

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

Caractérisation de l'activité de solubilisation de
phosphore chez les souches (PGPR) *Azotobacter*

Présenté par : Toumi Chahrazed

Tounsi Farah

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président : Mr Abbouni. B (Professeur, Univ_UDL_SBA)

Examineur : Mr Benine M (MCA, Univ_UDL_SBA)

Examinatrice : Mme Khaldi. A (MCB, Univ_UDL_SBA)

Encadreur : Mme Ghalem M (MCB, Univ_UDL_SBA)

Année universitaire 2020 - 2021

Session : « Juin »

Remerciements

Remercions ALLAH le tout puissant..... qui nous a donné la force et la patience lors de la réalisation de ce travail.

Nous exprimons nos remerciements à notre encadreur **Mme GHALEM.M** Maitre assistant à l'UDL de Sidi Bel Abbes, pour l'encadrement de ce travail aussi pour sont rôles prépondérants, ainsi que pour nous avoir fait profiter de ses connaissances.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et remerciement à notre responsable de spécialité biotechnologie microbienne et président du jury **MR ABBOUNI. B** Professeur A l'UDL de Sidi Bel Abbes.

Nous exprimons des remerciements aussi au membre du Jury : **Mr BENINE. M** Maître de conférences A pour son soutien précieux lors de la rédaction de ce mémoire et **Mme. KHALDIA** Maître de conférences B. pour leurs encouragements et pour l'intérêt qu'ils nous ont porté à ce travail.

Et nous remercieront très vivement **MME.GHERBI.N, MME MITIR .S, MELLE BRINISSET .D** pour Nous avoir accueillis dans le laboratoire microbiologie appliquée ou nous avons trouvé tout les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse et ces encouragements motivants.

Nous remercieront très chaleureusement tous nos enseignants de biotechnologie microbienne.

Dédicaces

Je remercie avant tout ALLAH tout puissant, de m'avoir guidé toutes les années d'étude et m'avoir donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

Avant de passer dans le vif du sujet, je dédie ce travail à:

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi **mon père**

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; **maman** que j'adore.

Au meilleur homme que je puisse connaître, le plus gentil , je peux apprendre à connaître la personne la plus précieuse. Qui m'a aidé et m'a soutenu à chaque étape de ma vie. A qui j'aime de tout mon coeur, mon cher **grand-père**.

A celui qui n'a pas cessé de prier pour moi pour le succès. A celui qui essaie toujours de m'aider et de me défendre .Mon cher **grand-mère**.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères **MOHAMMED ABBDE ALKADER** et **FAYÇAL** , je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

À toute la famille **TOUMI** et la famille **BEN MOUSSA**

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude.

Chahrazed

Dédicaces

Je remercie avant tout **ALLAH** tout puissant, de m'avoir guidé toutes les années d'étude et m'avoir donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

C'est avec un grand plaisir et une immense joie et fierté que je dédie ce modeste travail :

à mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour s'insère et ma gratitude profonde.

À Ma Très Chère Mère

Ma douce et tendre mère. Quoi que je face, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là c'est bien grâce à vous que dieu vous donne longue vie et vous protège pour moi.

À mon chère mari : **YASSINE**

A mes chers frères : **OMAR, KADA, MOHAMED, NACER, ISHAK**

À mes très chères sœurs : **KELTOUM , MAROUA**

pour leurs soutien et encouragement.

À toute la famille **TOUNSI** et la famille **SADOUKI**

A toute personne qui a participé à la réalisation de ce mémoire.

FARAH

Résumé

Les PGPR sont des bactéries du sol qui peuvent stimuler la croissance des plantes de façon directe ou indirecte en fournissant des substances qui sont habituellement présentes en quantité limitée dans le sol.

Les bactéries solubilisant le phosphate jouent un rôle vital dans la fertilité du sol et par conséquent favorisent la croissance des plantes.

L'objectif global de cette étude consiste à isoler et identifier des bactéries solubilisant le phosphate et à optimiser leur activité de solubilisation et étudier leurs activités PGP afin de les utiliser comme inoculums sur les graines de blé dur dans le but d'améliorer la germination et la croissance.

Dans cette présente étude, 9 isolats bactériens ont été obtenus à partir de rhizosphères de blé dur de la wilaya de Sidi Bel Abbès, et testés *in vitro* pour leur effet promoteur de la croissance.

La sélection des isolats les plus performants a été établie en s'appuyant sur leur capacité à produire des métabolites particuliers (l'acide indole acétique et l'ammoniac) et sur leur capacité à solubiliser le phosphate. Les indices de solubilisation enregistrés ont dépassé 2.

Différentes conditions de cultures, source d'azote et source de carbone ont été utilisées pour optimiser la solubilisation du phosphate par deux bactéries isolées à partir de sol PIA et PI 5.

Le glucose a été sélectionné pour être la meilleure source de carbone pour la solubilisation du phosphate par les deux isolats. L'effet de la variation de source d'azote dans le milieu a permis de sélectionner le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ comme la source d'azote la plus favorable pour les deux isolats bactériens.

Les résultats ont montré que le pH=7 et la température de l'incubation 30°C sont les conditions optimales pour la solubilisation pour les bactéries utilisées. L'étude de l'effet du temps d'incubation a mené à sélectionner le 3^{ème} jour d'incubation comme un temps optimal pour la solubilisation de phosphate par les deux isolats.

Les deux isolats (pi A, pi 5) présentant un important potentiel de promotion de la croissance des plantes *in vitro* et *in vivo* et répondant aux caractéristiques microscopiques, macroscopiques et biochimiques des *Azotobacter* ont été identifiés par des galeries Api 20 E et Api 50 CH.

Mots clés : *Azotobacter*, PGPR, blé dur, Activités PGP, Bactéries solubilisant le phosphate, optimisation de la solubilisation de phosphore

ABSTRACT

PGPRs are soil bacteria which can stimulate plant growth either directly or indirectly by providing substances which are usually limited in quantity in the soil.

Phosphate solubilizing bacteria play a vital role in soil fertility and thus promote the growth of plants.

The overall objective of this study is to isolate and identify bacteria that solubilize phosphate and optimize their solubilization and study their PGP activities in order to evaluate the inocula that will be applied to the seeds of durum wheat in order to improve germination and growth.

The study resulted in 9 bacterial isolates selected on the basis of their ability to fix nitrogen. The selection of the best performing isolates was based on their ability to produce specific metabolites (indole acetic acid and ammonia), their ability to solubilize phosphate in liquid and solid Pikovskaya medium.

Different nitrogen source and carbon source were used under variable culture conditions to optimize phosphate solubilization by the two most performing isolates PI A and PI 5 soil.

Glucose was selected to be the best carbon source for phosphate solubilization by the two isolates. The effect of varying the nitrogen source in the medium allowed ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ to be selected as the most favorable nitrogen source for the two bacterial isolates.

The results showed that the pH = 7 and the incubation temperature 30 ° C are the optimal conditions for solubilization for the bacteria used. The study of the effect of incubation time led to the selection of day 3 of incubation as the optimal time for phosphate solubilization by the two isolates.

The (PI A, PI 5) isolates with significant potential for promoting plant growth in vitro and in vivo and presenting the microscopic, macroscopic and biochemical characteristics of *Azotobacter* have been identified by Api 20 E and Api 50 CH.

Key words: *Azotobacter*, phosphorus solubilization, NH₃, , PGP activities, Phosphate solubilizing bacteria, optimization of phosphate solubilization.

:

PGPR هي بكتيريا التربة التي يمكن أن تحفز نمو النبات إما بشكل مباشر أو غير مباشر من خلال توفير المواد التي عادة ما تكون بكميات محدودة في التربة. تلعب البكتيريا التي تذوب الفوسفات دوراً حيوياً في خصوبة التربة وبالتالي تعزيز نمو النبات.

الهدف العام من هذه الدراسة هو عزل وتحديد البكتيريا التي تعمل على إذابة الفوسفات وتحسين ذوبانها ودراسة أنشطة PGP الخاصة بها من أجل استعمالها كسماد والذي سيتم تطبيقه على بذور القمح من أجل تحسين الإنبات والنمو.

في هذه الدراسة، تم الحصول على 9 عزلات بكتيرية من جذور القمح لولاية سيدي بلعباس، وتم اختبارها في المختبر لتأثيرها المعزز للنمو.

تم اختيار أفضل العزلات أداءً بناءً على قدرتها على إنتاج مستقبلات معينة (حمض الأسيتيك الإندول)، وقدرتها على إذابة الفوسفات في وسط Pikovskaya السائل و الصلب و انتاج NH_3

تم استخدام وسائط استنبات مختلفة ومصدر نيتروجين ومصدر كربوني تحت ظروف استزراع متغيرة لتحسين إذابة الفوسفات بواسطة بكتيريا معزولة من تربة PI A و PI 5.

تم اختيار الجلوكوز ليكون أفضل مصدر للكربون لإذابة الفوسفات بواسطة العزلتين. سمح تأثير تغيير مصدر النيتروجين في الوسط باختيار كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ كأفضل مصدر للنيتروجين للعزلتين البكتيريتين.

أظهرت النتائج أن الأس الهيدروجيني = 7 ودرجة حرارة الحضانة 30 درجة مئوية هي الظروف المثلى لإذابة البكتيريا المستخدمة. أدت دراسة تأثير زمن الحضانة إلى اختيار اليوم الثالث للحضانة باعتباره الوقت الأمثل لإذابة الفوسفات بواسطة العزلتين

تم تحديد العزلات (PI A، PI 5) التي تظهر إمكانات كبيرة لتعزيز نمو النبات في المختبر وفي الجسم الحي والاستجابة للخصائص الميكروسكوبية والكيميائية الحيوية للأزوتوباكتريا من قبل Api 20 E و Api 50 CH.

الكلمات المفتاحية: *Azotobacter*، ذوبان الفوسفور، الاسمدة الحيوية، البكتيريا المذيبة للفوسفات، أنشطة PGPR، NH_3 تحسين ذوبان الفوسفات.

Liste des abréviations

%	Pourcent.
°C	Degré Celsius.
μl	Microlitre.
μm	Micromètre.
AIA	Acide indole acétique.
ACC	1- aminocyclopropane -1- carboxylate
Ca₃(PO₄)₂	Phosphate tricalcique.
CaCl₂	Chlorure de calcium.
cm	Centimètre.
CO₂	Dioxyde de carbone.
Do	Densité optique.
Fe	Fer.
FeCl₃	Chlorure de fer.
g	Gramme.
g/l	Gramme par litre.
h	Heure.
ha	Hectare .
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂PO₄	Dihydrogéo-phosphate.
HCN	Acide cyanhydrique.
HPO₄-2	Phosphate mono basique.
IS	Indice de solubilisation.
ISR	la résistance systémique induite
Kg	kilogramme.
L	Litre.
Mg	Milligramme.
min	Minute.
ml	Millilitre.
Mm	Millimolaire
N	Azote.
NaCl	Chlorure de sodium.
Nm	nanomètre.
Ox	Oxydase
P	Phosphore.
Pi	Phosphore inorganique
PBH	Poly - -hydroxy butyrates.
PSB	Bactéries solubilisant le phosphate
PGPR	Plants Growth Promoting Rhizobacteria.
pH	Potentiel d'hydrogène.
Rpm	Rotation par minute.
V	Volume.
VF	Viande foie.

<i>µg</i>	Microgramme.
<i>DAPG</i>	Le 2,4-diacetylphloroglucinol.
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharides.
<i>kg/ ha</i>	Kilogramme / hectare
<i>PVK</i>	Pikovskaya.
<i>LB</i>	Bouillon lysogène
<i>tr/min</i>	Tour par minute.
<i>UFC</i>	Unité formant colonie
<i>(NH4)2MoO4</i>	Molybdate d'ammonium
<i>SnCl2</i>	Chlorure d'étain
<i>KH2PO4</i>	Dihydrogénophosphate de potassium,
<i>H2SO4</i>	Acide sulfurique (sulfate d'hydrogène)
<i>N</i>	Azote
<i>N2</i>	Diazote
<i>K</i>	Potassium
<i>UV</i>	Ultraviolet
<i>Al</i>	Aluminium
<i>Ca</i>	Calcium
<i>Cl</i>	Chlore
<i>Nh4+</i>	Ammonium
<i>AAF</i>	Aéro-anaérobie facultatif
<i>AS</i>	Aérobie stricte
<i>ANS</i>	Anaérobie stricte .
<i>ES</i>	L'efficacité de la solubilisation
<i>16s</i>	ARN ribosomique
<i>Ug/l</i>	Microgramme par litre
<i>ADNr</i>	Acide desoxyribonucleique recombinant.
<i>Mg/l</i>	Milligramme par litre
<i>CO3</i>	Le trioxyde de carbone
<i>H2O</i>	L'eau
<i>O2</i>	Dioxygène.

Liste des tableaux

Tableau 01: Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des pxdlantes contrôlées par les PGPR.....	19
Tableau 02: Caractèresphénotypique des espèces de Azotobacter.....	29
Tableau 03 : Autres caractéristiques des espèces d'Azotobacter.....	31
Tableau04: les resultats de Test de mobilité des isolats.....	49

Liste des figures

Figure 01 : cycle du phosphore dans le sol.....	9
Figure 2 : La rhizosphère	12
Figure 3 : La structure de la rhizosphère	15
Figure 04 : Interactions entre les plantes et les bactéries dans la rhizosphère.....	20
Figure 05 :Mécanismes de l'amélioration de la croissance des plantes par des bactéries solubilisant le phosphate.....	22
Figure.06 : Les fonctions biologiques des sidérophores.....	23
Figure: 07 : Rôles de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes.....	25
Figure 08 : Localisation du site d'échantillonnage.....	35
Figure 09 : Lecture des résultats du test de catalase.....	38
Figure 10 : Lecture des résultats du test mannitol mobilité.....	38
Figure 11 : Détermination du type respiratoire.....	39
Figure 12 : Aspects macroscopiques des isolats	46
Figure 13 : Observation microscopique des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Grossissement x100).....	47
Figure 14 : Observation microscopique des isolats après coloration de Gram et mise en évidence de la formation des cystes (Grossissement x100).....	47
Figure15 : Exemple d'un résultat positif au test de catalase.....	48
Figure 16 : Aspect des tubes à essai contenant le milieu de cult mobilité, ensemencé avec les isolants.....	49
Figure 17 : Aspect des tubes à essai contenant le milieu de culture VF, ensemencé avec les isolats (PI 1,PI 2,PI 5,PI 6,PI 7,PI A,PI F,PI E et PI C).....	50
Figure 18 : Les résultats du test de solubilisation du tricalcuim phosphate par les isolats (PI 5,PI 7,PI 6).....	51
Figure 19 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya solide.....	51
Figure 20 : Courbe standard du dosage du phosphore produit.....	52
Figure21 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de Culture Pikovskaya liquide.....	52

Figure 22 : Résultats obtenus des différentes compositions du réactif de Salkowski. En présence et l'absence de Ltryptophane.....	53
Figure 23 : Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique.	54
Figure 24 : Concentrations d'AIA produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azotes sur milieu de culture luria-Bertani.....	55
Figure 25 : Concentrations d'AIA produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azotes sur milieu de culture luria-Bertani additionné de L-tryptophane.....	56
Figure 26 : Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH ₃	57
Figure 27 : Résultats de la capacité des neufs isolats à produire l'ammoniac (NH ₃).....	57
Figure 28 : Concentrations d'ammoniac NH ₃ produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur milieu eau péptonée.....	58
Figure 29 : Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur la germination des grains de blé.....	59
Figure 30 : Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote, sur le taux de germination du blé dur.....	59
Figure 31 : Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur la longueur des plantules et de blé dur.....	60
Figure 32 : Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur le poids de graines de blé dur (les racines plus les tiges).....	61
Figure 33 : Effetdes isolats sélzctionnés fixateurs d'azote sur l'indice de vigueur des graines de blé dur.....	61
Figure 34 :Effet de diverse source de carbone sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.....	62
Figure 35 :Effet de diverse source d'azote sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.....	63
Figure 36 :Effet de différents dosages de salinité sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.....	64
Figure 37 :Effet de la durée d'incubation sur l'activité de solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.....	65
Figure 38 :Effet de Température sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.....	66
Figure 39 :Effet de agitation sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI5.....	67

Figure 40 : Identax bacterial identification system version 1.2. **a :** création de l'espace de travail. **b :** importation de la matrice d'identification. **c :** les grilles des résultats. **D :** affichage du résultat sur écran.....69

Figure 41: Rapport d'identification des souches **PIA** (à gauche) et **PI5** (à droite)...70

Figure 42 : Profils biochimiques de la souche PIA et PI 5.....70

Sommaire

Sommaire

	Page
Introduction.....	1

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Le phosphore dans l'environnement.....	4
1. Le phosphore dans le sol	4
2. Etats de phosphore dans le sol.....	5
2.1. Le phosphore total	5
2.1.1. Le phosphore minéral	5
2.1.2. Phosphore organique.....	6
2.2. Le phosphore assimilable	6
2.3. Le comportement de phosphore dans le sol	7
2.3.1. Forme soluble dans la solution du sol	7
2.3.2. Phosphore adsorbé ou facilement échangeable	7
2.3.2.1. Adsorption directe	8
2.3.2.2. adsorption indirecte	8
2.3.3. Forme moins facilement échangeable	8
2.3.4. Forme insolubles	8
2.3.5. Forme organique	9
3. Dynamique du phosphore de le sol	9
4. Facteurs influençant la disponibilité du phosphore dans la solution du sol.....	10
4.1. Effet du pH du sol.....	10
4.2. Effet de la texture du sol.....	10
4.3. Effet de la matière organique.....	11
4.4. Effet de l'activité microbienne.....	11
II. Diversité microbienne du sol.....	11
1: la rhizosphè.....	12
1.1. Étymologie.....	12
1.2. Définition.....	12
1.3. Activité de la rhizosphère	12
1.4. Facteurs déterminant la richesse et l'activité de la rhizosphère.....	14
1.5. La microbiologie rhizosphérique.....	15
2. Les rhizobactéries.....	16
3. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes:.....	16
3.1. Définition de PGPR.....	16
3.2. Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère	17
3.2.1. Les Rhizobia	17
3.2.2. Les PGPR diazotro.....	17
3.2.2.1. Azotobacter	17
3.2.2.2. Azospirillum	18
3.2.2.3. Azoarcus.....	18
3.2.3. Bacillus	18
3.2.4. Pseudomonas.....	18
3.3: Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR	19

A:Les mécanismes directs.....	20
A-1.La fixation de l'azote.....	20
A-2.La solubilisation du phosphore.....	21
A-3.La solubilisation du potassium:.....	22
A-4.La production des sidérophores	23
A-5.La production des phytohormones	23
A-5.1.L'acide indole acétique (AIA).....	24
A-5.2. L'acide Les cytokinines et les gibbérellines	26
A-5.3. L'acide L'éthylène.....	26
B .Les mécanismes indirects	26
B-1.La compétition pour l'espace et les nutriments	27
B-2.L'Antibiose	27
B-3.Le parasitisme.....	28
B-4.Résistance systémique induite ISR (Induced Systemic Resistance).....	28
B-5.Effet phytoprotecteur des Sidérophores.....	28
III: Le genre Azotobacter	28
1.Définition.....	28
2.Importance du genre Azotobacte.....	33

Chapitre II : Matériel et Méthode

1.Objectif	35
2 . Matériel	35
2.1. Isolats bactériens	35
3.Méthodes	35
3.1. Isolement et caractérisation des bactéries du genre Azotobacter.....	35
3.1.1. Isolement et purification des Azotobacter.....	35
3.1.1.1.Purification.....	36
3.1.1.2.Conservation des isolats	36
3.1.2. Caractérisation des isolats	36
3.1.2.1.Examen macroscopique	36
3.1.2.2. Examen microscopique.....	37
3.1.2.3.Test de catalase	37
3.1.2.4.Test de mobilité des isolats	38
3.1.2.5.Mise en évidence du type respiratoire	39
3.2. Screening des activités de biofertilisation(Evaluation des activités PGP des isolats bactériens):.....	39
3.2.1.Test de la solubilisation de phosphate	39
3.2.1.1. Test de solubilisation de phosphate sur milieu solide.....	39
3.2.1.2.Test de solubilisation de phosphate en milieu liquide.....	40
3.2.1.3.Production des auxines (acide indole acétique AIA)	40
3.2.1.4.Productionde l'ammoniac.....	41
3.2.1.5. Effet de l'inoculation sur la croissance des plants de blé dur	41
4. Optimisation de solubilisation de phosphate.....	42
4.1.Courbe d'étalonnage.....	42
4.2. Optimisation de La solubilisation du phosphate.....	42
4.2.1.Effet des composantes du milieu de culture.....	42
4.2.1.1.Effet de différentes source de carbone	42
4.2.1.2. Effet de différentes dosages salinités.....	42

4.2.1.3.Effet de différentes sources de l'azote	43
4.2.2. Optimisation des conditions de cultures	43
4.2.2.1. L'effet de température	43
4.2.2.2. L'effet de la durée d'incubation	43
4.2.2.3.l'effet de l'agitation.....	44
5. Identification biochimique des isolats PI A et PI 5 par la galerie Api 20E et API 50CH.....	44

Chapitre III : Résultats

1. Isolement, purification et caractérisation des bactéries du genre Azotobacter	46
1.1. Test de catalase	48
1.2. Test de mobilité des isolats.....	48
1.3. Mise en évidence du type respiratoires	49
2. Screening des activités biofertilisation	50
2.1. Solubilisation du phosphate.....	50
2.1.1. Test de solubilisation sur milieu solide.....	50
2.1.2. Test de solubilisation en milieu liquide	51
2.2. Production d'acide indole acétique (AIA).....	53
2.3. Production de l'ammoniac	56
3. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de blé dur	58
3.1. Effet sur la germination des grains de blé.....	58
4. Optimisation de solubilisation de phosphate	62
4.1. Optimisation de La composition de milieu de culture	62
4.1.1. Effet de différentes sources de carbone	62
4.1.2. Effet de différentes sources d'azote	63
4.1.3. Effet de différentes dosages de salinité	64
4.2 Optimisation des conditions de cultures	65
4.2.1. L'effet de la durée d'incu bation	65
4.2.2. L'effet de température.....	66
4.2.3. L'effet de agitation.....	67
5. Identification biochimique des isolats PIA et PI5 par la galerie Api 20E et API 50 CH	68

Chapitre I:Dicussion

Discussion	72
------------------	----

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives.....	77
Références bibliographiques.....	79
Annexe.....	91

Introduction

Chapitre I

Revue bibliographique

Chapitre II

Matériaux et Méthodes

Chapitre III

Résultats

Chapitre IV

Discussions

Conclusion et Perspective

Référence Bibliographiques

Introduction

Le phosphore est considéré comme l'élément le plus important dans la nutrition des plantes après l'azote. Il s'agit d'un composant essentiel dans toutes les principales procédures métaboliques dans les plantes, tels que le transfert d'énergie, la photosynthèse, la transduction du signal et la respiration (Khan *et al.*, 2010). Le phosphore inorganique se retrouve dans les sols, principalement dans des complexes minéraux insolubles tels que le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), le phosphate de fer (FePO_4) et le phosphate d'aluminium (AlPO_4) (Khan *et al.*, 2014) qui apparaissent après des applications répétées d'engrais chimiques. Les plantes n'ont pas la capacité d'absorber ces formes insolubles, en plus seulement 0,1% du phosphore total se retrouve sous forme soluble et disponible pour la nutrition des plantes (Chen *et al.*, 2006). De ce fait, les niveaux de phosphore disponibles doivent être complétés dans la plupart des sols agricoles en ajoutant des engrais chimiques à base de phosphore. Les applications fréquentes et imprudentes des engrais chimiques de phosphore conduisent à une diminution de la fertilité du sol en perturbant la population microbienne et réduisent ainsi le rendement des cultures agricoles (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

L'utilisation des bactéries solubilisant le phosphate pour résoudre ce problème est une solution alternative du fait de leur capacité à solubiliser le phosphate dans les conditions normales. Cette pratique est d'ailleurs soutenue par plusieurs chercheurs (Khan *et al.*, 2007). C'est une stratégie respectueuse de l'environnement et économiquement réalisables pour améliorer la production végétale et augmenter les rendements des cultures dans les sols pauvres en phosphore (Zaidi *et al.*, 2009b). Des mécanismes comme la production des acides organiques, la chélation et les réactions d'échange d'ions sont mis en œuvre par ces bactéries pour solubiliser les formes de phosphore inaccessibles et les rendre disponibles aux plantes (Vessey, 2003).

Les bactéries solubilisant le phosphate (BSP) font partie des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) et sont capables de solubiliser le phosphate inorganique à partir de différents composés, tels que le phosphate dicalcique, le phosphate tricalcique et le phosphate rocheux (Khan *et al.*, 2010). En effet, les microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) présentent des propriétés multifonctionnelles et peuvent également exhiber des caractères favorisant la croissance des plantes par exemple, ils sont connus pour la synthèse des

sidérophores (Hamdali *et al.*, 2008), d'acide indole acétique (AIA) et d'acide gibbérellique (Viruel *et al.*, 2011). Il existe de nombreuses bactéries solubilisant le phosphate possédant la capacité de synthétiser une enzyme clé, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase (Glick, 2014) et de fixer l'azote atmosphérique (Anand *et al.*, 2016). Les bactéries solubilisant le phosphate peuvent aussi sécréter des antibiotiques et fournir une protection pour les plantes contre les maladies d'origine tellurique (biocontrôle) (Singh *et al.*, 2010). D'autres activités physiologiques des MSP impliquent la libération de cyanure d'hydrogène, qui a un avantage sélectif aux souches productrices (Badawi *et al.*, 2011). En outre, la sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale.

Les souches appartenant aux genres bactériens *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* et *Enterobacter* ainsi que les champignons *Penicillium* et *Aspergillus* sont des microorganismes solubilisant le phosphate les plus puissants (Whitelaw, 1999). L'utilisation d'inoculas microbiens (biofertilisants) possédant des activités de solubilisation de phosphate dans les sols agricoles est considérée comme une alternative écologique à d'autres applications d'engrais chimique à base de phosphore (Sharma *et al.*, 2013). Ainsi, l'application des BSP et les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) associées pourraient réduire l'application d'engrais de phosphore de 50% sans aucune réduction significative du rendement des cultures (Yazdani *et al.*, 2009). Cette pratique consiste à appliquer les bactéries solubilisant le phosphate aux semences, surfaces végétales ou au sol de légumineuses et de céréales. Ces bactéries colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante (endophytes) et facilitent la croissance en fournissant le phosphore aux plantes en croissance (Khan *et al.*, 2014).

L'augmentation du rendement du blé a été attribuée au potentiel de solubilisation des phosphates des BSP appliquées comme il a été rapporté par plusieurs chercheurs (Ponmurugan et Gopi, 2006). Le blé est parmi les céréales le plus cultivé et consommé en Algérie avec une importance nutritionnelle et économique.

L'omniprésence de ces microorganismes rhizosphériques dans la nature, et leur aptitude exceptionnelle à stimuler la croissance des plantes et à augmenter le rendement nous a conduits à entreprendre ce travail. Il s'agit principalement dans

cette thématique d'évaluer les effets de l'inoculation par des bactéries solubilisant le phosphate sélectionnées sur la croissance des plants de blé dur.

Cette étude comprend les objectifs suivants :

- a) Isolement des bactéries solubilisant le phosphore les plus efficaces provenant du sol.
- b) Caractérisation in vitro des isolats bactériens (activités PGPR).
- c) Evaluation des inoculums qui seront appliqué sur les graines du blé dur dans le but d'améliorer la germination et la croissance.
- d) Identification biochimique des bactéries sélectionnées.

I. Le phosphore dans l'environnement

Le phosphore (P) est l'élément le plus important dans la nutrition des plantes, après l'azote (N). Pratiquement, il joue un rôle important dans tous les processus métaboliques, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse des macromolécules, la synthèse d'acides nucléiques et la respiration chez les plantes (**Khan et al., 2010**).

Il a aussi un rôle important dans la fixation de l'azote chez les légumineuses (**Kouas et al., 2005**). Par conséquent, l'acquisition d'une concentration suffisante de phosphore augmente la croissance et le développement des plantes dans différents systèmes de production (**Hayat et al., 2010**).

Malgré son importance indéniable dans le cycle du vivant, l'approvisionnement en phosphore à partir du milieu reste toutefois une contrainte majeure pour de nombreux organismes vivants du sol, en particulier pour les plantes (**Plassard et al., 2015**). Ceci est dû au fait que seulement 0,1% à 0,5% du phosphore totale du sol est assimilable par les plantes et le reste du phosphore est inaccessible aux plantes (**Rodriguez et Fraga, 1999**).

1. Le phosphore dans le sol

A l'inverse du carbone et de l'azote, qui peuvent être tirés directement de l'atmosphère, le phosphore ne peut provenir que de la désagrégation des roches qui contiennent du phosphate (**Hinsinger, 2001**).

Dans le sol, le phosphore existe sous différentes formes qui interagissent via différents mécanismes physico-chimiques, biologiques et biochimiques impliquant des réactions d'adsorption et de désorption, de précipitation et de dissolution, de minéralisation et d'immobilisation .

Le cycle biogéochimique du phosphore inclut aussi des flux de phosphore sous forme de prélèvements par les plantes, et des pertes par érosion, ruissellement de surface et de profondeur, lessivage et drainage (**Haygarth et al., 1998; Kleinman et al., 2009**).

En effet, le sol peut contenir de grandes quantités de phosphore mais, il est très rarement disponible pour les plantes, étant donné que ses deux formes organiques (phytates) et inorganiques (secondaires et primaires, par exemple l'apatite) sont des composés très insolubles (**Bhattacharyya et Jha, 2012**).

La mise à disposition des ions phosphates aux plantes est régie par la désorption et la solubilisation de phosphate inorganique ainsi que par la minéralisation du phosphate organique (Richardson *et al.*, 2009).

La biodisponibilité du phosphore dans le sol peut ainsi varier considérablement d'une espèce végétale à l'autre selon ses capacités à modifier elle-même la disponibilité de Pi (phosphore inorganique) ou via les organismes naturellement présents dans sa rhizosphère (Plassard *et al.*, 2015).

2. Etats de phosphore dans le sol

Dans le sol, le phosphore se présente généralement sous deux états bien distincts: l'un représente la quantité globale donc c'est le phosphore total et l'autre quantité que la plante peut l'utiliser, c'est le phosphore dit assimilable.

2.1. Le phosphore total

Il correspond à la quantité totale que renferme le sol et qui existe sous la forme minérale ou organique.

La quantité de phosphore présente dans un sol est donc la conséquence directe de la richesse de la roche mère (Peredacamos, 2008). Les sols dérivant des roches ignées sont plus riches en phosphore totale que les sols issues des roches sédimentaires (Duthil, 1973).

A l'état naturel, les sols contiennent de un à trois tonnes de phosphore par hectare dans les premiers 20 centimètres (Beaudin *et al.*, 2008). Dans les sols dérivés de roches sédimentaires, ces teneurs, sont, en moyenne, comprise entre 0,3 et 1 ‰, dans les roches dérivées des roches cristallines ou volcaniques, elles sont beaucoup plus importantes et varient entre 1 et 4 ‰ (Schvartz *et al.*, 2005).

Mais la connaissance de cette quantité ne donne qu'une indication très imparfaite sur l'aptitude du sol à fournir du phosphore aux végétaux et à satisfaire leurs exigences (Peredacamos, 2008).

2.1.1. Le phosphore minéral

Le phosphore minérale se trouve essentiellement sous forme de composés orthophosphates. Il se trouve souvent lié avec le fer, le calcium et l'aluminium (Masmoudi, 1998). Le phosphore minéral généralement plus abondant que le phosphore organique (Gachon, 1969).

C'est le phosphore inclus dans des minéraux comme les apatites, dans tous les composés d'oxyde-hydroxydes de fer et d'aluminium, ainsi que dans les

phosphates tricalciques associés à un calcaire actif (**très insolubles dans les milieux calcaires**) (Scheiner, 2005).

Le phosphore inorganique contient 170 formes minérales dans le sol (Holford, 1997), dans la majorité des sols altérés les apatites sont les minéraux dominants sous la forme chimique générale $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ où le X exprime des anions comme le F-, Cl-, OH- ou CO₃- (Holford, 1997).

2.1.2. Phosphore organique

Le phosphate organique est présent comme phosphates d'inositol, phospholipides, acides nucléiques et divers autres esters de phosphate qui sont issus de la dégradation de la matière organique et ils sont souvent immobilisés par adsorption et fixation aux colloïdes du sol (Marschner, 1995 in Pereda Campos, 2008).

Dans les sols cultivés de longue date, sa proportion varie entre 25 et 30 % du phosphore total, tandis que dans les zones dotées d'une couverture végétale permanente naturelle (forêts et prairies), elle oscille entre 75 et 80% (Fardeau et Conesa, 1994 in Scheiner, 2005).

Le phosphore organique n'est pas à priori assimilable par les plantes, il est capable d'être utilisable par les cultures grâce à l'action des micro-organismes responsable de la minéralisation de l'humus.

Eliard (1979), estime que le phosphore organique peut contribuer pour une part importante à l'alimentation de la plante (jusqu'à 30 % dans certains cas).

2.2. Le phosphore assimilable

Appelé aussi « réserve assimilable » ou « fraction labile », c'est le phosphore susceptible d'être absorbé par les racines (Baize, 2000).

D'après Gachon (1977), les réserves assimilables du sol susceptible d'approvisionner les racines des végétaux en phosphore et de participer ainsi à l'alimentation des cultures, constituent seulement une petite partie du phosphore présent dans le sol généralement 10 à 30 % du phosphore total.

Les formes absorbées par la racine sont les ions phosphates dissous c'est-à-dire H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} dont la proportion relative varie avec le pH du sol généralement. La solution des sols agricoles, qui est la principale source de phosphore pour les racines des plantes, contient 0,01 à 3,00 mg/l du phosphore (Frossard et al, 2000).

Le rôle de la solution est donc majeur puisque sans solution il n'y aura pas de prélèvement ([Morel et al, 2011](#)).

[Gervy\(1970\)](#), estime qu'un sol est considéré comme riche en phosphore assimilable lorsque sa teneur dépasse 0,3‰, moyennement riche quand cette dernière est comprise entre 0,15 ‰ et 0,3 ‰, et pauvre quand elle est inférieure à 0,15‰.

2.3. Le comportement du phosphore dans le sol

Les différentes formes de phosphore dans le sol sont classées selon différents critères: la nature des composés phosphorés, le fractionnement chimique ou l'échange ionique. La nature des composés phosphorés permet de séparer le phosphore organique du phosphore inorganique ([Pereda Campos, 2008](#)).

2.3.1. Forme soluble dans la solution du sol

Le phosphore de la solution du sol constitue moins de 1% du phosphore total, mais est la source principale de phosphore pour les végétaux ([Pereda Campos, 2008](#)). Selon [Morel \(1996\)](#), C'est le phosphore dissout dans la solution du sol, forme ionisée de l'acide phosphorique $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} dont les proportions relatives dépendent du pH du milieu concerné.

Ces formes sont à l'origine de la nutrition phosphatée des cultures. D'après [Eliard \(1979\)](#), sa concentration est très faible : 0,2 à 0,5 mg/l, cela représente moins de 1 kg/ha dans la terre exploitée par les racines.

La solution du sol dissout une faible quantité de phosphore à cause de la faible solubilité des composés phosphatés par le pH. Cependant il faut noter que la concentration de cette solution reste sensiblement constante de fait des échanges continus avec le phosphore adsorbé.

En cas de prélèvement par les racines, ce sont les réserves du sol aisément échangeable qui libèrent des ions phosphoriques de façon à élever la teneur de la solution du sol jusqu'à son niveau initial ([Masmoudi, 1998](#)).

2.3.2. Phosphore adsorbé ou facilement échangeable

Ce sont les ions phosphoriques adsorbés sur le complexe adsorbant du sol ; ils participent aux échanges constants (sol-solution) et constituent l'essentiel du «pool alimentaire» des plantes ([Fardeau, 1991 in Mihoub, 2012](#)).

Ils sont adsorbés sur les argiles, soit directement sur leurs surfaces ou par l'intermédiaire d'un cation ([Masmoudi, 1998](#)).

2.3.2.1. Adsorption directe

Cette adsorption se fait sur les bords ou cassures du réseau des argiles qui mettent à nu des atomes Al^{+++} et de Fe^{+++} susceptible de prendre un hydroxyle et d'accueillir l'anion phosphorique (Masmoudi, 1998).

2.3.2.2. adsorption indirecte

L'acide phosphorique est un anion, et ne peut être retenu par le complexe que par l'intermédiaire d'un cation: fer, aluminium mais plus généralement le calcium (Lambert, 1979).

Des cations bivalents principalement Ca^{++} peuvent servir de ponts entre l'argile et les ions phosphoriques (Masmoudi, 1998).

2.3.3. Forme moins facilement échangeable

Les hydroxydes métalliques du sol sous forme colloïdale fixe directement les anions phosphoriques grâce à leur charge positive. Dans les sols acides, ces hydroxydes métalliques présentent un pouvoir adsorbant élevé vis à vis des ions phosphoriques.

Les complexes alumino-ferri-phosphoriques formés sont difficiles à dissocier. La libération de P_2O_5 est lente, elle devient plus facile à un pH neutre et totale à un pH alcalin (Gros, 1979).

2.3.4. Forme insolubles

L'acide phosphorique H_2PO_4 est un triacide qui donc donne 3 types de sel selon qu'une, deux ou trois fonctions acides sont neutralisées par les cations. Par exemple, le calcium :

- Phosphate mono-calcique $Ca(H_2PO_4)_2$ est soluble.
- Phosphate bi- calcique $Ca_2(H_2PO_4)_2$ est peu soluble.
- Phosphate tricalcique $Ca_3(H_2PO_4)_2$ est insoluble.

Il existe dans le sol des phosphates tricalciques (apatite par exemple) insoluble, de même qu'en sols acides des phosphates de fer et d'aluminium : le phosphore ainsi combiné est inutilisable par la plante (Eliard, 1979).

Néanmoins, des modifications de pH, l'effet de rhizosphère, l'action de la matière organique, l'activité microbienne et l'utilisation directe des phosphates minéraux par plusieurs espèces végétales font que ces formes de phosphore exercent un rôle non négligeable dans la nutrition des plantes (Masmoudi, 1998).

2.3.5. Forme organique

Le phosphore organique représente de 20 à 80 % du phosphore du sol (Pereda Campos, 2008).

La matière organique du sol contient du phosphore emprisonné dans des molécules organique, ce phosphore est soumis au processus de minéralisation. La minéralisation des composés organiques permet de libérer une quantité de phosphore accessible à la végétation. Mais cette quantité est faible ; elle est de l'ordre de 1 à 2 % par an (Heck et Hanotiaux, 1982 in Masmoudi, 1998).

Le phosphore organique est l'objet d'une lente minéralisation qui le rend progressivement disponible pour les végétaux (Pereda Campos, 2008).

3. Dynamique du phosphore de le sol

On peut définir la dynamique de phosphore comme étant le passage des ions phosphatés d'un état à un autre sous l'effet des mécanismes physico- chimiques et biologiques.

Dans le sol, des ions phosphates subissant des transformations par des réactions chimiques, physiques et biologiques comme l'adsorption, les miniréalizations, la précipitation et la réorganisation microbienne.

Ainsi le cycle comprend le processus du prélèvement de phosphore par les plantes, les transformations des formes organique et les réactions chimiques de fixation et d'immobilisation dans le sol.(Morei, 2002; Demers, 2008) (Figure 01).

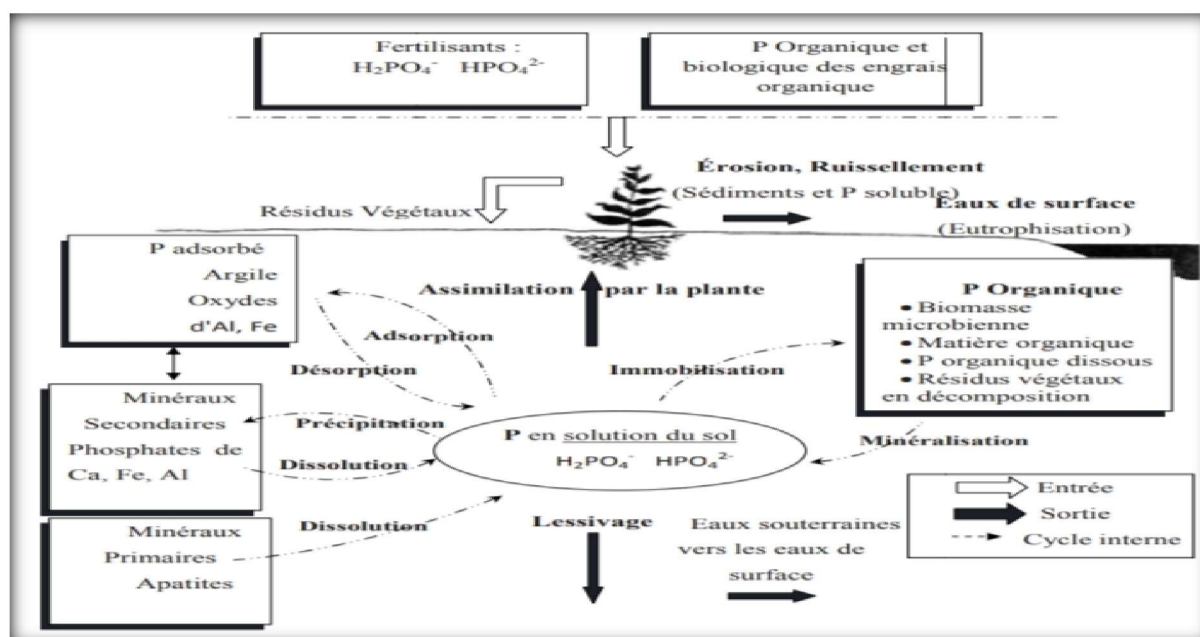


Figure 01 : cycle du phosphore dans le sol (Demers, 2008)

D'après [Drouet \(2010\)](#), dans le sol un cycle actif du phosphore peut être distingué: ce cycle est très semblable à celui de l'azote et les micro-organismes jouent également un rôle important dans le processus de minéralisation et d'immobilisation.

Généralement le phosphore se retrouve dans le sol associé à des cation , à des oxydes ou des hydroxydes métalliques.

Certains se retrouveront rapidement en solution, d'autres migreront plus lentement de la phase solide vers la solution et d'autres encore ne se solubiliseront qu'avec l'activité d'organismes vivants ([Beaudin, 2008](#)).

4. Facteurs influençant la disponibilité du phosphore dans la solution du sol

4.1. Effet du pH du sol

La solubilité des minéraux du phosphore et la concentration des sols en ions H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} sont fortement dépendantes du pH ([Azzaoui et al., 1994](#)).

La plupart des études ont montré que les prélèvements du P chez les plantes sont très importants à pH situé entre 5 et 6 où le H_2PO_4^- est dominant ([Furihata et al., 1992](#)).

Les mêmes auteurs rapportent que dans les sols très acides, le mono-calcium de phosphate (forme de phosphore dans les engrais) est rapidement précipité sous forme de P-Fe et P-Al alors que dans les sols calcaires, il y a formation du di- et tri-calcium de phosphate de moindre solubilité et qui sont par la suite, graduellement convertis en carbonate d'apatite ([Furihata et al., 1992](#); [Mengel., 1997](#)).

A noter que le pH du sol peut être modifié par la réaction racinaire à travers la libération d'exsudats ou de protons H^+ comme il peut être modifié par l'activité microbienne.

4.2. Effet de la texture du sol

La taille des particules constituant le sol a un effet sur la mise en disponibilité des éléments minéraux en général [Azzaoui et al., 1994](#) et [Johnson., 2000](#) estiment que l'augmentation de la teneur en argile diminue le coefficient de diffusion du phosphore à cause de l'augmentation des sites d'adsorption.

4.3. Effet de la matière organique

La matière organique du sol ou l'humus joue un rôle important dans la disponibilité du phosphore pour les plantes cultivées.

Dans les sols cultivés, le P organique représenterait 50% du phosphore total. Cette proportion peut être plus élevée dans les horizons supérieurs du sol (Sharpley., 1985). Elle est principalement représentée par la flore microbienne et consiste surtout en des composés cellulaires. L'humus présente des composés de faible énergie de liaison pour le P rendant sa mise en disponibilité plus facile (Johnson., 2000; Delgado *et al.*, 2001).

Certains anions organiques provenant de la décomposition de la matière organique peuvent se lier avec le fer, l'aluminium ou le calcium et éviter la fixation du phosphore par ces minéraux (Hoefl *et al.* 2000).

4.4. Effet de l'activité microbienne

Vue l'importance du phosphore d'origine organique dans la part du P total dans le sol, toute action visant l'amélioration de la minéralisation de la matière organique mobiliserait d'avantage de P pour la nutrition des plantes.

L'inoculation du sol par des champignons (*Aspergillus*) à grand potentiel de production de phosphatase a amélioré la disponibilité du P du sol et ses prélèvements et par la suite la matière sèche et le rendement grain chez le blé et le pois chiche (Tarafdar *et Rao.*, 1996).

II. Diversité microbienne du sol

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité écologique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contient de 10^{10} à 10^{11} de bactéries (Claire Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002).

Ces microorganismes jouent un rôle clé dans un grand nombre de processus dans les différents écosystèmes incluant l'acquisition d'éléments nutritifs pour les plantes (Sprent, 2001 ; Smith *et Read*, 2010).

La microflore tellurique est naturellement constituée de procaryotes et d'eucaryotes (Cardon *et Gage*, 2006).

Certains sont sans effets sur le développement des végétaux (microorganismes commensaux), d'autres encore sont favorables (mutualistes) alors que d'autres, ont des effets délétères (parasites et phytopathogènes) ([Whipps, 2001](#)). De ce fait, il a été suggéré que la plante favorise celles qui lui sont bénéfiques ([Cook et al., 1995](#); [Lynch et Leij, 2012](#))

1. la rhizosphère

1.1.Étymologie

Le mot rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner ([Anton et al., 2008](#)), bactériologiste spécialiste de microbiologie du sol et professeur d'agronomie au collège Technique de Munich.

« Rhizo » vient du grec rhiza signifiant racine. « Sphère » vient du latin sphaera (même sens), mot provenant lui-même du grec ancien sfaira (signifiant balle, ballon, ou globe). La sphère définit le champ d'influence du système racinaire.

En raison du volume qu'elle occupe, par rapport au volume de la plante, la rhizosphère est aussi appelée la « moitié cachée » (the hiddenhalf en anglais) ([Bowen et Roriva, 1991](#)).

1.2 Définition

La rhizosphère est la partie du substrat immédiatement au contact des racines vivantes et elle est sous l'influence directe de ces dernières ([Anonyme, 2017](#)). Cette zone comprend la majorité des organismes du sol car ils bénéficient des exsudats racinaires ([Figure 2](#)).



Figure 2: La rhizosphère ([Elise Leal, 2014](#))

La croissance des micro-organismes y est directement influencée par l'activité des racines et des rhizomes et l'échange de composés avec les plantes (**Anonyme, 2017**).

Les champignons en interactions avec la rhizosphère forment une symbiose avec les racines des plantes qui favorisent l'apport en éléments nutritifs, la tolérance au gel et à la protection contre les agents pathogènes.

Connu sous le nom de mycorhizes, elle constitue des réseaux physiques de communication qui permettent un mouvement de nutriments entre les micro-organismes et les plantes, et même parmi les plantes avec présence de mycéliums obligatoires (**Anonyme 1, 2017**).

La rhizosphère contient de nombreuses bactéries qui se nourrissent de cellules végétales élastiques, appelées rhizo-déposition, et les protéines et les sucres sont libérés par les racines.

Les protozoaires et les nématodes qui paissent sur les bactéries sont également plus abondants dans la rhizosphère. Ainsi, une grande partie du cycle des nutriments et de la suppression des maladies (pathogénie) nécessaire aux plantes se produit immédiatement à côté des racines (**Anonyme 1, 2017**).

1.3 Activité de la rhizosphère

L'activité de la rhizosphère est conditionnée par la dynamique de la biomasse racinaire. Environ 30, 50 et 75 % de la biomasse racinaire totale se trouvent respectivement dans les 10, 20 et 40 premiers centimètres du sol (**Candell et al., 1996**).

Jusqu'à 30 % des composés photosynthétisés par la plante y sont remis à la disposition des micro-organismes qui y vivent, par le biais d'un processus de rhizodéposition (sécrétion racinaire active, exsudation racinaire passive, rhizodépôts de types mucilages, lysats, gaz) (**Lynch et al ., 1990 ; William et al., 1994 ; Hisinger et al., 2009**).

Ces composés incluent une grande quantité d'acides organiques et de sucres, ainsi que des quantités plus limitées de composés organiques complexes. Ils sont transformés en biomasse microbienne ou ré-oxydés en CO₂.

Les organismes vivants de la rhizosphère bénéficient de cette activité végétale, qui joue aussi un rôle dans la dissolution de près de 30 % du calcaire du

substrat. Il faudrait déverser 500 litres d'acide chlorhydrique sur chaque mètre cube de sol pour obtenir un effet équivalent purement chimique (**Hisinger et al., 1996**).

De nombreuses interactions, bénéfiques (symbioses) ou non, voire délétères (pathogénie) sont observées entre plantes, bactéries et champignons du sol "dopant" l'activité biologique de ce sol (**STENGEL et GELIN., 1998**).

Parmi les interactions bénéfiques aux plantes, on peut citer les symbioses fixatrices d'azote, les associations avec les bactéries promotrices de croissance (PGPR) ou de santé (phénomène de suppression de maladie), ou les interactions avec les champignons mycorhizogènes ou jouant un rôle dans la défense des plantes (**STENGEL et GELIN., 1998**).

Les effets délétères sont souvent liés à l'action de bactéries ou champignons pathogènes. Ils peuvent aussi être liés à des phénomènes de parasitisme végétal (tels ceux induits par les *Striga* ou les *Orobanches*) ou d'allélopathie qui conduisent à l'impossibilité pour certains végétaux d'occuper le même espace de sol (effet d'inhibition de croissance de l'un des deux sur l'autre (**LEMANCEAU., 1992**)).

Siège d'une activité métabolique intense, d'échanges génétiques importants, la rhizosphère joue un rôle essentiel dans les processus de phytoremédiation (**Elaine et Ingham , 2011**).

1.4 Facteurs déterminant la richesse et l'activité de la rhizosphère

D'une façon générale, l'activité microbienne dans la rhizosphère est régie :

- par des facteurs de l'environnement climatique, notamment humidité de l'air, température, radiation solaire, teneur en CO₂ (**Dommergues, 1978**).
- par des facteurs de l'environnement édaphique, notamment : teneur du sol en eau et en oxygène, température du sol, teneur du sol en éléments assimilables par les plantes, présence de composés phytotoxiques (**Dommergues, 1978**).
- par des échanges de « molécules signal entre les racines des plantes et les microorganismes qui leur sont associés » (champignons, bactéries, cyanobactéries...).

La rhizosphère est modifiée en termes de communauté et diversité microbienne. La racine filtre activement ces communautés (Turner *et al.*, 2013).

1.5 La microbiologie rhizosphérique

La microbiologie du sol est complexe et variée, Elle comprend les bactéries, des champignons, des protozoaires et des virus (Figure 03).

La distribution des micro-organismes du sol est hétérogène et dépend des facteurs nutritionnels et des facteurs physico chimique (Prescott *et al.*, 2003).

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. On estime 1 gramme de sol quand peut contenir jusqu'à 10^9 bactéries (Malek., 2015).

Les mycètes sont également présents dans le sol. Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologique des sols. (Noumeur., 2008).

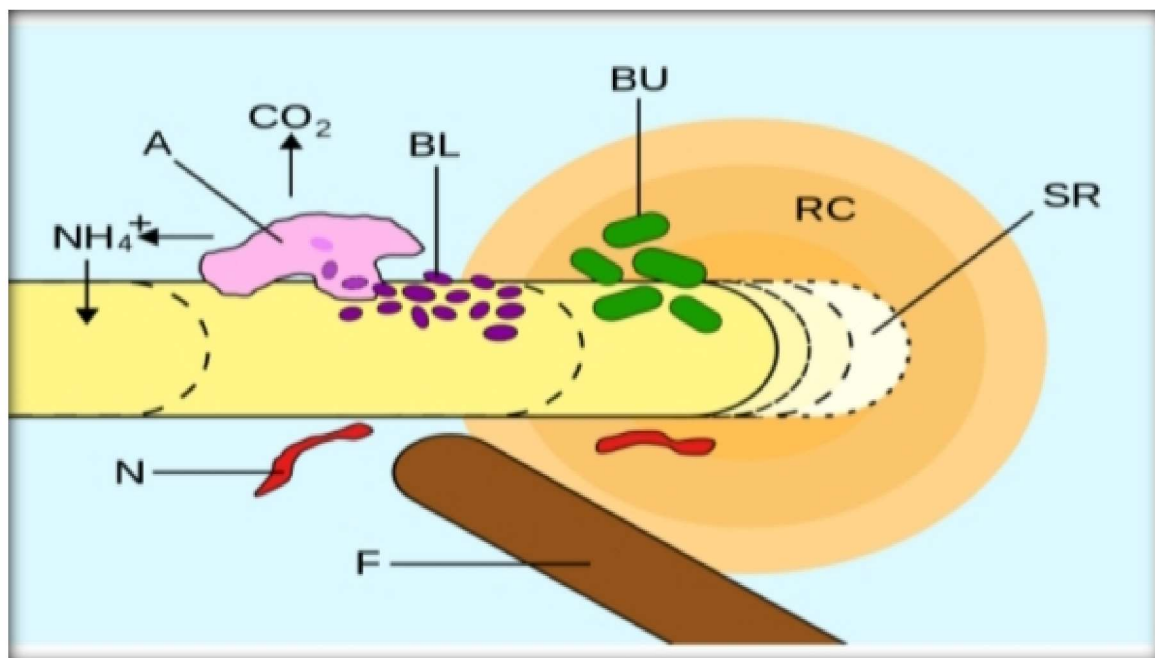


Figure 3: La structure de la rhizosphère (Giri *et al.*, 2005).

A=Amibe digérant une bactérie

BL= Bactérie à énergie limitée

BU= Bactérie à énergie non limitée

RC= Racine

SR= Poils absorbants racinaires

F= Mycélium d'un champignon

N= Ver nématode

2. Les rhizobactéries

Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne $6 \cdot 10^8$ cellules par gramme de sol et un poids de 10000 kg/ha équivalant à 5% du poids sec des composés organiques du sol.

On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries, sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993).

Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère.

Ces bactéries utilisent en effet de nombreux substrats provenant de la plante: les cellules corticales et épidermales des racines qui se détachent, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, etc (Campbell et Greaves, 1990 ; Glick, 1995 ; Konate, 2007).

La colonisation des racines par les bactéries est observée depuis longtemps, mais seulement dernièrement, son importance pour la croissance et le développement des plantes est devenu clair (Glick, 1995).

La quantité et la composition des exsudats racinaires conditionnent également la nature des activités bactériennes. Ces activités résultent de la synthèse de métabolites tels que les antibiotiques, sidérophores, substances de croissance, acidecyanhydrique, lipopolysaccharides (Voisard *et al.*, 1989; Kloepper *et al.*, 1989; Van Peer *et al.*, 1991 ; Zahir *et al.*, 2004).

3. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

3.1. Définition de PGPR

Le terme PGPR provenant de l'anglais "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" désigne les bactéries qui exercent un effet bénéfique sur la croissance et le développement des plantes par différents moyens (Abnatura., 2013).

Les rhizobactéries sont des bactéries qui présentent l'aptitude à coloniser les racines de façon intense (Schroth et Hancock., 1981., 1982).

Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Agrobacterium Radiobacter*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp fluorescentes* (Lemanceau, 1992).

3.2. Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère

3.2.1. Les *Rhizobia*

La mise en place d'une interaction non spécifique des *Rhizobia* avec les racines des plantes non légumineuses a favorisé les espèces de ce genre de devenir des PGPR, outre leurs activités fixatrices de l'azote atmosphérique, les *Rhizobia* contribue considérablement à l'amélioration de la disponibilité des phosphates pour la plante par mobilisation des formes organiques et inorganiques (Sahran et Nohra, 2011).

Elles peuvent produire des phytohormones, des siderophores et de l'HCN, avec la capacité de coloniser les racines de plusieurs types de plantes non légumineuses.

Les *Rhizobia* ont manifesté un grand intérêt lors de leur utilisation comme agents de bio-control. (Antoun et Prevost., 2005).

3.2.2. Les PGPR diazotrophes

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont utilisées pour la stimulation de la croissance des plantes.

La disponibilité d'une source d'énergie pour l'établissement du processus de fixation de l'azote constitue une principale limitation, compensée par le rapproche vers l'intérieur de la plante.

Azoarcus sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum sp* et *Azotobacter sp* forment un groupe bactérien non symbiotique fixateur d'azote. (Ahmad et al., 2008).

3.2.2.1. *Azotobacter*

Azotobacter paspali, décrite par Dobereiner et Pedrosa, (1987) est une bactérie aérobie stricte, non symbiotique, fixatrice de l'azote atmosphérique, isolée à partir de la rhizosphère de *Paspalum notatum*, une herbe tropicale qui possède une grande spécificité d'hôte.

Azotobacter paspali affecte positivement la germination des graines et leur développement, il est noté que l'inoculation des cultures de blé par ce genre augmente le rendement de 30% (Saharan et Nohra., 2011).

3.2.2.2. *Azospirillum*

Les espèces d'*Azospirillum*, isolées à partir des rhizosphères de plusieurs céréales à travers le monde principalement dans des régions tropicales et tempérées sont utilisées depuis les années 1970.

Cette bactérie initialement sélectionnée par sa capacité fixatrice de l'azote atmosphérique représente un bon candidat PGPR (Antoun et Prevost., 2005).

3.2.2.3. *Azoarcus*

Azoarcus a gagné une grande attention due principalement à sa grande diversité génétique et métabolique, divisé en trois genres : *Azovibrio*, *Azospira* et *Azonexus*, qui se différencient des autres genres par leur capacité de se développer lors de l'utilisation des acides carboxyliques et de l'éthanol au lieu des sucres avec une température optimale de croissance comprise entre 37-42°C (Reinhold et al., 1986).

Azoarcus est une bactérie endophyte du riz et est considérée comme un modèle de bactéries endophytes fixatrices d'azote (Ahmad et al., 2008).

3.2.2.4. *Bacillus*

Certaines espèces de genre *Bacillus* sont des diazotrophes, notamment *B. subtilis*, isolée à partir des rhizosphères de diverses plantes à des concentrations supérieures à 10^7 bactéries par gramme de sol rhizosphérique (Antoun et Prevost., 2005).

3.2.2.5. *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* et les *Pseudomonas* fluorescentes sont des bactéries ubiquistes, rencontrées souvent dans les sols, classées comme étant les meilleurs candidats PGPR (Saharan et Nohra., 2011).

Les effets bénéfiques de la bactérisation des graines sont observés lors de l'inoculation des graines de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) par *P.fluorescens* et *P. putida* (Bur et al., 1978, Alabouvette et al., 1993) ont démontré que lors de l'utilisation de *Fusarium oxysporum* pathogènes, *P. fluorescens* et *P. putida* se manifestent comme principales candidates de contrôle biologique du flétrissement

fusarien, avec une application bénéfique pour la suppression des fusarioses chez plusieurs espèces des plantes (Chung *et al.*, 2005).

3.3. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR

Les PGPR interviennent sur la croissance des plantes selon plusieurs mécanismes (Tableau 01), de manière directe ou indirecte (Figure. 04).

Tableau 01: Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlées par les PGPR (Martinez-Viveros *et al.*, 2010).

Terme	Definition	Mécanismes	Référence
<i>Biofertiliseur</i>	Une suspension contenant des microorganismes vivants qui, une fois appliquée sur des graines, sur une plante ou dans le sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et promeuvent la croissance par l'augmentation de la disponibilité des nutriments principaux pour la plante hôte.	-La fixation biologique de l'azote. - L'utilisation des Formes insolubles de phosphor	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004; Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado, 2006.
<i>Phyostimulateur</i>	Des microorganismes qui ont la capacité de produire ou de changer la concentration des régulateurs de la croissance .	-Production des phytohormones. - Réduction de la concentration de l'éthylène à l'intérieur de la plante.	Lugtenberg <i>et al.</i> , 2002; Somers <i>et al.</i> , 2004.
<i>Biopesticide ou agent de biocontrôle</i>	Des microorganismes qui stimulent la croissance d'une plante par la production des antibiotiques et des métabolites antifongiques.	Production des antibiotiques - Production des enzymes qui dégradent les membranes des cellules fongiques - La compétition - L'ISR et l'ASR	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004; Chandler <i>et al.</i> , 2008.

Ces bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. (Haas et Defago., 2005).

Les modes directs incluent la fixation d'azote atmosphérique, l'apport de nutriments non disponibles, (phosphore et autres nutriments minéraux), la production de régulateurs de croissance végétale (auxines, cytokinines et gibbérellines) et la répression de la synthèse d'éthylène (Hassen et Labuschagne, 2010).

Les mécanismes indirects sont les éliminations des agents phytopathogènes à travers la compétition pour l'espace et les nutriments, la synthèse d'enzymes hydrolytiques, l'inhibition des enzymes ou des toxines produites par les pathogènes, et l'induction des mécanismes de résistance de la plante (Antoun et Prévost, 2005).

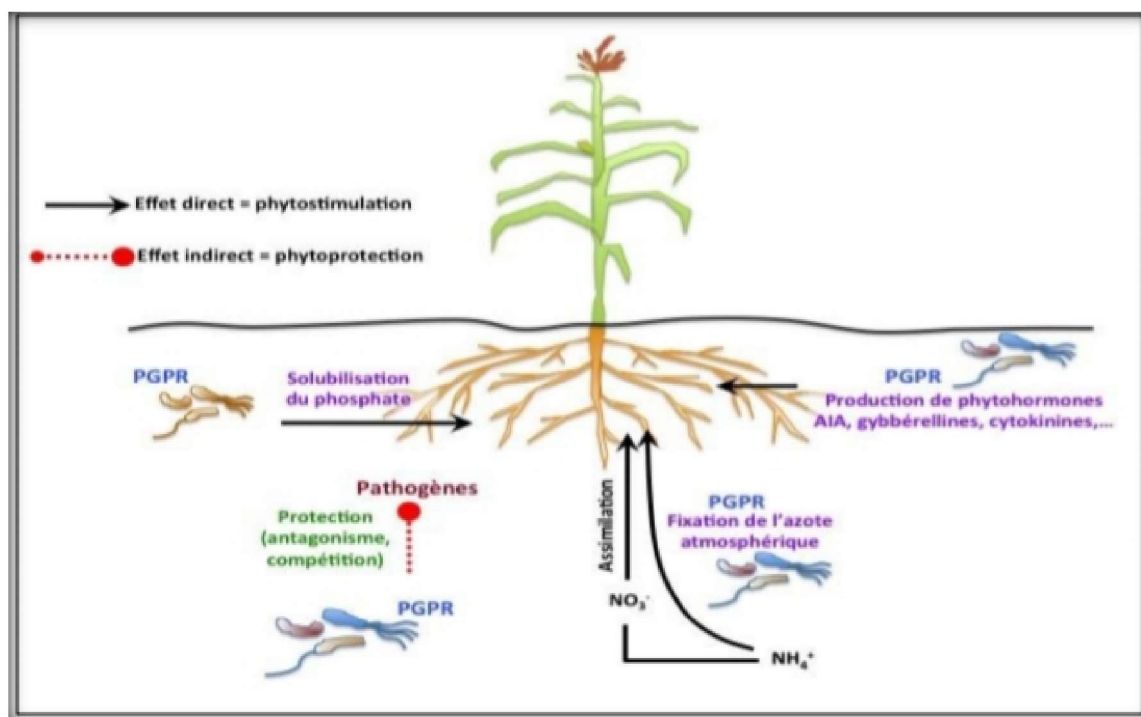


Figure 04: Interactions entre les plantes et les bactéries dans la rhizosphère (Khan *et al.*, 2009).

3.3.1. Les mécanismes directs

L'effet direct de la croissance des plantes peut se produire par plusieurs processus :

3.3.1.1 La fixation de l'azote

L'azote se trouve fréquemment sous forme gazeuse (N_2), inaccessible aux animaux et aux plantes où aucune espèce végétale n'est capable de fixer l'azote atmosphérique et de l'utiliser directement pour sa croissance (Pujic et Normand, 2009 ; Arora *et al.*, 2012).

Les PGPRs les plus connus pour leur rôle de stimulation des plantes grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique sont : *Azoarcus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* ; *Azotobacter* *Paenibacillus* et *Azospirillum brasilense*, qui transforment l'azote atmosphérique en ammoniac en utilisant un système enzymatique complexe connu sous le nom de la nitrogénase (Weyens *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2012).

Les rhizobia est un vaste groupe de rhizobactéries qui ont la capacité d'établir des interactions symbiotiques par la colonisation et forme des nodules racinaires dans le végétale, dans lesquelles l'azote est fixé en ammoniac qui est rapidement transformé en nitrates et le rendre disponible pour l'hôte ; La bactérie entre d'abord dans la racine et plus tard sur les nodules dans lesquelles se produit la fixation de l'azote (Munees et Mulugeta., 2013).

3.3.1.2. La solubilisation du phosphore

Le phosphore (P) est un élément largement distribué dans la nature. Il est considéré, avec l'azote (N) et le potassium (K), comme un constituant fondamental de la vie des plantes et des animaux.

Cet élément a un rôle important dans le métabolisme de la plante, et il est l'un des éléments nutritifs essentiels pour la croissance et le développement des végétaux. Cependant, le phosphore existe sous forme inaccessible pour la plante, il reste donc de le mobilisé dans le sol (Qureshi *et al.*, 2012).

Le phosphore est absorbé principalement pendant la croissance végétale et, par la suite, la majeure partie du phosphore absorbée est transférée dans les fruits et les graines pendant les étapes de reproduction.

Toutefois, les plantes déficientes en phosphore montrent un retard de croissance (réduction de la croissance des cellules et des feuilles, perturbation de la respiration et de la photosynthèse) (FAO., 2004).

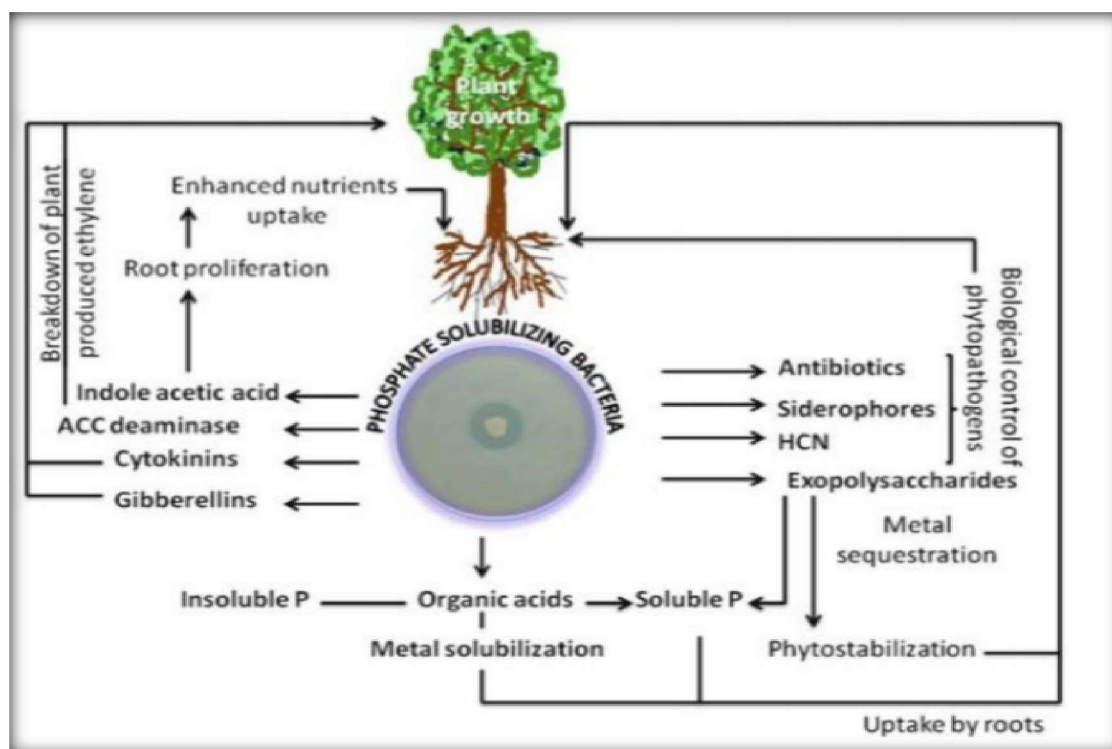


Figure 05 : Mécanismes de l'amélioration de la croissance des plantes par des bactéries solubilisant le phosphate (Khan *et al.*, 2009)

3.3.1.3. La solubilisation du potassium

Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% de potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux de silicate (Parmar et Sindhu., 2013).

En raison de l'application déséquilibrée des engrais, la carence en potassium devient l'une des principales contraintes dans la production végétale. Sans potassium adéquat, les plantes ont des racines mal développées, poussent lentement, produisent de petites graines et ont des rendements plus faibles (Kumar et Dubey., 2012).

Les microorganismes des sols jouent un rôle clé dans le cycle K naturel. Les microorganismes solubilisant de potassium présent dans le sol pourraient fournir une solution alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes (Rogers *et al.*, 1998).

3.3.1.4 La production des sidérophores

Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (Neilands., 1995). Certains PGPR produisent des sidérophores, composés de faibles poids moléculaire, généralement inférieurs à 1 kDa contenant des groupements fonctionnels capables de capter le fer en le rendant assimilable par les plantes (Kirdi et Zermane., 2010).

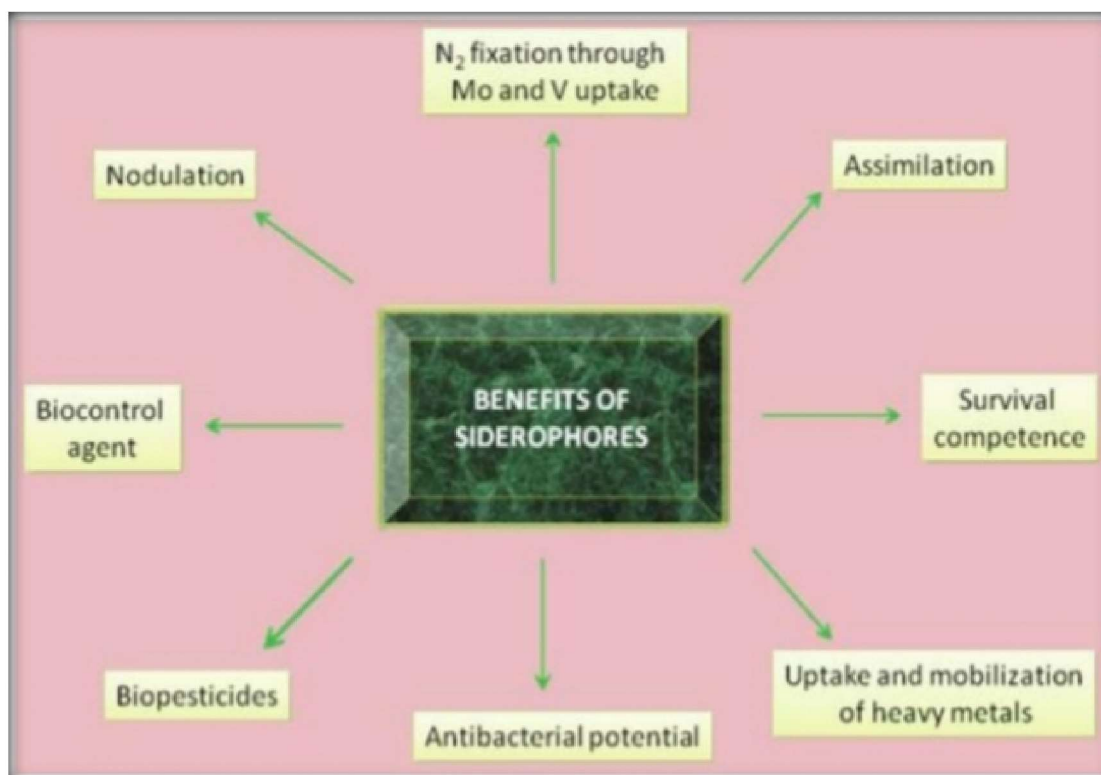


Figure.06 : Les fonctions biologiques des sidérophores (Khan *et al.*, 2009)

Les sidérophores (sidéros = fer ; phoros = transport) (Rossum *et al.*, 1994) sont des composés organiques ont une affinité très élevée et spécifique pour chélater le fer. Les Sidérophores augmentent aussi la disponibilité du fer par la complexassions forte de Fe³⁺.

Ces complexes restent en solution et augmentent de ce fait la diffusion du fer sur la surface de cellules. Presque 500 structures de sidérophore sont connues jusqu'ici, qui sont produites par des bactéries, des mycètes et des plantes (Boukhalfa et Crumbliss., 2002).

3.3.1.5 La production des phytohormones

Il existe deux sources de phytohormones naturellement disponibles pour les plantes: production endogène par les tissus de la plante et exogène par des micro-organismes associés.

Les PGPRs produisent différentes phytohormones comme: l'AIA (Acide indole acétique : auxines), l'acide gibbérellique et les cytokinines.

Ce sont des petites molécules de signal produites en très faible concentration influençant les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques dans les plantes. (Han *et al.*, 2005 ; Baca *et Elmerich.*, 2007 ; Kloepper *et al.*, 2007 ; Martinez-Viveros 1 *et al.*, 2010).

3.3.1.5.1 L'acide indole acétique (AIA)

L'acide indole acétique AIA est une auxine primaire active dans la majorité des plantes. Il fonctionne comme une molécule - signal importante dans la régulation du développement des plantes.

L'AIA intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse. Il contrôle aussi bien l'organisation du méristème apical (phyllostaxie), la ramification des parties aériennes de la plante (dominance apicale), la formation de la racine principale, l'initiation des racines latérales et adventives (rhizogénèse) et intervient également dans les tropismes en réponse à la gravité (gravitropisme) ou à la lumière (phototropisme).

Ces multiples effets sur les différents stades de la croissance de la plante résultent du contrôle que cette phytohormone exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation (Figure 08).

Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Celle-ci peut être utilisée comme outil de dépistage des souches PGPR performantes (Khalid *et al.*, 2004). Les PGPR libèrent ces auxines dans la rhizosphère comme des métabolites secondaires (Khan *et al.*, 2009).

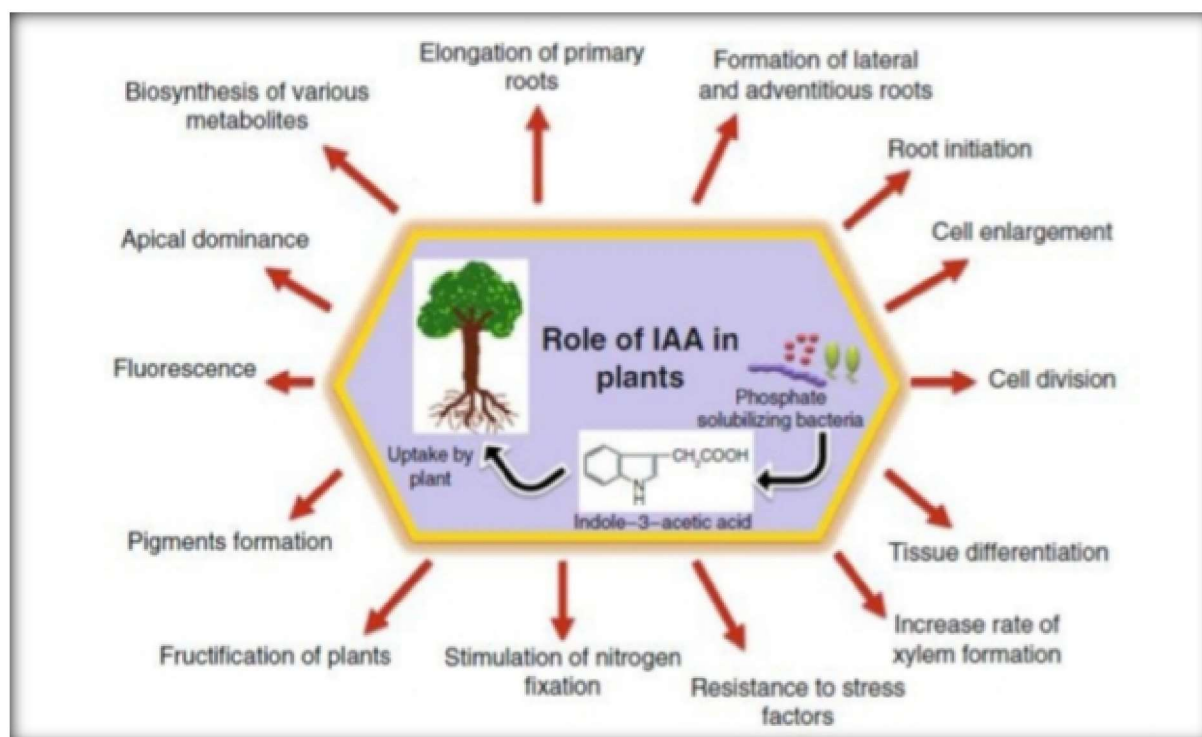


Figure: 07 : Rôles de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes (Khan *et al.*, 2009).

Les PGPR synthétisent et sécrètent l'AIA qui sera absorbé par la graine ou la racine à partir du tryptophane et d'autres petites molécules présentes dans les semences ou les exsudats racinaires (Whipps, 1990; Fallik *et al.*, 1994). Le tryptophane est le principal précurseur pour la biosynthèse d'AIA. Les exsudats des racines sont la ressource principale de tryptophane dans le sol (Spaenpen *et al.*, 2007).

Une partie de l'AIA est reprise par la plante qui s'ajoute à l'AIA endogène de la plante pour stimuler la prolifération cellulaire des plantes et l'allongement racinaire.

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

Certains PGPR dont *Pseudomonas putida* synthétisent et sécrètent des régulateurs de croissance telle que l'AIA qui infiltre les cellules végétales et stimule la croissance racinaire en augmentant la longueur de 35-50% (Patten et Glick, 2002).

En outre, l'AIA active l'ACC synthase pour produire plus d'ACC qui sera transformé en éthylène par l'ACC oxydase (Mayak *et al.*, 2004). Simultanément, l'ACC désaminase hydrolyse l'ACC et inhibe ainsi la production de l'éthylène. En conséquence, l'effet final de la production d'éthylène sur la croissance racinaire dépend de l'équilibre entre l'AIA et l'ACC désaminase produits.

3.3.1.5.2 Les cytokinines et les gibbérellines

Sont aussi des phytohormones impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et la stimulation de la croissance de la partie aérienne (Van Loom, 2007).

Les Gibbérellines forment le groupe de phytohormones impliqué dans la modification de la morphologie de la plante par l'extension des tissus, en particulier de la tige.

Ils affectent les processus de reproduction dans une large variété de plantes et retarde la sénescence des fruits et des feuilles.

Les cytokinines sont retrouvées dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines, mais une forte évidence indique que la racine est le site principal de la biosynthèse de cytokinines (Hopkins, 2003 ; De Salamone *et al.*, 2005).

3.3.1.5.3 L'acide L'éthylène

L'éthylène est un régulateur impliqué dans la stimulation de la croissance des plantes à des concentrations modérées.

Dans les conditions du stress (salinité, pollution par les métaux lourds...etc.), la plante augmente la sécrétion de l'éthylène, ce qui induit l'inhibition de la croissance des racines (Saleem *et al.*, 2007).

3.3.2 Les mécanismes indirects

Le principal avantage de l'utilisation des PGPR est la résistance conférée aux plantes contre les maladies causées par les agents pathogènes.

Les rhizobactéries jouent un rôle majeur dans la lutte contre ces agents, où un large spectre des maladies bactériennes, fongiques et parasitaires est supprimé via la production d'antibiotiques, compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène et l'espace), l'activation de la résistance systémique induite (ISR) et la production des enzymes (chitinase, protéase, lipase), cette protection est nommée biocontrôle.

De plus, les PGPR peuvent être utilisées comme un biofertilisant efficace dans l'amélioration du rendement des cultures par la production d'enzymes telles que (cellulases, amylases, etc.) (Lugtenberg et Kamilova ,2009 ; Glick, 2012 ; Tariq *et al.*, 2014).

3.3.2.1 La compétition pour l'espace et les nutriments

La compétition pour l'espace et les nutriments est un mécanisme biologique utilisé par les PGPR pour éliminer les phytopathogènes.

Cette compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour leur croissance (Dommergues et Mangenot., 1970 ; Shameer et Prasad., 2017).

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997).

Mais, la corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est, dans certains cas, pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale (Reyes *et al.*, 2004).

L'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie fut beaucoup discutée.

Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique et capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005).

Toutefois, la compétition pour les nutriments et les différentes sources nécessaires pour la vie se produit généralement entre les microorganismes du sol. Ainsi les PGPR fixateurs du fer et du phosphore, inhiberont la croissance des pathogènes d'une part, et favoriseront celle des plantes, d'une autre part (Pal *et al.*, 2006).

3.3.2.2 L'Antibiose

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

2007). Il consiste à produire des antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène par l'agent antagoniste.

Ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire tels que les antibiotiques comme l'ampiciline, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), cyanure d'hydrogène (HCN) et la phénazine qui agissent comme des facteurs contre l'attaque des pathogènes (Corbaz, 1990 ; Babalola, 2010 ; Shameer et Prasad, 2017).

3.3.2.3 Le parasitisme

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

3.3.2.4 Résistance systémique induite ISR (Induced Systemic Resistance)

L'expression de mécanismes de défense systémique chez les plantes peut être initiée suite à l'interaction avec certaines rhizobactéries non pathogènes lors d'un phénomène appelé ISR, ce mécanisme rend la plante plus résistante contre d'éventuelle attaque des agents pathogènes (virus, bactéries et champignons).

De nombreux composants bactériens tel que les lipopolysaccharides (LPS), sidérophores, lipopeptides cycliques, peuvent induire une résistance systémique des plantes (Gupta *et al.*, 2015 ; Shameer et Prasad., 2017).

3.3.2.5 Effet phytoprotecteur des sidérophores

Les PGPR, notamment du genre *Pseudomonas sp.*, sont connues pour leur capacité à produire des sidérophores dans le milieu. La chélation du fer est un phénomène qui participe efficacement à l'antagonisme contre les agents phytopathogènes en réduisant leurs effectifs dans le sol. (Kirdi et Zermane., 2010).

III. Le genre *Azotobacter*

1. Définition

Azotobacter est un genre bactérien appartenant à la sous-classe des Gamma proteobacteria. Selon la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(2005) (Brenner *et al.*, 2005) le genre *Azotobacter* est transféré de la

famille des Azotobacteriaceae à la famille des Pseudomonadaceae sur la base des séquences des ADNr 16S.

Les cellules du genre *Azotobacter* sont des bacilles à Gram négatif, ovoïdes et relativement larges (2 à 4 µm, jusqu'à 6 µm) et peuvent prendre plusieurs formes (cocci ou bâtonnets) non sporulés, mobiles grâce des flagelles multiples.

Ce sont des bactéries aérobies à métabolisme strictement respiratoire. Contrairement au genre *Azomonas*, *Azotobacter* a la capacité de former des kystes en absence de nutriments.

Ceux-ci remplis de poly- -hydroxy butyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux comme source d'énergie. Le genre comprend plusieurs espèces (*chroococcum*, *beijerinckii*, *vinelandii*, *nigricans*, *armeniacus*, *paspali*...) qui se distinguent par leurs caractères biochimiques et la production de pigments (**Tableau 2 et Tableau 3**).

Tableau 2 : Caractères phénotypique des espèces de *Azotobacter* (**Berner et al.;2005**).

	<i>A. chroococcum</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. nigricans</i>	<i>A. armeniacus</i>	<i>A. paspali</i>
MORPHOLOGIE	Bâtonnets ovales ou cocci.	Bâtonnets aux extrémités arrondies	Bâtonnets aux extrémités arrondies	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets longs aux extrémités arrondies	Bâtonnets aux extrémités arrondies
Dimension	3 à 7µm de long 1,5 à 2,3µm de large.	3,2 à 5,3µm de long 1,7 à 2,7µm de large.	3 à 4,5µm de long 1,5 à 2,4 µm de large.	4,1 à 4,9µm de long 1,5 à 2,7µm de large	5 à 5,7µm de long 1,7 à 2 µm de large.	7 à 10,9µm de long 1,3 à 1,7 µm de large Mais des fois 3,2 à 4,2µm de large 1,6 à 1,9µm de large

Disposition	En paire	Cellules isolées ou en paires parfois en petite chaînette	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires
Mobilité	Mobile par des flagelles péritriches	-	Mobile par des flagelles péritriches	-	Mobile par des flagelles péritriches.	Mobile par des flagelles péritriches.
Fluorescence vert- jaunâtre	-	-	+	-	-	+
Fluorescence-verte	-	-	±	-	-	-
Fluorescence marron – noir	+	-	-	±	-	-
Fluorescence rouge – violet	-	-	±	±	+	+
Mannitol	+	±	+	±	+	-
Rhamnose	-	-	+	-	+	-
Caprylate	-	-	+	-	+	-
Malonnate	±	+	+	±	-	-

Les *Azotobacter* sont ubiquitaires et peuvent être isolés de l'eau et du sol où ils y vivent librement. Cependant, ils sont beaucoup plus nombreux au voisinage des

radicelles. Bien qu'ils n'en soient pas dépendants, ils sont plus abondants près des racines et dans la rhizosphère qu'ailleurs dans le sol.

Les *Azotobacter* préfèrent les sols neutres ou légèrement alcalins, bien oxygénés et moyennement humides. Ces bactéries fixent mieux l'azote atmosphérique dans les sols où les apports d'azote minéral sont réduits.

Elles peuvent fixer au moins 10µg d'azote/g de glucose consommé. La fixation nécessite les ions molybdène. Ces bactéries exigent néanmoins des apports organiques importants probablement comme source de carbone.

Il semblerait que ces bactéries aient d'importantes facultés à utiliser les apports minéraux sous forme insoluble qu'il s'agisse de phosphates ou de nitrates (Buchan et Gibbous, 1974).

Tableau 3 : Autres caractéristiques des espèces d'*Azotobacter* (Brenner et al.,2005).

	<i>A. chroococcum</i>	<i>A. armeniacus</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. nigricans</i>	<i>A. paspali</i>	<i>A. salinestris</i>	<i>A. vinelandii</i>
Flagelles péritriches	+	+	-	-	+	+	+
5.0 -5.5	-	-	d	d	-	-	-
6	-	-	+	d	d	d	+
6.5 – 9.5	+	+	+	+	+	+	+
10	+	d	+	+	+	-	+
NIF	+	d	+	+	+	d	+
Vnf	+	nd	+	+	+	d	+
Anf	-	nd	-	-	+	nd	+
9°C	-	-	d	d	-	-	-
14°C	d	-	+	d	+	-	+
18°C	+	d	+	+	+	-	+
32°C	+	+	+	+	+	d	+
37°C	d	d	-	-	+	+	+
Production de	+	d	d	+	-	d	d

polysaccharides diffusibles							
Peroxydase	d	d	d	d	-	+	+
Uréase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	d	+	+	+	nd	+
Thiosulfate	d	-	d	d	+	nd	+
Cysteine	-	-	-	-	d	nd	d
Fructose, glucose, acetate, pyruvate, fumarate, malate, succinate, - oxoglutarate, lactate, DL-gluconate, ou acetylmethylcarbinol.	+	+	+	+	+	+	+
lactose, mannose, xylose, arabinose, ribose et fucose	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	d	+	+	+	+	+
Propionate	+	d	+	-	-	nd	+
β- phenylpropionate	d	-	-	-	-	nd	+
n-Butyrate	+	+	+	d	-	nd	+
Glutarate	-	d	-	-	-	nd	+
DL-β-Hydroxybuterate	d	+	+	d	-	nd	d
Benzoate	d	-	+	-	-	+	+
Trehalose	d	+	d	+	-	nd	-
Melibiose	+	+	+	d	-	+	+
Maltose	+	+	d	d	-	nd	+
Raffinose	+	d	d	d	-	nd	d
Propane-1-ol	d	-	d	d	d	nd	+
Butan-1-ol	+	d	+	d	-	nd	+

Glycerol	d	-	d	-	-	-	+
Manitol	+	+	d	d	-	nd	+
Sorbitol	+	+	d	d	-	nd	+
Sterptomycine 0.2 µg/ml	S	S	S	S	S	S	S
Tetracycline 2µg/ml	d	R	d	d	R	nd	d
Chloramphenicol 25µg/ ml	d	d	d	R	d	nd	R
Sulfanilamide 25µg/ml	d	R	d	d	S	nd	d
Pénicilline G 5U/ml	d	S	d	R	R	nd	d
Phenol, 0.05%	R	S	d	d	d	nd	R
Sodium Benzoate, 0.5%	d	R	d	R	d	nd	R
Sodium fluoride, 0.01M	d	R	R	d	R	nd	R
Chlorure de Mercure e 10µg/ml	d	R	d	d	R	nd	d
Iodoacetate, 1mM	S	S	S	S	S	nd	S
Erythromycine, 2µg/ml	S	R	d	R	d	nd	R
Néomycine ou kanamycine 1µg/ml	S	S	S	S	S	S	S

2. Importance du genre *Azotobacter*

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

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

ha (Saharan et Nohra, 2011). Il a été prouvé que le genre *Azotobacter* affecte positivement la germination des graines et leur développement et que l'inoculation des cultures de blé par ce genre augmente le rendement de 30%. Aussi, l'inoculation par ces bactéries permet une réduction de plus de 50% sur les engrais azotés (urée) appliqués aux cultures de blé réalisées sous conditions contrôlées sous serre (Kennedy *et al.*, 2004).

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

Chapitre II

Matériels & Méthodes

1. Objectif

L'objectif de cette étude, consiste à isoler et identifier des bactéries solubilisant le phosphate, à étudier leurs activités PGPR et en fin à évaluer leurs effets sur la croissance d'une plante modèle.

2. Matériel

2.1. Isolats bactériens

Les plantes de blé dur utilisées proviennent de la commune de Sidi Bel Abbès, willaya de Sidi Bel Abbès. Le site est situé à 1.3 km de l'ex ITMA



Figure 08 : Localisation du site d'échantillonnage (Source : Google Maps 2019).

Les graines de la variété Boussalem ont été utilisées pour la réalisation du test de germination

3. Méthodes

3.1. Isolement et caractérisation des bactéries du genre *Azotobacter*

3.1.1. Isolement et purification des *Azotobacter*

Afin d'isoler sélectivement les bactéries du genre *Azotobacter*, un enrichissement est réalisé au préalable sur un milieu liquide exempt d'azote *Azotobacter* Broth (Annexe I) (Atlas et al. 2005).

Cent ml du milieu sont aliquotes dans des flacons de 250 ml. 5g du sol adhérant fortement aux racines de chaque échantillon sont mis en suspension dans le milieu de culture. Après agitation, 5ml de cette suspension serviront à inoculer un deuxième flacon contenant le même milieu. Les milieuxensemencés sont incubés sous agitation à 30°C pendant 72 heures. L'apparition d'une pellicule à la surface du milieu signifie l'existence d'une croissance bactérienne. L'isolement des *Azotobacter* est réalisé par la suite sur gélose Ashby au mannitol (**Annexe I**) (**Atlas et al., 2005**).

Une anse pleine de chaque culture est étalée à la surface du milieu coulé en boîtes de Pétri. Ces dernières sont mises à incuber à 30°C pendant trois jours.

3.1.1.1. Purification

Après incubation, les différentes colonies caractéristiques sont repiquées plusieurs fois sur milieu Ashby en vue de leur purification.

3.1.1.2. Conservation des isolats

La méthode de conservation des isolats consiste à repiquer les isolats en tube de gélose inclinée (**Botton et al., 1990**). Après une incubation de 72h, les cultures sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

3.1.2. Caractérisation des isolats

3.1.2.1. Examen macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après les auteurs **Thoma et al. (1970)**, les éléments d'identification macroscopiques sont :

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

3.1.2.2. Examen microscopique

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal; il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de lugol, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%, pendant 15 à 30 secondes puis est rincé à l'eau distillée. Ensuite le frottis est coloré par la fuschine pendant 10 à 30 secondes et après un bref rinçage à l'eau distillée, on sèche le frottis au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec bunsen et on l'examine à l'objectif (GX 100) à immersion. Avec cette coloration double, les bactéries «Gram-positif» apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries «Gram négatif» sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2007).

3.1.2.3. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives.

Cette enzyme sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène. Elle accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène.



Cette réaction est mise en évidence par la formation rapide de bulles.

1. Placez une lame de microscope à l'intérieur d'une boîte de Pétri.
2. Gardez le couvercle de la boîte de Pétri à disposition. L'utilisation d'une boîte de Pétri est facultative car la méthode peut être effectuée correctement sans elle. Elle vise à limiter les aérosols dont il a été démontré qu'ils portaient des cellules bactériennes viables.
3. À l'aide d'une anse d'inoculation stérile ou d'un bâtonnet d'application en bois, prélevez une colonie bien isolée d'une culture pure et placez-la sur la lame de microscope.
4. Veuillez à ne pas prendre d'agar.
5. À l'aide d'un compte-gouttes ou d'une pipette Pasteur, déposez 1 goutte de H_2O_2 à 3% sur la colonie. Ne pas mélanger.
6. Couvrez immédiatement la boîte de Pétri avec un couvercle et observez la formation immédiate de de mousse ou de bulles traduit la décomposition de

dioxygène: le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles: le test catalase est négatif (Delarras, 2007). ($O_2 + \text{eau} = \text{bulles}$).

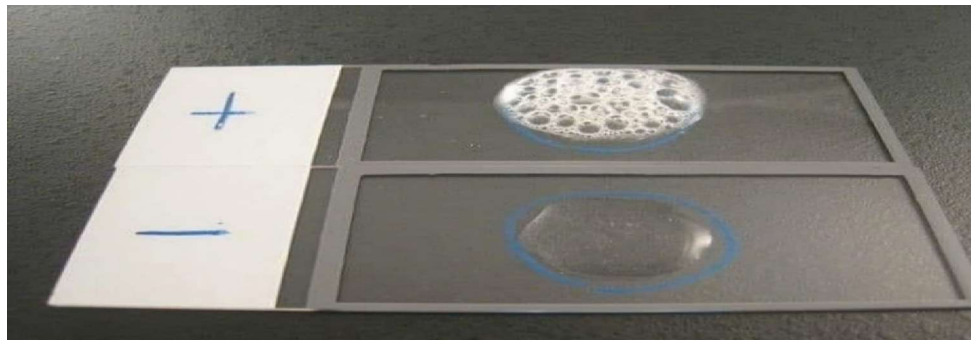


Figure 09: Lecture des résultats du test de catalase.

3.1.2.4. Test de mobilité des isolats

Le milieu de culture mannitol mobilité (Annexe I) est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement du milieu de culture est réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu de culture alors que les bactéries immobiles poussent uniquement sur le long du strie d'ensemencement (Gerhardt *et al.*, 1994).

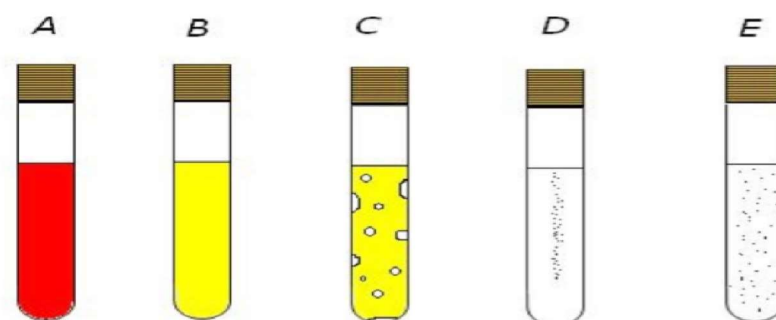


Figure 10: Lecture des résultats du test mannitol mobilité.

Lecture de la fermentation du Mannitol :

- Tube A : milieu rouge, pas de fermentation du mannitol : mannitol –.
- Tube B : milieu jaune, fermentation du mannitol : mannitol +.
- Tube C : Fermentation du mannitol avec production de gaz : mannitol + avec gaz.

Lecture de la mobilité :

- Tube D : pas de diffusion autour de la piqûre : bactéries immobiles.
- Tube E : diffusion autour de la piqûre : bactérie mobiles.

3.1.2.5. Mise en évidence du type respiratoire

La détermination de type respiratoire des bactéries est effectuée sur milieu de culture Viande Foie (VF). Dans des tubes à essai stériles, le milieu de culture en surfusion est aseptiquement ensemencé en réalisant un mouvement en hélice du bas vers le haut à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Le milieu de culture solidifié est incubé à 30°C pendant 48h. Les résultats obtenus sont interprétés selon la **Figure 12** et le germe est dit soit: aérobie strict, anaérobie aéro-tolérant, anaérobie strict ou microaérophile.

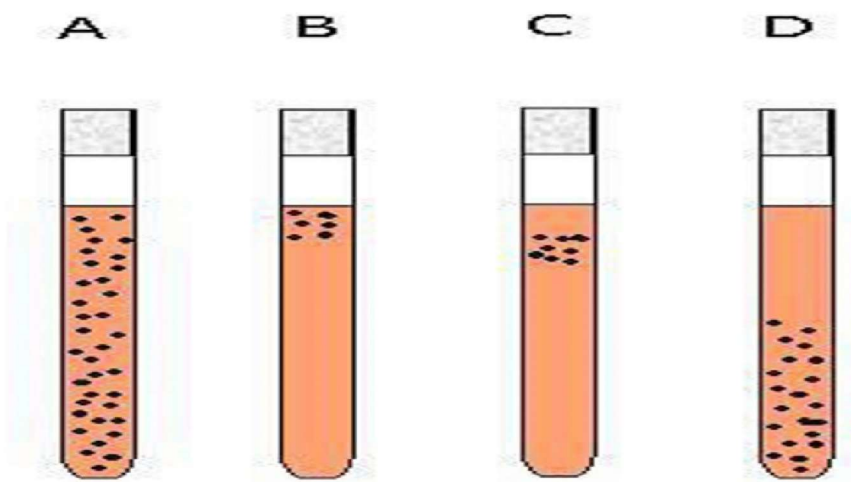


Figure 11: Détermination du type respiratoire.

L'endroit où se trouvent les colonies dans le tube détermine le type respiratoire :

- A culture sur toute la hauteur : aéro-anaérobie facultatif (AAF).
- B culture seulement en haut : aérobie stricte (AS).
- C culture limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut : micro-aérophile.
- D culture seulement 1 cm au-dessous du haut : anaérobie stricte (ANS).

3.2. Evaluation des activités PGP des isolats bactériens**3.2.1 Test de la solubilisation de phosphate****3.2.1.1 Test de solubilisation de phosphate sur milieu solide**

La solubilisation de phosphate inorganique a été déterminée qualitativement sur le milieu Pikovskaya agar (**Annexe I**). Les pré-cultures de bactéries solubilisant le phosphate ont été déposées sous forme de spots (10 µl) sur milieu PVK solide contenant le $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphate à raison de 3 à 4 souches par boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 28 ± 2 °C pendant 5 jours.

Après incubation, le diamètre de l'halo clair autour des colonies ainsi que de la colonie bactérienne ont été mesurés (**Alam et al., 2002**). L'indice de la solubilisation (IS) des microorganismes a été calculée selon la formule suivante (**Nguyen et al., 1992**):

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

3.2.1.2 Test de solubilisation de phosphate en milieu liquide

Pour une estimation quantitative du phosphate solubilisé, 100 µl des cultures bactériennes sont ensemencés dans 5 ml de milieu PVK liquide puis incubés à 30°C/7 jours sous agitation modérée. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 20 mn. La quantité du phosphore soluble est mesurée dans le surnageant par la méthode colorimétrique de Olsen (**Olsen et Sommers, 1995**). Dans une fiole de 50 ml contenant 1 ml du surnageant, sont ajoutés 10 ml de molybdate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4)$ à 12 mM et 1 ml de chlorure d'étain (SnCl_2) 5 mM. Le volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur bleue mesurée à 620 nm est directement proportionnelle à la concentration de phosphates dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution de KH_2PO_4 (**Olsen et Sommers, 1995**).

3.2.1.3 Production des auxines (acide indole acétique AIA)

La capacité de différentes bactéries étudiées à produire l'auxine AIA a été testée en milieu LB (**Lauria Bertani**) (**Annexe 2**).

Cinq ml de milieu LB liquide additionné de glucose à 1% en présence et en absence du L-tryptophane (5g/l) (**Annexe I**). Le milieu de culture dilué au 1/10^{ème} est inoculé par 100 µl de suspension bactérienne (pré-culture) âgée de 24 heures, ajustée à 0.5 Mc Farland (**Kumar, 2010**). Puis incubés pendant 4 jours à 28 ± 2 °C sous agitation à 180 tr/min.

Les cultures bactériennes ont été ensuite centrifugées à 3000 tr/min pendant 30 min. L'estimation de l'acide indole acétique (AIA) dans le surnageant a été réalisée par la méthode colorimétrique décrite par [Brick *et al.*, \(1991\)](#).

1 ml de surnageant a été ajouté à 2 ml de réactif de Salkowski (12g de FeCl_3 dans 429ml de H_2SO_4), ils ont été mis à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de la couleur rose résultante qui indique la production de l'AIA a été lue à 535 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible.

Les taux de l'AIA libérés ont été calculés à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage et exprimés en $\mu\text{g/ml}$.

3.2.1.4 Production de l'ammoniac

Tous les isolats bactériens ont été testés pour la production de l'ammoniac par la méthode décrite par [Cappuccino et Sherman \(1992\)](#) avec modification.

Il consiste à inoculer 100 μl de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau peptonée (EP). Après incubation 30°C pendant 96 heures, les cultures sont centrifugées à 3000 rpm pendant 20mn. La quantité du NH_3 est mesurée dans le surnageant des cultures. Un volume du réactif de Nessler est ajouté à quatre volumes du surnageant. Le développement d'une couleur jaune vers la couleur marron foncé indique la production de NH_3 . L'intensité de la couleur marron mesurée à 425 nm est directement proportionnelle à la concentration de NH_3 dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution d'ammonium sulfate.

3.2.1.5 Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination des grains de blé

Afin de calculer l'indice de germination, des graines de blé dur ont été désinfectées en surface par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) pendant 3 min, suivie d'un rinçage 6 fois à l'eau distillée stérile ([Aly *et al.*, 2012](#)).

Les graines désinfectées ont été immergées séparément dans un milieu de culture inoculé par les isolats bactériens et dans l'eau distillée stérile (pour le témoin) et Les graines sont déposées dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre contenant un papier filtre imbibé d'eau distillée stérilisée. Chaque boîte a reçu 5 graines. Puis incubées à 25 °C à l'obscurité pendant 10 jours.

On considère qu'une graine de blé est germée lorsque la radicule perse l'enveloppe séminale (Walker-Simmons et Sesing 1990).

Le nombre de graines germées a été compté quotidiennement pendant dix jours et le taux de germination a été calculé.

4. Optimisation de solubilisation de phosphate

4.1. Courbe d'étalonnage

Pour la préparation de la solution standard, 0,2195 g de KH_2PO_4 ont été dissoutes dans un litre d'eau distillée. Cette solution contient 50 ppm (partie par million) de phosphore (Kumar, 2010). La préparation de la courbe d'étalonnage a été réalisée par l'ajout de 2,5 ml de réactif de Barton aux différents volumes: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 et 20 ml de la solution standard ensuite les volumes ont été complétés à 50 ml avec de l'eau distillée.

L'absorbance de la couleur résultante a été lue après 10 min à 430 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible.

4.2. Optimisation de la solubilisation du phosphate

4.2.1. Effet des composantes du milieu de culture

L'estimation quantitative du phosphate solubilisé et la capacité de solubilisation de phosphate chez les isolats ont été testés en milieu liquide (PVK), des cultures jeunes des isolats solubilisant le phosphate (de 24 heures) ont été utilisées pour l'inoculation du milieu de culture.

L'efficacité des isolats solubilisant le phosphate a été testée en utilisant le milieu de culture modifiées à chaque fois: soit par modification de la source de carbone, de la source d'azote ou de la concentration du substrat (le tricalcium phosphate)

4.2.1.1. Effet de différentes sources de carbone

L'effet de différentes sources de carbone comme le glucose, mannitol, fructose et saccharose sur la capacité de solubilisation du phosphate des isolats bactériens est étudié dans le milieu PVK contenant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphate à un pH de 7. Dans un tube à essai on met 5 ml de milieu liquide ont été inoculés à raison de 100 μl de suspension bactérienne 0.5 McFarland. L'incubation a été réalisée à 30°C dans un agitateur pendant 7 jours.

Les concentrations du phosphore libérées ont été estimées par la méthode de colorimétrique de Olsen (Olsen et Sommers, 1995).

salinités

4.2.1.2. Effet de différents dosages salinités :

L'effet de différents dosages de salinité NaCl (1g, 2g, 3g, 4g et 5g) sur la capacité de solubilisation du phosphate des différents isolats bactériens ont été étudiés dans le milieu de culture favorable (Pikovskaya PVK liquide) contenant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphate à un pH de 7. Les tubes à essai contenant 10 ml de milieu ont été inoculés à raison de 100 µl de suspension bactérienne (les souches **PI A** et **PI 5**).

L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 7 jours. Les concentrations du phosphore libérées ont été estimées par la méthode de colorimétrie de Olsen (**Olsen et Sommers, 1995**).

4.2.1.3. Effet de différentes sources de l'azote

L'effet de diverses sources de l'azote comme : extrait de viande, peptone et tryptone, le NH_4NO_3 et le NaNO_3 sur la capacité de solubilisation de phosphate des isolats est étudiée dans le milieu Pikovskaya PVK liquide qui contient le phosphore tricalcique comme seule source de phosphate et le pH a été ajusté à 7.

Les concentrations du phosphore libérées ont été estimées par la méthode de colorimétrie de Olsen (**Olsen et Sommers, 1995**).

4.2.2. Optimisation des conditions de cultures

4.2.2.1. L'effet de température

La capacité de différents isolats bactériens à solubiliser le phosphate a été testée pour la détermination de la température optimale d'incubation. Pour une estimation quantitative du phosphate solubilisé, on a utilisé le milieu Pikovskaya liquide sans modification. Les cultures bactériennes ont été incubées à des températures de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C et 50°C dans un incubateur. La concentration de phosphate libérée à différentes températures de croissance a été mesurée par la méthode colorimétrique de Olsen (**Olsen et Sommers, 1995**).

4.2.2.2. Effet de la durée d'incubation

L'effet de la durée d'incubation sur la capacité de solubilisation du phosphate des isolats bactériens est étudié dans le milieu PVK contenant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphate à un pH de 7. Les isolats sont inoculés

chacun dans des flacons de milieu PVK, les flacons sont incubés pendant 5 jours à 30°C.

Des prélèvements sont effectués à interval de 24 heures et les concentrations de phosphore libérées sont estimées par la méthode de colorimétrie de Olsen (Olsen et Sommers, 1995).

4.2.2.3. L'effet de l'agitation

La capacité des isolats à dissoudre le phosphore a été étudiée en utilisant deux techniques différentes afin d'étudier leur effet sur les résultats obtenus. Les deux méthodes utilisent l'agitation et sans agitation. 10 ml de milieu favorable à la solubilisation PVK liquide (Pikovskaya, 1948) à pH de 7 a été inoculé par 100 µl de chaque suspension bactérienne (pré-culture). On met chaque isolat (PI 5 et PI A), dans quatre tubes à essai, Mettre deux isolats PI 5 et PI A avec sous agitation et on met les deux tubes sur la paillasse de laboratoire sans sous agitation, dans le but d'étudier l'effet de ce dernier sur la capacité de solubilisation de phosphate puis incubés à 30° pendant 4 jours. La quantité de phosphate soluble a été mesurée par la méthode colorimétrique de Olsen (Olsen et Sommers, 1995).

5. Identification biochimique des isolats IP 5 et IP A par la galerie Api 20E et API 50 CH

À l'issue des tests réalisés, les 2 souches isolées présentant un important potentiel de solubilisation de phosphore ont fait l'objet d'une identification phénotypique. Le microorganisme sont mis en suspension dans le milieu puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui font virer l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique de la souche et servent à son identification à l'aide du logiciel d'identification. La galerie API 20 E est utilisée en complément de la galerie API 50 CH.

Les galeries API 20 E et 50 CH composées de microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée sont utilisées selon les recommandations décrites par Biomerieux, France.

Les galeries sont préparées pour la culture bactérienne des souches sélectionnées retenues : Le fond et le couvercle des boîtes d'incubation sont réunis, un volume de

5 ml d'eau distillée stérile est introduit dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide et les galeries sont placées dans les boîtes d'incubation.

Des colonies isolées sont inoculées dans une solution de NaCl à une concentration de 0.9%. L'inoculum est ensuite ajusté à une concentration cellulaire de 10^8 UFC/ml, qui correspond à un standard de 0.5 de Mc Farland, ou par mesure de la densité optique ajustée à 0.1 à une longueur d'onde de 600 nm.

Les suspensions bactériennes sont introduites dans les tubes de la galerie avec une micropipette tout en évitant la formation des bulles d'air.

Les tubes et cupules sont remplis pour la réalisation des tests **CIT**, **VP** et **GEL**, pour les autres tests, seuls les tubes sont remplis. Les tests **ADH**, **LDC**, **ODC**, **H₂S** et **URE** nécessitent l'ajout d'huile de paraffine stérile dans leurs cupules afin de créer une anaérobiose.

Les galeries inoculées sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures.

La lecture des résultats s'effectue directement lors du changement de la couleur et indirectement par l'utilisation des réactifs de révélation (**VP1**, **VP2**, **NIT1**, **NIT2**, James et Kovacs).

Les galeries Api 50 CH sont inoculées de la même façon. Les résultats de chaque galerie sont reportés sur les fiches d'identification sous forme de signes (+) pour les tests positifs et (-) pour les tests négatifs. Les résultats obtenus et l'identification des souches isolées sélectionnées sont interprétés en s'appuyant sur les caractéristiques des isolats par l'utilisation du **Bergey's manual of systematic bacteriology** ([Brenner et al., 2005](#)).

Chapitre III

Résultat

1. Isolement, purification et caractérisation des bactéries du genre *Azotobacter*

Neuf isolats ont été obtenus de la rhizosphère des plantes de blé dur récoltées dans la wilaya de Sidi Bel Abbas, Après plusieurs repiquages, la pureté des isolats est vérifiée par l'observation de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

Les isolats sont désignés comme suit : **PI 1, PI 2, PI 5, PI 6, PI 7, PI A, PI C, PI E, PI F**.

La caractérisation macroscopique des colonies isolées sur gélose Ashby au mannitol montre des colonies de forme et de taille variables. Ils présentent trois aspects macroscopiques différents (**Figure 14**) :

- Colonies blanches, opaques, brillantes, lisses, bombées à contour irrégulier d'un diamètre compris entre 5 à 8 mm (**PI 2**) prenant une couleur marron (noire) après d'incubation.
- Colonies transparentes, brillantes circulaire lisse bombées et à bord régulier à d'un diamètre de 1 mm (exemple : **PI 7**).
- Colonies crème ou marron, opaques, brillantes, lisses, bombées à contour irrégulier d'un diamètre compris entre 5 à 8 mm prenant une couleur noire après 72h d'incubation (exemple : **PI F**).

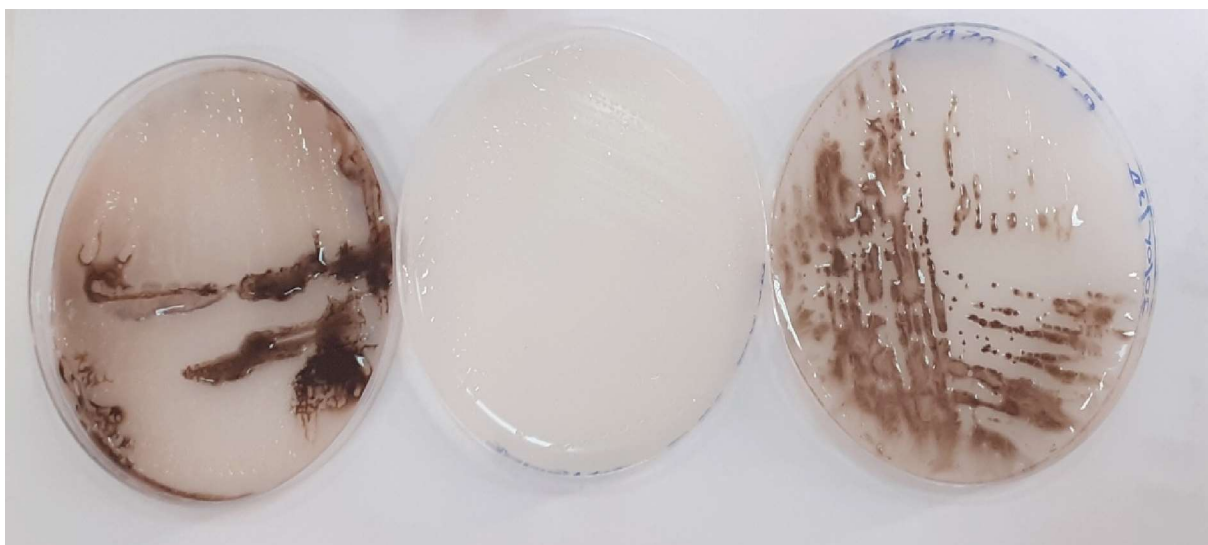


Figure 12: Aspects macroscopiques des isolats

L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram montre qu'ils sont tous des bacilles à Gram négatif (**Figure 13**)

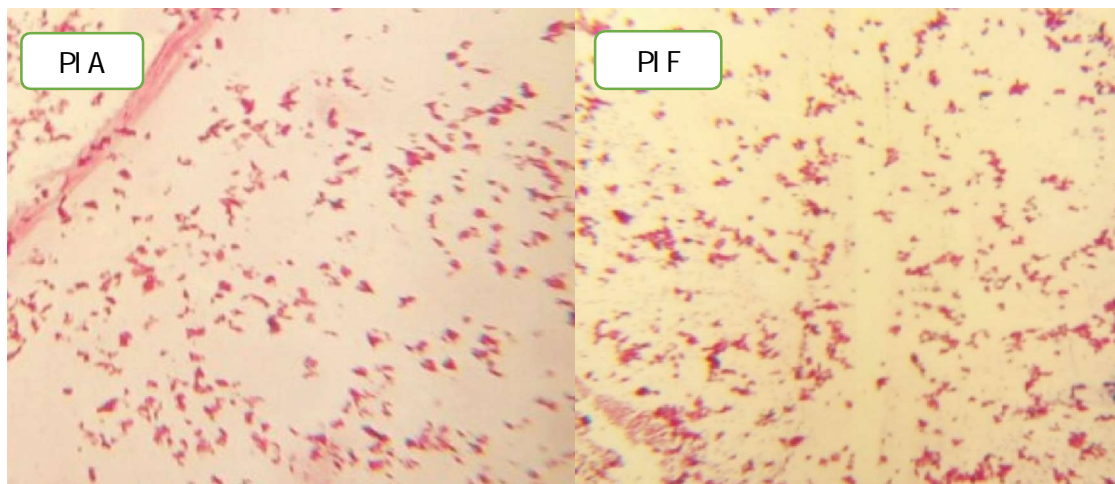


Figure 13: Observation microscopique des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Grossissement x100).

L'observation des cultures âgées des isolats **PI 1, PI 2, PI 4, PI 6, PI D, PI F** et **PI G** montre leur aptitude à la formation des cystes (**Figure 14**).

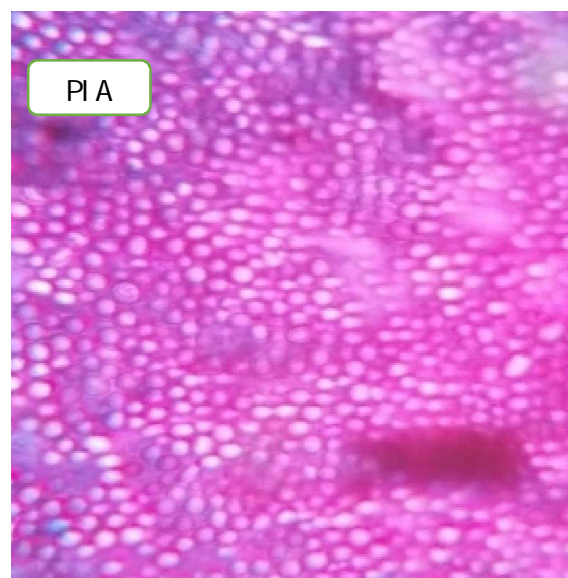


Figure 14: Observation microscopique des isolats après coloration de Gram et mise en évidence de la formation des cystes (Grossissement x100).

1.1. Test de catalase

La constatation d'une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) d'un dégagement gazeux chez les candidats (les souche) est la preuve de la production de catalase enzyme ayant servi à dégrader le composé cytotoxique: le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Un dégagement gazeux est constaté chez toutes les isolats **PI 1, PI 2, PI 5, PI 6, PI 7, PI A, PI C, PI F** et **PI E**, sélectionnés fixateur d'azote, de ce fait, les isolats sont catalase positif (**Figure 15**).



Figure 15: Exemple d'un résultat positif au test de catalase

1.2. Test de mobilité des isolats

La mise en évidence de la mobilité de 9 isolats fixateurs d'azote a été démontrée en milieu de culture de manitol-mobilité (**Figure 16**). La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale. et cela se traduit par la prolifération de bactéries sur gélose. Le test a montré une très fortes absorption de mannitol par les isolats testés, Les résultats du test de mobilité sur les différents isolats sont illustrées **le Tableau 4**.

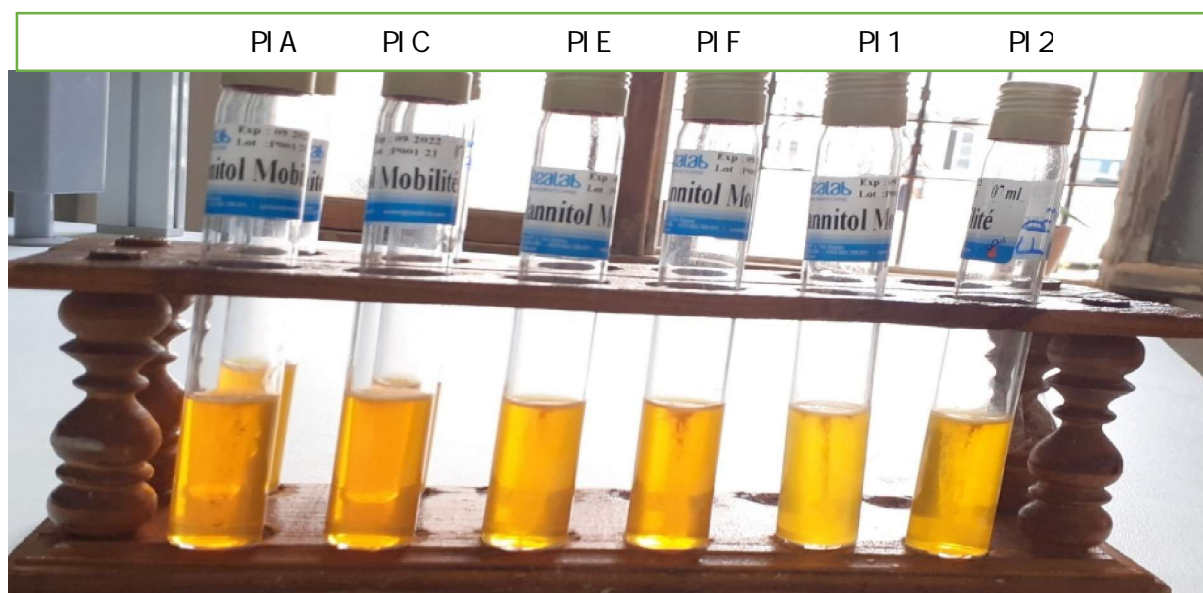


Figure 16 : Aspect des tubes à essai contenant le milieu de cult mobilité, ensemencé avec les isolants.

Tableau 04: Les resultats du test de mobilité des isolats.

souche	PI 1	PI 2	PI 5	PI 6	PI 7	PI A	PI C	PI E	PI F
Resultats	Mobile	Immobile	Immobile	Immobile	Mobile	Immobile	Immobile + Production du gaz	Immobile + Production du gaz	Immobile

1.4. Mise en évidence du type respiratoires

La mise en évidence du type respiratoire des isolats sélectionnés fixateurs d'azote est effectuée sur milieu de culture Viande-foie. Selon le niveau de croissance manifesté effectuée (Figure 17).

Les résultats obtenus ont montré que les 9 isolats sont tous des isolats aérobies stricts: PI 1 ,R3 2, PI 5, PI 6, PI 7, PI A, PI E ,PI F et PI C.

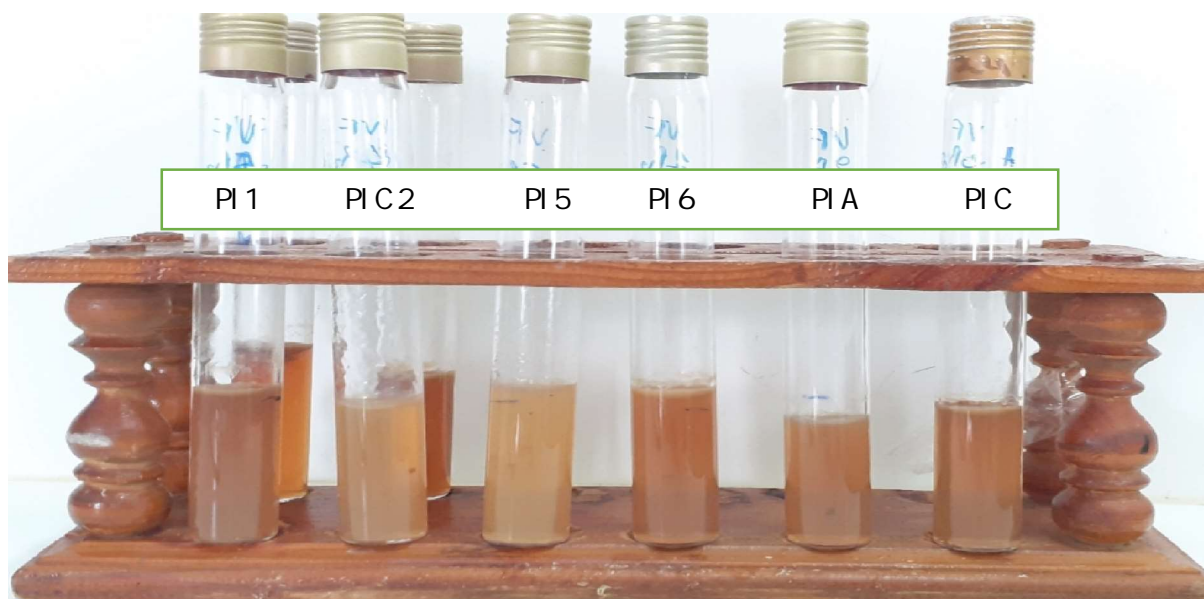


Figure 17 : Aspect des tubes à essai contenant le milieu de culture VF, ensemencé avec les isolats (PI 1, PI 2, PI 5, PI 6, PI 7, PI A, PI F, PI E et PI C)

2. Screening des activités biofertilisation

2.1. Solubilisation du phosphate

L'étude de la capacité des isolats bactériens à libérer le phosphate minérale a été réalisée avec un test qualitatif sur milieu solide et un test quantitatif en milieu liquide pour confirmer leur capacité à solubiliser le phosphate.

2.1.1. Test de solubilisation sur milieu solide

La capacité des différentes bactéries isolées (Neuf isolats) à solubiliser le phosphate inorganique a été étudiée sur milieu PVK solide en calculant l'efficacité de cette solubilisation par mesure des diamètres des halos transparents autour des colonies.

Les résultats obtenus montrent que la solubilisation du phosphate sur milieu solide est réalisée par 77,77 % des isolats dont 100 % ont exprimé un IS ≥ 2 (**Figure 18 et Figure 19**). Aucune activité de solubilisation du phosphore n'est observée chez les isolats (**PI 6 et PI E**).

Les souches **PI 5, PI 1, PI C, PI A, PI F, PI 7** et **PI 2** ont présenté des indices de solubilisation du phosphore de 4,50, 3,5, 3, 2,7, 2,51, 2,22 et 2, respectivement.



Figure 18: Les résultats du test de solubilisation du tricalcium phosphate par les isolats. (**PI 5, PI 6, PI 7**).

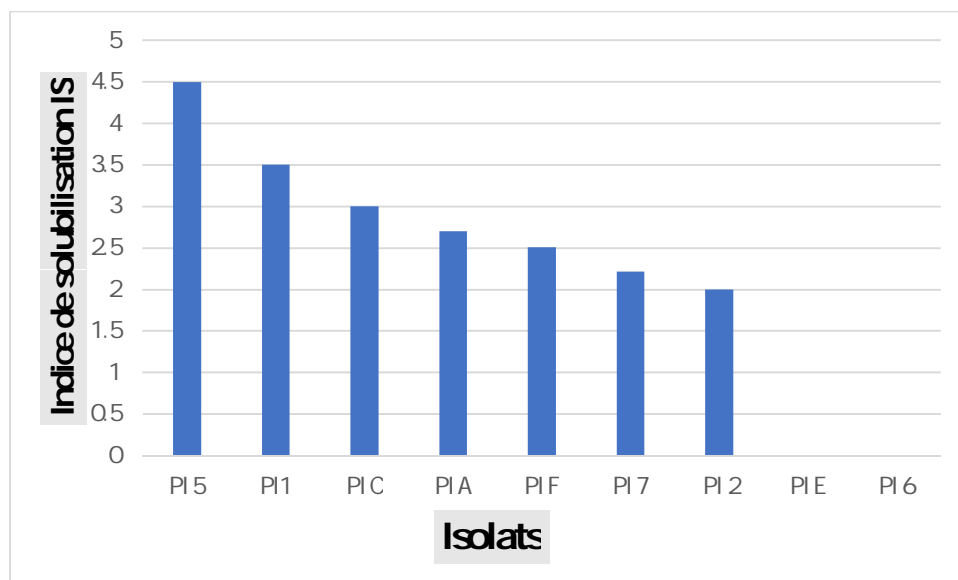


Figure 19 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya solide.

2.1.2. Test de solubilisation en milieu liquide

Le dosage de phosphore total soluble libéré par chaque isolat bactérien a été réalisé en milieu PVK liquide par la méthode colorimétrique d'Olsen ([Olsen et Sommers, 1995](#)). Les taux de phosphore soluble produit sur milieu liquide sont calculés en se référant à la courbe étalon suivant ([Figure 20](#)).

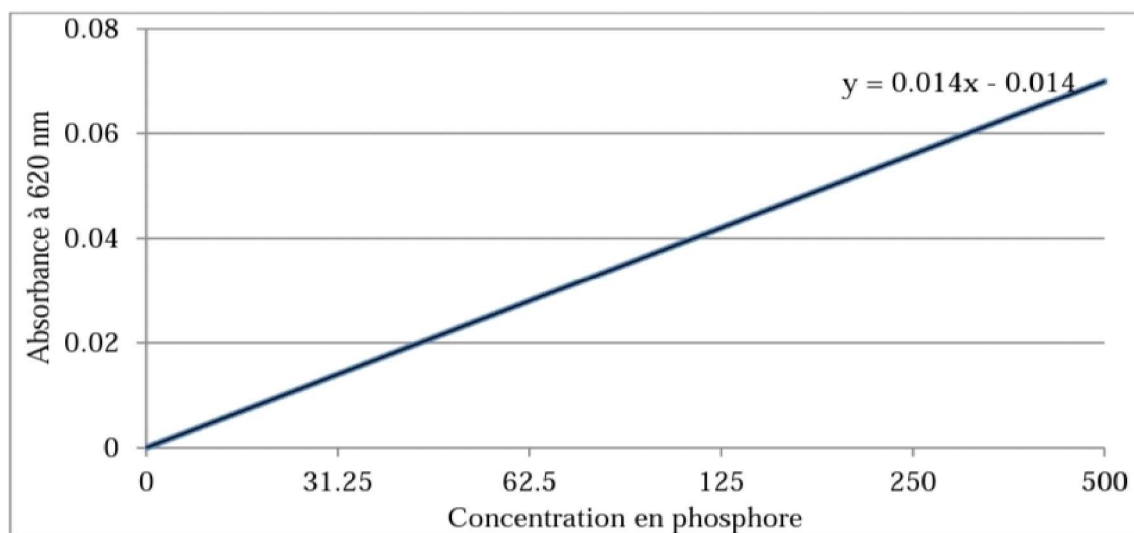


Figure 20 : Courbe standard du dosage du phosphore produit.

La quantité de phosphate solubilisée sur milieu Pikovskaya liquide varie de 26.429 à 48.179 $\mu\text{g/ml}$. Le maximum est atteint par l'isolat **PI F** (48.179 $\mu\text{g/ml}$) suivie

par **PI C** (44.464 $\mu\text{g/ml}$) et **PI E** (43.679 $\mu\text{g/ml}$) et **PI A** (43.5 $\mu\text{g/ml}$) (**Figure 21**).

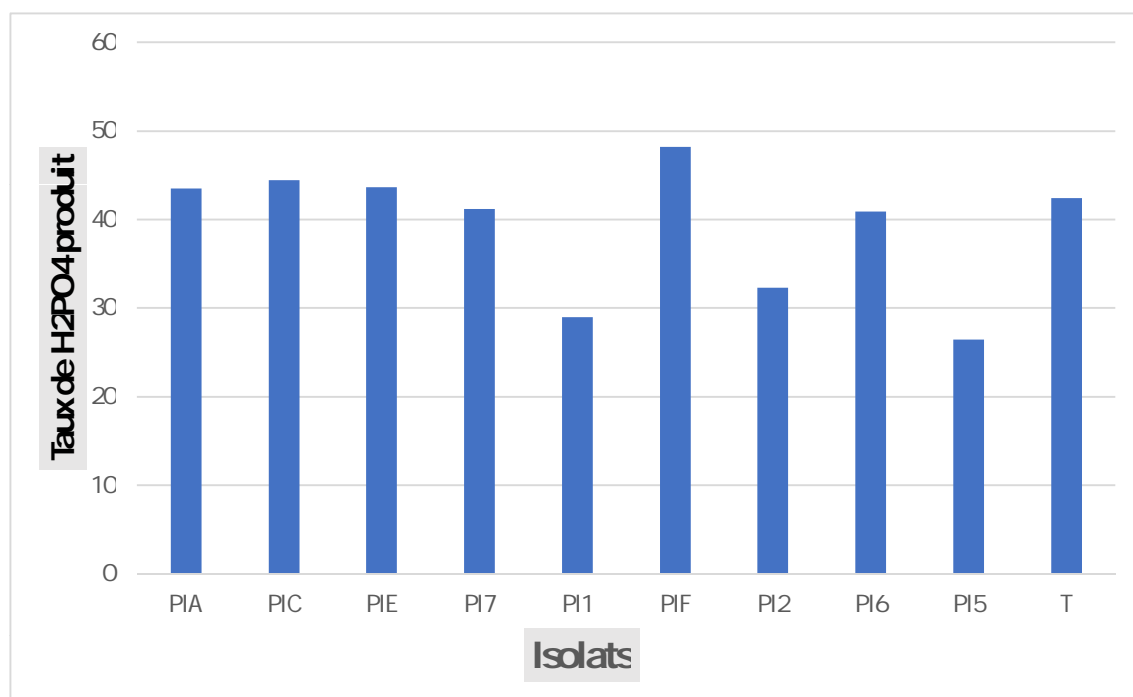


Figure 21 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya liquide.

2.2. Production d'acide indole acétique (AIA)

Les isolats bactériens solubilisant le phosphate ont été testés pour leur capacité à produire de l'acide indole-acétique par la technique rapporté par Acuña *et al.*, (2011) sur le milieu de culture de Luria- Bertani liquide additionné ou non de L-tryptophane (5g/l) .

Après addition de réactif de Salkowski aux surnageant, l'intensité de la couleur rose résultante indique la concentration de l'AIA libéré par les isolats bactériens (**Figure 22, 23 et 24**).

Après l'incubation à l'obscurité pendant 30 min, les différentes préparations sont examinées à l'œil nu (**Figure 23**) puis leurs densités optiques sont mesurées à 535 nm et les taux de d'AIA produit sont calculés en se référant à la courbe étalon (**Figure 24**).

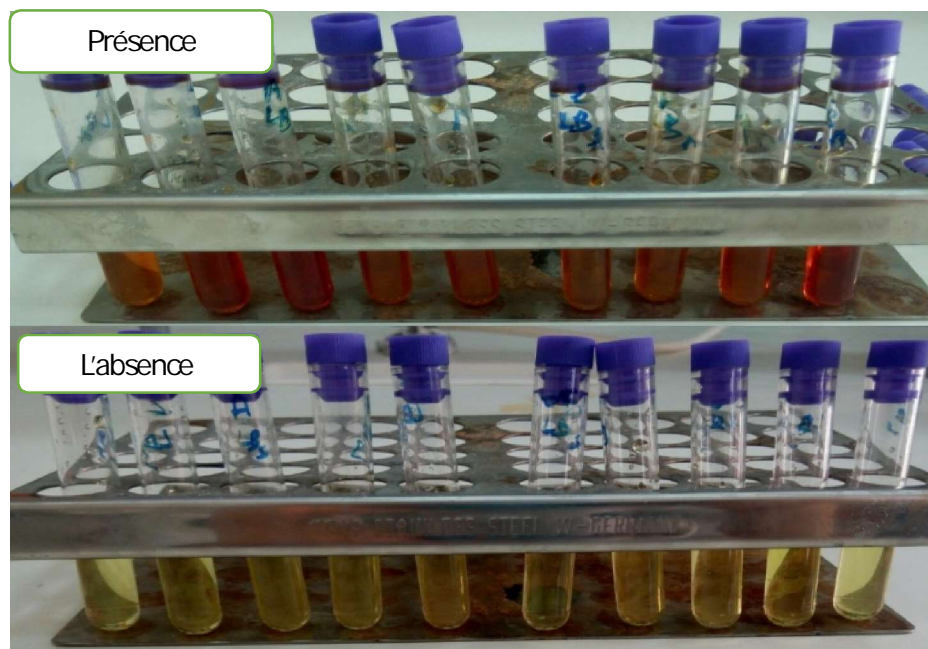


Figure 22 : Résultats obtenus des différentes compositions du réactif de Salkowski.
En présence et l'absence de Ltryptophane.

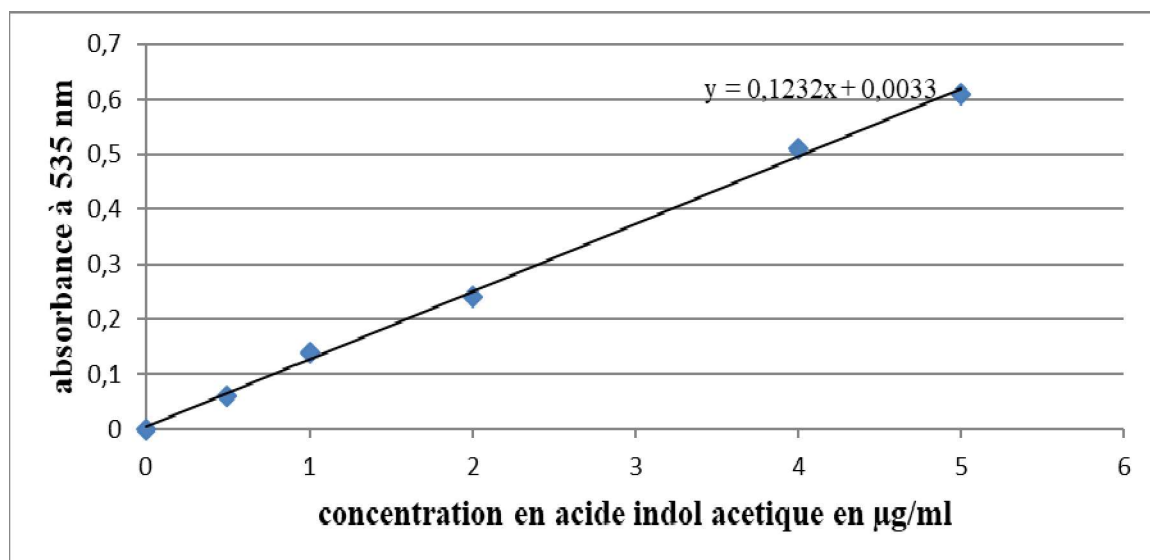


Figure 23 : Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique.

- **Production d'acide indole acétique (AIA): milieu non additionné de L-tryptophane**

La culture des isolats sélectionnés fixateurs d'azote et solubilisateur de phosphate sur le milieu de culture Luria-Bertani a permis la repartition des bacteries en deux groupes. Le

premier groupe de bactéries productrice d'AIA, marqué par l'enregistrement de concentration d'AIA largement supérieures au témoin (milieu stérile) représenté par les isolats **PI A**, **PI F**, **PI 1**, **PI 2**, **PI 5** et **PI 7**. Les seuils de production ont varié de 1.17 à 3.29. le maximum de production étant enregistré avec l'isolat **PI A** et la plus faible concentration d'AIA est enregistré avec l'isolat **PI 2** (Figure 24).

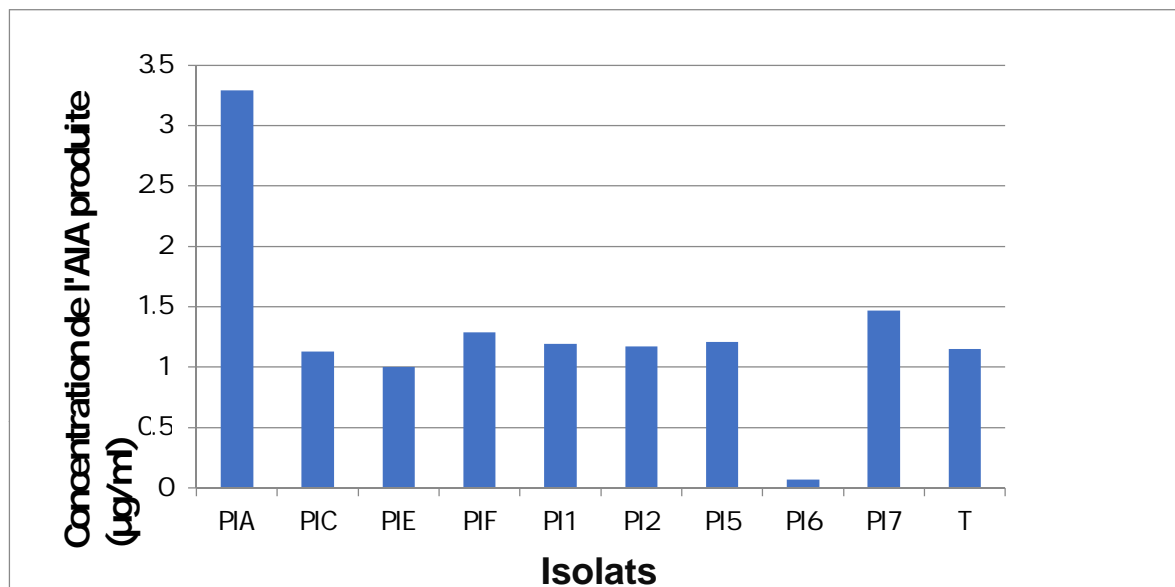


Figure 24: Concentrations d'AIA produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azotes sur milieu de culture luria-Bertani.

Le deuxième groupe étant quant à lui formé des isolats ayant présenté des concentrations d'AIA inférieures ou égales au témoin (milieu stérile) et est représenté par les isolats **PI C**, **PI E** et **PI 6**. Les seuils de production de ces isolats ont varié de 0.6 à 1.13, ces valeurs peuvent être le résultat d'une incapacité à la solubilisation de tricalcium phosphate avec consommation des quantités résiduelle soit d'une faible capacité à la solubilisation après consommation du phosphate résiduaire.

- **Production d'acide indole acétique (AIA): milieu additionné de L-tryptophane**

Les résultats obtenus ont montré que les quantités de l'AIA produites par les isolats bactériens varient de 0.1 à 4.5 µg/ml (Figure 25). Des quantités relativement élevées de l'AIA ont été enregistrées chez l'isolat **PI E**, suivie par **PI A** et **PI 7** avec une production de 4.5, 2 et 0.5 µg/ml respectivement (Figure 25 et Figure 22).

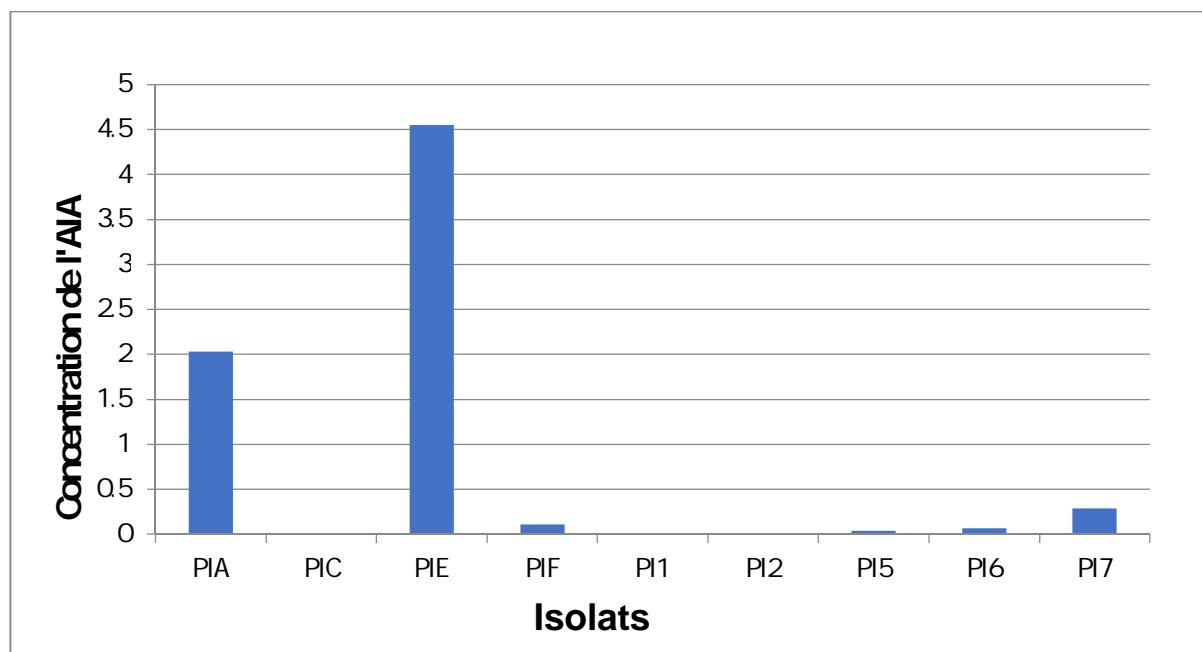


Figure 25: Concentrations d'AIA produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azotes sur milieu de culture luria-Bertani additionné de L-tryptophane.

A l'échelle des isolats, peu de corrélation est observée entre les taux d'AIA produits en absence et en présence du L-tryptophane (**Figure 24 et Figure 25**). Par exemple, l'isolat **PI E**, qui ne semblait pouvoir produire de l'AIA sur milieu sans L-tryptophane, marque le meilleur taux de production quand le même milieu est amendé en L-tryptophane à raison de 5g/l.

2.3. Production de l'ammoniac

Ce test est réalisé selon la méthode de **Capuccino et Sherman (1992)** avec modifications. Les modifications adoptées ont permis une estimation qualitative et quantitative des taux de NH_3 produits (**Figure 26, Figure 27, et Figure 28**),

L'examen de l'aspect du milieu après inoculation, incubation et ajout du réactif de Nessler, permet une appréciation qualitative. Les taux de production d'ammoniac NH_3 sont, cependant, déterminés dans les surnageant et en se rapportant à la courbe étalon (**Figure 26**).

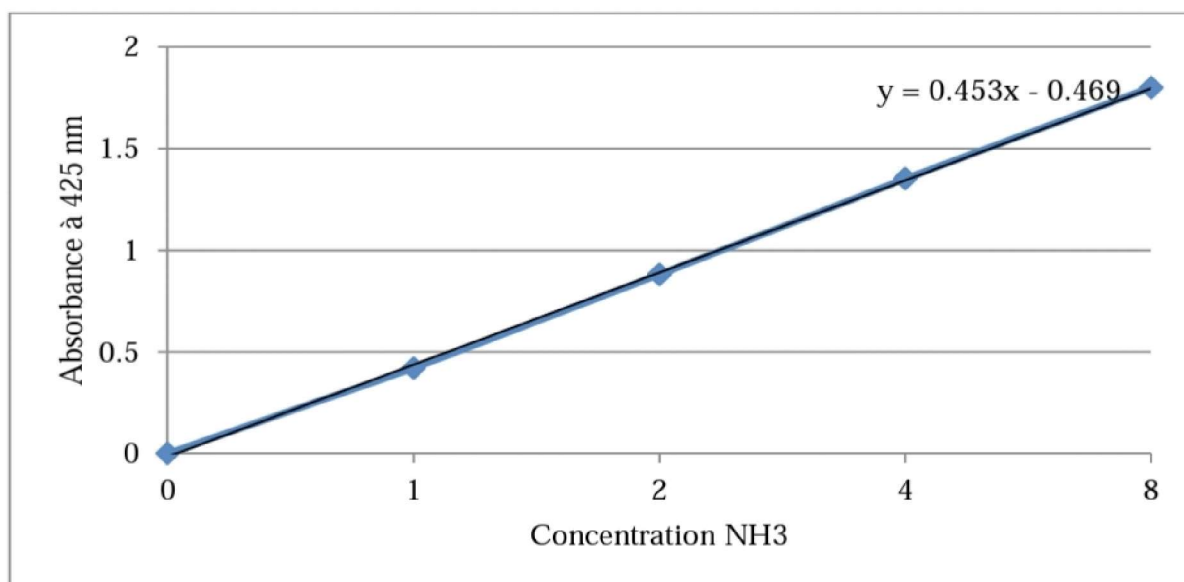


Figure 26 : Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH₃

Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats se sont révélés producteurs de l'ammoniac par le développement de la couleur jaune ou orange (**Figure 27**).



Figure 27: Résultats de la capacité des neuf isolats à produire l'ammoniac (NH₃).

Les taux de production d'ammoniac NH₃ ont varié de 2.33 mg/ml à 6.38 mg/ml. Le taux maximal est observé avec l'isolat **PI C**, **PI E**, **PI 2** et **PI 5** (6.38 mg/ml) suivi de l'isolat **PI A** (6.02 mg/ml) et **PI 7** (4.82 mg/ml) puis **PI 6** (4.56 mg/ml). Pour le reste des isolats, les taux de NH₃ produits ne dépassent pas les 4 mg/ml (**Figure 28**).

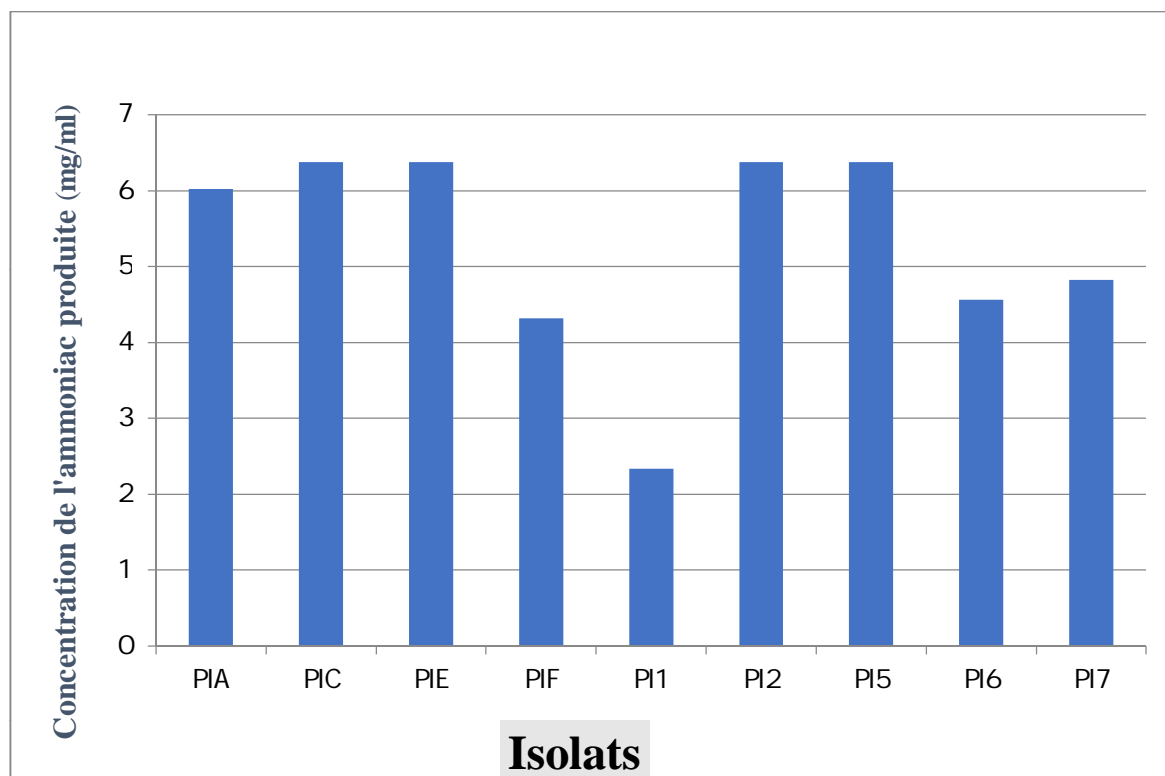


Figure 28 : Concentrations d'ammoniac NH_3 produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur milieu eau péptonée.

3. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de blé dur

3.1. Effet sur la germination des grains de blé

L'évaluation de l'effet des différents isolats sur la germination du blé est faite par l'étude des paramètres pourcentage de germination et longueur et poids des jeunes plantules, après 10 jours (**Figures 29, 30, 31, 32 et 33**).

La figure 31, ci-dessous, illustre la variation du taux de germination des grains de blé dur en fonction de l'inoculum des différents isolats sélectionnés. Globalement, l'inoculation par les différents isolats retenus semble affecter la germination des grains. Les valeurs du taux de germination varient entre 60% enregistré chez l'isolat **PI F** et 100% consigné pour les isolats **PI 1, PI A** et **PI C** (**Figure 30**).



Figure 29: Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur la germination des grains de blé.

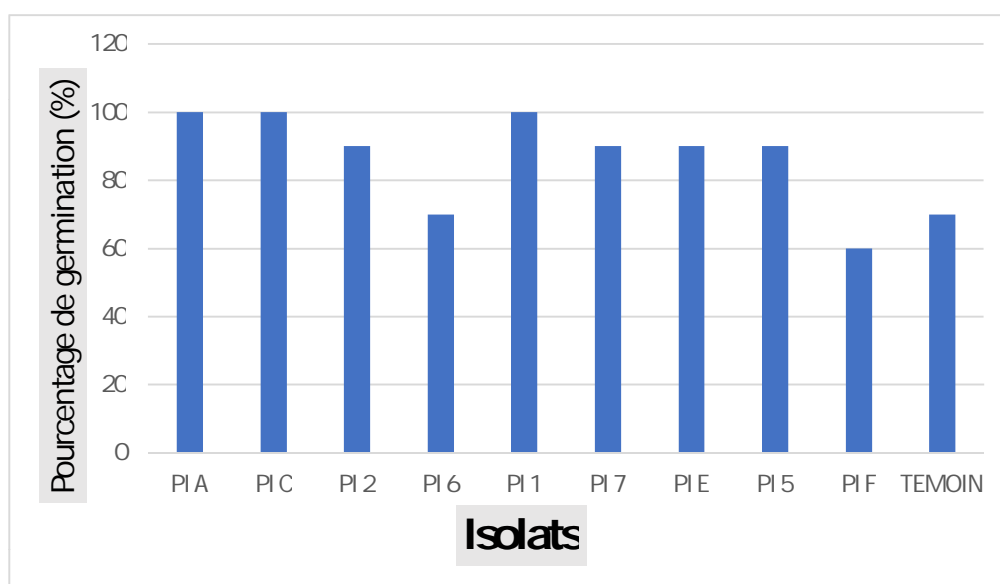


Figure 30 : Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote, sur le taux de germination du blé dur

Les isolats ont exercé trois types d'effet sur le taux de germination du blé dur (**Figure 29, Figure 30**) : un effet répressif, observé avec les isolats **PI F** avec le pourcentage de germination nettement plus faible par rapport au témoin. Un effet de promotion chez les graines inoculées par les isolats (**PI A, PI 1, PI C, PI 2, PI 5, PI E et PI 7**) et un effet neutre chez l'isolat **PI 6**, avec un taux de germination proche du témoin.

Les résultats obtenus pour les paramètres longueur des plantules sont peu compatibles avec ceux obtenus pour le taux de germination. Les isolats (**PI 7**, **PI 2** et **PI A**) ont témoigné d'une très bonne activité stimulatrice de la croissance des tiges et des racines. Cependant, les isolats **PI 1**, **PI 6**, **PI F** et **PI C** ont manifesté une activité repressive de la croissance des graines traitées par rapport au témoin (**Figure 31**).

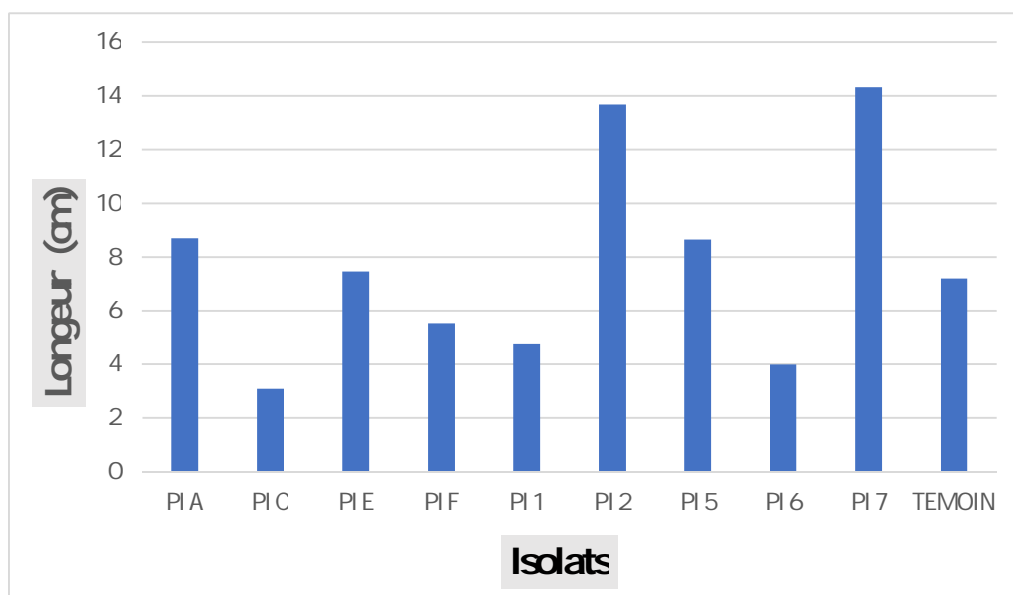


Figure 31 : Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur la longueur des plantules de blé dur.

L'analyse des résultats obtenus pour le paramètre poids des plantules de blé dur ressort une diminution de la masse des plantules inoculées par les isolats suivants **PI6** et **PI C** par rapport à témoin $T=0,06$. le maximum de poids du blé dur (les racines + les tiges) a été observée par chez les plantules inoculés par les isolats **PI 7**, **PI A**, **PI 2** et **PI E** (**Figure 32**).

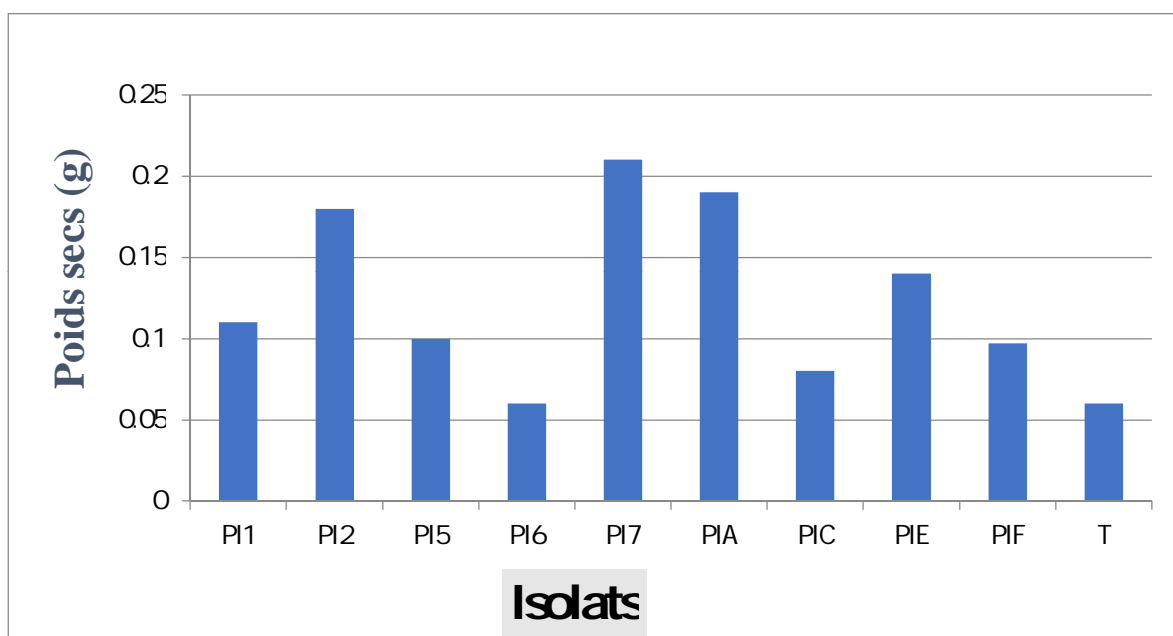


Figure 32: Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur le poids des plantules de blé dur.

Les indices de vigueur, paramètre renseignant sur l'état de santé des plantes, présentent une grande corrélation avec l'étude longueur des plantules, aucune corrélation avec du taux de germination n'est observée (Figure 33). L'état de santé des plantules est fortement amélioré sous l'effet des inoculations réalisées avec les isolats **PI A**, **PI E**, **PI 2**, **PI 5** et **PI 7**. Les IV obtenus sont nettement supérieur à l'IV témoin.

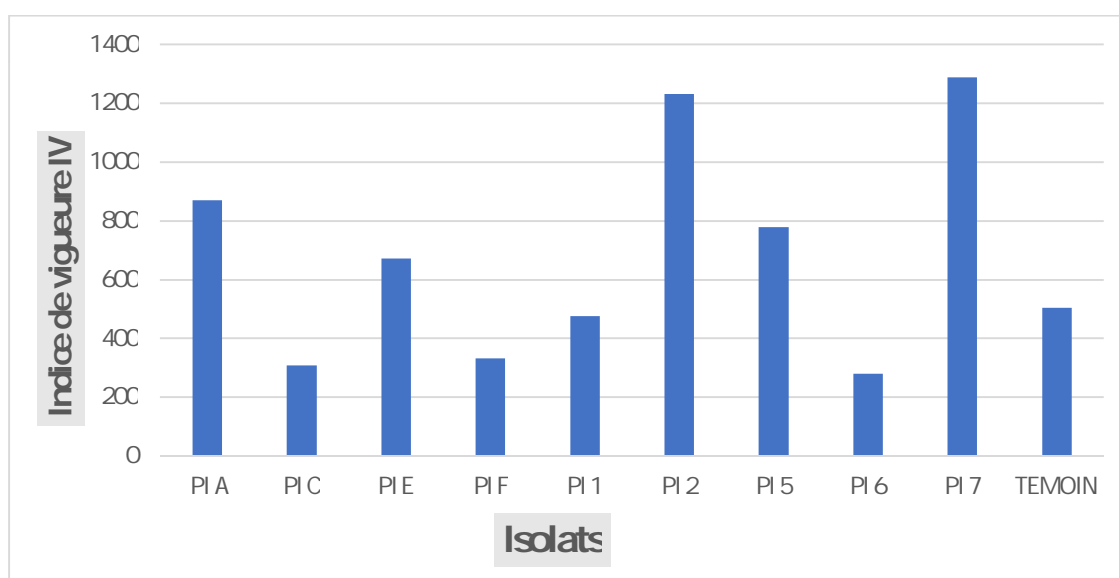


Figure 33: Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur l'indice de vigueur des graines de blé dur.

4. Optimisation de solubilisation de phosphate

4.1. Optimisation de la composition de milieu de culture

4.1.1. Effet de différentes sources de carbone

La solubilisation du phosphate a été testée avec différentes sources de carbone (**Figure 34**), les quantités de phosphore libérées varient entre 18,5 µg/ml et 75,928 µg/ml. Selon les résultats obtenus il est remarqué que la source la plus préférée pour les deux isolats bactériens **PI A** et **PI 5** (**Figure 34**) était le glucose avec des concentrations de phosphore libéré de 75,928 µg/ml et 74,214 µg/ml respectivement (**Figure 34**).

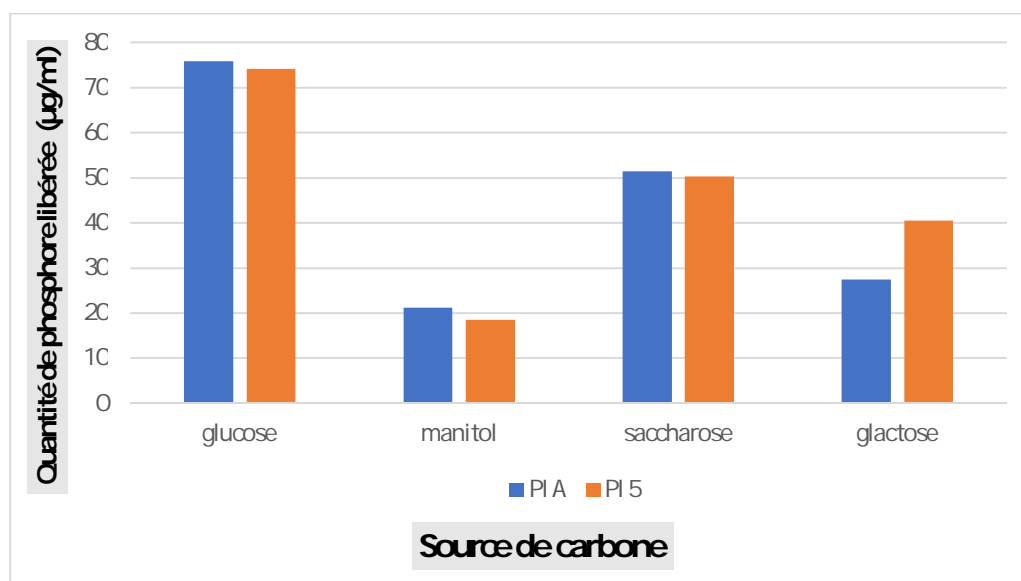


Figure 34: Effet de diverses source de carbone sur la solubilisation du phosphate par les isolats PI A et PI 5.

Ce résultat concorde avec les travaux de **Fasim et al., (2002)**, l'auteur rapporte que la solubilisation du phosphate se produit en présence d'une source de carbone avec un maximum de solubilisation du phosphate tricalcique avec le glucose. **Yadav et Singh, (1991)**, précisent même que la libération du phosphate augmente avec l'augmentation des concentrations de glucose et qu'une plus grande disponibilité de la source d'énergie pour la croissance des souches augmente la production de l'acide.

4.1.2. Effet de différentes sources d'azote

Pour étudier l'effet de la source d'azote sur la solubilisation des phosphates, différentes sources d'azote ont été ajoutées pour remplacer les extraits de levures dans le milieu PVK liquide (Figure 35). Les quantités de phosphore libérées varient selon la source d'azote entre 39.571 µg/ml et 66.071 µg/ml.

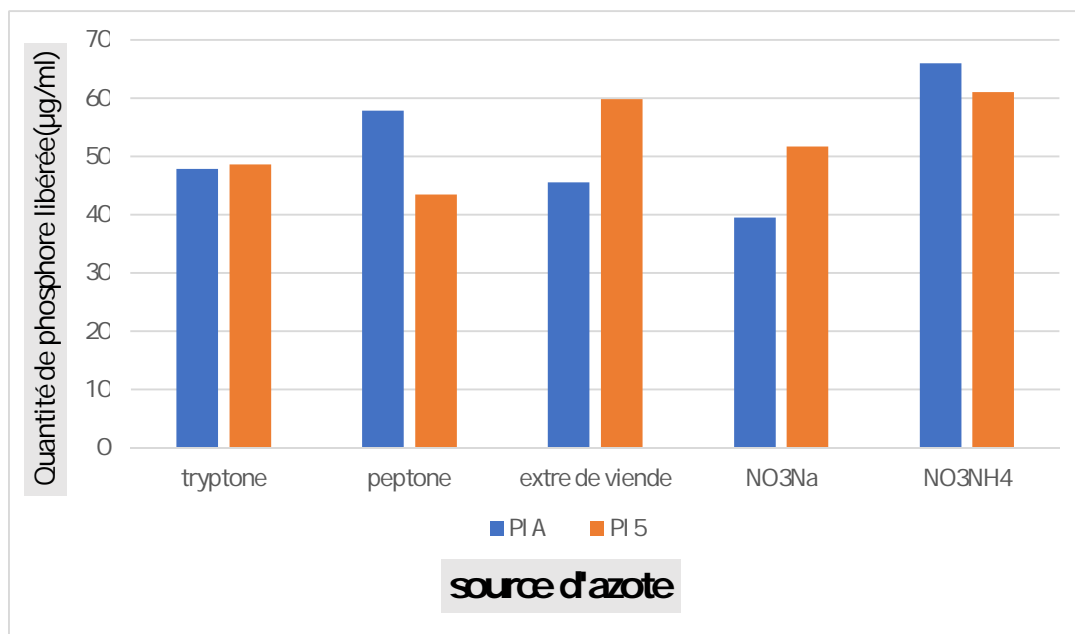


Figure 35: Effet de diverse source d'azote sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.

Il a été observé que le nitrate d'ammonium NH_3NH_4 et l'extrait de levure ont donné une solubilisation maximale des phosphates pour les isolats **PI A** et **PI 5** avec des concentrations de phosphore libérées de 66.071 µg/ml. et 61.071 µg/ml respectivement suivie par l'extrait de viande pour isolat **PI 5** (59.928 µg/ml) et le peptone pour isolat **PI A** (57.857 µg/ml).

Ces résultats sont en concordance avec les études de **Kumar et Ram, (2014)**. En outre, il a été observé que les sources d'azote inorganiques favorisent la solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par rapport aux sources d'azote organiques.

4.1.3. Effet de différents dosages de salinité

La solubilisation du phosphate a été testée avec différents taux de salinité, les quantités de phosphore libérées varient entre 42.428 $\mu\text{g/ml}$ et 80.07 $\mu\text{g/ml}$ pour isolat **PI A**, et 44.071 $\mu\text{g/ml}$ et 81.351 $\mu\text{g/ml}$ pour isolat **PI 5** (Figure 36).

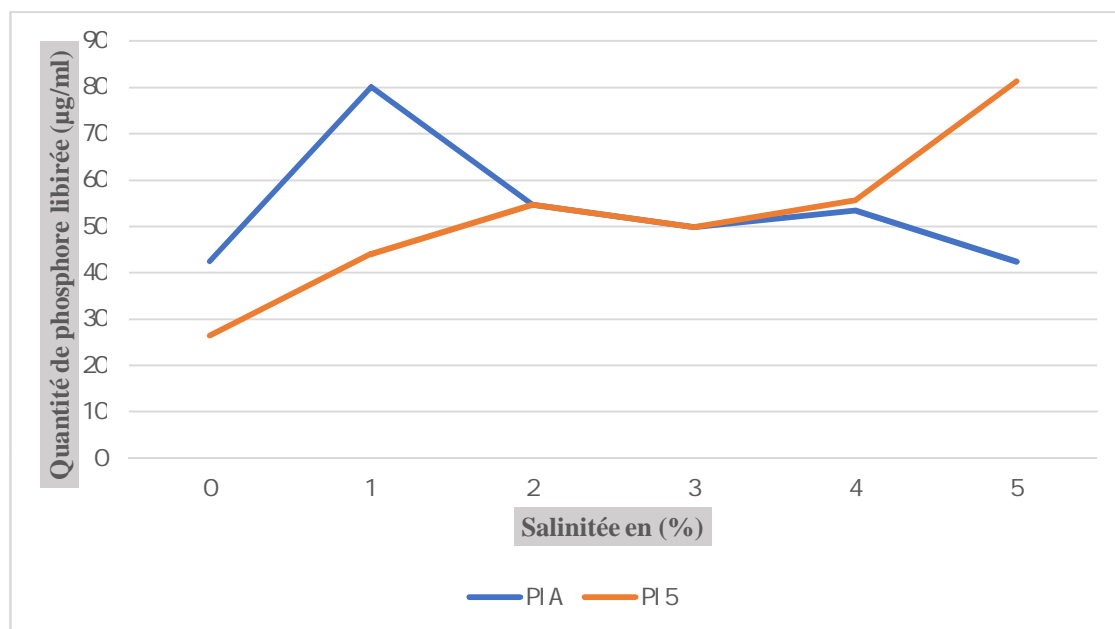


Figure 36: Effet de différents dosages de salinité sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5

Les résultats obtenus marquent une divergence dans la tolérance à la salinité pour les isolats testés. La tolérance de l'isolat **PI A** à de faibles taux de NaCl est soulignée par un optimum de solubilisation à 1% de NaCl avec libération de 81,357 $\mu\text{g/ml}$. En contre partie, l'isolats **PI 5** semble tolérer des concentration en NaCl allant jusqu'à 5% et il marque son optimum de solubilisation à cette concentration en libérant 80,071 $\mu\text{g/ml}$.

4.2. Optimisation des conditions de cultures

4.2.1 L'effet de la durée d'incubation

La capacité de différents isolats bactériens à solubiliser le phosphate a été testée pour la détermination de la durée optimale d'incubation.

Les résultats obtenus, exposés dans la **Figure 37**, montrent que les valeurs maximales de solubilisation de phosphate tricalcique ont été observées après 5 jours d'incubation, avec un taux de solubilisation variant de 11.928 $\mu\text{g/ml}$ à 48 $\mu\text{g/ml}$ de phosphore soluble pour les deux isolats **PI A** et **PI 5**. La concentration de phosphate tricalcique solubilisée diminue avec le début surtout à la 1^{ère} journée d'incubation qui présente les plus faibles concentrations de phosphore libre de 11.928 (**PI 5**) et 15.571 (**PI A**) $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à le 3^{ème} jours (**Figure 37**).

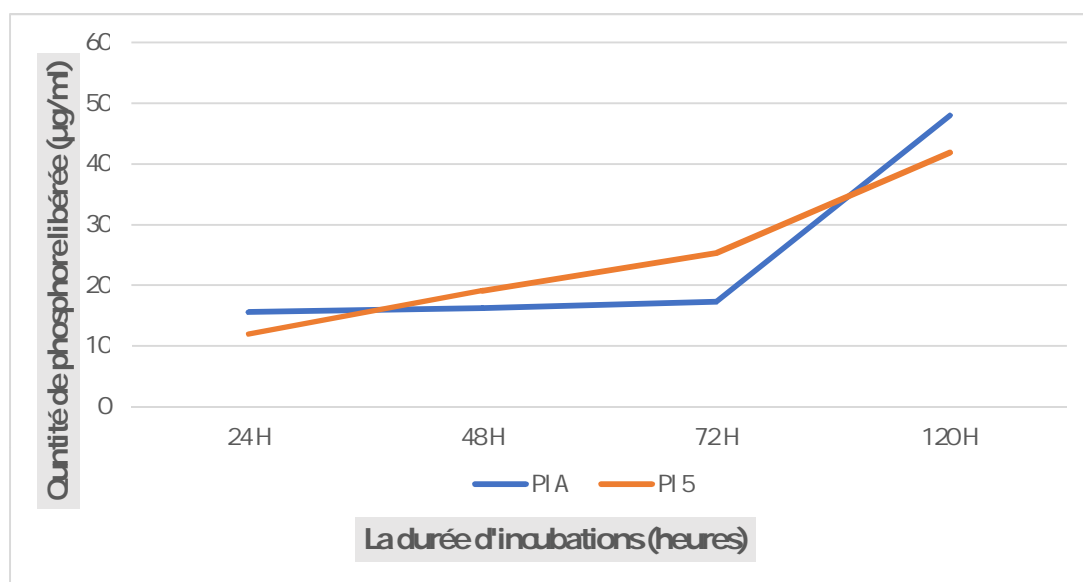


Figure 37: Effet de la durée d'incubation sur l'activité de solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.

Selon les résultats obtenus par **Muleta et al., (2012)**, la solubilisation de phosphate tricalcique est maximale après le sixième jours d'incubation.

4.2.2 L'effet de température

La température d'incubation apparaît comme un facteur agissant sur la capacité des isolats à solubiliser efficacement le phosphate tricalcique. Pour les deux isolats étudiés la température 30°C est la température optimale pour la croissance et la solubilisation du phosphate atteint un taux de 44.142 et 54.571 µg/ml de phosphore libéré par les isolats **PI A** et **PI 5** respectivement (Figures 38).

Aux températures 35, 40, 45 et 50 °C de plus faibles taux de solubilisation sont remarqués pour les deux isolats, ils ont été de 45.285 µg/ml (**PI A**) à température 45°C, 44.142 µg/ml (**PI 5**) à température 50°C. **Sayer et Gadd (1998)** ont aussi montrés que la température de 28°C est l'optimale pour la solubilisation du phosphate insoluble.

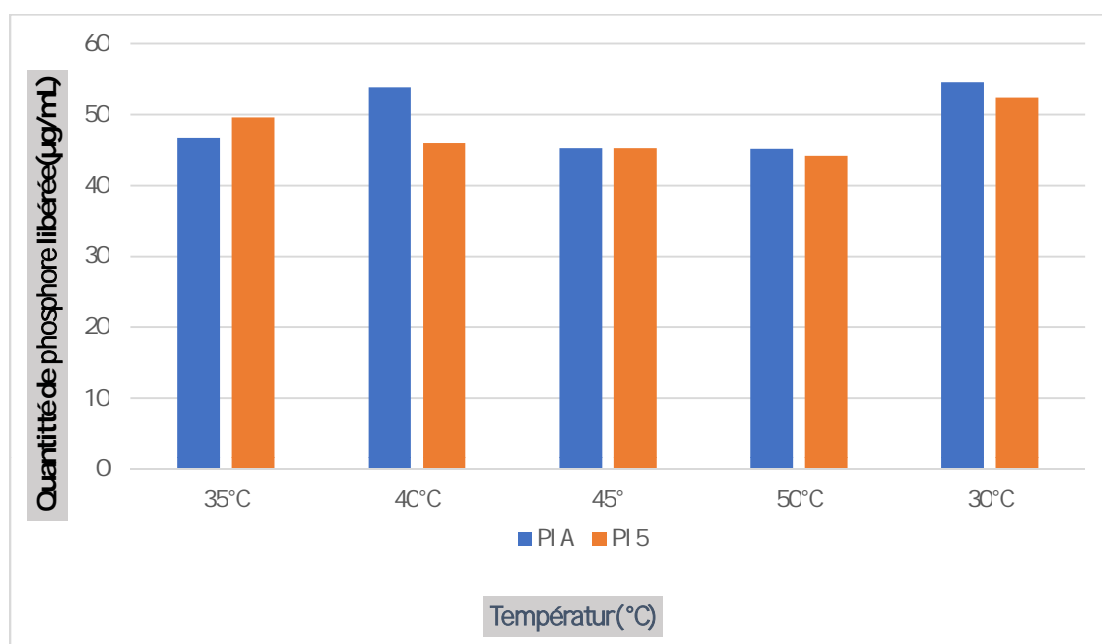


Figure 38: Effet de Température sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.

4.2.3 l'effet de agitation

La capacité des isolats à dissoudre le phosphore a été étudiée en utilisant deux variantes d'incubation, incubation en conditions statique et incubation sous agitation. Les résultats sont représentés dans la **Figure 39**.

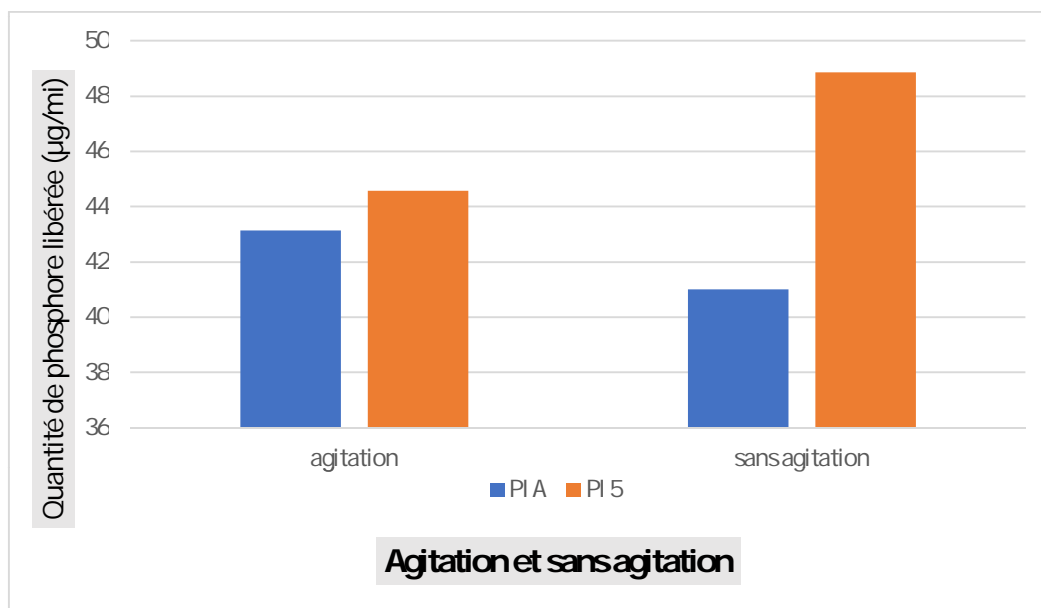


Figure 39 : Effet de agitation sur la solubilisation du phosphate par l'isolat PI A et PI 5.

Les résultats obtenus prouvent l'existence d'un impact des conditions de ces conditions d'incubation sur la solubilisation du phosphate. L'incubation sans agitation donne des résultats optimaux pour la solubilisation du phosphate chez les isolats **PI 5** avec un taux de 48.8571 µg/ml. Quant à l'isolat **PI A**, l'agitation semble affecter positivement la solubilisation, les taux de solubilisation obtenus passent de 41 µg/ml en absence d'agitation à 43.14 µg/ml en présence d'agitation.

5. Identification biochimique des isolats PIA et PI5 par la galerie Api 20E et API 50 CH

À l'issue des résultats obtenus, la souche **PI A** et **PI 5** ont été sélectionnée pour faire l'objet d'une identification phénotypique.

L'identification est réalisée via l'ensemencement des galeries API 20E et API 50 CH et le profil biochimique obtenu a servi à une interprétation probabiliste par l'usage du logiciel informatique Identax bacterial identification system version 1.2 (**Figure 40**).

Dans ce cas, l'identification de la souche **PI A** et **PI 5** est faite en se référant à une matrice d'identification élaborée à partir des tableaux d'identification fournis dans *Bergey's manual of systematic bacteriology* pour le genre *Azotobacter* (**Brenner et al., 2005**). Pour cela, un espace de travail est créé sur l'application identax, la matrice est importée et les résultats sont introduits (**Figure 40, Figure 41 et Figure 42**). À la fin, un résultat s'affiche sur l'écran et un rapport détaillé est établi (**Figure 41**).

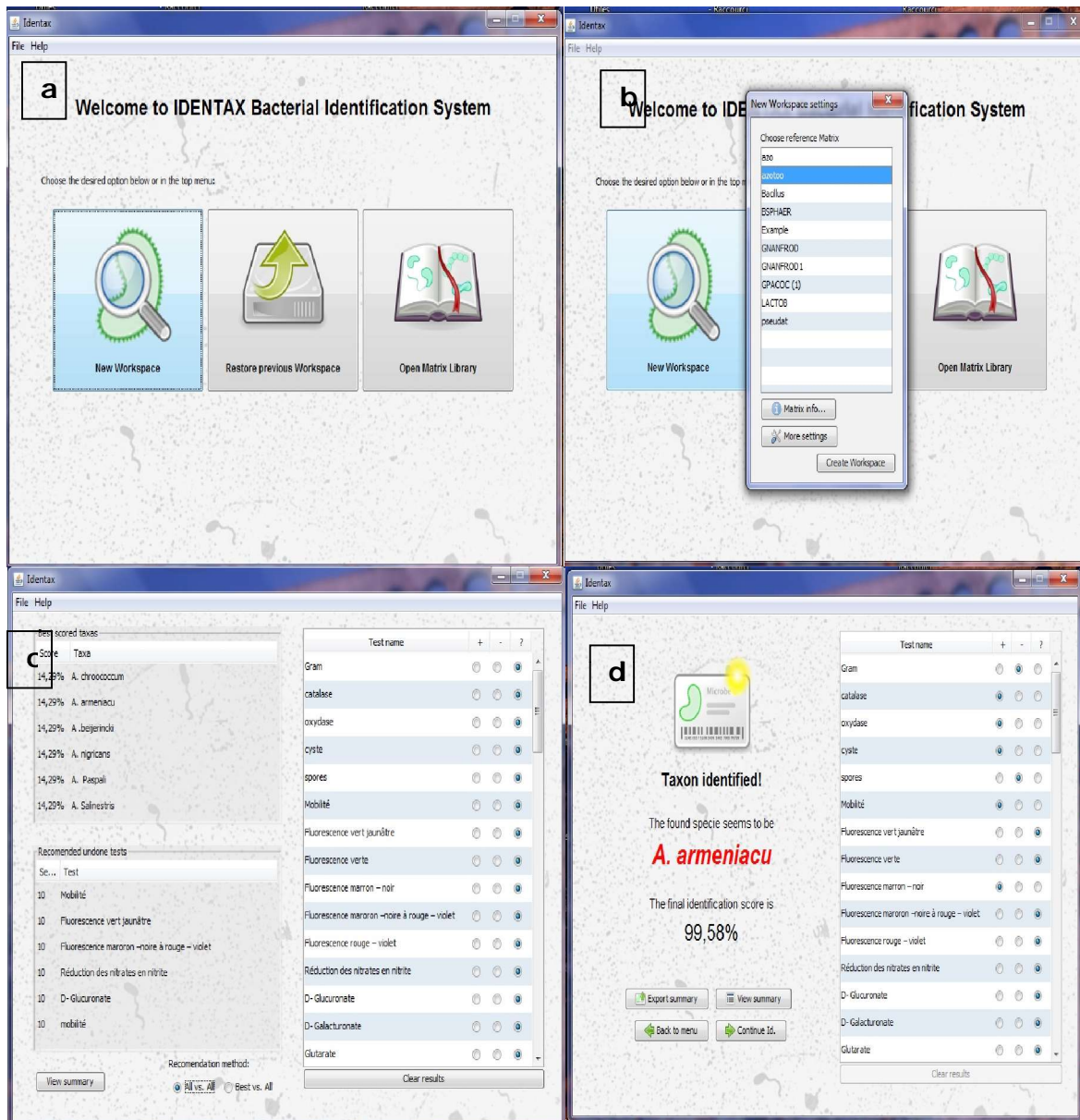


Figure 40 : Identax bacterial identification system version 1.2. **a :** création de l’espace de travail. **b :** importation de la matrice d’identification. **c :** les grilles des résultats. **D :** affichage du résultat sur écran.

Selon le Bergey’s manual of systematic bacteriology (Brenner *et al.*, 2005), les souche **PIA** et **PI5** partagent les caractéristiques suivantes avec les bactéries du genre *Azotobacter*: le type respiratoire, l’incapacité à la production des spores, la forme des cellules, la production de cystes, la production de pigment dans les cultures âgées de plus de trois jours, la production de catalase, la fixation d’azote, la dégradation du glucose, l’incapacité à la production de H₂S et la dégradation

variable du rhamnose, du mannitol, du sorbitol, du mélibiose et de l'inositol. La souche est identifiée comme appartenant au genre *Azotobacter*.

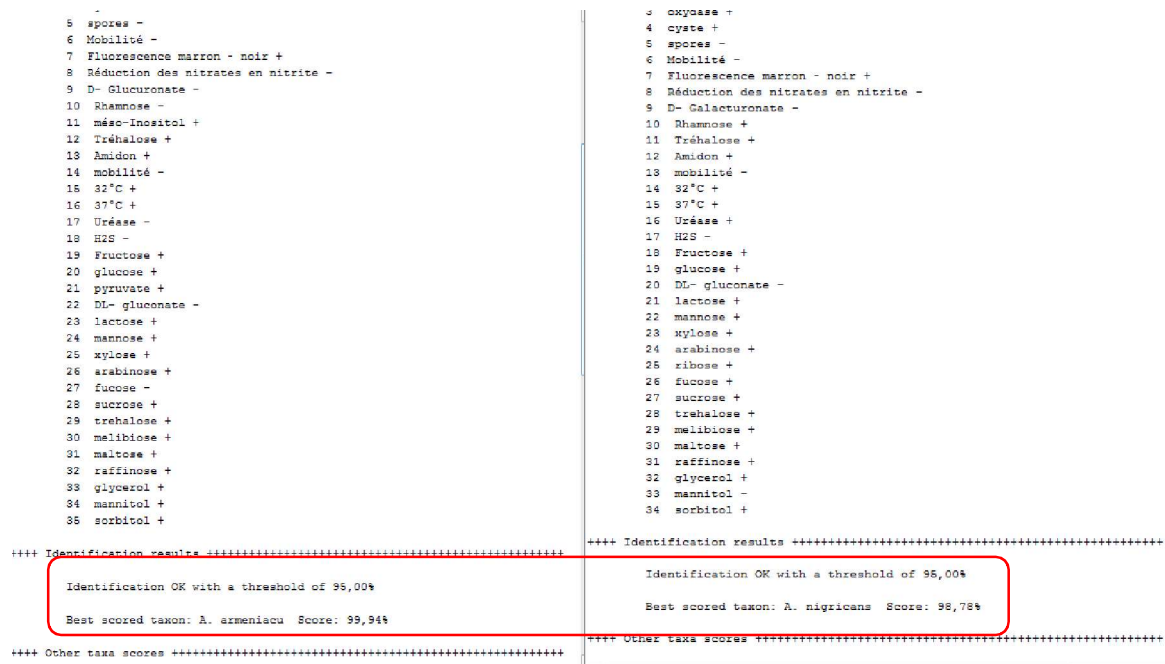


Figure 41 : Rapport d'identification des souches PIA (à gauche) et PI5 (à droite).

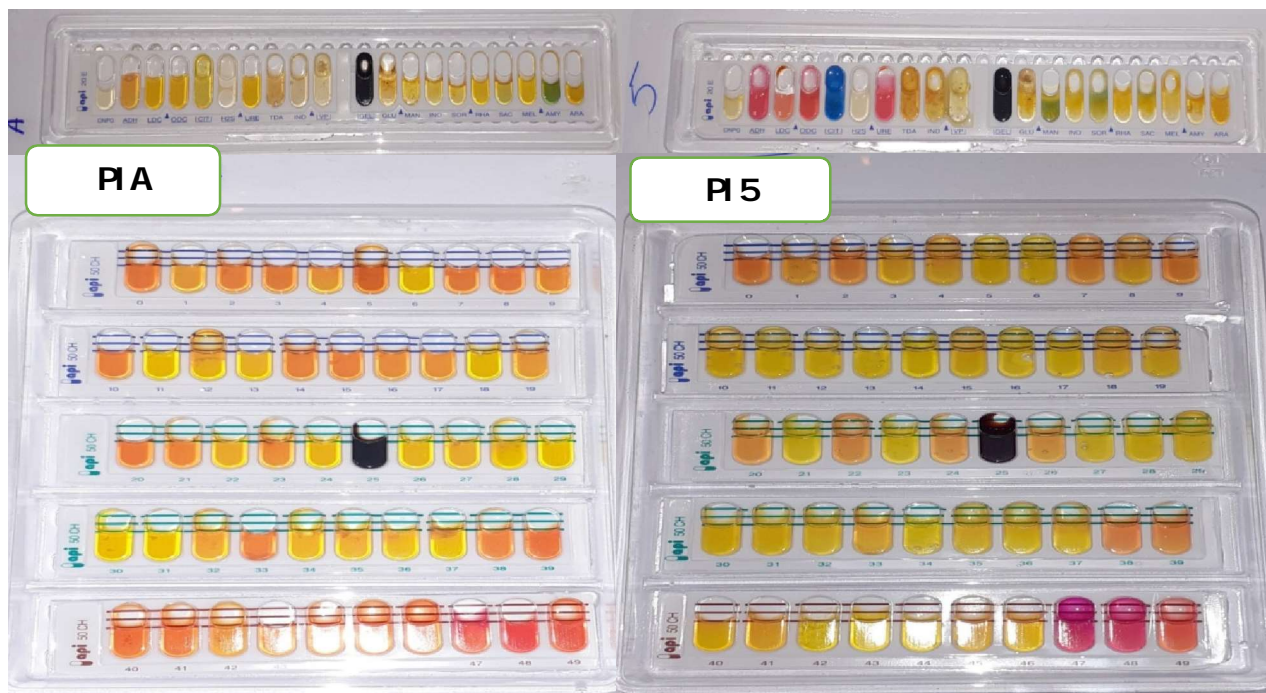


Figure 42 : Profiles biochimiques de la souche PIA et PI 5.

Suite à l'analyse des profils biochimiques des souche **PIA** et **PI5**, les souches sont identifiées comme *Azotobacter Armeniacus* (avec un score d'identification de **99.94%**) et *Azotobacter nigricans* (avec un score d'identification de **98,78 %**), respectivement (**Figure 42**).

Discussion

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont un groupe hétérogène de bactéries que l'on retrouve dans la rhizosphère, à la surface des racines et en association avec les racines, ce qui peut améliorer la croissance des plantes directement et/ou indirectement (Niranjana et Hariprasad, 2014).

Ces bactéries colonisant les racines, lorsqu'elles sont appliquées sur les graines ou les racines, améliorent la croissance de la plante, réduisent les dommages causés par les phytopathogènes et apportent une résistance des plantes contre le stress abiotique (Khan et al., 2010).

La capacité de certains microorganismes à convertir le phosphore insoluble en une forme accessible, comme l'orthophosphate est une activité importante dans les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) (Chen et al., 2006; Rodriguez et al., 2007).

Dés atouts reconnus, la fixation biologique de l'azote constitue un trait primordial des PGPR biofertilisants car la disponibilité réduite de l'azote, due à sa forte émission dans l'air, est le facteur le plus limitant dans les systèmes agricole. Le potentiel biofertilisant des PGPR fixateur d'azote est l'objet de la présente étude, en effet, l'objectif tracé pour le présent travail est l'isolement et la sélection de souches PGPR diazotrophes (du genre *Azotobacter*) à fort potentiel biofertilisant.

L'isolement de souches PGPR biofertilisantes efficaces du genre *Azotobacter* est effectué à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur cultivées sur le sol de la wilaya de Sidi Bel Abbés.

Lors de l'isolement, une stratégie de présélection est adoptée, la culture des prélèvements sur milieu Ashby permet l'élimination des microorganismes incapable de fixer l'azote atmosphérique, la croissance des bactéries diazotrophes asymbiotiques se trouve ainsi favorisée. L'isolement a abouti à l'obtention de 9 isolats d'aspect macroscopique varié.

L'étude phénotypique et la caractérisation préliminaire des isolats sélectionnés sont basées essentiellement sur la présence de six critères tels que l'aspect macroscopique des colonies, la forme bacillaire avec une coloration de Gram négative, la production de cystes, le type respiratoire et la réaction positive pour la catalase et l'oxydase.

Les colonies observées présentent des aspects macroscopiques variés et seuls les isolats PI1, PI2, PI5, PI6, PI7, PIA, PIE et PIC, PIF présentent une pigmentation marron brune après 72 heures d'incubation. Selon Chennappa, (2015), la production de tel pigment, trait

caractéristique des bactéries du genre *Azotobacter*, est due à l'accumulation de mélanine produite par oxydation de la tyrosine par une tyrosinase à copper.

Les isolats sélectionnés présentent des formes cellulaires similaires au genre *Azotobacter*, bâtonnets aux extrémités arrondies. La capacité à la production de cystes, vérifiée par observation microscopique, est révélée chez les isolats, PI1, PI2, PI5, PI6, PI7, PIA, PIC, PIE et PIF. Les cystes remplis de poly- β -hydroxybutyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux comme source d'énergie (Silini, 2013).

L'intérêt de bactéries PGPR du genre *Azotobacter* réside dans la diversité de leurs modes d'action, elles peuvent afficher presque tous les mécanismes de lutte biologique, de biostimulation et de biofertilisation (Chennappa, 2015).

La capacité des souches sélectionnées à l'expression des mécanismes implique dans la biofertilisation est mise en évidence via une série de test dont : la solubilisation de phosphore, d'acide indole-acétique et de production d'ammoniac.

L'amélioration de la disponibilité du phosphate est une des principales activités améliorant la croissance des végétaux, 100% des isolats sélectionnés fixateurs d'azote solubilisent les phosphates tricalcique en milieu solide, 77.77% de ces derniers ont exprimé un IS > 2.27. Aussi, 100% des isolats ont exprimé une solubilisation du phosphore en milieu liquide est 85.71% des isolats ont enregistré des taux entre (26.429 à 48.179). Le maximum est atteint par l'isolat **PI F** (48.179 $\mu\text{g/ml}$) suivie par **PI C** (44.464 $\mu\text{g/ml}$) et **PI E** (43.679 $\mu\text{g/ml}$) et **PI A** (43.5 $\mu\text{g/ml}$).

Les meilleurs taux de solubilisation, sur milieu liquide est l'isolat piF, solide est le pi5. Beneduzi et Passaglia, (2011), ont rapporté sur la prédominance des bactéries solubilisatrices du phosphore dans la rhizosphère et ils les estiment après de 20-40% de la population bactérienne du sol.

L'activité de solubilisation de phosphore exprimé par ces isolats est comparable à celle rapporté par Narula et al., (2002) ; Nosrati et al., (2014) et Aidouni et Mesmoudi, (2018) qui ont enregistré des IS de 1.3 à 4 pour les souches d'*Azotobacter* testées.

Les quantités de phosphore produites sur milieu liquide restent tout de même inférieures à celles rapporté par Silini, (2013) et serait la conséquence d'une déficience enzymatique. En effet, la disponibilité des formes solubles du phosphate dans le milieu favorise leur liaison avec les acides organiques libérés formant des complexes organophosphatés difficiles à dégrader par les bactéries (Ilmer et Schinner, 1995).

La synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est le plus efficace, est une faculté très commune chez les bactéries. Environ 80% des bactéries

rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son 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 par la totalité des isolats sélectionnés fixateurs d'azote, sa production est indépendante de la présence ou de l'absence du précurseur dans le milieu de culture. Cependant, son taux est fortement corrélé à la concentration de ce dernier, ainsi l'ajout de 5 g/l de précurseur accroît la production en acide indole-acétique, Le seuil maximal de production de isolat PI A passe de 3.25 µg/ml et Le plus faible Concentrations d'AIA e st enregistré avec l'isolat PI 6 et PI E estimé à 0 .

Selon Barazani et Friedman (1999), les bactéries capables de sécréter un taux supérieur à 13,5 µg/ml de composés indoliques sont considérés comme étant des PGPR. De faibles quantités d'AIA de 10⁻⁹ à 10⁻¹² M sont nécessaires pour la croissance primaire des racines (Patten et Glick, 2002), les taux obtenus sont donc suffisants pour stimuler la croissance végétale.

Des taux similaire de production d'AIA, sont rapportés par Narula et al., (2002), Naz et al. (2012), Esteban Julian Rubio et al. (2013) et Aidouni et Mesmoudi, (2018). La production d'AIA augmente avec l'augmentation des apports en L- tryptophane dans le milieu de 1 à 5 mg/ml (Ahmad et al., 2008b, Vikram, 2011, Ponmurugan et al., 2012 et Silini, 2013). Les résultats obtenus contrastent les travaux réalisés par El-Mahrouk et Belal, (2007) ; Sethi et Adhikary, (2012) et Ponmurugan et al., (2012), qui ont rapporté que la production de l'acide indole-acétique est fortement liée à la présence du L- tryptophane, dans le milieu de culture utilisé, chez les bactéries diazotrophes.

Les taux de production d'ammoniac NH₃ ont varié de 2.33 mg/ml à 6.38 mg/ml. Le taux maximal est observé avec l'isolat **PI C**, **PI E**, **PI 2** et **PI 5** (6.38 mg/ml) suivi de l'isolat **PI A** (6.02 mg/ml) et **PI 7** (4.82 mg/ml) puis **PI 6** (4.56 mg/ml). Pour le reste des isolats, les taux de NH₃ produits ne dépassent pas les 4 mg/m

La production de NH₃, propriété commune des PGPR, est fréquente chez les souches testées (100 %) et elle est comparable à celle rapportée par de nombreux auteurs (Joseph et al., 2007 ; Ahmed et al., 2008 ; Silini, 2013 et Aouane et Hamani, 2017). Chez les bacteries fixatrices d'azote. L'ammoniac fixe est assimilé en glutamate et glutamine. Après la mort bactérienne et la lyse, ces composés sont rejetés dans l'environnement et utilisés comme sources d'azote par d'autres organismes tels que les plantes (Hartono et al., 2016).

du blé dur a différé d'une souche bactérienne à l'autre. Dans l'ensemble, peu d'isolats ont exercé un pouvoir de promotion sur la germination et sur le développement des jeunes plantules.

Tous les isolats ont témoigné d'un très bon pouvoir promoteur de la croissance des tiges et des racines. Ils ont montré que les isolats (**PI 7, PI 2 et PIA**) ont témoigné d'une très bonne activité stimulatrice de la croissance des tiges et des racines.

Cependant, les isolats **PI 1, PI 6, PI F et PI C** ont manifesté une faible activité stimulatrice de la croissance des graines traitées par rapport au témoin.

Les résultats obtenus pour les paramètres de poids de blé dur. Une diminution de la masse des isolats a été observée par les isolats suivants (**PI 6 et PI C**) par rapport au témoin $T=0,06$. Le maximum de poids du blé dur (les racines + les tiges) a été observé par les isolats **PI 7, PIA, PI 2 et PI E** par rapport au témoin.

L'état de santé des plantules est faiblement amélioré sous l'effet des inoculations réalisées, seulement 26,66% des IV obtenus sont nettement supérieurs à l'IV témoin. Ils correspondent aux IV enregistrés sous l'effet des isolats **PIA, PIE, PI2, PI5, PI7**. Le calcul de la valeur (indice de vigueur* poids sec) a révélé l'effet positif de la souche **PI7** sur l'état de santé des plantes.

Ces résultats se concordent avec les travaux publiés par [Silini, \(2013\)](#), qui a observé un effet positif de l'inoculation par des PGPR diazotrophes sur la germination et la longueur des tiges et des racines du blé dur.

L'auteur attribue cet effet aux activités PGP des bactéries. À l'issue des tests réalisés, le candidat présentant un important potentiel de promotion de la croissance des plantes *in vitro* et *in vivo* et répondant aux caractéristiques microscopiques, macroscopiques et biochimiques (type respiratoire, mobilité, catalase et oxydase) des *Azotobacter* est sélectionné pour faire l'objet d'une identification phénotypique.

La composition de milieu de culture influence considérablement sur l'efficacité de solubilisation de phosphate d'où on a pu déterminer la source de carbone et de l'azote appropriée pour une meilleure solubilisation pour chaque isolat.

Un maximum de taux de solubilisation chez les deux isolats a été observé en utilisant le glucose et le sulfate d'ammonium comme source de carbone et d'azote respectivement avec des quantités de phosphore libérées : (75.928 $\mu\text{g/ml}$ et 74.214 $\mu\text{g/ml}$) et (66.071 $\mu\text{g/ml}$ et 61.071 $\mu\text{g/ml}$) pour **PIA** et **PI5** respectivement.

La température influe sur la croissance et la libération des ions ortho phosphates dans le milieu dont la température de 30°C a été considérée comme optimale pour la solubilisation du phosphate avec un taux de 44.142 et 54.571 µg/ml de phosphore libéré par l'isolat **PIA** et **PI 5** respectivement.

le 5^{ème} jour d'incubation a été considéré comme un temps optimal pour la Hui chez les deux isolats **PIA** et **PI5**.

les valeurs maximales de solubilisation de phosphate tricalcique ont été observées après 5 jours d'incubation, avec un taux de solubilisation qui varie de 11.928 à 48 µg/ml de phosphore soluble pour les deux isolats **PIA** et **PI 5**.

La solubilisation du phosphate a été testée avec différents dosages de salinité les quantités de phosphore libérées varient entre 42.428 µg/ml et 80.07 µg/ml pour isolat **PIA** et 44.071 µg/ml et 81.351 µg/ml pour isolat **PI 5** .

La solubilisation du phosphate se produit en absence de l'agitation avec un maximum de solubilisation du phosphate tricalcique avec un taux de 41 et 48.8571 µg/ml de phosphore libéré par l'isolat **PIA** et **PI 5** respectivement

L'identification de la souches **PIA**, **PI5** est faite en se référant à une matrice d'identification élaboré à partir des tableaux d'identification fournis dans Bergey's manual of systematic bacteriology pour le genre *Azotobacter* (Brenner et al., 2005).

Une identification à l'échelle des espèces, est réalisée grâce à l'outil informatique Identax, suite à l'analyse du profile biochimique des souches **PIA** et **PI5**, via cet outil, la souche sont identifiées comme *Azotobacter Armeniacus* (avec un score d'identification de **99.94%**) et *Azotobacter nigricans* (avec un score d'identification de **98,78 %**), respectivement Les scores obtenus sont nettement supérieur au score minimal requis pour une identification réussite (95%).

Conclusion et perspectives

Les bactéries solubilisant le phosphate constituent un groupe de bactéries favorisant la croissance des plantes qui jouent un rôle majeur dans la nutrition des plantes en améliorant la disponibilité du phosphate par la solubilisation des formes inorganiques insolubles.

Ce travail se proposait d'étudier l'effet de l'inoculation d'une variété de blé par des bactéries solubilisant le phosphate isolé du sol de SIDI BELABBES et identifiées comme ayant une multitude d'activités favorisant la croissance des plantes et l'optimisation de leur solubilisation.

Au total, 9 isolats bactériens solubilisant le phosphate ont été purifiées et retenues dont 7 ont été sélectionnées suivant leur activité de solubilisation du phosphate.

Ces isolats ont solubilisé de grande quantités de phosphate allant jusqu'à 48.179 $\mu\text{g/ml}$ de phosphore libéré.

La plupart des isolats bactériens étudiés ont montré un fort potentiel pour produire des substances impliquées dans la promotion de la croissance des plantes tel que l'acide indole acétique (AIA), l'ammoniac (NH_3) et la fixation de l'azote.

L'inoculation des graines de blé dur a engendrés des variations importantes dans les paramètres de germinations (pourcentage, longueur des racines et des tiges et indice de vigueur). Dans l'ensemble, peu d'isolats ont exercé un pouvoir de promotion sur la germination et sur le développement des jeunes plantules.

L'état de santé des plantules est moyennement améliorée sous l'effet des inoculations réalisées, 55.55 % des IV obtenus sont nettement supérieur à l'IV témoin et le calcul de la valeur (indice de vigueur* poids sec) a révélé l'effet positif de la souche **PI 7** sur l'état de santé des plantes.

La composition de milieu de culture influe considérablement sur l'efficacité de solubilisation de phosphate d'où on a pu déterminer la source de carbone et de l'azote approprié pour une meilleure solubilisation pour chaque isolat. Un maximum de taux de solubilisation chez les deux isolats a été observé en utilisant le glucose et le sulfate d'ammonium comme source de carbone et d'azote .

La température influe sur la croissance et la libération des ions ortho phosphates dans le milieu dont la température de 30°C a été considérée comme optimale pour la solubilisation de phosphate chez les deux isolats.

La valeur de pH 5.0 de milieu a amené à une solubilisation maximale de phosphore inorganique par les souches utilisées et le 5^{ème} jour d'incubation a été considéré comme un temps optimal pour la solubilisation chez les deux isolats **PI5** et **PIA**.

La solubilisation du phosphate se produit en absence de l'agitation avec un maximum de solubilisation du phosphate tricalcique.

Enfin, pour augmenter la production agricole il faut l'amélioration de la fertilité du sol par introduire des souches performantes qui peuvent mené à mieux solubiliser les sels minéraux dans le sol , identifier génétiquement les souches performantes afin de créer une banque des souches solubilisant le phosphore BSP .

Utiliser les souches manipulées génétiquement dans la culture afin de progresser et assister à une grande production agricole ainsi qu'avoir des études expérimentales approfondies par leur inoculation in vivo pour déterminer leur efficacité dans l'amélioration de croissance de plantes en vue d'une application industrielle à grande échelle.

Références bibliographiques

- **AHMAD, I., PICHTEL, J., & HAYAT, S.** (2008). *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Weinheim: WILEY -VCH Verlag GmbH &Co.
- **AHMAD F., AHMAD I., KHAN M. S.** (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, 29: 29-34.
- **ANAND, K., KUMARI, B., MALLICK, M. A.** (2016). Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 37-40.
- **ANTOUN H. AND PRÉVOST D.** (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A.Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.
- **ALAM, S., KHALIL, S., AYUB, N., RASHID, M.** (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate-by-phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4, 454-458.
- **AZZAOUI, A., EL MOURID, M., LOUDYI, B., RYAN, J.** (1994). Fertilité et fertilisation potassique au Maroc : Acquis et perspectives d'avenir. *Al Awamia* 83: 241-263.
- **ANONYME,** 2017: définition de rhizosphère, <https://www.aquaportail.com/definition-4683-rhizosphere.html>, consulté le: 17/06/2019.
- **ANTON HARTMANN, MICHAEL ROTHBALLER ET MICHAEL SCHMID,**2008.« Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research », *Plant and Soil*, vol. 312, no 1-2, novembre, p. 7
- **ANTOUN H. AND PRÉVOST D.** (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A.Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.
- **ARORA NK, TEWARI S, SINGH S, LAL N, MAHESHWARI DK .**(2012). PGPR for protection of plant health under saline conditions.
- **ALY, M. M., EL SAYED, H. E. A., JASTANIAH, S. D.** (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. *Journal of American Science*, 8(5), 667-676.
- **AMIR, H. G., SHAMSUDDIN, Z. H., HALIMI, M. S., MARZIAH, M., RAMLAN, M. F.** (2005). Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 36(15-16), 2059-2066.
- **ATLAS, R.M.**(2005). *Handbook of media for environmental microbiology*. 2nd ed. Crc Press. Boca Raton.USA.
- **BADAWI, F. S. F., BIOMY, A. M. M., DESOKY, A. H.** (2011). Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(1), 17-25.

Références bibliographiques

- **BACA B.E. ET ELMERICH C.** (2007). Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C., Newton W.E. (Eds). Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations, Springer, Netherlands. pp. 113-143.
- **BEAUDIN I, GIROUX M, MICHAUD A, BEAUDET B.**, les sources, les formes et la gestion de phosphore en milieu agricole. 2006, 1-16.
- **BEAUDINE I., GIROUX M., MICHAUD A et BEAUDET P.**, 2008 – Les sources, formes et la gestion du phosphore en milieu agricole. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire. EVC 019 fiche technique n° 2. 16p.
- **BAIZE D.**, 2000 - Guide des analyses en pédologie, 2e éd., INRA, Paris. p 280.
- **BOUTON, J.H., A.E. DUDECK ET R.L. SMITH** (1976). Germination in freshly harvested seed of centipede grass. Agron. J., 68: 991-992.
- **BEAUDIN I.**, 2008.Revue de littérature .la mobilité du phosphore version finale.EDCRAAQ, 137p.
- **BHATTACHARYYA, P. N., JHA, D. K.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4), 1327-1350.
- **BRENNER D. J., KRIEG R.N., STALEY J.T.** (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1st ed., Michigan State University publishers.
- **BOTTON B ., BRETTON A., FEVER M ., GAUTIER S ., GUY PH ., LARPENT, J.P ., REYMOND, P.,BOURRELIER P. H., BERTHELIN J.**, (1998). Introduction générale. Dans : Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion (rapport n= 42). Ed Technique & Documentation lavoisier Paris, XXXVII.
- **BOURDON,J.-L.ETMARCHAL,N.** (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edition Doin, Paris.
- **CANADELL, J., JACKSON, RB., EHLERINGER, J.R, MOONEY, H.A., SALA, O.E., SCHULZE, E.D.**,1996. Maximum rooting depth of vegetation types at global scale. Oecologia 108, 583-595.
- **CAPPUCCINO, J.G, SHERMAN, N.** (1992). Biochemical activities of microorganisms. In: Microbiology, A Laboratory Manual. The Benjamin / Cummings Publishing Co. California, USA.
- **CARDON, Z. G., GAGE, D. J.**(2006). Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. Annual review of ecology, evolution, and systematics, 37, 459-488.
- **CLAIRE HORNER DEVINE, M., LEIBOLD, M. A., SMITH, V. H., BOHANNAN, B. J.**(2003).Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. Ecology Letters, 6(7), 613-622.
- **CURTIS, T. P., SLOAN, W. T., SCANNELL, J. W.** (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(16), 10494-10499.

Références bibliographiques

- **CARDON, Z. G., GAGE, D. J.** (2006). Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 37, 459-488.
- **COOK, R. J., THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M., FUJIMOTO, D., MAZZOLA, M., BANGERA, G., KIM, D. S.** (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4197-4201.
- **CORBAZ R.**(1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes.
- **CHEN, Y. P., REKHA, P.D., ARUN, A.B., SHEN, F.T., LAI, W. A., YOUNG, C.C.**(2006).Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.
- **DEMERS I.**, 2008. Forme et disponibilité du phosphore de composts utilisés comme amendements de sols agricoles, pour l'obtention du grade de maître des sciences (M.SE.), laval (Québec), 92p
- **DE SALAMON I.G., HYNES R.K. AND NELSON L.M.** (2005). Role of Cytokinins in plant growth promotion by rhizosphère bacteria. P. 173-195. In Siddiqui A. A. (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*.
- **DUTHIL J.**, 1973 – Eliment d'écologie et d'agronomie. tome III. Ed. J.B. bailliere. Paris. 656p.
- **DOMMERGUES, Y. MANGENOT, F**, 1970. ecologie microbienne du sol .Masson et Cie, 2013. Microbacterium avec l'uranium. Th doctorat : Microbiologie : Université d'AixMarseille,. paris, pp9- 72(796).
- **DELGADO, A., MADRID, A., ANDREU, L., KASSEM, S.** (2001). Effects of organic amendments on the efficiency of applied phosphorus fertilizer. In *I World Congress On Conservation Agriculture Madrid*, 1-5 October, 2001. pp: 343-3347.
- **DELARRAS C.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition TEC& DOC. Lavoisier.
- **DOMMERGUES Y., MANGENOT F.** (1970). *Microbial Ecology of Soil*. Masson and Cie (eds.), Paris. 33-45.
- **ELIARD J.L.**, 1979 – Manuel d'agriculture générale, base de la production végétale. Ed J.B Baillièrè, Paris. 344p.
- **ELAINE R. INGHAM**, (2011). The Soil Food Web. National Ressources Conservation Service.
- **EMILY CLAUDIA RICCI**, 2015. investigating the role of pseudomonas sp. And bacillus sp biofilms as plant growth promoting inoculants. McGill university, montreal. Quebec. Canada.
- **ESPINOSA, L., NORMAN, R., SLATON, N., DANIELS, M.** (2005). The nitrogen and phosphorus cycles in soils. University of Arkansas, Division of Agriculture, 4 p.
- **FAO.** (2004). Utilization des phosphates naturels pour une agriculture durable .

Références bibliographiques

- **FROSSARD E., CONDRON L. M., OBERSON A., SINAJ S., FARDEAU J. C.,** 2000 –Processes Governing Phosphorus Availability in Temperate Soils. *J. Environ. Qual* 29. p15-23.
- **FARDEAU J.C.,** 2005 - Dynamique du phosphore et du potassium dans le système sol-plante. Dans « Fertilisation P-K : raisonner pour agir », ARVALIS Institut du Végétal. Pp 12- 19.
- **FARDEAU J.C., MOREL C ET BONIFACE R.,** 1991 - Cinétiques de transfert des ions phosphate du sol vers la solution du sol : paramètres caractéristiques. *Agronomie* (1991) 11. Pp 787 à 797.
- **FURIHATA, T., SUZUKI, M., AND SAKURAI, H.** (1992). Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiology* 33: 1151-1157.
- **FUENTES-RAMÍREZ L. E., CABALLERO-MELLADO J.** (2006). Bacterial biofertilizers. In: Z.A. Siddiqui (ed). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Netherlands. 143-172.
- **GYANESHWAR, P., KUMAR, G. N., PARE KH, L. J., POOLE, P.S.** (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In: *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*. Adu-Gyamfi, J.J. (Ed.), Springer, Netherlands. pp. 133-143.
- **GLICK, B. R., TODOROVIC, B., CZARNY, J., CHENG, Z., DUAN, J., MCCONKEY, B.** (2007b). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5-6), 227-242
- **GLICK BR.** (2012). *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, Waterloo.
- **GACHON L.,** 1977 – Utilité d'un bon niveau de réserves phosphatées du sol. *Phosphore et agriculture* n° 70. P 27 à 33.
- **GACHON L.,** 1969 – Les méthodes d'application de la fertilité phosphorique des sols. *BAFES* 4, 53. 17 à 31.
- **GERVY R.,** 1970 - les phosphates et l'agriculture. Ed. Dunod. Paris. 298p.
- **GIRI, B.; GIANG, P. H.; KUMARI, R.; PRASAD, R.; VARMA, A .** (2005). "Microbial Diversity in Soils". *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. *Soil Biology*. 3. pp. 37. doi:10.1007/3-540-26609-7_2. ISBN 3-540-22220-0
- **GUPTA G, SINGH PARIHAR S, KUMAR AHIRWAR N, KUMAR SNEHI S ET SINGH V.** (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol*. Volume 7(2), 96 -102.
- **GROS A.,** 1979 – Guide pratique de la fertilisation. Ed maison rustique. Paris. 356p.
- **GLICK, B.R.,** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of Microbiology* 41, 109-117.

Références bibliographiques

- **HAMDALI, H., HAFIDI, M., VIROLLE, M. J., OUHDOUCH, Y.** (2008). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2565-2575.
- **HAYAT, R., ALI, S., AMAR A, U., KHALID, R., AHMED, I.** (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- **HAAS, D; DÉFAGO, G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Natra. Rev. Microb.* 1129.
- **HAYGARTH, P. M., HEPWORTH, L., JARVIS, S. C.** (1998). Forms of phosphorus transfer in hydrological pathways from soil under grazed grassland. *European Journal of Soil Science*, 49(1), 65-72.
- **HOPKINS WG.** (2003). physiologie végétale. Traduction de la 2 édition américaine par SERGE R .Ed de Boeck.pp. 309-362.
- **HAN J, SUN L, DONG X, CAI Z, SUN X, YANG H, WANG Y, SONG W.** (2005). Characterization of a novel plant growth-promotingbacteria strain Delftia tsuruhatensis HR4 both as a diazotrophand a potential biocontrol agent against various plant pathogens.*Syst Appl Microbiol* 28(1):66–76.
- **HELLUY, S., & HOLMES, J.C.**(2005).Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural processes*, 68(3), 205-210.
- **HOEFT, R. G., NAFZIGER, E. D., JOHNSON, R. R., ALDRICH, R.**(2000). Chapter 6 in *Modern Corn and soybean production*. Edt MCSP Publications. pp 107-171.
- **HOLFORD I C R.,** 1997 – Soil phosphorus: its measurment, and it suptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*. Vol 35. Pp 227 à 240
- **HARMAN G. E. AND SHORESH M.**(2007). The Mechanisms and Applications of Symbiotic Opportunistic Plant Symbionts.P131-155. In Vurro M. and Gressel J. (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*.
- **HINSINGER, P.** (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237(2), 173-195.
- **HINSINGER, P.;JAILLARD, B.;ARVIEU, J.C.**1996, INRA, Département de Science du sol; Paris ;Le sol, un patrimoine menacé, le point scientifique http://agritech.tnau.ac.in/org_farm/orgfarm_biofertilizertechnology.html > [consulté le 02.12.2014].
- Le flux de composés carbonés est mesuré par traçage isotopique. Cf(en) Philippe **HINSINGER A.G. BENGOUGH., D. VETTERLEIN, I. M. YOUNG,** , « Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance », *Plant and Soil*, vol. 321, nos 1-2, août 2009, p. 117- 152(DOI10.1007/s11104-008-9885-9).
- **HUSSAIN, M. I., ASGHAR, H. N., ARSHAD, M., SHAHBAZ, M.** (2013). Screening of multi-traits rhizobacteria to improve maize growth under axenic conditions. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23, 514-520.
- **IBEKWE, A. M., PAPIERNIK, S. K., YANG, C. H.** (2010). Influence of soil fumigation by methyl bromide and methyl iodide on rhizosphere and phyllosphere

Références bibliographiques

- microbial community structure. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45(5), 427-436.
- **JOHNSON, A. E.**, (2000). Soil and plant phosphate. Edts International Fertilizer Industry Association. 46p.
 - **JOFFIN, J.N AND LAYERAL,G.**,(2006).Microbiologie technique. Tom 1. Dictionnaire des techniques.Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique, 368.
 - **JOFFIN, N.** (2013). Les techniques de laboratoires utilisées en mycologie,p. 1-20. <http://www.techmicrobio.eu/index.php/microbio/mycologie/laboratoire>.
 - **JOFFIN,J.N., LEYRAL G.**,2005. Microbiologie Technique. Tome 1 Dictionnaire des techniques.Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, 171-189.
 - **JOFFIN, J.N.,&LERYRAL ,G** (2001). Microbiologie. Dictionnaire des Techniques, 3éme ED., Collection biologie Technique .CRDP d'aquitaine , Bordeaux .105p.
 - **KHAN, M. S., ZAIDI, A., AHEMAD, M., OVES, M., WANI, P. A.** (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi–current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98., 1989. Free-living bacteria in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 20, 221-225.
 - **KALDI, R., ZEKRI, S., MAATOUGUI, M.E.H., AND BEN YASSINE, A .** (2002). L'Economie desLégumineuses Alimentaires au Maghreb dans le Monde. Proceedings du 2ème séminaire du réseau REMAFEVE/REMALA, « Le devenir des Légumineuses Alimentaires dans le Maghreb », Hammamet, Tunisie, 100pp.
 - **KENNEDY I. R., CHOUDHURY A. T. M. A., MIHALY KECSKE L .** (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1229-1244.
 - **KENT, N. L.** (1994). Kent's Technology of Cereals 4th edition: An introduction for students of food science and agriculture, Woodhead Publishing, Oxford, UK. 352 p.
 - **KHALID, A., ARSHAD, M., ZAHIR, Z. A.**(2004). Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473-480.
 - **KHALIL, S., SULTAN., T.**(2000). Phosphorus solubilizing microorganisms potential improve P availability from unavailable sources. In: 8th Int Soil Sci Cong, Islamabad.
 - **KHAN, M. S., AHMAD, E., ZAIDI, A., OVES, M.**(2013). Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*, Maheshwari, D.K., Aeron, A., Saraf, M.(Eds.), Springer Berlin Heidelberg. pp. 237-263.
 - **KHAN, M. S., ZAIDI, A., AHEMAD, M., OVES, M., WANI, P. A.** (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi–current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98.
 - **KHAN, M. S., ZAIDI, A., AHMAD, E.** (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms.

Références bibliographiques

- In: Phosphate Solubilizing Microorganisms Khan, M. S., Zaidi, A. (Eds). Springer International Publishing, Switzerland. pp. 31-62.
- **KHAN, M.S., ZAIDI, A., WANI, P.A., OVES, M. ,** 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ. Chem. Lett. 7, 1–19. Kim J, D.C,1994.Rees Nitrogenase and biological nitrogen fixation Biochemistry, 33 (), pp. 389–397.
 - **KONATE I.**(2007). Diversité phénotypique et moléculaire du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des bactéries endophytes qui lui sont associées. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V.
 - **KOUAS, S., LABIDI, N., DEBEZ, A., ABDELLY, C .** (2005). Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. Agronomy for sustainable development, 25(3), 389-393.
 - **KRISHNARAJ, P. U., KHANUJA, S. P. S., SADASHIVAM, K. V.** (1998). Mineral phosphate solubilization (MPS) and mps genes-components in eco-friendly P fertilization. In:Indo US Workshop on Application of Biotechnology for Clean Environment and Energy, National Institute of Advanced Studies, Vol. 27, 14-16 August, Karnataka environment research foundation, Bangalore, India.
 - **KUCEY, R. M. N., JANZEN, H. H., LEGGETT, M. E.** (1989). Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Advances in agronomy, 42, 199-228.
 - **KUMAR, A.**(2010). Development of a liquid biofertilizer with indigenous microbial strains of Himachal Prache. Thèse de doctorat. Chaudhary Sarwan Kumar Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya University. India. 196 p.
 - **KUMAR, A., KUMAR, A., DEVI, S., PATIL, S., P AYAL, C., NEGI, S.** (2012). Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. Recent Research in Science and Technology, 4(1), 1-5.
 - **KUMAR, A., MAURYA, B. R., RAGHUWANSHI, R.** (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(4), 121-128.
 - **KUMAR, K. V., SRIVASTAVA, S., SINGH, N., B EHL, H. M.** (2009). Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. Journal of hazardous materials, 170(1), 51-57.
 - **KUMAR, V., BEHL, R. K., NARULA, N.** (2001). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. Microbiological research, 156(1), 87-93.
 - **KUNC, F., MACURA, J.** (1988). Mechanisms of adaptation and selection of microorganisms in the soil. In: Soil microbial associations Volume 17-1st edition.
 - **KUMAR, S; KAMBOJ, J; SUMAN, S.S.**(2011). Overview for various aspects of the health benefits of *Piper longum* linn fruit. J Acupunct Meridian Stud. 4:134-140.

Références bibliographiques

- **KIRDI, B., ZERMANE, N.**, 2010. Rôle des PGPR dans la stimulation de la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites : *Orobanche crenata* Forsk. et *Cuscuta campestris* Yuncker / Role of PGPR in plant growth promotion and control of the parasitic weeds: *Orobanche crenata* Forsk. and *Cuscuta campestris* Yuncker .
- **KLOEPPER JW, GUTIERREZ-ESTRADA A, MCLNROY JA.** (2007). Photoperiodregulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 53(2):159–167.
- **KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R., ZABLOTOWICZ, R.M.**, 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7, 39-44
- **KUMAR, P., DUBEY, R.C.**, 2012. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Curr. Perspect. Appl. Microbiol.* 1, 6–38.
- **KHAN, M. S., ZAIDI, A., AHMAD, E.** (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: *Phosphate Solubilizing Microorganisms* Khan, M. S., Zaidi, A. (Eds). Springer International Publishing, Switzerland. pp. 31-62.
- **KHAN, M. S., ZAIDI, A., WANI, P. A.** (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- **KLEINMAN, P. J., SHARPLEY, A. N., SAPORITO, L. S., BUDA, A. R., BRYANT, R. B.** (2009). Application of manure to no-till soils: phosphorus losses by sub-surface and surface pathways. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 84(3), 215-227.
- **KOUAS, S., LABIDI, N., DEBEZ, A., ABDELLY, C.** (2005). Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for sustainable development*, 25(3), 389-393.
- **LAMBERT J.C.**, 1979 -La fertilisation phosphatée. *revue cultivars*. N° 115. Pp 96 à 97.
- **LAI, W. A., REKHA, P. D., ARUN, A. B., YOUNG, C. C.** (2008). Effect of mineral fertilizer, pig manure, and *Azospirillum rugosum* on growth and nutrient contents of *Lactuca sativa* L. *Biology and fertility of soils*, 45(2), 155-164.
- **LYNCH, J. M., LEIJ, F.** (2012). *Rhizosphere*. John Wiley & Sons, eLs.UK. 528 p
- **LYNCH, J.M.** 1990. Beneficial interactions between micro-organisms and roots. *Biotech. Adv.* 8r 335-346
- **LEMANCEAU, L.**, 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents 413–437, 414
- **LUGTENBERG B., KAMILOVA F.** (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- **MARTÍNEZ-VIVEROS 1, O., M.A. JORQUERA, D.E. CROWLEY, G. GAJARDO AND M.L. MORA.** (2010). Mechanisms and practical considerations

Références bibliographiques

- Involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293 – 319.
- **MASMOUDI A.**, 1998- Etude expérimentale sur l'efficacité du phosphate naturel de djebel Onk (Tébessa) par rapport au TSP dans la fertilisation des sols au sahara. Mem mag, univ. Batna, 93p.
 - **MASMOUDI A.**, 1999. Etude expérimentale sur l'efficacité du phosphate naturel de djebel ONK , actes du séminaire de ouargla , CRSTRA BOKRA .
 - **MUNEES, A., MULUGETA, K.**, 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. 28 Febr. 2013 1018–3647, 1–20.
 - **MALEK F.**, 2015. interaction microbienne cours assure aux Master II microbiologie et Magistère Maitrise de la qualaté et du développement microbien. Université de Tlemcen. P :17
 - **MOREL C.**, 2002. Caractérisation de la phytodisponibilité du phosphore du sol par la modélisation du transfert des ions phosphates entre le sol et le solution .Thèse d'habilitation INRA Bordeaux 80p.
 - **MOREL C., BUTLER F., CASTILLON P., CHAMPOLIVIER L., DENOROY P., DUVAL R., HANOCQ D., KOUASSI A.S., KVARNSTRÖM E., MESSIGA A., METRAILLE M., RABEHARISOA L., RABOURDIN N., RAYNAL C., SAVOIE T., SINAJ S et ZIADI N.** , 2011 - Gestion à long terme de la dynamique du phosphore dans les sols cultivés. 10èmes rencontres de la fertilisation raisonnée et de l'analyse, COMIFER-GEMAS, Reims, 23-24 novembre 2011. 12 pages.
 - **MENGEL, K.** (1997). Agronomic measures for better utilization of soil and fertilizer phosphates. *European Journal of Agronomy* 7: 221-233.
 - **MEEK, B.D., GRAHAM, L.E., DONOVA, T.J., MAYBERRY, K.S.** . (2001). Phosphorus availability in calcareous soil after high loading rates of animal manure. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 43: 741-744.
 - **NEILANDS, J.B.**, 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.
 - **NAUTIYAL, C. S., BHADAURIA, S., KUMAR, P., LAL, H., MONDAL, R., VERMA, D.** (2000). Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182(2), 291-296.
 - **NAUTIYAL, C. S., GOVINDARAJAN, R., LAVANIA, M., PUSHPANGADAN, P.** (2008). Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting rhizobacteria NRRL B-30488. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4474-4481.
 - **NGUYEN, C., YAN, W., LE TACON, F., LAPIRE, F.** . (1992). Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant Soil*, 143, 193-199.
 - **OLSEN S. R., SOMMERS L.E.** (1982). Phosphorus. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbial Properties*. Page, A.L., Miller, R.H.,

Références bibliographiques

- Keeney, D.R. (Eds.), second ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- **PAL K. K. AND GARDENER B. M.** (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor : 1-25.
 - **PEREDA CAMPOS M.V.**, 2008- Contribution à l'étude des transporteurs de phosphate de la famille PHT1 chez le Peuplier (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) et le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton. Thèse doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy I (France). P 141.
 - **PARMAR, P., SINDHU, S.S.**, 2013. Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. J. Microbiol. Res. 3, 25–31.
 - **PUJIC, P., NORMAND, P.** (2009) La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. Biofuture, 26-29.
 - **PIANO, S; NEYROTTI, V; MIGHELI, Q; GULLINO, M.L.**(1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. Postharvest Biol. Technol. 11(3) :131-140.
 - **PRADHAN, N., SUKLA, L.B.** (2005). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. Afr. J. Biotechnol, 5(10): 850-854.
 - **PIKOVSKAYA R. L.**(1948). Mobilization of phosphorus in soil connection with vital activity of source microbial species. *Microbiologiya* 17: 362-370.
 - **PATTEN CL, GLICK BR** (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795–3801.
 - **PONMURUGAN, P., GOPI, C.** (2006). In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 348-350.
 - **PLASSARD, C., ROBIN, A., LE CADRE, E., MARSDEN, C., TRAP, J., HERRMANN, L. ET AL.**,(2015). Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol?. *Innovations Agronomiques*, 43, 115-138.
 - **QURESHI M. A., AHMAD Z. A., AKHTAR. N., IQBAL A., MUJEEB F. AND SHAKIR M. A.**(2012)Role of phosphate solubilizing bacteria (psb) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(1): 204-210.
 - **ROGERS, J.R., BENNETT, P.C., CHOI, W.J.**, 1998. Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *Am. Mineral.* 83, 15321540.
 - Chauhan, J., Tomar, Y., Indrakumar, S., Seema, A., Debarati, A., 2009. Effect of growth hormones on seed germination and seedling growth of black gram and horse gram. *J Am Sci* 5, 79–84.
 - **REYES, M.E.Q; ROHRBACH, K.G; PAULL, R.E.**(2004). Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2):193-203.

Références bibliographiques

- **RAJAE S., ALIKHAM H. A., RAIESI F.** (2007). Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. *J. Sci. Technol. Agric. Nat. Resources*. 11: 297.
- **RICHARDSON, A.E., BAREA, J. M., MCNEILL, A. M., PRIGENT-COMBARET, C.**(2009).Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 305-339.
- **RODRIGUEZ, H., FRAGA, R.**(1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4), 319-339.
- **SCHEINER J D.**, 2005 -Spéciation du Carbone, de l'azote et du Phosphore de différentes boues de stations d'épuration au cours de leurs incubations contrôlées dans deux types de sol. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, spécialité : Agronomie. 218 p.
- **SALEEM M, ARSHAD M, HUSSAIN S, BHATTI AS.** (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34(10):635–64.
- **SOMERS E., VANDERLEYDEN J., SRINIVASAN M.** (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade Veneta our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 205 - 240.
- **SCHVARTZ C ; MULER J et DECROUX J,** 2005 – Guide de la fertilisation raisonnée ; grandes cultures et prairies. Ed. France agricole, Paris. P 125
- **SHARPLY, A.N.** (1985). Phosphorus cycling in unfertilized and fertilized agricultural soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 49: 905-911.
- **SPRENT, J. I.** (2001). Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens Kew, London, UK. p. 113.
- **SMITH, S. E., READ, D. J.** (2010). Mycorrhizal symbiosis. Academic press, Elsevier Ltd. New York, USA, 508 p.
- **SHARMA, S. B., SAYYED, R. Z., TRIVEDI, M. H., GOBI, T. A.** (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587-597.
- **SAHARAN B. S., NEHRA V.** (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*. 21.
- **SINGH, R. P., JHA, P. N.** (2016). The Multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS one*, 11(6), e0155026.
- **SCHROTH MN, HANCOCK JG** ,1981. Selected topics in biological control. *Annu Rev Microbiol* 34, 453-476 Schroth MN, Hancock JG ,1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* 216, 1376-1381.
- **TARAFDAR, J.C., RAO, A.V.** (1996). Contribution of *Aspergillus* strains to acquisition of phosphorus by wheat (*Triticum aestivum* L.) and chick pea (*Cicer arietinum* L.) grown in a loamy sand soil. *Applied Soil Ecology* 3 (2):109-114.
- **T.R. TURNER, E.K. JAMES, P.S. POOLE,** « The plant microbiome », *Genome Biology*, vol. 14, no 6, 2013 ,p .209 (DOI 10.1186/gb-2013-14-6-209)

Références bibliographiques

- **TARIQ M, HAMEED S, YASMEEN T, ZAHID M, ET AL.** (2014) Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) *World J Microbiol Biotechnol* 30: 719-725.
- **VAN LOON, L.C.** (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J.Plant Pathol.* 119: 243-254.
- **VESSEY, J. K.** (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- **VIRUEL, E., LUCCA, M. E., SIÑERIZ, F.** (2011). Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of microbiology*, 193(7), 489-496.
- **VOISARD, C., KEEL, C., HAAS, D., DÈFAGO, G.** (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal*, 8(2), 351.
- **WALKER-SIMMONS, M., SESING, J.**(1990). Temperature effects on embryonic ABA levels during development of wheat grain dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9, 51-56.
- **WHITELAW, M. A .** (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99 -151.
- **WHIPPS, J. M.**(2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl 1), 487-511.
- **WILLIAM ARMSTRONG, ROLAND BRÄNDLE, MICHAEL B. JACKSON,**« Mechanisms of Flood Tolerance in Plants », *Acta botanica Neerlandica*, vol. 43, no 4, 1994 ,p .307-358 (DOI 10.1111/j.1438-8677.1994.tb00756.x).
- **WEYENS N., MONCHY S., VANGRON SVELD J., TAGHARI. AND LELIE D. V.** (2010). *Plant- Microbe Partnerships* (ed.), *Hand booh of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. 547-257.
- **YAZDANI, M., BAHMANYAR, M. A., PIRDASHTI, H., ESMAILI, M. A.** (2009). Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). *Proc World Acad Sci Eng Technol*, 37, 90 -92.
- **ZAIDI, A., KHAN, M., AHEMAD, M., OVES, M.** (2009b). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica and immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.

Annexe 1

Composition des Milieux de culture :

1. Eau péptonée g/l:

Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau	1000ml

2. Pikovskaya Agar g/l :

- o Composition en g/l d'eau distillée est :

Extrait de levure	0.50g
Glucose	10g
Tri calcium phosphate	5g
Sulfate d'ammonium	0.50g
Chloride de potassium	0.20g
Sulfate de magnésium	0.10g
Sulfate de manganèse	0.0001g
Sulfate de fer	0.0001g
Agar	15g
Eau distillée q.s.p	1000ml

PH = 7.2 ± 0.2 à 25°C

3. Milieu VF (Viande-Foie) g/l:

Base viande foie	30,0g
Glucose	2,0g
Agar	6,0g
Eau distillée qsp	1000ml

pH = 7,0

4. Milieu luria-bertani (LB) g/l

Tryptone	10g
Na Cl	10g
Extrait de levure	5g

5. Milieu luria-bertani dilué au 1/10ème :

Tryptone	1g
Na Cl	1g
Extrait de levure	<u>0.5g</u>
Agar	15g

pH=7

6. Milieu mannitol mobilité :

Hydrolysate tryptique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1,0 g

Références bibliographiques

Agar	3,5 g
Eau distillée q.s.p	1000ml
pH = 7,6	

7. Milieu Ashby g/l:

- Composition en g/l d'eau distillée est :

Mannitol	20g
K ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
Na Cl	0.2g
K ₂ SO ₄	0.1g
CaCO ₃	5g
Agar	15g
Eau distillée q.s.p	1000ml

8. Bouillon Azotobacter :

K ₂ HPO ₄	1.0g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
Na Cl	0.2g
FeSO ₄	0.005g
Solution de sol	100ml
Eau distillée q.s.p	1000ml
pH = 7.0	

Stérilisation des milieux de culture a été réalisée par autoclavage à 120°C/20 min

Annexe 2

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

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