

**REPUBLIQUE ALGERIENNE**  
**DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**  
**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



UNIVERSITE DJILLALI LIABES  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

# **MÉMOIRE DE MASTER**

**SPECIALITE :SCIENCE BIOTECHNOLOGIQUE**

**Option: Biotechnologie Microbienne**

## **Thème**

**Isolement, Identification et caractérisation des souches**  
***Bacillus* PGPR et leurs effets sur le blé dur.**  
**(*Triticum Durum*).**

**Présenté par :**

**M<sup>r</sup> : SAIL ABDESLEM**

**M<sup>r</sup> : SAADOUNI MOHAMED**

**depose le : / /2020**

**Devant le jury :**

***Président : Dr BENINE A. Maître de conférences A (UDL de Sidi Bel Abbès).***

***Examineurs : Dr. KHALDI A. Maître de conférences B (UDL de Sidi Bel Abbès).***

***Encadreur : Dr. GHALM M. Maître Assistant B (UDL de Sidi Bel Abbès).***

**Année universitaire 2019-2020**



## Remerciements :

**Nous** Remercions الله (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** Maître assistant à l'UDL de Sidi Bel Abbes, pour l'encadrement de ce travail aussi pour ses 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 **M<sup>me</sup> KHALDI A** Maître de conférences B. pour leurs encouragements et pour l'intérêt qu'ils nous ont porté à ce travail.

Nous remercieront très chaleureusement tous nos enseignants de biotechnologie microbienne.



# Dédicaces:

*A mon très cher **père***

*Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal.*

*A ma très chère **mère***

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie*

*A mes **frères***

*Abderahmen, Billel, walid et youcef et ma très chère sœur **Zineb** que j'aime tant Pour leur petit mot et leur soutien*

*A tous la promo biotechnologie microbienne que j'aime tant un par un .*

***ABDSLLEM***



## Dédicaces:

*A mon très cher **Père***

*Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie Je t'aime tellement ...*

*A ma très chère **mère***

*Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie tu m'a toujours soutenue*

*A mon binôme **Abdslem** pour tous les souvenirs pendant les années d'études ensemble surtout les deux dernières années tu a une place dans mon cœur.*

*A toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu et encouragé, je vous remercie.*

*A tous ceux que j'apprécie énormément, et qui contribuent à nous rendre la vie plus agréable. Merci*

*Je dédie ce travail également à tous les étudiants de ma promotion.*

*Mohamed*

## Résumé

L'étude des interactions entre les bactéries de genre *Bacillus* et leurs plantes hôtes constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur. En effet, leur utilisation, rentre dans le contexte de la stimulation de la croissance et des défenses naturelles des plantes, dont la finalité est de réduire l'application des produits phytosanitaires au champ.

Dans le présent travail, les auteurs des travaux analysés rapportent l'abondance des *Bacillus* PGPR dans les sols Algériens (nombre d'isolats variant de 15 à 40), ces bactéries sont isolées partout dans le pays (l'Est le Sud-Est et l'Ouest du pays : SETIF, BOU-SAADA et DJELFA, AIN TEMOUCHENT, SIDI BEL ABBES)

De nombreuses activités biologiques telles que la solubilisation des phosphates, la fixation de l'azote, la production de l'AIA et de l'H<sub>2</sub>CN et l'activité antifongique vis-à-vis de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* sont mises en évidence in vitro chez les souches isolées.

La majorité des souches isolées ont manifesté une activité antifongique variable et très importante vis-à-vis des souches fongiques testées. Par ailleurs, la majorité des souches sont fixatrices d'azote et ont montré une excellente solubilisation du phosphate. Les souches isolées se manifestent capables de produire de l'acide indole acétique à partir du L-tryptophane, avec des taux très appréciables.

Les résultats obtenus par les auteurs des travaux analysés suggèrent la capacité des souches à améliorer les rendements des cultures auxquelles elles sont appliquées.

**Mots clés :** *Bacillus*, PGPR, blé dur, germination, activité antifongique.

The study of the interactions between bacteria of the genus *Bacillus* and their host plants is currently a major challenge. Indeed, their use falls within the context of stimulating the growth and natural defenses of plants, the purpose of which is to reduce the application of phytosanitary products in the field.

In the present study, the authors of the analyzed works report the abundance of *Bacillus* PGPR in Algerian soils (number of isolates varying from 15 to 40), these bacteria are isolated everywhere in the country (East, South-East and West of the country: SETIF, BOU-SAADA and DJELFA, AIN TEMOUCHENT, SIDI BEL ABBES)

Numerous biological activities such as phosphate solubilization, nitrogen fixation, AIA and HCN production and antifungal activity (against *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*) are in vitro demonstrated by the isolated strains.

The strains showed variable and very significant antifungal activity with respect to the fungal strains tested. Furthermore, the majority of strains are nitrogen fixing and have shown excellent phosphate solubilization. The strains are shown to be able to produce indole acetic acid from L-tryptophan at very appreciable levels.

The results obtained by the authors of the studies analyzed suggest the ability of strains to improve the yields of the crops to which they are applied.

**Key words:** *Bacillus*, PGPR, durum wheat, , antifungal activity, germination.

## الملخص

تمثل دراسة التفاعلات بين البكتيريا من جنس العصوية والنباتات المضيفة حاليًا تحديًا كبيرًا. يندرج استخدام هذه البكتيريات في سياق تحفيز النمو والدفاعات الطبيعية للنباتات، والغرض منها هو الحد من تطبيق منتجات الصحة النباتية في هذا المجال.

في هذا العمل، يشير مؤلفو الأعمال التي تم تحليلها إلى وفرة *Bacillus* PGPR في التربة الجزائرية (يتراوح عدد العزلات من 15 إلى 40)، حيث تم عزل هذه البكتيريا في كامل تراب البلاد (شرق وجنوب شرق و غرب البلاد: سطيف ، بوسعادة ، جلفة ، عين تيموشنت ، سيدي بلعباس)

مخبريا أبدت السلالات المعزولة قدرتها على إذابة الفوسفات، تثبتت النيتروجين، إنتاج IAA و HCN تثبيط الفطريات مثل *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*

أظهرت غالبية السلالات المعزولة نشاطًا مضادًا فعالًا جدًا فيما يتعلق بالسلالات الفطرية المختبرة. علاوة على ذلك، فإن غالبية السلالات مثبتة للنيتروجين وقد أظهرت نوبًا ممتازًا للفوسفات. كما ثبت أن السلالات المعزولة قادرة على إنتاج حمض الأسيتيك الإندول من L-tryptophan بمستويات ملحوظة للغاية.

تشير النتائج التي حصل عليها مؤلفو الدراسات التي تم تحليلها إلى قدرة السلالات على تحسين غلات المحاصيل التي يتم تطبيقها عليها.

الكلمات المفتاحية :

، سلالة *Résosphère* ، PGPR ، *Bacillus* القمح الصلب ،

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

<b>%</b>	pourcent.
<b>°C</b>	Degré Celsius.
<b>µl</b>	Microlitre.
<b>µl</b>	Microlitre.
<b>µm</b>	Micromètre.
<b>ACC</b>	Acide-1 aminocyclopropane carboxylate.
<b>ACC</b>	Désaminase :(1 aminocyclopropane 1-carboxylase).
<b>ADN<sub>r</sub></b>	Acide desoxyribonucleique recombinant.
<b>ADN<sub>r</sub></b>	Adenosine di –nucleotide ribosomal.
<b>AIA</b>	Acide indole acétique.
<b>Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	Phosphate tricalcique.
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de calcium.
<b>cm</b>	Centimètre.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone.
<b>DAP</b>	Di azotophosphate.
<b>DGGE</b>	PCR-denaturent gradient gel electrophoresis.
<b>Do</b>	Densité optique.
<b>Fe</b>	Fer.
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de fer.
<b>g</b>	Gramme.
<b>g/l</b>	Gramme par litre.
<b>GN</b>	Gélose nutritive
<b>h</b>	Heure .
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Dissulfur d'hydrogène.
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Acide sulfurique.
<b>HCN</b>	Acide cyanhydrique.
<b>HPO<sub>4</sub> .<sub>2</sub></b>	Phosphate mono basique.
<b>INRAA</b>	Institut national de recherche agronomique D'Algérie.
<b>IS</b>	Indice de solubilisation.
<b>ISR</b>	Résistance systémique induite.
<b>ISR</b>	Induced system resistance.

<b>ITGC</b>	Institut technique des grandes cultures.
<b>IV</b>	Indice de vigueur.
<b>Kg</b>	kilogramme.
<b>l</b>	Litre.
<b>m</b>	Mètre.
<b>mg</b>	Milligramme.
<b>min</b>	Minute.
<b>ml</b>	Millilitre.
<b>mm</b>	Millimètre.
<b>N</b>	Azote.
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium.
<b>No</b>	Numéro.
<b>NPK</b>	Azotes phosphate potassium
<b>P</b>	Phosphore.
<b>PBH</b>	Poly - $\beta$ -hydroxy butyrates.
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar.
<b>PGPR</b>	Plants Growth Promoting Rhizobacteria.
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène.
<b>PK</b>	Phosphate potassium.
<b>Q<sub>s</sub>/ha</b>	Quintaux par hectar.
<b>rpm</b>	Rotation par minute.
<b>T</b>	Tonnes.
<b>V</b>	Volume.
<b>VF</b>	Viande foie.
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramme.

## *LISTE DES TABLEAUX*

<b>Tableau 1</b> : Critères de notation des principaux stades de développement de blé.....	7
<b>Tableau 2</b> : Substances favorisant la croissance libérées par PGPR.....	14
<b>Tableau 3</b> : Site, plante hôte et nombre isolats retenus par les auteurs des travaux à analyser. ....	31
<b>Tableau 4</b> : Analyse des résultats du test de solubilisation de phosphore pour les trois auteurs. ....	35
<b>Tableau 5</b> : Analyse des résultats du test de production d'AIA pour les trois auteurs.....	37
<b>Tableau 6</b> : Analyse des résultats du test de fixation d'azote pour les trois auteurs.....	38
<b>Tableau 7</b> : Analyse des résultats pour le test d'activité antifongique.....	39
<b>Tableau 8</b> : Analyse des résultats pour le test de production de HCN.....	41
<b>Tableau 9</b> : Analyse des résultats pour le test d'activité antifongique.....	42

# *LISTE DES FIGURES*

<b>Figure 1</b> : photo descriptive d'épillet et fleur de blé.....	6
<b>Figure 2</b> : représentation schématique de la rhizosphère .....	9
<b>Figure 3</b> : : présentation schématique des organismes du sol .....	11
<b>Figure 4</b> : Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère.....	13
<b>Figure 5</b> : Aspect macroscopique des cultures des souches fongiques sur milieu de culture PDA.....	22
<b>Figure 6</b> : Localisation du site d'échantillonnage. ....	23
<b>Figure 7</b> : Aspect macroscopique des souches.....	31
<b>Figure 8</b> : Aspect microscopique des souches isolées.....	32
<b>Figure 9</b> : Aspect et position des spores produit par les souches.....	32
<b>Figure 10</b> : Solubilisation du tricalcuim phosphate par la souche GN 2 sur milieu Pikovskaya.....	34
<b>Figure 11</b> : Production de l'acide indole acétique chez les souches inoculées sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence de (5g/l) de Ltryptophane.....	36
<b>Figure 12</b> : Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique.....	36
<b>Figure 13</b> : Aspect des résultats du test de fixation de l'azote.....	38
<b>Figure 14</b> : Exemple des résultats obtenus lors du test de l'activité antifongique Cherif, 2014 (B) ; Hassani et Hassani, 2017 (A) et Bouras, 2018 (C).....	40

# Sommaire

	page
INTRODUCTION .....	1

## Chapitre 1:

### Revue Bibliographique

1 Le blé dur .....	3
1.1 Historique .....	3
1.2 Importance stratégique et économique du blé .....	4
1.3 Caractère botanique .....	4
1.3.1 Morphologie.....	4
1.3.1.1 Appareil racinaire .....	5
1.3.1.2 Tige et feuilles.....	5
1.3.1.3 L'épi.....	5
1.3.1.4 Le grain.....	5
1.4 Critère de notation des stades.....	6
2 La rhizosphère .....	8
2.1 Définition de la rhizosphère .....	8
2.2 Rôle de la rhizosphère.....	9
2.3 Facteurs déterminant la richesse et l'activité de la rhizosphère .....	10
2.4 La faune et la flore de la rhizosphère .....	10
2.4.1 La faune de la rhizosphère.....	11
2.4.1.1 Sa composition .....	11
2.4.1.2 Son rôle .....	11

3	Rhizobacteries stimulatrices de la croissance végétale.....	12
3.1	Effet directe des PGPR sur la plante .....	14
3.1.1	Acquisition des ressources .....	14
3.1.1.1	Fixation d'azote.....	14
3.1.1.2	Solubilisation du phosphate .....	15
3.1.1.3	Solubilisation du potassium.....	15
3.1.2	Production des sidérophores.....	16
3.1.3	Production des phytohormones .....	16
3.2	Effet indirect des PGPR sur les plantes.....	16
3.2.1	Productions des antibiotiques :.....	16
3.2.2	Induction d'un système de résistance (ISR).....	17
3.3	Formation des biofilms par les PGPR .....	18
4	Le genre Bacillus.....	18
4.1	Morphologie, phénotype et environnement.....	19
4.2	Utilisation des Bacillus .....	20

## *Chapitre 2:*

# *Matériels et Méthodes*

1.	Objectif.....	22
2.	Matériel .....	22
2.1.	Isolats bactériens et souche fongique.....	22
2.2.	Matériel végétal.....	23
3.	Isolement du genre de Bacillus .....	23
4.	Conservation des isolats .....	23
5.	Identification préliminaire du genre Bacillus.....	24

5.1 Etude morphologique .....	24
5.2 Coloration de Gram .....	24
5.4. Revelation de l'oxydase .....	25
5.5 Test Mannitol mobilité .....	25
5.6 Coloration des spores au vert de malachite .....	25
5.7. Détermination du type respiratoire .....	26
5.8. L'identification de l'espèce par la galerie API 20 E/50 CH .....	26
6. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance .....	27
6.1. Screening des souches, isolées sélectionnées solubilisant le phosphate ..	27
6.2. Screening des souches, isolées sélectionnées productrices de l'acide indole acétique .....	27
6.3. Screening des souches pour la fixation d'azote .....	27
6.4. Activité anti fongique .....	28
6.5. Screening des souches isolées, sélectionnées productrice de l'acide cyanhydrique HCN .....	28
6.6. Screening des souches pour la production des protéases .....	29
7. Effet des isolats sur la germination des graines de blé dur .....	29

## *Chapitre 3:*

# *Résultats et discussion*

1. Isolement, purification et caractérisation des bactéries du genre Bacillus .....	30
1.1. L'identification des souches .....	32

2. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance .....	33
2.1. Screening des souches pour la solubilisation du phosphate inorganique .	33
2.2. Screening des souches pour la production d'acide indole acétique .....	35
2.3. Screening des souches pour la fixation d'azote.....	37
2.4. Activité anti fongique .....	39
2.5. Screening des souches pour la production d'acide cyanhydrique HCN...	41
3. Effet des Bacillus sur la germination des graines de blé dur .....	42

## *Chapitre 4:*

# *Conclusion & perspectives*

conclusion.....	45
Référence bibliographique.....	47
Annexe .....	60

# *Introduction*

---

## INTRODUCTION

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins, en Algérie la filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale (**Djarmoun, 2009**).

Le blé dur est l'un des céréales les plus importantes en Algérie. Sa production nationale ne répond pas aux besoins de la population et son rendement est influencé par une multitude de facteurs biotiques (les phytopathogènes, organismes symbiotiques) et abiotiques (salinité, matière, organique, pH, Humidité etc.). Ces derniers n'affectent pas uniquement les plantes, mais également la communauté microbienne entourant ses racines.

Les racines des plantes sont entourées d'une mince pellicule de sol appelée rhizosphère, qui représente le principal lieu d'absorption des nutriments, et est également le lieu d'importantes activités physiologiques, chimiques et biologiques. Les bactéries sont les microbes les plus abondants présents dans la rhizosphère. Les espèces de *Bacillus* sont capables de former des spores de longue durée et tolérantes au stress et de sécréter des métabolites qui stimulent la croissance des plantes et empêchent l'infection par des agents pathogènes (**Radhakrishan et al., 2017**).

Les microorganismes du sol peuvent être bénéfiques en affectant positivement la qualité du sol et la croissance des plantes, ou pathogènes et responsables de maladies à effets dévastateurs (**Bonkowski et al., 2009**). La diversité des communautés bactériennes rhizosphériques est influencée à la fois par le sol, sa composition, ses caractères physicochimiques, ainsi que par les exsudats racinaires produites par les plantes (**Marschner et al., 2001**). Parmi cette grande diversité bactérienne, un groupe de bactéries communément appelé PGPR, de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria », est capable de coloniser les racines des plantes et d'apporter un effet positif à leur croissance (**Kang et al., 2012**).

Le PGPR présente une interaction significative avec les racines des plantes et a des effets positifs directs et indirects sur la croissance des plantes et la réduction des stress biotiques et abiotiques. La croissance des plantes est renforcée par l'induction d'une résistance systémique, d'une antibiose, d'une suppression compétitive et d'autres mécanismes (**Tripathi et al., 2012**).

Les PGPR améliorent la disponibilité de certains nutriments par la fixation de l'azote atmosphérique ou à travers la solubilisation du phosphate. Ils synthétisent des phytohormones (AIA, cytokinines ...), modulent le développement des plantes à travers la production d'enzymes et facilitent la mise en place ou le fonctionnement des symbioses mutualistes entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote et l'antagonisme avec les pathogènes (**Kennedy *et al.*, 2006 ; Baca et Elmerich, 2007 ; Ficher *et al.*, 2007 ; Sharma, 2011 ; Kang *et al.*, 2012**).

L'objectif du présent travail sera de cibler des PGPR du genre *Bacillus* à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur, de sélectionner les traits à fort pouvoir de promotion de la croissance végétative et antagoniste contre les champignons phytopathogènes qui attaquent les cultures du blé dur, afin de formaliser des inoculums qui seront appliqués sur les graines du blé dur dans le but d'améliorer la germination, la croissance et la protection de cette plante.

# *Chapitre 1*

---

*Revue*

---

*Bibliographique*

---

# 1 Le blé dur

## 1.1 Historique

Les premières cultures furent à l'origine de bouleversements majeurs pour les sociétés humaines. En effet, l'homme sachant désormais produire sa propre nourriture, sa survie devenait moins dépendante de son environnement. L'agriculture marque aussi le début du commerce (Bonjean et Picard, 1999).

Dans un premier temps, le blé semble avoir été consommé cru puis grillé ou cuit sous forme de bouillie puis de galettes sèches élaborées à partir des grains simplement broyés entre deux pierres. Le blé s'impose par la suite comme l'aliment essentiel de la civilisation occidentale. Il se présente sous forme d'aliments variés, le pain, la semoule, les pâtes, les biscuits... (Bonjean et Picard, 1999).

La culture du blé est beaucoup moins difficile que celle du riz: elle ne demande pas d'aménagement spécial du champ ni un trop lourd travail d'entretien. Entre la période des labourssemilles et celle de la moisson, les travaux sont plutôt réduits. Après la récolte, le blé, à la différence du riz, ne demande pas d'opération spéciale comme le décorticage. Les pays reposant fortement sur la culture du blé comptent moins de travailleurs que les régions du maïs et du riz (Bonjean et Picard, 1999).

Ainsi, au Moyen Âge, les fermiers des campagnes à blé européennes utilisaient la charrue à roue et le cheval. Les pays à seigle en restaient à l'araire et aux bovins. Le semoir mécanique et la moissonneuse-batteuse ont été mis au point dans les régions à blé d'Europe et d'Amérique du Nord. Le blé est également le premier à bénéficier de l'usage des amendements (comme dans l'est de la France) et des engrais chimiques. Pendant plusieurs millénaires, le blé n'est cultivé qu'en faibles quantités et avec de très bas rendements. Au cours du XXe siècle, les progrès de la technologie permirent d'augmenter formidablement la production céréalière (Bonjean et Picard, 1999).

À partir de la seconde moitié du XIXe siècle, l'agriculture s'est mécanisée et rationalisée. Les machines agricoles, tirées au départ par des chevaux, puis par des machines à vapeur et enfin par des engins à moteur, se sont multipliées, en particulier dans les pays développés. Depuis 1950, les récoltes de blé s'effectuent avec des moissonneuses-batteuses qui coupent et battent les céréales en une seule opération. De même, des engins agricoles spécialisés existent pour le labourage et les semis (Bonjean et Picard, 1999).

À partir de la seconde moitié du XIXe siècle, l'agriculture s'est mécanisée et rationalisée. Les machines agricoles, tirées au départ par des chevaux, puis par des machines à vapeur et enfin par des engins à moteur, se sont multipliées, en particulier dans les pays développés. Depuis 1950, les récoltes de blé s'effectuent avec des moissonneuses-batteuses qui coupent et battent les céréales en une seule opération. De même, des engins agricoles spécialisés existent pour le labourage et les semis (**Bonjean et Picard, 1999**).

La culture du blé est longtemps restée confinée au bassin méditerranéen et à l'Europe. En Europe, à la fin du XIXe siècle, la culture du blé commence par reculer, en raison de la généralisation de l'économie urbaine, du développement des moyens de transport et les moindres coûts de production en outre-mer. Cependant la culture du blé reprend son essor au cours du XXe siècle grâce aux progrès de la mécanisation, à la sélection de nouvelles variétés productrices et au développement de l'usage de fertilisants (**Bonjean et Picard, 1999**).

## 1.2 Importance stratégique et économique du blé

Les blés constituent la première ressource en alimentation humaine, et la principale source de protéines. Ils fournissent également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et de multiple application industrielle. La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95 % sont produits par les principales cultures céréaliennes (**Bonjean et Picard, 1999**).

La production mondiale de blé se montre à environ 580 millions de tonnes et occupe 215 millions d'hectares (**I.T.C.F, 2002**).

Le blé dur représente environ 8% des superficies cultivées en blés dans le monde dont 70 % sont localisées en conditions méditerranéennes. La Turquie, la Syrie, la Grèce, l'Italie, l'Espagne, et les pays d'Afrique nord, sont en effet, parmi les principaux producteurs (**Gate, 1995**).

Le blé dur occupe une place centrale dans l'économie algérienne. Il couvre 1.5x10<sup>6</sup> ha sur les 3.0x10<sup>6</sup> ha consacrés à la céréaliculture. Le rendement est faible et irrégulier, il est de l'ordre de 8q/ha. La production couvre près de 41 % des besoins (**Gate, 1995**).

## 1.3 Caractère botanique

### 1.3.1 Morphologie

Le blé se présente d'abord comme une plante herbacée à feuilles assez larges, dont la forme peut être caractérisée par les détails suivant : à l'endroit où le limbe se

détache de la tige, au sommet de la partie engainante de la feuille, on trouve deux stipules finement poilus ne ceinturant pas totalement la tige et une ligule transparente, courte et assez importante, appliquée sur tige (**Jaques et Clément, 2003**).

### **1.3.1.1 Appareil racinaire**

Si on déterre avec soin une plante de blé adulte, ou mieux, si on la cultive dans une caisse grillagée, on peut observer la position et la répartition du système racinaire.

Il est très facile de constituer une caisse profonde de 80 cm environ à cotés mobiles, dans laquelle des grillages (type grillage de clapier) maintiennent les racines en place. Pour évacuer la terre sans détruire les racines, on ôte les côtés de la caisse et on lave au jet d'eau pas trop brutal, ce qui permet d'observer l'appareil racinaire complet et en place (**Jaques et Clément, 2003**).

### **1.3.1.2 Tige et feuilles**

La tige elle - même ou chaume s'allonge considérablement à la montaison, et porte 7 ou 8 feuilles rubanées, engainantes sur toute la longueur d'un entre-nœud, prenant naissance sur le nœud situé en dessous de celui au niveau duquel elles se détachent de la tige.

Les feuilles ont des nervures parallèles et sont terminées en pointe (**Jaques et Clément, 2003**).

### **1.3.1.3 L'épi**

Il est issu du bourgeon terminal du plateau de tallage. Dès la fin du tallage il commence à s'élever dans la tige, à mesure que celle-ci s'allonge, ce qui constitue la montaison.

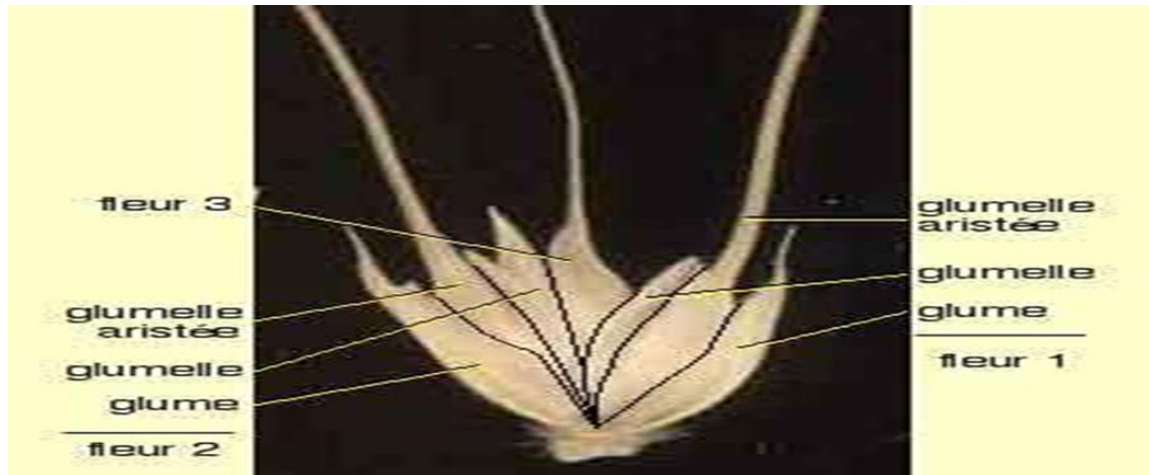
Lorsque le développement de la tige est terminé, l'épi apparaît enveloppé dans la dernière feuille, et après quelques jours on peut étudier sa structure en détail, C'est l'épiaison (**Jaques et Clément, 2003**).

### **1.3.1.4 Le grain**

Depuis la fécondation des fleurs, les grains de blé se sont formés; ils ont grossi peu à peu et mûri au soleil. Chaque épi en porte de 45 à 60 environ. La taille du grain de blé est d'environ 6 mm, sa couleur varie du jaune pâle à l'ocre roux, selon la variété du blé. Sa forme rappelle celle d'un petit oeuf, marqué toutefois sur toute sa longueur

par une légère fente: le sillon où se trouve le faisceau nourricier du grain. Une fine brosse de poils est attachée à son extrémité la plus arrondie (**Belaid, 2000**).

Quand les grains de blé sont mûrs, vient le temps de la moisson. Autrefois, on moissonnait à la faux et on battait sur l'aire, avec des fléaux, pour séparer les grains de la paille. Le van, sorte de grande corbeille plate en osier, permettait de ne garder que les grains sans la batte qui les entoure et sans les débris de paille (**Belaid, 2000**).



**Figure 1** : photo descriptive d'épillet et fleur de blé. (**Hacini, 2014**)

## 1.4 Critère de notation des stades

Selon (**Boulal et al., 2007**), les critères de notation des stades de développement du blé sont représentés dans le tableau n° 01.

**Tableau n°01** : Critères de notation des principaux stades de développement de blé

<b>Stades de développement</b>	<b>Critères de notation des dates d'apparition des stades</b>
Levée	90 % des plantes ont leur première feuille émergée du sol.
Début tallage	50 % des plantes ont leur première feuille visible à l'aisselle de la première feuille.
Début montaison	Apparition du premier nœud sur 50 % des plantes.
Gonflement	50 % des gaines de la dernière feuille sont en état de gonflement.
Début épiaison	50 % des épis sont à moitié sortis de la gaine de la dernière feuille.
Début floraison	50 % des épis présentent des étamines sur plus de la moitié des épillets.
Grain laiteux	50 % des épis présentent des gaines qui en s'écrasant laisse apparaître un liquide.
Grain pâteux	50 % épis présentent des grains à l'état pâteux.
Maturité physiologique	90 % des épis ont des grains durs qui se cassent difficilement entre les dents.

## 2 La rhizosphère

### 2.1 Définition de la rhizosphère

Le concept de rhizosphère a été développé par le microbiologiste visionnaire Hiltner dès 1904 (**Khakipour et al., 2008**). « rhizo » vient du grec « rhiza » signifiant racine, « sphère » vient du latin « sphaera » signifiant balle, ballon ou globe. La sphère définit le champ d'influence du système racinaire (**Philippe, 2010**). Le terme rhizosphère désigne la mince couche du sol qui entoure les racines absorbantes et dont la composition est profondément modifiée par l'activité et le métabolisme de la racine. Elle diffère de la masse du sol par son pH, son potentiel d'oxydoréduction, par l'abondance et la composition de la matière organique et enfin par sa forte activité biologique qui se traduit par une teneur élevée en CO<sub>2</sub>. Ainsi, malgré le petit volume qu'occupe la rhizosphère dans le sol, elle joue un rôle central dans le maintien du système sol-plante (**Mouas Bourbia, 2012**).

Le volume de la rhizosphère est variable selon le développement racinaire : il représente entre 0,1 et 1% du sol global des écosystèmes forestiers et près de 100% des premiers centimètres des sols prairiaux.

La rhizosphère peut être divisée en trois zones distinctes (**Figure 2**) :

**L'endorhizosphère** (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'ectorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (**Schroder, 2003**). Certaines bactéries vivent au contact direct de la racine, voire même pénètrent dans les tissus rhizodermiques et corticaux, sans pour autant être parasites ou prédatrices. Ceci souligne le fait que l'interface entre la racine et la microflore s'étend à l'intérieur de la racine (**Schroder, 2003**)

**Le rhizoplan**, selon clark (**Schroder, 2003**) désigne la surface racinaire et les bactéries qui y sont fortement adhérentes.

L'ectorrhizosphère représente la zone extérieure qui se trouve directement après le rhizoplan (Schroder, 2003).

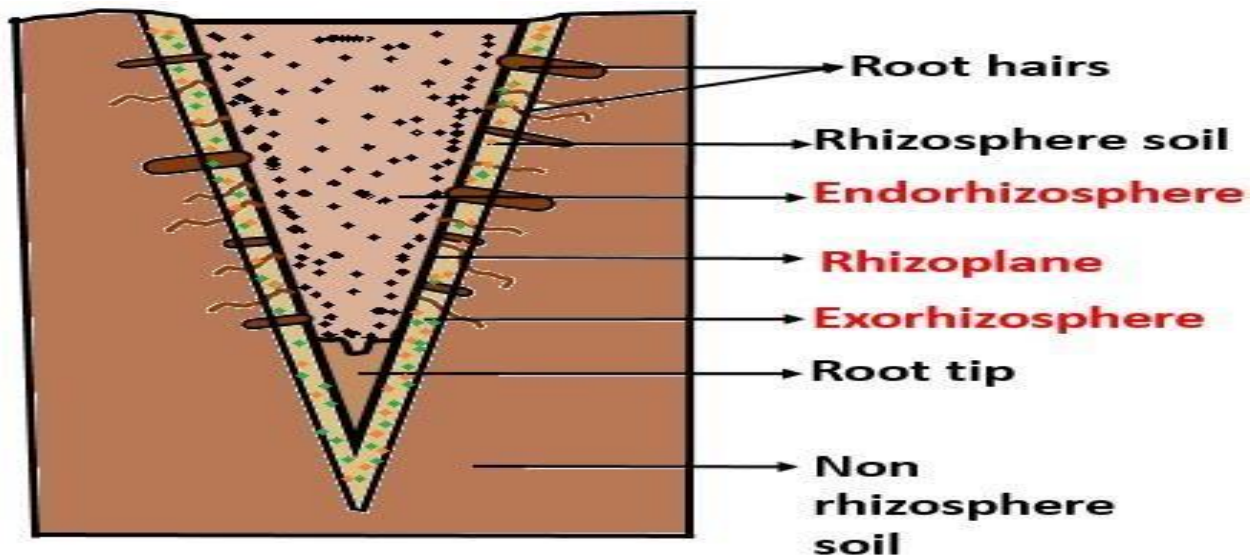


Figure 2 : représentation schématique de la rhizosphère.

## 2.2 Rôle de la rhizosphère

Il existe une double relation fonctionnelle qui est établie dans la rhizosphère, cette relation concerne l'effet des racines sur le milieu environnant, ainsi que la réponse de la microflore à l'activité racinaire.

### Le rôle de la rhizosphère peut être résumé dans les points suivants :

- La rhizosphère joue un rôle essentiel dans les processus de phytoremédiation (Maalem Ahlem, 2014).
- La rhizosphère représente la stimulation de la croissance et de l'activité des communautés microbiennes autour des racines (Grayston et al., 1996).
- La rhizosphère est le siège de processus physiques et chimiques spécifiques liés à l'alimentation hydrique et minérale des plantes (Gobat et al., 2003).
- La rhizosphère est apparue comme le lieu privilégié des échanges de matière et d'énergie : la libération de composés organiques, l'absorption d'eau et d'ions, la synthèse des métabolites microbiens divers et variés (Hinsinger et al., 2005).

La rhizosphère est une région du sol riche en gaz carbonique et pauvre en oxygène dissous, la rhizosphère et de ce fait un site réducteur, où se développe une activité

- dénitrifiante, réduisant l'ion nitrate en oxyde d'azote, voir en ammoniacque (**Gobat et al., 2003**) .

- Elle contribue à modifier les propriétés des sols : propriétés biologiques, biodiversités et activités microbiennes, fertilité et qualité du sol (**Gobat et al., 2003**),

- Dans la rhizosphère la synthèse de phosphatase mène à une augmentation de la disponibilité du phosphore, et en contrepartie son assimilation par les plantes (**Hinsinger et al., 2005**)

- La rhizosphère est une niche écologique qui éveille et stimule divers activités microbienne en participant ainsi, au fonctionnement des cycles des nutriments majeurs et des oligoéléments comme le carbone, l'azote, phosphore, le fer...etc (**Gobat et al., 2003**).

- La rhizosphère joue un rôle singulier dans la régulation de la santé et de la nutrition des plantes, en lien avec la nature des exsudats racinaires (**Hinsinger et al., 2005**).

## 2.3 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 : l'humidité de l'air, température, radiation solaire, teneur en CO<sub>2</sub>.

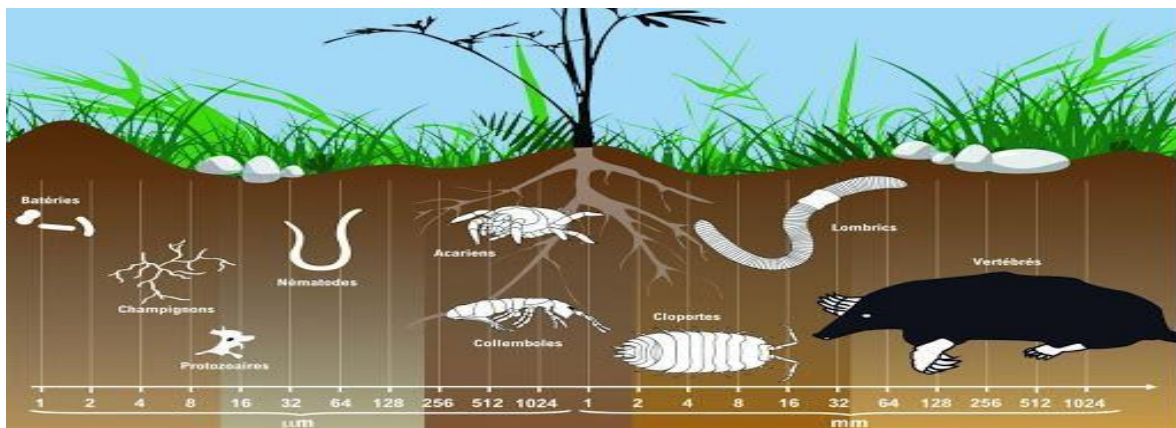
- Par des facteurs de l'environnement édaphique, notamment : teneur du sol en eau et en oxygène, température du sol, teneur du sol en éléments assimilables par les plantes, présence de composés phytotoxiques.

- Par des échanges de « molécules signal entre les racines des plantes et les microorganismes qui leur sont associés » (champignons, bactéries, cyanobactéries...). Mais quand il y a par exemple une symbiose associative entre les PGPR et une plante, le rôle et l'importance de ces molécules est encore mal connu. Les signaux rhizosphériques influent sur l'expression génique « épigénétique ». Ils sont souvent « phytobénéfiques » en améliorant par exemple l'architecture, la croissance et le fonctionnement du système racinaire (**Gobat et al., 2003**).

## 2.4 La faune et la flore de la rhizosphère

La population de la rhizosphère représentée dans la (**Figure 3**) est :

- **nombreuse**: bien que très variable d'un sol à l'autre, le poids de matière vivante à l'hectare est environ de 2,5 tonnes.
- **variée**: il y a une grande diversité d'espèces, de tailles et de modes de nutrition.
- **en équilibre**: vivant en communauté, ces êtres vivants sont tantôt en concurrence, tantôt en association et sont très sensibles aux conditions du milieu (**Maalem, 2014**)



**Figure 3** : présentation schématique des organismes du sol (**Rovira,1969**)

## 2.4.1 La faune de la rhizosphère

### 2.4.1.1 Sa composition

La faune de la rhizosphère peut être classée en deux sous-groupes :

a) La macro-faune : elle est constituée par des animaux mesurant plus de 2 mm. - mammifère, rongeur et insectivore, vers de terre, arthropodes (insectes, arachnides et myriapodes), mollusques (escargots, limaces) (**Maalem, 2014**)

b) La micro-faune : elle est constituée par des animaux mesurant moins de 2 mm tel que : les nématodes, rotifères et tardigrades et protozoaire (**Maalem,2014**).

### 2.4.1.2 Son rôle

Le rôle de la faune dans la rhizosphère est triple :

a). **Une action sur l'état physique de la rhizosphère** : création de galeries, aération, drainage, fragmentation de la matière organique, brassage énergétique de ces fragments, malaxage et transport des matières organiques dans tout le profil du sol et formation d'agrégats stables et

amélioration de la porosité, donc de la structure et de la stabilité structurale du sol (par le biais de la fabrication d'humus) (Maalem,2014)

## **b). Une action chimique :**

- Lutte contre le lessivage en remontant les éléments minéraux lessivés hors d'atteinte des racines, et enrichissement en minéraux assimilables. Leurs déjections sont considérablement plus riches en potassium, phosphore et magnésium assimilables.
- Amélioration de l'assimilabilité des éléments minéraux grâce à cette prédigestion notamment par les vers de terre.
- Mobilisation sous forme organique d'une partie des éléments minéraux présents dans le sol. (Maalem, 2014).

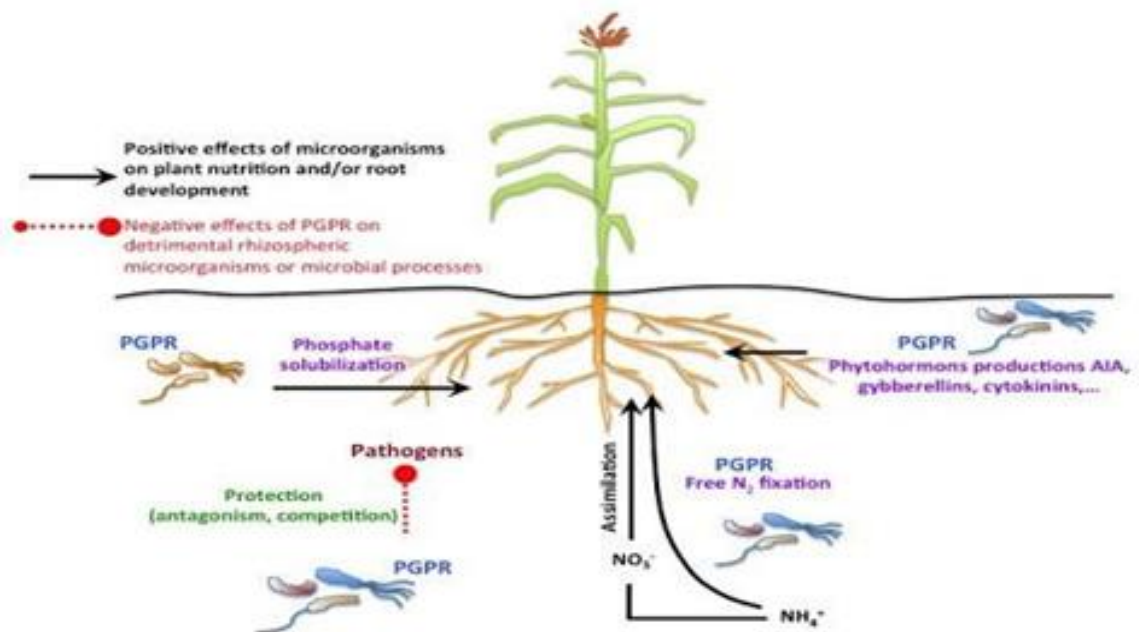
## **c). Une action biologique**

- Stimulation de la flore microbienne de la rhizosphère avec une sélection et un rajeunissement permanents des souches les mieux adaptées.
- Limitation d'invasions extérieures par des parasites (Maalem,2014).

## **3 Rhizobactéries stimulatrices de la croissance végétale**

Plusieurs interactions, bénéfiques (symbioses) ou non, voire délétères (pathogénie) sont observées entre plantes, bactéries et champignons du sol fleuriront l'activité biologique de ce sol. 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, et les interactions avec les champignons mycorrhizogènes. (Elaine, 2015).

Les PGPR interviennent sur la croissance des plantes salons plusieurs mécanismes, de manière directe ou indirecte (**Figure 4**). 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. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. (Haas et Defago, 2005)



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

**Tableau 2:** Substances favorisant la croissance libérées par PGPR

PGPR	Traits de promotion de la croissance des plant
------	------------------------------------------------

PGPR	Traits de promotion de la croissance des plant
<i>Pseudomonas putida</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Klebsiella sp</i> ; <i>Enterobacterasburiae</i>	IAA, siderophores, HCN, ammoniacque, exopolysaccharides, solubilization du phosphate
<i>Psychrobacter sp. SRS8</i> , <i>Bradyrhizobium sp. 750</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Ochrobactru meytisi</i>	Mobilisation des métaux lourds
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	activité du Nitrogenase, solubilization du phosphate, IAA, ACC deaminase
<i>Pseudomonas sp.</i>	solubilization du Phosphate, IAA, siderophore, HCN, potential de biocontrol
<i>Burkholderia Pseudomonas sp.</i>	ACC deaminase, IAA, siderophore, solubilisation des métaux lourds, solubilization du phosphate
<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>	solubilization du Phosphate, IAA et siderophores
<i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Az otobacter spp.</i> , <i>Rhizobium spp.</i>	IAA, production de l'ammoniacque
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Activité antifongique

## 3.1 Effet directe des PGPR sur la plante

Les bactéries PGPR facilitent la croissance des plantes directement en aidant à l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétales (Munees et Mulugeta, 2013)

### 3.1.1 Acquisition des ressources

#### 3.1.1.1 Fixation d'azote

L'azote (N) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes. Bien qu'il y ait environ 78% de N<sub>2</sub> dans l'atmosphère, il est indisponible pour les plantes en

croissance. Le  $N_2$  atmosphérique est converti en formes utilisables par la plante par la fixation biologique de  $N_2$  par les bactéries en utilisant un système enzymatique complexe appelé nitrogénase (**Kim et Rees, 1994**).

Les bactéries fixatrices de l'azote ont la capacité de récupérer l'azote atmosphérique et de le fournir aux plantes par deux mécanismes: symbiotiques et non symbiotiques. La fixation d'azote symbiotique est une relation mutualiste entre une bactérie et la plante. La bactérie entre d'abord dans la racine et plus tard sur les nodules de forme dans lesquels se produit la fixation de l'azote. Le rhizobium est un vaste groupe de rhizobactéries qui ont la capacité d'établir des interactions symbiotiques par la colonisation et forme de nodules racines dans le végétale, dans le quelle l'azote est fixé à L'ammoniaque et le rendre disponible pour l'hôte (**Munees et Mulugeta, 2013**)

### 3.1.1.2 Solubilisation du phosphate

Le phosphore et le deuxième nutriment important limitant la croissance des plantes après l'azote, il est largement disponible dans le sol sous deux forme organique et inorganique (**khan et al., 2009**). Il joue un rôle pratiquement important dans tous les processus métaboliques majeurs dans les plantes, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (**Khan et al., 2010**).

Les plantes sont incapables d'utiliser le phosphate car 95 à 99% de phosphate présents sous la forme insoluble, immobilisée et précipitée. Les plantes absorbent le phosphate uniquement sous deux formes solubles: les ions monobasique ( $H_2PO_4$ ) et basique ( $HPO_4^{2-}$ ) (**Govind et al., 2015**). La solubilisation microbienne du phosphate joue un rôle important dans la conversion du P insoluble en P soluble. En effet, il a été démontré que certains microorganismes du sol sont impliqués dans la solubilisation des phosphates insolubles. Ces microorganismes bénéficient directement du P bio disponible nécessaire pour leur croissance. De même, d'autres organismes sont en mesure de profiter du P solubilisé, tels que les champignons et les plantes supérieures. Notons que ces microorganismes produisent des acides organiques et relâchent des protons, qui à travers leurs groupements carboxyliques, chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles (**Salma, 2015**)

### 3.1.1.3 Solubilisation du potassium

C'est le troisième nutriment majeur important pour les plantes. 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 outre, 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**). On a signalé que les microorganismes des sols jouaient un rôle clé dans le cycle K naturel et, par conséquent, les microorganismes solubilisants de potassium présents dans le sol pourraient fournir une technologie alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes (**Rogers et al., 1998**)

### 3.1.2 Production des sidérophores

Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (**Neilands, 1995**). Ces oligoéléments sont soumis à une forte compétition, certaines bactéries sont capables de séquestrer le fer du milieu environ à l'aide de molécules appelées sidérophores. Ces siderophores se lient avec l'ion ferrique et forment un complexe siderophore-ferrique qui se lie ensuite avec des récepteurs dépendants de la suspension de fer à la surface de la cellule bactérienne. L'ion Ferrique est ensuite relâché et actif dans le cytoplasme comme ion ferreux. Beaucoup de plantes peuvent utiliser divers siderophores bactériens comme sources de fer. Les bactéries productrices de sidérophores appartiennent aux genres *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* (**Kuffner et al., 2008**). Le siderophore le plus connu est l'aérobactine

### 3.1.3 Production des phytohormones

Une large gamme de microorganismes trouvés dans la rhizosphère est capable de produire des substances qui régulent la croissance et le développement des plantes. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes produisant des phytohormones telles que les auxines, les cytokines, les gibbérellines et l'éthylène peuvent affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture racinaire par la surproduction de racines latérales et de racines avec un accroissement subséquent de l'apport d'éléments nutritifs et d'eau (**Arora, 2013**)

## 3.2 Effet indirect des PGPR sur les plantes

### 3.2.1 Productions des antibiotiques :

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes de biocontrôle les plus puissants et les plus étudiés chez les PGPR. (**Shilev, 2013**) exemple d'antibiotiques

produits par PGPR : l'acide phénazine-1-carboxylique, l'oomycine A et les rhamnolipides (Fernando et al., 2005)

l'acide phénazine-1-carboxylique a été secrété par *Pseudomonas fluorescens* 2-79, synthétise l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), un antibiotique pigmenté qui inhibe *G. graminis* var. *Triticici* et d'autres agents pathogènes racémiques in vitro à moins de (1 g / ml), Les mutants de 2-79 défectueux dans la production de PCA (Phz-) ne parviennent pas à inhiber *G. graminis* var. *Triticici* et sont considérablement réduits dans leur capacité à supprimer le take-all, tandis que les mutants génétiquement restaurés pour la production de PCA (Phz +) regroupent de manière coordonnée l'activité antifongique in vitro et sur le blé

L'oomycineA : est responsable de l'aptitude de *Pseudomonas* à réduire 70% l'infection de la racine par *Pythium cotton* et de sa capacité à augmenter de 50% l'émergence des graines de cootton (Shilev ,2013)

- Les rhamnolipides : *Pseudomonas aeruginosa* produit et sécrète des bio-tensioactifs glycolipides contenant du Rhamnose appelés Rhamnolipides. La production de Rhamnolipides dépend des voies métaboliques centrales, telles que la synthèse des acides gras et les sucres activés par le dTDP, ainsi que sur les enzymes participant à la production de l'alginate d'exopolysaccharide. La synthèse de ces tensioactifs est régulée par un système de régulation génétique très complexe qui contrôle également différents traits associés à la virulence de *P. aeruginosa*. Les Rhamnolipides ont plusieurs applications industrielles et environnementales potentielles, y compris la production de produits chimiques fins, la caractérisation des surfaces et des revêtements de surface, comme additifs pour l'assainissement environnemental et comme agent de contrôle biologique (Maier et Soberón, 2000)

Ces antibiotiques sont connus pour posséder des activités antivirales, antimicrobiennes, antiinflammatoires, anti-oxydantes, cytotoxiques, antitumorales et agissant également sur la croissance de plantes (Fernando et al., 2005 et Kim, 2012).

### 3.2.2 Induction d'un système de résistance (ISR)

Les PGPR peut déclencher chez la plante un phénomène connue sous le nom d'induction de la résistance systémique qui est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise qui se produit lorsque la plante active ses mécanismes de défense en réponse à une infection par un agent pathogène (Corné et al., 2009). Les plantes inoculées avec des PGPR peuvent également fournir une résistance systémique contre un large éventail

de pathogènes végétaux. Les maladies d'origine fongique, bactérienne et virale et, dans certains cas, même les dommages causés par les insectes et les nématodes peuvent être réduits après l'application de PGPR (**Naznin et al., 2012**). Il confère à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique. Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par le microorganisme bénéficiaire (**cherif , 2014**)

### 3.3 Formation des biofilms par les PGPR

Les biofilms sont des communautés microbiennes uni ou multi adhérentes aux surfaces biotiques ou abiotiques et / ou en contact intime l'une avec l'autre, enfermées dans une matrice autoproduite de substances polymères extracellulaires (EPS). Des biofilms moins complexes avec un nombre inférieur de cellules sont décrits de manière variable comme des microcolonies, des agrégats ou des grappes de cellules (**Ramey et al, 2004**). La production de biofilm par PGPR reflète leur pouvoir de colonisation du système racinaire et est considéré comme une activité PGPR importante (**Prescott ,2003**).

Plusieurs étapes sont impliquées dans la formation du biofilm, par réponse à des indices environnementaux la présence des nutriments les cellules planctoniques se déplacent vers une surface appropriée et se fixe premièrement à une surface selon leur fimbria et/ou pili par une faible force de Van Der Waal ou liaison hydrogène pour rendre la fixation réversible par le temps l'attachement devient essentiellement irréversible, par la suite d'une accumulation d'interactions faibles et un changement dans l'expression des gènes, c'est-à-dire que lorsque les cellules bactériennes commencent à sécréter EPS. Lorsque de nombreuses cellules bactériennes ont été regroupées dans ce pré-biofilm en croissance en raison de la division cellulaire bactérienne et d'autres microbes se joignant, développent des micro colonnes qui conduisent finalement à la formation de macro colonies(biofilms matures).Enfin, lorsque le biofilm est assez grand, les cellules bactériennes commencent à se détacher du biofilm, ces cellules bactériennes reprenant leur mode de croissance planctonique ou créant leur propre biofilms (**Emily, 2015**).

## 4 Le genre *Bacillus*

Le genre bactérien *Bacillus* pourrait être intéressant à utiliser comme PGPR. Ce genre bactérien appartient à la famille des Bacillaceae de l'ordre des Bacillales dans l'embranchement des Firmicutes.

## 4.1 Morphologie, phénotype et environnement

Les *Bacillus* sont des cellules en forme de bâtonnet droit ou légèrement recourbé que l'on retrouve seul ou en pair, parfois en chaîne et occasionnellement en long filament (**Schleifer , 2009**).

Les *Bacillus* se distinguent des autres membres des Bacillaceae par leur nature aérobie stricte ou facultative (**Slepecky et Hemphill , 2006**) . le genre *Bacillus* représente une fraction d'un large consortium taxonomique de bactéries productrice d'endospore. La production d'endospore en condition aérobie représente le caractère définissant les *Bacillus* depuis 1920 (**Schleifer , 2009**). Les endospores sont formées de façon intracellulaire à la fin de la phase exponentielle de croissance et une seule endospore par cellule sera formée et leur position dans la cellule est aussi caractéristique (**Schleifer,2009**). Les endospores sont extrêmement résistantes métaboliquement et ne possèdent pas d'ATP (**Schleifer , 2009**) .

Les *Bacillus* sont phénotypiquement et génétiquement hétérogènes. Ils exhibent diverses propriétés physiologiques ainsi ils sont capables de dégrader la plupart des dérivés animal ou de plantes, sont des producteurs d'antibiotiques, des nitrificateurs hétérotrophes, sont capable de dénitrification, de fixation d'azote, des précipitateurs de fer, des oxydants de sélénium, des oxydants et réducteurs de manganèse, des chemiliotrophes facultatifs, des acidophiles, des alcalophiles, des psychrophiles et des thermophiles (**Schleifer , 2009**).

Ils sont aussi mobiles grâce à des flagelles péritriches ou péritriches dégénérés ou non mobiles (**Schleifer , 2009**). Les espèces de *Bacillus* sont reconnues pour produire une grande variété de molécules biologiquement actives incluant des polyketides, des lipopeptides, des sidérophores et des peptides (**Hamdache et al., 2013**). Les *Bacillus* peuvent produire au moins une enzyme extracellulaire ce qui peut inclure différentes protéases, pénicillinases, nucléases, phosphatases et lipases ( **Slepecky et Hemphill , 2006**)

Il est possible pour les *Bacillus* de produire des antibiotiques comme métabolites secondaires en fin de phase logarithmique et au début de la phase stationnaire (**Slepecky et Hemphill , 2006**) .

La plupart des *Bacillus* sont des saprophytes et sont largement distribués dans l'environnement (**Schleifer , 2009**) . Les *Bacillus* sont des bactéries ubiquitaires. Ils sont retrouvés dans divers environnements tels que les plantes et sols, les événements hydrothermaux,

des environnements extrêmes, l'eau de mer, etc. (**Hamdache et al., 2013**) et cette distribution dans divers environnements démontre la grande capacité métabolique des *Bacillus*. Il est possible de cultiver plusieurs espèces de *Bacillus* à partir d'échantillons de sols. Les espèces retrouvées en abondances dans les échantillons de sols sont *B. subtilis* et *B. cereus* (**Pérez-Garcia et al., 2011**).

## 4.2 Utilisation des Bacillus

Certaines souches de *Bacillus* sont utilisées au niveau industriel. Il est estimé que les enzymes produites par *Bacillus* représentent 50 % des enzymes sur le marché (**Schallmey et al., 2004**). Divers *Bacillus* tels que *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. clausii* sont utilisés au niveau industriel (**Schallmey et al., 2004**). Les différentes enzymes (amylase, protéase,  $\alpha$ -glucanase, etc.) produites par les *Bacillus* sont utilisées dans différents procédés industriels. On les retrouve dans les détergents (protéase alcaline), pour la cuisson (amylase), l'amidon ( $\alpha$ -amylase, pullulanase, glucose isomérase), le textile (pectate lyase, amylase, mannanase) et les boissons (amylase,  $\alpha$ -glucanase) (**Schallmey et al., 2004**).

Il y a quatre espèces entomopathogéniques qui sont actuellement utilisées ou qui possèdent le potentiel d'être utilisées comme insecticide (**Schallmey et al., 2004**). Parmi celles-ci, l'espèce *Bacillus thuringiensis* est utilisée comme biopesticide depuis plusieurs années. Les autres espèces pouvant servir comme insecticide sont *B. sphaericus*, *B. popilliae* et *B. lentimorbus* (**Schallmey et al., 2004**).

Les différents traits physiologiques (formation de spores, sécrétion de métabolites secondaires (antibiotiques, enzymes extracellulaires, etc.), leur membrane cellulaire, etc.) des *Bacillus* leur permettent de survivre dans différents environnements, ce qui en fait un genre intéressant à utiliser comme PGPR. Il est possible de cultiver plusieurs *Bacillus* à partir de différents sols, car les bactéries formant des endospores en condition aérobie sont ubiquitaires dans l'écosystème des agricoles (**McSpadden, 2004**).

Certaines espèces de *Bacillus* sont déjà commercialisées comme biofertilisant ou biopesticide par exemple la souche *Bacillus amyloliquefaciens* FBZ42 est commercialisée

comme biofertilisant par ABiTEP GbmH sous le nom de Rhizo Vital® (**Borriss,2011**). Il existe plusieurs bioformulations à base de Baeillus disponibles commercialement tel que

Kodiak (B. subtilis GB03), Yield Shield (B.pumilus GB34), Bioyield (B. amyloliquefaciens GB99 + B. subtilis GBI22), VAULT (B. subtilis MBI600 + souches rhizobia) pour n'en nommer que quelques-unes (**Borriss,2011**)..

---

# ***Chapitre 2***

---

## *Matériels & Méthodes*

---

---

# *Chapitre 2*

## *Matériels & Méthodes*

---

## 1. Objectif

L'objectif du présent travail est:

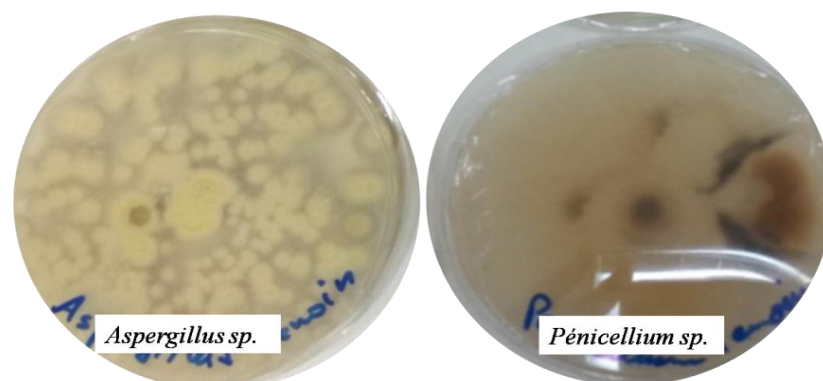
- L'isolement des bactéries PGPR du genre *Bacillus* à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur cultivé sur le sol de village oued taria (willaya de Mascara),
- La caractérisation de leur pouvoir de promotion de la croissance végétative ainsi que leur effet antagoniste vis à vis de deux champignons phytopathogène modèle : *Penicillium sp* et *Aspergillus sp*.
- L'évaluation de l'effet des PGPR sélectionnées sur la germination et la croissance des graines de blé dur.
- L'identification des souches a fort pouvoir de promotion.

## 2. Matériel

### 2.1. Isolats bactériens et souche fongique

Les isolats ayant fait l'objet de l'étude bactériologique proviennent du sol rhizosphérique des plantes de blé dur, âgé de 2 mois, récolté dans la région de Oued Taria willaya de Mascara.

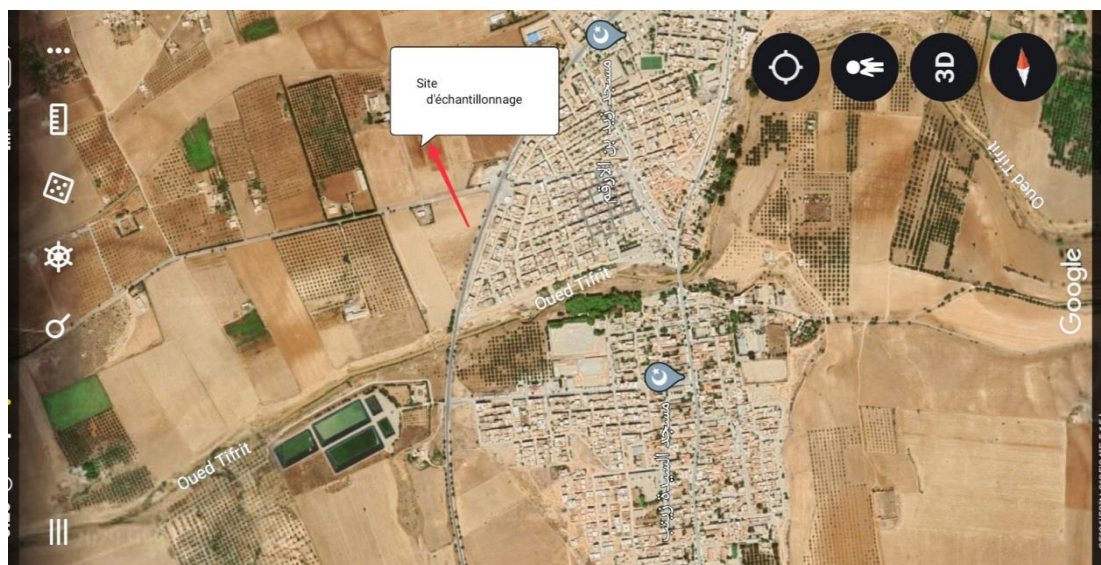
Les agents fongiques phytopathogène *Aspergillus sp* et *Penicillium. sp.*, proviennent du laboratoire de l'unité de recherche INRAA, les souches fongiques ont été fournies sous une forme de cultures sur milieu de culture PDA (**Annexe**) dans des boîtes de pétri (**Figure 5**).



**Figure 5** : Aspect macroscopique des cultures des souches fongiques sur milieu de culture PDA.

## 2.2. Matériel végétal

Les plantes de blé dur utilisées proviennent de la région de Oued Taria willaya de Mascara. Le site est situé à côté de route nationale N°06.



**Figure 6** : Localisation du site d'échantillonnage. (Source : Google Earth 2020)

## 3. Isolement du genre de *Bacillus*

Le genre *Bacillus* a été isolé à partir d'échantillons de sol rhizosphérique prélevés, en utilisant la méthode de dilution, la première dilution est bouillie à 80 ° C pendant 10 minutes pour éliminer toute forme végétale. Les dilutions sont ensuite ensemencées sur un milieu de culture en gélose nutritive (**Annexe 1**).

Les colonies obtenues sont purifiées puis caractérisés à l'échelle macroscopique et microscopique.

## 4. Conservation des isolats

Les colonies pures, isolées, sont ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures. Les tubes manifestant une croissance bactérienne sont conservés à une température de 4°C, à un intervalle de temps de 4-6 semaines.

Concernant la conservation à longue durée, les souches isolées sont conservées dans un bouillon nutritif glycérolé à une concentration de 20 %, à une température de -20°C (environ 1 an).

## 5. Identification préliminaire du genre *Bacillus*

L'appartenance des souches isolées au genre *Bacillus*, est explorée en présentant six tests, à savoir l'aspect macroscopique des colonies sur la gélose, la coloration de Gram positive, la forme bacillaire, la réaction positive de la catalase et la présence des spores à l'intérieure des cellules bactériennes ainsi que le type respiratoire.

### 5.1 Etude morphologique

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. Les caractéristiques étudiées sont :

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

### 5.2 Coloration de Gram

La coloration de Gram et l'observation microscopique ont permis la détermination de la forme, l'arrangement, la pureté, et la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées et la distinction entre deux groupes bactériens : les bactéries à Gram positif, colorées en violette et à Gram négatif en rose (**Annexe 2**) (**Marchal et Bourdon, 1982**).

### 5.3. Révélation de la catalase

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existante chez toutes les bactéries aérobies, permet de vivre en présence d'oxygène. Il existe en effet chez les aérobies une chaîne fixant l'hydrogène sur l'oxygène en aboutissant à de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) selon la réaction



La recherche de cette enzyme est effectuée par le dépôt d'une colonie pure sur une lame propre et l'ajout de quelques gouttes de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à une concentration de 10 volumlecture

positive se traduit par le dégagement de bulles d'air.

## 5.4.Revelation de l'oxydase

Ce test permet la mise en évidence d'une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu de culture gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthyl paraphénylène diamine.

La recherche de cette enzyme consiste le dépôt d'une colonie pure sur le disque d'oxydase, mis sur une lame propre. La lecture positive se manifeste par l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes.

## 5.5 Test Mannitol mobilité

Le milieu de culture Mannitol-Mobilité, utilisé pour l'identification présomptive des souches bactériennes est mis en œuvre pour l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate (enzyme respiratoire).

Le test est procédé par l'ensemencement de la colonie à l'aide d'un fil de platine ou d'une pipette Pasteur, par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose, incubée pendant 24 heures à 30°C (**Annexe 1**).

La fermentation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune et les bactéries mobiles envahissent le milieu de culture à partir du point d'ensemencement.

## 5.6Coloration des spores au vert de malachite

Les bactéries appartenant au genre de *Bacillus* forment une structure exceptionnellement résistante appelée endospore, sa morphologie et sa localisation varient selon les espèces et elle est souvent précieuse dans l'identification.

La technique de coloration des spores est procédée en deux étapes successives (**Ejiofor et Johnson 2002**). Après la fixation du frottis, la lame est couverte par le vert de malachite, incubée à 55°C pendant 20 min, rincée avec de l'eau distillée. Ensuite, la lame est recolorée avec le safranine pendant 5 min, rincée une deuxième fois avec de l'eau distillée, séchée et observée à l'aide d'un microscope optique à immersion où les spores apparaissent en vert émeraude et le matériel végétatif apparait en rouge.

## 5.7.Détermination du type respiratoire

La culture bactérienne en milieu de culture liquide est utilisée pour l'ensemencement du milieu de culture « viande-foie » (VF) en surfusion, puis incubée à 30°C pendant 24 heures (**Annexe 1**). Le type respiratoire est déterminé selon le niveau de croissance dans le tube.

## 5.8.L'identification de l'espèce par la galerie API 20 E/50 CH

Les souches isolées, sélectionnées stimulatrice de la croissance, appartenant au genre *Bacillus*, ont fait l'objet d'une identification phénotypique. 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 (**Annexe 2**).

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, sélectionnées stimulatrices de la croissance sont inoculées dans une solution de NaCl à une concentration de 0.9%. L'inoculum est ensuite ajusté 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, H<sub>2</sub>S 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 (VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, NIT<sub>1</sub>, NIT<sub>2</sub>, James et Kovacs). Les galeries api 50 CH sont inoculées de la même façon.

Les résultats sont rapportés sur les fiches d'identification sous forme de signes (+, -) des tests positifs négatifs respective et la lecture est effectuée par l'utilisation du logiciel

Bacterial Identification Program (**Emanuel et al., 2009**).

## 6. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance

### 6.1. Screening des souches, isolées sélectionnées solubilisant le phosphate

La solubilisation des phosphates est évaluée sur milieu de culture Pikovskaya (PVK) (**Annexe 1**) contenant du  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme source de phosphore par la méthode décrite par (**Gaur, 1990**). Un volume de 2 d'une pré-culture de 24 heures des souches, isolées sélectionnées stimulatrices de croissance de blé dur, est déposé sur la surface du milieu de culture PVK, incubé à une température de 30°C pendant 7 jours.

La solubilisation du phosphate se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie inoculée. Le taux du phosphate solubilisé est calculé par l'indice de solubilisation selon la formule suivante (**Sitepu et al., 2007**):

$$\text{SI} = \frac{\text{Diamètre de la colonie} + \text{diamètre de la zone claire}}{\text{Le diamètre de la colonie}}$$

### 6.2. Screening des souches, isolées sélectionnées productrices de l'acide indole acétique

La production d'IAA des souches, isolées sélectionnées stimulatrices de croissance de blé dur, est déterminée selon la méthode standard (**Bric et al., 1991**). La colonie isolée est étalée sur milieu de culture gélosé Luria-Bertani, additionné d'une concentration de 5 mM de L-tryptophane, 0.06% de SDS, et 1% de glycérol (**Annexe 1**). Ensuite, un disque de papier Whatman n°1 (80 mm de diamètre), est déposé sur la surface du milieu de culture gélosé, incubée à une température de 28°C pendant 48 heures, récupéré, traité avec le réactif de Salkowski (2% de  $\text{FeCl}_3$  à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique) (**Annexe 1**). Les disques sont saturés dans une boîte de Pétri lors de l'imprégnation dans le réactif, après 10-30 min. La production d'IAA se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies inoculées et la production d'autres types d'indoles est traduite par le virage de la coloration jaune au jaune brune à marron (**Naik et Sakthivel, 2006**).

### 6.3. Screening des souches pour la fixation d'azote

La fixation d'azote moléculaire des souches isolées, sélectionnées stimulatrices de croissance de blé dur, est mise en évidence sur milieu de culture solide dépourvu d'azote (**Annexe 1**). Le milieu de culture N-free est ensemencé par stries à partir des souches isolées, sélectionnées, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures. La lecture positive se manifeste par croissance des colonies ensemencées.

## 6.4. Activité anti fongique

L'étude de l'activité antifongique des 14 isolats sélectionnés vis-à-vis de la croissance mycélienne d'*Aspergillus sp.* et de *Penicillium .sp* est mise en évidence par la méthode de confrontation par contact direct (**Gerbaldo et al., 2012**). Un fragment mycélien d'un diamètre de 5 mm de phytopathogène est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant un volume de 20 ml de milieu de culture PDA (**Annexe1**). Les cultures bactériennes ajustées à 0.5 Mc Farland, sont inoculées à 1 cm de la bordure de la boîte de Pétri et à une distance de 3 cm du mycélium fongique. Deux boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PDA inoculé avec un fragment mycélien d'une des 2 souches fongiques sont utilisées comme témoin. Les boîtes sont incubées à température de 30°C jusqu'à l'envahissement de la surface du milieu de culture par le mycélium fongique. La croissance radiale des phytopathogènes est mesurée et le taux d'inhibition est calculé par l'utilisation de la formule de (**Sgroy et al., 2009**) comme suit:

$$I=(C-T)/C \times 100$$

**I** : le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, **C** : diamètre du mycélium dans la boîte contrôle (mm), **T** : diamètre du mycélium en présence de la bactérie (mm).

## 6.5. Screening des souches isolées, sélectionnées productrice de l'acide cyanhydrique HCN

La capacité des souches, isolées à produire de l'acide cyanhydrique est effectuée selon la méthode décrite par **Lorck** en **1948**.

Les souches sont ensemencés par strie sur un milieu de culture gélosé additionnée de 4.4g/l de glycine et des disques de papier Whatman n°1, saturés en picrate alcalin, sont déposés dans les couvercles des boîtes, scellées au parafilm et incubées inversées à 28°C pendant 4 jours (**Ahmad et al., 2008 ; Trivedi et al., 2008**). Une production modérée et élevée d'HCN est indiquée par un virage de la couleur du jaune vers le brun clair au rouge brun (**Trivedi et al., 2008**).

## 6.6. Screening des souches pour la production des protéases

L'étude de l'activité protéolytique des souches est mise en évidence selon la méthode décrite par de (Smibert et Krieg, 1994). Les souches isolées, sélectionnées stimulatrices de croissance de blé dur sont inoculées dans un milieu de culture gélosé additionné de lait écrémé, incubées à une température de 28°C pendant deux jours (Annexe 1). La lecture positive se manifeste par le développement d'un halo clair autour des coloniesensemencées (Naik et Sakthivel, 2006).

## 7.Effet des isolats sur la germination des graines de blé dur

Dans le but d'apprécier l'effet des isolats sur la germination des graines du blé dur, un essai de germination est effectué.

Les graines de blé dur sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 18° pendant 5 minutes puis rincées 6 fois à l'eau distillée stérile.

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des cultures sur milieu de culture bouillon *Bacillus* , les charges bactériennes sont ajustées à 0.5 Mc Farland. Les graines sont mises pour une durée de 30 min, dans les bécgers contenant l'inoculum bactérien. Chaque isolat est testé séparément. Le témoin négatif est préparé à l'aide des graines trempées dans le milieu stérile.

Les graines sont déposées dans des boites de pétri de 10 cm de diamètre contenant un papier filtre imbibé d'eau distillée stérilisée. Chaque boite a reçu 10 graines.

Dix jours après le lancement du test, L'évaluation des résultats est effectuée par le relever et le calcul des paramètres : pourcentage de germination, la longueur de la radicelle et de la longueur de la tige, poids sec et l'indice de vigueur calculé selon la formule :

**IV (%) =** (longueur moyenne de la partie racinaire + longueur moyenne de la partie aérienne) × le taux de germination %

# **Chapitre 3**

---

## *Résultats et discussion*

# Chapitre 3

## Résultats et discussion

Les *Bacillus* représentent le plus large et proéminent groupe de bactéries aérobies formant des endospores et ont reçu une attention considérable au niveau taxonomique, car les différentes espèces ont des applications remarquables dans différents secteurs (médical, industriel, environnemental et agricole). Au secteur agricole, une large application des PGPR du genre *Bacillus* peut réduire la dépendance aux produits chimiques. De plus, c'est une technologie accessible, saine et durable. Les objectifs initialement tracés pour le présent travail étaient:

- L'isolement des bactéries PGPR du genre *Bacillus* à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur cultivé sur le sol de village oued taria (willaya de Mascara),
- La caractérisation de leur pouvoir de promotion de la croissance végétative ainsi que leur effet antagoniste vis à vis de deux champignons phytopathogène modèle : *Penicillium sp* et *Aspergillus sp*.
- L'évaluation de l'effet des PGPR sélectionnées sur la germination et la croissance des graines de blé dur.
- L'identification des souches à fort pouvoir de promotion.

La survenue de la pandémie du Covid 19 avec toutes les mesures préventives instaurées par l'état et le gel des activités au sein des établissements universitaires du pays, ont empêchés la bonne conduite de la présente étude et, de ce fait, on s'est retrouvé contraint à transformer le travail expérimental prévu en une analyse bibliographique où ont été revus et discutés les contributions des scientifiques et chercheurs Algériens autour du thème abordé. Les travaux en question sont ceux de **Cherif, 2014** (thèse de doctorat) ; **Hassani et Hassani, 2017** (mémoire master) et **Bouras, 2018** (thèse de doctorat).

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

Les trois auteurs ont réussi à isoler des souches de bactéries rhizosphériques du genre *Bacillus*. Les isolats sont obtenus de 4 plantes hôtes et les sites d'étude sont réparties entre l'Est le Sud-Est et l'Ouest du pays. Le nombre d'isolats retenus varie de 15 à 40 (**Tableau 1**).

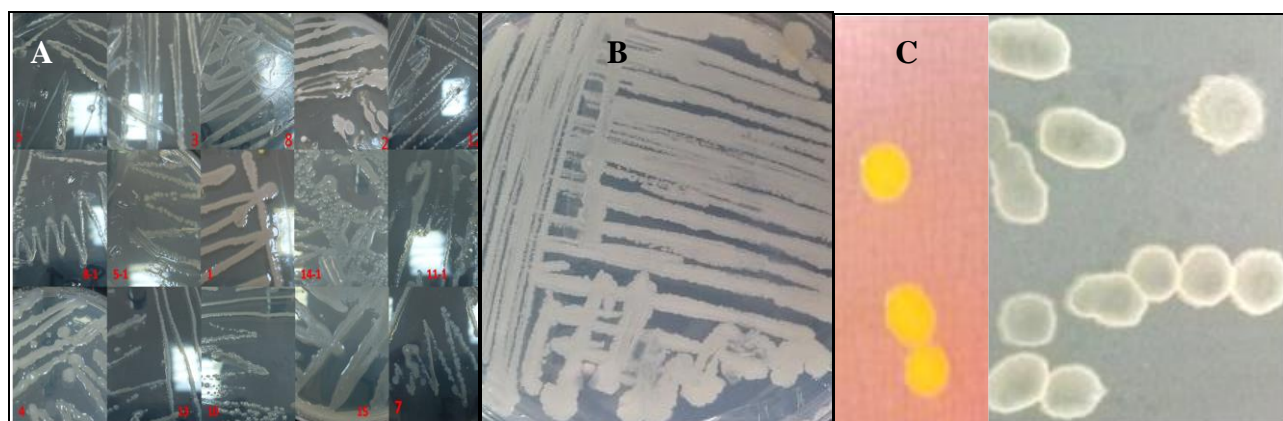
Dans les 3 documents, lors de l'isolement, la stratégie du choc thermique est adoptée pour la sélection des bactéries sporulées, elle permet l'élimination des formes végétatives et les formes sporulées (formes de résistance) se développent dans les conditions favorables (**Lynn et al., 1999**).

Les résultats de ces études se concordent avec les données rapportés dans de la littérature sur l'abondance de ce genre au niveau de la rhizosphère. Selon **Holl et Chanway, (1992)**, l'habitat primaire du genre *Bacillus* est le sol et la rhizosphère particulièrement, les systèmes racinaires des plantes. **Wipat et Harwood, (1999)** ont rapporté sur l'abondance du genre de *Bacillus* dans la rhizosphère, ils estiment leur nombre à  $10^7$  par gramme de sol.

**Tableau 3** : Site, plante hôte et nombre isolats retenus par les auteurs des travaux à analyser.

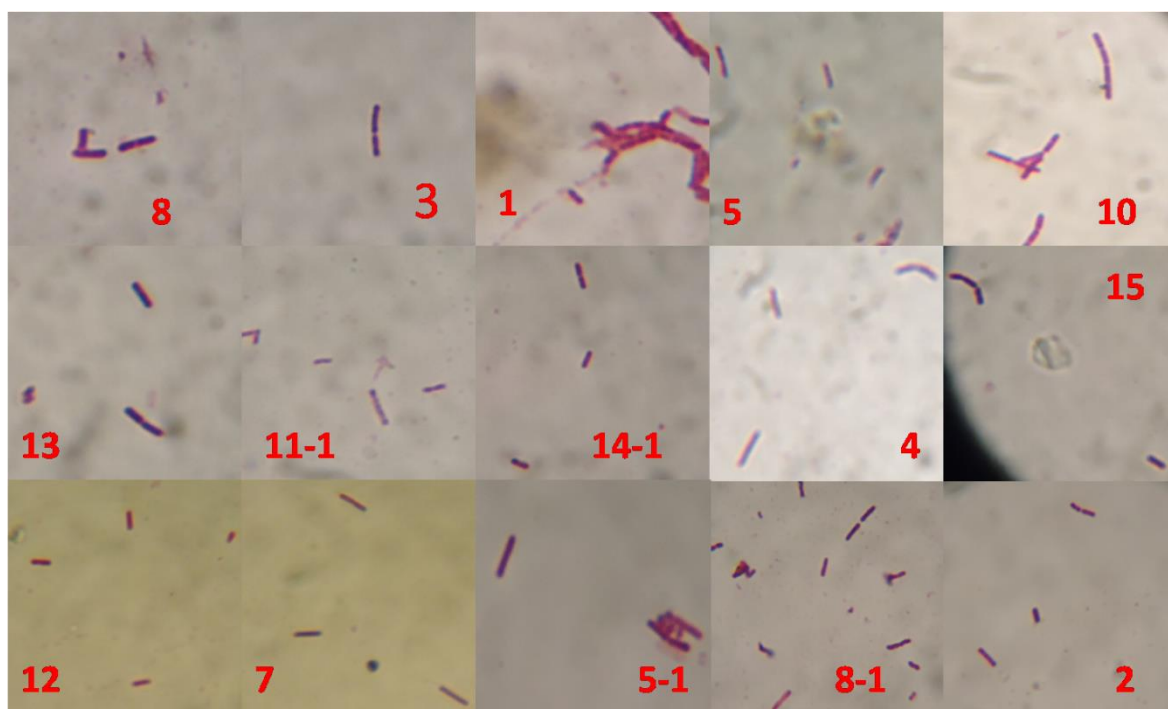
Auteurs	Site de prélèvement	Plant hôte	Nombre d'isolats
<b>Cherif, 2014</b>	SETIF, BOU-SAADA ET DJELFA	Blé et orge	<b>40</b>
<b>Hassani et Hassani, 2017</b>	Ain Tolba willaya de AIN TEMOUCHENT	Pois chiche	<b>15</b>
<b>Bouras, 2018</b>	Tessala willaya de SIDI BEL ABBES	Lentille	<b>18</b>

Les colonies observées, par ces auteurs, présentent majoritairement un aspect macroscopique très hétérogène, des colonies de différentes formes, tailles, couleurs et aspects (**Figure 7**)



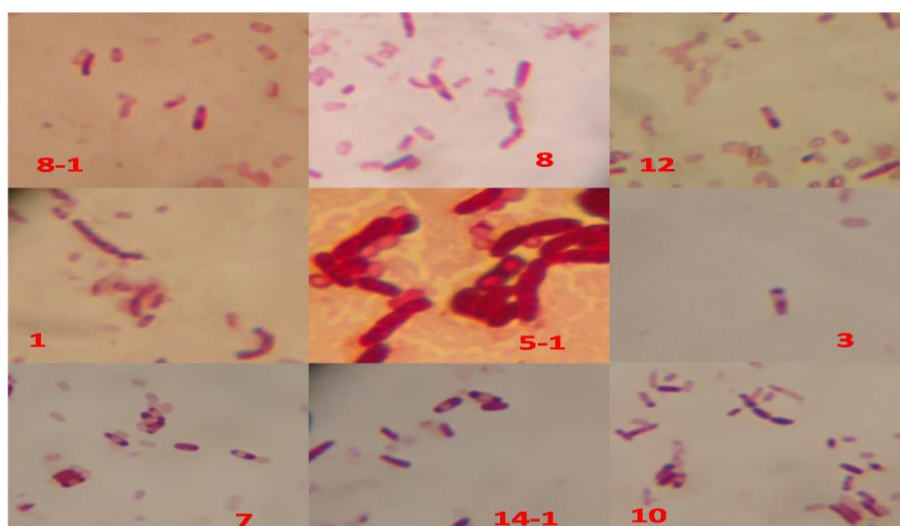
**Figure 7** : Aspect macroscopique des souches. **Cherif, 2014 (C)** ; **Hassani et Hassani, 2017 (A)** et **Bouras, 2018 (B)**.

Les souches présentent un aspect microscopique typique du genre *Bacillus* : forme bacillaire, Gram positif, taille variant entre 2 et 10  $\mu\text{m}$  de long et 0.5 à 2  $\mu\text{m}$  de large, des bords parallèles et des extrémités rondes ou tronquées (**Figure 8**).



**Figure 8:** Aspect microscopique des souches isolées par Hassani et Hassani, (2017).

La production de spores est vérifiée par observation microscopique des cultures âgées de plus que 48 heures (**Figure 9**). La capacité de sporulation de ce genre bactérien favorise d'une part l'ubiquité et d'autre part la survie dans des environnements très divers (**Cherif, 2014**).



**Figure 9:** Aspect et position des spores produit par les souches (Hassani et Hassani, 2017).

### 1.1. L'identification des souches

Les auteurs des travaux analyses ont adopté des approches différentes pour l'identification des souches isolés :

**Cherif, (2014)** a choisi une approche moléculaire, l'identification moléculaire par le séquençage du gène de l'ARNr16S (un seul isolat) a permis l'affiliation phylogénétique de la souche D13 au genre *Bacillus* par comparaison aux séquences d'espèces proches.

**Hassani et Hassani, (2017)** ont procédé à une identification préliminaire (appliquée à la totalité des isolats) basée essentiellement sur la présence de six critères tels que l'aspect macroscopique des colonies (forme R : routh), la forme bacillaire le Gram positive, la production de spores, la réaction positive au test de catalase et le type respiratoire aérobic. Selon **Emanuel et al., (2009)** ces caractères témoignent de l'appartenance des souches au genre *Bacillus*.

Tandis que, **Bouras, (2018)** a adopté une approche biochimique basée sur l'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres à l'aide de mini systèmes d'identification disponibles dans le commerce sous forme de galeries (API 20NE et API 50CH). Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille. Le profil biochimique obtenu par cet auteur fut analysé et interprété à l'aide du logiciel Identax bacterial identification system version 1.2, les deux souches retenus fut identifiées comme appartenant au genre *Bacillus* et aux espèces *boduis* et *lichiniformis*.

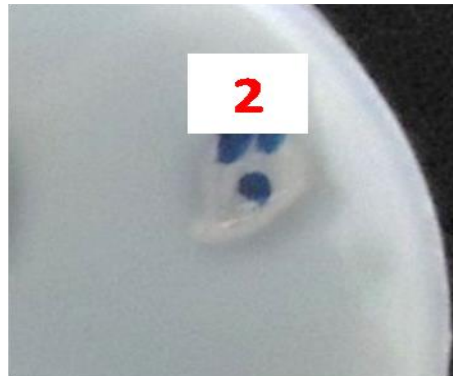
## 2. Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance

Selon **Francis et al., (2000)** ; l'intérêt de bactéries PGPR du genre *Bacillus* réside dans la diversité de leurs modes d'action, elles peuvent afficher presque tous les mécanismes de lutte biologique, de biostimulation et de biofertilisation. La capacité des souches sélectionnées à l'expression des divers mécanismes implique dans promotion de croissance des plantes est mise en évidence via une série de test dont : la fixation d'azote, la solubilisation de phosphore, la production d'acide indolacétique et l'antibiose.

### 2.1. Screening des souches pour la solubilisation du phosphate inorganique

Le test de solubilisation des phosphates s'opère sur milieu de culture Pikovskaya solide. Les souches bactériennes et fongiques présentant une activité de solubilisation du P sont détectées par la formation d'un halo clair (signe de solubilisation) autour de leurs colonies (**Figure 10**). La production

d'un halo sur un milieu gélose solide ne doit pas être considérée comme le seul test de solubilisation P. Lorsque les colonies se développent sans halo après plusieurs repiquages sur le même du milieu, un test supplémentaire en milieu liquide doit être effectué et les quelques isolats obtenus après une sélection aussi rigoureuse doivent être testés davantage pour la production d'acides organiques (Sharma *et al.*, 2007).



**Figure 10:** Solubilisation du tricalcuim phosphate par la souche GN 2 sur milieu Pikovskaya. (Hassani et Hassani, 2017).

Les micro-organismes libèrent le P par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétion de  $H^+$ . Par conséquent, le P peut être libéré par la substitution des protons ou sa complexation avec le  $Ca^{2+}$  (Illmer et Schinner, 1995). Ainsi lors de la solubilisation, les bactéries acidifient l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose. Ce processus conduit à la libération de différents acides organiques (lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique). Cependant, ces composés sont libérés difficilement dans le milieu solide contrairement au milieu liquide (Nautiyal, 1999). La conséquence de ce phénomène se manifeste par la non-apparition du halo de transparence autour des colonies des souches solubilisant efficacement les phosphates sur bouillon PVK.

L'alimentation minérale en phosphate est une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Les trois auteurs ont rapporté l'expression de cette activité par plusieurs les souches de *Bacillus* testées (Tableau 4). Les taux de solubilisation exprimés sont appréciables. Ces souches peuvent être considérées comme des biofertilisants car elles sont capables de libérer des quantités de P supérieure à celles nécessaires à leur

métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus (Kloepper *al.*, 1989).

**Tableau 4** : Analyse des résultats du test de solubilisation de phosphore pour les trois auteurs.

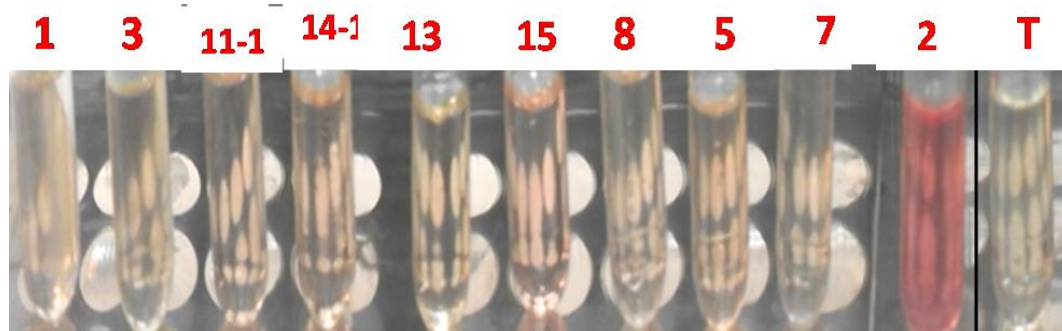
Auteurs	Technique adoptée	Taux d'expression de l'activité	Taux de solubilisation
Cherif, 2014	Recherche sur milieu liquide	60% des souches	0 à 16.65 µg/ml.
Hassani et Hassani, 2017	Recherche sur milieu solide	50% des souches	IS variant de 0 à 2.8
Bouras, 2018		10% des souche	IS variant de 0 à 3

Wani *et al.* (2007) ; décrivent les souches de *Bacillus* comme des agents de solubilisation efficaces, ces bactéries sont même considérées comme les plus performants (Illmer et Schinner 1992), elles dessoudent le P du sol grâce aux acides organiques de faible poids moléculaire qu'elles secrètent (Illmer et Schinner, 1995).

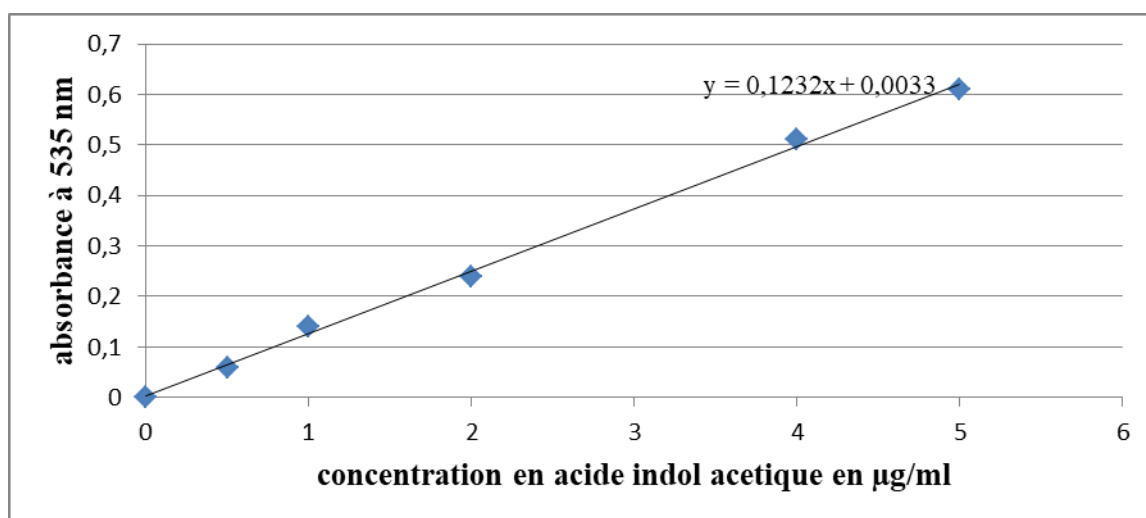
## 2.2. Screening des souches pour la production d'acide indole acétique

Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'AIA. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production d'AIA. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2010).

La recherche et le dosage de la production de l'acide indole acétique se font souvent selon la technique rapportée par Acuña *et al.*, (2011), sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide ou solide, additionné ou non de L-tryptophane. La détection de la phytohormone est réalisée grâce à la réaction de Salkowski (Silini, 2013). Cette dernière est spécifique aux auxines et composés similaires. Le réactif de Salkowski, lors de la réaction avec l'IAA, donne une couleur rose-rouge en raison de la réduction de  $Fe^{3+}$  et la formation d'un complexe d'IAA-fer (Figure 11) (Gang *et al.*, 2019). Les taux de production d'acide indol-acétique sont déterminés en se reportant au courbe étalon (Figure 12).



**Figure 11** : Production de l'acide indole acétique chez les souches inoculées sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence de (5g/l) de L-tryptophane (Hassani et Hassani, 2017).



**Figure 12** : Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique (Hassani et Hassani, 2017).

Les trois auteurs ont rapporté l'expression de cette activité par plusieurs des souches de *Bacillus* testées (Tableau 5). Les taux d'AIA produit varient de 0.13 µg/ml à 30 µg/ml. Cette variation est influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Miraza *et al.*, 2001).

**Tableau 5:** Analyse des résultats du test de production d'AIA pour les trois auteurs.

Auteurs	Technique adoptée	Taux d'expression de l'activité	Taux de solubilisation
<b>Cherif, 2014</b>	Recherche sur milieu liquide à 1g/ml de L-tryptophane	100% des souches	1,58 µg/ml à 25,41µg/ml
<b>Hassani et Hassani, 2017</b>	Recherche sur milieu liquide à 5 g/ml de L-tryptophane	100% des souches	0.13 µg/ml. à 11.34 µg/ml
<b>Bouras, 2018</b>	Recherche sur milieu solide à 1 g/ml de L-tryptophane	33.33 % des souche	/

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 par les chercheur Algériens sont donc suffisants pour stimuler la croissance végétale.

Les bactéries sécrétant une grande quantité d'auxine l'AIA ou l'acétamide indole (IAM) dans le sol causent une augmentation maximale de la croissance et le rendement des récoltes (**Khalid et al., 2004**).

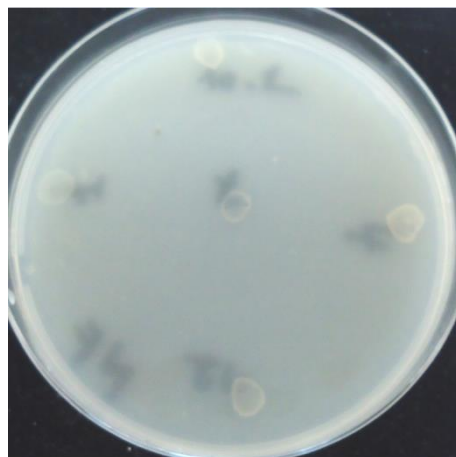
Les résultats des trois chercheurs se concordent avec les travaux réalisés par **El-Mahrouk et Belal, (2007)**; **Sethi et Adhikary, (2012)** et **Ponmurugan et al.,(2012)**, qui ont rapporté que la production de l'acide indole-acétique est fortement liée à la présence du L- tryptophane, dans le milieu de culture utilisé, chez les bactéries diazotrophes.

### 2.3. Screening des souches pour la fixation d'azote

La fixation d'azote est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel la plante bénéficie de l'association microbienne. Les bactéries diazotrophes fournissent aux plantes l'azote fixé en échange du carbone libéré comme exsudats racinaires. De nombreux rapports sont disponibles sur

l'application des diazotrophes libres, y compris *Bacillus* spp., pour un rendement accru de diverses cultures (Ding *et al.*, 2005).

La fixation d'azote moléculaire est mise en évidence sur milieu de culture solide dépourvu d'azote. La lecture positive se manifeste par croissance des colonies ensemencées (Figure 13).



**Figure 13 :** Aspect des résultats du test de fixation de l'azote (Hassani et Hassani, 2017).

Les trois auteurs ont décrit la capacité de souches de *Bacillus* isolées à la fixation d'azote, la fréquence d'expression de cette activité par les souches de *Bacillus* testées est variable (Tableau 6). Cette activité est liée à l'existence du gène *nif* H est présente chez l'ensemble des bactéries à Gram-. Selon Guemori-Athmani *et al.* (2000), cette capacité mesurée par l'activité de la nitrogénase existe chez *Bacillus* et *Peanibacillus* isolés du sol Agérien.

**Tableau 6:** Analyse des résultats du test de fixation d'azote pour les trois auteurs.

Auteurs	Technique adoptée	Taux d'expression de l'activité
Cherif, 2014	Recherche sur milieu solide exempte d'azote	50 % des souches
Hassani et Hassani, 2017		100% des souches
Bouras, 2018		50 des souche

## 2.4. Activité anti fongique

L'élimination des agents fongiques phytopathogènes constitue un trait important de nombreux PGPR. Les principaux mécanismes par lesquels les PGPR peuvent contrôler d'autres micro-organismes sont la concurrence directe pour l'espace et les nutriments, l'antibiose ou la production de toxines, la prédation ou le parasitisme et la résistance induite de l'hôte (Compant *et al.*, 2005). La plupart des agents microbiens présentent un seul de ces mécanismes, alors que certains peuvent en utiliser plusieurs (Cherif, 2014).

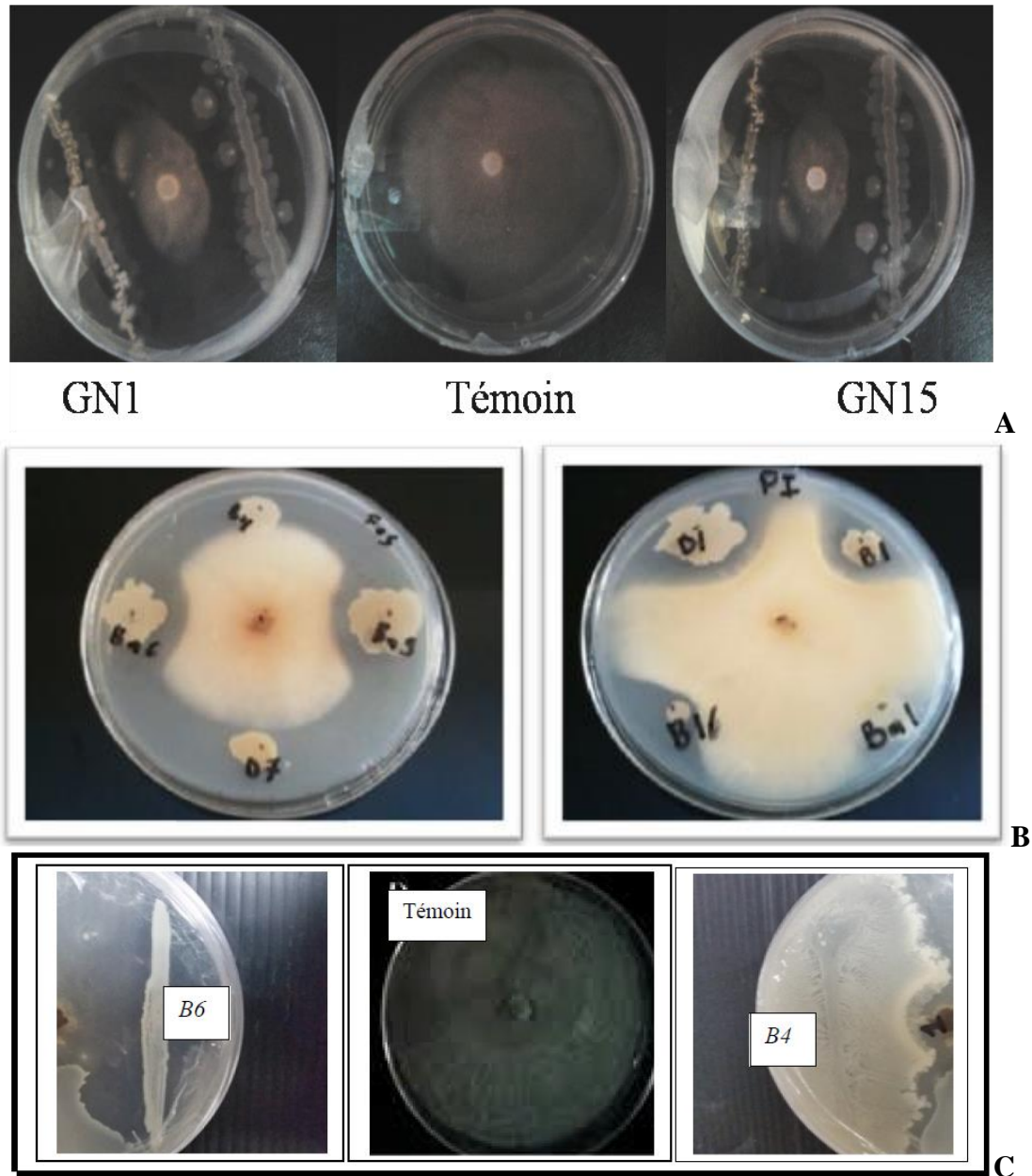
L'analyse des résultats des trois études montre l'expression d'une activité antifongique importante par les souches de *Bacillus* isolées (50% à 92.5% des souches exprime une activité antifongique), Le taux des souches actives par souche fongique testée varie de 40% à 100% et les taux d'inhibition exprimé par les souches de *Bacillus* varie de 16.66% à 97% (Tableau 5, Figure 14).

**Tableau 7:** Analyse des résultats pour le test d'activité antifongique.

Auteurs	Nombre de souches fongiques utilisées	Souches fongiques utilisées	Taux d'expression de l'activité	Taux d'inhibition exprimés	Taux des souches actives/souche fongique
Cherif, 2014	6	- <i>Aspergillus niger</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Alternaria alternata</i> - <i>Phytophthora infestans</i> - <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Fusarium solani</i>	92.5 % des souches	/	- 40% - 55% - 70% - 65% - 60% - 60%
Hassani et Hassani, 2017	1	- <i>Fusarium oxysporum</i>	100% des souches	De 16.66% à 70%	100%
Bouras, 2018	1	- <i>Fusarium oxysporum</i>	50 % des souche	De 20% à 97%	50%

Selon Cherif, (2014), la majorité des *Bacillus* testés ont au moins une action inhibitrice envers une souche fongique et plus. Quatre d'entre elles (Ba7, Ba11, D13 et B16) inhibent la croissance de la totalité (n=6) des

champignons et 10 autres sont antagonistes envers cinq. Seules 15 souches sont efficaces contre *A. alternata*. L'antagonisme envers *P. infestans* est induit par les souches D1 et B1. *A. niger* est inhibé par 12 souches les plus actives sont B8, B10, B21 et B23 (isolées d'un même sol).



**Figure 14** : Exemple des résultats obtenus lors du test de l'activité antifongique Cherif, 2014 (B) ; Hassani et Hassani, 2017 (A) et Bouras, 2018 (C).

La totalité des souches testé par **Hassani et Hassani, (2017)** ont manifesté une activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*. Les souches (GN1 et Nf10) ont montré une forte activité antifongique avec des taux d'inhibition de 66.66 % à 70%. Par ailleurs, les isolats (GN2, GN5, GN7, GN8-1, GN10, GN 11-1 et GN14-1) ont manifesté une activité antifongique modérée avec des taux d'inhibition variant de 46% à 60%.

Les *Bacillus* sont connus pour leur activité antifongique importante, celle-ci est liée à leur capacité produire une variété de métabolites puissants et des enzymes hydrolytiques (**Rahman et al. 2007**). De ces métabolites on peut citer l'excrétion des lipopeptides actifs (**Ongera et al., 2005**) dont l'activité biologique est liée à leur effet sur les lipides de la membrane cellulaire où ils peuvent favoriser selon la concentration, la formation de pores irréversible dans la double couche de phospholipides. Ces peptides antifongiques inhibent la croissance d'un grand nombre de champignons, y compris *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, les bactéries et les oomycètes (**Munimbazi et Bullerman, 1998**). Les espèces de *Bacillus* comme *amyloliquefaciens*, *subtilis*, *cereus*, *licheniformis*, *megaterium*, *mycoides* et *pumilus* sont connues comme de puissants producteurs de molécules antibiotiques très efficaces. *B. subtilis* a une moyenne de 4 à 5 % de son génome consacré à la synthèse d'antibiotiques (**Stein et al., 2005**). Il est aussi largement utilisé en lutte biologique comme un agent de biocontrôle puissant (**Knaak et al., 2007**).

### 2.5. Screening des souches pour la production d'acide cyanhydrique HCN

L'acide cyanhydrique est un inhibiteur métabolique général, il est excrété par les PGPR comme moyen d'éviter la prédation ou la compétition (**Heydari et al., 2008**).

**Tableau 8:** Analyse des résultats pour le test de production de HCN.

Auteurs	Taux d'expression de l'activité
<b>Cherif, 2014</b>	2.5% des souches

Hassani et Hassani, 2017	Non testée
Bouras, 2018	90% des souches

L'analyse des résultats (**Tableau 8**) montre que quatre-vingt-dix pourcent des souches isolées par **Bouras, (2018)** sont capable de produire du HCN. En revanche, la majorité des souches isolées par **Cherif, (2014)** ne possèdent pas la capacité de produire ce métabolite. Ceci est dû, selon **Cherif, (2014)**, à l'absence des gènes (*hcn*) responsables de la production de ce métabolite (**Laville et al., 1998**), ou bien d'un précurseur adéquat utilisé. En plus de la glycine comme précurseur, d'autres composés peuvent être utilisés tels que le glutamate ou la méthionine (**Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986**).

### 3. Effet des *Bacillus* sur la germination des graines de blé dur

Selon **Backer et al., (2018)**, les souches PGPR doivent être criblées pour leur capacité à améliorer la germination de plantes cultivées. Les isolats prometteurs peuvent ensuite être criblés pour leur capacité à accélérer l'émergence et la croissance précoce des plantes, dans des conditions d'environnement contrôlées car, selon **Etesami et al., (2015)**, dans de nombreux cas les PGPR n'induisent pas les effets désirés lorsqu'ils sont appliqués in vivo.

**Tableau 9:** Analyse des résultats pour le test d'activité antifongique.

Auteurs	Plante testé	Paramètres adopté pour l'évaluation	Proportion des souches PGPR pour chaque paramètre	Proportion des souches PGPR
---------	--------------	-------------------------------------	---------------------------------------------------	-----------------------------

Cherif, 2014		Test non réalisé		
Hassani et Hassani, 2017	Pois chiche	- Pourcentage de germination	60%	20% (3/15 souches)
		- Taille des plantules	26.66%	
		- Indice de vigueur.	20%	
Bouras, 2018	Lentille	- Poids sec	10%	5% (1/20 souches)
		- Poids frais	10%	
		- Taille des plantules	20%	

Selon **Hassani et Hassani, (2017)**, les souches de *Bacillus* testées ont exercé trois types d'effet sur la germination des graines de pois chiche : un effet répressif a été observé avec les souches GN2, GN3, GN5, GN11-1, GN15, GN1, GN4, GN10, GN8, GN8-1 et GN13 ou l'indice de vigueur a été nettement plus faible que le témoin. Un effet de promotion a été noté chez les graines inoculé par les souches GN5-1, GN7, GN14-1, cependant, La souche GN12 avait un effet neutre, l'indice de vigueur de cette souche été très proche de celui du témoin.

Les souches à effet promoteur de croissance ont exercé un très bon pouvoir de promotion sur la germination elle-même et sur le développement des jeunes plantules. Une nette amélioration de la longueur des racines et des tiges a été observée chez les lots traités avec ces souches en comparaison avec les lots non traités et ceux ayant reçus le reste des isolats. La capacité des bactéries PGPR à améliorer la germination des plantes a aussi été rapportée par **Yadav et al., (2010)**.

Pour **Bouras, (2018)**, une seule souches (B4) a témoigné d'un effet promoteur de croissance pour les plantules de lentille, tous les paramètres de croissances (poids sec, poids frais et longueur des plantules) sont améliorés sous l'effet de cette souche.

Les résultats rapportés par **Hassani et Hassani, (2017)** et **Bouras, (2018)** sont en accord avec ceux de **Nelson et al., (2004)**, ces auteurs ont aussi rapporté sur l'effet bénéfique des inoculat à *Bacillus*. L'inoculation des graines et des racines par les *Bacillus* PGPR cause l'augmentation de la croissance et

du rendement de différentes cultures (**Li et Alexander ; 1988 ; Vessey et Buss, 2002**)

---

# **Chapitre 4**

---

*Conclusion &  
perspectives*

---

Les *Bacillus* représentent le plus large et proéminent groupe de bactéries aérobies formant des endospores. Au secteur agricole, une large application des PGPR du genre *Bacillus* peut réduire la dépendance aux produits chimiques. De plus, c'est une technologie accessible, saine et durable. Les objectifs initialement tracés pour le présent travail étaient: L'isolement des bactéries PGPR du genre *Bacillus* à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur, la caractérisation de leur pouvoir PGPR *in vitro* et *in vivo* et l'identification des souches à fort pouvoir de promotion

La survenue de la pandémie du Covid 19 a empêché la bonne conduite de la présente étude et, de ce fait, on a transformé le travail expérimental prévu en une analyse bibliographique où ont été revus et discutés les contributions des scientifiques et chercheurs Algériens autour du thème abordé. Les travaux en question sont ceux de Cherif, 2014 (thèse de doctorat) ; Hassani et Hassani, 2017 (mémoire master) et Bouras, 2018 (thèse de doctorat).

A travers cette étude on a pu constater que les travaux analysés adoptent tous la même stratégie d'isolement et des protocoles de caractérisation similaires. Les auteurs de ces travaux admettent l'abondance de ces microorganismes dans nos sols. Ils se concentrent sur le potentiel PGPR de ces bactéries. Tous les isolats qu'il décrivent expriment des activités PGPR majeures tel que : la fixation d'azote, la production de HCN la solubilisation de phosphate tricalcique et la production d'acide indol-acétique et la fixation d'azote.

Ces travaux assurent l'efficacité des souches isolées à l'élimination des phytopathogènes de nature fongique. Leurs résultats suggèrent aussi la capacité de ces souches à améliorer les rendements des cultures auxquelles

elles sont appliquées car d'inoculation réalisés provoquent une nette amélioration de l'état de santé des plantules sous l'effet des inoculations réalisés

---

# *Références*

---

## *Bibliographiques*

**Acuña J. J., Jorquera M. A., Martínez O. A., Menezes–Blackburn D., Fernández M. T., Marschner P., Greiner R., Mora M. L. (2011).** Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 11 (3): 1-12.

**Ahemad M., Kibret M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University -Science*. 26: 1-20.

**Ahmad F., Ahmad I., Aqil F., Khan M. S., Hayat S. (2008a).** Diversity and potential of non symbiotic diazotrophic bacteria in promoting plant growth. *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Edited by Iqbal Ahmad, John Pichtel, and Shamsul Hayat. Copyright 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

**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.

**Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial. Research*. 163:173-81.

**Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. (2008b).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163: 173-181.

**Aidouni, A. et Mesmoudi, A. (2018).** Mémoire master Isolement, Identification et caractérisation des Azotobacters PGPR et leurs effets sur le blé dur. (*Triticum Durum*). UDL de Sidi Bel Abbas

**Ambreen Akhtar; Hisamuddin; Merajul Islam Robab; Abbasi, Rushda Sharf. (2012).** Plant growth promoting Rhizobacteria: An overview. *J. Nat. Prod. Plant Resour*. 2 (1):19-31.

**Anonyme A:** <https://www.bretagnecommerceinternational.com/donnee/perspectives-du-marche-mondial-des-biofertilisants-dici-2024/>

**Aouane, M. et Hamani, H. (2017).** Etude des PGPR “*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*” des plantes actinorhiziennes : cas de *Casuarina equisetifolia* et d’*Elaeagnus angustifolia*. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine.

**Arora NK, Tewari S, Singh R ,2013.** Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. In: Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, 411-449.

**Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context,

Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>.

**Barazani O., Friedman J. (1999)**. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 25: 2397-2406.

**Barazani, O. et J. Friedman (1999)**. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 25: 2397-2406.

**Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017)**. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169-178.

**Belaid D. (2000)**: aspect de la céréaliculture algérienne. Office des publications universitaires. Alger. P: 6, 7, 8, 9.

**Bonjean A et Picard E. (1999)**: Les céréales à paille origine, historique, économie et sélection. Edition Nathan. P: 235.

**Bonkowski, M., Villenave, C., et Griffiths, B. (2009)**. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant and Soil*, 321(1-2), 213-233.

**Borriss R. (2011)** Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents, p 41-76. In Maheshwari DK (ed), *Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses*. Springer Heidelberg, Heidelberg, Germany.

**Boulal. H, Zaghouane. O, EL Mourid. M et Rezgui. S (2007)** ; Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. ITGC, INRA, ICARDA, Algérie, 176 p.

**Bouras, 2018** (thèse de doctorat).

**Brenner D. J., Krieg R.N., Staley J.T. (2005)**. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Michigan State University publishers.

**Bric J. M., Bostock R. M., Silverstone S. E. (1991)**. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535-538.

**Caines, K. (2018)**. The Effect of Household Ammonia on Plant Growth. <https://homeguides.sfgate.com/effect-household-ammonia-plant-growth-102287.html#:~:text=Ammonia%20is%20present%20in%20soil,light%20energy%20into%20chemical%20energy>. Consulté le : 07/09/2020.

- Castric, PA. (1977).** Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 130 : 826-831
- Cherif Hafsa ,2014.** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus sp.* et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat. Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Université Ferhat Abbas Sétif 1
- Cherif, H. (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *bacillus sp. et pantoea agglomerans* isolées de sols (Doctoral dissertation).
- Compant, S., S. Duffy, J. Nowak, C. Clement et E.A. Barka (2005).** Use of plant growthpromoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principales, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9):4951-4959.
- Curl, E. A. et B. Truelove (1986).** The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.
- Dastager S. G., Deepa C. K., Pandey A. (2010).** Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 259-265.
- Dastager S.G., Deepa C.K., Pandey, A. (2010).** .Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.* 27: 259-265.
- Ding, Y., J. Wang, Y. Liu, et S. Chen (2005).** Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. Appl. Microbiol.* 99:1271–1281.
- Djermoun A (2009).** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Revue Nature et Technologie* 1 : 45-53.
- Ejiofor A. O., Johnson T. (2002).** Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *Indust. Microbiol. Biotech.* 28: 284-290.
- El-Mahrouk M. E., Belal, E. B. A. (2007).** Production of indole acetic acid (bioauxin) from *Azotobacter sp.* Isolate and its effect on callus induction of *Dieffenbachia maculate* cv. Marianne. *Acta biologica szegediensis.* 51(1): 53 - 59.
- Emanuel G., Lorrence H. G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA. 13: 8493-9365.
- Emanuel G., Lorrence H. G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA. 13: 8493-9365.
- Emily claudia ricci,2015.**investingating the role of pseudomonas sp. And bacillus sp .biofilms as plant growth promoting inoculants.McGill university,motereal.Quebec.Canada

**Etesami, H., Alikhani, H. A., & Hosseini, H. M. (2015).** Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. In *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem* (pp. 183-258). Springer, Cham.

**Fellah, S. et Bensahla, M. (2019)** Isolement et caractérisation des bactéries rhizosphériques à potentiel biofertilisant mémoire finale UDL. SBA

**Francis, C.A., A.Y. Obratzson et B.M. Tebo (2000).** Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *P. agglomerans* SPI. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:543-548.  
from forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 24:389–395

**Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019).** Analysis of Indole-3-Acetic-Acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the salkowski method. *Bio-Protocol*, 9(9), 1-9.

**Gate Ph. (1995):** Ecophysiologie du blé, de la plante à la culture. Ed. Lavoisier. Tec et Doc. P: 429. **Gaur A. C. (1990).** Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers. 1st Edn., Omega Scientific Publishers, New Delhi, India, ISBN: 81-85399-09-3

**Gerbaldo G. A., Barberis C., Pascual L., Dalcero A., Barberis L. (2012).** Glick, 1995). Glick BR, Bashan Y (1997) .Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phyto-pathogens. *Biotechnol. Adv.* 15:353-378.

**Govind Gupta, Shailendra Singh Parihar, Narendra Kumar Ahirwar, Sunil Kumar Snehi and Vinod Singh ,2015.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture, *MicrobBiochemTechnol*, 7:2

**Grayston SJ., Vanghan D., Jones D.(1996).** Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5, 29-56p.

**Guemori-Athmani, S., O. Berge, , M. Bourrain,, P. Mavingui, , JM. Thiery, T. Bhatnagar et T. Heulin (2000).** Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36 :149–159.

**HACINI, N,**”Etude de l’interaction Génotype X Environnement et effet de l’origine de quelques cultivars de blé dur (*Triticum durum* Desf.) sur les aptitudes adaptatives et qualitatives”, Thèses de doctorat, département de biologie, Université BADJI Mokhtar de Annaba, 2014.

**Hamdache A , Azaker R., Lamarti A , Aleu J. and Collado, LG. (2013)** Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. *Phytochem Rev* 12: 685-716.

**Hartono, N., Asnawati, F., Citra, H., Handayani, N. I., Junda, M., Ali, A., & Jumadi, O.** (2016). Ability of ammonium excretion, indol acetic acid production, and phosphate solubilization of nitrogen-fixing bacteria isolated from crop rhizosphere and their effect on plant growth. *ARPJN Journal of Engineering and Applied Sciences*. 11. 11735-11741.

**Hassani H., Hassani E. (2017).** Contribution à l'étude des bactéries phyto-bénéfiques de la rhizosphère du pois chiche (*Cicer arietinum*) mémoire master.

**Heydari, S., P.R. Moghadam et S.M. Arab (2008).** Hydrogen Cyanide Production Ability by *Pseudomonas* Fluorescence Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. Proceedings "Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development", Tropentag, Hohenheim.

**Hinsinger P, Gobran G.R, Gregory P.J, Wenzel W. 2005.** Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168, 293-303p.

**Holl, FB. et CP. Chanway (1992).** Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.* 38: 303-308.

**I.T.C.F (Institut Technique des Céréales et des Fourrages). (2002):** Le blé tendre. Ministère de l'agriculture. Algérie. Document de vulgarisation. P: 7-55.

**Illmer P., Schinner F. (1995).** Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27(3): 257-263.

**Illmer, P., et F. Schinner (1992).** Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated

**J.M.Gobat, M. Aragno, W. Mathez. (2003).** Le sol vivant: bases de pédologie biologique des sols. Presses Polytechniques et Universitaires, Lausanne. 5-6p.

**Jacques P. Clement-grandcourt M. (2003):** Les céréales (2ème édition) Revue et augmentée, J-B. Ballière et Fils, Editeurs 19, rue Hautfeuille, Paris-VIe . P: 14, 15.

**Jnawali AD, Ojha RB, Marahatta S. (2015).** Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—a review. *Adv Plants Agric Res.* 2015;2 (6):250–253. DOI: 10.15406/apar.02.00069.

**Jnawali, A. D., Ojha, R. B., & Marahatta, S. (2015).** Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—A Review. *Adv. Plants Agric. Res.* 2(6), 1-5.

**Joseph B., Ranjan Patra R., Lawrence R. (2007).** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*. 2: 141-152.

- Kang, S.-M., Khan, A. L., Hamayun, M., Hussain, J., Joo, G.-J., You, Y.-H., et Lee, I.-J. (2012).** Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones. *Journal of Microbiology*, 50(6), 902-909.
- Kaymak H.C. (2010).** Potential of PGPR in Agricultural Innovations. In: **D.K. Maheshwari** (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Microbiology Monographs. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-13612-2-3.
- 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.
- Khalid, A., M.Arshad. et Z.A. Zahir (2004).** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 473-480(8).
- Khan M. S., Zaidi A., Wani P. A., Ahemad M., Oves M. (2009).** Chapter 6: Functional Diversity Among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Current Status. In: **M. S. Khan et al.** (eds.). 2009. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-01979-1-6.
- Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M, Wani PA ,2010.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Arch Agron Soil Sci* 56:73-98.
- 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.
- Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A ,2008.**Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304: 35-44
- Kumar P, Dubey RC ,2012.**Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of *Phaseolus vulgaris*. *J CurrPersApplMicrobiol* 1: 6-38
- Kumar, A., Kumar, K., Kumar, P., Maurya, R., Prasad, S., & Singh, S. K. (2014).** Production of indole acetic acid by *Azotobacter* strains associated with mungbean. *Plant Archives*, 14(1), 41-42.
- Lahmer, H. et Malki, A. (2014).** Isolement, et caractérisation des bactéries de diazotrophes associées au pois chiche. Mémoire de master. Université de Sidi Bel Abbas.
- Laville, J., C. Blumer, C. Von Schroetter, V. Gaia, G. Delfago, C. Keel et D. Haas (1998).** Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic

regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. J. Bacteriol., 180 : 3187- 3196.

**Li D. M., Alexander M. (1988).** Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. Plant Soil. 108:211-219.

**Maalem Ahlem, Sansri Dalal. (2014).** Activité anti-phytopathogènes de quelques souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux et des *Pseudomonas* spp fluorescents. Université 8 Mai 1945 Guelma. 22p.

**Magda M. A., 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): 667-677.

**Malleswari D., Bagyanarayana G. (2013).** In vitro screening of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of medicinal and aromatic plants for multiple plant growth promoting activities. J. Microbiol. Biotech. Res. 3 (1): 84- 91.

**Marchal N., Bourdon J. L., Richard C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, Paris.

**Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R., et Crowley, D. (2001).** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry, 33(11), 1437-1445.

**McSpadden Gardener B.B. (2004)** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. Phytopathology, 94: 1252-1258.

**Miraza, M S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et KA. Malik (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. Plant Soil, 237:47–54.

**Mouas Bourbia, Sophia. (2012).** Biodisponibilité du potassium dans la rhizosphère de *Olea europea* L. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. 19-20p.

**MuneesAhemad, MulugetaKibret , 2013 .** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, Journal of King Saud University – Science, January Volume 26, Issue 1, Page 1–20.

**Munimbazi, C. et LB. Bullerman (1998).** Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. J. Appl. Microbiol. 84:959-969.

**N.Khaki pour, K. Khvazi, H. Mojallali, E. Pazira, H. Asadirahmani. (2008).** production of auxin hormonr by Fluorescent pseudomonas. American-Eurasian Journal Agriculture end Environment Science(6) 687-688p.

**Naik P. R., Sakhivel N.(2006).** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp.strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. Res. Microbiol,157: 538-546.

**Narula N., Kukreja K., Kumar V., Lakshminarayana K. (2002).** Phosphate solubilization by soil isolates of *Azotobacter chroococcum* and their survival at different temperatures. Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics. 103(1): 81 - 87.

**Nautiyal C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 170 (1): 265–270, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.

**Nautiyal C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS. Microbiol. Lett.* 170: 265- 270.

**Nautiyal, CS. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170: 260-270.

**Naznin HA, Kimura M, Miyazawa M, Hyakumachi M,2012.** Analysis of volatileorganic compounds emitted by plant growth promoting fungus phoma sp. GS8- 3 for growth promotion effects on tobacco. *Microbe Environ* 28: 42-49.

**Neilands, J.B., 1995.** Siderophores structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.

**Nelson L. M. (2004).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): prospects for new inoculants. *Crop Manag.* doi:10.1094/CM-2004-0301-05-RV.

**Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P. (2011).** Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15 (2): 327- 337.

**Ojha, A. D., Marahatta, R. B. S. (2015).** Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—a review. *Adv Plants Agric Res.* 2(6):250–253. DOI: 10.15406/apar.2015.02.00069.

**Ongena, M., P. Jacques, Y. Toure, , J. Destain, A. Jabrane et P. Thonart (2005).** Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:29-38.

**Parmar P, Sindhu SS ,2013.** Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *J Microbiol Res* 3: 25-31.

**Patten C. L., Glick B. R. (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ.Microbiol*, 68: 3795-3801.

**Patten, C.L. et B. R. Glick (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 3795-3801.

**Pérez-Garcia, A , Romero, D., Zeriuoh, H. and de Vicente, A. (2011)** Biological control of phytopathogenic fungi by aerobic endospore-formers. In *Aerobic, Endospore-forming Soil Bacteria*; ed. Logan, N.A and De Vos, P. pp. 157-180 Berlin: Springer-Verlag.

**Philippe, Hinsinger.** «Les racines au cœur du fonctionnement de la rhizosphère », In Montpellier SUPAgrO - ClrAD - InrA - IrD1, n°101, mai-juin2010, 17.

**Plunkett, M. (2018).** Optimization of Ammonium and Biohydrogen Production from Mutant Strains of *Azotobacter vinelandii* Deregulated for Nitrogen Fixation.

**Plunkett, M. H., Knutson, C. M., & Barney, B. M. (2020).** Key factors affecting ammonium production by an *Azotobacter vinelandii* strain deregulated for biological nitrogen fixation. *Microbial Cell Factories*, *19*, 1-12.

**Ponmurugan K., Sankaranarayanan A., Naif Abdullah Al-Dharbi. (2012).** Biological Activities of Plant Growth Promoting *Azotobacter sp.* Isolated from Vegetable Crops Rhizosphere Soils. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 6 (4): 1- 10.

**Prakash P., Karthikeyan B. (2013).** Isolation and Purification of Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of *Acorus Calamus* grown soil. *Indian Streams Research Journal*. 3 (7). ISSN 2230-7850.

**Radhakrishnan et coll., 2017** R. Radhakrishnan , A. Hashem , EF Abd\_Allah Bacillus: un outil biologique pour l'amélioration des cultures par des changements biomoléculaires dans des environnements défavorables *Front Physiol.* , 8 ( 2017 ) , p. 667.

**Rahman M. S., Ano T., Shoda M. (2007).** Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127:503-507.

**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.

**Ramey BE, Matthyse AG, Fuqua C ,2004.** The FNR-type transcriptional regulator SinR controls maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. *Mol Microbiol* 52:1495–1511.

**Rogers J.R., Bennett, P.C. and Choi, W.J., 1998,** Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *American Mineralogy*, 83, 1532-1540.

**Rovira AD. 1969.** Plant root exudate. *Botany Revue* 35, 35-57p.

**Saharan B. S., Nehra V. (2011).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*. 21.

**Salma Taktek ,2015.** Dissolution biologique des phosphates : Interaction bactéries – mycorhizes. Thèse de doctorat . université LAVAL québec canada

**Schallmey, M., Singh, A. and O. P. Ward. (2004)** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Cano J. Microbiol.* 50: 1-17.

**Schleifer K.H. (2009)** Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: Vos P, Garrity G, Jones D et al (eds) *Bergey's Manual® of systematic bacteriology*. Springer, New York, pp 19-1317.

**Schroder P, Hartmann A. (2003).** Global Soils: New Developments in Rhizosphere Research. *J. Soils & Sediments* 3 (4). 227p.

**Schwachtje, J., Karojet, S., Kunz, S., Brouwer, S., & van Dongen, J. T. (2012).** Plant-growth promoting effect of newly isolated rhizobacteria varies between two *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Signaling & Behavior*, 7(6), 623-627.

**Sethi S. K., Adhikary S. P. (2012).** *Azotobacter*: A Plant Growth- Promoting Rhizobacteria Used as Biofertilizer. *Dynaic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology.* 6 (1): 68- 74.

**Sgroy V., Cassan F., Masciarelli O. Del Papa M. F., Lagares A., Luna V. (2009).** Isolation and characterization of endophytic plant growth promoting (PGPB) or stress homeostasis regulating (PSHB) bacteria associatioted to halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl microbial biotechnol.* DOI 10.1007/S00253-009-2116-3

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

**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, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

**Shilev S ,2013.** Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. Chappitre5 plant microbe symbiosis fundamentals and advance naveenkumararora editor.

**Shrivastava S., Egamberdieva D., Varma A. (2015).** Chapter 1: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants: The State of the Art. **In : D. Egamberdieva et al.** (eds.). *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*, *Soil Biology* 42, DOI 10.1007/978-3-319-13401-7-1.

- Silini A. (2013).** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de *Azotobacter* et sur la croissance du blé en milieu salin. Thèse de Doctorat. Université de Sétif.
- Silini A. (2013).** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de *Azotobacter* et sur la croissance du blé en milieu salin. Thèse de Doctorat. Université de Sétif.
- Sitepu I. R., Hashidoko Y., Santoso E and Tahara S. (2007).** Potent phosphate-solubilizing bacteria isolated from dipterocarps grown in peat swamp forest in Central Kalimantan and their possible utilization for biorehabilitation of degraded peatland. Proceedings of the international symposium and workshop on tropical Peatland, Yogyakarta.
- Slepecky R. and Hemphill E. (2006)** The genus *Bacillus*. Nonmedical. The Prokaryotes, vol 4 (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E, eds), pp. 530-562. Springer, New York.
- Smibert R. M., Krieg N. R. (1994).** Phenotypic characterization. In: Methods for general and molecular bacteriology. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C, 607-654.
- Stein A. C., Sortino M., Avancini C., Zacchino S., Von Poser G. (2005).** Ethnoveterinary medicine in the search of antimicrobial agents: Antifungal activity of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.*, 99: 211-214.
- Tripathi et al., 2012** DK Tripathi, vice - président Singh, D. Kumar, DK Chauhan Impact de l'ajout de silicium exogène sur l'absorption de chrome, la croissance, les éléments minéraux, le stress oxydatif, la capacité antioxydante et les structures des feuilles et des racines chez les plants de riz exposés au chrome hexavalent *Acta Physiol. Plante.*, 34 (1) (2012), pp. 279 – 289.
- Trivedi P., Pandey A., Palni L. M. S. (2008).** In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. *Microbiol. Res.* 163 : 329- 336.
- Upadhyay, S., Kumar, N., Singh, V. K., & Singh, A. (2015).** Isolation, characterization and morphological study of *Azotobacter* isolates. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(2), 984-990.
- Vikram P. (2011).** Production of Indole Acetic Acid by *Azotobacter sp.* *Recent Research in Science and Technology.* 3 (12): 14- 16.
- Wani, P.A., M.S. Khan et A. Zaidi (2007).** Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170: 283-287.
- Weise, T., Kai, M., & Piechulla, B. (2013).** Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *PLoS one*, 8(5), e63538.

*Annexes*

## Annexe 1 : Composition des milieux de culture

<i>Composants</i>	<i>Poids en g/l</i>
<b><u>Milieu Nutritif solide</u></b>	
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15
Eau distillée	qsp 1000ml
pH 7.2	
<b><u>Milieu N-free</u></b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.2
CaCO <sub>3</sub>	1.0
NaCL	0.2
Glucose	10
Agar	18
Eau distillée	qsp 1000 ml
pH 7.2	
<b><u>Milieu Pikovskaya agar</u></b>	
Extrait de levure	0.50
Glucose	10
Tricalcium phosphate	5
Sulfate d'ammonium	0.50
Chloride de potassium	0.20
Sulfate de magnésium	0.1
Sulfate de manganèse	0.0001
Sulfate de fer	0.0001
Agar	15
Eau distillée.	qsp 1000 ml
pH 7.2+/- 0.2 à 25°C.	
<b><u>Milieu Luria Bertani</u></b>	
Tryptone	1
NaCl	1
Extrait de levure	0.5
Agar	15
Eau distillée	qsp 1000 ml.
pH 7	
<b><u>Milieu PDA</u></b>	
Pomme de terre épluchée	20
Glucose	200
Agar	20
Eau distillée	qsp 1000 ml.
pH 7	

<b><u>Milieu TSA</u></b>	
Hydrolysats enzymatique de caséine	15
Peptone de soja	5
Chlorure de sodium	5
Agar	12
Eau distillée	qsp 1000 ml.
<b><u>Milieu Mannitol Mobilité</u></b>	
Hydrolysats trypsique de caséine	10
Mannitol	7.5
Rouge de phénol	0.004
Nitrate de potassium	1
Agar	3.5
Eau distillée	qsp 1000 ml
pH = 7,6	
<b><u>Gélose au lait écrémé</u></b>	
Lait écrémé	10
Peptone	5
Agar	18
Eau distillée	qsp 1000 ml.
pH 7.2	
<b><u>Gélose à la chitine colloïdale</u></b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)	0.5
FeSO <sub>4</sub>	0.01
ZnSO <sub>4</sub>	0.001
MnCl <sub>2</sub>	0.001
Chitine colloïdal	2%
Agar	2%
Eau distillée	qsp 1000 ml
<b><u>Gélose Viande foie</u></b>	
Peptone viande-foie	30
Amidon soluble	2
Glucose	2
Sulfite de sodium	2.5
Citrate ferrique ammoniacal	0.5
Agar	11
Eau distillée	qsp 1000 ml.

<b><u>Réactif de salkowski</u></b>	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150 ml
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O 0,5 M	7.5 ml.
Eau distillée	250 ml
<b><u>Solution du picrate alcalin</u></b>	
Acide picrique Na <sub>2</sub>	2.5
CO <sub>3</sub>	12.5
Eau distillée	qsp 1000 ml.

**Annexe 02 : Techniques**

- **Coloration de Gram**

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec Bunsen.
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir avec de Lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

## Identification par API système :

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés

spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

### Technique :

**1. Préparation de la galerie :** Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

**2. Préparation de l'inoculum :** Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de suspension medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

### **3. Inoculation de la galerie :**

Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne. Remplir uniquement les tubes des autres tests.

Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

**4. Lecture :** Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

### Préparation de la chitine colloïdale

1- La chitine colloïdale est préparée à partir de la poudre de chitine disponible dans le commerce (Sigma) basé sur la méthode décrite par **Arnold et Solomon (1986)**. 20 g de la poudre de chitine (Sigma) est mélangé avec 400 ml de HCl concentré puis incubée pendant une nuit dans une chambre fraîche. Ensuite, le pH de la suspension résultante est neutralisé en ajoutant du NaOH 10N.

2- Après avoir gardé la suspension pendant la nuit au réfrigérateur, elle est centrifugée à (5.000 tr / min pendant 30 min) et lavée avec 2 litres d'eau distillée pour le dessalage. La chitine colloïdale est prête à l'emploi.

3- Le déchet avec la chitine colloïdale préparé à partir de la poudre de chitine (Sigma) est utilisé comme substrats pour la production de chitinase.