



UNIVERSITÉ  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

UNIVERSITÉ  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem  
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie  
Département de Biologie

Mémoire  
Présenté pour l'obtention du diplôme de  
MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Microbiologie Appliquée  
Par  
**BENABBOU Fella**  
&  
**DEBBAH Kaoutar Halima**

Thème :

*Caractérisation du potentiel antagoniste de la flore Bacillus  
rhizosphérique vis - à vis des phytopathogènes*

Soutenue le 25/06/2023 devant le jury composé de :

Président	Mr BOUZNEB Ahcene	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur	Mr HAMOUM Hakim	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	Mr ARABI Abed	MCB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023



## *Remerciement*

Nos remerciements S'adressent tout d'abord à **Allah**, le tout puissant qui nous a tracé le chemin de notre vie et accordé la volonté, la santé et la patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude envers nos parents pour leur soutien et leur amour, qui nous ont donné la motivation nécessaire pour suivre nos études.

Nous remercions très chaleureusement notre encadrant : **Mr HAMOUM Hakim**, qui nous a tenu compagnie, soutenu et prêté sa main tout au long de notre recherche et nous a accordé son expérience et son temps afin de superviser, corriger et finaliser ce travail .

Nous exprimons un respectueux remerciement aux membres du jury, **Mr BOUZNAD A et Mr ARABI A**, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger et d'examiner notre travail.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale (LMBV) de l'Université de Mostaganem. Nous tenons à remercier chaleureusement **Mme Amina et Mme Hafida** ainsi que tous les membres du laboratoire, les enseignants (**Mr MEJAHED, Mr DJIBAOUI, Mr Mekhaldi, Mr Ait saada**), les doctorants et le personnel de soutien pour leur contribution.

Enfin, nous souhaitons exprimer nos remerciements du fond du cœur à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

# *Dédicaces*





## *Dédicaces*



Je souhaite dédier ce travail à ma famille qui m'a offert une éducation, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

À mon très chère grand -père maternelle décédé

A la mémoire, je souhaite dédier ma réussite d'aujourd'hui à la personne qui a toujours été à mes côtés pour m'aider à réussir mes études. Tu as été présent dans mon esprit et dans mon cœur tout au long de ta vie et je te remercie de tout mon cœur. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son vaste paradis.

À ma très chère grand- mère maternelle

Je dédie ce modeste travail en tant qu'expression des vœux que tu as toujours formulés dans tes prières. Tu as été constamment à mes côtés et m'as soutenu tout au long de mes années d'études et je suis reconnaissant (e) de ton amour et de ton soutien. Aujourd'hui, je te dédie ma réussite. Que Dieu te préserve en bonne santé et te donne une longue vie.

À mes très chers grands –parents paternelle décédés

En souvenir de mes grands-parents qui ont toujours été présents dans mon esprit et dans mon cœur, je dédie ma réussite d'aujourd'hui à vous. Que Dieu vous accueille dans son vaste paradis;

À mon cher père

Pour l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour toi, ainsi que pour l'effort que tu as suscité en moi, je te dédie ma réussite d'aujourd'hui. Que ce travail témoigne de mon profonde affection et de ma sincère estime. Que Dieu te préserve en bonne santé et te donne une longue vie.

À mes chères mères

Je ne saurais jamais assez-vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vos affections me couvrent, vos bienveillances me guident et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour surmonter les obstacles. Je suis reconnaissant(e) pour l'amour, le respect et l'encouragement que vous m'avez toujours témoignés tout au long de mon parcours d'études afin de réaliser mes objectifs. Aujourd'hui, je vous dédie ma réussite. Que Dieu vous préserve en bonne santé et vous accorde une longue vie.

À mes chers oncles et ma chère tante décédés

Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de mes oncles et ma tante qui ont toujours été des sources d'encouragement pour moi dans mes études tout au long de leur vie. Vous avez été constamment présents dans mon esprit et dans mon cœur et je vous

remercie pour cela. Aujourd'hui, je vous dédie ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son vaste paradis.

À mes chers oncles et mes chères tantes

Je vous remercie de m'avoir accueilli(e) parmi vous pendant toutes ces années. Je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Que Dieu, le tout-puissant, vous préserve, vous accorde une bonne santé et vous protège de tout mal.

À mon chère frère

Pour toute l'ambiance chaleureuse et spontanée dont tu m'as entouré, je te dédie ce travail. Que Dieu, le tout-puissant, réalise tous tes vœux et te préserve, t'accorde une bonne santé, le bonheur et te protège de tout mal.

À ma très chère sœur de cœur, ma poupée d'amour

Ton encouragement et ton soutien ont été ma bouffée d'oxygène dans les moments difficiles. Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, ton amour dévoué et ta tendresse. Je t'exprime mon estime et mon sincère attachement. Que Dieu, le tout-puissant, te comble de bonheur, de réussite, de santé et de prospérité.

À mes très chers cousins (e) s

En souvenir d'une enfance partagée et des moments agréables, ce travail est un témoignage de mon attachement et de l'amour que je vous porte.

À mes très chères amies

Au nom de l'amitié qui nous unit et de nos souvenirs inoubliables, ainsi qu'en reconnaissance de votre soutien dans les moments difficiles, j'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.

À ma chère amie décédée

Ta mort inattendue et rapide a créé un grand vide parmi tous ceux qui t'ont aimé. A ta mémoire, je célèbre aujourd'hui le succès que tu souhaitais obtenir dans ta vie. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son vaste paradis.

À tous mes autres amies de la promotion

Et à tous ceux qui apprécient le travail bien fait et ne reculent pas devant les obstacles de la vie.



*Debbah Kaoutar .Halima.*

Remerciement	i
Dédicace	ii
Sommaire	iv
Liste des abréviations	vii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	iv
Résumé	x
Abstract	xi
ملخص	xii
<b>Introduction</b>	1
<b>Chapitre I : Revue bibliographique</b>	
I.1 La rhizosphère	04
I.1.1 Définition	04
I.1.2 Compartiments de la rhizosphère	04
I.1.2.1 Rhizoplane	04
I.1.2.2 Endo rhizosphère	04
I.1.2.3 Ectorhizosphere	04
I.2 Rhizodéposition et effet rhizosphérique	05
I.3 Microflore rhizosphérique	06
I.3.1 Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes	06
I.3.1.1 Effets des PGPR sur la croissance végétale	07
I.4 L'activité microbiologique de la rhizosphère	07
I.4.1 Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissances des plantes par PGPR	07
I.5 Les interactions entre les microorganismes rhizosphériques	08
I.5.1 Antagonisme	08
I.5.1.1 Modes d'action des agents antagonistes	09
I.5.1.2.1 Compétition pour la nutrition et l'espace	09
I.5.1.2.2 Hyperparasitisme	09
I.5.2 Commensalisme	09
I.5.3 Mutualisme	09
I.6 Communauté microbienne de la rhizosphère:	10
I.6.1 Le genre <i>Bacillus</i>	10
I.6.2 Classification et phylogénie des <i>Bacillus</i>	10
I.6.3 Taxonomie moderne des <i>Bacillus</i>	11
I.6.4 Principaux caractères des <i>Bacillus</i>	11
I.6.5 Ecologie des <i>Bacillus</i>	11
I.6.6 <i>Bacillus</i> comme agents de biocontrôle	12
I.6.6.1 Résistance aux pathogènes du sol	12
I.7 Les maladies des plantes	13
I.7.1 Définition	13
I.7.1.1 Les maladies non infectieuses	13
I.7.1.2 Les maladies infectieuses	13
I.8 Les relations plante-pathogène	13
I.8.1 La relation non-hôte	13
I.8.2 La relation hôte	13
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>	
II.1 Échantillonnage	15
II.2 Isolement des <i>Bacillus</i> Rhizosphériques	16
II.3 Purification et Conservation des isolats	16

II.4	Identification des isolats	17
II.4.1	Caractérisation morphologique des isolats	17
II.4.2	Caractérisation microscopique des isolats	17
II.4.3	Coloration des endospores	17
II.4.4	Recherche de catalase	17
II.5	Activités PGP	18
II.5.1.1	Microorganismes phytopathogènes	18
II.5.2	Solubilisation des phosphates	18
II.5.3	Production d'acide indole acétique	19
II.6	Activités enzymatiques	19
II.6.1	Cellulases	19
II.6.2	La recherche de l'activité amylolytique	19
II.6.3	La recherche de l'activité pectinolytique	19
	<b>Chapitre III : résultats et discussion</b>	
III	Résultats	22
III.1	Isolement de l'agent antagoniste	22
III.2	Identification des isolats de <i>Bacillus</i>	22
III.2.1	Caractérisation macroscopiques et microscopiques des isolats de <i>Bacillus</i>	22
II.2.2	Recherche de catalase	24
III.3	Test PGP	24
III.3.1	Test d'antagonisme	24
III.3.2	Solubilisation des phosphates	28
III.3.3	Production de l'acide indole acétique (AIA)	28
III.4	Les activités enzymatique	30
III.5	Discussion	32
	<b>Conclusion</b>	37
	Référence bibliographiques	39
	Annexe	

## Liste des abréviations

**AIA** : Acide indole acétique

**DO** : Densité optique

**IS** : Indice de solubilisation

**GN** :Gélose nutritive

**LB** : Luria-Bertani

**PDA** : Potato dextrose agar

**PGP** : Plant Growth Promotion

**PGPR** : Plant growth promoting Rhizobacteria

**PVK** : Pikovskaya

**rpm** : rotation par minute

**µg** : Microgramme

**CMC**: Carboxyméthylcellulose

## Liste des abréviations

**AIA** : Acide indole acétique

**DO** :Densité optique

**IS** : Indice de solubilisation

**GN** :Gélose nutritive

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**LB** : Luria-Bertani

**mg** : milligramme

**ml** : millilitre

**PDA** : Potato dextrose agar

**PGP** : Plant Growth Promotion

**PGPR** : Plant growthpromotingRhizobacteria

**PVK** : Pikovskaya

**rpm** : rotation par minute

**µg** : Microgramme

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Produits commerciaux de biocontrôle à base de <i>Bacillus</i> .....	11
<b>Tableau 2</b> : Les coordonnées cartographiques des échantillons.....	16
<b>Tableau 3</b> : Aspect microscopique et macroscopique des isolats.....	23
<b>Tableau 4</b> : Activité antagoniste des isolats.....	26
<b>Tableau 5</b> : Récapitulatif des tests des isolats.....	31

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation des trois zones de la rhizosphère .....	05
<b>Figure 2</b> : Diversité biologique du sol .....	06
<b>Figure 3</b> : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR .....	08
<b>Figure 4</b> : Prélèvement des échantillons .....	15
<b>Figure 5</b> : Aspect macroscopique des isolats .....	22
<b>Figure 6</b> : Aspect microscopique des isolats.....	23
<b>Figure 7</b> : Activité antagoniste des isolats.....	25
<b>Figure 8</b> : Test d'antagonisme .....	27
<b>Figure 9</b> : Solubilisation de phosphate de l'isolat.....	27
<b>Figure 10</b> : Solubilisation du phosphate par les isolats.....	28
<b>Figure 11</b> : Production d'AIA par les isolats.....	29
<b>Figure 12</b> : Taux de production d'AIA par les isolats.....	29
<b>Figure 13</b> : Les activités enzymatiques .....	30
<b>Figure 14</b> : Taux des activités enzymatiques .....	31

# Résumé

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) représentent une partie des rhizobactéries qui ont la capacité de favoriser la croissance des plantes et peuvent améliorer la performance et la tolérance des plantes lors des stress environnementaux. Dans ce travail, nous avons étudié le potentiel des bactéries rhizosphérique de la flore *Bacillus* sur quelques phytopathogènes. Un ensemble de 33 isolats de *Bacillus* ont été isolées à partir des rhizosphères de huit 8 échantillons, cultivés à Ain safsaf et Achaacha dans la wilaya de Mostaganem. Après avoir isoler les rhizobactéries, ils ont été testés pour évaluer leur activité antagoniste vis-à-vis des phytopathogènes et quelques activités PGP. L'analyse des résultats obtenus a montré que sept isolats bactériens (LD2, LB1, LC1, LA4b, LA5, LB7 et LD1), ont une activité antifongique contre certain phytopathogènes. Deux isolats ont formé un halo transparent autour des colonies, signifiant la solubilisation de phosphate sur le milieu PVK avec des indices de solubilisation de 2.25 et 2.14 respectivement. Parmi les isolats bactériens testés seize 16 isolats ont produit l'acide indole acétique (AIA) avec des concentrations varient entre 7.87ug/ml et 54.76ug/ml, Douze isolats ont été capable d'hydrolyser la cellulose, vingt-deux isolats ont été positif pour la production d'amylase, aucun isolat n'a été capable de produire de la pectinase. Les résultats obtenus prédisent la possibilité d'utilisation de ces isolats pour diminuer l'impact des phytopathogènes.

**Mot clé** : PGPR, *Bacillus*, phytopathogène, Antagonisme, Solubilisation de phosphate, AIA.

# Abstract

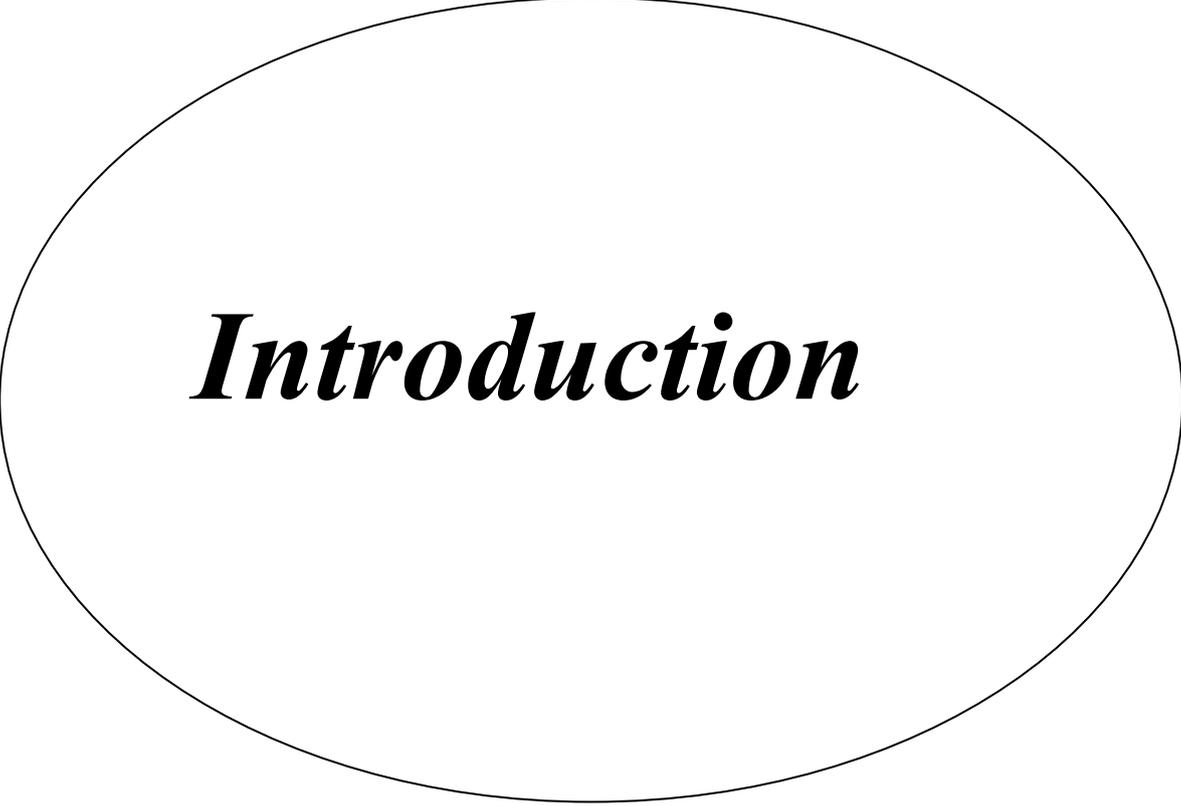
Plant growth-promoting bacteria (PGPR) represent a part of rhizobacteria that have the capacity to promote plant growth and can improve plant performance and tolerance to environmental stresses. In this work, we studied the potential of rhizospheric bacteria of the *Bacillus* flora on some phytopathogens. A total of 33 *Bacillus* isolates were isolated from the rhizospheres of eight 8 samples grown at Ain Safsaf and Achaachad in the wilaya of Mostaganem. After isolating the rhizobacteria, they were tested to assess their antagonistic activity against phytopathogens and some PGP activities. Analysis of the results showed that seven bacterial isolates (LD2, LB1, LC1, LA4b, LA5, LB7 and LD1) had antifungal activity against some phytopathogens. Two isolates formed a transparent halo around the colonies, indicating phosphate solubilization on PVK medium with solubilization indices of 2.25 and 2.14 respectively. Among the bacterial isolates tested, 16 isolates produced indole acetic acid (IAA) at concentrations ranging from 7.87ug/ml to 54.76ug/ml, 12 isolates were able to hydrolyze cellulose, 22 isolates were positive for amylase production, and no isolate was able to produce the pectinase. The results obtained suggest that these isolates could be used to reduce the impact of plant pathogens.

**Key word :** PGPR, *Bacillus*, phytopathogen, Antagonism, Phosphate solubilization, AIA.

## ملخص

تمثل البكتيريا المعززة لنمو النبات (PGPR) جزءا من البكتيريا الجذرية التي لديها القدرة على تعزيز نمو النبات ويمكن أن تحسن أداءه وتحمله للضغوط البيئية. في هذا العمل ، درسنا إمكانات بكتيريا الريزوسفير العسوية على بعض مسببات الأمراض النباتية. تم عزل ما مجموعه 33 عزلة من العصيات من مناطق الجذور لثمانى 8 عينات نمت في عين الصفصاف وعشعاشة بولاية مستغانم. بعد عزل البكتيريا ، تم اختبارهم لتقييم نشاطها المضاد ضد مسببات الأمراض النباتية وبعض أنشطة PGP. أظهر تحليل النتائج أن سبع عزلات بكتيرية (LD2، LD1، LB1، LC1، LA4b، LA5، LB7) كان لها نشاط مضاد للفطريات ضد بعض مسببات الأمراض النباتية. شكلت عزلتان هالة شفافة حول المستعمرات ، مما يشير إلى ذوبان الفوسفات على وسط PVK مع مؤشرات الذوبان 2.25 و 2.14 على التوالي. من بين العزلات البكتيرية المختبرة ، أنتجت 16 عزلة حمض الأسيتيك الإندول (IAA) بتركيزات تتراوح من 7.87 ميكروغرام / مل إلى 54.76 ميكروغرام / مل ، 12 عزلة كانت قادرة على تحلل السليلوز ، 22 عزلة كانت موجبة لإنتاج الأميلاز ، ولم تكن أي عزلة قادرة على إنتاج البكتيناز. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أنه يمكن استخدام هذه العزلات لتقليل تأثير مسببات الأمراض النباتية.

الكلمات المفتاحية : حمض أندول ، إذابة الفوسفات ، العداء ، الأمراض النباتية, PGPR, Bacillus.



# ***Introduction***

## Introduction

Le sol est considéré comme une ressource naturelle vitale équivalente à l'air et à l'eau qui soutient la croissance des plantes et fournit des habitats aux microorganismes (bactéries et champignons) (Poonam *et al.*, 2022) qui sont essentiels dans ses fonctions clés. Ils sont nécessaires pour la minéralisation de la matière organique et lui confèrent une meilleure structure, ils participent à la dégradation de polluants organiques et à un meilleur état sanitaire dans les sols (Gobat *et al.*, 2010). Depuis plusieurs décennies, certains de ces microorganismes, notamment des bactéries, ont été introduites dans le sol pour améliorer la croissance des plantes (Cooper, 1959 ; Mishustin et Naumova, 1962 ; Brown, 1974 ; Kloepper *et al.*, 1980 ; Schippers *et al.*, 1995). Ces bactéries sont appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1989).

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont des bactéries bénéfiques qui colonisent efficacement la rhizosphère, elles exercent sur les plantes divers effets influençant leur croissance (Orozco Mosqueda *et al.*, 2021 ; Moustaine *et al.*, 2019).

Le nombre d'espèces bactériennes identifiées comme PGPR a augmenté récemment en raison de nombreuses études portant sur une plus large gamme d'espèces végétales sur les progrès réalisés en matière de taxonomie bactérienne ainsi que sur les progrès développés dans la compréhension des différents mécanismes d'action de ces rhizobactéries. À l'heure actuelle, les PGPR incluent des taxons bactériens très divers (Ashraf *et al.*, 2008).

La dynamique des populations d'organismes introduits et leurs effets sur la santé des plantes ou sur les populations de phytopathogènes ont souvent été étudiés (Kloepper *et al.*, 1980 ; Okon et Kapulink, 1986, Bull *et al.*, 1991), et il existe des études sur les effets des microorganismes introduits autre que les phytopathogènes (Siciliano et Germida, 1998).

La lutte chimique c'est la seule moyenne utilisée en Algérie pour éliminer les agents phytopathogènes, ils comprennent les pesticides qui sont des substances utilisées pour prévenir, éliminer ou contrôler les ravageurs des cultures maraîchères. Bien qu'ils aient des effets inhibiteurs sur les ravageurs qui nuisent aux plantes et aux animaux, les pesticides peuvent également être toxiques pour les humains et polluer l'environnement (Vieira, 2018). Alors il est nécessaire de trouver d'autres stratégies contre les agents phytopathogènes. En fait, la lutte biologique est un moyen très efficace et plus sécurisé sur la santé humaine. En effet, plusieurs microorganismes ont été étudiés ou utilisés dans des applications de lutte

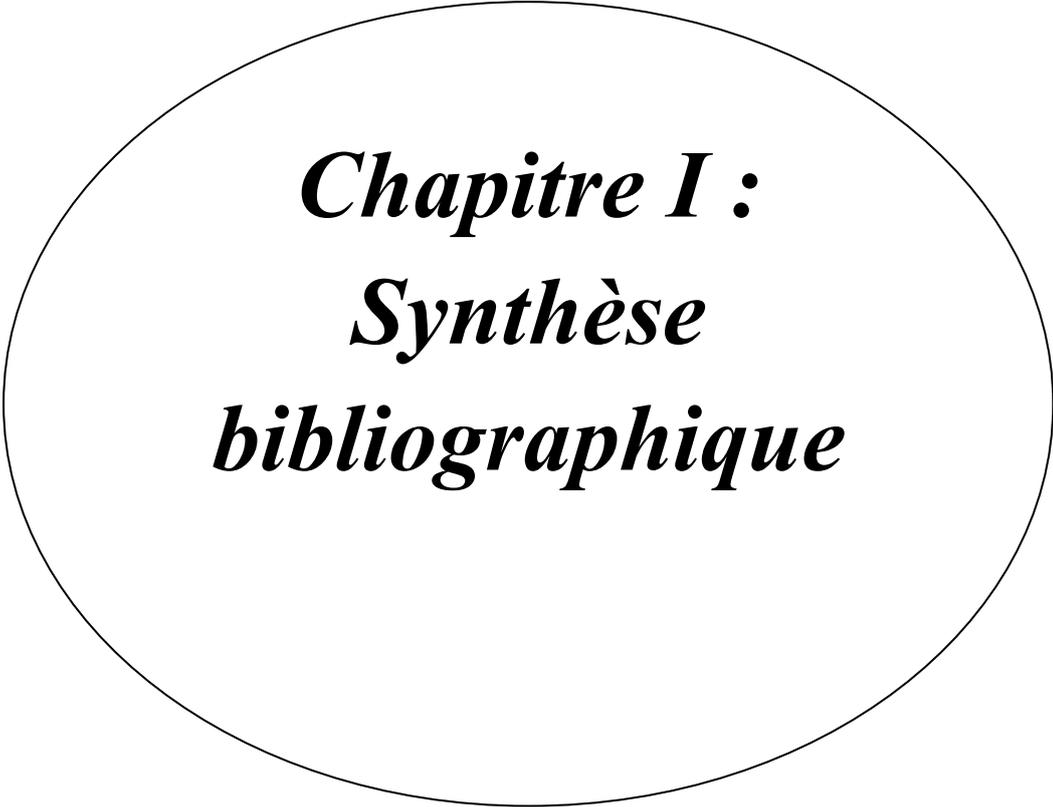
## Introduction

---

biologique. En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité des écosystèmes, la lutte biologique joue également un rôle important dans le contrôle des maladies des plantes (**Elizabeth et al., 1998**). Plus de centaines bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation dans le domaine de biocontrôle. Ces bactéries appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae*, le genre *Bacillus* figure en tête de liste (**Greathead et al., 1994**). Les PGPR utilisées comme biofertilisant et/ou antagoniste contre les phytopathogènes constituent une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides (**Normander et Prosser., 2000**).

La colonisation des racines par les *Bacillus* rhizosphérique implique la chimiotaxie des exsudats racinaires, l'adsorption des microorganismes sur les racines et enfin la compétition pour les substrats nutritifs. Cette seule colonisation peut entraîner l'occupation de sites suffisants pour empêcher la croissance des autres micro-organismes, y compris les agents phytopathogènes (**Jacques., 1993; Ait KAKI., 2013**).

L'objectif du présent travail est d'isoler, identifier et caractériser des isolats de *Bacillus* rhizosphériques dans l'optique d'une évaluation *in vitro* vis-à-vis des agents phytopathogènes.



***Chapitre I :***  
***Synthèse***  
***bibliographique***

## I. Synthèse bibliographique

### I.1. La rhizosphère.

#### I.1.1. Définition

En 1904, Lorenz Hiltner, bactériologiste du sol et professeur d'agronomie à Munich, a utilisé le terme « rhizosphère » pour la première fois afin de décrire spécifiquement l'interaction entre les bactéries et les racines des légumineuses. Depuis lors, la définition de la rhizosphère s'est affinée et correspond désormais à la zone du sol où la microflore tellurique est exposée aux influences des racines. (Fig.1) (Campbell et Greaves., 1990; Westover *et al.*, 1997).

#### I.1.2. Compartiments de la rhizosphère

##### I.1.2.1. Rhizoplane

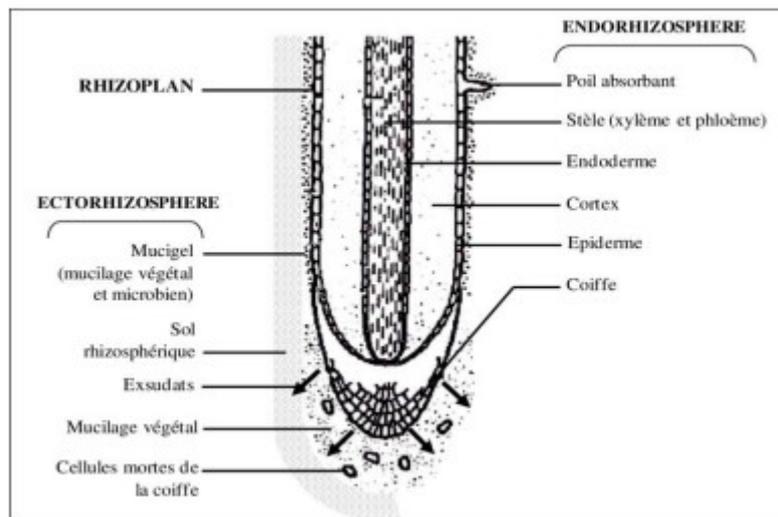
Le rhizoplane, ou surface des racines, fait référence à la zone spécifique des racines des plantes où la microflore est extraite par une agitation vigoureuse des racines (Brahim., 1998). C'est une partie distincte de la rhizosphère qui correspond à la surface externe des racines.

##### I.1.2.2. Endorhizosphère

Il existe des bactéries qui vivent au contact direct avec les racines des plantes, voire qui pénètrent dans les tissus externes (rhizodermiques) et internes (corticaux) des racines, sans être des parasites ou prédatrices. Cela met en évidence le fait que l'interface entre la racine et la microflore s'étend à l'intérieur de la racine elle-même (Schroder et Hartmann., 2003).

##### I.1.2.3. Ectorhizosphère

Représente la zone extérieure qui se trouve directement après rhizoplane (Schroder et Hartmann., 2003).



**Figure. 1** : Représentation des trois zones de la rhizosphère (Lynch., 1983).

## I.2. Rhizodéposition et effet rhizosphérique

Le sol près des racines diffère du sol global. A ce niveau, les conditions physico-chimiques et biologiques sont modifiées par les racines, un effet qui s'explique par l'absorption et l'excrétion des éléments minéraux et par les composés organiques. C'est la rhizodéposition (Gregory et Hinsinger., 1999). La rhizodéposition a été initialement définie par (Whipps et Lynch.,1985) comme étant toute matière émise par les racines des plantes. Les rhizodépôts composent principalement de composés carbonés et azotés sécrétés par les plantes, y compris des produits de la photosynthétique. Un flux important de carbone libéré est utilisé par les microorganismes hétérotrophes du sol comme source d'énergie et de nutriments, favorisant leur croissance.

L'exsudation se réfère à comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire ( Lesuffleur.,2007). Dans la rhizosphère, les racines libèrent une grande quantité de matières organiques sous forme de mucilage .En fait, plus de 40% des produits de photosynthèse sont transférés vers le système racinaire (Whipps.,1990).

Les microorganismes stimulés peuvent avoir un impact direct sur les plantes en fournissant des phytohormones (Lebuhn *et al.*, 1997), des vitamines ou des molécules organiques absorbables par les racines. De plus, ils peuvent également agir indirectement en améliorant la nutrition minérale des plantes en solubilisant ou en minéralisant certains éléments (Brahim.,1998).

### I.3. Microflore rhizosphérique

Le sol est un écosystème dynamique véritable abritant une variété de microflore. Il est composé de cinq éléments principaux : la fraction minérale, la matière organique, l'eau, l'air et les organismes vivants. Environ un milliard de micro-organismes spécifiques tel que les bactéries, les champignons, les algues et les protozoaires peuvent être trouvés dans 1 gramme de sol (**Fig.2**), qu'ils soient libres ou étroitement associés aux racines des plantes. Leur capacité à coloniser la rhizosphère est influencée par les facteurs physico-chimiques du sol et la disponibilité des nutriments (**Lugtenberg et al., 2013**).

La rhizosphère est une zone qui abrite de nombreux types de bactéries, les quelles notamment les PGPR (bactéries promoteurs de la croissance des plantes), telles que les genres *bacillus* et *pseudomonas* (**Malek.,2015**), ainsi que certains champignons tel que *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et le genre *Trichoderma*, qui est particulièrement important. Ces microorganismes établir une association symbiotique avec les racines des plantes, ce qui permet à la plante de bénéficier de divers éléments nutritifs tels que le phosphore.



**Figure. 2 :** Diversité biologique du sol (**Gobat et al., 2010**)

#### I.3.1. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) regroupent les bactéries capables de coloniser la rhizosphère, la zone autour des racines des plantes. Ces bactéries exercent des effets bénéfiques sur la croissance et le développement des plantes de différentes manières, en fonction de leur position stratégique à l'interface sol-racine (**Orozco et al., 2021**). Plusieurs genres bactériens ont été identifiés comme PGPR tel que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*.

### **I.3.1.1.Effets des PGPR sur la croissance végétale**

Depuis les dernières décennies, la réponse des cultures végétales à l'inoculation par des PGPR est étudiée dans de nombreuses expériences menées à travers le monde dans les champs et sous serres. Sur la base des données obtenues, il est évident que l'inoculation a entraîné des augmentations significatives des rendements de différentes cultures, sous différentes conditions. Elles peuvent affecter la croissance et le rendement d'une large gamme de cultures telles que les céréales ou les légumes. Les traitements avec les PGPR augmentent le pourcentage de germination, la vigueur des plantules, l'émergence, le développement des racines et des tiges, la biomasse totale des plantes, le poids des semences, la floraison précoce et les rendements de fruits et des graines (Van *et al.*, 1998; Rama *et al.*, 2001).

## **I.4. L'activité microbiologique de la rhizosphère**

La microflore du sol un ensemble varié de microorganismes tels que les bactéries, les champignons, etc. Ces microorganismes peuvent jouer un rôle essentiel dans la stimulation de croissance des plantes en fournissent des éléments nutritifs et en protégeant les plantes contre les pathogènes environnants (Amarger., 2002). Il est important de noter que ces interactions dépendent de la présence de racines vivantes ou de la disponibilité de matière végétal morte disponible (Barea *et al.*, 2005). Les microorganismes du sol jouent un rôle clé dans le cycle des nutriments et contribuent au maintien de la santé et de la qualité du sol (Jeffries *et al.*, 2003). Ils sont impliqués dans les activités fondamentales qui assurent la stabilité et la productivité du système agricole ainsi que des écosystèmes naturel (Barea *et al.*, 2005).

### **I.4.1 Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissances des plantes par PGPR**

Les PGPR interviennent sur la croissance des plantes selon plusieurs mécanismes, de manière direct ou indirect, qui peuvent se produire simultanément ou séquentiellement (Fig.3) (Beauchamp., 2021).

Les PGPR, exercent un impact positif direct sur la croissance des plantes en améliorant l'assimilation des nutriments du sol, en produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance chez les plantes. Elles ont également un effet indirect en agissant de manière antagoniste envers les microorganismes néfastes, en détoxifiant les métabolites toxiques et en favorisant la nodulation des légumineuses par les

Rhizobia. L'établissement d'une association solide entre les PGPR et les plantes est crucial pour l'expression de ces effets bénéfiques. Les rhizobactéries sont des bactéries capables de coloniser intensément les racines. Parmi les genres et espèces les plus étudiés, on trouve *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp. Fluorescents (Hallmann *et al.*, 1997).

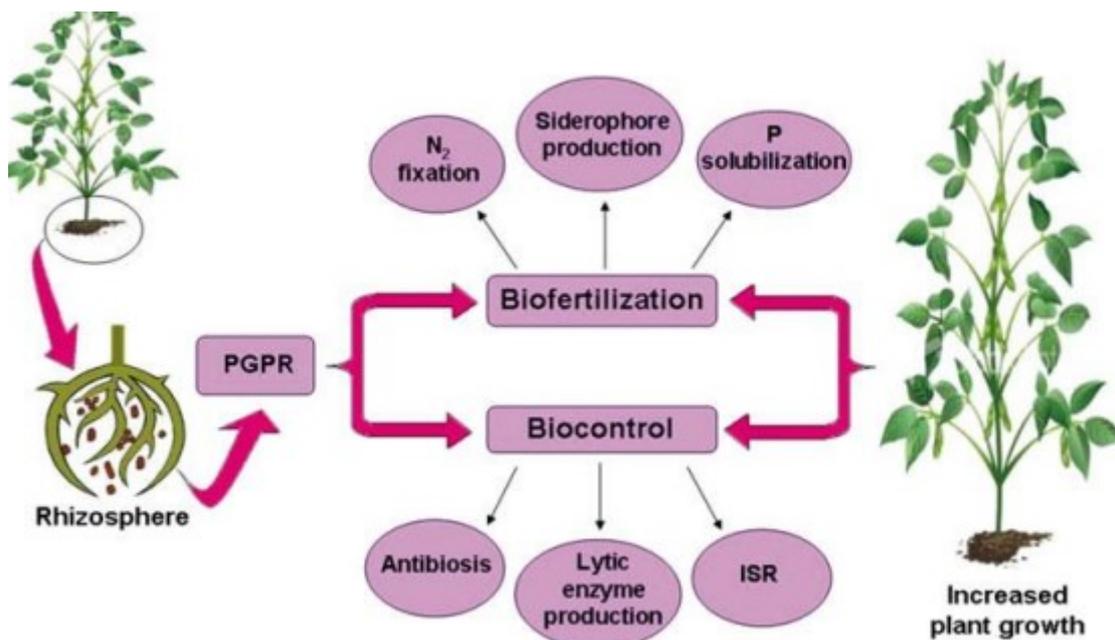


Figure. 3 : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Khan *et al.*, 2009).

## I.5. Les interactions entre les microorganismes rhizosphériques

Au niveau de la rhizosphère, une zone riche en matière organique où les populations microbiennes sont abondantes, les interactions entre les microorganismes sont nombreuses et intenses. Ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au détriment d'autres au sein de la communauté microbienne (Curl et Truelove., 1986). Les interactions se manifestent de différentes manières :

### I.5.1. Antagonisme

L'antagonisme désigne l'inhibition ou l'action défavorable d'un organisme envers un autre au sein d'une population microbienne mixte. Il peut se manifester par la compétition pour les ressources, l'hyperparasitisme, la production de sidérophores (molécules chélation du fer) ou par une antibiose (Curl et Truelove., 1986).

### **I.5.1.1. Modes d'action des agents antagonistes**

Les microorganismes de lutte biologique peuvent exercer leur protection en utilisant un ou plusieurs d'action tels que la compétition pour les ressources nutritifs, l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est essentielle dans le développement de la lutte biologique (Jijakli., 2003).

#### **I.5.1.2.1 Compétition pour la nutrition et l'espace**

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. Les exsudats racinaires sélectivement favorisent les souches à croissance rapide, ce qui peut influencer la compétition de la microflore dans la rhizosphère. Par exemple, la fréquence élevée des *Fusarium* dans la rhizosphère peut être attribuée à son pouvoir compétitif (Dommergues et Mangenot., 1970).

#### **I.5.1.2.2. Hyperparasitisme**

Certains microorganismes peuvent attaquer directement d'autres microorganismes dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui abrite une grande variété de populations microbiennes, offre un milieu propice à l'apparition de l'hyperparasitisme (Gagné., 1984).

### **I.5.2. Commensalisme**

Le commensalisme existe au niveau de la rhizosphère principalement par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, le potentiel osmotique, etc....) créés par un micro-organisme, rendant ainsi le climat favorable au développement d'autres microorganismes. De plus, certains organismes peuvent dégrader ou neutraliser des substances toxiques, favorisant ainsi la croissance d'autres microorganismes (Curl et Truelove., 1986).

### **I.5.3. Mutualisme**

Le mutualisme ou symbiose est une association mutuellement avantageuse entre les microorganismes partenaires. Par exemple : de *Proteus vulgaris* qui a besoin de biotine, mais ne peut pas la synthétiser, tandis que *Bacillus polymyxa* synthétise l'acide nicotinique nécessaire à *Proteus vulgaris* et le transforme en biotine (Dommergues et Mangenot., 1970).

## I.6. Communauté microbienne de la rhizosphère :

### I.6.1. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est caractérisé par une grande diversité d'organismes comprenant des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles, qui ont la capacité de former des spores en conditions défavorables en présence d'oxygène (Prescott., 2002). Ces bactéries sont chimiohétérotrophique et comprenant des espèces aérobies, des facultatifs anaérobies et des anaérobies, avec des exigences de croissance variées. Certaines souches sont même thermophiles et peuvent se développer efficacement entre 65°C à 75°C (Talaro et Talaro., 2002). Les *Bacillus* présentent divers activités biochimiques, y compris la fermentation et la respiration. Certaines espèces produisent des enzymes extracellulaires hydrolytiques qui sont capables de décomposer les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides. Ces enzymes sont souvent produites à grande échelle commerciale, par exemple, les enzymes protéolytiques sont utilisées dans des détergents à lessive et les enzymes hydrolytiques de polysaccharides sont utilisées pour la dégradation de l'amidon. De plus, certaines espèces de *Bacillus* sont pathogènes pour les insectes, comme c'est le cas de *Bacillus thuringiensis*, qui est utilisée à grande échelle comme bio-insecticide (Prescott., 2002).

### I.6.2. Classification et phylogénie des *Bacillus*

Les premières classifications du genre *Bacillus* étaient basées sur deux caractéristiques principales : la croissance en aérobie et la production d'endospores. Cependant, ces caractéristiques ont conduit à regrouper plusieurs bactéries ayant des types physiologiques différents et occupant des habitats variés. Par conséquent, l'hétérogénéité physiologique, écologique et génétique rendait difficile la caractérisation du genre *Bacillus* (Todar., 2008). Dans la première édition du Manuel de Bergey de la systématique bactérienne (1986), le pourcentage de G+C des espèces de *Bacillus* connues variait de 32 à 69%, ce qui démontrait une grande diversité génétique au sein de ce genre. De plus, le contenu de G+C pouvait au sein des souches d'une même espèce. Par exemple, le contenu de G+C des souches de *Bacillus megaterium* variait de 36 à 45% (Slepecky et Hemphill., 2006). Dans la deuxième édition, elles ont été séparées en deux classes distinctes au sein du phylum des Firmicutes : les Clostridia et les Bacilli. Les Clostridia comprennent l'ordre des Clostridiales et la famille des Clostridiaceae, qui compte 11 genres, dont *Clostridium*. Les Bacilli comprennent l'ordre des Bacillales et la famille des Bacillaceae. Dans cette famille, on trouve 37 nouveaux genres en plus de *Bacillus*. Ainsi, la hiérarchie taxonomique de *Bacillus* selon le Manuel de Bergey

(2004) est la suivante: Domaine : Bactéries Division : Firmicutes Classe : Bacilli Ordre : Bacillales Famille : Bacillaceae Genre : *Bacillus* (Todar.,2008).

### I.6.3.Taxonomie moderne des *Bacillus*

La classification la plus fréquente est basée sur la morphologie de *Bacillus* :

- *Bacillus* à spore ovale central ou terminale ne déforme pas la cellule mère. parmi ces espèces on trouve : *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoide*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis* (Avril et al., 1992).
- *Bacillus* à spore ovale centrale ou subterminale, déformant la cellule mère, ex : *Bacillus*• *circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Bacillus macerans*, *B. pumilus*, *B. subtilis* (Avril et al., 1992).
- *Bacillus* à spore sphérique terminale ou subterminale déformant la cellule mère, ex : *B.*• *globisporus*, *B. insolitus*, *B. sphaericus* (Avril et al., 1992).

### I.6.4.Principaux caractères des *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes, présentant des extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (0,5x1,2 mm jusqu'à 2,5x10mm).Elles forment des spores et sont chimioorganotrophes, Gram positive ou à Gram variable (la coloration de Gram n'est positive que dans les cultures très jeunes). En général, elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche à l'exception *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*. Les *Bacillus* sont rarement capsulés, sauf *B. anthracis*. Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives. Le genre *Bacillus* présente une extrême variabilité, comprenant des espèces thermophiles, psychrophiles, acidophiles, halophiles, alkalophiles.La plupart de ces espèces ont été isolées à partir du sol, de l'eau et d'aliments contaminés. Toutes les espèces de *Bacillus* ne sont pas pathogènes, à l'exception *B. thuriengiensis* ; *B. cereus* ; *B. anthracis* (Prescott's., 2002).

### I.6.5.Ecologie des *Bacillus*

Dans le sol, les *Bacillus* constituent une part importante de la communauté microbienne, coexistant avec des commensaux tels que les genres *Pseudomonas* et *Actinomyces*. Ils sont présents dans tous les horizons du sol et affichent une diversité de capacités physiologiques qui leur permet de vivre dans une large variété d'habitats, tels que l'eau de mer, les fonds de la mer, les sédiments (Andrea et al., 2008), les marais, les sources d'eau, les aliments, les fourrages, les composts, les volailles, ainsi que des

environnementsextrêmes commeles déserts, les sources chaudes et les sols de l'Arctique.Certaines espèces sont pathogènes pour les mammifères (*B. anthracis*) et les insectes (*B. sphaericus* et *B. thuringiensis*). Le principal habitat du genre *Bacillus* est le sol, en particulier la rhizosphère des plantes c'est -à- dire la zone entourant les racines. Ils font partie de la flore zymogène du sol et sont présents en tant qu'épiphytes ou endophytes dans divers plantes. On les retrouve notamment dans la rhizosphère de cultures telles que le blé, le maïs, le sorgho, la canne à sucre, l'orge, ainsi que les arbres forestiers tels que le pin et le sapin (Holl et Chanway., 1992).

#### I.6.6. *Bacillus* comme agents de biocontrôle

Les biopesticides, à base de bactéries représentent la majorité des biopesticides microbiens (Shoresh *et al.*, 2010). Le genre *Bacillus* est le genre bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus utilisé en agriculture. En effet, le US Food and Drug Administration (USFDA) a confirmé que toutes les espèces qu'englobe le groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogènes à l'homme. En plus, le genre *Bacillus* possède la possibilité de se sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat., 1996; Loloo *et al.*, 2010). Le tableau 1 résume l'ensemble des souches de *Bacillus* commercialisées dans le monde comme biofertilisants et agents de biocontrôle (Schisler *et al.*, 2004).

Tableau.1 : Produits commerciaux de biocontrôle à base de *Bacillus* (Schisler *et al.*, 2004).

Souches bactériennes	Produit Commercial	Cible primaire
<i>B. subtilis</i> QST713	Serenade	Mycètes et bactéries sur les légumes et les fruits
<i>B. licheniformis</i>	Ecoguard	Mycètes sur le gazon
<i>B. subtilis</i> GB03	Kodiak	Mycètes sur des haricots, coton et de soja
<i>B. pumilis</i> GB34	Yield shield	Mycètes sur de soja
<i>B. amyloliquefasciens</i>	Bioyield	Mycètes sur les plantes annuelle
<i>B. subtilis</i> MB1600	Subtilex	Mycètes sur le coton et le soja
<i>B. subtilis</i> MB 1600	Hi stick	Mycètes sur le soja

##### I.6.6.1. Résistance aux pathogènes du sol

Lorsque les PGPR s'atténuent ou préviennent les effets délétères d'un ou plusieurs organismes phytopathogènes, la croissance des plantes se produit. Cela peut se faire en synthétisant des substances antagonistes ou en induisant une résistance aux agents pathogènes (Beneduzi *et al.*, 2012).

## **I.7. Les maladies des plantes**

### **I.7.1. Définition**

Une maladie des plantes peut être définie par une succession de réponses invisibles et/ou visibles à un microorganisme phytopathogène ou à la modification d'un facteur environnemental (température, pH, humidité et disponibilité d'oxygène), qui provoque des bouleversements de forme, de fonction ou de l'intégrité de la plante. Il existe de ce fait deux types de maladies des plantes : des maladies non infectieuses (abiotiques) et des maladies infectieuses (biotiques) causées par les champignons, bactéries, des virus, nématodes et des protozoaires (**Sarah et al., 2008**).

### **I.7.2. Les maladies non infectieuses**

Les maladies non infectieuses résultent d'une inadéquation de conditions environnementales, qui ne sont pas favorables pour la plants, ils peuvent s'agir de problèmes liés en carence des condition minérales du sol (azote, potassium, magnésium, fer...), inondation des sols, trop de soleil, exposition ou polluants atmosphérique (ozone, dioxyde de soufre), l'exposition accidentelle aux herbicides (**Knudsen., 2013**).

### **I.7.3. Les maladies infectieuses**

Les bactéries et les virus peuvent entrer dans les plantes par les blessures ou les ouvertures naturelles, ou par vecteur, mais jamais directement (**Knudsen., 2013**).

### **I.7.4 Les relations plante-pathogène**

D'une manière générale, les plantes mettent en œuvre des mécanismes très efficaces qui contrôlent leurs rapports avec les agents potentiellement pathogènes. A cet égard, il est classique de distinguer deux grands types de relations (**Lepoivre., 2003**).

#### **I.7.4.1. La relation non-hôte**

Les plantes sont des « non-hôte » vis-à-vis de la plupart des microorganismes de leur environnement. Elles ne sont attaquées que par un nombre restreint de microorganismes (**Rocher.,2004**).

#### **I.7.4.2. La relation hôte**

L'évolution d'une maladie fongique ainsi que ses symptômes sont étroitement liées aux relations qui s'établissent entre la plante et son parasite. Si le champignon ne réveille pas les mécanismes de défense de la plante, il s'y installe pour s'y développer, la plante est alors dite sensible. Au contraire, certaines plantes, dites résistantes, répondent rapidement à la tentative d'invasion et sont épargnées. Cette propriété est largement utilisée pour sélectionner des variétés résistantes (**Mazoyer., 2002**).

## I. Synthèse bibliographique

### I.1. La rhizosphère.

#### I.1.1. Définition

En 1904, Lorenz Hiltner, bactériologiste du sol et professeur d'agronomie à Munich, a utilisé le terme « rhizosphère » pour la première fois afin de décrire spécifiquement l'interaction entre les bactéries et les racines des légumineuses. Depuis lors, la définition de la rhizosphère s'est affinée et correspond désormais à la zone du sol où la microflore tellurique est exposée aux influences des racines. (Fig.1) (Campbell et Greaves., 1990; Westover *et al.*, 1997).

#### I.1.2. Compartiments de la rhizosphère

##### I.1.2.1. Rhizoplane

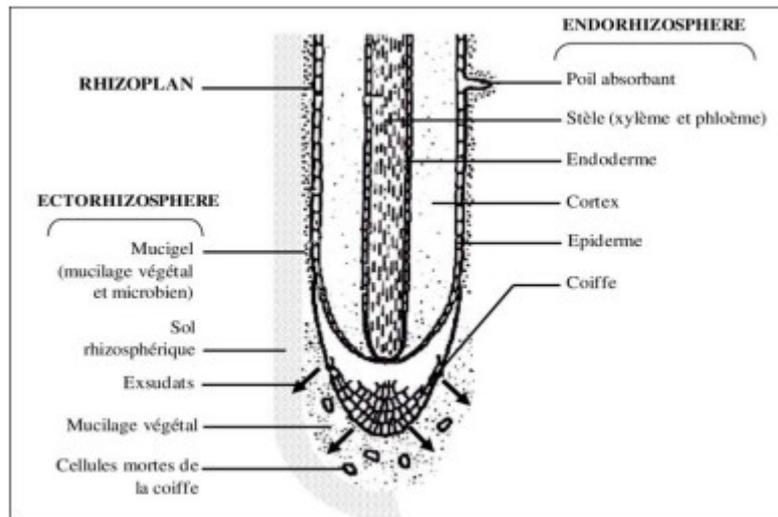
Le rhizoplane, ou surface des racines, fait référence à la zone spécifique des racines des plantes où la microflore est extraite par une agitation vigoureuse des racines (Brahim., 1998). C'est une partie distincte de la rhizosphère qui correspond à la surface externe des racines.

##### I.1.2.2. Endorhizosphère

Il existe des bactéries qui vivent au contact direct avec les racines des plantes, voire qui pénètrent dans les tissus externes (rhizodermiques) et internes (corticaux) des racines, sans être des parasites ou prédatrices. Cela met en évidence le fait que l'interface entre la racine et la microflore s'étend à l'intérieur de la racine elle-même (Schroder et Hartmann., 2003).

##### I.1.2.3. Ectorhizosphère

Représente la zone extérieure qui se trouve directement après rhizoplane (Schroder et Hartmann., 2003).



**Figure. 1** : Représentation des trois zones de la rhizosphère (Lynch., 1983).

## I.2. Rhésodéposition et effet rhésosphérique

Le sol près des racines diffère du sol global. A ce niveau, les conditions physico-chimiques et biologiques sont modifiées par les racines, un effet qui s'explique par l'absorption et l'excrétion des éléments minéraux et par les composés organiques. C'est la rhizodéposition (Gregory et Hinsinger., 1999). La rhizodéposition a été initialement définie par (Whipps et Lynch.,1985) comme étant toute matière émise par les racines des plantes. Les rhizodépôts composent principalement de composés carbonés et azotés sécrétés par les plantes, y compris des produits de la photosynthétique. Un flux important de carbone libéré est utilisé par les microorganismes hétérotrophes du sol comme source d'énergie et de nutriments, favorisant leur croissance.

L'exsudation se réfère à comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire ( Lesuffleur.,2007). Dans la rhizosphère, les racines libèrent une grande quantité de matières organiques sous forme de mucilage .En fait, plus de 40% des produits de photosynthèse sont transférés vers le système racinaire (Whipps.,1990).

Les microorganismes stimulés peuvent avoir un impact direct sur les plantes en fournissant des phytohormones (Lebuhn *et al.*, 1997), des vitamines ou des molécules organiques absorbables par les racines. De plus, ils peuvent également agir indirectement en améliorant la nutrition minérale des plantes en solubilisant ou en minéralisant certains éléments (Brahim.,1998).

### I.3. Microflore rhizosphérique

Le sol est un écosystème dynamique véritable abritant une variété de microflore. Il est composé de cinq éléments principaux : la fraction minérale, la matière organique, l'eau, l'air et les organismes vivants. Environ un milliard de micro-organismes spécifiques tel que les bactéries, les champignons, les algues et les protozoaires peuvent être trouvés dans 1 gramme de sol (**Fig.2**), qu'ils soient libres ou étroitement associés aux racines des plantes. Leur capacité à coloniser la rhizosphère est influencée par les facteurs physico-chimiques du sol et la disponibilité des nutriments (**Lugtenberg et al., 2013**).

La rhizosphère est une zone qui abrite de nombreux types de bactéries, les quelles notamment les PGPR (bactéries promoteurs de la croissance des plantes), telles que les genres *bacillus* et *pseudomonas* (**Malek.,2015**), ainsi que certains champignons tel que *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et le genre *Trichoderma*, qui est particulièrement important. Ces microorganismes établir une association symbiotique avec les racines des plantes, ce qui permet à la plante de bénéficier de divers éléments nutritifs tels que le phosphore.



**Figure. 2 :** Diversité biologique du sol (**Gobat et al., 2010**)

#### I.3.1. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) regroupent les bactéries capables de coloniser la rhizosphère, la zone autour des racines des plantes. Ces bactéries exercent des effets bénéfiques sur la croissance et le développement des plantes de différentes manières, en fonction de leur position stratégique à l'interface sol-racine (**Orozco et al., 2021**). Plusieurs genres bactériens ont été identifiés comme PGPR tel que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*.

### **I.3.1.1.Effets des PGPR sur la croissance végétale**

Depuis les dernières décennies, la réponse des cultures végétales à l'inoculation par des PGPR est étudiée dans de nombreuses expériences menées à travers le monde dans les champs et sous serres. Sur la base des données obtenues, il est évident que l'inoculation a entraîné des augmentations significatives des rendements de différentes cultures, sous différentes conditions. Elles peuvent affecter la croissance et le rendement d'une large gamme de cultures telles que les céréales ou les légumes. Les traitements avec les PGPR augmentent le pourcentage de germination, la vigueur des plantules, l'émergence, le développement des racines et des tiges, la biomasse totale des plantes, le poids des semences, la floraison précoce et les rendements de fruits et des graines (**Van et al., 1998; Rama et al., 2001**).

## **I.4. L'activité microbiologique de la rhizosphère**

La microflore du sol un ensemble varié de microorganismes tels que les bactéries, les champignons, etc. Ces microorganismes peuvent jouer un rôle essentiel dans la stimulation de croissance des plantes en fournissent des éléments nutritifs et en protégeant les plantes contre les pathogènes environnants (**Amarger., 2002**). Il est important de noter que ces interactions dépendent de la présence de racines vivantes ou de la disponibilité de matière végétal morte disponible (**Barea et al., 2005**). Les microorganismes du sol jouent un rôle clé dans le cycle des nutriments et contribuent au maintien de la santé et de la qualité du sol (**Jeffries et al., 2003**). Ils sont impliqués dans les activités fondamentales qui assurent la stabilité et la productivité du système agricole ainsi que des écosystèmes naturel (**Barea et al., 2005**).

### **I.4.1 Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissances des plantes par PGPR**

Les PGPR interviennent sur la croissance des plantes selon plusieurs mécanismes, de manière direct ou indirect, qui peuvent se produire simultanément ou séquentiellement (**Fig.3**) (**Beauchamp., 2021**).

Les PGPR, exercent un impact positif direct sur la croissance des plantes en améliorant l'assimilation des nutriments du sol, en produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance chez les plantes. Elles ont également un effet indirect en agissant de manière antagoniste envers les microorganismes néfastes, en détoxifiant les métabolites toxiques et en favorisant la nodulation des légumineuses par les

Rhizobia. L'établissement d'une association solide entre les PGPR et les plantes est crucial pour l'expression de ces effets bénéfiques. Les rhizobactéries sont des bactéries capables de coloniser intensément les racines. Parmi les genres et espèces les plus étudiés, on trouve *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp. Fluorescents (Hallmann *et al.*, 1997).

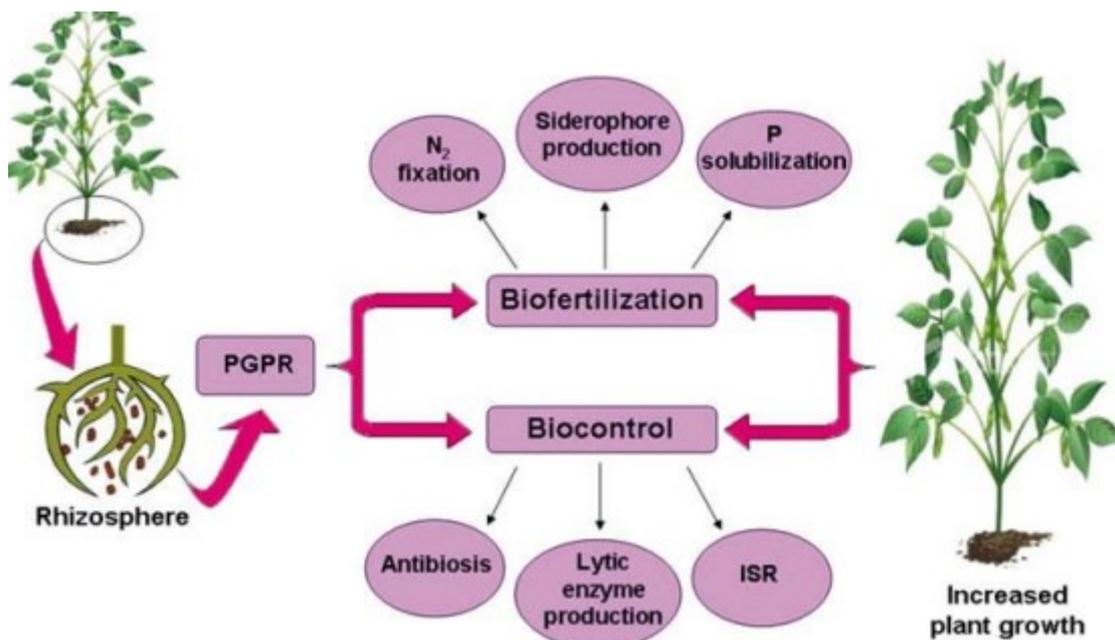


Figure. 3 : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Khan *et al.*, 2009).

## I.5. Les interactions entre les microorganismes rhizosphériques

Au niveau de la rhizosphère, une zone riche en matière organique où les populations microbiennes sont abondantes, les interactions entre les microorganismes sont nombreuses et intenses. Ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au détriment d'autres au sein de la communauté microbienne (Curl et Truelove., 1986). Les interactions se manifestent de différentes manières :

### I.5.1. Antagonisme

L'antagonisme désigne l'inhibition ou l'action défavorable d'un organisme envers un autre au sein d'une population microbienne mixte. Il peut se manifester par la compétition pour les ressources, l'hyperparasitisme, la production de sidérophores (molécules chélation du fer) ou par une antibiose (Curl et Truelove., 1986).

### **I.5.1.1. Modes d'action des agents antagonistes**

Les microorganismes de lutte biologique peuvent exercer leur protection en utilisant un ou plusieurs d'action tels que la compétition pour les ressources nutritifs, l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est essentielle dans le développement de la lutte biologique (Jijakli., 2003).

#### **I.5.1.2.1 Compétition pour la nutrition et l'espace**

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. Les exsudats racinaires sélectivement favorisent les souches à croissance rapide, ce qui peut influencer la compétition de la microflore dans la rhizosphère. Par exemple, la fréquence élevée des *Fusarium* dans la rhizosphère peut être attribuée à son pouvoir compétitif (Dommergues et Mangenot., 1970).

#### **I.5.1.2.2. Hyperparasitisme**

Certains microorganismes peuvent attaquer directement d'autres microorganismes dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui abrite une grande variété de populations microbiennes, offre un milieu propice à l'apparition de l'hyperparasitisme (Gagné., 1984).

### **I.5.2. Commensalisme**

Le commensalisme existe au niveau de la rhizosphère principalement par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, le potentiel osmotique, etc....) créés par un micro-organisme, rendant ainsi le climat favorable au développement d'autres microorganismes. De plus, certains organismes peuvent dégrader ou neutraliser des substances toxiques, favorisant ainsi la croissance d'autres microorganismes (Curl et Truelove., 1986).

### **I.5.3. Mutualisme**

Le mutualisme ou symbiose est une association mutuellement avantageuse entre les microorganismes partenaires. Par exemple : de *Proteus vulgaris* qui a besoin de biotine, mais ne peut pas la synthétiser, tandis que *Bacillus polymyxa* synthétise l'acide nicotinique nécessaire à *Proteus vulgaris* et le transforme en biotine (Dommergues et Mangenot., 1970).

## I.6. Communauté microbienne de la rhizosphère :

### I.6.1. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est caractérisé par une grande diversité d'organismes comprenant des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles, qui ont la capacité de former des spores en conditions défavorables en présence d'oxygène (Prescott., 2002). Ces bactéries sont chimiohétérotrophique et comprenant des espèces aérobies, des facultatifs anaérobies et des anaérobies, avec des exigences de croissance variées. Certaines souches sont même thermophiles et peuvent se développer efficacement entre 65°C à 75°C (Talaro et Talaro., 2002). Les *Bacillus* présentent divers activités biochimiques, y compris la fermentation et la respiration. Certaines espèces produisent des enzymes extracellulaires hydrolytiques qui sont capables de décomposer les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides. Ces enzymes sont souvent produites à grande échelle commerciale, par exemple, les enzymes protéolytiques sont utilisées dans des détergents à lessive et les enzymes hydrolytiques de polysaccharides sont utilisées pour la dégradation de l'amidon. De plus, certaines espèces de *Bacillus* sont pathogènes pour les insectes, comme c'est le cas de *Bacillus thuringiensis*, qui est utilisée à grande échelle comme bio-insecticide (Prescott., 2002).

### I.6.2. Classification et phylogénie des *Bacillus*

Les premières classifications du genre *Bacillus* étaient basées sur deux caractéristiques principales : la croissance en aérobie et la production d'endospores. Cependant, ces caractéristiques ont conduit à regrouper plusieurs bactéries ayant des types physiologiques différents et occupant des habitats variés. Par conséquent, l'hétérogénéité physiologique, écologique et génétique rendait difficile la caractérisation du genre *Bacillus* (Todar., 2008). Dans la première édition du Manuel de Bergey de la systématique bactérienne (1986), le pourcentage de G+C des espèces de *Bacillus* connues variait de 32 à 69%, ce qui démontrait une grande diversité génétique au sein de ce genre. De plus, le contenu de G+C pouvait au sein des souches d'une même espèce. Par exemple, le contenu de G+C des souches de *Bacillus megaterium* variait de 36 à 45% (Slepecky et Hemphill., 2006). Dans la deuxième édition, elles ont été séparées en deux classes distinctes au sein du phylum des Firmicutes : les Clostridia et les Bacilli. Les Clostridia comprennent l'ordre des Clostridiales et la famille des Clostridiaceae, qui compte 11 genres, dont *Clostridium*. Les Bacilli comprennent l'ordre des Bacillales et la famille des Bacillaceae. Dans cette famille, on trouve 37 nouveaux genres en plus de *Bacillus*. Ainsi, la hiérarchie taxonomique de *Bacillus* selon le Manuel de Bergey

(2004) est la suivante: Domaine : Bactéries Division : Firmicutes Classe : Bacilli Ordre : Bacillales Famille : Bacillaceae Genre : *Bacillus* (Todar.,2008).

### I.6.3.Taxonomie moderne des *Bacillus*

La classification la plus fréquente est basée sur la morphologie de *Bacillus* :

- *Bacillus* à spore ovale central ou terminale ne déforme pas la cellule mère. parmi ces espèces on trouve : *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoide*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis* (Avril et al., 1992).
- *Bacillus* à spore ovale centrale ou subterminale, déformant la cellule mère, ex : *Bacillus*• *circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Bacillus macerans*, *B. pumilus*, *B. subtilis* (Avril et al., 1992).
- *Bacillus* à spore sphérique terminale ou subterminale déformant la cellule mère, ex : *B.*• *globisporus*, *B. insolitus*, *B. sphaericus* (Avril et al., 1992).

### I.6.4.Principaux caractères des *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes, présentant des extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (0,5x1,2 mm jusqu'à 2,5x10mm).Elles forment des spores et sont chimioorganotrophes, Gram positive ou à Gram variable (la coloration de Gram n'est positive que dans les cultures très jeunes). En général, elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche à l'exception *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*. Les *Bacillus* sont rarement capsulés, sauf *B. anthracis*. Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives. Le genre *Bacillus* présente une extrême variabilité, comprenant des espèces thermophiles, psychrophiles, acidophiles, halophiles, alkalophiles.La plupart de ces espèces ont été isolées à partir du sol, de l'eau et d'aliments contaminés. Toutes les espèces de *Bacillus* ne sont pas pathogènes, à l'exception *B. thuriengiensis* ; *B. cereus* ; *B. anthracis* (Prescott's., 2002).

### I.6.5.Ecologie des *Bacillus*

Dans le sol, les *Bacillus* constituent une part importante de la communauté microbienne, coexistant avec des commensaux tels que les genres *Pseudomonas* et *Actinomyces*. Ils sont présents dans tous les horizons du sol et affichent une diversité de capacités physiologiques qui leur permet de vivre dans une large variété d'habitats, tels que l'eau de mer, les fonds de la mer, les sédiments (Andrea et al., 2008), les marais, les sources d'eau, les aliments, les fourrages, les composts, les volailles, ainsi que des

environnement extrêmes comme les déserts, les sources chaudes et les sols de l'Arctique. Certaines espèces sont pathogènes pour les mammifères (*B. anthracis*) et les insectes (*B. sphaericus* et *B. thuringiensis*). Le principal habitat du genre *Bacillus* est le sol, en particulier la rhizosphère des plantes c'est-à-dire la zone entourant les racines. Ils font partie de la flore zymogène du sol et sont présents en tant qu'épiphytes ou endophytes dans diverses plantes. On les retrouve notamment dans la rhizosphère de cultures telles que le blé, le maïs, le sorgho, la canne à sucre, l'orge, ainsi que les arbres forestiers tels que le pin et le sapin (Holl et Chanway., 1992).

#### I.6.6. *Bacillus* comme agents de biocontrôle

Les biopesticides, à base de bactéries représentent la majorité des biopesticides microbiens (Shoresh *et al.*, 2010). Le genre *Bacillus* est le genre bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus utilisé en agriculture. En effet, le US Food and Drug Administration (USFDA) a confirmé que toutes les espèces qu'englobe le groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogènes à l'homme. En plus, le genre *Bacillus* possède la possibilité de se sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat., 1996; Loloo *et al.*, 2010). Le tableau 1 résume l'ensemble des souches de *Bacillus* commercialisées dans le monde comme biofertilisants et agents de biocontrôle (Schisler *et al.*, 2004).

Tableau.1 : Produits commerciaux de biocontrôle à base de *Bacillus* (Schisler *et al.*, 2004).

Souches bactériennes	Produit Commercial	Cible primaire
<i>B. subtilis</i> QST713	Serenade	Mycètes et bactéries sur les légumes et les fruits
<i>B. licheniformis</i>	Ecoguard	Mycètes sur le gazon
<i>B. subtilis</i> GB03	Kodiak	Mycètes sur des haricots, coton et de soja
<i>B. pumilis</i> GB34	Yield shield	Mycètes sur de soja
<i>B. amyloliquefasciens</i>	Bioyield	Mycètes sur les plantes annuelle
<i>B. subtilis</i> MB1600	Subtilex	Mycètes sur le coton et le soja
<i>B. subtilis</i> MB 1600	Hi stick	Mycètes sur le soja

##### I.6.6.1. Résistance aux pathogènes du sol

Lorsque les PGPR s'atténuent ou préviennent les effets délétères d'un ou plusieurs organismes phytopathogènes, la croissance des plantes se produit. Cela peut se faire en synthétisant des substances antagonistes ou en induisant une résistance aux agents pathogènes (Beneduzi *et al.*, 2012).

## **I.7. Les maladies des plantes**

### **I.7.1. Définition**

Une maladie des plantes peut être définie par une succession de réponses invisibles et/ou visibles à un microorganisme phytopathogène ou à la modification d'un facteur environnemental (température, pH, humidité et disponibilité d'oxygène), qui provoque des bouleversements de forme, de fonction ou de l'intégrité de la plante. Il existe de ce fait deux types de maladies des plantes : des maladies non infectieuses (abiotiques) et des maladies infectieuses (biotiques) causées par les champignons, bactéries, des virus, nématodes et des protozoaires (**Sarah et al., 2008**).

### **I.7.2. Les maladies non infectieuses**

Les maladies non infectieuses résultent d'une inadéquation de conditions environnementales, qui ne sont pas favorables pour la plants, ils peuvent s'agir de problèmes liés en carence des condition minérales du sol (azote, potassium, magnésium, fer...), inondation des sols, trop de soleil, exposition ou polluants atmosphérique (ozone, dioxyde de soufre), l'exposition accidentelle aux herbicides (**Knudsen., 2013**).

### **I.7.3. Les maladies infectieuses**

Les bactéries et les virus peuvent entrer dans les plantes par les blessures ou les ouvertures naturelles, ou par vecteur, mais jamais directement (**Knudsen., 2013**).

### **I.7.4 Les relations plante-pathogène**

D'une manière générale, les plantes mettent en œuvre des mécanismes très efficaces qui contrôlent leurs rapports avec les agents potentiellement pathogènes. A cet égard, il est classique de distinguer deux grands types de relations (**Lepoivre., 2003**).

#### **I.7.4.1. La relation non-hôte**

Les plantes sont des « non-hôte » vis-à-vis de la plupart des microorganismes de leur environnement. Elles ne sont attaquées que par un nombre restreint de microorganismes (**Rocher.,2004**).

#### **I.7.4.2. La relation hôte**

L'évolution d'une maladie fongique ainsi que ses symptômes sont étroitement liées aux relations qui s'établissent entre la plante et son parasite. Si le champignon ne réveille pas les mécanismes de défense de la plante, il s'y installe pour s'y développer, la plante est alors dite sensible. Au contraire, certaines plantes, dites résistantes, répondent rapidement à la tentative d'invasion et sont épargnées. Cette propriété est largement utilisée pour sélectionner des variétés résistantes (**Mazoyer., 2002**).



***Chapitre II :***  
***Matériel et***  
***méthodes***

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Échantillonnage

Les différents échantillons de sols rhizosphériques ont été prélevés à partir des champs de Pomme de terre, Oignon vert, Petit pois, Salade et Fève durant le mois de Mars (**Fig.4**). Cultivés dans deux zones situées à la wilaya de Mostaganem, situés à Ain Saf Saf et à Achaacha, au nord-ouest de l'Algérie.



**Figure.4** : Prélèvement des échantillons de sol.

Des zones à l'intérieure du champ ont été sélectionnées comme site d'échantillonnage. Les prélèvements des racines ont été réalisés à une profondeur de 15cm placés ensuite dans des sacs en plastique stériles et finalement étiquetés, ensuite transporter au laboratoire pour le reste des tests. Les coordonnées cartographiques de chaque prélèvement sont montrées dans (Tab.2) (Kennedy et Smith., 1995).

**Tableau .2** : Les cordonnées cartographiques des échantillons.

Échantillon	Plante de prélèvement	Cordonnées cartographique
A	Fève	36°14'28.35'' N 0°37'05.93''E
B	Pomme de terre	36°14'28.35'' N 0°37'05.93''E
C	Petit pois	36°14'28.35'' N 0°37'05.93''E
D	Oignon vert	36°04'32.99'' N 0°25'41.73''E,
E	Pomme de terre	36°04'32.99'' N 0°25'41.73''E,
F	Petit pois	36°04'32.99'' N 0°25'41.73''E,
G	Salade	36°04'32.99'' N 0°25'41.73''E,
H	Fève	36°04'32.99'' N 0°25'41.73''E,

## II.2. Isolement des *Bacillus* Rhizosphériques

L'isolement des bactéries a été effectué à partir d'un seul compartiment de la rhizosphère (ectorrhizophère), en utilisant la méthode de (Garge et Nerurkar.,2017).

Les isolats de *Bacillus* ont été isolées à partir de 10g de sol fortement adhérent aux racines qui a été pesés et homogénéisés dans un flacon avec 90 ml d'eau physiologique, bien mélanger avec un vortex, ensuit le mélange a été utiliser pour faire des dilutions décimales( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-6}$ ) ensuite les trois dernières dilutions ont été traitée thermiquement à 80 °C pendant 10min, après des aliquotes de 0,1ml de chaque dilutions traitée ont été utilisé pour ensemenecer en surface des boites de pétri contenant la gélose LB (Annexe 1). L'incubation a été faite à 30°C pendant 48h.

## II.3. Purification et Conservation des isolats

Les différents isolats ont été repiqués plusieurs fois sur gélose nutritif (Annexe 1) jusqu'à avoir des colonies pures, ensuite les différents isolats ont été conservés à 4°C dans des tubes contenant la gélose nutritive incliné (ElKarkouri *et al.*, 2019).

## II.4. Identification des isolats

### II.4.1. Caractérisation morphologique des isolats

L'étude macroscopique des bactéries est la première étude effectuée après l'isolement. Elle nous a permis de différencier les colonies bactériennes de celles des moisissures et de réaliser une première caractérisation à l'œil nu en observant : la forme, la couleur, l'aspect, et la taille des colonies (**Joffin et Leyral., 2006**).

### II.4.2. Caractérisation microscopique des isolats

La coloration de Gram (**Annexe 3**) est essentielle pour l'identification d'une bactérie isolée et la vérification de la pureté de l'isolat (**Singleton.,2005**). C'est une coloration de base en pratique bactériologique, Elle identifie la présence de bactéries, leur forme et leurs caractéristiques "Gram-positif" ou "Gram-négatif".

Cet examen a été fait sur des frottis préparés à partir des colonies de chaque isolat obtenu. Ces frottis ont été observée à l'aide d'un microscope optique à grossissements (x100), Les bactéries Gram-négatives seront colorées en rose et les bactéries Gram-positives seront colorées en violet (**Haichour., 2017**).

### II.4.3. Coloration des endospores

Une endospore est une structure dormante intracellulaire particulière qui protège la bactérie contre des conditions environnementales défavorables. Dans le contexte d'un diagnostic microbiologique où il est important de vérifier leur présence pour identifier la bactérie. Une coloration des spores a été réalisée avec vert du malachite (**Annexe 3**) pour confirmer la présence de spores. La technique décoloration la plus courante pour les endospores est la coloration de Schaeffer- Fulton (**Annexe 3**) (**Tortora et al., 2003**).

### II.4.4. Recherche de catalase

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

C'est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies et anaérobies facultatives contenant un cytochrome, la catalase décompose le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La mise en évidence de la catalase se pratique par l'ajout d'une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une petite quantité de crème bactérienne. Le dégagement d'O<sub>2</sub> sous forme de bulles de gaz signifie que la bactérie a produit de la catalase et ainsi considérée comme catalase positive (**Talaro et Talaro., 2002**).

## II.6. Activités PGP

### II.6.1. Test antagonisme

Les isolats bactériens ont été sélectionnés sur la base de leur activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes. La méthode de double culture dans la gélose dextrose de pomme de terre (PDA) (**Annexe 1**) décrite par (**Oldenburg *et al.*, 1996**) a été suivie, avec des modifications mineures. Brièvement, le disque de phytopathogène (5 mm de diamètre) a été prélevé puis transféré au centre d'une boîte de Pétri (90 mm de diamètre) contenant 15 ml de PDA. Les isolats bactériens ont été inoculés à la périphérie, à 25 mm du disque mycélien. Quatre isolats bactériens ont été ensemencés sur chaque boîte. Les boîtes sans inoculation d'isolats bactériennes ont servi de contrôle. Le temps d'incubation était de 7 jours à 25°C.

Une zone d'inhibition apparente autour de la colonie fongique a été considéré comme résultat positif. Les isolats bactériens sélectionnés sont celles qui présentent les zones d'inhibition les plus apparentes contre les phytopathogènes afin d'évaluer leur taux d'inhibition.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale est calculé selon la formule de **Fokkema (1973) et Sy (1976)** :

$$M(\%) = 100 \times (M_0 - M_1) / M_0$$

Où  $M_0$  est la croissance normale exprimée en mm et  $M_1$  représente la croissance mycélienne influencée (mm).

#### II.6.1.1. Microorganismes phytopathogènes

Dix champignons phytopathogènes ont été utilisés pour le test d'antagonisme, ils ont été fournis par le laboratoire de microbiologie et biologie végétale de l'Université de Mostaganem.

### II.6.2. Solubilisation des phosphates

La capacité des isolats à solubiliser les phosphates a été testée sur gélose Pikovskaya (PVK) (**Annexe.1**), contenant du phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3\text{HPO}_4$ ) comme seule source de phosphate. (**Annex1**) Un volume de 10  $\mu\text{l}$  de culture bactérienne de 24h a été déposé sur la surface de la gélose PVK (**Annexe 1**), comme décrit par (**Gaur., 1990**). Après incubation à 30 °C pendant 7 jours, le diamètre du halo autour de la colonie a été mesuré. L'indice de solubilisation (IS) a été et calculé à l'aide de la formule d' (**Edi-Premono *et al.*, 1996**).

Indice de solubilisation (IS) = (Diamètre de la colonie + Diamètre d'halo) / Diamètre de la colonie.

### II.6.3. Production d'acide indole acétique

La production d'acide indole acétique (IAA) a été testée sur milieu LB supplémenté avec 0.2g/L de tryptophane (**Annexe 1**). Le milieu a été inoculé avec 1ml de culture bactérienne et incubé à 30 °C pendant 4jours sous agitation à 160 rpm. Un test colorimétrique a été réalisé selon la méthode de (**Loper et Scroth., 1986**). Les cultures ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 20 min, 1 ml de surnageant a été mélangé avec 2 mL de réactif de Salkowski (50mL d'acide perchlorique à 35% et 1 mL de FeCl<sub>3</sub> à 0,5 M) (**Annexe 2**), ils ont été incubés pendant 30min à l'obscurité puis la DO a été mesurée à 530nm.

Un courbe d'étalonnage a été utilisé pour calculer les concentrations produites du métabolite (**Annexe.4**).

## II.7. Activités enzymatiques

La capacité enzymatiques des bactéries a été évaluée sur plusieurs source de glucides complexes à savoir : cellulose, amidon et pectine.

### II.7.1. Cellulases

La capacité cellulolytique des bactéries a été évaluée en utilisant le milieu de (**Mandels et Reese., 1957**) contenant du sel CMC (**Annexe 1**). Toutes les boîtes inoculées ont été colorées avec une solution de rouge Congo à 1 % pendant 15 minutes après une incubation à 30 °C pendant 48 heures, et distraites avec du NaCl à 1 M pendant 15 minutes (**Teather et Wood., 1982**). L'apparition des zones de dégradation clair autour des colonies indique un résultat positif pour le test.

### II.7.2. Recherche de l'activité amylolytique

Ce test est réalisé en cultivant les isolats bactériens sur milieu gélose nutritive contenant 1% d'amidon soluble (**Annexe 1**). Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 48h. Après incubation, le milieu gélosé a été recouvert d'une solution de Lugol pendant 30 secondes puis un rinçage à l'eau distillée a été fait. La présence d'une activité amylolytique se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (absence de coloration autour des colonies). A l'inverse, un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun) (**De Vos et al., 2009**).

### II.7. 3. La recherche de l'activité pectinolytique

Le milieu pectine agar (**Annexe 1**) a été utilisé pour la sélection des isolats bactériens producteurs de la pectinases. Après incubation à 30°C pendant 48h, les boîtes sont inondées par une solution d'acétate de cuivre à 75% pendant 10 minutes. Un résultat positif se traduit

par un halo clair autour des colonies. A l'inverse, un résultat négatif se manifeste par l'absence de zones d'hydrolyse (**Benkahoul *et al.*,2017**).



***Chapitre III :***  
***Résultats et***  
***discussion***

### III. Résultats & Discussion

#### III.1. Isolement de l'agent antagoniste

Après incubation à 30°C pendant 48h sur le milieu d'isolement (LB) et la purification des isolats de *Bacillus* nous a permis d'avoir 33 isolats à partir des échantillons du sol rhizosphérique de 8 échantillons (Fig.5).

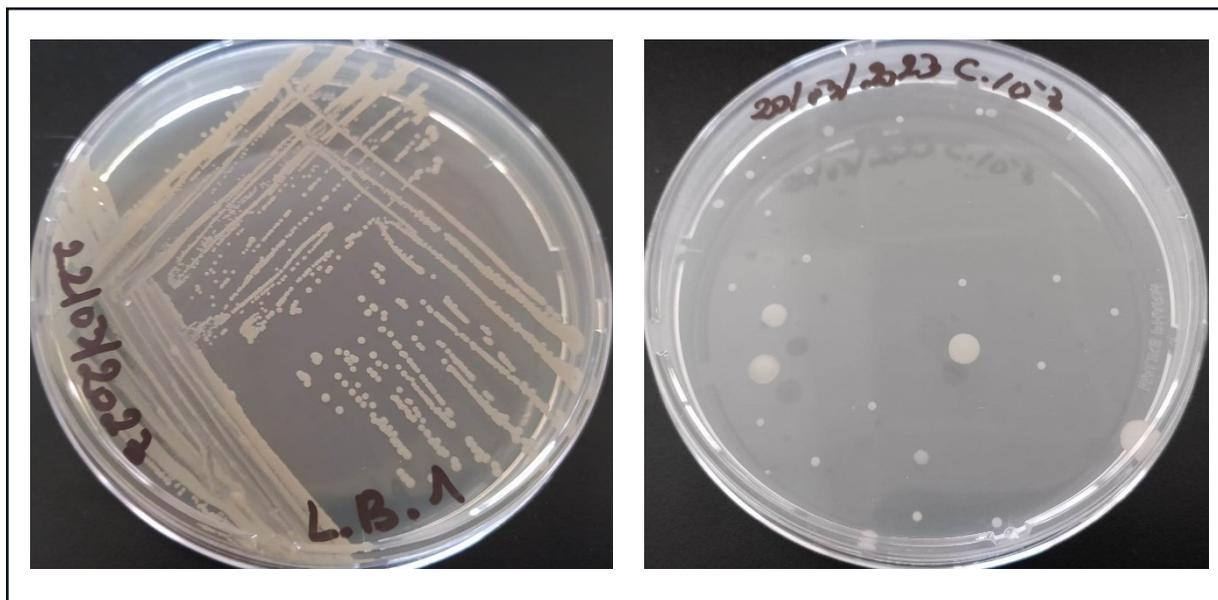


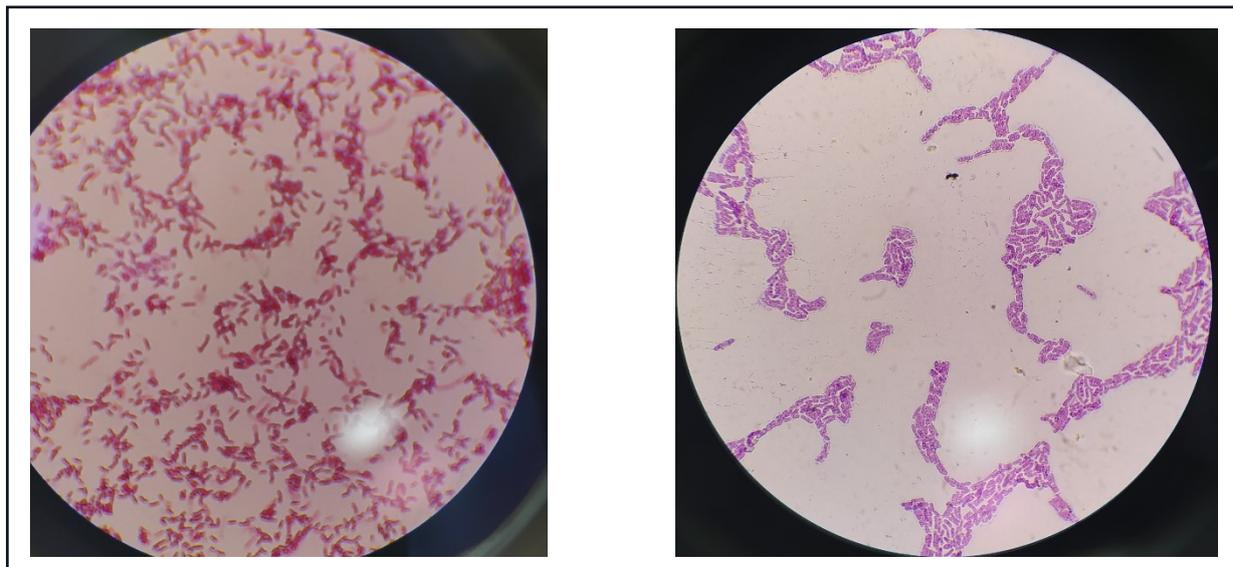
Figure.5 : Aspect macroscopique des isolats.

#### III.2. Identification des isolats de *Bacillus*

##### III.2.1. Caractérisation macroscopiques et microscopiques des isolats de *Bacillus*

La caractérisation macroscopique des colonies isolées sur gélose LB montre des colonies de forme et de taille variables. Certaines colonies sont circulaires, d'autres de forme irrégulière atteignant des dimensions allant de 1 à 6 mm de diamètre. L'aspect des colonies est aussi différent, il peut être visqueux, lisse ou granulaire, les colonies sont opaques ou translucides avec des couleurs blanches à crème (Tab.3)

L'observation microscopique a été faite après coloration de Gram qui a permis de différencier les bactéries selon leur forme et leur coloration, tous les isolats observés avaient une forme bacille et Gram+ avec une couleur violette. Tous les isolats sont sporulés (Fig.6), (Tab.3)



**Figure.6** : Aspect microscopique des isolats.

**Tableau.3** :Aspect microscopique et macroscopique des isolats de *Bacillus*

Isolats	Forme	Gram	Spore	Aspect macroscopique
L.c.2.b	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
L.F.3	Bacille	+	+	Granuleux, régulière, blanche à crème
D.4	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
D.5	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
D.3	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
L.F.1.b	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème
L.D.2	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
LC2a	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LG1b	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LB5	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LD1	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
LG1a	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LA4b	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
LC3b	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
LC1	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
LB11	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème

<b>LB10</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LA5</b>	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
<b>LF2</b>	Bacille	+	+	Granuleux, régulière, blanche à crème
<b>LB1</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LG2</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LF1a</b>	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème
<b>LC3a</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LB7</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LA3b</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LA2a</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LB8</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LB2</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LB6</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LA4</b>	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème
<b>LA2b</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LB9</b>	Bacille	+	+	Granuleux, régulière, blanche à crème
<b>LA4a</b>	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème

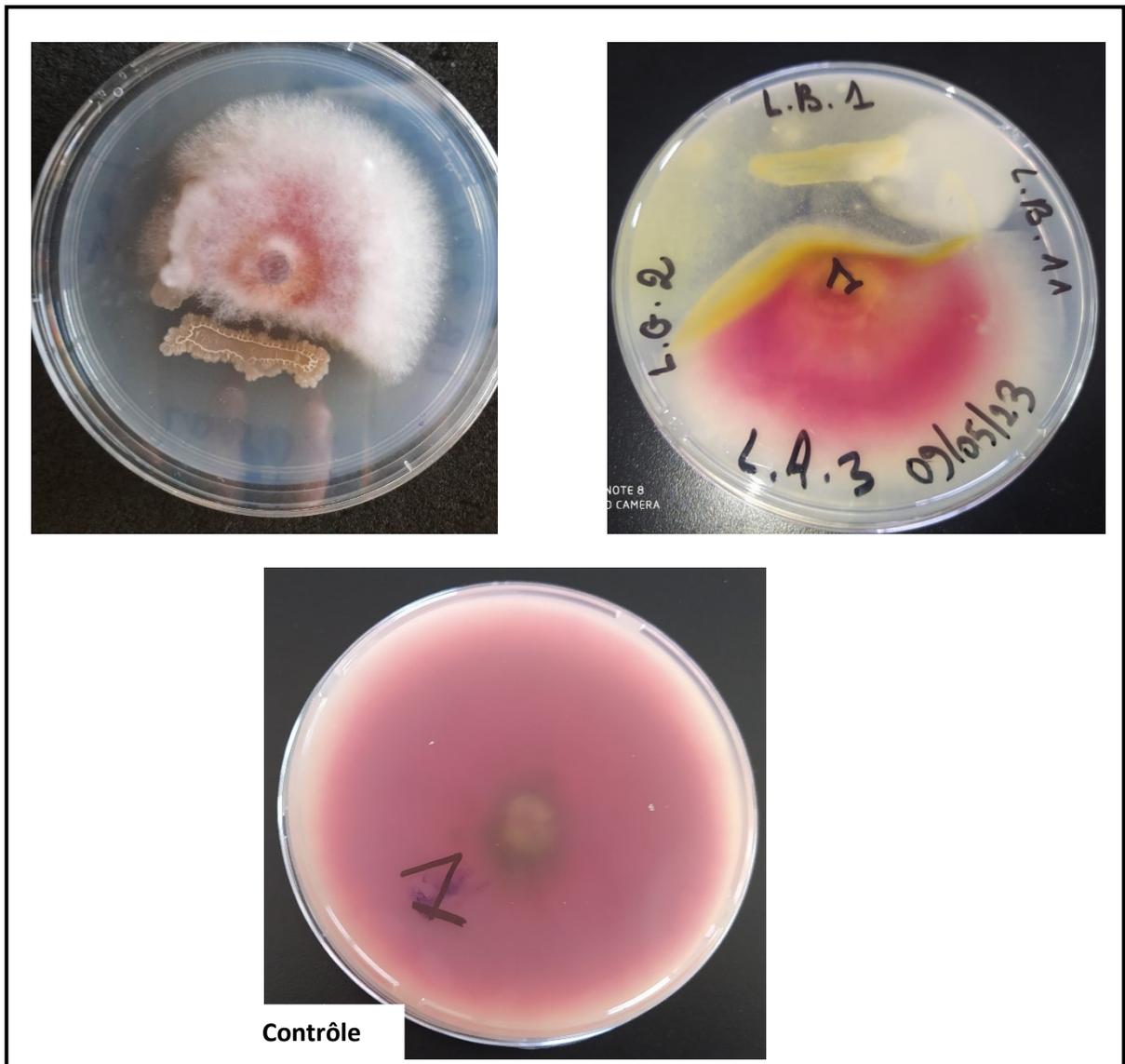
### II.2.2. Recherche de catalase

Le test de catalase permet de vérifier si la bactérie possède l'enzyme de la catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En effet, les résultats de ce test montrent que 26 isolats sont capables de produire cette enzyme et 7 sont incapables de la produire. **(Tab.8)**.

## III.3. Test PGP

### III.3.1. Test d'antagonisme

Parmi les isolats bactériens testés, sept isolats avaient un effet antagoniste positif. Deux isolats (LD2 et LB1) ont montré un effet positif contre le champignon 1 **(Fig.7)**. Les isolats LC1 et LA4b ont un effet positif contre le champignon 2. Et trois isolats (LA5, LA4b et LB7) ayant une activité antifongique contre le champignon 10. L'isolat LD1a un effet positif contre champignon 4. Aucun isolat n'a montré d'effet antagoniste contre les champignons 3, 5, 6, 7 et 8, **(tab.4)**.



**Figure.7 :** Activité antagoniste des isolats.

Les résultats de cette expérience ont montré que les deux isolats LD2 et LB1 ont présenté des taux d'inhibition de 33.3% et 25 % respectivement contre le champignon 1. Alors que les autres isolats positifs (LA5, LB7, LD1, LC1 et LA4b) ont présenté des taux d'inhibition moins de 5%.

Tableau.4 : Activité antagoniste des isolats

Champignon Isolats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L.C.2.b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.F.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.F.1.b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.D.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LG1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LD1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA4b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
LC3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LB11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LA3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA4a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

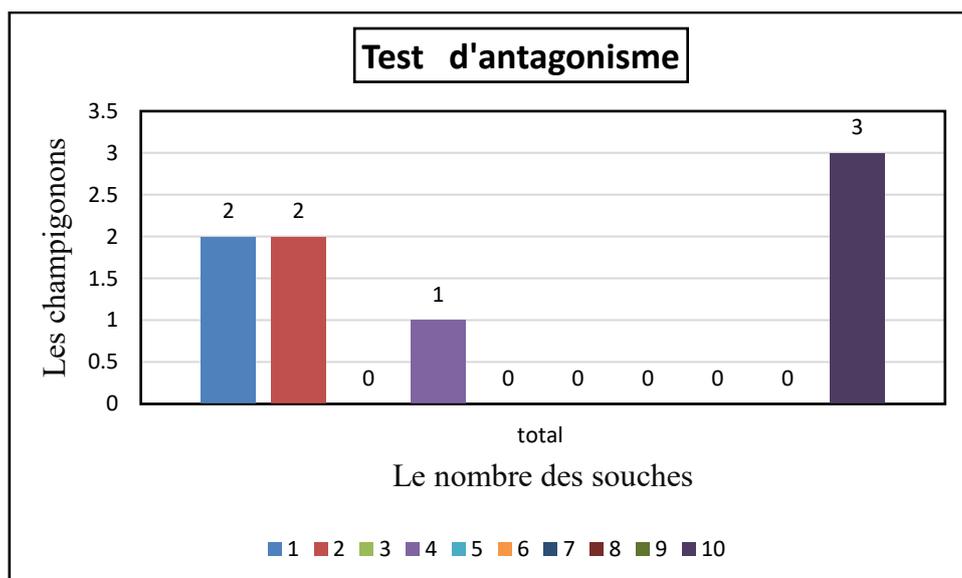


Figure.8 :Test d’antagonisme.

La figure8 montre le nombre d’isolat capable d’inhiber la croissance de chaque agent phytopathogène.D’après cette figure, nous avons remarqué quele champignon 10 a été inhibé par trois isolats, les deux champignons 1 et 2 ont inhibé par deux isolats, un isolat a pu inhiber le champignon 4.Aucun isolat bactérien n’a pu montrer une activité antagoniste vis-à-vis les phytopathogène 3, 5, 6, 7, 8 et 9.

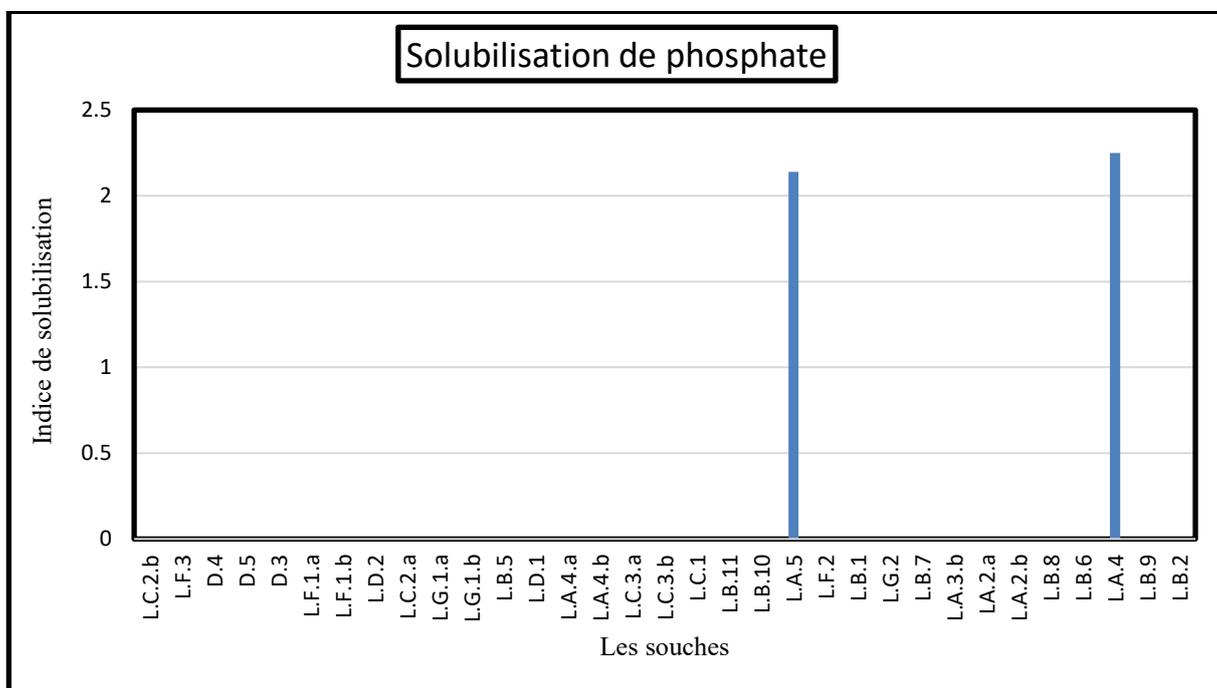
### III.3.2. Solubilisation des phosphates

La solubilisation du phosphate est révélée par l’apparition d’un halo de transparence autour descolonies après 7 jours d’incubation à 30°C (Fig.9).



Figure.9 : Solubilisation de phosphate de l’isolat.

Deux isolats ont montré des résultats positifs pour le test, LA4 et LA5 avec des l'indice de solubilisation de 2.25, 2.14 respectivement (**Fig.10**).Le reste des isolats (31 bactéries)ont été négatifs pour la solubilisation du phosphate.



**Figure .10** :Taux de Solubilisation du phosphate par les isolats.

### III.3.3. Production de l'acide indole acétique (AIA)

La recherche de l'acide indole acétique chez l'ensemble des isolats a été réalisée après leur culture dans le milieu LB additionnés de tryptophane à raison de 0.2g/l. Après 4 jours d'incubation, l'apparition de la couleur rose après addition du réactif Salkowski indique de production de l'AIA.

Seize isolats ont été positifs pour la production d'AIA.Par contre dix-sept isolats étaient négatifs pour le test. (**Fig.11**).

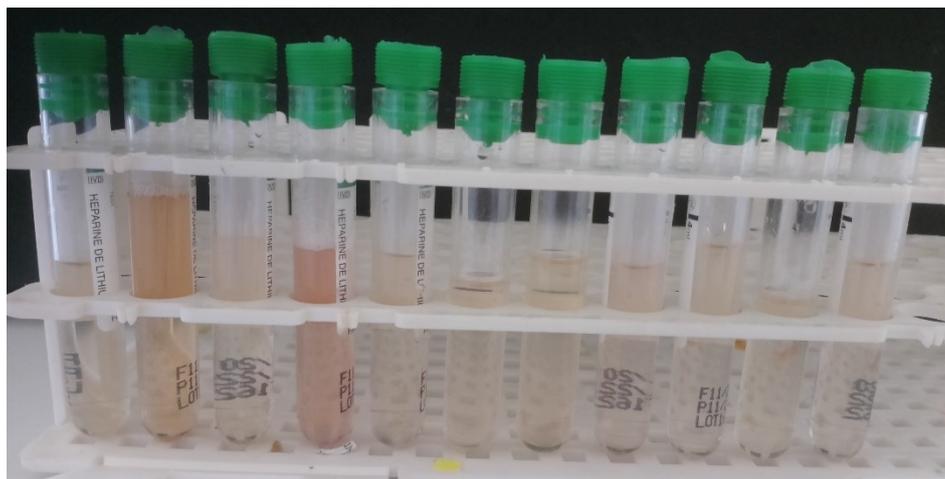


Figure .11 : Production d’AIA par les isolats.

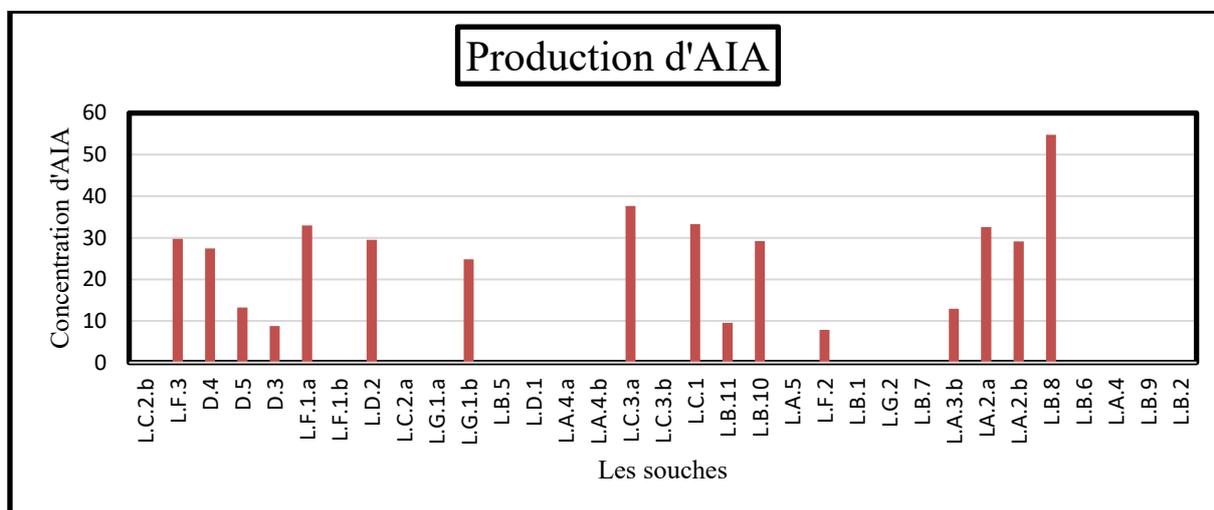


Figure .12 : Taux de production d’AIA par les isolats.

D’après la figure 12, nous avons remarqué que l’isolat LB8 avait une production maximale d’AIA par rapport aux autres isolats, dix isolats ont montré une production moyenne du métabolite avec des concentrations allant de 24.84ug/ml à 37.62ug/ml.

Cinq isolats (D5, LA3b, LB11, D3, LF2) ont montré une production minimale d’AIA avec des concentrations allant de 12.98ug/ml à 7.87ug/ml. Le reste des isolats étaient négatif pour le test.

### III.4.Activités enzymatiques

Les tests enzymatiques ont été réalisés dans le but de déterminer la capacité des isolats obtenus à produire les enzymes nécessaires à la dégradation des sucres complexes, telles que : la cellulase, la pectinase et l'amylase. (Fig14).

Les analyses de production de divers enzymes révèlent que sur les 33 isolats de *Bacillus* testés, 21 isolats ont été incapables d'hydrolyser la cellulose.(Fig.13).En revanche, 12 ont été capables de l'hydrolyser (Tab.5).

Concernant la deuxième enzyme l'amylase, ils n'y avaient que 22 isolats capables de produire cette enzyme et d'une manière assez forte(Fig.13), alors que les 11 isolats ont été incapables de la produire (Tab.5).

Concernant le troisième enzyme (pectinase) nous avons observés que les 33 isolats testés ont été incapables de produire cette enzyme (Tab.5) (Fig.13).



Figure .13 : Les activités enzymatiques.

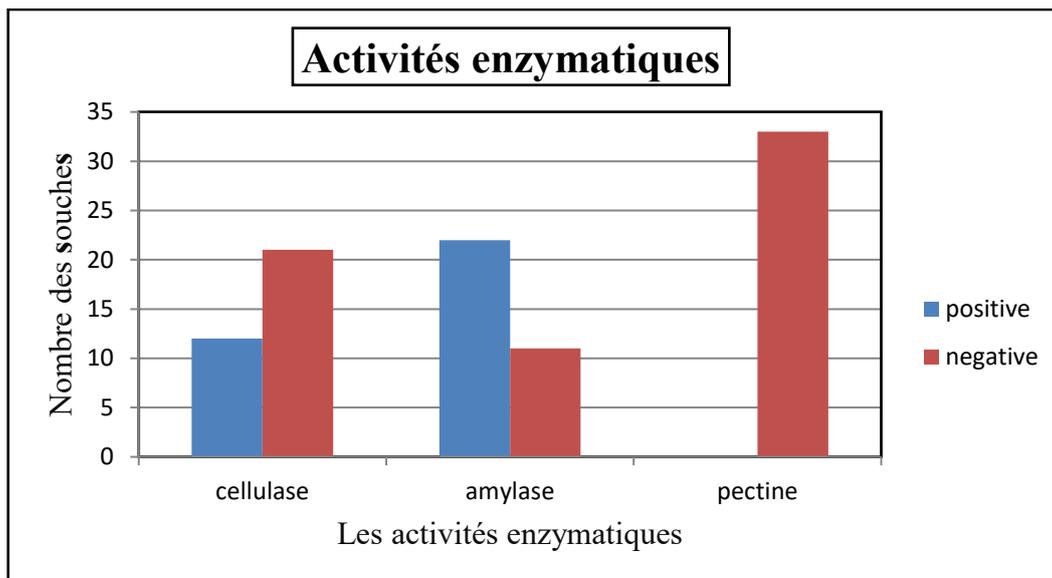


Figure .14 : taux d'activités enzymatiques

Tableau.5 : Récapitulatif des tests des isolats.

Les isolats	Amylase	Pectine	Cellulase
L.C.2.b	+	-	-
L.F.3	-	-	-
D.4	+	-	-
D.5	+	-	+
D.3	+	-	-
L.F.1.a	+	-	+
L.F.1.b	-	-	+
L.D.2	+	-	-
L.C.2.a	-	-	-
L.G.1.a	+	-	-
L.G.1.b	+	-	+
L.B.5	+	-	-
L.D.1	+	-	-
L.A.4.a	+	-	-
L.A.4.b	+	-	-
L.C.3.a	+	-	+
L.C.3.b	+	-	+
L.C.1	+	-	+
L.B.11	-	-	-
L.B.10	+	-	-
L.A.5	+	-	-
L.F.2	-	-	+
L.B.1	-	-	+
L.G.2	+	-	-
L.B.7	+	-	-
L.A.3.b	-	-	+
LA.2.a	+	-	-

L.A.2.b	-	-	+
L.B.8	-	-	+
L.B.6	+	-	-
L.A.4	-	-	-
L.B.9	+	-	-
L.B.2	-	-	-

### III.5. Discussion

Dans la présente étude, des *Bacillus* rhizosphérique ont été isolés et identifiés, après traitement à 80°C elles possèdent une variété de caractères morphologique. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs, où les isolats de *Bacillus* et *Paenibacillus* ont été observés comme des colonies de taille petite à moyenne, translucides, Gram positif, et en forme de bâtonnets et une texture lisse. Dans d'autres résultats, des pigmentations de couleur différente et une élévation convexe ont été observés (**Mumtaz et al., 2017 ; Ahmad et al., 2018 ; Suman et al., 2018**)

Plusieurs études révèlent que les *Bacillus* sont abondants dans la rhizosphère du blé (**Milus et Rothrock., 1993 ; Maplestone et Campbell., 1989**). Toutefois, leur dominance se trouve dans les régions salées. La capacité de sporulation de ce genre bactérien favorise d'une part l'ubiquité et d'autre part la survie dans des environnements très divers. Les isolats bactériens observés se sont révélés tous à gram positif, végétatifs dont certains pouvant croître en conditions aéro-anaérobie (facultatifs), alors que d'autres sont aérobies stricts. Les cellules rencontrées produisent des spores ellipsoïdales, centrales, subterminales et terminales soit déformantes ou non déformantes. Ces caractères rappellent l'aspect des *Bacillus* cités par la littérature (**Logan et Turnbull., 2000**).

Les bactéries *Bacillus* spp forment des spores en cas de stress environnemental tel que la privation de nutriments (**Setlow et Johnson., 2007**). Dans des conditions appropriées, la sporulation de *Bacillus* spp. peut-être induite non seulement par l'épuisement des nutriments mais aussi en soumettant les cellules à certaines conditions environnementales défavorables notamment des valeurs extrêmes de pH et de température (**Turnbull et al., 1990**). Dans cette étude, après traitement thermique à 80° C/10 min, la présence de spores dans *Bacillus* a été confirmée par plusieurs auteurs, (**Cho et Rhee 2018 ; Elisashvili et al., 2019**) ont prouvé la présence de *Bacillus* formant des spores.

(Karimiet *al.*, 2012), ontrapporté que *Bsubtilis* est l'espèce la plus abondante dans le sol rhizosphérique du pois chiche. (Kumar *et al.*, 2014), ont pu isoler un total de 240 *Bacillus* à partir la rhizosphère dupois chiche en Inde. En outre, (Patil *et al.*, 2015), ajoutentque sur 75 isolats de*Bacillus* isolées à partir de la rhizosphère de pois chiche, le *B. subtilis*est l'isolat la plus dominante. Elle est aussi dominante dans la rhizosphère du blé (Yueju *et al.*, 2014). D'autres espèces de *Bacillus* ont été isolés à partir du sol, ainsi, (Nouvamoet *al.*, 2015),ont rencontré *B.coagulans*, *B.thuriengiensis*, *B.pumilus*, *B.circulans*, *B.firmus*, *B.lentuset B.licheniformis*sur la rhizosphère du maïs. (Santos *et al.*, 2006) affirment que les *Bacillus sp.*, sont les rhizobactéries les plus abondants dans le sol ce qui explique leur potentiel compétitif, dans l'environnement en présence avec plusieurs autres microorganismes.

Dans cette étude, la plupart des isolats testés ont été positives pour l'activité catalase. (Iqbal *et al.*, 2016) ont rapporté que les cinq isolats de *Bacillus* étaient tous positifs à la catalase car ceux-ci forment des bulles de gaz lors de l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aux cellules des bactéries. Dans une autre étude, (Ahmad *et al.*,2018) ont observé que les sept isolats étaient positifs pour la production d'enzyme catalase.

Concernant l'antagonisme, Les *Bacillus sp.* ont été considérée comme des agents potentiels de lutte biologique grâce à leur forte production des spores, qui sont souvent résistantes à la dessiccation, à la chaleur, aux UV, aux solvants organiques et à l'irradiation (Ling *et al.*, 2007)..

Certains isolats bactériens de *Bacillus* ont montré un effet très faible d'activité antagoniste contre les phytopathogènes, telle que (LA5, LB7, LD1, LC1, LA4b ) avec un taux d'inhibition moins de 5%, alors que d'autres n'ont montré qu'une activité nulle dans certains cas. Parmi les 33 isolats, l'isolatLD2 a une activité antagoniste avec un taux d'inhibition environ (33.3%) et (25%) pour l'isolat LB1 contre le champignon 1. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs, Cette capacité des isolats de *Bacillus* à inhiber les champignons phytopathogènes repose principalement sur leur production d'une grande variété de métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes (Keswani *et al.*,2020).

Les résultats de Toralet *al.*,(2018) ont montré que le taux d'inhibition d'*Ascochyta*sp par *Bacillus*après 7 jours d'incubation est de 33,74% qui est similaires avec nos résultats. Par contre d'autre chercheurs ont trouvées un potentiel antagoniste élevé,Jemniet *al.*,(2009) ont montré que deux isolats de *Bacillus* SB1 et SB2 présentent un effet inhibiteur de 50% sur la croissance de *Botrytis cinerea*. Sur la même idée Tour *et al.*,(2004) ont trouvé que le taux

d'inhibition de la croissance de *Botrytis cinerea* par l'isolats *Bacillus amyloliquefaciens* était 70%. Mari *et al.*,(1996) ont signalé queles bactéries à Gram positif appartenant au genre*Bacillus* étaient plus efficaces contre *Botrytis cinerea*. Alippi et Monaco,(1994) ont démontré que plusieurs isolats de *Bacillus* pouvant produire des molécules antifongiques telles que subtiline, bacitracine, bacilline et bacillomycine qui appartiennent à la famille des iturines.

A propos des test PGP la synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est le plus efficace,est une faculté très commune chez les bactéries. Environ 80% des bactéries rhizosphériques sontcapables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son addition est nécessaire à la production d'AIA. Les exsudats racinaires sont une source naturelle deL-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastageret *al.*, 2010). L'AIA étaient synthétisé dans la présent étude par les seize 16 isolatsde *Bacillus* : LC3a- LF1a-LC1-LA2a-LF3-LD2-LB10-LA2b-D4-D5-L.A3b-LB11-D3-LF2.Selon (Joseph *et al.*, 2007),tout en travaillant avec les pois chiches, les isolats de *Bacillus* ont produit l'IAA et ont ainsi amélioré la production et le rendement.Alors que, le reste des isolats libèrent des taux très faibles ou négligeable, Les espèces de *Bacillus* sont faiblement productrices de l'AIA. Nos résultats en accordavecLoper et Schroth, (1986),les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices de l'AIA. La production de ce composé est variable entre les isolats dedifférentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phasede croissance et la disponibilité du substrat (Mirazaet *al.*, 2001).

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate sont considérées comme des agentsbiofertilisants en agriculture(Sharma *et al.*, 2007). Les *Bacillus* possèdent plusieurs mécanismes ayant des effets bénéfiques sur les plantes. L'une des principales activités améliorant la croissance des végétaux est l'alimentation phosphatée.

Les résultats de la présente étude montre que indice de solubilisation de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ parles deux isolats de *Bacillus*sont 2.25 et 2.14 respectivement. M. Gupta *et al.*,(2012)ont marquée des efficacités de solubilisation qui varient entre (150 et 340).

Dans notre étude, 31 isolats étaientincapables de solubiliser le phosphate, Des résultats similaire ont été obtenus par d'autres chercheurs. Les micro-organismes libèrent le Phosphate soluble par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétionde  $\text{H}^+$ . Par conséquent, le P peut être libéré par la substitution des protons ou sa complexationavec le  $\text{Ca}^{2+}$  (Illmer et

**Schinner., 1995).** Ainsi lors de la solubilisation, les bactéries acidifient l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose. Ce processus conduit à la libération de différents acides organiques (lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique). Cependant, ces composés sont libérés difficilement dans le milieu solide contrairement au milieu liquide (**Nautiyal., 1999**). La conséquence de ce phénomène se manifeste par la non-apparition du halo de transparence autour des colonies des isolats solubilisant efficacement les phosphates sur bouillon PVK..

Pendant de nombreuses années, les bactéries dégradant la cellulose ont été ciblées et caractérisées pour l'obtention de cellulases plus efficaces (**Otajevwo et Aluyi., 2011**). Les résultats obtenus montrent que l'activité cellulolytique est observée chez 12 isolats. Les résultats sont en accord avec les recherches précédemment effectuées par **Maki et al., (2011)**, dans lequel plusieurs isolats de *Bacillus* et de *Microbacterium* produisent les cellulases. (**Otajevwo et Aluyi 2011**) ont isolé plusieurs isolats de *Bacillus circulans* et *Bacillus subtilis* productrices de cellulases. Selon **Lu et al., (2005)**, les espèces de *Bacillus* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de haut poids moléculaires, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* sont fréquemment signalées parmi les espèces cellulolytiques.

Les amylases peuvent avoir plusieurs sources, microbiennes et même animales et végétales. Mais la plus demandée en industrie est les amylases microbiennes (**Sharma et al., 2010**). Nos résultats, ont montré que la majorité des isolats de *Bacillus* sélectionnés ont été positifs pour l'activité de l'amylase. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs. **Shonkore et al., (2011)** ont montré que les espèces du genre *Bacillus* sont capables de produire des métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases ...etc.).

Aucun isolat n'est capable d'hydrolyser la pectine, cela se traduit par l'absence d'un halo clair autour des colonies. De ce fait toutes les isolats bactériens étudiées sont dépourvues de la pectinase extra-cellulaire. Au contraire d'autre étude a montré que la production de pectinase par ces isolats est plus élevée que celle de la plupart des autres microbes, comme *Bacillus polymyxa* (**Nagel et Vaughn., 1961**), *Bacillus sp. RK9* (**Kelly et Fogarty., 1978**).



### III. Résultats & Discussion

#### III.1. Isolement de l'agent antagoniste

Après incubation à 30°C pendant 48h sur le milieu d'isolement (LB) et la purification des isolats de *Bacillus* nous a permis d'avoir 33 isolats à partir des échantillons du sol rhizosphérique de 8 échantillons (Fig.5).

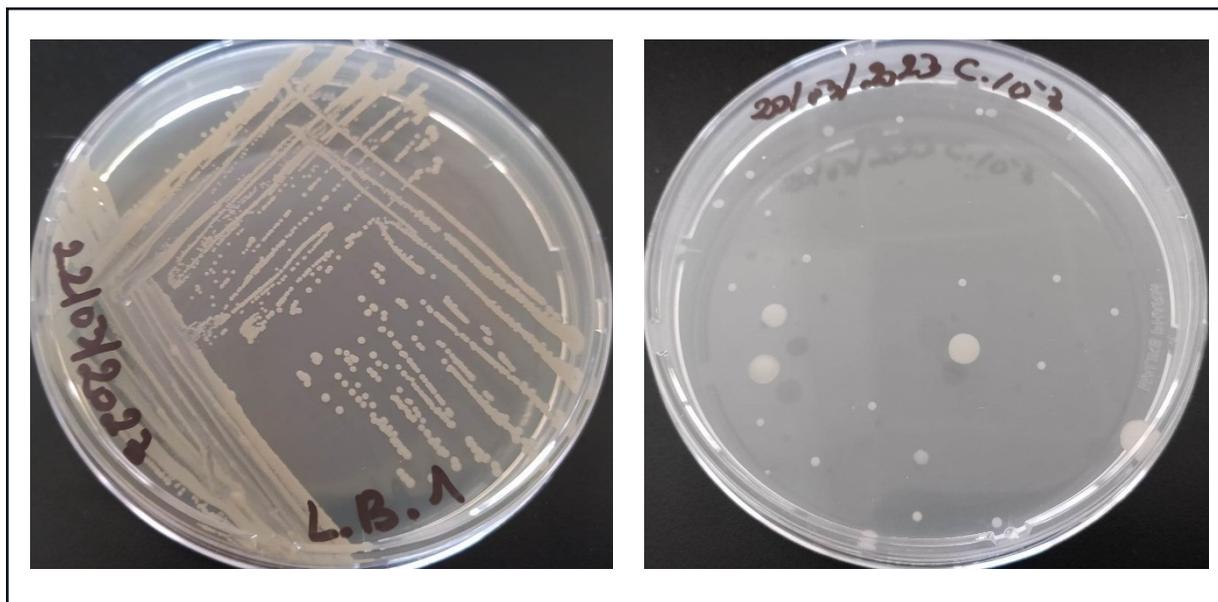


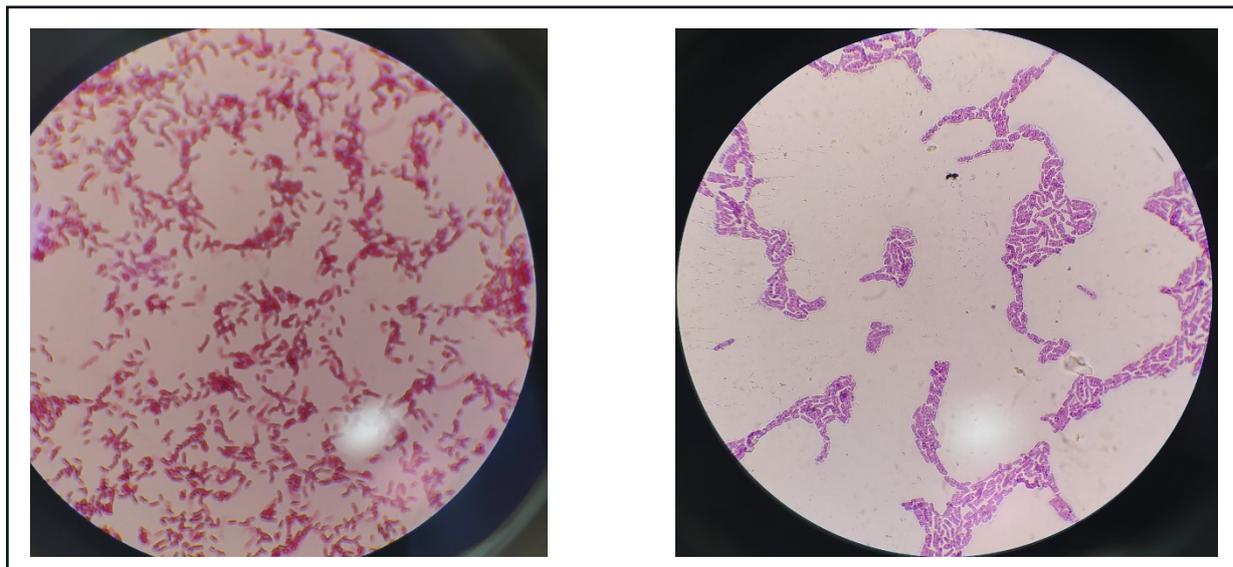
Figure.5 : Aspect macroscopique des isolats.

#### III.2. Identification des isolats de *Bacillus*

##### III.2.1. Caractérisation macroscopiques et microscopiques des isolats de *Bacillus*

La caractérisation macroscopique des colonies isolées sur gélose LB montre des colonies de forme et de taille variables. Certaines colonies sont circulaires, d'autres de forme irrégulière atteignant des dimensions allant de 1 à 6 mm de diamètre. L'aspect des colonies est aussi différent, il peut être visqueux, lisse ou granulaire, les colonies sont opaques ou translucides avec des couleurs blanches à crème (Tab.3)

L'observation microscopique a été faite après coloration de Gram qui a permis de différencier les bactéries selon leur forme et leur coloration, tous les isolats observés avaient une forme bacille et Gram+ avec une couleur violette. Tous les isolats sont sporulés (Fig.6), (Tab.3)



**Figure.6** : Aspect microscopique des isolats.

**Tableau.3** :Aspect microscopique et macroscopique des isolats de *Bacillus*

Isolats	Forme	Gram	Spore	Aspect macroscopique
L.c.2.b	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
L.F.3	Bacille	+	+	Granuleux, régulière, blanche à crème
D.4	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
D.5	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
D.3	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
L.F.1.b	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème
L.D.2	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
LC2a	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LG1b	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LB5	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LD1	Bacille	+	+	Granuleux, irrégulière, blanche à crème
LG1a	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
LA4b	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
LC3b	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
LC1	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
LB11	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème

<b>LB10</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LA5</b>	Bacille	+	+	Visqueux, irrégulière, blanche à crème
<b>LF2</b>	Bacille	+	+	Granuleux, régulière, blanche à crème
<b>LB1</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LG2</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LF1a</b>	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème
<b>LC3a</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LB7</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LA3b</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LA2a</b>	Bacille	+	+	Visqueux, régulière, blanche à crème
<b>LB8</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LB2</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LB6</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LA4</b>	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème
<b>LA2b</b>	Bacille	+	+	Lisse, régulière, blanche à crème
<b>LB9</b>	Bacille	+	+	Granuleux, régulière, blanche à crème
<b>LA4a</b>	Bacille	+	+	Lisse, irrégulière, blanche à crème

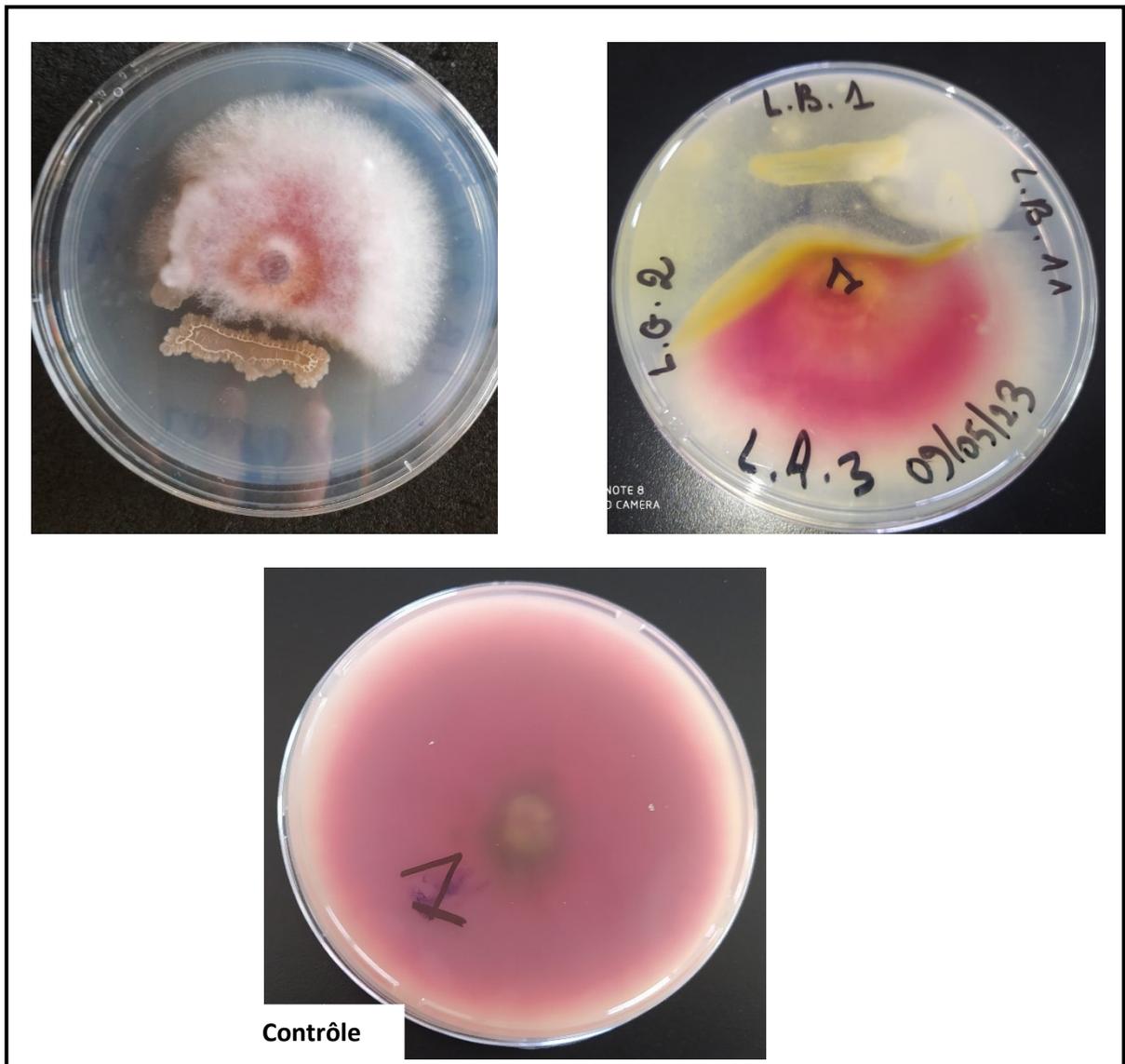
### II.2.2. Recherche de catalase

Le test de catalase permet de vérifier si la bactérie possède l'enzyme de la catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En effet, les résultats de ce test montrent que 26 isolats sont capables de produire cette enzyme et 7 sont incapables de la produire. **(Tab.8)**.

## III.3. Test PGP

### III.3.1. Test d'antagonisme

Parmi les isolats bactériens testés, sept isolats avaient un effet antagoniste positif. Deux isolats (LD2 et LB1) ont montré un effet positif contre le champignon 1 **(Fig.7)**. Les isolats LC1 et LA4b ont un effet positif contre le champignon 2. Et trois isolats (LA5, LA4b et LB7) ayant une activité antifongique contre le champignon 10. L'isolat LD1a un effet positif contre champignon 4. Aucun isolat n'a montré d'effet antagoniste contre les champignons 3, 5, 6, 7 et 8, **(tab.4)**.



**Figure.7 :** Activité antagoniste des isolats.

Les résultats de cette expérience ont montré que les deux isolats LD2 et LB1 ont présenté des taux d'inhibitions de 33.3% et 25 % respectivement contre le champignon 1. Alors que les autres isolats positifs (LA5, LB7, LD1, LC1 et LA4b) ont présenté des taux d'inhibitions moins de 5%.

Tableau.4 : Activité antagoniste des isolats

Champignon Isolats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L.C.2.b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.F.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.F.1.b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.D.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LG1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LD1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA4b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
LC3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LB11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LA3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA4a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

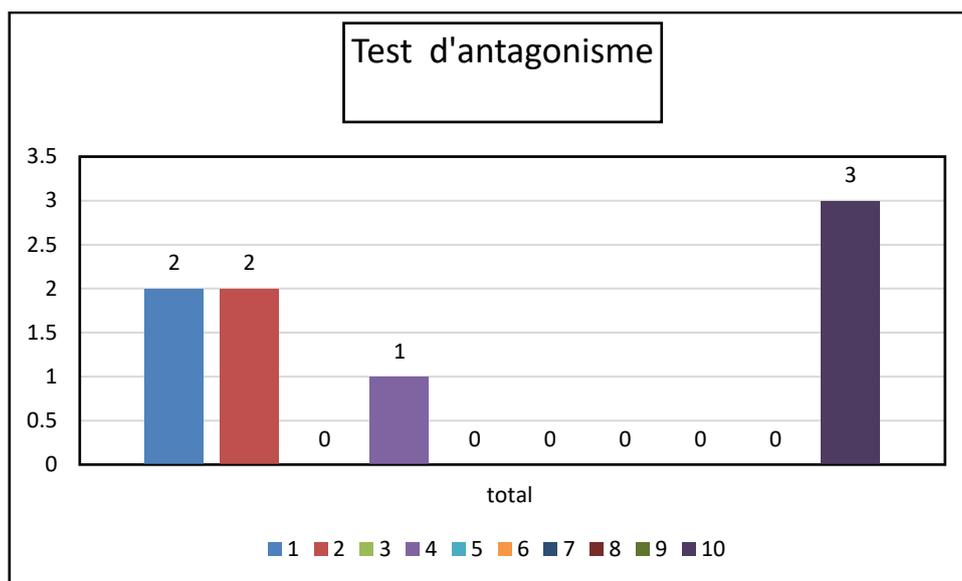


Figure.8 : Test d'antagonisme.

La figure 8 montre le nombre d'isolat capable d'inhiber la croissance de chaque agent phytopathogène. D'après cette figure, nous avons remarqué que le champignon 10 a été inhibé par trois isolats, les deux champignons 1 et 2 ont inhibé par deux isolats, un isolat a pu inhiber le champignons 4. Aucun isolat bactérien n'a pu montrer une activité antagoniste vis-à-vis les phytopathogène 3, 5, 6, 7, 8 et 9.

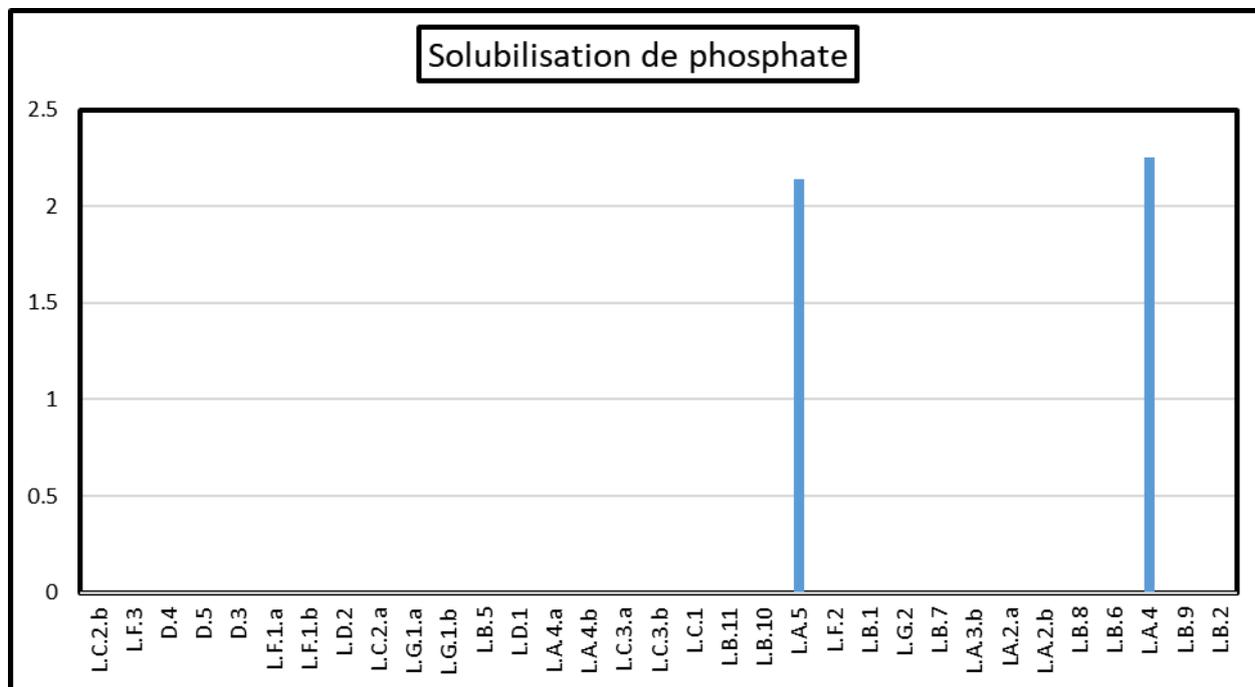
### III.3.2. Solubilisation des phosphates

La solubilisation du phosphate est révélée par l'apparition d'un halo de transparence autour des colonies après 7 jours d'incubation à 30°C (Fig.9).



Figure.9 : Solubilisation de phosphate de l'isolat.

Deux isolats ont montré des résultats positifs pour le test, LA4 et LA5 avec des l'indice de solubilisation de 2.25, 2.14 respectivement (**Fig.10**). Le reste des isolats (31 bactéries) ont été négatifs pour la solubilisation du phosphate.



**Figure .10** : Taux de Solubilisation du phosphate par les isolats.

### III.3.3. Production de l'acide indole acétique (AIA)

La recherche de l'acide indole acétique chez l'ensemble des isolats a été réalisée après leur culture dans le milieu LB additionnés de tryptophane à raison de 0.2g/l. Après 4 jours d'incubation, l'apparition de la couleur rose après addition du réactif Salkowski indique de production de l'AIA.

Seize isolats ont été positifs pour la production d'AIA. Par contre dix-sept isolats étaient négatifs pour le test. (**Fig.11**).

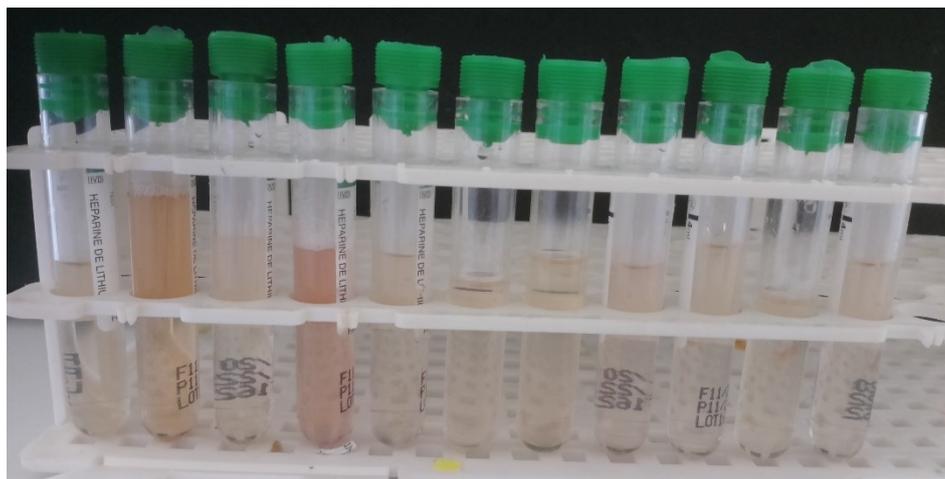


Figure .11 : Production d’AIA par les isolats.

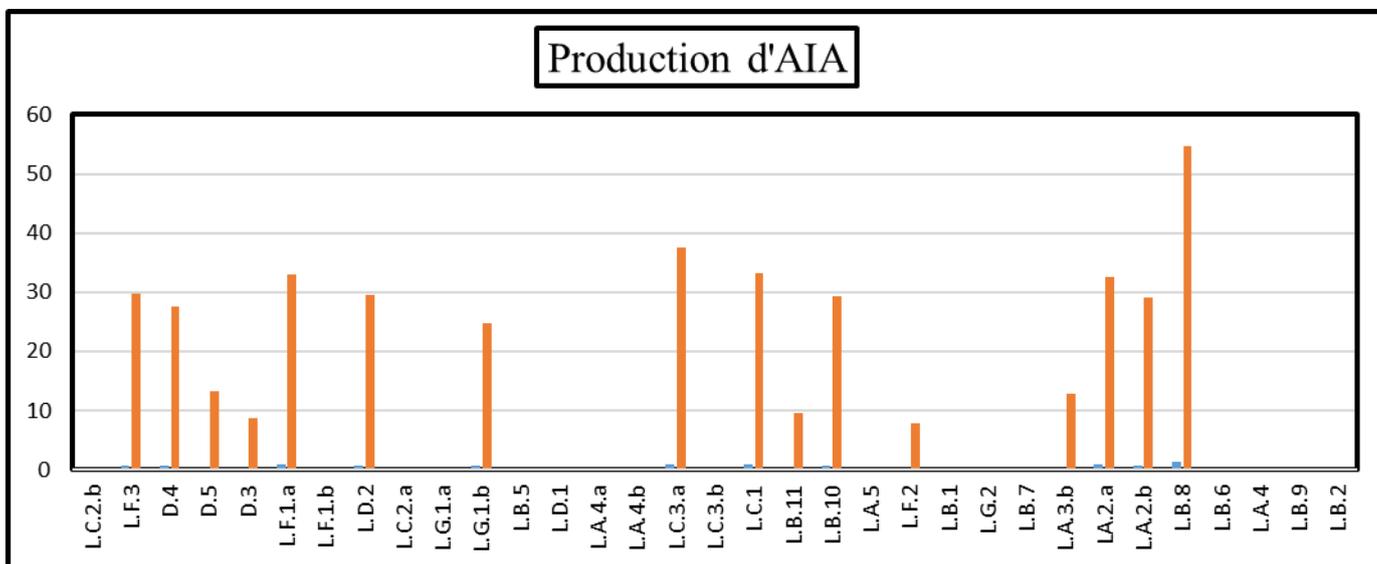


Figure .12 : Taux de production d’AIA par les isolats.

D’après la figure 12, nous avons remarqué que l’isolat LB8 avait une production maximale d’AIA par rapport aux autres isolats, dix isolats ont montré une production moyenne du métabolite avec des concentration allant de 24.84ug/ml à 37.62ug/ml

Cinq isolats (D5, LA3b, LB11, D3, LF2) ont montré une production minimale d’AIA avec des concentrations allant de 12.98ug/ml à 7.87ug/ml. Le reste des isolats étaient négatif pour le test.

### III.4. Activités enzymatiques

Les tests enzymatiques ont été réalisés dans le but de déterminer la capacité des isolats obtenue à produire les enzymes nécessaires à la dégradation des sucres complexes, telles que : la cellulase, la pectinase et l'amylase. (Fig14).

Les analyses de production de divers enzymes révèlent que sur les 33 isolats de *Bacillus* testées, 21 isolat ont été incapables d'hydrolyser la cellulose. (Fig.13). En revanche, 12 ont été capables de l'hydrolyser (Tab. 5).

Concernant la deuxième enzyme l'amylase, il n'y avait que 22 isolats capables de produire cette enzyme et d'une manière assez forte (Fig.13), alors que les 11 isolats ont été incapables de la produire (Tab. 5).

Concernant le troisième enzyme (pectinase) nous avons observées que les 33 isolats testés ont été incapables de produire cette enzyme (Tab.5) (Fig.13).



Figure .13 : Les activités enzymatiques.

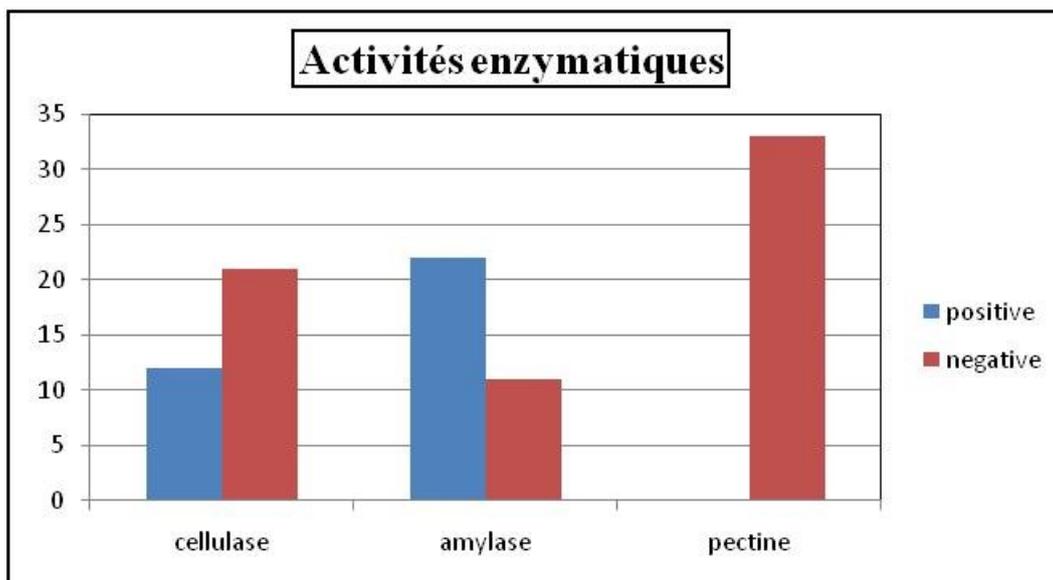


Figure .14 : taux d'activités enzymatiques

Tableau.5 : Récapitulatif des tests des isolats.

Les isolats	Amylase	Pectine	Cellulase
L.C.2.b	+	-	-
L.F.3	-	-	-
D.4	+	-	-
D.5	+	-	+
D.3	+	-	-
L.F.1.a	+	-	+
L.F.1.b	-	-	+
L.D.2	+	-	-
L.C.2.a	-	-	-
L.G.1.a	+	-	-
L.G.1.b	+	-	+
L.B.5	+	-	-
L.D.1	+	-	-
L.A.4.a	+	-	-
L.A.4.b	+	-	-
L.C.3.a	+	-	+
L.C.3.b	+	-	+
L.C.1	+	-	+
L.B.11	-	-	-
L.B.10	+	-	-
L.A.5	+	-	-
L.F.2	-	-	+
L.B.1	-	-	+
L.G.2	+	-	-
L.B.7	+	-	-
L.A.3.b	-	-	+
LA.2.a	+	-	-
L.A.2.b	-	-	+

L.B.8	-	-	+
L.B.6	+	-	-
L.A.4	-	-	-
L.B.9	+	-	-
L.B.2	-	-	-

### III.5. Discussion

Dans la présente étude, des *Bacillus* rhizosphérique ont été isolés et identifiés, après traitement à 80°C elles possèdent une variété de caractères morphologique. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs, où les isolats de *Bacillus* et *Paenibacillus* ont été observés comme des colonies de taille petite à moyenne, translucides, Gram positif, et en forme de bâtonnets et une texture lisse. Dans d'autres résultats, des pigmentations de couleur différente et une élévation convexe ont été observés (**Mumtaz et al., 2017 ; Ahmad et al., 2018 ; Suman et al., 2018**)

Plusieurs études révèlent que les *Bacillus* sont abondants dans la rhizosphère du blé (**Milus et Rothrock., 1993 ; Maplestone et Campbell., 1989**). Toutefois, leur dominance se trouve dans les régions salées. La capacité de sporulation de ce genre bactérien favorise d'une part l'ubiquité et d'autre part la survie dans des environnements très divers. Les isolats bactériennes observées se sont révélées toutes à gram positif, végétatives dont certaines pouvant croître en conditions aéro-anaérobie (facultatives), alors que d'autres sont aérobies stricts. Les cellules rencontrées produisent des spores ellipsoïdales, centrales, subterminales et terminales soient déformantes ou non déformantes. Ces caractères rappellent l'aspect des *Bacillus* cités par la littérature (**Logan et Turnbull., 2000**).

Les bactéries *Bacillus* spp forment des spores en cas de stress environnemental tel que la privation de nutriments (**Setlow et Johnson., 2007**). Dans des conditions appropriées, la sporulation de *Bacillus* spp. peut-être induite non seulement par l'épuisement des nutriments mais aussi en soumettant les cellules à certaines conditions environnementales défavorables notamment des valeurs extrêmes de pH et de température (**Turnbull et al., 1990**). Dans cette étude, après traitement thermique à 80° C/10 min, la présence de spores dans *Bacillus* a été confirmée par plusieurs auteurs, (**Cho et Rhee 2018 ; Elisashvili et al., 2019**) ont prouvé la présence de *Bacillus* formant des spores.

(**Karim et al., 2012**), ont rapporté que *Bsubtilis* est l'espèce la plus abondante dans le sol rhizosphérique du pois chiche. (**Kumar et al., 2014**), ont pu isoler un total de 240 *Bacillus*

à partir la rhizosphère du pois chiche en Inde. En outre, (Patil *et al.*, 2015), ajoutent que sur 75 isolats de *Bacillus* isolées à partir de la rhizosphère de pois chiche, le *B. subtilis* est l'isolat le plus dominante. Elle est aussi dominante dans la rhizosphère du blé (Yueju *et al.*, 2014). D'autres espèces de *Bacillus* ont été isolés à partir du sol, ainsi, (Nouvamo *et al.*, 2015), ont rencontré *B.coagulans*, *B.thuriangiensis*, *B.pumilus*, *B.circulans*, *B.firmus*, *B.lentus* et *B.licheniformis* sur la rhizosphère du maïs. (Santos *et al.*, 2006) affirment que les *Bacillus sp.*, sont les rhizobactéries les plus abondants dans le sol ce qui explique leur potentiel compétitif, dans l'environnement en présence avec plusieurs autres microorganismes.

Dans cette étude, la plupart des isolats testés ont été positives pour l'activité catalase. (Iqbal *et al.*, 2016) ont rapporté que les cinq isolats de *Bacillus* étaient tous positifs à la catalase car ceux-ci forment des bulles de gaz lors de l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aux cellules des bactéries. Dans une autre étude, (Ahmad *et al.*, 2018) ont observé que les sept isolats étaient positifs pour la production d'enzyme catalase.

Concernant l'antagonisme, Les *Bacillus sp.* ont été considérée comme des agents potentiels de lutte biologique grâce à leur forte production des spores, qui sont souvent résistantes à la dessiccation, à la chaleur, aux UV, aux solvants organiques et à l'irradiation (Ling *et al.*, 2007)..

Certains isolats bactériens de *Bacillus* ont montré un effet très faible d'activité antagoniste contre les phytopathogènes, telle que (LA5, LB7, LD1, LC1, LA4b) avec un taux d'inhibition moins de 5%, alors que d'autres n'ont montré qu'une activité nulle dans certains cas. Parmi les 33 isolats, l'isolat LD2 a une activité antagoniste avec un taux d'inhibition environ (33.3%) et (25%) pour l'isolat LB1 contre le champignon 1. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs, Cette capacité des isolats de *Bacillus* à inhiber les champignons phytopathogènes repose principalement sur leur production d'une grande variété de métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes (Keswani *et al.*, 2020).

Les résultats de Toral *et al.*, (2018) ont montré que le taux d'inhibition d'*Ascochyta sp* par *Bacillus* après 7 jours d'incubation est de 33,74% qui est similaires avec nos résultats. Par contre d'autre chercheurs ont trouvées un potentiel antagoniste élevé, Jemni *et al.*, (2009) ont montré que deux isolats de *Bacillus* SB1 et SB2 présentent un effet inhibiteur de 50% sur la croissance de *Botrytis cinerea*. Sur la même idée Tour *et al.*, (2004) ont trouvé que le taux d'inhibition de la croissance de *Botrytis cinerea* par l'isolats *Bacillus amyloliquefaciens* était 70%. Mari *et al.*, (1996) ont signalé que les bactéries à Gram positif appartenant au genre

*Bacillus* étaient plus efficaces contre *Botrytis cinerea*. Alippi et Monaco, (1994) ont démontré que plusieurs isolats de *Bacillus* pouvant produire des molécules antifongiques telles que subtiline, bacitracine, bacilline et bacillomycine qui appartiennent à la famille des iturines.

A propos des test PGP la synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est le plus efficace, est une faculté très commune chez les bactéries. Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son addition est nécessaire à la production d'AIA. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastageret al., 2010). L'AIA étaient synthétisé dans la présent étude par les seize 16 isolats de *Bacillus* : LC3a- LF1a-LC1-LA2a-LF3-LD2-LB10-LA2b-D4-D5-L.A3b-LB11-D3-LF2. Selon (Joseph et al., 2007), tout en travaillant avec les pois chiches, les isolats de *Bacillus* ont produit l'IAA et ont ainsi amélioré la production et le rendement. Alors que, le reste des isolats libèrent des taux très faibles ou négligeable, Les espèces de *Bacillus* sont faiblement productrices de l'AIA. Nos résultats en accord avec Loper et Schroth, (1986), les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices de l'AIA. La production de ce composé est variable entre les isolats de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Mirzaet al., 2001).

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate sont considérées comme des agents biofertilisants en agriculture (Sharma et al., 2007). Les *Bacillus* possèdent plusieurs mécanismes ayant des effets bénéfiques sur les plantes. L'une des principales activités améliorant la croissance des végétaux est l'alimentation phosphatée.

Les résultats de la présente étude montre que indice de solubilisation de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  par les deux isolats de *Bacillus* sont 2.25 et 2.14 respectivement. M. Gupta et al., (2012) ont marquée des efficacités de solubilisation qui varient entre (150 et 340).

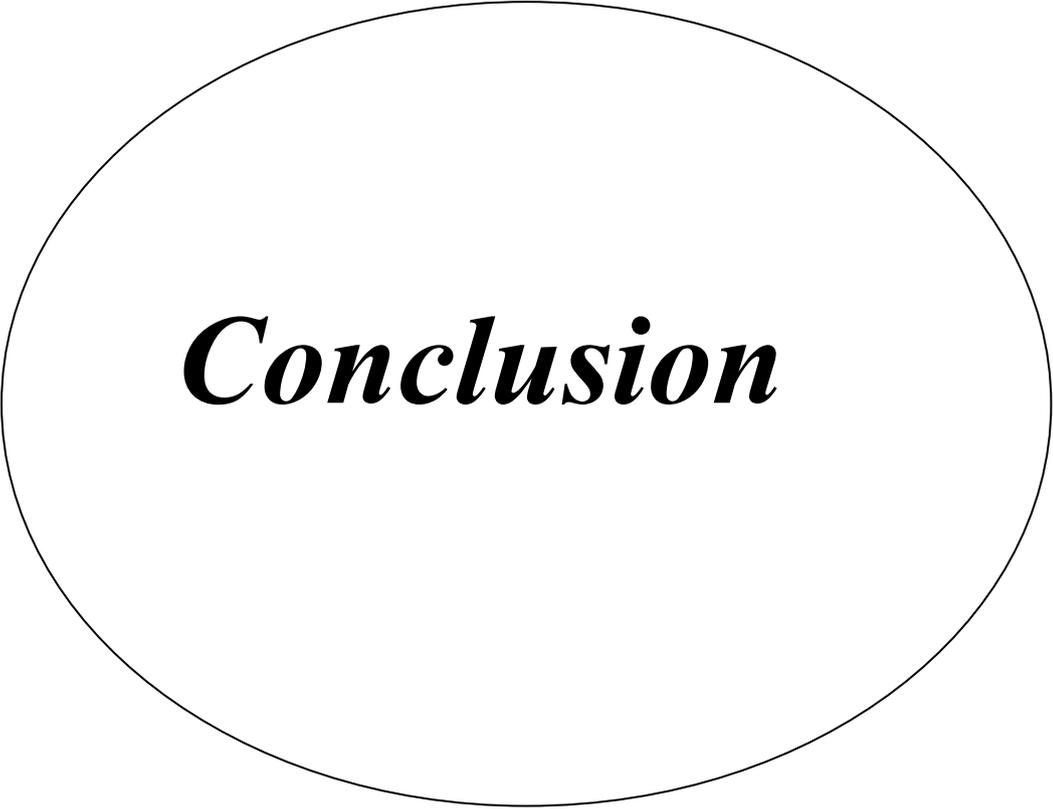
Dans notre étude, 31 isolats étaient incapables de solubiliser le phosphate, Des résultats similaire ont été obtenus par d'autres chercheurs. Les micro-organismes libèrent le Phosphate soluble par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétion de  $\text{H}^+$ . Par conséquent, le P peut être libéré par la substitution des protons ou sa complexation avec le  $\text{Ca}^{2+}$  (Illmer et Schinner., 1995). Ainsi lors de la solubilisation, les bactéries acidifient l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose. Ce processus conduit à la libération de différents acides organiques (lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et

succinique). Cependant, ces composés sont libérés difficilement dans le milieu solide contrairement au milieu liquide (Nautiyal., 1999). La conséquence de ce phénomène se manifeste par la non-apparition du halo de transparence autour des colonies des isolats solubilisant efficacement les phosphates sur bouillon PVK..

Pendant de nombreuses années, les bactéries dégradant la cellulose ont été ciblées et caractérisées pour l'obtention de cellulases plus efficaces (Otajewwo et Aluyi., 2011). Les résultats obtenus montrent que l'activité cellulolytique est observée chez 12 isolats. Les résultats sont en accord avec les recherches précédemment effectuées par Maki *et al.*, (2011), dans lequel plusieurs isolats de *Bacillus* et de *Microbacterium* produisent les cellulases. (Otajewwo et Aluyi 2011) ont isolé plusieurs isolats de *Bacillus circulans* et *Bacillus subtilis* productrices de cellulases. Selon Lu *et al.*, (2005), les espèces de *Bacillus* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de haut poids moléculaires, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* sont fréquemment signalées parmi les espèces cellulolytiques.

Les amylases peuvent avoir plusieurs sources, microbiennes et même animales et végétales. Mais la plus demandée en industrie est les amylases microbiennes (Sharma *et al.*, 2010). Nos résultats, ont montré que la majorité des isolats de *Bacillus* sélectionnés ont été positifs pour l'activité de l'amylase. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs. Shonkor *et al.*, (2011) ont montré que les espèces du genre *Bacillus* sont capables de produire des métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases ...etc.).

Aucun isolat n'est capable d'hydrolyser la pectine, cela se traduit par l'absence d'un halo clair autour des colonies. De ce fait toutes les isolats bactériens étudiées sont dépourvues de la pectinase extra-cellulaire. Au contraire d'autre étude a montré que la production de pectinase par ces isolats est plus élevée que celle de la plupart des autres microbes, comme *Bacillus polymyxa* (Nagel et Vaughn., 1961), *Bacillus sp. RK9* (Kelly et Fogarty., 1978).



***Conclusion***

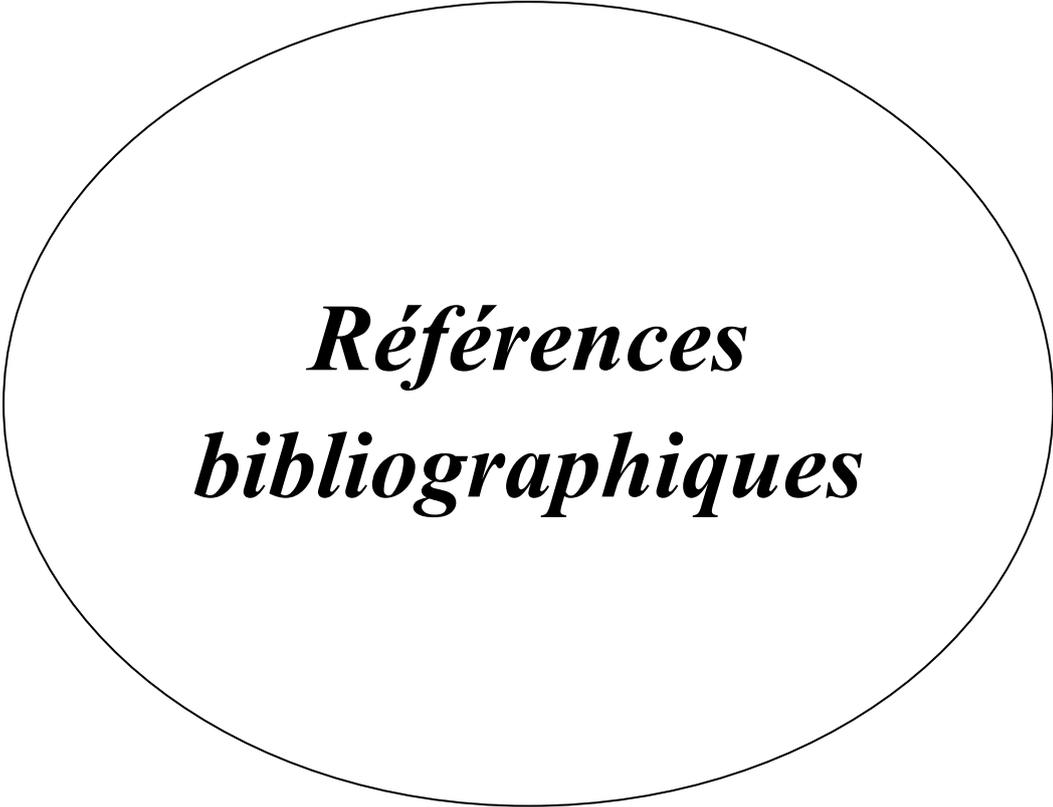
### Conclusion et perspectives

Dans l'agriculture, il est nécessaire de rechercher des moyens respectueux de l'environnement pour augmenter la production de rendement sans endommager le sol et l'eau. Des dommages peuvent résulter de l'application de différents engrais chimiques. L'utilisation de biopesticides biologiques comme alternative aux pesticides chimiques devrait être étudiée plus avant dans l'agriculture. *Bacillus*, avec toutes les preuves à l'appui de ses caractéristiques bénéfiques, peut être considéré comme un bio- pesticides biologiques. Jusqu'à présent, il a été rarement appliqué comme inoculant pour augmenter le rendement des produits agricoles, malgré l'excellent potentiel montré dans un grand nombre de publications scientifiques.

Dans cette étude, un totale de 33 isolats de *Bacillus* ont été isolé à partir de la rhizosphère de 8 échantillons de plantes, elles ont été soumises à une identification préliminaire par des examens macroscopique et microscopique et tests biochimiques, cette identification a permis de démontrer quenos isolats bactériens comprennent des souches appartenant au genre *Bacillus sp* mais les caractérisations phénotypiques utilisées n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique complète et précise.

Tous les isolats ont été ensuite évalués pour estimer leur différents activités PGP pour l'un des caractères testés, Deux isolats ont été capable de solubiliser le phosphate avec des indices de solubilisation allant de 2.24 à 2.14. Seize isolats sont productifs d'acide indole acétique. A propos de l'activité antifongique, les isolats LD2 et LB1 ont développé un meilleur effet d'inhibition vis-à-vis le phytopathogène 1 para port au d'autre isolats contre les autre phytopathogènes, qui ont permis d'obtenir un taux d'inhibition varient entre 33% et 25% sur le champignon 1, La plupart des isolats ont la capacité de production des enzymes intéressants dégradant la paroi cellulaire (cellulase et amylase), et pour l'enzyme pectinase les 33 isolats ont été incapable de produire cette enzyme.

Une étude prolongée dans le futur, nécessite une identification génotypique précise des isolats par le séquençage du gène ARNr 16S, suivi par l'observation directe des effets PGPR sélectionnées, sur la croissance des plantes et une amélioration des souches, pour un rendement meilleur puisque les PGPR sont considérés comme des clés pour la résolution des contraintes de l'agriculture moderne, la rendant écologiquement saine. De plus, Il serait intéressant d'étudier d'autres activité PGP comme l'ACC désaminases, production d'ammoniac, production des sidérophores..., En effet, des études plus approfondies sur les interactions bactérie antagoniste et moisissures phytopathogènes.



*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Ahmad M, Ahmad I, Hilger TH, Nadeem SM, Akhtar MF, Jamil M, Hussain A, Zahir ZA. (2018).** Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. Peer J: 2–22
- Ait kaki. A. (2013).** Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire. (Thèse Doctorat. Université constantine).
- Akpa., Philippe Jacques., Bernard Wathelet., Regine., Herbert. (2001).** Influence des conditions de culture sur la production de lipopeptides par *Bacillus subtilis* .
- Alippi A et Monaco C. (1994).** Antagonisme in vitro des espèces de *Bacillus* contre *Sclerotium rolfsii* et *Fusarium solani*. *Revue de la faculté d'Agronomie*. 70: 91-95
- Amarger, N. (2002).** Genetically modified bacteria in agriculture. *Biochimie*, 84(11), 1061-1072.
- Andrea, M.S., A.M. Boyd, S. Henrik, F. Jorg, NT. Kenneth, et JM. Terry. (2008).** Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *BioMed. Central* 4:8.
- Avril J. L., Dabrenat H., Denis F., Monteil H. (1992).** Chapitre *Bacillus* In : Bactériologie Clinique 2<sup>ème</sup> édition, édition Markting. P: 135-149.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. (2005).** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1761-1778.
- Barnett HL. et Hunter BB. (1998).** Illustrated genera imperfect fungi: fourth edition. Edition: The American Phytopathological Society. Saint Paul. 218p.
- Beauchamp, C.J. (2021).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. Vol-74 (1) : 10p.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. et Passaglia, L. M. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Journal of genetics and molecular biology*. 35(4) :1044-1051.2
- Benkahoul, M., Talhi, A., Boulefkhad, M. (2017).** Bactéries des environnements chauds Algériens : isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *Sciences & Technologie*, N°45, pp.25-35.
- Bonmatin J.M., Laprévotte O and Peypoux F. (2003).** Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 6: 541-556.
- Brahim, S. (1998).** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec.

- Campbell ,R., Greaves M. P. (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere. *In: the rhizosphere.* Lynch I. M. (Eds). *Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology.* 11-34.
- Cho, T. J., & Rhee, M. S. (2018).** Underrecognized niche of spore-forming bacilli as a nitrite-producer isolated from the processing lines and end-products of powdered infant formula. *Food Microbiology.* 80 , 50-61 .
- Curl ,E. A., Truelove B. (1986).** The rhizosphere, *Advanced series in agriculture sciences.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 288.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. & Scannell, J.W. (2002).** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6(99): 10494-10499.
- Dastager, S.G., C.K. Deepa et A. Pandey (2010) .**Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.*, 27: 259-265
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ndEd., The Firmicute. Springer. New York. Volume 3: 63-67.
- Delarras, C. (2007).** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.* Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris
- Dommergues Y.,F.Mangenot. (1970).** *Ecologie Microbienne du sol.* Eds. Masson et Cie, Paris, 796 p
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Chikindas, M. L. (2019).** Recent Advances in the Physiology of Spore Formation for *Bacillus* Probiotic Production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* *Probiotics & Antimicro* , 11:731–747 pp.
- Elizabeth., E., & J. H. (1998).** *Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective.* USA : ELSEVIER
- Gagné ,S., Antoun, H., Richard, C. (1985).** Inhibition of phytopathogenic fungi by bacteria from soils and legume rhizosphere. *Canadian Journal of Microbiology.* 31:856-860.
- Garge SS, Nerurkar AS.** Evaluation of quorum quenching *Bacillus* spp. for their biocontrol traits against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot. *Biol Agric Biotechnol.* 2017;9:48–57
- Gaur ,AC (1990)** *Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizers*, 1st edn. Omega Scientific, New Delhi, India. ISBN 81-85399-09-3
- Gobat, J. M., Aragno, M. et Matthey, W. (2010).** *Le sol vivant : bases de pédologie, biologie des sols* (14). PPUR Presses polytechniques. 656
- Greathead, D. J., Kooyman, C., Launois-Luong, M. H., et Popov, G. B. (1994).** *Les ennemis naturels des 8 criquets du Sahel.* Collection acridologie opérationnelle N CILSS/DFPV, Niamey, Bp 12625. Niger.
- Gregory, J., et Hinsinger, P. (1999).** *New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview* (plant and soil, 211, Montpellier: INRA) 1-9.

- 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
- Hallman, J., A. Quadt-Hallman, W.F. Mahaffee et J.W. Kloepper. (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*,43: 895-914.
- Harwood, C.R., Wipat, A. (1996).** Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters*.389:84-87.
- Holl, FB. et CP. Chanway .(1992).** Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.*38: 303-308.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. & Bohannon, B.J.M. (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters* 6(7): 613-622.
- Illmer, P. et F. Schinner. (1995).** Solubilization of inorganic calcium phosphates – solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.*, 27(3): 257-263.
- Iqbal ,S., Khan, MY., Asghar, HN., Akhtar, MJ. (2016).** Combined use of phosphate solubilizing bacteria and poultry manure to enhance the growth and yield of mung bean in calcareous soil. *Soil Environ* 35: 146–154
- Jacques, P. D. (1993).** Les mécanismes biochimiques développés par les "Pseudomonas" fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agricultures* 2(5), 301-307
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J. M. (2003).** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and fertility of soils*, 37(1), 1-16.
- Jemni, M., Maaroufi, A et Mejri, S. (2009).** Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien. *Revue des Régions Arides*. Jerba, Tunisie. 1367- 1370
- Jijakly ,M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie, *In: Phytopathology*. Lepoivre P.(Eds). De Boeck, Bruxelles
- Joffin, J. N. et Leyral, G. (2006).** Microbiologie technique, 2ème Ed, Collection Biologietechnique. CRDP d'aquitaine, Bordeaux. 304p
- Joseph, B., RR. Patra et R. Lawrence. (2007).** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152
- Kelly, C.T. & Fogarty, W.M. (1978)** .Production and properties of polygalacturonate lyase by an alkalophilic microorganism *Bacillus* sp. RK9. *Canadian Journal of Microbiology* 29, 1164±1172.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., Miller, T.D. (1980).** Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70, 1078– 1082.

- Kennedy, A.C. and Smith, K.L., 1995.** Soil microbial diversity and the sustainable agricultural soils. *Plant and Soil*, 170, 75 – 86
- Keswani ,C., Singh ,H.B., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y.-W., Mezaache-Aichour, S., Glare T.R., Borriss R., Sansinenea E. 2020.** Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (3): 1013–1034.
- Khan, M. S ., A. Zaidi., et M. Javed. (2009).** *Microbial Strategies for Crop Improvement*. pp: 1-371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Knudsen, G.R. (2013).** *Phytopathologie : Etude de la santé des plantes*. 1<sup>ère</sup> Edition, Université d'Idaho. Moscow. USA
- Kowalchuk, G.A. & Stephen, J.R. (2001).** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol* 55(1): 485-529.
- Lebuhn , M., Heulin, T., Hartmann ,A. (1997).** Production of auxine and other indolic and phenolic compounds by Paeni bacillus polymyxa strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*.22: 325-334.
- Lepoivre, P. (2003).** *Les bactéries phytopathogènes*. La Phytopathology. Edition De Boeck. Bruxelles
- Lesuffleur, F. (2007).** Rhizodéposition à court terme de l'azote et exsudation racinaire des acides aminés par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Thèse de doctorat. Institut de biologie fondamentale et appliquée (IBFA). Université de CAEN, France
- Ling ,Lin F., Rong, X., Wei ,Fen L., Jiang ,Bing S., Ping ,L et Chun, Xia H. (2007).** Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis* : Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology Advances*. 25 (1): 1-12.
- Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J., Gardiner, N. (2010).** A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 499-508.
- Loper, JE., Schroth ,MN. (1986)** Influence of bacterial sources of indole-3- acetic acid on root elongation of sugar beet. *Chem Phys* 76:386–389,
- Loper ,JE., Schroth ,MN. (1986).** Importance of siderophores in microbial interactions in the rhizosphere. In: Swinburne TR, ed. *Iron, Siderophores and Plant Diseases*. New York: Plenum Press, 85–9.
- Lu WJ, Wang HT, Yang SJ, Wang ZC et Yong FN. (2005).** Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51 ,353–360
- Lugtenberg, B., Malfanova, N., Kamilova, F. Berg, G. (2013).** Plant growth promotion by microbes, In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. Journal de Bruijn (ed.), Chapter 53, Vol II, pp.: 559-573. Wiley-Blackwell Publisher, 1328 p.
- Lynch, J.M. (1983).** *Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity* blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Maki ,ML ., Broere, M ., Leung, KT et Qin, W. (2011).** Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J. Biochem. Mol. Biol.* 2 (2): 146-154
- Malek, F. (2015).** Interaction microbienne cours assure aux Master II microbiologie et Magistère Maitrise de la qualité et du développement microbien. Mémoire de magistère. Université de Tlemcen.
- Mandels, M, Reese ET .(1957)** Induction of cellulose in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol* 73(2):269–278
- Maplestone, PA. et R. Campbell .(1989).** Colonization of roots of wheat seedlings by bacilli proposed as biocontrol agents against takeall. *Soil Biol. Biochem.* 21(4): 543-550
- Mari M., Guizzardi M et Pratella G.C. (1996).** Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biology Control.* 7: 30-37.
- Mazoyer M. (2002).** Dictionnaire Larousse agricole. Edition ISBN. Canada.
- Milet . A. (2017).** Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose. (Thèse Doctorat. Université Constantine 1)
- Milus, EA et CS. Rothrock .(1993).** Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Revue canadienne de microbiologie* 39(3): 335-341
- Miraza, M S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et KA. Malik. (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, 237:47–54
- Mumtaz, MZ., Ahmad, M., Jamila, M., Hussain, T . (2017)** Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiol Res* 202:51–60
- Nagel, C.W. & Vaughn, R.H. ( 1961).** The characteristic of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93, 344±352.
- Nautiyal, CS. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbial. Lett.*, 170: 260-270
- Oldenburg K.R., Vo K.T., Ruhland B., Schatz P.J., Yuan Z. (1996).** A dual culture assay for detection of antimicrobial activity. *Journal of Biomolecular Screening* 1 (3): 123–130.
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart ,P. (2007).** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090
- Orozco-Mosqueda, M. d. C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C.A., Morales Cedeño, L.R., Valencia-Marin, M.F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D. et Santoyo, G. (2021).** Plant-Growth Promoting Bacteria as Bioinoculants Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement, *Agronomy* ,MDPI, 11(1167): p 1-2.
- Otajewwo FD et Aluyi HSA. (2011).** Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium. *Modern Applied Science.* 5 (3): 141-151.

- Patil, S, C. T. Shivannavar<sup>1</sup>, M. C. Bheemaraddi<sup>1</sup>, and S. M. Gaddad. (2015).** Antiphytopathogenic and Plant Growth Promoting Attributes of *Bacillus* Strains Isolated from Rhizospheric Soil of Chickpea, *J. Agr. Sci. Tech. (2015) Vol. 17: 1365-1377*
- Pivato, B., Offre P., Marchelli, S. Barbonaglia, B., Mougel C., Lemanceau, P., et al. (2009).** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19(2): 81-90
- Prescot, L. M. (2002).** Microbiology, 5TH edition, P : 120-150
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raghuchander, V. Prakasam et R. Samiyappan (2001).** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20:1–11.
- Rillig, M.C. & Mummey, D.L. (2006).** Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol* 171(1): 41- 53.
- Rocher, F. (2004).** Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : Evaluation du systémier phloémienne de nouvelles moléculaires à l'effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. Thèse de Doctorat. Sciences fondamentales et appliqués. Université de Poitiers
- Santos, E. R., Gouveia, E. R., Mariano, R. L. R., & Souto-Maior, A. M. (2006).** Controle biológico da mancha aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. *Summa Phytopathologica*, 32(4), 376-378
- Sarah, D., Ellis ,S.D et B€Ehn, MJ. (2008).** Plants get sick too an introduction to plant disease. Ohio State University Extension. 401-405
- Schisler, M. J.; Khan, N. I.; Boehm, D. A.; Lipps, P. E. and Slininger, P. J. (2004).** Field testing of antagonists of Fusarium head blight incited by Gibberella zeae. *Biological Control*, 29: 245 – 255
- Schroder, P. et Hartmann, A. (2003).** Global Soils: New Developments in Rhizosphere Research. *Journal of Soils and Sediments*. 3 (4). 227p.
- Setlow, P., Johnson, EA . (2007)** Spores and their significance. *Curr Opin Microbiol* 6:550–556
- Sharma ,D. K. And Muehlbauer, F. J., (2007).** Fusarium Wilt Of Chickpea: Physiological Specialization. *Genetics Of Resistance And Resistance Gene Tagging. Euphytica.*, 157: 1-14
- Sharma, S., Gul Khan.,F. et Nabi Qazi G. (2010).** Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1821–1828.
- Shonkor, KD et Ajit, V. (2011).** Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. *Soil enzymology.* 2, 25-45
- Singleton, P. (2005).** Bactériologie: Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6 ème édition. Dunod- Paris, p.480-490.

**Slepecky, R. A. And Hemphill, H. E., (2006).** The Genus *Bacillus*—Nonmedical Chapter 1.2.16, pp: 530–562. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., *The Prokaryotes 3rded.* Vol. 4, Springer Science+Business Media, LLC.

**Somasegaran, P., and Hoben, H. J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Methods in Legume–Rhizobium Technology. Heidelberg, NY: Springer.

**Suman, B., Gopal, AV., Reddy, RS., Triveni, S. (2018)** Cultural and morphological characterization of native *Pseudomonas fluorescens* isolates from Telangana. *Int J Pure App Biosci* 6:592–597

**Talaro, K. P et Talaro A. (2002).** The Gram-positive Bacilli of medical importance In: *Foundation in microbiologie* 4th Edition.

**Teather RM, Wood PJ. (1982)** Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 43(4):777–780

**Todar, K. (2008)** .OnlineTextbook for Bacteriology :The Genus *Bacillus*.

**Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro I. 2018.** Antifungal activity of Lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology* 9: 1315.

**Tortora, G., Caputo, R., Damiano, V., Melisi, D., Bianco, R., Fontanini, G., & Ciardiello, F. (2003).** Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 and protein kinase a antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. *Clinical cancer research*, 9(4), 1566-1572.

**Toure, Y., Ongena ,M., Jacques, P., Guiro ,A et Thonart P. (2004).** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on appel. *Applied Journal of Microbiol.* 96: 1151-1160

**Van Loon, LC., PA. Bakker et CM. Pieterse. (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453–483.

**Vieira Costa, b. C. (2018).** Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH*, 1

**Westover ,K.M., Kennedy A.C., Kelley S.E. (1997).** Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with Co-occurring plant species. *Journal of Ecology.* 85: 563-873.

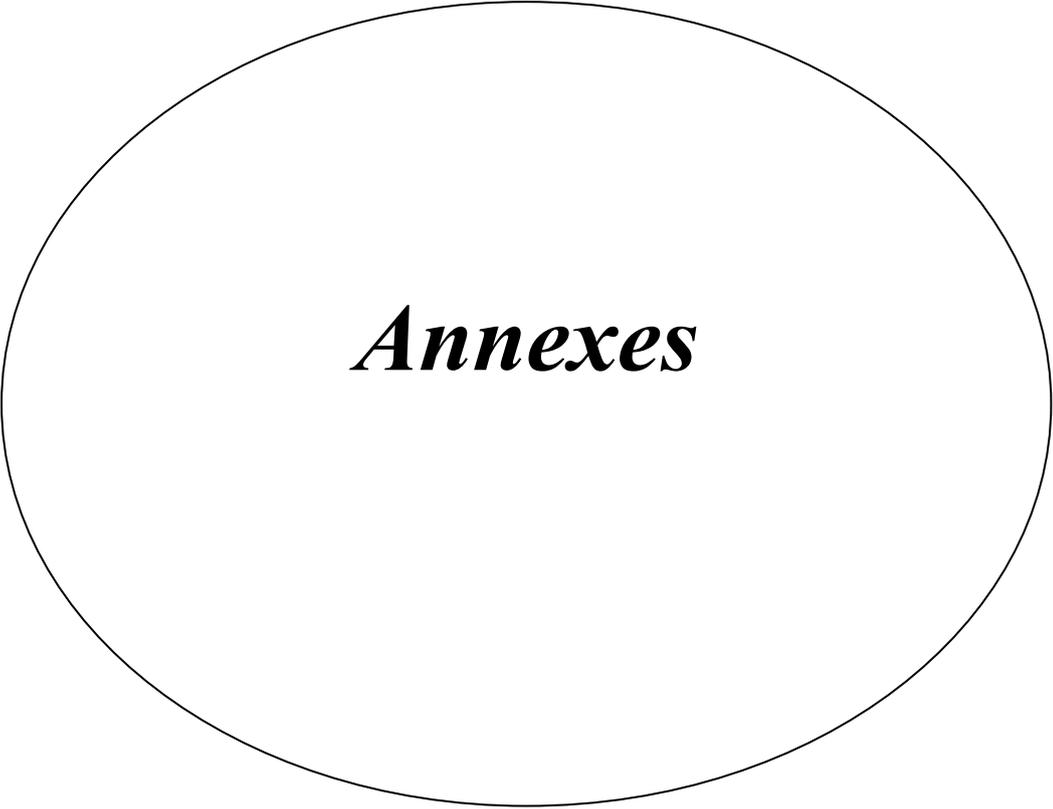
**Whipps, J. M. (1990).** Carbon economy in the rhizosphere. In: *Ecological and applied microbiology.* Lynch J.M. (Eds). Wiley Series. 59-97

**Whipps, J. M. et Lynch J. M. (1985).** Energy losses by the plant in rhizodeposition. *Plant products and the new technology.*

**Wolfgang, S . ( 2003 ).** The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon , 8(3): 207–217

**Yueju Zhao, Jonathan, Nimal Selvaraj, Fuguo Xing, Lu Zhou, Yan Wang, Huimin Song, Xinxin Tan, Lichao Sun, Lancine Sangare, Yawa Minnie Elodie Folly, Yang Liu .**

**(2014).**Antagonistic Action Of Bacillus Subtilis Strain SG6 On Fusarium Graminearum, Plos ONE 9(3): E92486.



***Annexes***

## Annexe

---

### Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

➤ **Milieu Luria-Bertani (LB)**

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	10g
Agar	20g
Eau distillée	1L

PH =7,0 ; Stérilisation à 120°C pendant 25 min.

➤ **Milieu Gélose nutritive(GN)**

Peptone	10g
Extrait de viande	3g
Glucose	5g
NaCl	5g
Agar	20g
Eau distillée	1L

PH =7,0 ± 0,2 ; Stérilisation à 121°C pendant 15 min.

➤ **Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distillée	1L

PH =5,6 ± 0,2 ; Stérilisation à 121°C pendant 30 min.

## Annexe

---

### ➤ Milieu Pikovskaya (PVK)

Glucose	10g
Extrait de levure	0,5 g
KCl	0,2g
NaCl	0,2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,002g
FeSO <sub>4</sub>	0,002g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5g
Agar	20g
Eau distillée	1L

PH =7,0 ; Stérilisation à 121°C pendant 15 min.

### ➤ Bouillon LB additionnée de 0,2g /l de Tryptophane

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Tryptophane	0,2g
Eau distillée	1L

PH =7,0 ; Stérilisation à 120°C pendant 25 min.

### ➤ Milieu Carboxyméthylcellulose (CMC)

Cellulose	5g
Extrait de levure	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub>	5g
Agar	20g

Eau distillée 1000L

PH =5,0 ; Stérilisation à 120°C pendant 20min.

## Annexe

---

➤ **Milieu gélose nutritive contenant 1% d'amidon soluble**

Amidon Soluble	10g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2,5g
Peptone	5g
NaCl	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000L

PH =7,2 ; Stérilisation à 121°C pendant 30min.

➤ **Milieu Pectine Agar**

Pectine	5g
Extrait de levure	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000L

PH =5,0 ; Stérilisation à 110°C pendant 30min.

### Annexe2 : Les réactifs

#### ➤ Réactif de de Salkowski

FeCl<sub>3</sub> (0,5 M) 1ml

Acide perchlorique (35%) 50 ml

50 ml d'acide perchlorique à 35% + 1ml de fecl<sub>3</sub> à 0.5M.

### Annexe3 : Techniques de colorations

#### ➤ Coloration de Gram

A partir d'une colonie de 24h, un frottis est fixé à la chaleur puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, ensuite il est éliminé par l'ajout du Lugol pendant une minute. Le frottis est ensuite décoloré avec de l'éthanol jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis.

A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes. Ensuite, le frottis est soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine, pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage, le frottis est séché puis examiné, consécutivement, à l'objectif 40X et à immersion 100 X (Singleton, 2005).

#### ➤ Coloration des endospores

D'abord, le frottis fixé à la chaleur est recouvert par le vert de Malachite, colorant primaire, puis chauffé jusqu'à évaporation pendant environ 5 minutes, la chaleur favorise la pénétration du colorant à travers la paroi de l'endospore. La préparation est ensuite lavée à l'eau pendant environ 30 secondes. Pour colorer les constituants bactériens qui ne sont pas des endospores, le frotti est traité par la safranine qui est un contre colorant. Si le frottis est correctement préparé, les endospores apparaîtront en vert à l'intérieur des cellules bactériennes colorées en rouge ou rose (Tortora *et al.*, 2003).

### Annexe 4 : Courbes d'étalonnages (Hamoum, 2017)

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

