*).

3.2. Fixation d'azote

Pour mettre en évidence la fixation d'azote par les isolats, ces derniers ont été ensemencée sur le milieu de culture Burk' N-free additionnée par 20mg/l de bleu de bromothymol, après incubation nous avons observé un changement de couleur vers le bleu c'est-à-dire le changement du pH de milieu, et une croissance des colonies sur toutes les boites ensemencées de tous les isolats (**Fig.28**), (**Fig.29**), (**Tab.4**), qui nous montre qu'ils ont la capacité de fixer l'azote. Le changement du couleur indique l'augmentation de pH suit à la formation de NH_4^+ issue de la fixation d'azote.



Figure 28 : Pourcentages de la fixation d'azote par les isolats.

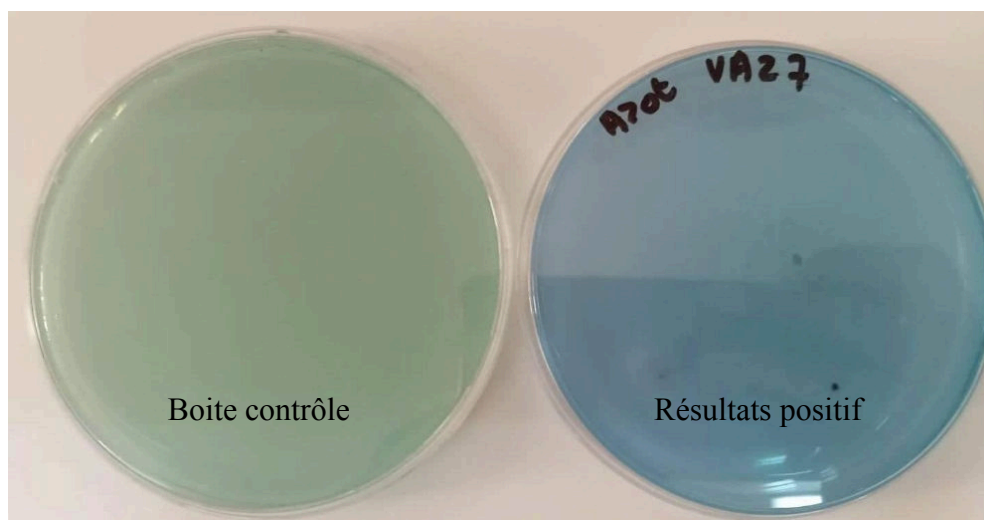


Figure 29 : Le changement de la couleur pour la fixation d'azote (VAZ7).

Des travaux similaires sur les bactéries fixatrices d'azote ont été faits par **Aouane et Hamani, (2017)** qui ont indiqué qu'environ 70% des bactéries rhizosphérique ont la capacité de fixer l'azote, ce qui est en accords avec nos résultats.

L'azote est l'élément le plus important pour la croissance et le développement des plantes ce qui améliore la productivité végétale, mais il n'est pas disponible d'une façon directe pour l'utilisation (**Ahemad et Kibret, 2013**), c'est pourquoi les PGPR sont important pour la fixation d'azote (**Vessy, .2003**).

3.3. Solubilisation du phosphate

Pour mettre en évidence les bactéries qui ont la capacité de solubiliser le phosphate, les 14 isolats ont été ensemencés sur le milieu de culture PVK, après incubation, l'apparition d'un halo est marquée comme indicateur positif, les résultats montrent que la majorité des isolats (13 isolats), (92,85%) ont la capacité de solubiliser le phosphate (**Fig.30**), (**Tab.4**).

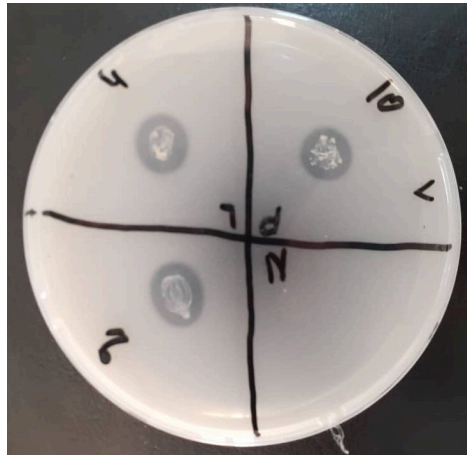


Figure 30 : Observation de quelques isolats qui la capacité de solubiliser le phosphate.

L'analyse de la variance a montré un effet hautement significatif du facteur isolat sur la solubilisation du phosphate ($P = 0$) (**Annexe 5**).

La comparaison des moyennes deux à deux par le test de *Newman & Keuls* a montré une solubilisation maximale chez les 3 isolats VBY3, VDY13, VAY110 ($319,33 \pm 40,4$, $309,66 \pm 15,2$, $349,33 \pm 30,5$ respectivement), et une solubilisation moyenne chez les 10 isolats VBY1, VBY2, VBY4, VAZ6, VAZ7, VCZ8, VDZ9, VDZ10, VAY12, VBZ14 ($221,33^a \pm 32,1$, $229,66^b \pm 35,1$, $210,66^d \pm 20,8$, $258,33^d \pm 28,8$, $237,33^e \pm 30,5$, $188,66^f \pm 32,1$, $259^g \pm 36,0$, $199^h \pm 45,8$, $190^i \pm 40$, $249^k \pm 10$ respectivement), et zéro solubilisation chez l'isolat VAY111 (**Fig.31**), (**Tab.4**).

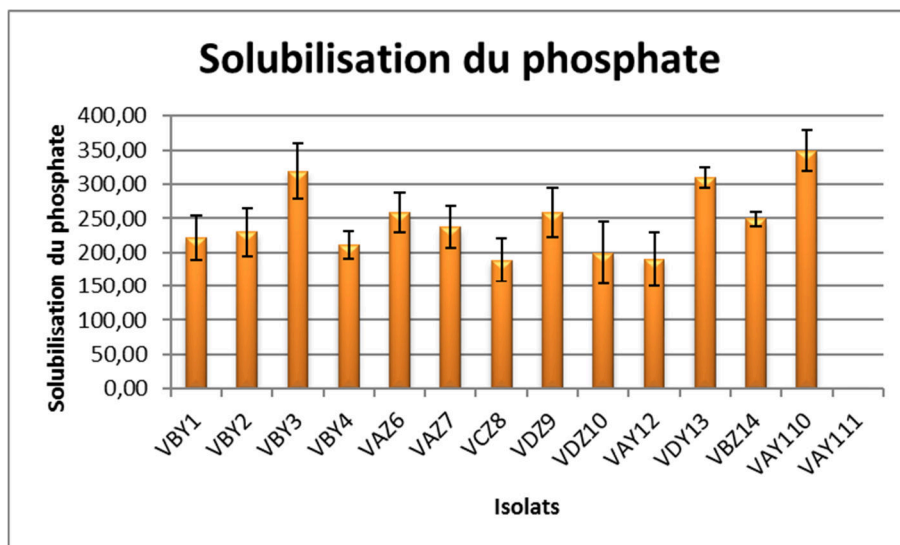


Figure 31 : efficacité de solubilisation du phosphate par les isolats.

D'autres travaux sur la solubilisation du phosphate ont été faite par M. Gupta *et al.*, (2012), qui ont marquée des efficacités de solubilisation qui varient entre 150 et 340.

D'autres travaux sur la solubilisation du phosphate ont été faite par Fahsi, N. *et al.*, (2021), qui ont utilisé le milieu liquide NBRIP, ou ils ont marqué des taux de la solubilisation qui varient entre 36 μ g/ml et 278 μ g/ml.

3.4. Production de l'HCN

Pour mettre en évidence la capacité des BSP à produire l'acide cyanhydrique, les isolats ont étéensemencée sur milieu de culture LB additionné par la glycine, après incubation nous avons remarqué que 2 isolats ont été capables de produire l'acide cyanhydrique VBY4 etVDZ9, par contre les autres isolats était négatif pour le test (**Tab.4**), avec un changement de couleur vers orange-marron comme résultats positif (**Fig.32**). Des travaux sur la production d'HCN ont été faits par Boubekri, K *et al.*, (2021) ou ils ont montré que 11% des isolats ont une productivité importante d'HCN, qui suggère que nos résultats sont similaires et en accords (**Fig.33**).

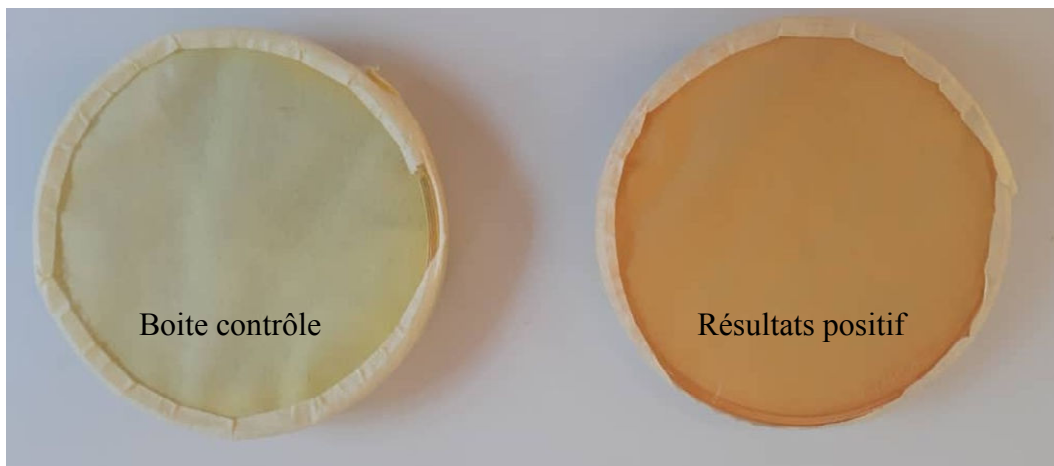


Figure 32 : Le changement de la couleur vers le marron qui indique la production d'HCN.

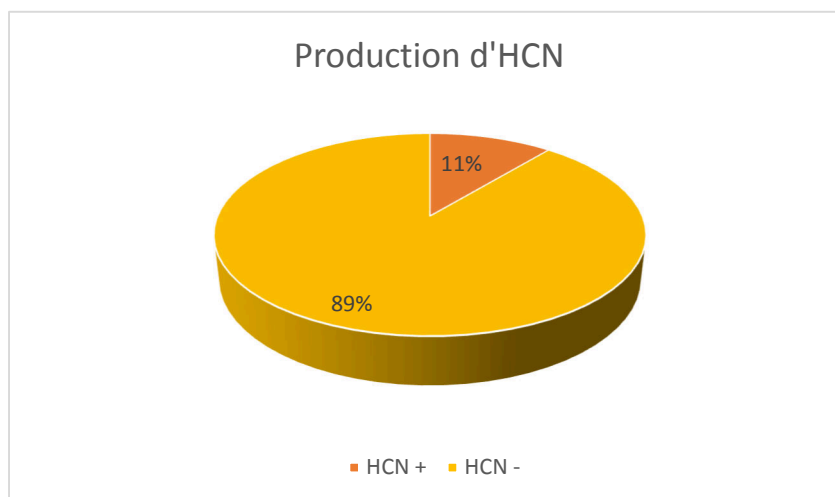


Figure 33 : Pourcentage de la production d'HCN par les isolats.

3.5. Solubilisation du zinc

Le zinc est un nutriment essentiel pour la croissance des plantes et leur développement (Hafeez, B *et al.*, 2004), pour mettre en évidence la solubilisation du zinc, les 14 isolats ont été ensemencés sur le milieu de culture BR, après incubation, on a observé l'apparition d'un halo sur 11 isolats (78,57%) telle que (VBY4, VBZ14) (Fig.34), (Tab.4), indiquant un résultat positif.

L'analyse de la variance a montré un effet hautement significatif du facteur isolat sur la solubilisation du zinc ($P = 0$) (Annexe 5).

La comparaison des moyennes deux à deux par le test de *Newman & Keuls* a montré, une solubilisation maximale chez l'isolat VAY12 ($699,66^g \pm 35,1$), et une solubilisation moyenne a été observé chez les 9 isolats VBY1, VBY2, VBY3, VBY4, VAZ6, VDZ9, VDZ10, VDY13, VBZ14 ($208,66^a \pm 32,1$, $299,66^b \pm 35,1$, $159,66^b \pm 25,1$, $299,66^b \pm 15,2$, $238^b \pm 26,4$, $248^e \pm 43,5$, $260^f \pm 33 \pm 15,2$, $299^h \pm 66 \pm 25,1$, $299^h \pm 10$ respectivement), et zéro solubilisation chez les 4 isolats VAZ7, VCZ8, VAY110, VAY111, (**Fig.35**), D'autre travaux de la solubilisation du zinc ont été faites par Fahsi, N. *et al.*, (**2021**) où ils ont marqué l'apparition des halos autour des colonies indiquant des résultats positifs.

Les PGPR ont la capacité de favoriser l'absorption des micronutriments comme le Zn, dans le sol (**Bouain, N. et al., 2014**),



Figure 34 : Résultats de la solubilisation du zinc pour quelques isolats (VBY4, VBZ14).

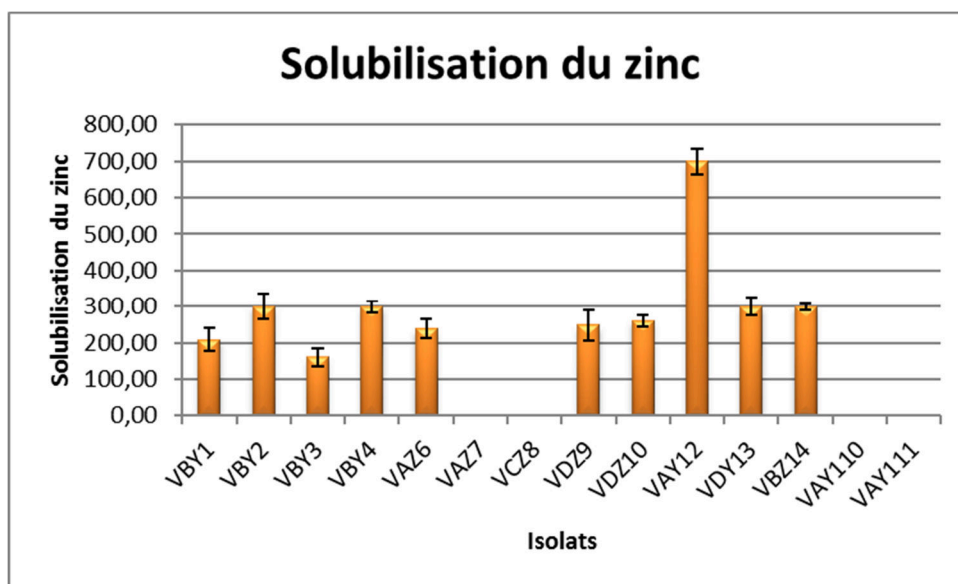


Figure 35 : Histogramme des quantités du zinc solubiliser par les isolats.

D'autres travaux sur la solubilisation du zinc ont été faite par Beulah , *et al* (2017) qui ont marqué des efficacités de la solubilisation qui varient entre 112% et 382.

Tableau 4 : activités PGP des isolats.

Isolat	AIA (µg/ml)	SP(ES)	SZ(ES)	HCN	N ₂
VBY1	12,33 ^a ±0,30	221,33 ^a ±3,210	208,66 ^a ±32,10	-	+
VBY2	8,91 ^b ±0,30	229,66 ^b ±35,10	299,66 ^b ±35,10	-	+
VBY3	9,61 ^c ±0,30	319,33 ^c ±40,40	159,66 ^b ±25,10	-	+
VBY4	7,85 ^d ±0,50	210,66 ^d ±20,80	299,66 ^b ±15,20	+	+
VAZ6	6,98 ^e ±0,20	258,33 ^d ±28,80	238 ^b ±26,40	-	+
VAZ7	9,61 ^e ±0,30	237,33 ^c ±30,50	0 ^c ±0,00	-	+
VCZ8	9,29 ^f ±0,30	188,66 ^f ±32,10	0 ^d ±0,00	-	+
VDZ9	10,71 ^f ±0,20	259 ^g ±36,00	248 ^c ±43,50	+	+
VDZ10	10,19 ^f ±0,30	199 ^h ±45,80	260,33 ^f ±15,20	+	+
VAY12	9,27 ^g ±0,30	190 ⁱ ±40,00	699,66 ^g ±35,10	-	+
VDY13	9,27 ^h ±0,10	309,66 ⁱ ±15,20	299,66 ^h ±25,10	-	+
VBZ14	12,99 ⁱ ±0,20	249 ^k ±10,00	299 ^h ±10,00	-	+
VAY110	4,30 ^j ±0,10	349,33 ^k ±30,50	0 ^h ±00	-	+
VAY111	6,71 ^k ±0,20	0 ^l ±0,00	0 ^h ±00	-	+

AIA : acide indole -3- acétique

SP : Solubilisation du phosphore

SZ : Solubilisation du zinc

HCN : Hydro Cyanidric acid

N₂ : Azote / Nitrogen

Conclusion

Conclusion

Les BSP jouent un rôle très important pour la croissance et le développement des plantes, leur action est nécessaire pour la disponibilité du P, ce qui augmente et améliore la productivité végétale, tant qu'ils sont communs dans la rhizosphère, leur activité PGP montre un intérêt bénéfique pour l'agriculture, à cause de la favorisation de certain caractère dans la rhizosphère, et donc c'est le meilleur choix contrairement à l'utilisation des engrais.

A travers notre travail nous avons isolé des bactéries solubilisant le phosphate à partir des 3 compartiments de la rhizosphère de 4 plantes de la région de Douar Shaibia - Wilaya de Mostaganem, nous avons sélectionné les isolats ayant montré un halo claire autour des colonies sur gélose PVK, ensuite des tests d'identification ont été faites, ils nous ont montré que la majorité des isolats sont Gram -, de forme Bacille, de différent couleur et consistance, et de type respiratoire Aérobie strict pour la majorité des isolats, ce qui suggère une diversité des bactéries, la solubilisation de phosphate de ces isolats a permis de marqué une efficacité de solubilisation de phosphate allant jusqu'à 349,33^k µg/ml pour isolat VAY110, et solubilisation minimale de 188,66^fµg/ml chez isolat VCZ8.

L'analyse des résultats obtenus des activités PGP ont montré leur capacité à produire l'AIA a différentes concentrations, allant de 4,30µg/ml chez isolat VAY110 jusqu'à 12,99µg/ml chez isolat VBZ14, tous les isolats ont été capable de fixer l'azote, 11% des isolats ont la capacité de produire l'HCN et concernant la solubilisation du zinc nous avons remarqué une solubilisation maximale de 699,66µg/ml chez isolat VAY12, et une solubilisation minimale de 159,66µg/ml.

L'ensemble des caractères PGP des divers BSP étudiés dans la présente étude suggèrent que ces microorganismes peuvent favoriser la croissance des plantes par plus d'un mécanisme et que ces activités pourraient être mieux exploitées.

De plus, Il serait intéressant d'étudier autres activité PGP comme l'ACC désaminases, production d'ammoniac, production des sidérophores, et d'identifié les isolats avec l'utilisation de la biologie moléculaires.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Ahemad, M. Kibret, M.(2014).** Mechanisms and Applications of Plant Growth bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities.
- **Akhtar MA, Siddiqui ZA (2010)** Role of plant growth promoting rhizobacteria in biocontrol of plant diseases and sustainable agriculture. In: Maheshwari DK (ed) Plant growth and health.
- **Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R (1998)** Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus*L.). *Plant Soil* 204:57–67.
- **Baliah, N. T., Pandiarajan, G., & Kumar, B. M. (2016).** Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Tropical Ecology*, 57(3), 465-474.
- **Beulah Jerlin, S. Sharmila, K. Kathiresan, K. Kayalvizhi. (2017).** Zinc Solubilizing Bacteria from Rhizospheric Soil of Mangroves. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 2, No. 3, pp. 148-155.
- **Bhattacharyya PN, Jha DK (2012)** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327–1350.
- **Bouain, N.; Shahzad, Z.; Rouached, A.; Khan, G.A.; Berthomieu, P.; Abdelly, C.; Poirier, Y.; Rouached, H, (2014).** Phosphate and zinc transport and signalling in plants: Toward a better understanding of their homeostasis interaction. *J. Exp. Bot.*, 65, 5725–5741.
- **Boubekri, K., Soumare, A., Mardad, I., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., & Kouisni, L. (2021).** The screening of potassium-and phosphate-solubilizing actinobacteria and the assessment of their ability to promote wheat growth parameters. *Microorganisms*, 9(3), 470.
- **Boubekri, K.; Soumare, A.; Mardad, I.; Lyamlouli, K.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Kouisni, L, (2021).** The Screening of Potassium- and Phosphate-Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. *Microorganisms*, 9, 470.

- **Bowen GD, Rovira AD (1999)** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv Agron* 66:1–102.
- **Brady NC, Weil RR (2002)** The nature and properties of soils, 13th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- **Bundy, L. G., H. Tunney, and A. D. Halvorson. (2005).** Agronomic aspects of phosphorus management. In: *Phosphorus: Agriculture and the Environment*, ed. L. K. Al-Amoodi, pp. 685–727.
- by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1), 305-339.
- **Cakmakci,R.,Donmez,F., Aydim,A.,Sahin,F.(2007).**Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions,*soil biology and biochemistry*,38(6),1482-1487.
- **Can, J. Microbiol 38(12):1219-1232.Koo S-Y, Cho K-S, (2009).** Isolation and characterization of a plant growth promoting rhizobacterium *Serratia* sp. SY5. *J Microbiol Biotechnol* ;19:1431–8.
- **Cattelan, A.J., Hartel P.G., et Fuhrmann J.J. (1999).** Screening for plant growth
- **Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC (2006).** Phosphate solubilizing
- **Cherif Hafsa .(2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat. laboratoire de Microbiologie Appliquée. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- **Chowdhury SP, Schmid M, Hartmann A, Tripathi AK (2009)** Diversity of 16S-rRNA and nifH genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. *Eur J Soil Biol* 45:114–122.
- **D. (2015).** Advances in molecular quantum chemistry contained in the Q-Chem 4 program
- **D. M. WEBLEY,MOIRA E. K. HENDERSON,IRENE F. TAYLOR. (1963).** THE MICROBIOLOGY OF ROCKS AND WEATHERED STONES. Volume 14 (1),102-112.
- **Das AJ, Kumar M, Kumar R. (2013).** Plant growth promoting rhizobacteria (pgpr): an alternative of chemical fertilizer for sustainable, environment friendly agriculture. *Res J Agric For Sci* 4:21–23.

- **Dasri, K., Kaewharn, J., Kanso, S., & Sangchanjiradet, S. (2014).** Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, *19*, 268-268.
- **Datta, C., & Basu, P. S. (2000).** Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from
- **Delarras (C), 2014,** *Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures*, Céline Poiteaux, Lavoisier, Paris, 772p.
- **Diego.** Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- **Di-Simine CD, Sayer JA, Gadd GM (1998)** Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. *Biol Fertil Soils* 28:87–94.
- **Egamberdieva, D., Shrivastava, S., & Varma, A.. (2015).** *Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants* (pp. 287-303). Cham: Springer International Publishing.
- **El Karkouri, A., Assou, S. A., & El Hassouni, M. (2019).** Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. *The Pan African Medical Journal*, *33*.
- **Erma JP, Yadav J, Tiwari KN, Kumar A (2013)** Effect of indigenous Mesorhizobium spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecol Eng* 51:282–286.
- **Fahsi, N., Mahdi, I., Mesfioui, A., Biskri, L., & Allaoui, A. (2021).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria isolated from the Jujube (*Ziziphus lotus*) plant enhance wheat growth, Zn uptake, and heavy metal tolerance. *Agriculture*, *11*(4), 316.
- **Gandhi A, Muralidharan G, Sudhakar E, Murugan A (2014)** Screening for elite zinc solubilizing bacterial isolate from rice rhizosphere environment. *Int J Recent Sci Res* 5:2201–2204.
- **Gangwar, M., Saini, P., Nikhanj, P., & Kaur, S. (2017).** Plant growth-promoting microbes (PGPM) as potential microbial bio-agents for eco-friendly agriculture. In *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects* 37-55.
- **Ghignone S, Salvioli A, Anca I, Lumini E, Ortu G, Petiti L, Bonfante P (2012)** The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions. *ISME J* 6(1):136–145.
- **Gibson, F., and Magrath, D. J. (1969).** *Biochim. Biophys. Acta* 192, 175–187.

- **Glass ADM, (1989).** Plant nutrition: an introduction to current concepts. Jones and Bartlett, Boston, P234.
- **Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007)** Promotion of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:329–339.
- **Gobat J.; Aragno M.; Matthey W.; 2010.** Le sol vivant Bases de pedalogie- Biologie des sols, 3rd Edition, *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 817p.
- **Gobat JM, Aragno M, Matthey W (2004)** The living soil: fundamentals of soil science and soil biology. Science Publishers, Enfield.
- **Guilfoyle, Gretchen Hagen, Tim Ulmasov, Jane Murfett.(1998).** How Does Auxin Turn On genes?.
- **Gupta, A., Gopal, M., & Tilak, K. V. B. (2000).** Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria.
- **Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., & Tewari, R. (2012).** Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of Aloe barbadensis Miller. *Microbiological research*, 167(6), 358-363.
- **Hamoum H., (2017)** - Screening des diazotrophes non symbiotiques associés aux plantes des zones salines de l'ouest algérien : effet phyto-stimulateur sur la croissance du blé dur, Thèse de Doctorat, Université de A. Ben badis de Mostaganem, 115p.
- **Hansali ,K et Banouh, S (2020).** Les Bactéries solubilisant du phosphate : Avancées et perspectives en agriculture moderne. Thèse de mémoire. Universite Akli Mohand Oulhadj – Bouira,61.
- **Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., and Chauhan, B. S. (1982).** Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am.*46, 970–976.
- **Hinsinger, P. (2001).** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237(2), 173-195.
- **Hinsinger, P. (2001).** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant Soil*237:173–195.

- **Hon HZ, Yuan KN (1990)** Studies on organo-mineral complex in soil. IV. Distribution of organic phosphorus compounds in organo-mineral complexes. *Acta Pedol Sin* 27:286–292.
- **Hui, L. I. U., Xiao-Qin, W. U., Jia-Hong, R. E. N., & Jian-Ren, Y. E. (2011).** Isolation and identification of phosphobacteria in poplar rhizosphere from different regions of China. *Pedosphere*, 21(1), 90-97.
- **Joffin J. N & Leyral G. (2006).** Microbiologie technique, 2ème Ed, Collection Biologie technique. CRDP d'aquitaine, Bordeaux. 304p.
- **Kang, J., Amoozegar, A., Hesterberg, D., and Osmond, D. L. (2011).** Phosphorus leaching in a sandy soil as affected by organic and incomposted cattle manure. *Geoderma* 161, 194–201.
- **Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., & Rasheed, M. (2009).** Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J agric biol sci*, 1(1), 48-58.
- **Kim KY, McDonald GA, Jordan D (1997)** Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biol Fertil Soils* 24:347–3.
- **Kloepper J.W. and Schroth M. N. (1978).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*, 2: 879-882.
- **Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA (2007)** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 53:159–167.
- **Kloepper, J.W. et Beauchamp, C.J. (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria.
- **Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL, (2004).** Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* ;6:1244–51.
- **Kumar A, Bahadur I, Maurya BR, Raghuwanshi R, Meena VS, Singh DK, Dixit J (2015)** Does a plant growth-promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability?

- **Lévy, E., Eyal, Z., Chet, I. & Hochman, A. (1992).** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 40(3):163-71.
- **Lindsay, W. L. (1979).** *Chemical Equilibrium in Soils*. New York: John Wiley & Sons.
- **Lynch JM (1990)** Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch JM (ed) *The rhizosphere*. Wiley, Chichester, p 1.
- **Lynch, J.M. (1983).** *Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity* blackwell Scientific Publications, Oxford.
- **Marschner, H. (1995).** *Mineral nutrition of higher plants* Academic Press San
- **McGill WB, Cole CV (1981)** Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26:267–268.
- **Morel C, Plenchette C (1994)** Is isotopically exchangeable phosphate of a loamy soil and plant available P? *Plant Soil* 15:287–297.
- **Munees A ,Mulugeta K , (2013)** .Mechanisms and applications of plant growth
- **Munees Ahemad, Mulugeta Kibret, (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, *Journal of King Saud University - Science*, Volume 26, Issue 1, 1-20.
- **Neilands, J. B., Kanopka, K., Schwayn , B., Coy, M., Francis, R. T., Paw, B. H., Bagg, B.(1987).** Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. *In* : Winkelmann, G., Van der Helm, D., Neilands, J. B. (Eds) *Iron transport in microbes, Plants, and animals. VCH*, New York, USA. pp. 3-33.
- **Neilands, J. B., Leong, S. A. (1986).** Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review of Plant Physiologie*, 37(1), 187-208.
- **Neumann, G. and V. Romheld. (2001).** The release of root exudates as affected by the plants physiological status. In: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, eds. R. Pinto, Z. Varanini, and P. Nannipieri, pp. 41–93. New York: Marcel Dekker.
- **Normanly, J., and Bartel, B.(1999).** Redundancy as a way of life-IAA metabolism. *Curr. opin. PlantBiol.*, 2, 207-213.
- **Olsen, S. R., F. S. Watanabe, and R. E. Danielson. (1961).** Phosphorus absorption by corn roots as affected by moisture and phosphorus concentration. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*25:289–294.

- **Omar SA (1998)** The role of rock phosphate solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J Microbiol Biotechnol* 14:211–219.
- **Palleroni, N. J. (1984).** Family I. Pseudomonadaceae Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith, 1917, 555. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 141-213.
- **Parfitt RL (1978)** Anion absorption by soils and soil materials. *Adv Agron* 30:1–50.
- **Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., & Sa, T. (2005).** Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2), 127-133.
- **Pikovskaya, R. I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- **Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (2001)** The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P. (eds) *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, New York, pp 1–17.
- **Pradhan A., Pahari A., S. Mohapatra, et Bibhuti Bhusan Mishra, (2017).** Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture: Genetic Mechanism and Application
- **Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S (2013)** Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* 10:1007.
- **production. J agric biol sci, 1(1), 48-58.**
- **promoting bacteria, Microbiology monographs 18. Springer, Berlin/Heidelberg.**
- **promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J 63(6): 1670-1680.**
- **promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J 63(6): 1670-1680.**
- **promoting rhizobacteria: Current perspective, Journal of King Saud University – Science, January Volume 26, Issue 1, Page, 1–20.**
- **promoting Rhizobacteria: Current Perspective. Journal of King Saud University- Science, 26, 1-20.**

- **R. Prasad, M. Kumar, A. Varma (2015).** Role of PGPR in Soil Fertility and Plant Health, Amity Institute of Microbial Technology, Amity University.
- **Reyes, M. E. Q., Rohrbach, K. G., & Paull, R. E. (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest biology and technology*, 33(2), 193-203.
- **Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009).** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion
- **Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009).** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1), 305-339.
- **Rogers, J. R., Bennett, P. C., & Choi, W. J. (1998).** Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *American Mineralogist*, 83(11-12_Part_2), 1532-1540.
- **Ruback GH, Guggenberger G, Zech W, Christensen BT (1999)** Organic phosphorus in soil size separates characterized by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance and resin extraction. *Soil Sci Am J* 63:1123–1132.
- **Saini P, Khanna V, Gangwar M (2015)** Mechanisms of plant growth promotion by rhizobacteria. *J Pure Appl Microbiol* 9:1163–1177.
- **Saravanan, V. S., Subramanian, S. and Anthoni Raj, S. (2003).** Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 121–125.
- **Sauvêtre, A., & Schröder, P. (2015).** Uptake of carbamazepine by rhizomes and endophytic bacteria of *Phragmites australis*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 83.
- **Shao, Y., Gan, Z., Epifanovsky, E., Gilbert, A. T., Wormit, M., Kussmann, J et Ghosh, D. (2015).** Advances in molecular quantum chemistry contained in the Q-Chem 4 program package. *Molecular Physics*, 113(2), 184-215.
- **Sharma K, Dak G, Agrawal A, Bhatnagar M, Sharma R (2007)** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seeds and seedling growth. *J Herbal Med Tox* 1:61–63.
- **Sharpley, A. N., J. J. Meisinger, J. F. Power, and D. L. Suarez. (1992).** Root extraction of nutrients associated with long-term soil management. *Adv. Soil Sci.* 19:151–217.

- **Shilev (2013)** Soil rhizobacteria regulating the uptake of nutrients and undesirable elements by plants. In: Arora NK (ed) Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances. Springer, New Delhi, pp 147–150.
- **Sims JT, Pierzynski GM (2005)** Chemistry of phosphorus in soil. In: Tabatabai AM, Sparks DL (eds) Chemical processes in soil, SSSA book series 8. SSSA, Madison, pp 151–192. *soil*, 255(2), 571-586.
- **Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997)**, Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int J Syst Bacteriol* 47, 479-491.
- **Stevenson EJ (1986)** Cycles of soil. Wiley, New York.
- **Venkateswarlu B, Rao AV, Raina P, Ahmad N (1984)** Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from arid soil. *J Indian Soc Soil Sci* 32:273–277.
- **Vessey, J. K. (2003)**. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp.
- **Vijayalkshmi, R. Kairunnisa K., Natarajan, S. (2016)**. Phosphate solubilization by rhizosphere Bacteria isolated from Rose garden soils of Satkhol, India, *J. Acad. Ind. Res.* 4(11), 243-245.
- **Webley (D.M.), Henderson (M.E.K.) et Taylor (I.R.)-1963**. *J. Soil Sci.*, 16, 149-157.
- **Weller DM (1988)** Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 26:379–407. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol* 3.
- **Whitelaw MA (2000)** Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv Agron* 69:99–151.
- **Wildermuth, H. & Hopwood, D. A. (1970)**. Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* 60, 51-59.
- **Yang, J., Kloepper, J. W., Ryu, C. M. (2009)**. Rhizosphere bacteria help plantstolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1–4.
- **Yin JL, Cao CR, Shi RH (1989)** Study on the phosphorus fixation of calcareous soils in Xu-Huai districts. *Acta Pedol Sin* 26:131–136. (in Chinese).

- **Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani PA (2009)** Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Khan MS et al (eds) Microbial strategies for crop improvement. Springer, Berlin/Heidelberg, pp 23–50.
- **Zhu, F., Qu, L., Hong, X., and Sun, X. (2011).** Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011.
-



Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

1. Gélose nutritif (GN) :

Peptone	10g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure	3g
NaCl.....	5g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1L
pH=7	

2. Gélose PVK :

Glucose	10g
Ca ₃ (PO ₄) ₂ .H ₂ O.....	5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
KCl.....	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2g
MnSO ₄ .7H ₂ O.....	0.1g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.002g
NaCl.....	0.2g
Extrait de levure	0.1g
Agar.....	20g
Eau distillée	1L
PH=7	

3. Milieu Burk's N-free :

Glucose.....	10g
KH ₂ PO ₄	0.41g
K ₂ HPO ₄	0.52g
Na ₂ SO ₄	0.05g
Cacl ₂	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.1g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.005g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0.0025g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1L
PH=7	

4. Milieu LB :

Trypton.....	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Eau distillée	1L
PH=7	

5. Milieu Mannitol-Mobilité :

Peptone trypasique de viande.....	10g
Mannitol.....	7,5g
Nitrate de potassium.....	1g
Rouge de phénol	0,04g
Agar.....	4g
Eau distillée.....	1L
PH=7,6	

6. Gélose Viande-Foie :

Base viande foie	20g
Glucose.....	2g
Agar.....	6g
Eau distillée.....	1L
PH=7,4	

7. Milieu Bunt and Rovira :

Glucose.....	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
MgSO ₄	0,2g
KClO.....	0,2g
K ₂ HPO ₄	0,1g
ZnO.....	1g
ZnCl.....	1g
Eau distillée.....	1L
PH=7	

Annexe 2 : Protocol des techniques de coloration

- **Coloration classique des spores bactériennes**

Réaliser un frottis de la culture bactérienne à étudier, puis

- Le recouvrir d'une solution aqueuse de vert malachite à 0,5%, chauffer pendant quelques minutes, sur une platine chauffante, jusqu'à émission de vapeur, rajouter du colorant pendant le chauffage si nécessaire, sans jamais laisser évaporer complètement le colorant.
- Laver à l'eau distillée.
- Colorer avec de la safranine pendant 30 secondes.

Les cellules végétatives apparaissent colorées en rouge, les spores en vert dans leur sporange rouge et les spores libres colorées en vert.

- **Coloration de Gram**

- Préparer un frottis d'un produit pathologique ou d'une culture bactérienne pure.
- Recouvrir le frottis de violet cristal oxalate, laisser agir 1 minute, rincer à l'eau distillée.
- Verser le Lugol et le laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée.
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes (selon les auteurs), rincer à l'eau distillée.
- Recolorer avec de la safranine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distille.
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen.

Annexe 3 : Les réactifs et solutions

- **Réactif de Solkowski**

50 ml d'acide perchlorique à 35% + 1ml de FeCl_3 0,5M

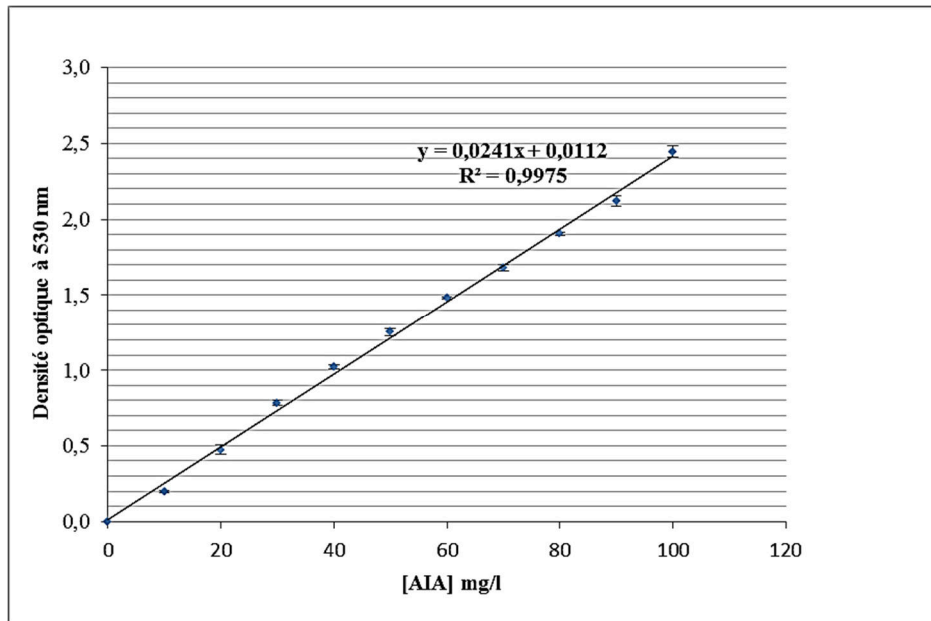
- **Solution d'acide picrique**

-Carbonate de sodium à 2% dans une solution d'acide picrique à 0,5%

-2g de carbonate de sodium + 2g d'acide picrique dans 100ml d'eau distillée.

Annexe 4 : Courbes d'étalonnages (HAMOUM, 2017)

- Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA



Annexe 5 : tableaux des analyses statistiques (STATBOX 6.4)

Tableau 1 : L'analyse de la variance de la production de l'Acide Indole Acétique (AIA).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	194,368	41	4,741				
VAR.FACTEUR 1	194,342	13	14,949	15995,45	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0,026	28	0,001			0,031	0,33%

Tableau 2 : L'analyse de la variance de la solubilisation du phosphate.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	265001,6	41	6463,454				
VAR.FACTEUR 1	264733,6	13	20364,13	2127,595	0		
VAR.RESIDUELLE 1	268	28	9,571			3,094	1,34%

Tableau 3 : L'analyse de la variance de la solubilisation du zinc.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1365572	41	33306,63				
VAR.FACTEUR 1	1365413	13	105031,8	18539,89	0		
VAR.RESIDUELLE 1	158,625	28	5,665			2,38	1,11%