

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par Mlles

BELGHIT Houria & TADMOUT Yousra Khouloud

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Science biologique

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

**Caractérisation du potentiel PGP de
*Bacillus rhizosphérique***

Soutenu publiquement le : 29-06-2022

Devant le Jury

Président :	DJIBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Examineur :	BOUZNAD Ahcene	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur :	HAMOUM Hakim	MCB	Université de Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire pédagogique de microbiologie n°

1 Année Universitaire 2021/2022

*« Ce ne sont pas les plus gros,
les plus brillants ou les
meilleurs qui vont survivre,
mais ceux qui s'adaptent le
plus rapidement. »*

Charles Darwin

Avant-propos

Nous tenons tout d'abord à remercier très chaleureusement et présenter notre reconnaissance à un grand monsieur 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. : notre encadreur Mr HAMOUM Hakim, maitre de conférences B.

Nous remercions respectueusement les membres de jury : Mr DJIBAOUI R et Mr BOUZNAD L pour l'honneur qu'ils nous ont fait d'avoir acceptés de juger et d'examiner notre travail.

Nous profitons également de l'occasion pour remercier tous nos professeurs pour avoir contribué à notre formation tout au long de notre cursus universitaire.

Nos vifs remerciements sont adressées à nos collègues et amies : Mme : MEDJAHED Saida , Mme BEDDANI Sara et Mr NEDDER Djaafar qui nous ont vraiment aidé lors de notre travail. Que toutes celles et ceux qui nous ont aidés de près ou de loin trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements.

Notre immense gratitude va , bien évidemment , à nos chers parents pour leur soutien matériel et moral.

Merci à tous ceux et celles qui ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui et ce que nous serons demain.

Dédicaces

À Mama , Papa et Grand mère .

À mes frères et mon adorée et joviale belle sœur .

*À ma chère tante , mamati et grande sœur dont tous les mots n'expriment pas
la valeur : PR Neddar Setti .*

À la mémoire de mon défunt oncle : PR Neddar Bel Abbes .

*À tous les membres de ma famille du plus vieux au plus jeune et à ceux/celles
qui ne sont pas encore né(e)s.*

À mon ami, professeur et papa adoptif : Mr le RENARD.

À mon ami et mon mentor : Mr Kenancha T

Au fleuve de tendresse et de bonté Mme Ghomari S.A et son adorable fille.

À ma meilleure : Mlle Belghit Houria.

*À toute l'équipe « **El Gosto Eat** » qui nous a fait goûter de ses délices et nous
a offert les plus beaux des services dans les moments de stress et de pression.*

" À l'avenir et au présent surtout " .

Au monde .

Et bien sûr à moi-même.

ありがとう

Yusra Khouloud .

Dédicaces

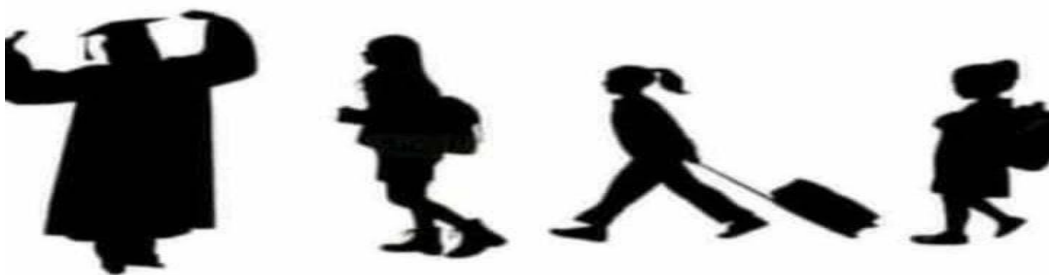
Je dédie ce travail à l'homme qui a pris ma main avant dix-sept ans à l'école pour ma première année et qui est présent aujourd'hui pour ma soutenance, à mon cœur, qui a toujours cru en moi, à ma force aux moments de faiblesse et ma vie « Ba ».

Dear Papa, Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais jamais te remercier comme il se doit et aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Je t'aime énormément !

A ma très chère maman

A mes chers (e) frères et sœurs : Cherifa, Bilel, Halima, Lahssen

A ma copine : Youssra, je n'oublierai jamais les merveilleux moments qu'on a passés ensemble !



Houria

Sommaire

Avant-propos	<i>i</i>
Sommaire	<i>ii</i>
Liste des abréviations	<i>iv</i>
Liste des figures	<i>v</i>
Liste des tableaux	<i>vi</i>
Résumé	<i>vii</i>
Abstract	<i>viii</i>
المخلص	<i>viii</i>
Introduction	1
Chapitre I . Revue bibliographique	
I. Microbiologie du sol	03
I.1. Définition.....	03
I.2. Microflore du sol	03
II. La rhizosphère	04
II.1. Définition.....	04
II.2. Historique.....	05
II.3. Rôle des racines dans la rhizosphère.....	05
II.4. Rôle des microorganismes dans la rhizosphère.....	06
II.5. Les rhizobacteries.....	07
II.6. Les rhizobacteries promotrices de la croissance des plantes.....	08
II.6.1. Définition.....	08
II.6.2. Mécanismes d'action des PGPR	09
II.6.2.1. Mécanismes directes.....	09
II.6.2.1.1. Fixation d'azote.....	09
II.6.2.1.2. Solubilisation du phosphate.....	09
II.6.2.1.3. Solubilisation du Zinc.....	10
II.6.2.1.4. Production de phytohormones.....	10
II.6.2.1.4.1. Acide Indole Acétique.....	10
II.6.2.1.4.2. Gibbérellines et cytokinines.....	11
II.6.2.2. Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) désaminase.....	12
II.6.2.3. Mécanismes indirectes.....	13
II.6.2.3.1. La production des sédirophores.....	13
II.6.2.3.2. Compétition pour l'espace et les nutriments.....	13
II.6.2.3.3. L'antibiose.....	13
II.6.2.3.4. Résistance systémique induite	14
II.6.4. Diversité taxonomique des PGPR	14

II.6.5.	<i>Bacillus</i>	15
II.6.5.1.	Taxonomie.....	15
II.6.5.2.	Habitat et écologie.....	16
II.6.5.3.	Caractéristiques bactériologique.....	16
II.6.5.4.	Caractéristiques physiologiques.....	16
III.	Utilisation de <i>Bacillus Spp</i> en agriculture	17
III.1.	Exemples de souches utilisées.....	17
III.1.1.	La souche <i>B.subtilis</i> QST 713.....	17
III.1.1.1.	Présentation de produit à base de <i>B.subtilis</i> QST 713.....	17
III.2.	Exemples d'autres souches.....	18
Chapitre II . Matériels et méthodes		
II.1.	Echantillonnage.....	20
II.2.	Isolement de <i>Bacillus</i>	21
II.3.	Conservation.....	24
II.4.	Identification du genre <i>Bacillus</i>	24
II.4.1.	Aspect macroscopique.....	25
II.4.2.	Aspect microscopique.....	25
II.4.2.1.	Observation microscopique à l'état frais.....	26
II.4.3.	Mise en évidence des spores.....	26
II.4.4.	Test de catalase.....	26
II.4.5.	Test de mannitol-mobilité.....	26
II.4.6.	Détermination du type respiratoire.....	26
II.4.7.	Test de l'hémolyse.....	27
II.5.	Tests du potentiel PGP.....	27
II.5.1.	Solubilisation du phosphate.....	27
II.5.2.	Solubilisation du zinc.....	27
II.5.3.	Fixation d'azote.....	28
II.5.4.	Production de l'acide indole acétique.....	28
II.5.5.	Production de l'acide cyanhydrique (HCN).....	29
II.6.	Traitement statistique.....	30
Chapitre III. Résultats et discussion		
III.	Résultats.....	31
III.1	Identification du genre <i>Bacillus</i>	31
III.2.	Screening du potentiel PGP des isolats.....	34
III.2.1.	Solubilisation du phosphate.....	35
III.2.2.	Solubilisation du zinc.....	36
III.2.3.	Fixation d'azote.....	37
III.2.4.	Production d'acide indole acétique (AIA).....	38
III.2.5.	Production de l'acide cyanhydrique (HCN).....	40
III.3.	Discussion.....	41
	Conclusion	45
	Références bibliographiques	46
	Annexes	

Liste des

abréviations ACC : Aminocyclopropane -1-
carboxylique

AIA : Acide indole acétique

ARN : Acide ribonucléique

ASO : App Store Optimization

BR : Bunt et Rovira

Ca₃(PO₄)₂ : Phosphate de calcium

CAT :Catalase

DO :Densitéoptique

ES : Efficacité de solubilisation

FeCl₃ : Le chlorure de fer(III)

GN :Gélose nutritive

HCN :Hydrocyanidricacid

ISR : Inducedsystemicresistance

KDA : Kilo Dalton

LB : Luria-Bertani

M : Molaire

MSP : Microorganisme solubilisant le phosphate

MSZ : Microorganisme solubilisant le zinc

N : Azote atmosphérique

N₂ : Azote diatomique

NO₃ : Ions nitrates

P :Phosphore

PGP : Plant Growth Promotion

PGPR : Plant growthpromotingRhizobacteria

PVK : Pikovskaya

Rpm : Tours par minute

Sp : Espèce

VF : Viande-Foi

M@>7Plate Count Agar

Liste des figures

Figure 1.	Classification des organismes du sol selon leur taille modifiée.....	04
Figure 2.	Représentation des trois compartiments de la rhizosphère	05
Figure 3.	Agglutination et formation d'un agrégat de sol consécutives à l'activité microbienne de décomposition d'une particule de matière organique	07
Figure 4.	Molécule d'AIA et son précurseur le tryptophane.....	11
Figure 5.	Mécanismes d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stress abiotique.....	12
Figure 6.	Arbre représentant la diversité taxonomique des PGPR.....	14
Figure 7.	Le produit Rhapsody ASO, made in Mexico	18
Figure 8.	Échantillons prélevés des champs de Courgette , L'ail et l'haricot vert successivement	20
Figure 9.	Localisation des échantillons prélevés.....	21
Figure 10.	Représentation de l'isolement de <i>Bacillus</i> à partir de l'ectorrhizosphère..	22
Figure 11.	Représentation de l'isolement de <i>Bacillus</i> à partir de l'épiphyte.....	23
Figure 12.	Représentation de l'isolement de <i>Bacillus</i> à partir de l'endorrhizosphère.....	24
Figure 13.	La réactivation des souches.....	25
Figure 14.	Estimation de la production de l'acide indole acétique.	29
Figure 15.	Production d'HCN par <i>Bacillus</i> sp.....	29
Figure 16.	Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PAZ11 (Objectif X100).....	31
Figure 17.	Résultat de la coloration positive du spore	32
Figure 18.	Résultat du test de mannitol-mobilité	32
Figure 19.	Résultat du test de type respiratoire	32
Figure 20.	Résultat du test de l'hémolyse	33
Figure 21.	Représentation du pourcentage du test de l'hémolyse des isolats	33
Figure 22.	Solubilisation du phosphate sur milieu PVK	35
Figure 23.	Efficacité de solubilisation du phosphate par les isolats	36
Figure 24.	Solubilisation- du zinc sur milieu BR.	36
Figure 25.	Efficacité de solubilisation du zinc par les isolats.....	37
Figure 26.	La fixation de l'azote sur milieu Burkn-free.....	37
Figure 27.	Représentation du pourcentage de la fixation d'azote par les isolats.....	38
Figure 28.	Résultat de la production de l'AIA.....	39
Figure 29.	Taux de production de l'acide indole acétique par les isolats.....	39
Figure 30.	Résultat négatif de la Production de l'acide cyanhydrique (HCN)	40
Figure 31.	Représentation du pourcentage de la production d'HCN par les isolats.....	40

Liste des tableaux

Tableau 1.	Classification de <i>Bacillus</i>	15
Tableau 2.	Bactéries du genre <i>Bacillus</i> ayant démontré des effets prometteurs contre diverses maladies des plantes.....	19
Tableau 3.	Coordonnées géographiques des échantillons.....	21
Tableau 4.	Caractères biochimiques et physiologiques des isolats.....	34
Tableau 5.	Les potentiels PGP des isolats.....	41

Résumé

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont des bactéries bénéfiques qui colonisent les racines des plantes et améliorent leur croissance par une grande variété de mécanismes, leur utilisation est en constante augmentation dans l'agriculture. Dans ce travail, nous avons étudié le potentiel de production de quelques activités liées à la PGP de onze rhizobactéries du genre *Bacillus* qui ont été isolées à partir des champs de différentes plantes, cultivés dans des zones à Mostaganem, au nord-ouest de l'Algérie. Après avoir isolé les rhizobactéries à partir des trois compartiments de la rhizosphère, différents tests d'identification ont été réalisés, ensuite tous les isolats ont été testés pour évaluer leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, solubiliser le phosphate et le zinc, produire l'acide indole acétique et la production de cyanure d'hydrogène. Les résultats ont montré que les isolats : LAX11, LAX12, PBX4, PAY2, PAY8, PAZ10, PAZ11, PAX13 et PDY7 ont induit la production de d'acide indole acétique (AIA) avec des taux allant de $4,58^h \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ jusqu'à $25,16^a \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$, tous les isolats ont été fixateurs d'azote alors qu'aucun isolat n'était capable de produire l'HCN. La plupart des isolats ont formé un halo transparent autour des colonies, signifiant la solubilisation du zinc avec des valeur d'ES allant de $207,12^c \pm 6.56$ à $250^a \pm 11$ et la solubilisation du phosphate sur le milieu pikvoskaya avec des valeur d'ES allant de $209,33^c \pm 9.02$ à $550^a \pm 12$. Les résultats obtenus augurent de la possibilité d'utiliser la rhizobactérie *Bacillus* comme un engrais biologique pour de meilleurs rendements.

Mots clés : PGPR, *Bacillus*, Solubilisation du phosphate, Solubilisation du zin, Fixation d'azote , IAA , HCN .

Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial bacteria that colonise plant roots and enhance their growth through a wide variety of mechanisms, and their use is constantly increasing in agriculture. In this work, we investigated the production potential of some PGP-related activities of eleven rhizobacteria of the genus *Bacillus* that were isolated from the fields of different plants, grown in areas in Mostaganem, northwestern Algeria. After isolating the rhizobacteria from the three compartments of the rhizosphere, different identification tests were performed, then all isolates were tested for their ability to fix atmospheric nitrogen, solubilise phosphate and zinc, produce indole acetic acid and produce hydrogen cyanide. The results showed that isolates: LAX11, LAX12, PBX4, PAY2, PAY8, PAZ10, PAZ11, PAX13 and PDY7 induced the production of indole acetic acid (IAA) with levels ranging from $4.58^h \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ up to $25.16^a \pm 0.73 \mu\text{g/ml}$, all isolates were nitrogen fixers while none of the isolates were able to produce HCN. Most isolates formed a transparent halo around the colonies, signifying zinc solubilisation with ES values ranging from $207.12^c \pm 6.56$ to $250^a \pm 11$ and phosphate solubilisation on pikvoskaya agar medium with ES values ranging from $209.33^c \pm 9.02$ to $550^a \pm 12$. The results obtained point to the possibility of using *Bacillus* rhizobacteria as an organic fertiliser for better yields.

Key words: PGPR, *Bacillus*, Phosphate solubilisation , Zinc solubilisation , Nitrogen fixation , IAA , HCN .

المخلص

البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات (PGPR) هي بكتيريا مفيدة تستعمر جذور النباتات وتعزز نمو النبات من خلال مجموعة متنوعة من الآليات ، ويتزايد استخدامها بشكل مطرد في الزراعة. في هذا العمل ، درسنا إمكانيات الإنتاج لبعض الأنشطة المتعلقة بـ PGP لإحدى عشرة بكتيريا جذرية من جنس *Bacillus* والتي تم عزلها من حقول مختلف النباتات المزروعة في مناطق في مستغانم ، شمال غرب الجزائر. بعد عزل البكتيريا الجذرية من الأجزاء الثلاثة من الجذور ، تم إجراء اختبارات تعريف مختلفة ، ثم تم اختبار جميع العزلات لتقييم قدرتها على تثبيت النيتروجين في الغلاف الجوي ، وإذابة الفوسفات والزنك ، وإنتاج إندول حامض الخليك و إنتاج سيانيد الهيدروجين بعد فترة الحضانة المطلوبة لكل اختبار ، أظهرت النتائج أن العزلات LAX11 و LAX12 و PBX4 و PAY2 و PAY8 و PAZ10 و PAZ11 و PAX13 و PDY7 استحثت إنتاج حمض أندول الخليك (IAA) بمعدلات تتراوح من 0.33 ± 4.58^h ميكروغرام / مل حتى 0.73 ± 25.16^a ميكروغرام / مل ، جميع العزلات كانت مثبتة للنيتروجين بينما لم تكن أي عزلة قادرة على إنتاج HCN. شكلت معظم العزلات هالة شفافة حول المستعمرات ، مما يدل على ذوبان الزنك بمعدلات ES تتراوح من 6.56 ± 207.12^c إلى 11 ± 250^a ، وإذابة الفوسفات على وسط أجار بيكفوسكايًا بمعدلات ES تتراوح من 9.02 ± 209.33^c إلى 12 ± 550^a . تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى إمكانية استخدام البكتيريا الجذرية *Bacillus* كسماد بيولوجي لتحقيق عوائد أفضل.

الكلمات المفتاحية : PGPR ، *Bacillus* ، إذابة الفوسفات ، إذابة الزنك ، تثبيت النيتروجين ، حمض أندول الخليك حمض الهيدروسيانيك .

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**).

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**) et le genre *Bacillus* figure en tête de liste.

La dynamique des populations d'organismes introduits et leurs effets sur la santé des plantes ou sur les populations de pathogènes ont souvent été soigneusement étudiés (**Kloepper et al., 1980 ; Okon et Kapulink, 1986, Bull et al., 1991**), et il existe des études sur les effets des microorganismes introduits autres que les pathogènes(**Siciliano et Germida, 1998**) et des travaux sur les voies de succession (**Steer et Harris, 2000**), mais des articles où la croissance des plantes est considérée en même temps que la dynamique des populations inoculées dans le temps sont rares.

Une question intéressante est celle de la spécificité de la réponse de la croissance des semis après inoculation avec des PGPR. Comme les PGPR sont fréquemment isolés à partir d'une espèce végétale différente de celles où elles sont ensuite introduites, cette spécificité pourrait être un obstacle au développement d'inoculants racinaires efficaces pour une utilisation dans les programmes de pépinières ou de cultures de plein champ (**Enebak et al., 1998**). L'élaboration de mesures efficaces pour les inoculants microbiens demeure un défi scientifique majeur (**Richardson, 2001**). En outre, la sélection d'une souche PGPR efficace

est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale. (**Cattelan et al., 1999**).

Parmi les bactéries inoculantes utilisées à ces fins il y en a qui appartiennent principalement au genre *Bacillus* (**Holl et al., 1988**). Les inoculants à base de *Bacillus* sont particulièrement intéressants car (au moins en théorie) grâce à l'utilisation de PGPR formant des spores, gram-positifs ils peuvent persister dans les champs pendant de longues périodes et peuvent aussi être produits et stockés à des fins commerciales. L'utilisation de la technologie PGPR dans les deux dernières conditions expérimentales peut produire des plantes forestières plus vigoureuses et, par conséquent, pourrait améliorer la survie de ces plantes lorsqu'elles sont plantées sur le terrain à des fins de reforestation. (**Probanza A et al., 2002**).

L'objectif de la présente étude était donc d'estimer les potentialités du genre *Bacillus*, isolé du sol, conduisant à l'amélioration de la croissance des plantes.

*Revue
bibliographique*

I. La microbiologie du sol

I.1. Définition

Le sol est normalement considéré comme la terre fine qui recouvre les surfaces terrestres à la suite de l'altération in situ des matériaux rocheux ou de l'accumulation de matières minérales transportées par l'eau, le vent ou la glace. La particularité du sol est qu'à cette matière minérale altérée s'ajoute de la matière organique (**Doran et Zeiss, 2000**). Cette matière organique peut être à la fois vivante et morte. La matière organique morte comprendra des racines et des feuilles de plantes mortes peu modifiées et fraîchement ajoutées et d'autres litières végétales, de la faune morte et de la matière organique à divers stades de décomposition, allant de matières relativement fraîches peu modifiées à la matière décomposée complexe appelée humus. C'est ce mélange de matières minérales et organiques qui donne aux sols leurs caractéristiques distinctives. (**Luo et al., 2020**).

À la surface de la terre, il existe de nombreux types de sols différents qui reflètent, au moins en partie, diverses combinaisons de matières minérales et organiques et leurs différentes réponses - à la fois séparément et souvent en association complexe - à différentes conditions environnementales. En effet, le sol (et les constituants du sol), avec la vie végétale qu'il supporte, la roche sur laquelle il repose et le climat qu'il subit, forme un système finement équilibré. (**Nortciff et al., 2006**).

I.2. La microflore du sol

Les organismes présents dans le sol comprennent des bactéries, des champignons, des algues, des parties souterraines de plantes et des animaux allant des protozoaires aux mammifères (**Gobat et al., 2010**) que les pédologues classent généralement en fonction de leur taille, bien que d'autres classifications existent (par régime alimentaire, par leur habitat). Dans cette classification, les bactéries et les champignons sont regroupés en tant que microbiomes (moins de 10 μm de taille ou de diamètre). Les protozoaires et les nématodes d'une taille comprise entre 10 et 200 μm sont classés comme microfaune. Ensuite, les animaux de taille moyenne sont principalement constitués de collemboles et d'acariens (entre 200 μm et 2 mm). Enfin, la grande faune comprend les invertébrés de plus de 2 mm : les principaux représentants sont les vers de terre, les larves d'insectes, les myriapodes, les limaces, etc. Certaines classifications incluent la mégafaune, y compris les vertébrés terrestres tels que les taupes ou les campagnols (**Fig.1**), (**Swift et al., 1979**).

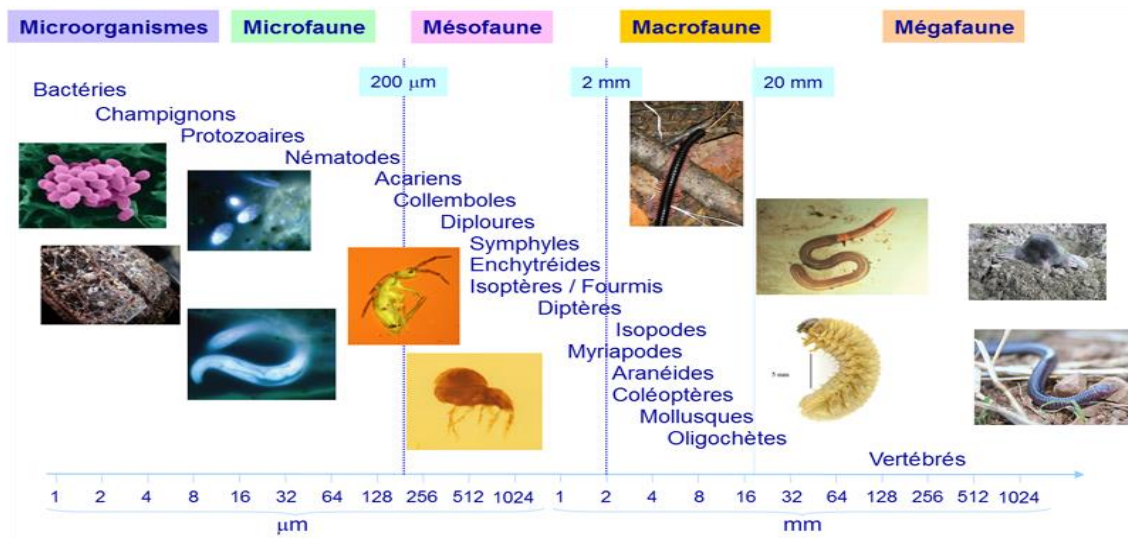


Figure1 : Classification des organismes du sol selon leur taille modifié d'après (Swift *et al.*, 1979)

Les microbes du sol sont des acteurs clés dans d'importants processus écologiques tels que les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre, et affectent directement toute la vie sur Terre (Garbeva *et al.* 2004). Notez que 1 g de sol/sédiment peut contenir 10⁹ cellules bactériennes (Whitman *et al.* 1998).

II. La Rhizosphère

II.1. Définition

Une rhizosphère est le volume sédimentaire où la croissance des microorganismes est directement influencée par l'activité des racines et des rhizomes, souvent par l'échange de composés avec les plantes, elle représente ainsi la région du sol influencée par les racines et les microorganismes associés (York *et al.*, 2016) Cette zone comprend la majorité des organismes du sol car ils bénéficient des exsudats racinaires. On compartimente la rhizosphère en trois grandes composantes qui interagissent ensemble : l'exorhizosphère sol, la rhizoplane et les racines (Barea *et al.*, 2005)(Fig.2).

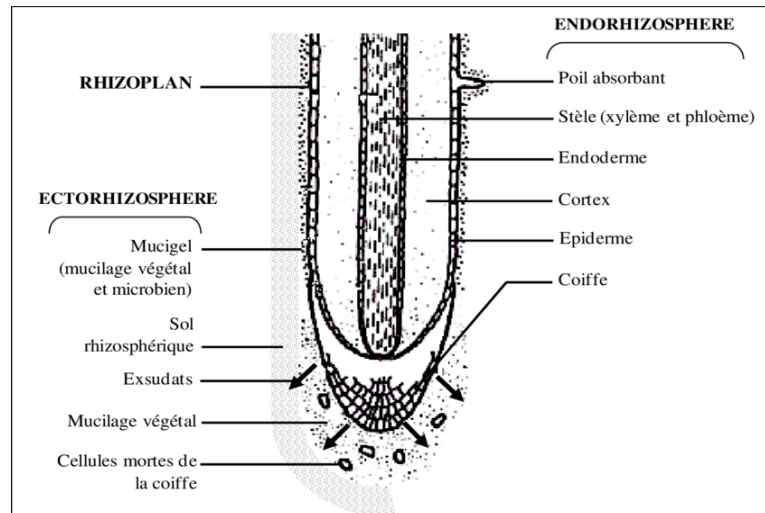


Figure 2 : Représentation des trois zones de la rhizosphère (Lynch 1983).

II.2. Historique

Le scientifique allemand Hiltner (1904) a été le premier à proposer l'idée que les plantes ne sont pas seulement influencées par le sol, mais qu'elles y participent activement par le biais des racines, créant ainsi la rhizosphère, et depuis lors, le développement de la théorie de la rhizosphère a été constant et l'utilisation du préfixe latin rhizo est devenue populaire, et parfois la création de nouveaux mots semblait prendre le pas sur l'avancement de concepts clairs. Le rhizoplane a été introduit par Clark (1949) et défini comme "les surfaces externes des racines des plantes ainsi que toutes les particules de sol ou de débris qui y adhèrent étroitement". Cependant, les recherches ultérieures ont utilisé ce terme de manière ambiguë, souvent en raison des limites des approches expérimentales. Parfois, lorsque les racines sont extraites du sol ou d'autres milieux, seul le sol adhérant aux racines est considéré comme la rhizosphère, et l'épiderme racinaire lavé et exempt de particules de sol est considéré comme le rhizoplane (Cook et Lochhead, 1959 ; Wieland *et al.*, 2001 ; Bulgarelli *et al.*, 2012).

II.3. Rôle des racines

La rhizosphère est un milieu enrichi en matières organiques par les racines ; un processus majeur dans la rhizosphère consiste en la rhizodéposition de composés carbonés par les racines. Il est estimé que 40 % du C assimilé par les plantes au cours de la photosynthèse est alloué au compartiment souterrain, avec des variations importantes suivant les espèces végétales et leur environnement. (York *et al.*, 2016). Un tiers de ce C permet l'élaboration de la biomasse racinaire, un second tiers est respiré par les racines,

alors qu'un dernier tiers correspond à la rhizodéposition qui constitue une source d'énergie essentielle pour les microorganismes du sol. Les activités et les structures des communautés microbiennes de la rhizosphère sont ainsi considérablement affectées par rapport au reste du sol. Le sol est en effet un milieu contraignant par la faible disponibilité et accessibilité des ressources, notamment en C. Ainsi, les points d'entrée de matières organiques fraîches que sont les racines et leurs rhizodépôts (notamment les exsudats racinaires) jouent un rôle majeur en écologie microbienne des sols, en stimulant les activités microbiennes et l'ensemble des chaînes trophiques qui en découlent. Par ailleurs, ce processus qui a lieu notamment à l'apex des racines, contribue à injecter des composés carbonés sur l'ensemble du profil de sol colonisé par les racines. Ce processus ne concerne pas seulement le cycle biogéochimique de C puisque les rhizodépôts peuvent contenir des nutriments (azote (N)) ou stimuler la minéralisation de matières organiques du sol et des nutriments (N ou phosphore (P))(Philippe, 2010).

La rhizodéposition est un processus pour lequel il manque encore de données quantitatives compte tenu de la difficulté de l'estimer au champ. Il existe de multiples facteurs génétiques et environnementaux de régulation de la rhizodéposition, qui compliquent la prédiction des flux mis en jeu effectivement dans les agro-écosystèmes et leur contribution à la séquestration de C dans les sol (Philippe, 2010)

II.4.Rôle des microorganismes dans la rhizosphère

Certains microorganismes interagissent avec des plantes spécifiques. Ces interactions peuvent être pathogènes, symbiotiques, nocives, saprophytes, ou neutres. Les interactions bénéfiques pour l'agriculture comprennent les mycorhizes, la nodulation des légumineuses et la production de composés antimicrobiens qui inhibent la croissance des agents pathogènes. (Barbault, 2008).

Les microorganismes convertissent les formes organiques des nutriments en formes inorganiques que les racines des plantes peuvent absorber. Chez les légumineuses, les nodulations racinaires microbiennes permettent aux plantes de fixer l'azote de l'air. Ils produisent des vitamines, des antibiotiques, des hormones végétales et des molécules de communication qui favorisent la croissance des plantes (Lines-Killy, 2005) et lorsqu'ils redeviennent actifs, les microorganismes du sol sécrètent un mucilage riche en glucides et en protéines dont la fonction première est d'assurer une protection contre la dessiccation. Ce mucilage est collant et a tendance à s'agglutiner aux particules de sol adjacentes

constituant ainsi de petites entités autour des cellules microbiennes ayant une stabilité et une cohésion supérieure à celle du milieu environnant ; c'est ce qu'on appelle un agrégat (Tisdall et Oades, 1982). Les microorganismes se développant sur les matières organiques pour s'en nourrir ont donc une influence sur leur propre environnement physique et en deviennent eux-mêmes les architectes (Fig.3).

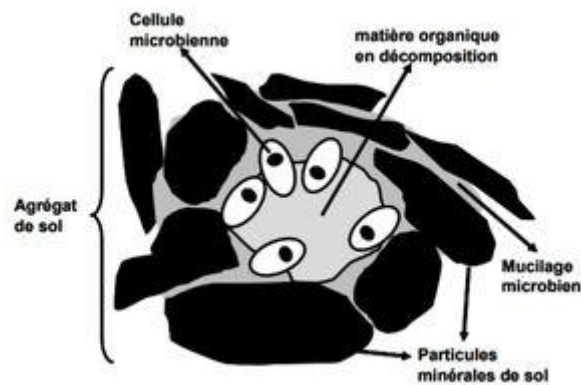


Figure 3 : Agglutination et formation d'un agrégat de sol consécutives à l'activité microbienne de décomposition d'une particule de matière organique (CRAAQ, 2005).

Les agrégats formés par l'activité microbienne de décomposition des matières organiques ont toutefois une durée de vie limitée et se désagrègeront à mesure que la matière organique se décompose et s'humifie, et que les microorganismes mourront ou entreront de nouveau en dormance après avoir épuisé leur source d'énergie. De nouveaux agrégats seront formés à mesure que de nouvelles matières organiques seront apportées au sol. Ce phénomène d'alternance entre aggrégation et désaggrégation constitue un système biologiquement dynamique où les agrégats se renouvellent et changent de forme, sans cesse influencés par l'activité biologique de décomposition des matières organiques. (Philippe, 2010).

II.5. Les rhizobactéries

Les microbes du sol varient en qualité et en quantité d'une plante à l'autre. Les exsudats racinaires influencent sélectivement la croissance des bactéries et des champignons de la rhizosphère en libérant de grandes quantités de sédiments de la rhizosphère dans le sol (les rhizodépôts) en modifiant la chimie du sol à proximité des usines racinaires et en agissant comme un substrat de croissance sélectif pour les microorganismes. Ceux-ci influencent à leur tour la composition et la quantité des différents composants des exsudats racinaires par des effets sur la perte de cellules racinaires, le métabolisme cellulaire et la nutrition des plantes (Yang et Crowley, 2000).

De cette particularité, la structure et la composition spécifique de la communauté microbienne de la rhizosphère varient selon les différentes parties du système racinaire, et cette différence dépend également du type de sol, des espèces végétales, de l'état nutritionnel, de l'âge, de la présence de stress ou de maladies, et d'autres facteurs environnementaux. (Reddy *et al.*, 2014).

On comprend donc que les racines puissent attirer divers microorganismes, dont des bactéries précisément associées à ces racines, qui sont alors appelées : les rhizobactéries (le nom vient du grec rhiza, signifiant racine). Cette association, ce rôle et cet impact des bactéries de la rhizosphère sur les plantes dépendent de leur établissement réussi dans la rhizosphère ; elles peuvent avoir des effets positifs, négatifs ou neutres sur la croissance des plantes. Près de 5 % des bactéries de la rhizosphère favorisent la croissance des plantes et protègent contre les agents pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les nématodes. L'inoculation des semences avec ces bactéries de la rhizosphère entraîne généralement une augmentation de rendement d'environ 10 à 30%. (Beauchamp, 1993).

II.6. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

II.6.1. Définition

Le terme PGPR a été introduit pour la première fois à la fin des années 1970, lorsqu'il a été démontré, par Kloepper et Schroth, que des souches de *Pseudomonas* fluorescentes ont amélioré le rendement des cultures de pommes de terre jusqu'à 500% par la production de sidérophores ; chélateurs de fer, privant les bactéries pathogènes indigènes de fer (Garcia *et al.*, 2003). Seulement 1 à 2% des bactéries favorisent la croissance des plantes dans la rhizosphère (Beneduzi *et al.*, 2012). Les PGPR peuvent être donc définies comme la partie indispensable du biote de la rhizosphère qui, lorsqu'elles sont cultivées en association avec les plantes hôtes, peuvent stimuler la croissance de ces dernières.

Les PGPR semblent être des rhizobactéries qui ont réussi à s'établir dans l'écosystème du sol en raison de leur grande adaptabilité à une grande variété d'environnements, de leur taux de croissance plus rapide et de leur polyvalence biochimique pour métaboliser une large gamme de composés naturels et xénobiotiques et les utiliser par la suite. (Parvatha, 2014). A la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (Vacheron *et al.*, 2013).

Les PGPR les plus fréquemment identifiées sont des *pseudomonades* fluorescentes, mais comptent aussi des *Bacillus*, des *Azospirillum*, des *Azotobacter*, des *Klebsiella*, des *Enterobacter*, des *Rhizobium* et des *Serratias* pp. (Bakker et al. 1991;Kloepper 1992).

II.6.2. Mécanismes d'action des PGPR

II.6.2.1. Mécanismes directs

II.6.2.1.1. Fixation d'azote

L'azote représente 78% de l'atmosphère terrestre, ce fait de lui l'élément le plus abondant. Malgré son abondance, il s'y trouve que sous sa forme moléculaire normale diatomique N₂, un gaz relativement inerte et donc peu réactif(Pedraza, 2008).

Chez les plantes, il est essentiel à la synthèse des acides nucléiques et des protéines, les deux polymères les plus importants de la vie. Or, la plupart ne peuvent pas l'utiliser sous sa forme N₂. L'azote fixée inorganique, souvent sous forme d'ammoniac NH₃ ou d'ions nitrates NO₃⁻, est la seule forme qu'ils peuvent utiliser. Par conséquent, l'azote représente donc un élément très limitant pour la productivité et la croissance des légumineuses. (Miloud, 2018).

Certaines espèces de *Bacillus* sont parmi les PGPR qui ont la capacité de fixer l'azote à l'aide de la nitrogénase on catalysant la réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en ammoniac (NH₃). (Pedraza, 2008).

II.6.2.1.2. Solubilisation du phosphate

La solubilisation microbienne applique la capacité naturelle d'un microorganisme à libérer le phosphate à partir de structures non disponibles. Le principal mécanisme reconnu comme responsable de la solubilisation du phosphate est la production de différents types d'acides organiques comme un mécanisme majeur de la libération du phosphore des structures d'hydroxyapatite (Miloud, 2018).

Les microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) ont été considérés comme les meilleurs moyens écologiques pour la nutrition des cultures par le phosphate. Bien que, plusieurs espèces de *Bacillus* ont été identifiées comme des MSP : *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* (Agnieszka et al., 2018).

II.6.2.1.3. Solubilisation du zinc

Les plantes peuvent absorber le zinc en tant que cation divalent (**Kabata-Pendias et Pendias, 2001**) mais seule une très petite partie du zinc total est présente dans la solution du sol sous forme soluble. Le reste du zinc est sous forme de complexes et de minéraux insolubles (**Alloway, 2008**). L'indisponibilité du zinc dans le sol entraîne une carence en zinc, qui est l'une des carences en micronutriments les plus répandues. Pour atténuer la carence en zinc, diverses méthodes ont été appliquées depuis longtemps. Des engrais à base de zinc sous forme de sulfate de zinc (**White et Broadly, 2005**) ou de Zn-EDTA (**Karak et al., 2005**) ont été utilisés. Cependant, ces approches sont coûteuses, laborieuses et plus lentes. Une meilleure alternative à toutes ces approches est l'utilisation de rhizobactéries solubilisant le zinc.

II.6.2.1.4. Production de phytohormones

Les PGPR peuvent directement influencer la croissance des plantes, soit par la production de phytohormones (auxines, gibbérellines, etc.) ou par la promotion de l'accès aux nutriments (**Beneduzi et al., 2012**). Les bactéries vivant en association avec les plantes ou dans la rhizosphère sont plus aptes à prospérer à partir des substrats excrétés par les racines des plantes et ainsi convertir les différents substrats en hormones ou autres substances bénéfiques à la croissance des plantes (**Kochar et al., 2011**).

II.6.2.1.4.1. Acide Indole Acétique

La famille des auxines est une importante famille de phytohormones de croissance. L'acide-indole-acétique (IAA) est l'auxine la plus naturellement distribuée chez les plantes vasculaires, les mono et dicotylédones, les filicophyta et les gymnospermes (**Srivastava, 2002**).

L'IAA dont le précurseur est le tryptophane (**Fig.4**) est impliqué dans presque tous les aspects de la croissance et du développement chez la plante (**Srivastava, 2002**) et est connu pour être impliqué dans l'initiation des racines, la division et l'élargissement cellulaire (**Vessey, 2003**).

La production d'IAA a été détectée chez plus de 80 % des bactéries en provenance de la rhizosphère. Cependant, la documentation de la production d'IAA par les bactéries Gram positive est rare (**Shahab et Ahmed, 2011**). Parmi les espèces bactériennes capables

de produire de l'IAA on retrouve les genres *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Bacillus* (Yuan *et al.*, 2011).

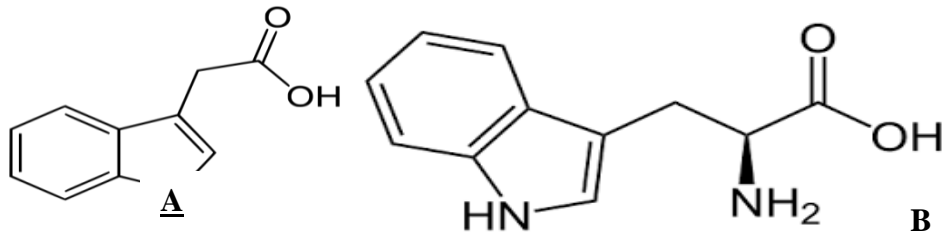


Figure 4 : Molécule d'IAA et son précurseur le tryptophane. (LAURIANE, 2015)

A : IAA , B : Tryptophane

II.6.2.1.4.2. Gibbérellines et Cytokinines

Les cytokinines sont des aminopurines N6-substituées qui jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence. En outre, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansion, protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes et facilitant l'expansion de la cellule végétale et provoquant sa turgescence, ceci a un impact à la fois sur la taille et la forme des cellules (Downes *et al.* 2001). *Bacillus* c'est parmi les productrices de cette hormone (Timmusk *et al.*, 1999).

Les gibbérellines sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries, ce sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques. Un nombre important (136) de gibbérellines différentes sont identifiées et caractérisées (MacMillan,2002). Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales. Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini *et al.*, 2004).

II.6.2.2. La production de l'Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

Au cours des dernières années, un nouveau mécanisme de promotion de la croissance des plantes impliquant l'éthylène est proposé (**Burdman et al., 2000**). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène et favoriserait un allongement des racines. Les PGPR produisant cette enzyme soulageraient ainsi la plante de plusieurs stress causés par des infections, l'absorption de métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse (**Glick et al., 1998**).

Le rôle de l'ACC désaminase chez les PGPR est actuellement bien établi. Elle intervient dans la régulation de l'éthylène chez les plantes. Les PGPR s'attachent aux racines et métabolisent les exsudats racinaires tels que le tryptophane et le transforment en auxines particulièrement en AIA. Cet AIA rhizobactérien ainsi que l'AIA endogène de la plante peuvent induire l'activité de l'ACC-synthase qui produit de l'ACC (**Penrose et Glick, 2001**). Une partie de l'ACC de la plante est excrétée et dégradée par l'ACC-désaminase des rhizobactéries en ammoniacque et α -cétobutyrate, composés rapidement métabolisés par les bactéries (**Holguin et Glick, 2001**) par conséquent la diminution de l'ACC entraîne l'abaissement du taux d'éthylène dans la plante (**Fig.5**).

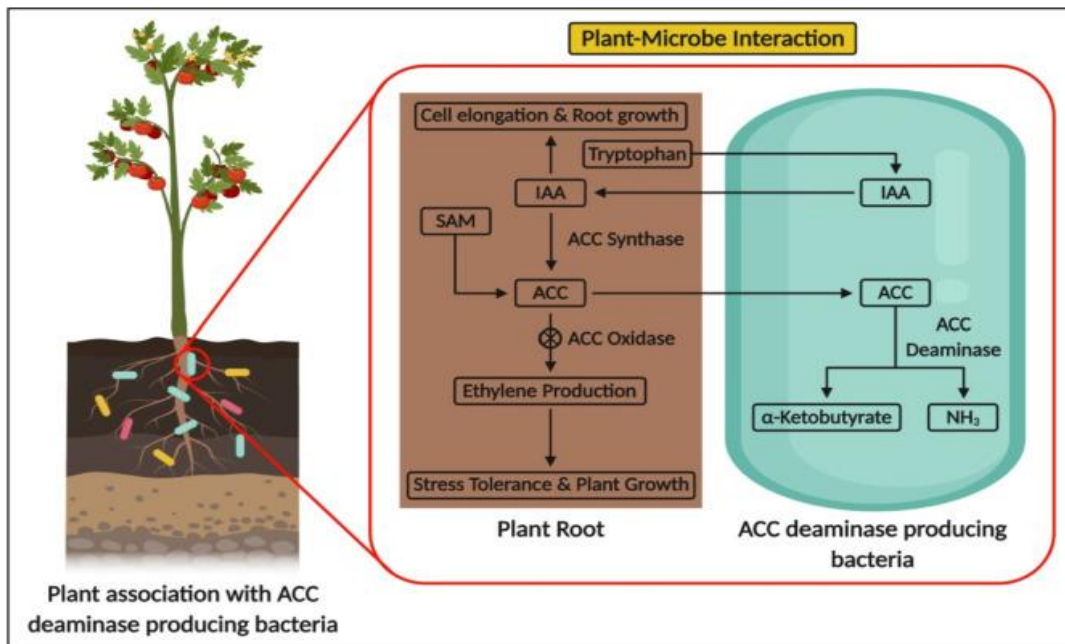


Fig. 5 : Mécanisme d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stress abiotiques (**Glick et al., 1998**).

II.6.2.3. Mécanismes indirects

II.6.2.3.1. La production des sidérophores

Le fer est un nutriment important pour presque toutes les formes de vie (**Neilands., 1995**). Certains PGPR produisent des sidérophores, composés de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 1 KDa, qui contiennent des groupements fonctionnels capables de capter le fer par assimilation végétale (**Kirdi et Zermane., 2010**). Ils transportent ensuite ces complexes jusqu'à la cellule microbienne, où il est reconnu par des récepteurs membranaires situés sur la membrane externe bactérienne, qui seront utilisés lors de la croissance microbienne. Les sidérophores des bactéries de la rhizosphère peuvent affecter directement la disponibilité du fer pour les plantes car ils rendent le fer indisponible pour les champignons phytopathogènes. De nombreuses plantes ont des mécanismes pour lier les complexes bactériens fer-sidérophores, les transporter à travers la plante, puis les libérer sous sa forme réduite disponible (**Hamoum, 2017**).

II.6.2.3.2. Compétition pour l'espace et les nutriments

La compétition pour l'espace et les nutriments est un mécanisme biologique utilisé par le PGPR pour éliminer les agents pathogènes des plantes. La réduction de la maladie peut être liée à la colonisation importante des racines par des bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes, réduisant ainsi leur croissance (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Ainsi, le taux de croissance joue un rôle important, et il existe d'autres propriétés qui améliorent le potentiel de colonisation de la souche, telles que la mobilité (présence de flagelles), la chimiotaxie et la capacité d'utiliser les composés excrétés par les racines comme sources de carbone et d'azote (**Berggren et al., 2001**).

II.6.2.3.3. L'antibiose

L'action antibiotique est l'antagonisme causé par les antibiotiques. Elle est causée par l'activité de composants antagonistes synthétisés par des populations microbiennes qui sont toxiques pour les pathogènes. De plus, certaines souches de PGPR ont la capacité de dégrader les parois cellulaires fongiques en produisant des hydrolases. D'autre part, certains composés volatils (comme le HCN) libérés par les PGPR ont des effets antibactériens et protègent les plantes hôtes (**Paulin, 2007**).

II.6.2.3.4. Résistance systémique induite

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère entraîne une réponse immunitaire qui lui permet de mieux se protéger des organismes pathogènes. L'immunité de cette plante s'appelle ISR. La résistance systémique induite est une forme de résistance stimulée notamment par les PGPR, car ils peuvent induire des effets indirects en sensibilisant les plantes à se protéger des attaques microbiennes. Le concept de résistance systémique inductible (ISR) au PGPR a été justifié par certaines études biochimiques montrant que la protection des plantes traitées au PGPR est associée à des modifications métaboliques profondes. L'ISR peut être induite par divers microorganismes Gram-positifs ou Gram-négatifs tels que *Bacillus* et *Pseudomonas* (Emmanuel *et al.*, 2008).

II.6.4. Diversité taxonomique des PGPR

Les PGPR représentent une diversité de genres et d'espèces, Certains genres des PGPR sont plus étudiés que d'autres notamment pour leur utilisation dans le domaine de l'agriculture, il est à noter que la première souche bactérienne qualifiée de PGPR appartient au genre *Pseudomonas* (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). Elles appartiennent surtout aux quatre phylums : Proteobacteries, Actinobacteries, Bacteroidetes et Firmicutes (Hugenholtz, 2002). Ce dernier phylum comporte les *Bacillus* (Fig.6).

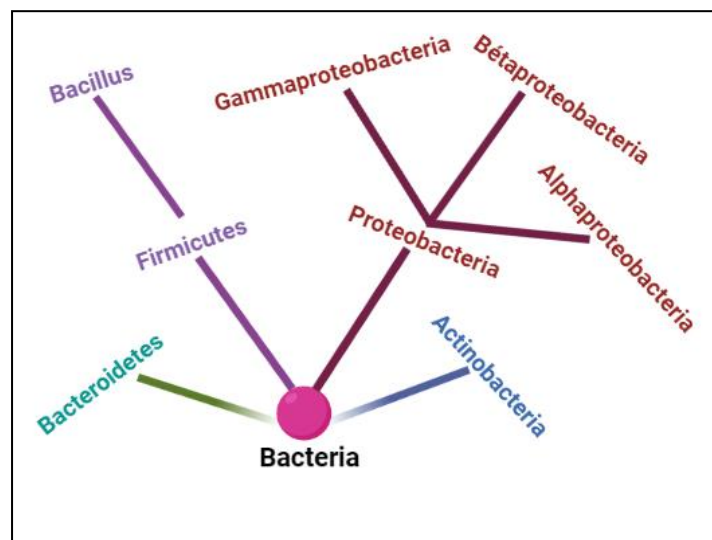


Figure 6 : Arbre représentant la diversité taxonomique des PGPR .

II.6.5. *Bacillus*

Bacillales est l'ordre auquel appartient la famille des Bacillaceae au sein du genre *Bacillus*. Ce genre se caractérise par une forme de bâtonnet dans le groupe des Gram positifs et est donc classé comme aérobies stricts ou anaérobies facultatifs et intégré par 88 espèces. Une caractéristique associée à ce genre est qu'il forme un type de cellule appelé endospore en réponse à des conditions de croissance défavorables qui déforme la structure de la cellule (Abe *et al* .,2018) . Cette forme de spore résiste aux températures élevées et aux désinfectants chimiques actuels. Généralement, les espèces de *Bacillus* utilisées en lutte biologique sont mobiles, à flagelle péritriche. De nombreuses espèces de *Bacillus* , y compris *B. subtilis* , *B. cereus* et *B. mycoides* , sont connues pour supprimer la croissance de plusieurs pathogènes fongiques tels que *Rhizoctonia* , *Fusarium* , *Nectria* . Les principaux producteurs d'antibiotiques de ce genre sont *B.brevis* (gramicidine, tyrothricine), *B. subtilis* (polymyxine, difficidine, subtiline ,mycobacilline, bactéricine), *B. cereus* (cerexine, zwittermicine) etc .. *Bacillus* spp. produisent également une gamme d'autres métabolites, notamment des phytoalexines, des chitinases et d'autres enzymes dégradant les parois cellulaires et des composés volatils qui déclenchent des mécanismes de résistance des plantes contre les attaques de champignons, de bactéries et de nématodes pathogènes.(Parvatha ,2014) .

II.6.5.1. Taxonomie

La taxonomie des *Bacillus* a été modifiée avec l'avènement des différentes technologies moléculaires et génomiques. il a été démontré qu'il est possible de différencier plusieurs espèces de *Bacillus* par leur ARN ribosomique et que la plupart de ces espèces ne sont pas distribuées dans un ordre apparent (Joung et Côté , 2004) . Certaines espèces de *Bacillus* ont été transférées dans de nouveaux genres tels que *Geobacillus*, *Paenibacillus*, etc. Malgré le transfert de certaines espèces, *Bacillus* reste toujours un grand groupe avec plus de 150 espèces. Les espèces bien connues telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus* ainsi que *Bacillus megaterium* font toujours partie du genre *Bacillus* .Les *Bacillus* représentent le plus large et proéminent groupe de bactéries aérobiques formant des endospores et ont reçu une attention considérable au niveau taxonomique, car les différentes espèces ont des applications remarquables dans différents secteurs. Il est possible de distinguer des groupes pour le genre *Bacillus*. Parmi ceux-ci on

retrouve deux groupes qui représentent un intérêt particulier au niveau médical et industriel, soit le groupe *B. subtilis* et le groupe *B. cereus*. (Fritze ,2004). Le tableau qui suit représente la classification du genre *Bacillus* Sp(Tab.1).

Tableau 1 : Classification de *Bacillus* (Cohn, 1872)

Règne	Bacteria
Embranchement	Firumicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacilaes
Famille	Bacilaceae
Genre	<i>Bacillus</i>

II.6.5.2. Habitat et écologie

Le sol est considéré comme l'habitat principal des espèces de *Bacillus* ou ces dernières représentent l'essentiel de la communauté microbienne et en particulier la rhizosphère et les systèmes racinaires des plantes. Les espèces de *Bacillus* sont présentes dans l'épiphyte ou l'endophyte des plantes, ainsi que dans la rhizosphère de diverses cultures, notamment le blé, le maïs, le sorgho, la canne à sucre, l'orge et les espèces forestières telles que les arbres, le pin et le sapin. (Hall et Qian Wei, 1992). Elles existent dans tous les horizons et possèdent de multiples capacités physiologiques qui leur permettent de vivre dans une grande variété d'habitats, tels que l'eau de mer, les profondeurs des océans, les sédiments, les marécages, les sources d'eau, la nourriture, aliments pour animaux, volaille et de nombreux habitats extrêmes tels que les déserts, les sources chaudes et les sols arctiques (Andrea et al., 2008).

II.6.5.3. Caractéristiques bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulées, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulées (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase.(Cherif , 2014).

II.6.5.4. Caractéristiques Physiologiques

Les caractères physiologiques des bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont d'une grande variabilité, en effet, ces bactéries peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires, produisent aussi des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Elles sont hétérotrophes, nitrifiantes, dénitrifiantes, fixatrices d'azote, préceptrices de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. (Cherif, 2014).

III. Utilisation de *Bacillus* SP en agriculture

Grace à la capacité des bactéries du genre *Bacillus* à produire des endospores, coloniser différentes niches écologiques, produire d'importants antibiotiques, probiotiques et enzymes et survivre dans plusieurs milieux différents, on les qualifie d'excellents candidats pour être utilisés en agronomie comme biofertilisants et biopesticides contre les agents pathogènes. Ils ont d'autres applications dans les autres domaines tels que la médecine et l'industrie (Mathieu, 2020).

Certaines souches de *Bacillus* sont utilisées pour leur activité antagoniste envers les agents phytopathogènes par différents modes d'action incluant la compétition, l'antibiose et la stimulation de la croissance des légumineuses et de leurs défenses naturelles qui assurent leur protection (AIT KAKI, 2013).

III.1. Souches de *Bacillus* utilisées comme PGPR .

III.1.1. La souche *B. subtilis* QST 713

Plusieurs souches de *Bacillus* commercialisées, comme la souche *B. subtilis* QST 713 présente dans le Serenade, ont démontré la capacité de réduire de 50% la sévérité de plusieurs maladies racinaires et des parties aériennes, comme la fonte des semis causée par *Rhizoctoniasolani*, la moucheture bactérienne causée par *Pseudomonas syringae* et le blanc poudreux causé par divers champignons de l'ordre des Erysiphales chez plusieurs plantes incluant la tomate et le concombre (Islam et al., 2017).

III.1.1.1. Présentation de produit à base de *B. subtilis* QST 713

"Rhapsody ASO" (Fig.7) est un biofongicide préventif à large spectre pour le contrôle de nombreuses maladies fongiques et bactériennes affectant les légumes de serre, les plantes ornementales de serre et les plantes ornementales d'extérieur, élaboré par la souche QST 713

Rhapsody combine des composés lipopeptidiques antifongiques et antimicrobiens naturels. Ces composés utilisent divers modes d'action pour détruire les agents pathogènes, faisant de Rhapsody un outil efficace de gestion de la résistance.

L'avantage de ce produit est qu'il est homologué pour le traitement fongique des sols par trempage des plantes ornementales en serre et en extérieur. Il ne laisse presque aucun dépôt sur les feuilles ou les fleurs des plantes. Ses performances sont comparables aux produits à base de cuivre sans phytotoxicité ni dépôts. Il peut être pulvérisé jusqu'au jour de la récolte. Il pose un risque négligeable pour les pollinisateurs et les insectes bénéfiques et peut être mélangé/alterné en réservoir avec de nombreux autres produits homologués.



Figure 7. le produit Rhapsody ASO , made in Mexico (2017)

III.1.2. Autres souches

Une autre souche de *B. subtilis*, GA1, a démontré la capacité de protéger des pommes endommagées après leur récolte contre *Botrytis cinerea* (Toure et al., 2004).

Récemment, Salvatierra-Martinez et collaborateurs (2018) ont démontré l'efficacité de *Bacillus amyloliquefaciens* à réduire la sévérité de la pourriture grise chez la tomate.

En général, les *Bacillus* sont plus efficaces contre les agents pathogènes affectant les racines qu'envers ceux affectant la partie aérienne des plants, et leur efficacité serait améliorée par l'application répétée préventive, particulièrement en serre, où les modes (vent, insecte, pluie) de dispersion des endospores des bactéries sont plus limités (**Islam et al., 2017; Wei et al., 2016**) ;(Tab.2).

Tableau 2 : Bactéries du genre *Bacillus* ayant démontré des effets prometteurs contre diverses maladies des plantes. (**Mathieu, 2020**)

<i>Bacillus</i> sp.	Souche(s) homologuée(s) au Canada comme biofongicide(s)/nématocide(s)	Maladies
<i>B.amyloliquefaciens</i>	FZB24 [taegrotechnique] F727[stargus] D747[double nickel]	Pourriture post-récolte (<i>Aspergillus spp.</i>), tache foliaire (<i>xanthomonascampestris</i>). mildiou (<i>bremialactuae</i>), pourriture racinaire (<i>pythium</i> spp). fonte des semis (<i>rhizoctoniasolani</i>)
<i>B.mycoides</i>	Isolat J [Lifegard]	Pourriture grise (<i>botrytis cinerea</i>)
<i>B.subtilis</i>	QST 713 [Rhapsody] MB1600[Integral] BU1841[velondis] FMCH002[F4018-4] GB03[kodiak]	Esca de la vigne (<i>Eutypalata</i>), fonte des semis (<i>R.solani</i>), Anthracnose (<i>colletotrichum spp.</i>), brulure tardive (<i>phytophthora infestans</i>), fusariose (<i>Fusarium spp.</i>), rhizoctonie (<i>rhizoctonia spp.</i>), chancre de la tige (<i>phomopsis spp.</i>), tache foliaire (<i>X.campestris</i>), pourriture brune (<i>monilinia fructicola</i>), mildiou (<i>plasmopara viticola</i>), hernie du chou (<i>plasmodiophora brassicae</i>), tache noire (<i>diplocarpon rosae</i>), piétin-verse (<i>tapesia spp.</i>), cercosporiose noire (<i>mycosphaerella fijiensis</i>), blanc (<i>erysiphaceae</i>), pourriture grise (<i>B. cinerea</i>), pourriture du collet (<i>phytophthora spp.</i>), pourriture racinaire (<i>phythium spp.</i>), pyriculariose (<i>magnaporthe grisea</i>)
<i>B.firmus</i>	1-1582[Votivo]	Meloidogyne (<i>meloidogyne spp.</i>)
<i>B.pumilus</i>		Blanc (<i>erysiphaceae</i>), brulure tardive (<i>P. infestans</i>), tache foliaire (<i>X.campestris</i>), mildiou (<i>B.lactuae</i>), anthracnose (<i>colletotrichum spp.</i>), fusariose (<i>Fusarium spp.</i>), fonte des semis (<i>R.solani</i>), cercosporiose noire (<i>M.fijiensis</i>)
<i>B.firmus</i>		Meloidogyne (<i>meloidogyne spp.</i>)
<i>B.pumilus</i>		Blanc (<i>erysiphaceae</i>), brulure tardive (<i>P. infestans</i>), tache foliaire (<i>X.campestris</i>), mildiou (<i>B.lactuae</i>), anthracnose (<i>colletotrichum spp.</i>), fusariose (<i>Fusarium spp.</i>), fonte des semis (<i>R.solani</i>), cercosporiose noire (<i>M.fijiensis</i>)

*Matériel et
méthodes*

II.1. Echantillonnage

Les échantillons des sols ont été prélevés à partir des champs de courgette, l'ail, betterave et d'haricot vert(Fig.8), cultivés dans des zones à Mostaganem, Hadjadj, au nord-ouest de l'Algérie (Fig.9).



Figure 8. Échantillons prélevés des champs de courgette, l'ail et l'haricot vert successivement.

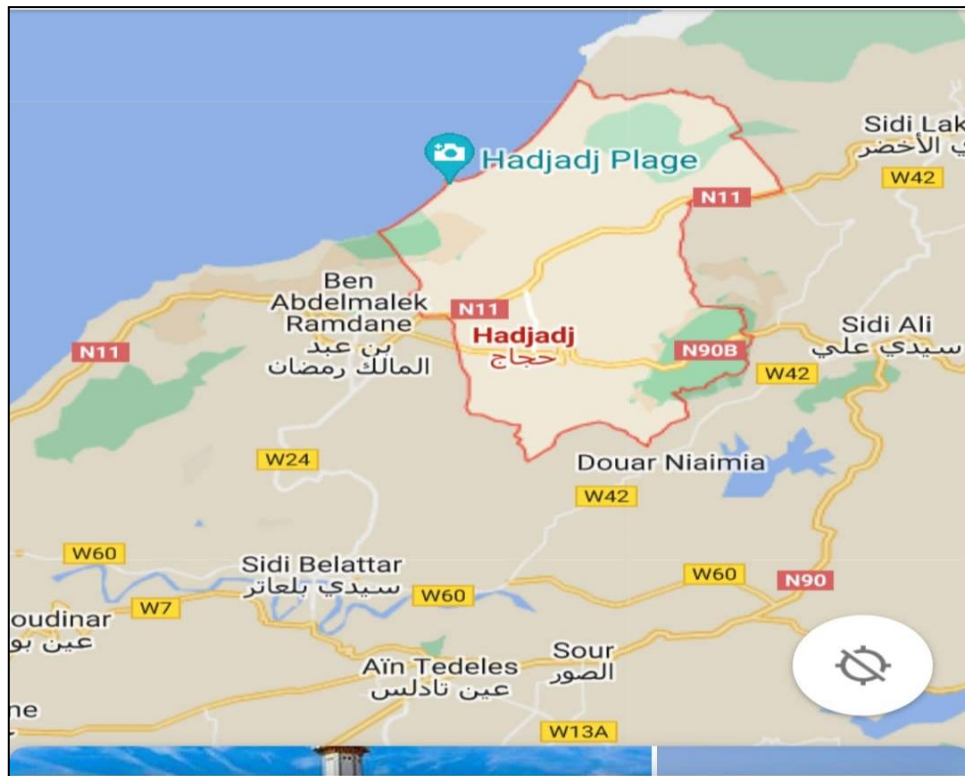


Figure 9. Localisation des échantillons prélevés.

Les prélèvements des racines sont réalisés à partir du sol à une profondeur de 15 cm, placés ensuite dans des sacs en plastique et finalement étiquetés. Les données ont été résumé (Tab.3). (Ghalem, 2016)

Tableau 3 : Coordonnées géographiques des échantillons.

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

II.2. Isolement de *Bacillus*

L'isolement a été effectué à partir des trois compartiments de la rhizosphère (endorhizosphère, ectorhizosphère et épiphyte), en utilisant deux milieux de culture à savoir : PCA et LB (Ladjabi, 2019) (Annexe 1).

Pour le compartiment éctorhizosphérique, les racines ont été secouées afin de les séparer du sol. Dix grammes de sol de chaque échantillon ont été pesés de façon aseptique, homogénéisés dans un flacon Erlenmeyer avec 90 ml d'eau physiologique et secoués pendant 30 minutes à une vitesse approximative de 180 r/min. (Fig.10) (LIU *et al.*,2011).

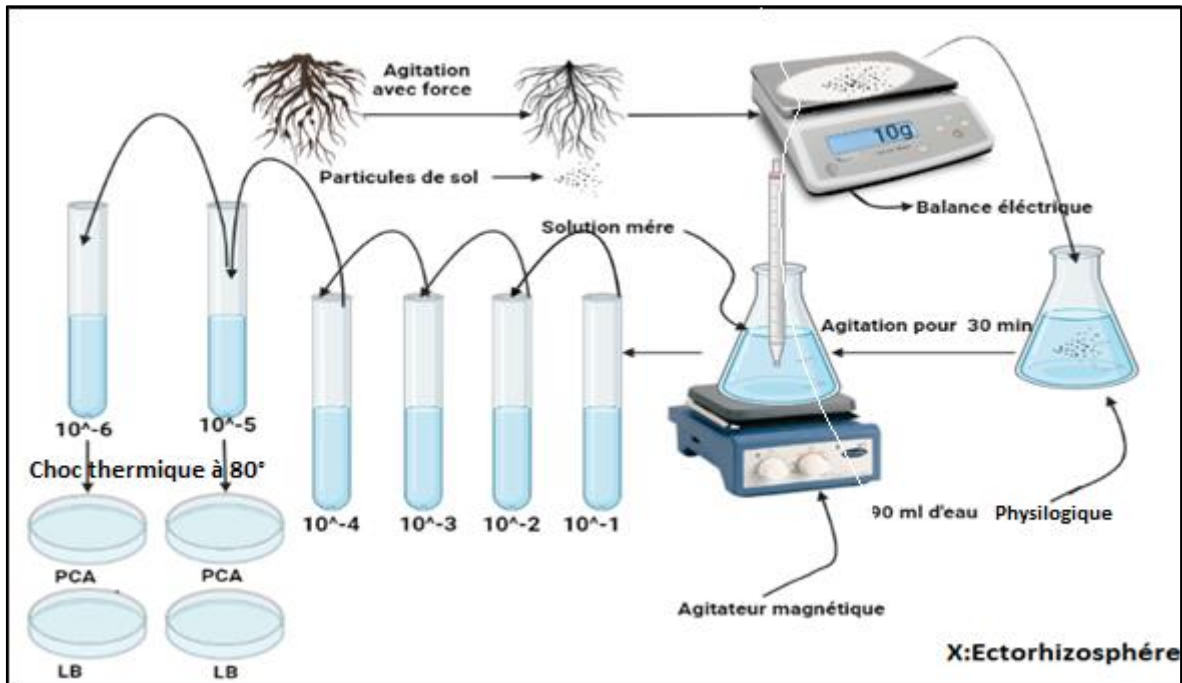


Figure 10: Représentation de l'isolement de *Bacillus* à partir de l'ectorhizosphere

Pour l'épiphyte, les racines ont été coupées entières de manière aseptique, 4-5 racines par plante. Les racines des plantes de 2,5 g ont été coupées à une taille de 2-5 mm et remplies dans des flacons de 125 ml avec 50 ml d'eau physiologique. Le mélange a été agité à 100 rpm pendant 30 min (Fig.11)(Kajohnpong *et al.*,2014).

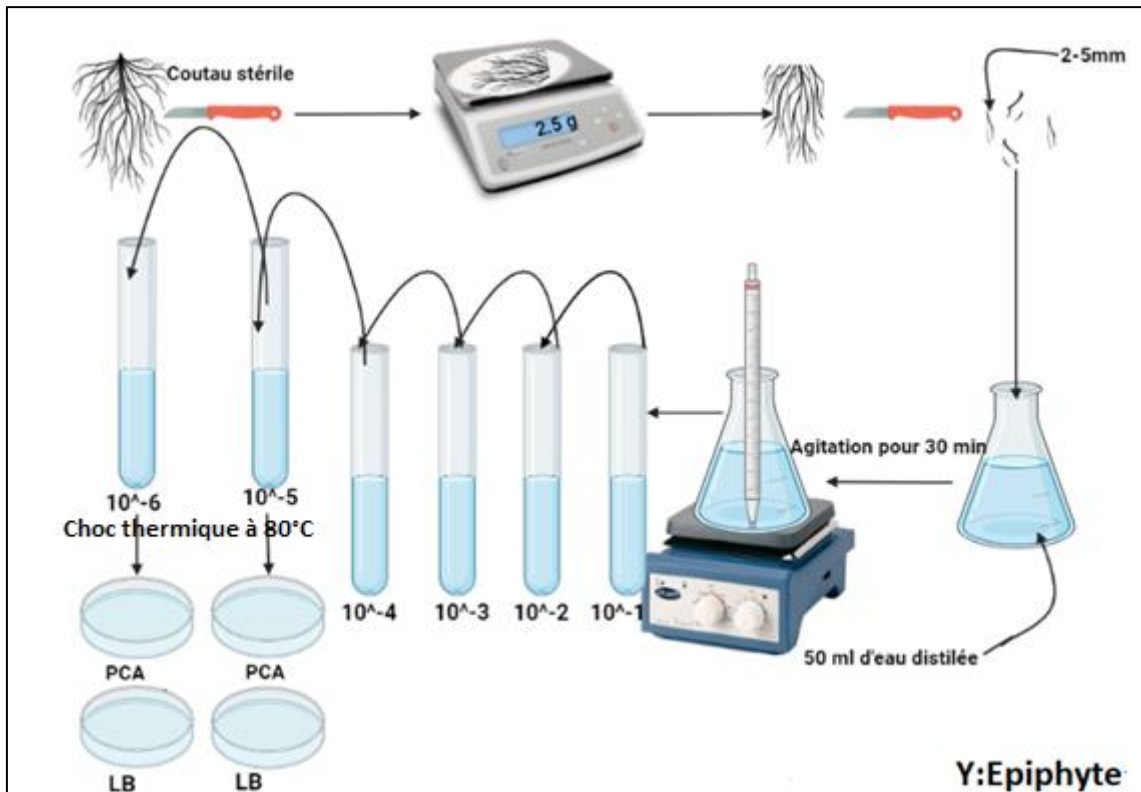


Figure 11 . Représentation de l'isolement de *Bacillus* à partir de l'épiphyte

Pour l'endorhizosphere, les échantillons ont été tranchés séparément en morceaux de 2-3 cm stérilisés en surface avec de l'éthanol pendant deux minutes et rincés trois fois avec de l'eau stérile pendant 1 minute. Ils ont ensuite été pilés dans un mortier en verre dans 2 ml d'eau distillée (**Fig.12**) , (Sauvêtre et Schröder.,2015) .

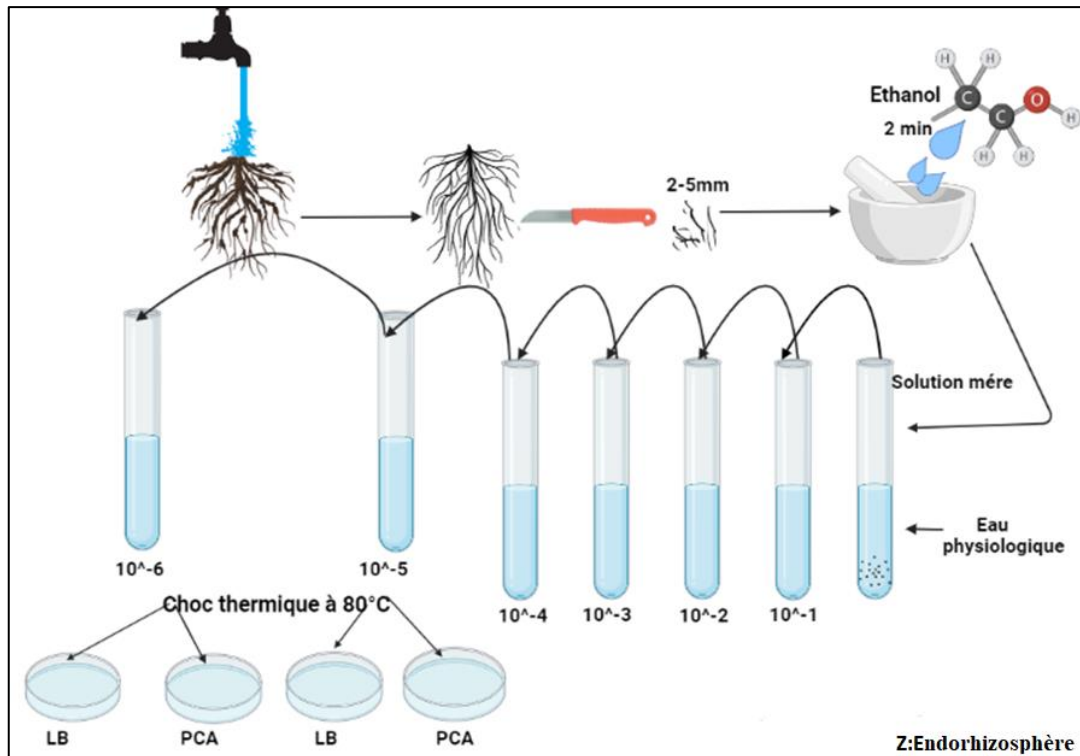


Figure 12 .Représentation de l'isolement de *Bacillus* à partir de l'endorhizosphère

Après que des dilutions appropriées ont été faites par dilution décimale (10^{-1} jusqu'à 10^{-6}), Les échantillons des trois compartiments ont été laissés dans un bain-marie à 80°C pendant 10 minutes, afin d'éliminer les formes végétatives et les formes de résistance (spores), ensuite $100\ \mu\text{L}$ s ont été utilisés pour ensemercer des géloses de PCA et de LB. Après incubation pendant 24 heures à 30°C les colonies obtenues ont été purifiées en sorte que chaque microorganisme isolé forme une colonie distincte à la surface de la gélose ensemencée (Bouali *et al.*, 2016).

II.3. Conservation des isolats

Les colonies pures, isolées, ont été conservées dans des tubes à essai inclinés de Gélose nutritive (GN), incubées à une température de 30°C pendant 18 à 24heures. Puis conservées à une température de 4°C (Bouras, 2018.).

II.4. Identification du genre *Bacillus*

Afin de pouvoir identifier les souches du genre *Bacillus*, plusieurs tests sont effectués, en effet, des critères suffisants ont été recherché et considéré et validés pour confirmer l'appartenance au genre *Bacillus*. (Bouali *et al.*, 2016). Pour s'y faire une étape nécessaire doit être réalisée : la réactivation des souches.

Réactivation des isolats

Les isolats conservés dans des tubes de gélose inclinée ont été ensemencés dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive et incubés à 28 °C pendant 24 h .Avant chaque test les isolats ont été réactivés (**Zaguryet al., 1997**) (**Fig.13**).

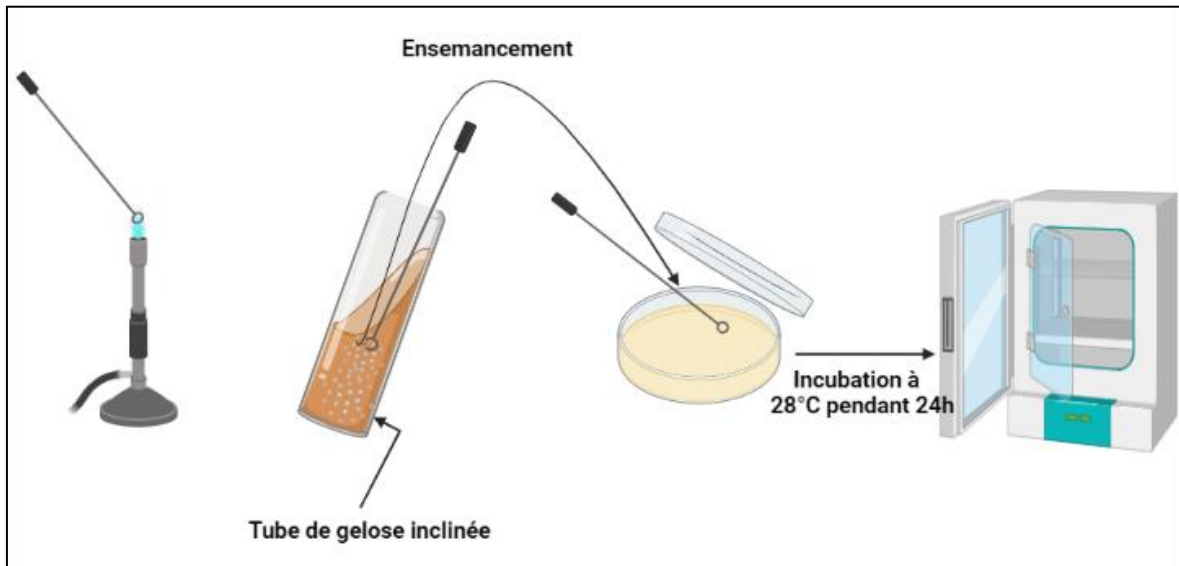


Figure13. La réactivation des isolats.

II.4.1. Aspect macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Ce qui est à vérifier est : la taille , la forme (Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers ; Relief : surface bombée, demi-bombée, plate ; Centre : parfois surélevé, parfois ombiliquée (en creux)) , la consistance (Au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, Crémeuses , sèches ou encore muqueuses) , la couleur et/ou pigment.(**Bent Mohamed et Sidi baba ,2007**).

II.4.2. Aspect microscopique

La coloration de Gram est coloration de base en pratique bactériologique (**Annexe 2**). Elle identifie la présence de bactéries, leur forme et leurs caractéristiques "Gram-positif" ou "Gram-négatif" selon qu'elles restent violettes. Les bactéries Gram-négatives seront colorées en rose/rouge et les bactéries Gram-positives seront colorées en bleu/violet..(**Haichour, 2017**).

II.4.2.1. Observation microscopique à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des souches et d'endéciler la forme, un prélèvement de la suspension bactérienne a été déposé entre lame et lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air puis directement observé au microscope optique. (Canler, 2005).

II.4.3. Mise en évidence des spores

Certaines bactéries produisent des spores dans des conditions de vie défavorables. Ces spores sont plus résistantes aux conditions physicochimiques du milieu que les cellules végétatives. Par conséquent, ils sont thermiquement particuliers et une coloration des spores a été réalisée avec du vert malachite (**Annexe 2**) pour confirmer la présence de spores.(Haichour,2017) .

II.4.4. Test de catalase

Rechercher cette enzyme s'effectue en plaçant une colonie pure sur des verres de montrepropres dans une goutte d'eau oxygénée à 3%. Une lecture positive entraîne la libération de bulles d'air (Abe *et al.*, 2018).

II.4.5. Test de mannitol-mobilité

Le Mannitol-Mobilité-Nitrate (**Annexe2**) est un milieu de culture caractérisé par l'utilisation de mannitol et de Nitrate et permet la mise en évidence (ou non) de la mobilité bactérienne. où la fermentation du mannitol provoque un virage au jaune du milieu. Les bactéries mobiles envahissent tout le milieu à partir de la piqûre centrale. (KACI *et al.*,2020).

II.4.6. Détermination du type respiratoire

Pour mettre en évidence l'effet de l'oxygène sur la croissance bactérienne, des tubes contenant de la gélose "viande de foie" (**Annexe.1**) ont été chauffés au bain-marie pendant 15 minutes pour chasser les gaz, notamment l'oxygène dissous dans le milieu (régénération du milieu) puis le milieu a été refroidit à une température de 45-50°C. À l'aide d'une pipette Pasteur, la culture bactérienne a été prélevée etensemencée de la gélose VF (FleshLiver) sous-refroidie. Les tubes ont été Incubés à 30°C pendant 24 à 48 h et le type de respiration a été défini en observant la croissance sur les tubes. Une bactérie a des besoins respiratoires spécifiques. Elle peut être : aérobie stricte : elle a besoin d'oxygène

pour vivre et se développer ; micro-aérophile : elle a besoin d'une concentration en oxygène spécifique (inférieure à celle de l'air) ; aéro-anaérobie facultative : la présence d'oxygène en petite quantité est préférable pour le développement de la bactérie mais elle peut s'en passer ; anaérobie aérotoleérante : elle n'a pas besoin d'oxygène mais elle le tolère ; anaérobie stricte : la présence d'oxygène est létale pour la bactérie. (Haichour, 2017).

II.4.7. Test de l'hémolyse

Ce test a été effectué sur un milieu de gélose au sang (Annexe.1), coulé sur des boîtes de pétri dans lesquelles les colonies des isolats ont été déposées par touche et incubées à 35°C – 37°C pour 18 – 24hr. Le type d'hémolyse produite sur gélose au sang: β -hémolyse, α -hémolyse ou absence d'hémolyse. (Sandards Unit, Microbiology Services, PHE ,2018).

II.5. Tests du potentiel PGP

II.5.1. Solubilisation du phosphate

Après la réactivation des isolats, la solubilisation du phosphate a été évaluée sur milieu de culture pikovskaya (annexe 1) contenant du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphate, l'ensemencement sur gélose PVK des souches pures se fait par la suite par pique centrale. Après incubation de 28 à 30°C pendant 7 jours, l'observation d'halo transparent autour des colonies indique leur capacité de solubilisation du phosphate. (Lauriane, 2015). Les diamètres des colonies et des halos sont mesurés et les résultats sont exprimés en efficacité de solubilisation calculé selon la formule qui suit (Nguyen *et al.*, 1992).

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

II.5.2. Solubilisation du Zinc

Les colonies bactériennes ont été inoculées sur des milieux Bunt et Rovira contenant des sources de zinc organique par une tache sur la surface , ensuite les milieux ont été maintenues en incubation à 28 ± 1 °C pendant environ une semaine (Bhatt et Maheshwari , 2019).

Les isolats bactériens présentant une zone de solubilisation ont ensuite été évalués pour leur capacité à solubiliser le zinc par le calcul de l'efficacité de solubilisation (ES) (**Sadiqet al. 2014 ; Sharma et al. 2014**)

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

II.5.3. Fixation d'azote

L'évaluation de la fixation d'azote moléculaire des isolats sélectionnés a été démontrée sur des milieux solides exempt d'azote(**Annexe.1**) dont on a ajouté un indicateur coloré : le bleu de bromothymol et qui a été inoculé par touche à partir de souches isolées et incubé pendant 96 heures à une température de 30°C. Une lecture positive est indiquée par la croissance de colonies et le virage de couleur du milieu vers le bleu. (**Bouras, 2018.**).

II.5.4. Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production d'AIA a été testée sur milieu LB additionné de tryptophane (100 mg/l). Le milieu a étéensemencé avec 1 ml de culture bactérienne (DO=0,8) et incubé à l'obscurité à 28°C/96 heures dans une étuve agitée à 180 rpm. 5 ml de culture ont été centrifugés à 6000 tr /20 min et puis 2 ml de réactif de Salkowski (50 ml d'acide perchlorique à 35% + 1 ml de FeCl₃ 0,5 M) et deux et gouttes d'acide orthophosphorique ont été ajouté à 1 ml de surnageant. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'apparition d'une couleur rose indique la production d'AIA et la densité optique (DO) a été mesurée à 530 nm en utilisant un spectrophotomètre(Jenway6760) pour quantifier l'AIA produit (**Lauriane, 2015**). (**Fig.14**)

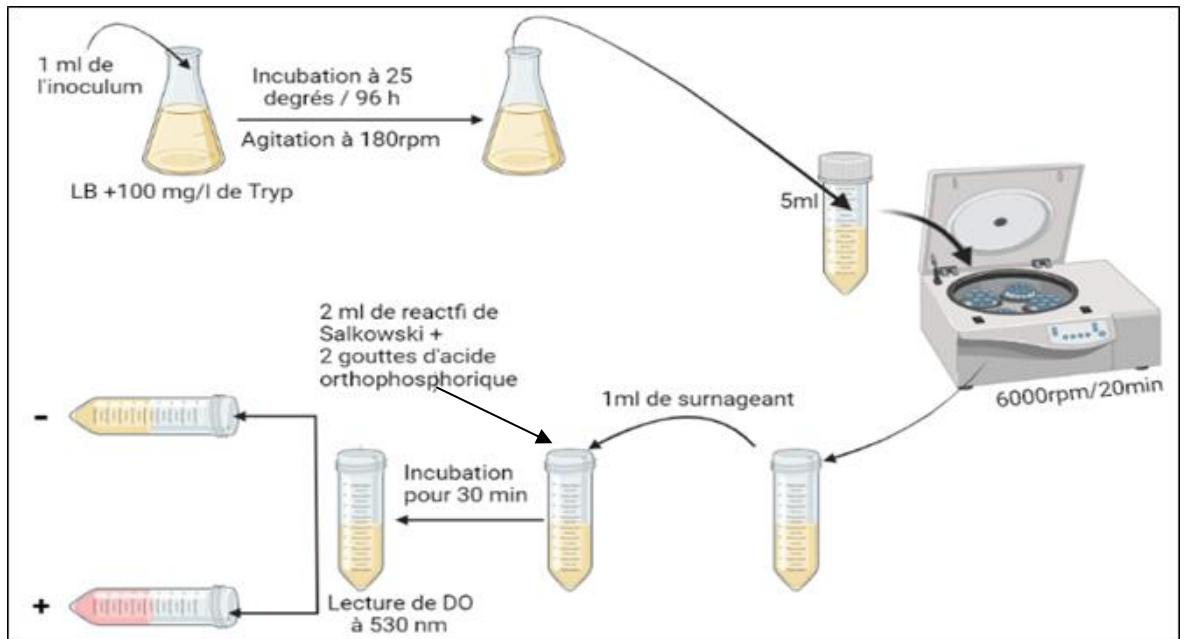


Figure 14. Estimation de la production de l'acide indole acétique.

II.5.5. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

Après la réactivation des isolats et leur isolement, ces derniers ont été ensemencés par stries sur un milieu de culture gélosé additionné de 4,4g/l de glycine, des disques de papier whatman n°1, saturés en acide picrique, déposés dans les couvercles des boîtes, scellés au parafilm et incubés à 28°C pendant 4 jours (**BOURAS,2018**).

Une production modérée et élevée d'HCN est indiquée par un changement de la couleur jaune vers le brun clair ou rouge brun (**Trivedi et al, 2008**) (**Fig.15**).

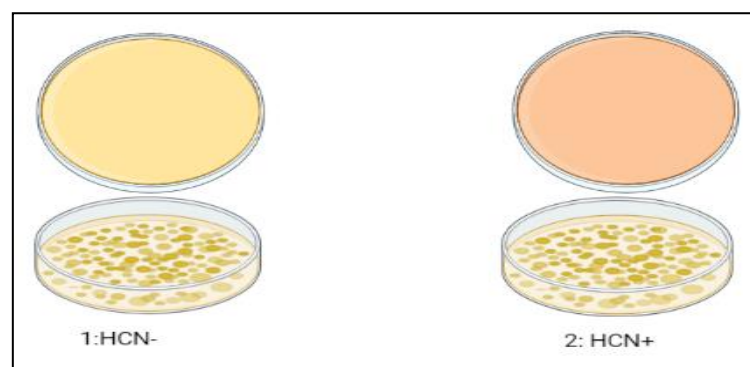


Figure15 : Production d' HCN par *Bacillus* sp

II.6. Traitement statistique

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

*Résultats et
discussion*

III. Résultats

III.1. Identification du genre *Bacillus*

Les différentes études macroscopiques réalisées sur les isolats ont montré la présence de colonies de forme ronde, leurs tailles se différencient, leurs consistances varient entre crémeuses et gélatineuses, une a été remarquée sèche, elles sont translucides à pigmentation blanche. L'examen microscopique sous l'objectif X100 a permis de mettre en évidence la présence de bactéries de forme bacillaire qui sont toutes à Gram positif (**Fig.16**). Tous les isolats sont sporulés (**Fig.17**).

Le virement de la couleur rouge vers le jaune indique la fermentation du mannitol (**Fig.18**) qui fut réalisée par quatre isolats parmi les onze (PAZ11, LBY5, LAX11, PBX4). Les isolats sont tous mobiles, l'étude du type respiratoire réalisée sur milieu de culture viande-foie a montré la présence d'une croissance dans la partie supérieure du tube à essai ce qui explique que les isolats sont des aérobies strictes (**Fig.19**). Le test à la catalase est positif pour tous les isolats. Concernant le test de l'hémolyse, il y a eu des halos autour des colonies des isolats qui ont poussé, tous les isolats ont poussé à part l'isolat LAX12 et l'isolat PAX13 ce qui indique que ces deux derniers n'ont pas effectué une hémolyse mais les autres ont effectué une hémolyse complète (**Fig.20, Fig.21**) Les résultats obtenus ont été représentés dans le tableau ci-dessous (**Tab.4**) et montrent que tous les isolats recherchés sont du genre *Bacillus*.

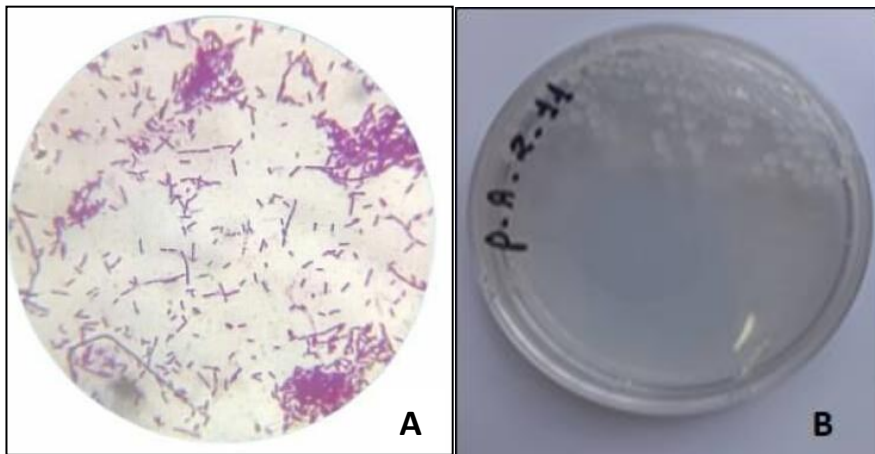


Figure 16 . Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PAZ11 (Objectif X100) .

A : Examen microscopique , B : Examen macroscopique

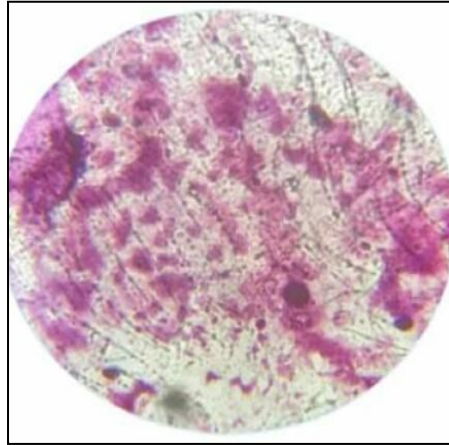


Figure 17 . Résultat de la coloration des spores

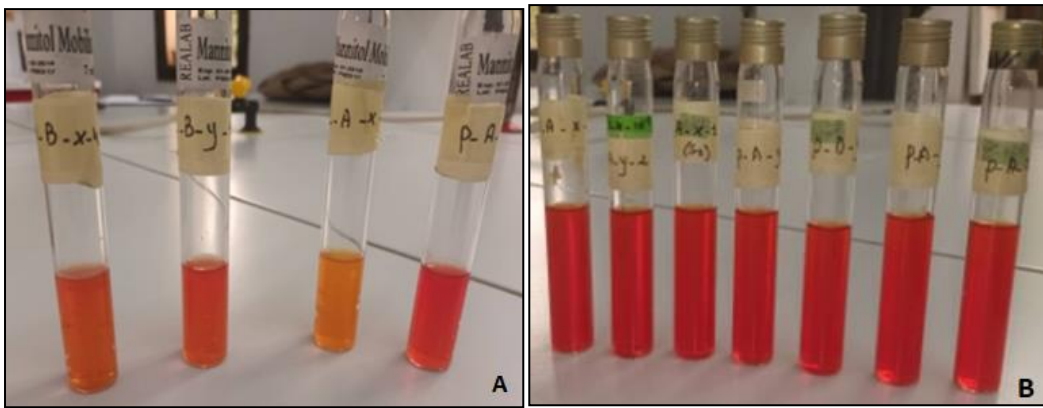


Figure 18 . Résultats du test de Mannitol-Mobilité

A : Mannitol + , B : Mannitol –

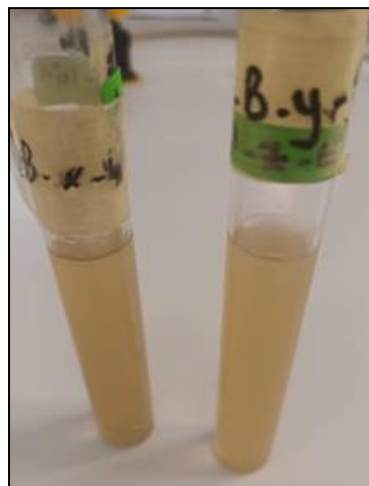


Figure 19 . Résultats du test de type respiratoire

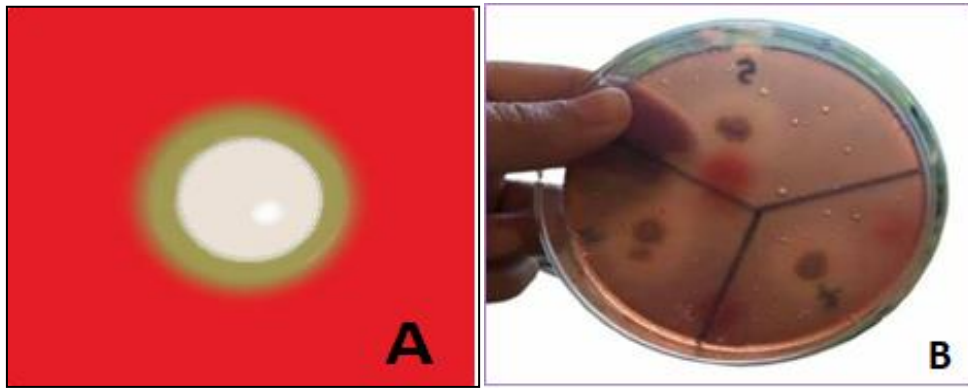


Figure 20 : Résultat du test de l'hémolyse

A : Temoin , B : +

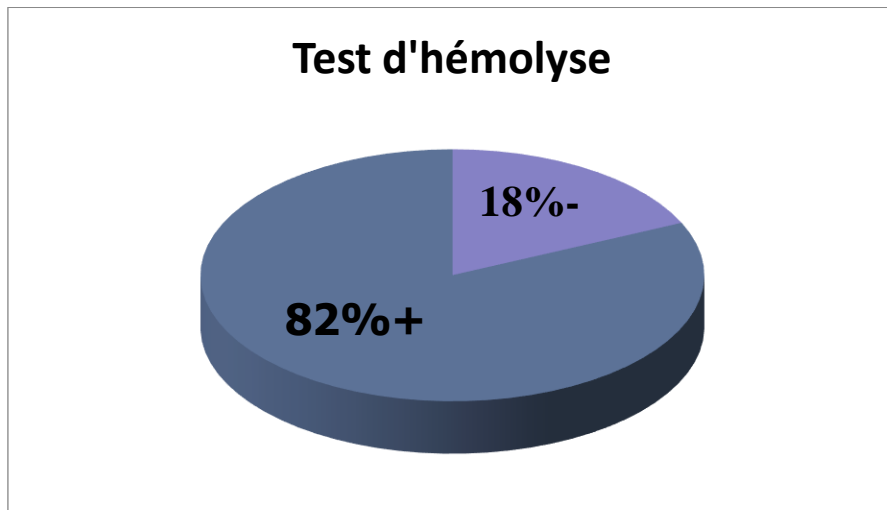


Figure 21. Représentation du pourcentage du test de l'hémolyse des isolats

Tableau 4. Caractères biochimiques et physiologiques des isolats.

Souche	Gram	Forme	Pigmentation & opacité	Consistance	Spore	Cat	T.R	Man	Mob	Hémolyse	Identification
LAX11	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	-	+	α	<i>Bacillus sp</i>
LAX12	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	+	+	-	<i>Bacillus sp</i>
LBY5	+	Bacille	Blanche Translucide	Crémeuse	+	+	Aérobie stricte	+	+	α	<i>Bacillus sp</i>
PBX4	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	+	+	α	<i>Bacillus sp</i>
PAY2	+	Bacille	Blanche Translucide	Sèche	+	+	Aérobie stricte	-	+	α	<i>Bacillus sp</i>
PAY8	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	-	+	α	<i>Bacillus sp</i>
PAY9	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	-	+	α	<i>Bacillus sp</i>
PAZ10	+	Bacille	Blanche Translucide	Crémeuse	+	+	Aérobie stricte	-	+	α	<i>Bacillus sp</i>
PAZ11	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	+	+	α	<i>Bacillus sp</i>
PAX13	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	-	+	-	<i>Bacillus sp</i>
PDY7	+	Bacille	Blanche Translucide	Muqueuse	+	+	Aérobie stricte	-	+	α	<i>Bacillus sp</i>

+ : Présence, - : Absence, **Cat** : catalase, **T.R** : Type respiratoire, **Man** : Mannitol, **Mob** : Mobilité, α : Hémolyse complète

III.2. Screening du potentiel PGP des isolats

Cette étude a été réalisée dans le but de mettre en évidence le potentiel naturel des isolats appartenant au genre bactérien *Bacillus* à produire des substances impliquées dans la promotion de la croissance des plantes par leur réponse aux différents tests inhérents à cette dernière, à savoir la capacité à solubiliser le phosphate et le zinc, la production de phytohormone (acide indole acétique), la fixation d'azote et la production du composé volatil: l'acide cyanhydrique .

III.2.1. Solubilisation du phosphate

Le pouvoir de solubilisation du phosphate inorganique des isolats a été évalué après leur croissance sur le milieu gélosé de pikovskaya, il se révèle par un halo de transparence autour de la colonie après 7 jours d'incubation à 30°C (**Fig.22**), et est réalisé par tous les isolats sauf un : PAY2. L'importance de cette capacité est mesurée par l'indice d'efficacité de solubilisation qui varie d'un isolat à l'autre.

L'analyse de la variance a montré un effet HS du facteur isolat sur la solubilisation du phosphate (P=0) (**Annexe.4**). Les taux de solubilisations notés vont de $207,85^c \pm 2,81$ à $550^a \pm 12$. avec un taux de solubilisation maximal de $550^a \pm 12$ pour l'isolat LAX11 (**Tab 5**). Les taux de solubilisation du phosphate étaient pratiquement similaires chez la majorité des isolats avec des valeurs de $207,85^c \pm 2,81$, $209,33^c \pm 9,02$, $210^c \pm 3$, $210^c \pm 12$, $218,04^c \pm 3,75$ et $211,37^c \pm 4,51$ pour les isolats PAZ11, PAY9, PAY8, LAX12, PBX4 et PAZ10 respectivement. La solubilisation a été plus ou moins élevée par rapport à ces derniers pour l'isolat LBY5 : $400,67^b \pm 3$ (**Fig.23**).



Figure 22 : Solubilisation du phosphate sur milieu PVK

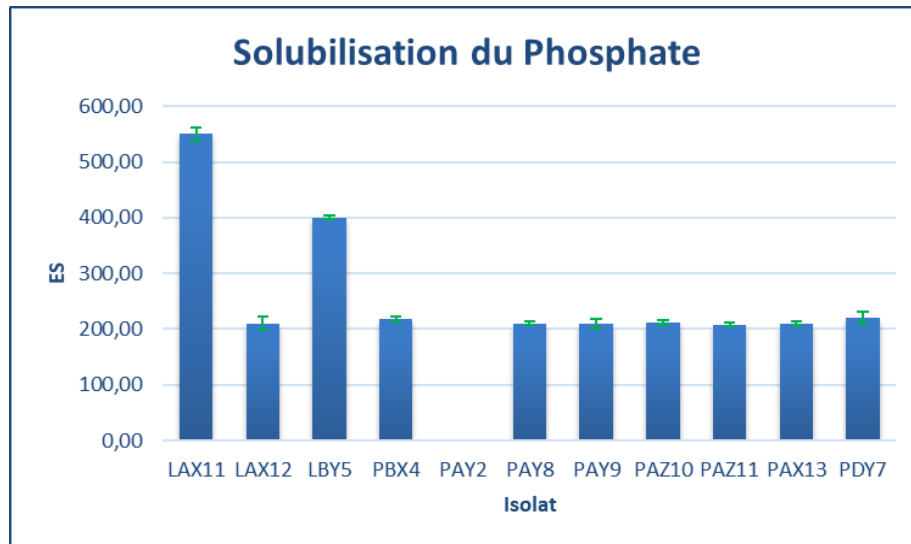


Figure 23 : Efficacité de solubilisation du phosphate par les isolats

III.2.2. Solubilisation du Zinc

La fixation du zinc a été testée sur milieu BR, après incubation, la formation d'un halo transparent autour des colonies a été vérifiée chez tous les isolats appart l'isolat PAY2 (Fig.24).

L'analyse de la variance a montré un effet HS du facteur isolat sur la solubilisation du Zinc (Z=0) (Annexe.4). Les taux de solubilisations notés vont de $207,12^c \pm 6$ à $250^a \pm 11$ avec un taux de solubilisation maximal de $250^a \pm 11$ pour l'isolat PDY7 (Tab.5), la production était presque maximale chez l'isolat PAX13 : $249,67^a \pm 7,51$, Les taux de solubilisation du zinc étaient pratiquement similaires chez la majorité des isolats avec des valeurs de $205,84^c \pm 8,19$, $207,12^c \pm 6,58$, $208,17^{bc} \pm 4,12$, $210,82^{bc} \pm 9,95$, $214,83^{bc} \pm 5,12$ et $216,16^{bc} \pm 2,04$ pour les isolats PAY9, PAZ11, LAX11, PAY8, PAZ10 et LBY5 respectivement. La solubilisation été plus ou moins élevée par rapport à ces derniers pour les isolats LAX12 et PBX4 avec des valeurs de solubilisation : $221^{bc} \pm 2,65$ et $225^b \pm 7$ respectivement (Fig.25).

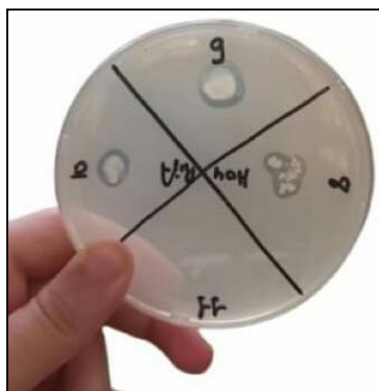


Figure 24. Solubilisation du zinc sur milieu BR.

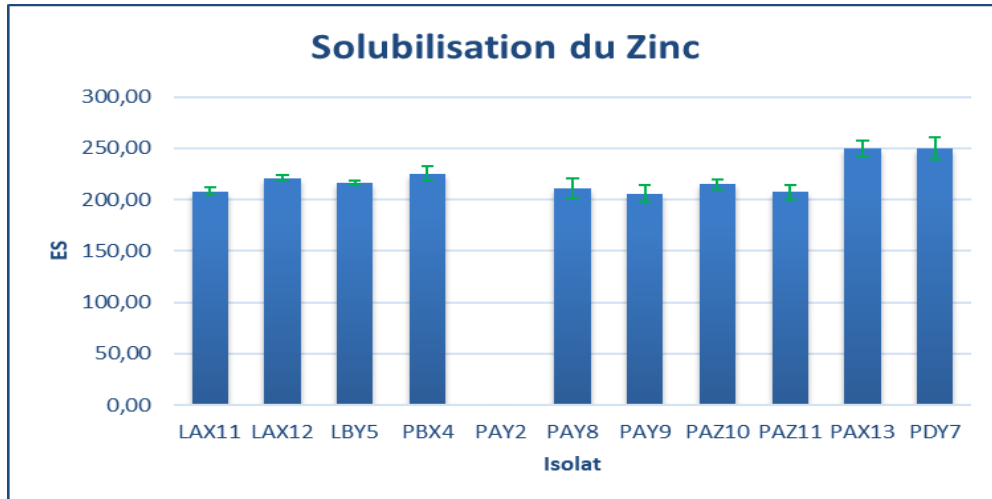


Figure 25 : Efficacité de solubilisation du zinc par les isolats

III.2.3. Fixation d'azote

Ce test a été effectué sur un milieu exempt d'azote (Burken-free). Une croissance a été observée sur les boîtes de tous les isolats avec un virement de couleur de milieu vers le bleu à cause de la production du NH_4 , ce qui confirme que les onze isolats sont fixateurs d'azote (Fig.26 ; Fig .27).

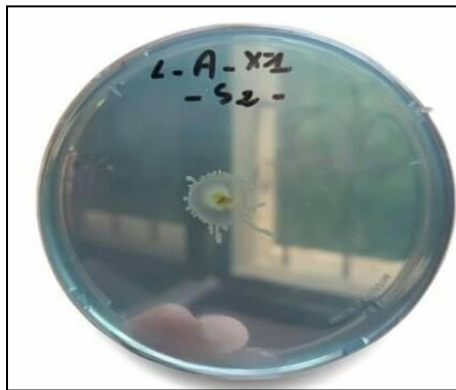


Figure 26. La fixation de l'azote sur milieu Burkn-free.



Figure 27. Représentation du pourcentage de la fixation d’azote par les isolats

III.2.4. Production d’Acide Indole Acétique (AIA)

La production de l’acide indole acétique a été testée après la culture des isolats dans un milieu LB additionné de tryptophane comme précurseur (100 mg/l) . Après incubation, la production d'AIA qui se remarque par le virement vers la couleur rose a été retrouvée chez neuf isolats parmi les onze (**Fig.28**).

L’analyse de la variance a montré un effet HS du facteur isolat sur la production de l’AIA (**Annexe.4**). Les niveaux de production observés vont de $4,58^h \pm 0,33 \mu\text{g/ml}$ à $25,16^a \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$ (**Fig.29**). La valeur maximale est celle de l’isolat PBX4 : $25,16^a \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$, la valeur la plus élevée après cette dernière est celle de l’isolat PDY7 : $19,65^e \pm 0,75 \mu\text{g/ml}$, les isolats PAY2 et LAX11 ont montré une production plus élevée par rapport au reste des isolats avec des valeurs d’AIA($\mu\text{g/ml}$) de $12,25^d \pm 0,3$ et $14,49^c \pm 0,33$ respectivement , tandis que les quatre isolats LAX12 , PAY8 , PAZ10 , PAZ11, PAX13 avec des valeurs d’AIA($\mu\text{g/ml}$) de $4,58^h \pm 0,33$, $7,14^f \pm 0,17$, $4,78^{gh} \pm 0,29$, $5,44^f \pm 0,17$ et $9,03^e \pm 0,44$ respectivement . La production d’AIA été absente chez les isolats LBY5 et PAY9(**Tab.5**).



Figure 28. Résultat de la production de l'AIA.

A : +, B : -

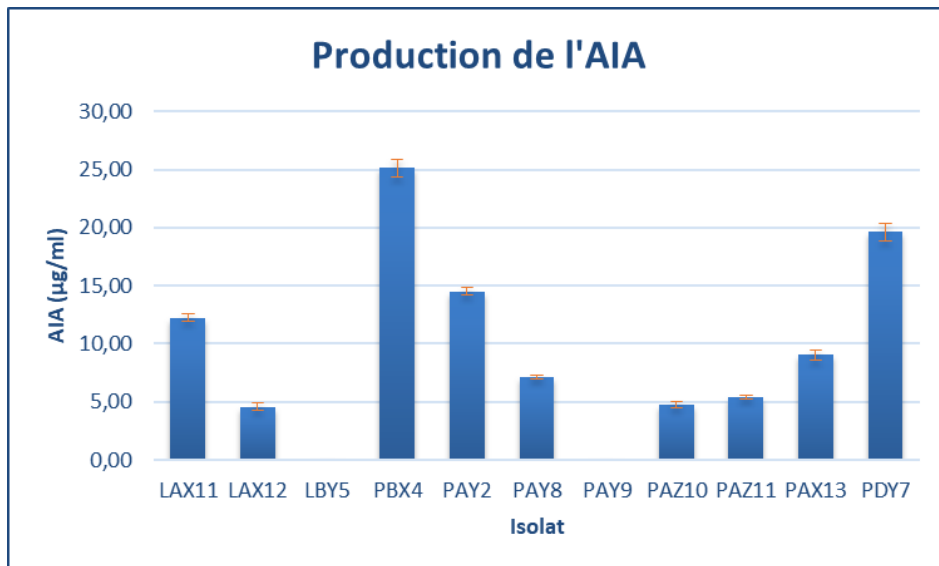


Figure 29 : Taux de production de l'acide indole acétique par les isolats

III.2.5. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

La couleur jaune du papier filtre est restée inchangée. La production d'acide cyanhydrique n'a donc été détectée chez aucune des souches étudiées. (Fig.30 ; Fig. 31),



Figure 30 .Résultat négatif de la Production de l'acide cyanhydrique (HCN).

Tous les résultats précédents ont été résumés dans le tableau ci-dessous (Tab.7)

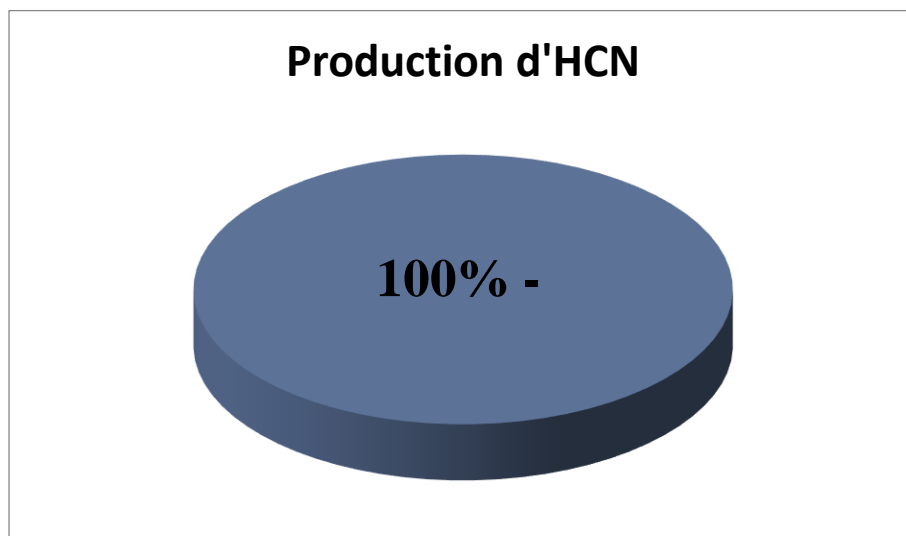


Figure 31. Représentation du pourcentage de la production d'HCN par les isolats

Tableau 5: Les potentiels PGP des isolats

Isolat	AIA µg/ml	SP (ES)	SZ(ES)	HCN	Fixation d'azote
LAX11	12,25 ^d ±0,30	550,00 ^a ±12,00	208,17 ^{bc} ±4,12	-	+
LAX12	4,58 ^h ±0,33	210,00 ^c ±12,00	221 ^{bc} ±2,65	-	+
LBY5	00 ⁱ , 00	400,67 ^b ±3,05	216,16 ^{bc} ±2,04	-	+
PBX4	25,12 ^a ±0,74	218,04 ^c ±3,75	225,00 ^b ±7,00	-	+
PAY2	14,49 ^c ±0,33	00 ^d , 00	00 ^d ±00	-	+
PAY8	7,14 ^f ±0,17	210,00 ^c ±3,00	210,82 ^{bc} ±9,95	-	+
PAY9	00 ⁱ , 00	209,33 ^c ±9,02	205,84 ^c ±8,19	-	+
PAZ10	4,78 ^{gh} ±0,29	211,37 ^c ±4,51	214,83 ^{bc} ±5,12	-	+
PAZ11	5,44 ^f ±0,17	207,85 ^c ±2,81	207,12 ^c ±6,58	-	+
PAX13	9,03 ^e ±0,44	210,33 ^c ±4,04	249,67 ^a ±7,51	-	+
PDY7	19,65 ^e ±0,75	219,67 ^c ±10,50	250,00 ^a ±11,00	-	+

AIA : Acide indole acétique, SP (Solubilisation du phosphate), SZ : Solubilisation du zinc, ES : Efficace de solubilité, HCN : l'acide cyanhydrique

III.3. Discussion

Dans la présente étude, les isolats de *Bacillus* qui ont été identifiés, après traitement au choc thermique à 80°C (Wolfgang, 2003) possèdent une variété de caractères morphologiques. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs, où les isolats de *Bacillus* et *Paenibacillus* ont été observés pour avoir des colonies de taille petite à moyenne, translucides, Gram positif, et en forme de bâtonnets et avaient une texture lisse, une pigmentation de couleur différente, et une élévation convexe (Mumtaz *et al.*, 2017 ; Ahmad *et al.*, 2018 ; Suman *et al.*, 2018).

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 au choc thermique à 80 degrés de *Bacillus*, la présence de spores

a été confirmée , Cho et Rhee (**2018**) ; Elisashvili *et al.* , (**2019**) ont prouvé la présence de *Bacillus* formant des spores .

L'activité catalase est une caractéristique importante qui permet aux plantes de faire face à des conditions défavorables (**Mumtaz *et al.*, 2017**). Dans cette étude, tous les isolats testés ont été trouvés positives pour l'activité catalase. Iqbal *et al.*, (**2016**) ont rapporté que les cinq isolats de PSB étaient tous positifs à la catalase car ceux-ci forment des bulles de gaz lors de l'ajout de H₂O₂ 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.

Il a été trouvé lors de cette étude que peu d'isolats de *Bacillus* ont effectué la fermentation du mannitol, elle a été remarquée chez quatre isolats parmi les onze. Il est d'ailleurs constaté par Vicki *et al.* , (**2005**) que ces résultats sont acceptables , car selon eux , une réaction positive de fermentation du mannitol produit une colonie jaune mais les colonies de *B. anthracis* étaient incolores et sur les six isolats étudiés, quatre isolats n'ont pas fermenté le mannitol.

Dans cette étude, les isolats de *Bacillus* sont tous aérobies stricts, en effet Led Yered *et al.*, (**2012**) ont démontré que *Bacillus* croit dans des conditions aérobies, Yumoto. I *et al* (**1998**) ont eux aussi démontré que les *Bacillus* sont de type respiratoire aérobie et ils ont également confirmé qu'ils sont mobiles.

Dans cette étude la majorité des isolats de *Bacillus* ont effectué une hémolyse complète (neuf sur onze) , Vladimir *et al.* , (**2003**) ont affirmé dans leur étude que six gènes pour des protéines homologues à des facteurs hémolytiques connus sont présents dans le génome de *B. anthracis*. Cela signifie que le genre *Bacillus* a cette capacité à réaliser l'hémolyse, ce qui est confirmé dans l'étude menée par Ramaro *et al.*, (**2020**) où un test d'hémolyse a été effectué sur des colonies bactériennes pour confirmer les souches de *B. cereus* et cela été le cas , néanmoins d'après eux cette méthode ne confirme que les cellules présumées de *B. cereus* car toutes les souches de *B. cereus* ne sont pas hémolytiques.

Les souches du genre *Bacillus* et plus exactement l'espèce *Bacillus subtilis* sont les microorganismes les plus prédominants d'importance agricole (**Swain et Ray, 2007**).

Parmi les propriétés les plus importantes des PGPR influençant directement la croissance des plantes : la solubilisation du phosphate et la solubilisation du Zinc qui sont des nutriments essentiels au développement de ces dernières. Ils remplissent plusieurs fonctions

clés dans la croissance et la physiologie des cultures (Gouda *et al.* 2018 ; Noulas *et al.* 2018). Malgré leur présence naturelle dans le sol, ces deux nutriments deviennent indisponibles pour les plantes en raison de leur fixation et de leur précipitation sous forme de différents complexes (Hafeez *et al.* 2013 ; Kafle *et al.* 2019). Ainsi, il devient nécessaire d'apporter des nutriments de phosphore et de zinc sous forme d'engrais pour une croissance saine des plantes. La solubilisation du phosphore et du zinc par les rhizobactéries, notamment par le genre *Bacillus*, et son potentiel pour améliorer l'économie agricole ont attiré l'attention des microbiologistes et des chercheurs en agriculture (Ahmad *et al.* , 2020).

L'utilisation de PSB et ZSB comme inoculants peut s'avérer être une alternative efficace pour répondre aux besoins des plantes en nutriments essentiels. Dans cette étude, les isolats ont été caractérisés sur la base de la solubilisation du zinc et la solubilisation du phosphore et il a été constaté que sur onze isolats appartenant à *Bacillus*, un seul qui n'a pas solubilisé le phosphate, n'a pas solubilisé le zinc également : PAY2, tandis que tout le reste des isolats ont effectué ces solubilisations, Résultats qui se comparent à une étude précédente, où Mumtaz *et al.* (2017) ont observé qu'une plus grande solubilisation de zinc a été montrée par *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus subtilis*(ZM63), et *Bacillus sp.* (ZM20) à des taux allant de 0,49µg/mL à 3.94 µg/mL . De même, dans une autre étude, il a été trouvé que sur 200 isolats, 81 isolats ont été capables de solubiliser le phosphate davantage que les autres isolats à des taux allant de 0.42 µg/mL à 2.75 µg/mL (Tsegaye *et al.* 2019). Les PGPR adoptent plusieurs mécanismes de solubilisation du zinc et du phosphore, notamment comme la diminution du pH du sol de la rhizosphère par la production d'acide organique, l'échange d'anions et la chélation (Habib *et al.* 2016 ; Dinesh *et al.* 2018 ; Mumtaz *et al.* 2019).

L'ensemble des isolats étudiés ont montrés leur potentiel d'utilisation d'azote atmosphérique. Des résultats similaires sur l'efficacité de fixation d'azote des souches de genre *Bacillus* ont été rapportés par plusieurs chercheurs (Elo *et al.*, 2001 ; Berge *et al.* ,2002; Von der weid *et al.* , 2002) . Par contre dans la recherche de (LAURIANE, 2015) très peu de souches démontrent la capacité à fixer l'azote.

Des composés agissant comme des phytohormones ont déjà été suggéré d'être impliqué dans l'action phytostimulatrice exercée par la rhizobactérie bénéfique pour les plantes *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Des analyses par chromatographie liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse réalisées avec des filtrats de culture de FZB42 ont démontré la présence d'acide indole-3-acétique (IAA),

comme l'une des substances favorisant la croissance des plantes produites par cette bactérie **(ElSorra et al., 2007)**.

Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère **(Dastager et al., 2010)**. L'AIA est synthétisé dans la présente étude par les neuf isolats de *Bacillus*: LAX1 I, LAX1 II, PBX-4, PAY2, PAY8, PAZ10, PAZ11, PAX13, PDY7. Les bactéries sécrétant une grande quantité d'auxine - l'AIA dans cette étude - causent une augmentation maximale de la croissance et le rendement des récoltes **(Khalid et al., 2004)**. La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat **(Miraza et al., 2001)**. Mehnaz et al., (2001) ont rapporté dans une étude précédente les taux de production de l'acide indole acétique des souches de *Bacillus*, le taux le plus élevé était de 750 µg/ml.

La production de l'HCN est considérée comme le mécanisme direct de la suppression des phytopathogènes car l'HCN inhibe l'enzyme cytochrome c oxydase terminale dans la chaîne respiratoire et se lie au métalloenzyme **(Susilowati et al., 2011)**. Dans cette recherche des isolats producteurs d'HCN n'ont pas été détectés. Par contre, dans les travaux de **(Archana et Harsha, 2022)** ils ont observé des isolats capables de produire de l'HCN.

Les résultats présentés ci-dessous et leur interprétation démontrent que les PGPR et plus particulièrement les *Bacillus* sont réellement pris en considération quant à leur efficacité d'utilisation dans l'amélioration de la croissance des plantes et par conséquent leur rendement.

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre des études menées sur les plantes, les biologistes se sont intéressés et s'intéressent toujours aux interactions symbiotiques qui surviennent au sein de leurs rhizosphères. Pour notre part, nous avons porté notre attention sur les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), un autre type de bactéries phytobénéfiques, qui utilisent les exsudats racinaires comme substrats nutritifs pour agir soit directement ou indirectement sur le développement de la plante.

À travers ce présent travail et les expériences réalisées, nous avons affirmé la présence, dans la rhizosphère des quatre plantes rhizobactéries PGP solubilisant le phosphate et le zinc fixant l'azote, produisant l'auxine (AIA). Ainsi la première partie de nos expérimentations, concernait l'identification phénotypique des isolats bactériens qui a permis de démontrer que nos 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.

La seconde partie de notre travail expérimentale qui s'est orientée vers la mise en évidence des mécanismes d'actions des PGPR a en effet révélé que les bactéries en notre possession étaient toutes PGPR pour au moins l'un des caractères testés par exemple, La plupart des isolats ont réalisé la solubilisation de phosphate et de zinc à $550^{\pm 12}\mu\text{g/ml}$ et $250^{\pm 11}$ respectivement comme valeurs maximales, neuf sont productifs d'acide indole acétique, neuf ont effectué une hémolyse de type alpha et tous sont fixatrices d'azote

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 puisqu'ils les PGPR se considèrent comme la clé pour la résolution des contraintes à l'agriculture moderne la rendant écologiquement saine.

Références

bibliographiques

Abe A , Assanvo J , Sanogo M ,Koffi K (2018).Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d’Ivoire , 12(5): 2284-2293

Agnieszka S., Ewelina P., Justyna D.I(2018). Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species.molecules,n°2897,1-18

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

Ahmad, I., Ahmad, M., Hussain, A., & Jamil, M. (2020). Integrated use of phosphate-solubilizing *Bacillus subtilis* strain IA6 and zinc-solubilizing *Bacillus* sp. strain IA16: a promising approach for improving cotton growth. Folia Microbiologica, 66(1), 115–125.

AIT KAKI A (2013) .Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l’agriculture et l’agroalimentaire , Doctorat , Université Constantine 1 .

Alloway B. J. (2008). *Zinc in Soils and Plant Nutrition*. Belgium: International Zinc Association

Andrés S and Peter S (2015) . Uptake of carbamazepine by rhizomes and endophytic bacteria of *Phragmites australis* , Front. Plant Sci. 6:83.

Archana,D, harsha,S(2022). Non-Rhizobial Endophytes Associated with Nodules of *Vigna radiata* L. and Their Combined Activity with *Rhizobium* sp.current microbiology,n°103,103-116

Ashraf, M., H.R. Athar, P.J.C. Harris et T.R. Kwon(2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. Adv. Agron. 97: 45-110.

Aubert G ., (1978) .Methodes d'analyse des sols ,191.

BADER,R .,HARROUDJ,R(2014).production de chitinase par des actinomycètes d’origine rhizosphérique et clinique. Mémoire de master.université constantine1, constantine

Bakker, P.A.H.M., R. van Peer et B. Schippers (1991). Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. Pages 217- 230

Beauchamp, C.J.(1993). Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agent. PHYTOPROTECTION 74: 19-27.

Beneduzi, A. Ambrosini, A. & Passaglia, Luciane M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet Mol Biol, 35(4 Suppl): 1044-1051.

Berge,O.,Guinebretiere,M.H.,Achouak,W.,Normand,P.,Heulin,T.(2002). *Paenibacillus graminis* sp.nov and *paenibacillus odorifer* sp.nov, isolated from plant roots,soil and food.Int.J.Syst.Evol.Microbiol,n°52,607-616

Berggren I., Van Vuurde J W et Mårtensson AM. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium*

leguminosarum bv. viceae. Applied Soil Ecology. 2001; 17(2), 97-106. Acad 95(12):6578–6583

Bhatt K, Maheshwari DK (2019) Decoding multifarious role of cow dung bacteria in mobilization of zinc fractions along with growth promotion of *C. annuum* L. Sci Rep 9(1):1-10

Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture , Cambridge Scholars Publishing. 540p.

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

Bouali W , Malek F, Sahin F and Djamel Eddine Abdelouahid (2016) , Morphological, physiological and biochemical characterizations of some soil isolates of *Bacillus cereus* group from Algeria. Vol. 10(29),1094-1103.

BOURAS,F,Z(2018).microorganismes producteurs de métabolites secondaires et enzymes .thèse de doctorat,université djillali liabès,sidi bel abbès.

Sidi baba A et Bent Mohamed A (2007),Manuel de travaux pratiques de microbiologie , université de Nouakchott.

Brown, M.E., (1974). Seed and root bacterization. Annu. Rev. Phytopatol. 12, 181–197.

Bull, C.T., Weller, D.M., Thomashow, L.S., 1991. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2–79. Phytopathology 81, 954–959.

Burdman, S., E. Jurkevitch et Y. Okon (2000). Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, In: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250

Burdman, S., E. Jurkevitch et Y. Okon (2000). Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, *In*: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.

Callot., Dupuis, M .(1980). Le calcaire actif du sol et sa signification.Bull.Ass.Fr.etud Sol , 1 , 17-26

Canler J-P,(2005) . Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : Origines etsolutions. Groupe Gis-Biostep. Doc & Tech. FNDAE n°33 : pp 100-104.

Cattelan, A.J., P.G. Hartel et J.J. Fuhrmann (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J., 63: 1670-1680.

CHERIF Hafsa,(2014).Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides . Doctorat , Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.177.

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 .

- Cooper, R., (1959).** Bacterial fertilizers in the Soviet Union. *Soil Fertil.* 22, 327–333.
- Cubitto, M. A., Moran, A. C., Commendatore, M., Chiarello, M. N., Baldini, M. D., and Sineriz, F. (2004).** Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation* 15, 281-287.
- Dinesh R, Srinivasan V, Hamza S, Sarathambal C, Gowda SJA, Ganeshamurthy AN, Gupta SB, Nair VA, Subila KP, Lijina A, Divya VC (2018)** Isolation and characterization of potential Zn solubilizing bacteria from soil and its effects on soil Zn release rates, soil available Zn and plant Zn content. *Geoderma* 321:173–186.
- Dommergues Y., Mangenot F.** *Ecologie microbienne du sol* (No. 631.46). Masson. 1970.
- Doran JW, Zeiss MR (2000)** Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl Soil Ecol* 15:3–11.
- Downes, BP., CR. Steinbaker, DN. Crowell (2001)** Expression and processing of a hormonally regulated b-expansin from soybean. *Plant Physiol* 126:244–252
- 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.
- Elo,S.,Suominen,I, Kampfner,P.,Juhanoja,J.,Salkinoja . Salonen,M.,Haahtela,K.(2001).** *paenibacillus borealis* sp.nov., a nitrogen fixing species isolated from spruce forest humus in finland.*Int.J.sys.evol.Microbiol*,n°51,535-545
- ElSorra E. Idris, Domingo J. Iglesias, Manuel Talon, and Rainer Borriss (2007) .** Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 . *MPMI* . 6 . 619-626 pp .
- Emmanuel .J, Marc .O, Philippe. T (2008).** Caractéristiques moléculaires de l’immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12(4), 437-449.
- Enebak, S.A., Wei, G., Kloepper, J.W., 1998.** Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *For. Sci.* 44 (1), 139–144.
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clement, C., Barka, E. A., Jacquard, C., and Dorey, S. (2015).** Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology* 16, 177-87.
- Fritze D. (2004)** Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology* 94, 1245-1248.
- G.J. Zagury, K.S. Narasiah, R.D. Tyagi et R. Brzezinski (1997) .** Conservation et réactivation de communautés bactériennes ferroxydantes impliquées dans la biolixiviation des sols contaminés.*Can.j*,24, 1050-1058 pp .
- Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD (2004)** Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42:243–270.

García Lucas, J.A., Schloter, M., Durkaya, T., Hartmann, A. & Gutierrez-Maero, F.J. (2003). Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biol Fertil Soils* 37(6): 381-385.

-Ghalem,M(2016). Isolement et caractérisation des bactéries promotrices de développement (PGPB) associées au pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Thèse de doctorat. UNIVERSITE DJILLALILIABES DE SIDI BEL ABBES,Algérie

Glick., B.R., D.M. Penrose et L. Jiping (1998). A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63–68

Gobat J , Aragno M and Matthey W (2010) , Les briques du systeme sol : constituants internes et etres vivants in : *Le sol vivant : Bases de pedologie - Biologie du sol . ed 3 ,* Presses polytechniques et universitaires romandes.

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin SH, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res* 206:131–140

Habib SH, Kausar H, Saud HM, Ismail MR, Othman R (2016) Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice. *Int J Agric Biol* 18:1560–8530.

Hafeez B, Khanif YM, Saleem M (2013) Role of zinc in plant nutrition-a review. *Am J Exp Agric* 3:374–391

Haichour N (2017) , Travaux pratiques de microbiologie générale au Laboratoire de Microbiologie Appliquée, université de Sétif , Algérie , 1-19.

Hamoum . H (2017) , Screening des diazotrophes non symbiotiques associés aux plantes des zones salines de l'ouest algérien : effet phyto-stimulateur sur la croissance du blé dur , These . Université de Mostaganem . 168p.

HMOUNI, A.R. , MASSOUMI, M. , DOUIRA, A, M(1999). Etude de l'activité antagoniste de *Trichoderma* spp. et de *Gliocladium* spp. à l'égard de *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise de la tomate.75-92

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

Holl, F.B., Chaneway, C.P., Turkingon, R., Radley, R.,(1988) Growth response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymixa*. *Soil Biol. Biochem.* 20, 19–24.

Hugenholtz P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era . *Genome Biol* .3 , revu 0003.

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

Islam, M. T., Rahman, M. M., Pandey, P., Jha, C. K., and Aeron, A. (2017). *Bacilli and Agrobiotechnology.* Springer International Publishing, New York, NY. 416 pages

- Joung, K.-B. and Côté, J.-c. (2002)** Evaluation of ribosomal RNA gene restriction
- Kabata-Pendias A., Pendias H. (2001).** *Trace Elements in Soils and Plants*. London: CRC Press.
- Kafle A, Cope KR, Raths R, Yakha JK, Subramanian S, Bücking H, Garcia K (2019)** Harnessing soil microbes to improve plant phosphate efficiency in cropping systems. Review. *Agronomy* 9:2–15
- Kajohnpong D , Jureporn K , Sungwan K and Suphatee S (2014) .** Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids . *KKU Res. J* , 19 , 268-275.
- Karak T., Singh U. K., Das S., Das D. K., Kuzyakov Y. (2005).** Comparative efficacy of ZnSO₄ and Zn-EDTA application for fertilization of rice (*Oryza sativa* L.). *Arch. Agron. Soil Sci.* 51, 253–264. 10.1080/03650340400026701
- Kirdi B, Zermane N. (2010).** Rôle des PGPR dans la stimulation de la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites : *Orobanche crenata* nForsk. et *Cuscuta campestris* Yunker /'' Role of PGPR in plant growth promotion and control of the parasitic weeds : *Orobanche Crenata* Forsk. and *Cuscuta Campestris*. Yuncker''.
- Kloepper, J.W.(1992).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Pages 255-274
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R.M., 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7, 39–43.
- 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.
- Kochar, M., Upadhyay, A., and Srivastava, S. (2011)** Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Res. Microbiol.* 162: 426-35
- LAURIANE, G(2015).** CARACTÉRISATION DE RHIZOBACTÉRIES DU GROUPE DES *BACILLUS* BÉNÉFIQUES À LA CROISSANCE DE LA TOMATE, magister. UNIVERSITÉ DU QUÉBEC, Canada
- LAURIANE, G(2015).** caractérisation de rhizobactéries du groupe des *bacillus* bénéfiques a la croissance de la tomate . Mémoire de master. L'université du Québec, a trois -rivières canada .
- Led Yered . J ., Alicia .C ., Luis .G ., Tecilli .C., Carlos . G., Emma .B, (2012) .**The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes . *J Bioenerg Biomembr.* 44:473–486 pp
- LIU H , WU X , REN J H and YE JR (2011) .** Isolation and Identification of Phosphobacteria in Poplar Rhizosphere from Different Regions of China , *Pedosphere* , 1 , 90-97 .
- Luo, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Guo, X., & Zhu, L. (2020).** Distribution characteristics and mechanism of microplastics mediated by soil physicochemical properties. *Science of The Total Environment*.

- Lynch, J.M (1983).** Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lynch, J.M. (1983).** Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity blackwell Scientific Publications, Oxford.
- MacMillan, J.(2002).** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. J. Plant Growth Regul. 20, 387-442.
- Mathieu,B.R(2020).** *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis* pour lutter contre la pourriture grise chez la tomate et le concombre de serre.magister,université laval, Québec, Canada
- Miloud,Y(2018).** Etude du potentiel bénéfique des souches de *Rhizobium* pour *Medicago truncatula*: symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose.Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP), Toulouse.
- Mishustin, E.N., Naumova, A.N., 1962.** Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. Microbiologia 31, 543–555.
- Mumtaz MZ, Ahmad M, Jamila M, Hussain T (2017)** Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. Microbiol Res 202:51–60
- Mumtaz MZ, Ahmad M, Jamila M, Hussain T (2017)** Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. Microbiol Res 202:51–60
- Mumtaz MZ, Barry KM, Baker AL, Nichols DS, Ahmad M, Zahir ZA, Britz ML (2019)** Production of lactic and acetic acids by *Bacillus* sp. ZM20 and *Bacillus cereus* following exposure to zinc oxide: a possible mechanism for Zn solubilization. Rhizosphere 12:00170.
- NAIK ,P.R., SAKTHIVEL, N (2006).** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic pseudomonas sp.strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential.res.Microbiol, 157:538-546
- Nalini Ramarao , Seav-Ly Tran, Marco Marin and Jasmina Vidic (2020) .** Advanced Methods for Detection of *Bacillus cereus* and Its Pathogenic Factors . sensors .20 , 2667-2690
- Neilands J. B., Leong S. A. (1986).** Siderophore in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Pl. Physiol., 37: 187-208.
- Nortcliff S , Bannick C , Litz N and Schulte-Bisping H . , 2006.** Soil, Definition, Function, and Utilization of Soil , vol33,399-419.
- Noulas C, Tziouvalekas M, Karyotis T (2018)** Zinc in soils, water and food crops. J Trace Elem Med Biol 49:252–260
- Okon, Y., Kapulink, Y., 1986.** Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant and Soil 90, 1–3.
- OULEBSIR-MOHAND KACI H., KHENDOUDI Z., TIHAR-BENZINA F. et ALLALBENFEKIH L.(2020).**CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET MOLECULAIRE D’UNE BACTERIE RHIZOSPHERIQUE *Bacillus* sp. H1 (LT547812) Et Etude DeSon Efficacité Entomopathogène CONTRELA PYRALE DE LA DATTE *Ectomyelois ceratoniae* . Vol 10 N° 2.32-46

- Panhwar, Q. A., Othman, R., Rahman, Z. A., Meon, S., and Ismail, M. R. (2012).** Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. *African Journal of Biotechnology* 11, 2711-2719
- Parvatha Reddy.P (2014)** .Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection . Springer , New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London .313
- patterns for the classification of Bacillus species and related genera.** *J. Appl. Microbiol.* 92: 97-108.
- Paulin,M(2007).** Etude moléculaire de l'antibiose et de son impact sur des agents phytopathogènes fongiques. Thèse de doctorat. Université de Moncton,Canada.
- pedraza,R.O.(2008).**recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bactereria.international journal of food microbiology,125(1),25-35.
- Penrose, D.M. et Glick BR. 2001. Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can. J. Microbiol.*47:368–372.
- Pérez-Montaña, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., JiménezGuerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T., 2014.** Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* 169, 325–336.
- Poonam . B , Manish. K , Singhab . M , Kumar . A ,Asifa .Q (2022).**Role of plant growth-promoting rhizobacteria in boosting the phytoremediation of stressed soils: Opportunities, challenges, and prospects.Volume 303, Part 1, 134954.
- Probanza . A , Lucas Garc'ia. J.A , Ruiz Palomino .M, Ramos .B Gutiérrez Mañero F.J. (2002) .** Pinus pinea L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (B. licheniformis CECT 5106 and B. pumilus CECT 5105) , *Applied Soil Ecology* , 20 , 75–84 .
- Reddy, M.S., Ila, R.I. & Faylon, P.S. (2014).** Recent Advances in Biofertilizers and
- Richardson, AE. (2001):** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28: 897-906.
- Roger, P.A et Reynaud ,P.A (1977) .** Les méthodes d'isolement et de purification des Cyanophycées , sér. Biol., vol.12, no 2,121-128
- Sadiq HM, Jahangir GZ, Nasir IA, Iqtidar M, Iqbal M (2014)** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil. *Biotech Biotech Equip* 27:4248–4255
- Schippers, B., Scheffer, R.J., Lugtenberg, B.J.J., Weisbeck, P.J., 1995.** Biocoating of seeds with plant growth-promoting rhizobacteria to improve plant establishment. *Outlook on Agric.* 24, 179–185.
- Setlow P, Johnson EA (2007)** Spores and their significance. *Curr Opin Microbiol* 6:550–556

- Shahab, S. and Ahmed, N. (2011)** Growth Promotion Of Chick Pea By Native Phosphate Solubilizing And Auxin Producing Bacteria. The Internet Journal of Microbiology Volume 9 Number 1
- Sharma P, Kunawat KC, Kaur S, Kaur N (2014)** Assessment of zinc solubilization by endophytic bacteria in legume rhizosphere. Ind J Appl Res 4:439–441
- Siciliano, S.D., Germida, J.J., 1998.** BIOLOG analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that pseudomonad inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. Soil Biol. Biochem. 30, 1717–1723.
- Srivastava, L.M. (2002)** Chapter 6: Auxin in Plant Growth and Development: Hormones and Environment. CA: Academic Press
- Standards Unit, Microbiology Services, PHE (2018).** Bacteriology – Identification | ID 9. Issue no: 3.1, 27 pp.
- Standards Unit, Microbiology Services, PHE (2018).** Bacteriology – Identification | ID 9. Issue no: 3.1, 27 pp.
- Steer, J., Harris, J.A., 2000.** Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. Soil Biol. Biochem. 32, 869–878.
- 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.
- Susilowati A, Wahyudi AT, Lestari Y, Suwanto A, Wiyono S (2011)** Potential *Pseudomonas* isolated from Soybean rhizosphere as biocontrol against soilborne phytopathogenic fungi. HAYATI J Biosci 18(2):51–56.
- Swain M.R., et Ray . R.c (2007) .** Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. Microbiol . Res . 162 : (in press) .
- Timmusk SNS., B. Nicander, U. Granhall et E. Tillberg (1999).** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. Soil Biol. Biochem. 31:1847–1852.
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., and Thonart, P. (2004).** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology 96, 1151-60.
- TRIVEDI, P., Pandey, A., Palni L.M.S(2008).** In vitro evaluation of antagonistic properties of *pseudomonas corrugate* . microbiol . Res. 163:329-336 .
- Tsegaye Z, Assefa F, Tefera G, Alemu T, Gizaw B (2018)** Characterization and identification of *Tef* (*Eragrostis tef*) seed endophytic bacterial species and evaluate their effect on plant growth promotion. J Plant Pathol Microbiol 9:438–446.
- Turnbull PCB, Kramer J, Melling J (1990)** *Bacillus*. In: Topley WWC, Wilson GS (eds) Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, 8th ed., vol. 2. Edward Arnold, London, United Kingdom, pp 188–210
- Vacheron, J., Desbrosses, G & Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. et al. (2013).** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, Front Plant Sci. 4(356): 1-19.

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

Vicki A. Luna, K. Kealy Peak, William O. Veguilla, Frank Reeves, Lea Heberlein-Larson, Andrew C. Cannons, Phil Amuso and Jacqueline Cattani (2005) . Use of Two Selective Media and a Broth Motility Test Can Aid in Identification or Exclusion of *Bacillus anthracis*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* , p. 4336–4341.

Vladimir I. Klichko, James Miller, Aiguo Wu, Serguei G. Popov, and Ken Alibek (2003) . Anaerobic induction of *Bacillus anthracis* hemolytic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.303.855–862.

Von der weid,I.,Duarte,G.F.,Van elsas,J.D.(2002).*paenibacillus* brasilensis sp.nov.,a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in brazil.*Int J Syst Evol microbial* n°52,2147-2153

Wei, F., Hu, X., and Xu, X. (2016). Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. *Scientific Reports* 6, 22611.

White P. J., Broadly M. R. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci.* 10, 586–593. 10.1016/j.tplants.2005.10.001

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl*

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

Yang, C.H. & Crowley, D.E. (2000). Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Appl Environ Microbiol* 66(1): 345-351.

York L.,Carminati A., Mooney S.,Ritz K and Bennett M. , 2016.The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots, *Journal of Experimental Botany*,N12,Volume67, 3629–3643.

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

Yumoto . I , Yamazaki. K , Sawabe . T , Nakano.K , Kawasaki . K Ezura.Y ans Haruo Shinano . H (1998) . *Bacillus horti* sp. nov., a new Gram-negative alkaliphilic *Bacillus* . *International Journal of Systematic Bacteriology* . 48 . 565-571 pp

ZAREMSKI A et GASTONGUAY L (2009) . EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTAGONISTE ENTRE MICROORGANISMES LIGNICOLES: RECHERCHE DES POSSIBILITES D'UTILISATION EN PRESERVATION DES POTEAUX ELECTRIQUES D'HYDROQUEBEC . Mémoire , institut de recherche Hydro Québec .

Zhalnina K, Dias R, de Quadros PD(2015) . Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microb Ecol.*; 69:395–406

https://www.environmentalscience.bayer.ca/greenhouse-and-nursery/products/rhapsody%7B66dce011-4ae1-4900-835d-c3e3defae7c5%7D?sc_lang=fr-ca
consulté le 26-05-2022.

Annexe

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Composants et poids en g/l

Plate Count Agar :

- Peptone de caséine5,00 g/l
- Extrait de levure2,50 g/l
- Glucose..... 1,00 g/l
- Agar15,00 g/l

Gélose nutritive :

- Extrait de boeuf..... 1 g/l
- Extrait de levure2.5g/l
- Peptone 5,0 g/l
- Chlorure de sodium5.0g/l
- Agar 15,0 g/l

Viande Foi :

- Peptone viande-foie30,00 g/l
- Sulfite de sodium2,50 g/l
- Glucose2,00 g/l
- Citrate ferrique ammoniacal....0,50 g/l
- Amidon soluble 2,00 g/l
- Agar 11,00 g/l

Mannitol-Mobilité-Nitrate

- Peptone de caséine10,00 g/l
- Mannitol7,50g/l
- Nitrate de potassium 1,00 g/l
- Rouge de phénol..... 0,04 g/l
- Agar3,50 g/l

LB

- Tryptone..... 10g/l
- Extrait de levure5g/l
- Chlorure de sodium..... 5g/l
- Agar bactériologique... 15g/l
- Eau distillée (qsp)1l

PVK (Pikovskaya)

- Glucose5g/500ml
- Extrait de levure0.25g/500ml
- (NH₄)₂SO₄0.25g/500ml
- MgSO₄.7H₂O.....0.005g/500ml
- Na₂INSP₆.....2.5g/500ml
- Nacl.....0.1g/500ml

- Kcl.....0.1g/500ml
- MnSo4.2H2O.....0.001g/500ml
- FeSO4.7H2O.....0.001g/500ml
- Agar7.5g/500ml

BurkN-Free (Milieu exempt d'azote)

- KH₂PO₄0.4g/L
- Phosphate dipotassique.....0.5g/L
- Sulfate de sodium.....0.05g/L
- Chlorure de calcium.....0.2g/L
- Sulfate de magnésium heptahydraté.....0.1g/L
- Sulfate de fer heptahydraté.....0.005g/L
- Molybdate de sodium.....0.003g/L
- Agar15g/L

Bunt et Rovira

- Glucose10g/L
- NH₄ SO₄..... 1g/L
- Mg SO₄.....0.2g/L
- Kcl.....0.2g/L
- K₂HPO₄.....0.1g/L
- Zno.....1g/L
- Agar..... 20g/L

Gélose au sang :

- Extrait de boeuf..... 1 g/l
- Extrait de levure2.5g/l
- Peptone 5,0 g/l
- Chlorure de sodium5.0g/l
- Agar 15,0 g/l
- Sang de cheval5 ml

PH : 7.3

Annexe 2 : Techniques

Procédure de coloration des endospores :

1. Prenez une lame propre sans graisse et faites un frottis
2. Sécher à l'air et fixer l'organisme sur une lame de verre et couvrir d'un carré de papier buvard ou d'essuie-tout coupé pour s'adapter à la lame.
3. Saturer le papier buvard avec une solution de teinture vert malachite et le vaporiser à la vapeur pendant 5 minutes, en gardant le papier humide et en ajoutant plus de colorant au besoin. En variante, la lame peut être vaporisée sur un récipient d'eau bouillante.
4. Lavez la lame à l'eau du robinet
5. Contre-colorer avec 0,5% de safranine pendant 30 secondes . Laver à l'eau du robinet, séchez.
6. Examinez la lame au microscope pour la présence d'endospore

Coloration de Gram :

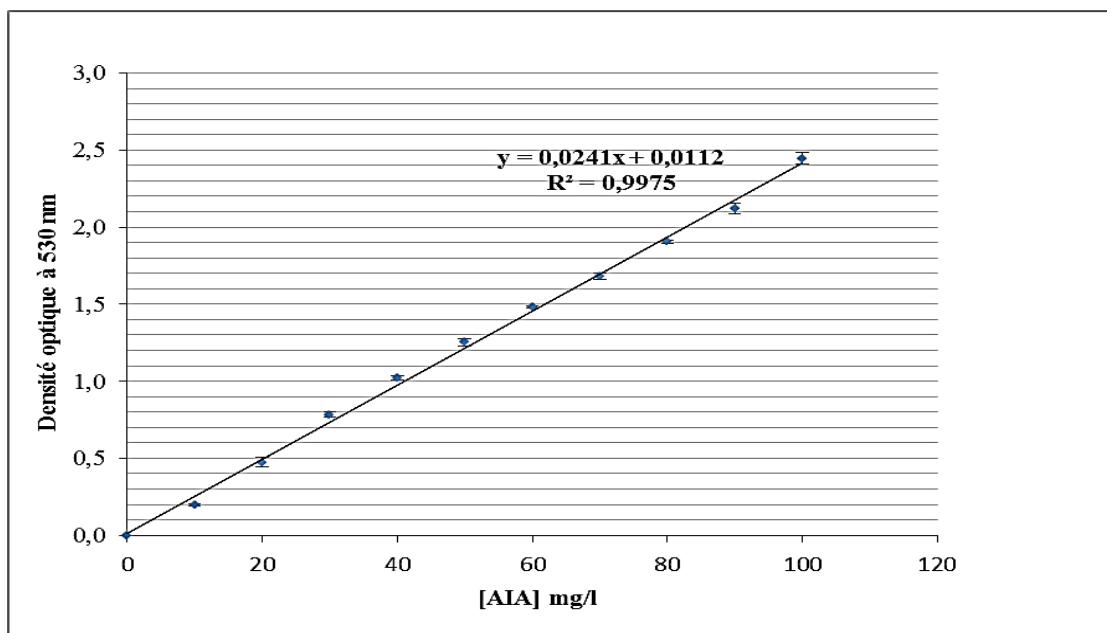
1. Inonder le frottis séché à l'air et fixé à la chaleur pendant 1 minute avec le réactif de coloration au cristal violet. Veuillez noter que la qualité du frottis (concentration cellulaire trop lourde ou trop légère) affectera les résultats de la coloration.
2. Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes
3. Inondation avec le mordant : iode ou lugol. Attendez 1 minute
4. Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes.
5. Inondation la lame avec agent décolorant. Attendre 15 secondes ou ajouter goutte à goutte pour faire sortir l'agent de décoloration
6. Inondation la lame avec contre-colorant, 'safranine'. Patienter 30 secondes à 1 minute.
7. Laver la lame dans un jet d'eau douce et indirecte de l'eau du robinet jusqu'à ce qu'aucune couleur n'apparaisse dans l'effluent, puis sécher avec du papier absorbant.
8. Observez les résultats de la procédure de coloration sous immersion dans l'huile. Examiner au microscope, objectif x100.

Test Mannitol-Mobilité

1. Si avant utilisation, le culot est fragmenté, reprendre les tubes au bain-marie vers 90°C et laisser refroidir en position vertical dans un bain d'eau froide.
2. Ensemencer avec un fil de platine ou d'une pipette Pasteur, par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose.
3. Incuber 18 à 24 heures à 35-37°C.
4. La fermentation du mannitol provoque un virage au jaune du milieu. Les bactéries mobiles envahissent tout le milieu à partir de la piqûre centrale.
5. La réduction des nitrates sera mise en évidence par l'addition des réactifs Nitrate A et B.

Annexe 3 : Courbes

Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA (Hamoum,2017).



Annexe 4 : Tableaux**Tableau 1 : Analyse de Variance de l'AIA**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1888,984	32	59,031				
VAR.FACTEUR 1	1885,473	10	188,547	1181,652	0		
VAR.RESIDUELLE 1	3,51	22	0,16			0,399	4,29%

Tableau 2 : Analyse de Variance du Phosphate

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	558748,9	32	17460,9				
VAR.FACTEUR 1	557635,8	10	55763,57	1102,121	0		
VAR.RESIDUELLE 1	1113,125	22	50,597			7,113	2,96%

Tableau 3 : Analyse de Variance du Zinc

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	141307,7	32	4415,865				
VAR.FACTEUR 1	140326,9	10	14032,69	314,754	0		
VAR.RESIDUELLE 1	980,828	22	44,583			6,677	3,33%