

**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  
*Azotobacters* PGPR et leurs effets sur le blé dur.**

***(Triticum Durum).***

**Présenté par :**

**M<sup>me</sup> : GHELDANE Meroua**

**M<sup>me</sup> : KRALIL Amina**

**Soutenu le : 27/09/2020**

**Devant le jury :**

**Président : Mr BENNINE A. Maître de conférences A (UDL de Sidi Bel Abbes).**

**Examineur : M<sup>me</sup> KHALDI A. Maître de conférences B (UDL de Sidi Bel Abbes).**

**Encadreur : M<sup>me</sup> GHALM M. Maître Assistant B (UDL de Sidi Bel Abbes).**

**Année universitaire 2019-2020**

## *Remerciements*

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

*Nous exprimons nos remerciements à notre encadreur **Mme GHALEM.M** Maitre de conférence B 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 président du jury **Mr Bénine.A** Maître de conférences A l'UDL de Sidi Bel Abbes.*

*Nous exprimons des remerciements aussi au membre du Jury : **Mme. KHALDIA** Maître de conférences A. pour leurs encouragements et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail*

*Nous remercierons très chaleureusement tous nos enseignants de biotechnologie microbienne.*

## *Dédicaces*

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

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

*A mon père, qui est toujours présent et continue de l'être pour faire mon bonheur, Merci pour m'avoir donné cette vie si diverse, et de m'avoir permis d'aller au bout de mes choix sans restriction.*

*A ma mère pour son soutien tout au long de mes études sa bienveillance et ses conseils ont été très précieux, je tiens à lui témoigner ma profonde affection et reconnaissance.*

*A mes très chères sœurs.*

*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.*

**AMINA**

## *Dédicaces*

*Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux. Louange à dieu qui m'a aidé durant des années, éclairé et ouvert les portes du savoir.*

*C'est avec une profonde émotion que je dédie ce travail :*

*A la mémoire de mon père*

*A ma grande mère*

*A ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils.*

*A mes frères Messaoud et Mohammed et ma sœur Hakima*

*A tous qui m'ont apporté du soutien toute ma vie*

*A tous mes enseignants*

*Meroua*

## Résumé :

Le genre *Azotobacter* est un exemple pertinent des biofertilisants fixateurs d'azote. Il est aussi une composante essentielle des préparations commerciales de celles-ci. Le choix du thème du présent travail ressort de notre conviction que l'utilisation des espèces efficaces d'*Azotobacter* peut très bien booster la conversion du système agricole vers une agriculture biologique et durable. L'objectif tracé pour le présent travail été l'isolement et la sélection de souches PGPR diazotrophes (du genre *Azotobacter*) à fort potentiel biofertilisant à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur cultivées sur le sol de la région de Tessela (willaya de Sidi Bel Abbas), de caractériser leur potentiel PGP, et d'étudier l'impact des inocula formulés de ces souches sur la germination du blé dur.

L'avènement de la pandémie du Covid 19 et l'instauration des mesures préventifs par l'état ont entravés la bon conduite de la présente étude et de ce faite on s'ait retrouvé contraint à transformés le travail expérimental prévu en une analyse bibliographique ou ont été revus et discutés les contributions des scientifiques et chercheurs Algériens autour du thème abordé.

A travers cette étude on a pu constater qu'en Algérie peu d'intérêt est porté aux biofertilisants et surtout au genre *Azotobacter* et que les productions scientifiques à ce sujet sont minime.

Les auteurs de ces travaux admettent la faible abandance de ces microorganismes dans nos sols. Ils se consentent sur le potentiel PGPR de ces bacteries. La sélection des isolats les plus performants par les auteurs de ces travaux s'appuyant sur leur capacité à produire des activité et des métabolites particuliers (la solubilisation de phosphate tricalcique, la production du NH<sub>3</sub>, la production d'acide indol-acétique et la fixation d'azote), Les isolats rapportés, dont le nombre ne dépasse pas généralement pas les 20, présentent un important potentiel de promotion de la croissance des plantes in vitro et in vivo, les *Azotobacters* isolés exercent un bon pouvoir de promotion sur la germination des plantes testées. L'utilisation de telle bio engrais peut substituer à l'utilisation courante des engrais chimiques xénobiotiques et nocifs.

**Mots clés :** *Azotobacter*, PGPR, blé dur, effet promoteur, biofertilisant, Algérie.

**Abstract:**

The genus *Azotobacter* is a relevant example of nitrogen-fixing biofertilizers. It is also an essential component of the commercial preparations thereof. The choice of the topic of this work arises from our conviction that the use of efficient species of *Azotobacter* can very well boost the conversion of the agricultural system towards organic and sustainable agriculture. The objective outlined for the present work was the isolation and selection of diazotrophic PGPR strains (of the genus *Azotobacter*) with high biofertilizing potential from the rhizosphere of durum wheat plants cultivated on the soil of the Tessela region (willaya de Sidi Bel Abbas), to characterize their PGP potential, and to study the impact of inocula formulated from these strains on durum wheat germination.

The advent of the Covid 19 pandemic and the establishment of preventive measures by the state hampered the proper conduct of this study and as a result we found ourselves forced to transform the planned experimental work into a bibliographic analysis or were reviewed and discussed the contributions of Algerian scientists and researchers around the topic addressed.

Through this study it was observed that in Algeria little interest is shown in biofertilizers and especially in the genus *Azotobacter* and that scientific production on this subject is minimal.

The authors of this work admit the low abandonment of these microorganisms in our soils. They agree on the PGPR potential of these bacteria. The selection of the best performing isolates by the authors of this work based on their ability to produce specific activities and metabolites (the solubilization of tricalcium phosphate, the production of NH<sub>3</sub>, the production of indol-acetic acid and the binding of of nitrogen), The reported isolates, the number of which does not generally exceed 20, show an important potential for promoting plant growth in vitro and in vivo, the isolated *Azotobacters* exert a good power of promotion on the germination of plants tested. The use of such biofertilizers can replace the common use of xenobiotic and harmful chemical fertilizers.

**Keywords:** *Azotobacter*, PGPR, durum wheat, promoter effect, biofertilizer, Algeria.

## التلخيص :

يعتبر جنس *Azotobacter* مثلاً ذا صلة بالأسمدة الحيوية المثبتة للنيتروجين. كما أنه عنصر أساسي في المستحضرات التجارية له. ينبع اختيار موضوع هذا العمل من قناعتنا بأن استخدام الأنواع الفعالة من *Azotobacter* يمكن أن يعزز بشكل جيد تحويل النظام الزراعي نحو الزراعة العضوية والمستدامة. كان الهدف المحدد لهذا العمل هو عزل واختيار سلالات PGPR المثبتة للآزوت من جنس *Azotobacter* مع إمكانات عالية للتخصيب الحيوي من جذور نباتات القمح الصلب المزروعة في تربة منطقة تسالة بولاية سيدي بلعباس ، لتوصيف إمكانات PGPR ، ودراسة تأثير اللقاح المصنوع من هذه السلالات على إنبات القمح الصلب.

أدى ظهور وباء كوفيد 19 وتأسيس تدابير وقائية من قبل الدولة إلى إعاقة سير هذه الدراسة بشكل صحيح ونتيجة لذلك وجدنا أنفسنا مضطرين لتحويل العمل التجريبي المخطط له إلى تحليل بيليوغرافي أو تمت مراجعة ومناقشة مساهمات العلماء والباحثين الجزائريين حول الموضوع الذي تم تناوله.

من خلال هذه الدراسة لوحظ أنه في الجزائر يظهر القليل من الاهتمام بالأسمدة الحيوية وخاصة في جنس *Azotobacter* وأن الإنتاج العلمي حول هذا الموضوع ضئيل.

يعترف مؤلفو هذا العمل بالتخلي المنخفض عن هذه الكائنات الحية الدقيقة في تربتنا. يتفوقون على إمكانات PGPR لهذه البكتيريا. اختيار أفضل العزلات أداءً من قبل مؤلفي هذا العمل بناءً على قدرتهم على إنتاج أنشطة ومستقلبات محددة إذابة فوسفات ثلاثي الكالسيوم ، وإنتاج  $NH_3$  ، وإنتاج حمض الخليك الإندول ، وربط النيتروجين ، تُظهر العزلات المبلغ عنها ، والتي لا يتجاوز عددها بشكل عام 20 ، إمكانات مهمة لتعزيز نمو النبات في المختبر وفي الجسم الحي ، تمارس *Azotobacters* المعزولة قوة جيدة في الترويج على إنبات تم اختبار النباتات. يمكن أن يحل استخدام مثل هذه الأسمدة الحيوية محل الاستخدام الشائع للأسمدة الكيماوية غير الحيوية والأسمدة الكيماوية الضارة.

الكلمات الرئيسية *Azotobacter* ، : PGPR ، القمح الصلب ، تأثير المروج ، الأسمدة الحيوية ، الجزائر.

## ***LISTE DES ABREVIATIONS :***

<b>%</b>	pourcent.
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	molybdate d'ammonium
<b>°C</b>	Degré Celsius.
<b>µl</b>	Microlitre.
<b>µm</b>	Micromètre.
<b>AIA</b>	Acide indole acétique.
<b>cm</b>	Centimètre.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone.
<b>DAP</b>	Di azotophosphate.
<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><sup>-2</sup></b>	Phosphate mono basique.
<b>IS</b>	Indice de solubilisation.
<b>IV</b>	Indice de vigueur.
<b>Kg</b>	kilogramme.
<b>kg/ha</b>	Kilogramme par hectare
<b>l</b>	Litre.
<b>LB</b>	milieu de culture Luria-Bertani
<b>LR</b>	la longueur des racines .
<b>LT</b>	la longueur des tiges .
<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>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniac.
<b>No</b>	Numéro.
<b>P</b>	Phosphore.
<b>PBH</b>	Poly -β-hydroxy butyrates.
<b>PGPR</b>	Plants Growth Promoting Rhizobacteria.
<b>PH</b>	Potentiel d'hydrogène.
<b>PK</b>	Phosphate potassium.
<b>PSR</b>	le poid sec des racines.
<b>PST</b>	le poid sec des tiges .
<b>Q<sub>x</sub>/ha</b>	Quintaux par hectar.
<b>rpm</b>	Rotation par minute.
<b>SnCl<sub>2</sub></b>	le chlorure d'étain
<b>T</b>	Tonnes.
<b>V</b>	Volume.
<b>VF</b>	Viande foie.
<b>µg</b>	Microgra

## *Liste des tableaux :*

<b>Tableau I :</b> Classification du blé dur .....	4
<b>Tableau II :</b> Surface, production et importation des céréales en Algérie de septembre 2003 jusqu'en mai 2012.....	5
<b>Tableau III:</b> Détermination du type respiratoire .....	24

## *Liste des figures :*

<b>Figure 1:</b> La rhizosphère. ....	8
<b>Figure 2:</b> Les mécanismes d'action des PGPR.....	12
<b>Figure 3:</b> Localisation du site d'échantillonnage.....	20
<b>Figure 4:</b> Lecture des résultats du test mannitol mobilité. ....	23
<b>Figure 5:</b> Aspects macroscopiques des isolats .....	29
<b>Figure 6:</b> Observation microscopique des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Grossissement x100) .....	30
<b>Figure 7:</b> Observation microscopique des isolats après coloration de Gram et mise en évidence de la formation des cystes (Grossissement x100) .....	30
<b>Figure 8:</b> Exemple d'un résultat positif et un résultat négatif au test de catalase.....	31
<b>Figure 9 :</b> Exemple d'un résultat positif au test d'oxydase. ....	31
<b>Figure 10 :</b> Exemple des résultats du test pour la recherche du type respiratoire. ....	32
<b>Figure 11:</b> Aspect des résultats de test de mobilité sur mannitol mobilité.....	33
<b>Figure 12:</b> Aspect des résultats du test de solubilisation de phosphore sur milieu Pikovskaya .....	34
<b>Figure 13:</b> Exemple des résultats du test de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya liquide (à gauche) et solide (à droite) .....	35
<b>Figure 14:</b> Production de l'acide indole acétique chez des isolats fixateurs d'azote en milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence de (5g/l) de L-tryptophane .....	36
<b>Figure 15 :</b> Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique.....	37
<b>Figure 16:</b> Exemple des résultats du test de production d'AIA d'isolats fixateurs d'azotes sur milieu de culture luria-Bertani (à gauche) additionné de (5g/l) de L- tryptophane (à gauche) .....	38
<b>Figure 17:</b> Résultats de la capacité des quatorze isolats à produire l'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) .....	39
<b>Figure 18:</b> Concentrations d'ammoniac NH <sub>3</sub> produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur milieu eau péptonée .....	39
<b>Figure 19 :</b> Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH <sub>3</sub> .....	40
<b>Figure 20:</b> Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azotes sur : le taux de germination, la longueur des racines (LR) et des tiges (LT), le poids sec des racines (PSR) et des tiges (PST) et l'indice de vigueur des graines de blé dur .....	41
<b>Figure 21:</b> Aperçu des résultats de test de germination .....	42

<b>Sommaire :</b>	<b>page</b>
Introduction .....	1

## *Chapitre 1 : Synthèse bibliographique*

1. Les céréales .....	3
2. La biologie du blé dur .....	3
2.1. Origine .....	3
2.2. Description du blé dur .....	3
2.3. Diversité génétique du blé .....	3
2.4. Classification du Blé Dur .....	4
2.5. Le blé dur en Algérie .....	4
2.5.1. Consommation .....	4
2.5.2. Production .....	5
2.5.3. Rendement.....	6
2.5.4. Apport en engrais .....	6
2.5.5. Problème de production .....	6
2.5.6. Solution pour améliorer la production de blé dur .....	7
3. Généralité sur la rhizosphère.....	7
3.1. Étymologie.....	7
3.2. Définition.....	8
3.3. Les bactéries rhizosphérique ou rhizobacteries .....	8
4. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes .....	9
4.1. Définition de Rhizobacteria (PGPR) .....	9
4.2. Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère .....	9
4.2.1. Les Rhizobia.....	9
4.2.2. Les PGPR diazotrophes.....	10

4.2.3.	Modes d'action des PGPR.....	11
4.2.4.	Effets bénéfiques des rhizobactéries .....	15
4.3.	Les effets Indirects.....	16
5.	Le genre <i>Azotobacter</i> .....	17

## *Chapitre 2: Matériels et méthodes*

1.	Objectif.....	20
2.	Matériel .....	20
2.1.	Isolats bactériens.....	20
2.2.	Matériel végétal .....	20
3.	Méthodes .....	21
3.1.	Isolement et caractérisation des bactéries du genre <i>Azotobacter</i> .....	21
3.1.1.	Isolement et purification des <i>Azotobacter</i> .....	21
3.1.2.	Purification .....	21
3.1.3.	Conservation des isolats .....	21
3.1.4.	Caractérisation des isolats .....	22
4.	Analyse des modes d'actions des PGPR.....	25
4.1.	Test de la solubilisation de phosphate .....	25
4.1.1.	Test de solubilisation de phosphate sur milieu solide .....	25
4.1.2.	Test de solubilisation de phosphate en milieu liquide.....	25
4.2.	Production des auxines (acide indole acétique).....	26
4.3.	Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ).....	26
4.4.	Effet des isolats sur la germination des graines de blé dur.....	27

## Chapitre3: Résultats et discussion

1.	L'intérêt du genre <i>Azotobacter</i> .....	28
2.	Isolement, purification et caractérisation des bactéries du genre <i>Azotobacter</i> .....	28
2.1.	Test de catalase, test d'oxydase & recherche du type respiratoire : .....	30
2.2.	Test de mobilité des isolats.....	32

3.	Screening des activités PGPR .....	33
3.1.	Solubilisation du phosphore inorganique .....	33
3.2.	Production d'acide indole acétique (AIA).....	35
3.3.	Production d'ammonium (NH <sub>3</sub> ).....	38
4.	Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du blé dur.....	40
	Conclusion.....	44
	Références bibliographiques.....	46
	Annexe.....	58

# **Introduction**

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

L'azote est essentiel à la croissance des plantes, son action positive sur les rendements des céréales fait de lui un facteur limitant quand les autres facteurs sont à leur optimum (eau, conditions climatique, nutrition minérale et techniques culturales). Les agronomes le considèrent comme le pivot de la fumure car son apport au sol peut augmenter sensiblement les rendements des cultures (**Pousset, 2002 ; Harrat, 2005**).

D'après **Belaid (1986)**, l'azote est un élément nécessaire à la multiplication cellulaire et au développement des organes végétatifs. Il joue un rôle prépondérant dans la synthèse des glucides et la constitution des réserves azotées ; et aussi dans la multiplication des chloroplastes, expliquant la couleur vert foncé après l'apport d'azote. De plus, il entre dans la composition des nucléoprotéines des noyaux des cellules, il est donc le facteur déterminant de la croissance des organes végétatifs (**Simon et al, 1989 ; Hamdi, 1994**).

L'azote du sol peut être fourni par l'apport d'engrais, la minéralisation de l'humus et la fixation biologique de l'azote, 60 % des apports d'azote proviennent de la fixation biologique de l'azote atmosphérique. Les PGPR diazotrophes sont très intéressantes pour l'application en agriculture comme biofertilisants, biopesticides et en phytoremédiation (**Berg, 2009**). La mise au point des formulation des PGPR est très importante afin d'augmenter leur efficacité d'utilisation (**zahir et al ., 2004**). Le biocontrôle et une alternative très importante à l'utilisation des pesticides et un moyen efficace pour la lutte contre les ravageurs des cultures, les phytopathogènes et les plantes adventices (**Peshin et Dhawan, 2009**).

La fixation d'azote non symbiotique a été mise en évidence à plusieurs reprises dans la rhizosphère des céréales (**Boddey et Oobereiner,1998**) Parmi les espèces végétales hébergeant une telle activité se trouvent le blé (*Triticum aestivum*), le riz (*Oryza sativa*), le maïs (*Zea mays*), la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) et plusieurs espèces prairiales (**Neyra et Dobereiner, 1977**). Des bactéries fixatrices d'azote ont été isolées à partir des racines ou des rhizosphères de ces plantes. La plupart de ces isolats appartiennent aux genres *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella* et *Bacillus* (**Rennie, 1980**).

Certaines de ces bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculants pour améliorer le développement des racines via la production de certaines phytohormones (**Bloemberg et Lugtenberg, 2001**), telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (**Vessey, 2003**).

# *INTRODUCTION*

L'intérêt actuel des biofertilisants n'est pas seulement motivé par le désir d'augmenter la productivité agricole mais aussi par la prise de conscience générale sur l'urgence de la protection de notre environnement. Un des moyens de parvenir à la réduction des entrées de composés xénobiotiques dans les agrosystèmes est de reconnaître l'association plante/sol/microorganismes comme une entité biologique capable d'optimiser les effets de ces produits, voire de les remplacer (**Gouzou , 1992**).

L'objectif du présent travail est de cibler des bactéries rhizosphériques à potentiel biofertilisant des plantes de blé dur, et de sélectionner les traits à fort pouvoir de bio-fertilisation et de promotion de la croissance végétative, afin de formaliser des inoculants qui seront appliqués sur les graines de blé dur dans le but d'améliorer la germination et la croissance.

# **CHAPITRE 1**

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Synthèse bibliographique

## 1. Les céréales

Les céréales et leurs dérivés constituent les principales ressources alimentaires de l'humanité, en raison de leur source d'énergie et leur grande richesse en protéines principalement destinées à l'alimentation humaine (à hauteur de 75% de la production), les céréales assurent 15% des besoins énergétiques, elles servent également à l'alimentation animale (15% de la production) et à des usages non alimentaires (Feillet, 2000).

En botanique, les céréales regroupent un certain nombre de plantes appartenant à la famille des graminées. Il existe treize (13) types de céréales. Parmi ces derniers on trouve le blé et le maïs (Fredot, 2005).

## 2. La biologie du blé dur

### 2.1. Origine

Le blé est l'une des premières espèces cueillies et cultivées par l'homme au proche Orient, il y a environ 10.000 à 15.000 ans avant J.C. D'après Harlan (1975), des restes de blé diploïde et tétraploïde ont été découverte sur des sites archéologiques au proche Orient et on croit que le blé dur provient des territoires de la Turquie, la Syrie, l'Iraq et l'Iran. (Oudjani, 2009).

### 2.2. Description du blé dur

Le blé dur (*Triticum turgidum ssp. Durum*) est une plante annuelle de la classe monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des *Gramineae*. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscence, appelé caryopse, constitué d'une graine et de téguments (Feillet, 2000).

### 2.3. Diversité génétique du blé

Selon Alloui (1997), le genre *Triticum* comporte de nombreuses espèces, se répartissant en trois groupes selon leur nombre de chromosomes :

- Le groupe Diploïde : ( $2n = 14$  chromosomes) ou *triticum monococcum* .

# Synthèse bibliographique

- Le groupe Tétraploïde : ( $2n = 28$  chromosomes) ou *triticum dicoccum* (Amidonnier), ici on trouve *Triticum durum* (blé dur).

- Le groupe Héxaploïde : ( $2n = 42$  chromosomes).

## 2.4. Classification du Blé Dur

Le genre *Triticum* appartient à la tribu des *Triticées* au sein de la famille des *Poacées* et plus largement au groupe des *angiospermes* monocotylédones (Feillet, 2000). La classification détaillée du blé dur est donnée ci-dessous (Tableau 1).

**Tableau I :** Classification du blé dur d'après (Feillet, 2000).

<b>Embranchement</b>	Angiospermes
<b>Sous embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Classe</b>	Monocotylédones
<b>Ordre</b>	Glumiflorales
<b>Super ordre</b>	Comméliniflorales
<b>Famille</b>	Gramineae = Poaceae
<b>Genre</b>	<i>Triticum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Triticum Durum</i>

## 2.5. Le blé dur en Algérie

### 2.5.1. Consommation

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins, notamment en Algérie.

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale avec un taux de la consommation par habitant et par an estimée à environ 185kg de céréales (Khelifi, 2013). Ils représentent 54% des apports énergétiques et 62% des apports protéiques journaliers et le blé représentait 88% de ces

# Synthèse bibliographique

céréales consommées. L'Algérie se situe ainsi au premier rang mondial pour la consommation de blé (Kellou, 2008).

## 2.5.2. Production

La production des céréales est très irrégulière, elle est fortement dépendante des conditions climatiques. Cela se traduit d'une année à l'autre par des variations importantes de la superficie agricole utile, de la production et du rendement (Djermoune, 2009). Le blé occupe une place importante dans la production agricole et constitue la nourriture de base pour 35% de la production mondiale (Mebarkia et al., 2012).

En Algérie, les céréales occupent une superficie de 3,3 millions d'hectares. 40% de ses surfaces sont destinées à la production de blé dur soit 1,35 millions d'hectares (Selmi, 2000).

Selon les derniers chiffres donnés par l'ITGC dans la campagne 2011/2012, la production céréalière s'est établie à 51,3 millions de quintaux dont plus de 58% en blé dur (Tableau 2) Cependant, la production nationale en blé dur est encore faible, elle ne couvre que 20 à 25 % des besoins du pays qu'on estime à 80 millions de quintaux/an, ce qui classe l'Algérie comme l'un des plus importants pays importateurs de céréales (Hamadache, 2002).

**Tableau II** : Surface, production et importation des céréales en Algérie de septembre 2003 jusqu'en mai 2012 (Bova, 2012).

Saisons	(par année)	03 /04	04/05	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12
Surface	(en mha)	2.9	3.0	2.6	2.7	2.9	1.5	3.2	3.3	3.1
Productio	n (en mt)	4.3	4.0	3.5	4.0	4.3	1.7	6.1	4.7	4.3

# Synthèse bibliographique

## 2.5.3. Rendement

Bien que le calcul des rendements ne prenne en compte que les surfaces récoltées, on le trouve faible et surtout très aléatoire. Comparativement à la moyenne mondiale, qui est de 29 Qx/Ha pour 2004, le rendement de blé algérien n'est que pour les meilleures années 50 % de la moyenne mondiale. Il est en moyenne de 10,5 Qx/Ha, il est parmi les plus faibles au monde (Kellou, 2008 et Madr, 2011).

## 2.5.4. Apport en engrais

Les engrais sont des substances, le plus souvent des mélanges d'éléments minéraux, destinées à apporter aux plantes des compléments d'éléments nutritifs, de façon à améliorer leur croissance, et à augmenter le rendement et la qualité des cultures. Selon les données collectées pour la période 1983-91, les engrais les plus utilisés sont l'ammoniac puis les engrais NPK, PK et DAP sont d'usage aléatoire. Pour des raisons de disponibilité sur le marché et d'autres raisons dont le prix et le transport.

L'engrais azoté reste le plus utilisé, probablement pour son effet instantané et remarquable sur les cultures de céréales et dont l'impact sur la culture est mesurable (visible), à l'inverse des autres engrais dont l'effet sur les cultures n'est pas apparent.

Les besoins de blé en azote varient de 30 à 100 Kg/Ha et cela en fonction de la pluviosité (service de la gestion des terres et de la nutrition des plantes 2005) .

## 2.5.5. Problème de production

L'agriculture algérienne est structurellement inapte à satisfaire une demande de blé de plus en plus importante.

La faiblesse relative des niveaux de rendement, trouve son explication dans deux raisons principales: l'une climatique et l'autre agronomique.

### 2.5.5.1. Problèmes climatique

L'Algérie présente un climat de type méditerranéen caractérisé par une longue période de sécheresse, et l'irrégularité pluviométrique (Température, la pluviométrie, le vent, l'humidité) (Elhadeff El Okki, 2015).

# Synthèse bibliographique

## 2.5.5.2. Problèmes agronomiques

Les problèmes agronomiques sont essentiellement techniques se rapportant à une mauvaise préparation du sol avec des outils inadaptés qui ont pour effet de diluer la matière organique et les éléments minéraux. Un autre problème qui est aussi important que le premier c'est la pauvreté du sol (Carence en azote N, en phosphore P et en potassium K), ce qui nécessite l'utilisation des engrais. Cette situation a obligé l'Algérie à se tourner vers les importations afin de combler la faible production (Benmatti, 2014).

## 2.5.6. Solution pour améliorer la production de blé dur

La production de blé dur en Algérie ne parvient pas à satisfaire la demande des consommateurs en forte augmentation ce qui conduit à des importations régulières. Il devient donc important de développer différentes méthodes biologiques par l'utilisation des organismes naturels pour améliorer les performances de blé en termes de rendements, de qualité boulangère et de valeur nutritionnelle.

Parmi les solutions utilisées on trouve les souches bactériennes qui sont capables d'augmenter le rendement et d'améliorer la qualité des cultures. On les appelle « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou PGPR. Leurs caractères interviennent à plusieurs niveaux du développement végétal (au niveau racinaire et aérien).

L'utilisation des PGPR en agriculture peut permettre de stimuler la croissance des plantes et de contourner leurs pathogènes (Beauchamp, 1993). De plus, en formant des symbioses, les PGPR augmentent la capacité des plantes à se nourrir en développant leur système racinaire.

## 3. Généralité sur la rhizosphère

### 3.1. Étymologie

Le mot rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner (Anton *et al.*, 2008), bactériologiste spécialiste en microbiologie du sol et professeur d'agronomie au collège Technique de Munich (Lombi *et al.*, 2001). « Rhizo » vient du grec rhiza signifiant racine. « Sphère » vient du latin sphaera (même sens), mot provenant lui-même du grec ancien sphaera

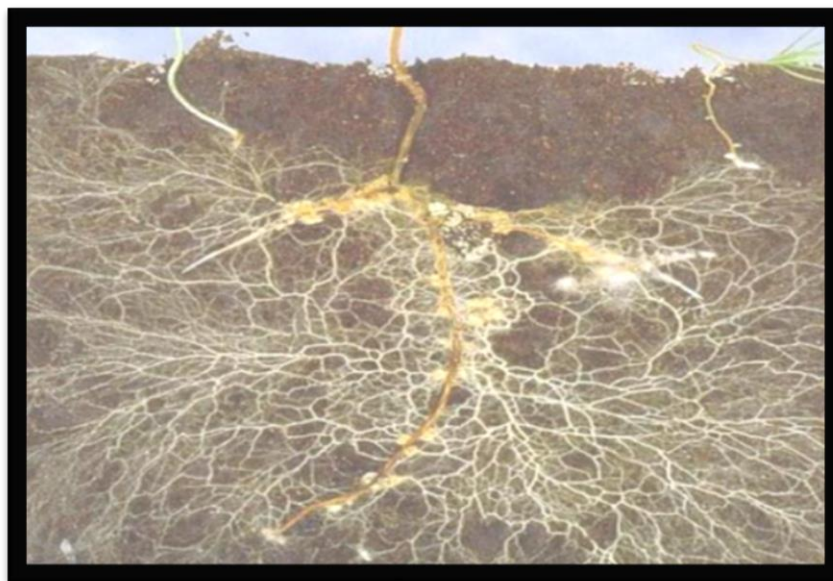
# Synthèse bibliographique

(signifiant balle, ballon, ou globe). La sphère définit le champ d'influence du système racinaire. En raison du volume qu'elle occupe, par rapport au volume de la plante, la rhizosphère est aussi appelée la « moitié cachée » (the hidden half en anglais) (**Bowen et Roriva, 1991**).

## 3.2. Définition

La rhizosphère (**Figure 1**) est la région du sol située sous les racines des plantes et soumise à leur influence directe. C'est un lieu d'intenses échanges entre le végétal et le substrat minéral. Elle peut être affectée par le tassement du sol, un ennoiement durable, sa salinisation, son eutrophisation ou la pollution, ou encore par des phénomènes d'aridification. Aussi elle est la région d'activité microbienne intense (**Anoua et al., 1997**).

Elle joue un rôle important dans la résistance des sols à l'érosion, au gel, aux incendies, aux inondations, etc. De même pour la résilience de ces sols et des plantes cultivées (Les enjeux sont donc également agronomiques) (**Krafczyk et al., 1984**).



**Figure 1:** La rhizosphère (**Elise Leal, 2014**).

## 3.3. Les bactéries rhizosphériques ou rhizobactéries

Les rhizobactéries sont des bactéries qui présentent l'aptitude à coloniser les racines de façon intense (**Schroth et Hancock, 1981, 1982**). Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiés

# Synthèse bibliographique

sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp fluorescents* (Lemanceau, 1992).

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol racine. En effet, le rhizo plan et la rhizosphère sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (Curl, 1982). Ces échanges sont réciproques.

## 4. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

### 4.1. Définition de Rhizobacteria (PGPR)

Le terme PGPR provenant de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria" désigne les bactéries qui exercent un effet bénéfique sur la croissance et le développement des plantes par différents moyens (Abnatura., 2013). Les rhizobactéries sont des bactéries qui présentent l'aptitude à coloniser les racines de façon intense (Schroth et Hancock., 1981, 1982).

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

### 4.2. Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère

#### 4.2.1. Les Rhizobia

La mise en place d'une interaction non spécifique des *Rhizobia* avec les racines des plantes non légumineuses a favorisé les espèces de ce genre de devenir des PGPR, outre leurs activités fixatrices de l'azote atmosphérique, les *Rhizobia* contribue considérablement à l'amélioration de la disponibilité des phosphates pour la plante par mobilisation de formes organiques et inorganiques (Sahran et Nohra., 2011). Elles peuvent produire des phytohormones, des siderophores et de l'HCN, avec la capacité de coloniser les racines de plusieurs types de plantes non légumineuses. Les *Rhizobia* ont manifesté un grand intérêt lors de leur utilisation comme agents de bio-control (Antoun et Prevost., 2005).

## 4.2.2. Les PGPR diazotrophes

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont utilisées pour la stimulation de la croissance des plantes. La disponibilité d'une source d'énergie pour l'établissement du processus de fixation de l'azote constitue une principale limitation, compensée par le rapproche vers l'intérieur de la plante. *Azoarcus sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum sp* et *Azotobacter sp* forment un groupe bactérien non symbiotique fixateur d'azote (Ahmad *et al.*, 2008).

- *Azotobacter*

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

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

- *Azospirillum*

Les espèces d'*Azospirillum*, isolées à partir des rhizosphères de plusieurs céréales à travers le monde principalement dans des régions tropicales et tempérées sont utilisées depuis les années 1970. Cette bactérie initialement sélectionnée par sa capacité fixatrice de l'azote atmosphérique représente un bon candidat PGPR (Antoun et Prevost., 2005).

- *Azoarcus*

*Azoarcus* a gagné une grande attention due principalement à sa grande diversité génétique et métabolique, divisé en trois genres : *Azovibrio*, *Azospira* et *Azonexus*, qui se différencient des autres genres par leur capacité de se développer lors de l'utilisation des acides carboxyliques et de l'éthanol au lieu des sucres avec une température optimale de croissance comprise entre 37- 42°C (Reinhoid *et al.*, 1986). *Azoarcus* est une bactérie endophyte du riz et est considérée comme un modèle de bactéries endophytes fixatrices d'azote (Ahmad *et al.*, 2008).

- *Bacillus*

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

# Synthèse bibliographique

- *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* et les *Pseudomonas* fluorescentes sont des bactéries ubiquistes, rencontrées souvent dans les sols, classées comme étant les meilleurs candidats PGPR (Saharan et Nohra., 2011). Les effets bénéfiques de la bactérisation des graines sont observés lors de l'inoculation des graines de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) par *P.fluorescens* et *P. putida*. Bur et al., (1978) et Alabouvette et al., (1993) ont démontré que lors de l'utilisation de *Fusarium oxysporum* pathogènes, *P. fluorescens* et *P. putida* se manifestent comme principales candidates de contrôle biologique du flétrissement fusarien, avec une application bénéfique pour la suppression des fusarioses chez plusieurs espèces des plantes (Chung et al., 2005).

## 4.2.3. Modes d'action des PGPR

Les modes d'action des PGPR sont regroupés traditionnellement en directs et indirects (Figure 2). Bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes directs sont ceux agissant à l'intérieur des plantes et affectent directement leur métabolisme tandis que les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors des plantes.

Les mécanismes directs comprennent les processus de biofertilisation (solubilisation des phosphates) et de biostimulation (production des phytohormones : l'acide indole acétique, les cytokinines, l'acide gibbérillique...). Les processus de biocontrôle (production des métabolites antifongiques, production de composés volatiles...) constituent des mécanismes indirects.

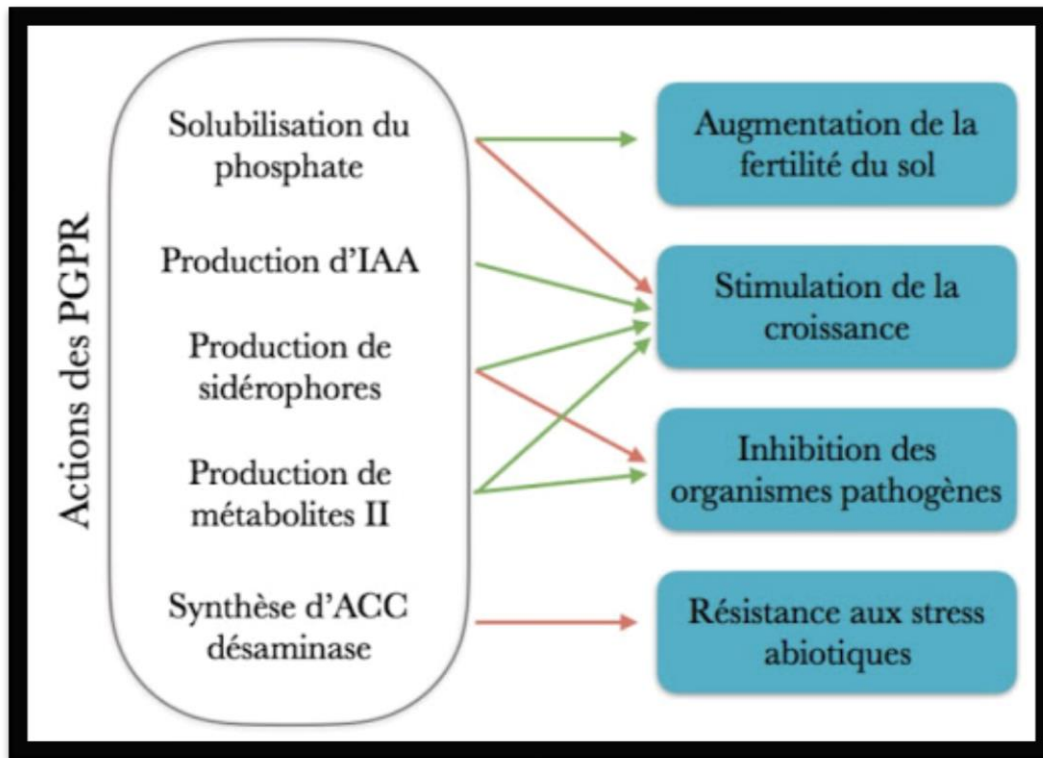


Figure 2: Les mécanismes d'action des PGPR.

#### 4.2.3.1. Solubilisation du phosphate

La solubilisation du phosphate est la capacité des microorganismes de convertir le phosphate insoluble à une forme accessible. Ce processus permet de réduire l'utilisation d'engrais phosphatés (Chaiharn et Lumyong, 2009). Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient donc constituer une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture (Sharma *et al.*, 2007). Les microorganismes solubilisant les phosphates (MSP) pourraient aussi faciliter la croissance et le développement des plantes par la production de nutriments essentiels, modifier la concentration des substances améliorant la croissance des plantes telles que l'AIA ou stimuler la fixation symbiotique et non symbiotique de l'azote moléculaire. Ils peuvent jouer aussi un rôle dans la production des sidérophores, des antibiotiques et d'acide cyanhydrique (HCN) (Khan *et al.*, 2009). Les PGPR les plus impliqués sont notamment: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Azotobacter* et *Erwinia*.

L'inoculation de plantes par les bactéries solubilisant les phosphates, *Herbaspirillum seropedicae* et *Burkholderia sp.*, augmentent le rendement de la récolte de 1,5

# Synthèse bibliographique

à 21% par rapport aux témoins non inoculés dans des conditions salines (Baldani *et al.*, 2000).

## 4.2.3.2. Production des sidérophores

Le fer est un élément capital pour les bactéries, les champignons et les plantes. Sous des conditions limitantes en fer, les PGPR synthétisent des composés à faible poids moléculaires généralement inférieur à 1 kDA appelés " sidérophores". L'implication des sidérophores dans l'antagonisme entre les populations microbiennes est le résultat de la disponibilité limitante du fer qui affecte la croissance et le développement. Privée de fer, la flore tellurique nuisible ralentit sa croissance et sa densité diminue dans la rhizosphère (Loper *et Buyer*, 1991).

Les sidérophores sont synthétisés par des bactéries telles *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* (Ahmad *et al.*, 2008). La production des sidérophores par des souches de *Rhizobium* est considérée comme un moyen efficace d'améliorer la nodulation et la fixation de N<sub>2</sub> (O'hara *et al.*, 1988; Khan *et al.*, 2009).

## 4.2.3.3. Les régulateurs de croissance des plantes

Les régulateurs de croissance sont des substances actives qui agissent sur les mécanismes physiologiques, notamment sur la différenciation ou l'élongation racinaires, sans nuire à la plante du point de vue agronomique.

### ✓ *La production de phytohormones*

Les hormones végétales sont des messagers chimiques qui affectent la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stressés biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent que l'utilisation des hormones en tant que molécule- signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres microorganismes tels le « quorum sensing » ou la résistance systémique induite ISR (Spaepen *et al* 2007)

# Synthèse bibliographique

## ✓ *L'acide indole acétique (AIA)*

L'acide indole acétique AIA est une auxine primaire active dans la majorité des plantes. Il fonctionne comme une molécule - signal importante dans la régulation du développement des plantes. L'AIA intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse. Dives espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Celle-ci peut être utilisée comme outil de dépistage des souches PGPR performantes (Khalid *et al.*, 2004). Les PGPR libèrent ces auxines dans la rhizosphère comme des métabolites secondaires (Khan *et al.*, 2009). Les PGPR synthétisent et sécrètent l'AIA qui sera absorbé par la graine ou la racine à partir du tryptophane et d'autres petites molécules présentes dans les semences ou les exsudats racinaires (Whipps, 1990; Fallik *et al.*, 1994). Le tryptophane est le principal précurseur pour la biosynthèse d'AIA.

## ✓ *Rôle de l'ACC désaminase*

L'éthylène gazeux produit de manière endogène par les plantes agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante (Ecker, 1995). La surproduction de cette molécule en réponse aux stress abiotiques et biotiques conduit à l'inhibition de l'élongation racinaire et, par conséquent, la croissance de la plante dans son ensemble. Les PGPR possédant l'ACC désaminase régulent et abaissent les niveaux de l'éthylène en métabolisant l'ACC, un précurseur de l'éthylène. L'ACC désaminase régule la production d'éthylène en réponse à une multitude de stress biotiques et abiotiques comme la salinité, la sécheresse et les variations de température. Les bactéries possédant une ACC désaminase confèrent la tolérance des plantes au sel (Cheng *et al.*, 2007).

### **4.2.3.4. Lutte biologique**

Les PGPR autochtones du sol et la rhizosphère jouent un rôle majeur dans la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes. Elles peuvent supprimer un large spectre de maladies bactériennes, fongiques et parasitaires. Les PGPR peuvent aussi procurer une protection contre les maladies virales. De nombreux travaux présentent la diversité des agents microbiens impliqués dans la lutte biologique (Weller, 1988; Siddiqui, 2006). L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante- hôte (Whipps, 2001).

# Synthèse bibliographique

## 4.2.3.5. Composés volatiles

Certains gaz volatiles sont connus par leur action négative sur le métabolisme des racines (Schippers *et al.*, 1990) et constituent un moyen efficace et compatible avec l'environnement dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes (Heydari, 2008). Les microorganismes agissant comme agents de lutte biologique contre les mauvaises herbes comprennent les rhizobactéries qui colonisent la surface des racines de ces plantes et sont capables de les supprimer (Wani *et al.*, 2007).

## 4.2.3.6. Effet de la salinité sur les PGPR

La productivité des plantes sur sols salins est considérablement réduite en raison de l'activité biologique limitée due à la salinité et à la sécheresse. Les PGPR sont capables de s'adapter à des conditions défavorables les rendant aptes à se développer dans une diversité d'écosystèmes (Rangarajan *et al.*, 2002). Par conséquent, les rhizobactéries des sols salins sont capables de croître à des niveaux de salinité variant entre 0 et 5% de NaCl. Les espèces d'*Azotobacter* résistent mieux à la salinité. Leurs densités peuvent atteindre  $10^6$  à  $10^7$  par gramme de sol (Whipps, 2001). Les bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio* sont parmi les PGPR les plus dominantes dans les sols salins (Ahmad *et al.*, 2005).

## 4.2.4. Effets bénéfiques des rhizobactéries

La microflore rhizosphérique bénéfique pour les plantes peut avoir soit un effet direct via les organismes associés à la racine (relations mutualistes) ou indirect via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère (Van der Heijden *et al.*, 2008).

### 4.2.4.1. Les effets directs

Différents microorganismes de la rhizosphère mettent en place des associations symbiotiques avec les plantes et stimulent leur productivité et leur diversité. Les associations les plus connues sont celles des bactéries fixatrices d'azote appartenant aux actinomycètes et aux Rhizobiaceae.

Les *Rhizobia* sont particulièrement bien étudiées, elles établissent des relations symbiotiques avec les plantes appartenant à la famille des légumineuses (Bloemberg *et*

# Synthèse bibliographique

**Lugtenberg, 2001**). Cette symbiose entre les *Rhizobia* et les légumineuses se caractérise par la formation sur les racines hôtes de nodosités dans lesquelles ces bactéries se logent (**Dénarié et al., 1992 ; Franssen et al., 1992 ; Perret et al., 2000**). L'association symbiotique permet aux *Rhizobia* de bénéficier d'un micro-habitat favorable dans lequel ces bactéries ont accès aux substrats carbonés issus de la photosynthèse. En échange, les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammonium et le rendent, ainsi, directement assimilables par les plantes-hôtes. Les bactéries fixatrices d'azote sont des régulateurs importants de la productivité des plantes incapables d'utiliser l'azote atmosphérique sans ces microorganismes.

## 4.3. Les effets Indirects

Les microorganismes vivant librement dans la rhizosphère ont un effet bénéfique indirect sur la plante (**Van der Heijden et al., 2008**) caractérisé d'une manière générale par le processus de minéralisation, voie importante par laquelle ces microorganismes décomposent la matière organique insoluble et soluble et libèrent ensuite des éléments minéraux disponibles pour les plantes.

La fixation de l'azote atmosphérique est un mécanisme permettant aux microorganismes fixateurs dits 'libres' de favoriser l'amélioration de la croissance de la plante. Ces bactéries appartiennent à différents genres tels que *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*.

*Azotobacter* et *Azoarcus* (**Steenhoudt et Vanderleyden, 2000**). Elles fixent l'azote à des taux relativement faibles mais néanmoins significatives (< 3 kg ha<sup>-1</sup>) (**Cleveland et al., 1999**). Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols lorsque l'azote du sol est un facteur limitant (**Bloemberg et Lugtenberg, 2001**). Certaines bactéries sont utilisées pour améliorer le développement de la racine via la production de phytohormones (**Bloemberg et Lugtenberg, 2001**) telles les auxines dont l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines (**Steenhoudt et Vanderleyden, 2000; Vessey, 2003; Barea et al., 2005**). Alors que d'autres sont capables de favoriser la croissance des plantes par de la mise en place des symbioses entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote (**Remans et al., 2007**) et les champignons mycorrhizogènes (**Garbaye, 1994; Frey-Klett et al., 2007; Pivato et al., 2009**).

# Synthèse bibliographique

Les bactéries ayant la capacité de promouvoir l'établissement des mycorhizes en améliorant le contact des champignons avec les racines des plantes hôtes et la colonisation de ces racines, sont appelées MHB (Mycorrhiza Helper Bacteria) (Garbaye, 1994).

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Whipps, 2001). Ces bactéries sont capables d'avoir un effet protecteur en induisant des mécanismes de défense chez les plantes par la résistance systémique induite (ISR : Induced Systemic Resistance) (Van Loon, 2007) permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes. D'autres bactéries peuvent contrôler la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, pour le carbone (Lemanceau *et al.*, 1988) et pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau *et al.*, 2009). L'antagonisme microbien lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les phytopathogènes (Van Loon, 2007 ; Mazurier *et al.*, 2009).

## 5. Le genre *Azotobacter*

Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a connu une grande augmentation 2 à 5% des rhizobactéries; elles comprennent de nombreuses espèces bactériennes parmi elles *Azotobacter* est présent en quantité importante au niveau de la rhizosphère (Whipps 2001; Ahmad *et al.*, 2008).

*Azotobacter* est un genre bactérien appartenant à la sous-classe des Gammaproteobacteria. Selon la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(2005) (Brener *et al.*, 2005) le genre *Azotobacter* est transféré de la famille des Azotobacteriaceae à la famille des Pseudomonadaceae sur la base des séquences des ADNr 16S. Les cellules du genre *Azotobacter* sont des bacilles à Gram négatif, ovoïdes et relativement larges (2 à 4 µm, jusqu'à 6 µm) et peuvent prendre plusieurs formes (cocci ou batonnets) non sporulés, mobiles grâce des flagelles multiples. Ce sont des bactéries aérobies à métabolisme strictement respiratoire. Contrairement au genre *Azomonas*, *Azotobacter* a la capacité de former des cystes en absence de nutriments. Ceux-ci remplis de poly-β-hydroxybutyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux

# Synthèse bibliographique

comme source d'énergie. Le genre comprend plusieurs espèces (*chroococcum*, *beijerinckii*, *vinelandii*, *nigricans*, *armeniacus*, *paspali*...) qui se distinguent par leurs caractères biochimiques et la production de pigments.

Les *Azotobacter* sont ubiquitaires et peuvent être isolés de l'eau et du sol où ils y vivent librement. Cependant, ils sont beaucoup plus nombreux au voisinage des racelles. Bien qu'ils n'en soient pas dépendants, ils sont plus abondants près des racines et dans la rhizosphère qu'ailleurs dans le sol.

Les *Azotobacter* préfèrent les sols neutres ou légèrement alcalins, bien oxygénés et moyennement humides. Ces bactéries fixent mieux l'azote atmosphérique dans les sols où les apports d'azote minéral sont réduits. Elles peuvent fixer au moins 10µg d'azote/g de glucose consommé. La fixation nécessite les ions molybdène. Ces bactéries exigent néanmoins des apports organiques importants probablement comme source de carbone. Il semblerait que ces bactéries aient d'importantes facultés à utiliser les apports minéraux sous forme insoluble qu'il s'agisse de phosphates ou de nitrates (**Buchan et Gibbous, 1974**).

- **Importance du genre *Azotobacter***

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

# **CHAPITRE 2**

## **MATERIELS ET METHODES**

## 1. Objectif

Cette étude vise l'isolement des bactéries du genre *Azotobacter* à partir de la rhizosphère, la caractérisation et l'identification de ces souches puis à l'évaluation de leur potentiel PGP (Plant Growth Promotion) par la détermination de différentes activités améliorant la croissance des végétaux en vue de sélectionner la souche la plus performante pour un test in vivo.

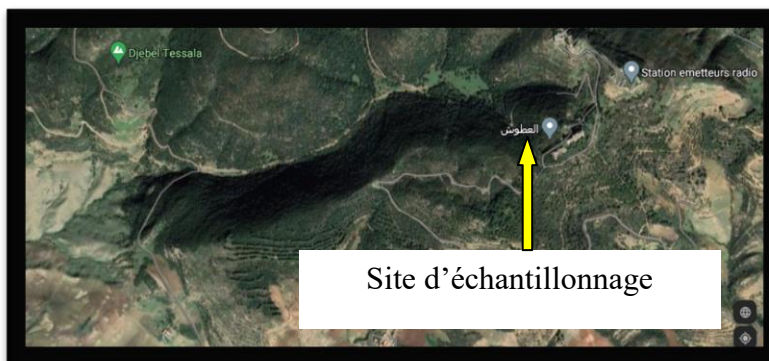
## 2. Matériel

### 2.1. Isolats bactériens

Les isolats ayant fait l'objet de l'étude bactériologique proviennent de la rhizosphère de blé dur (*Triticum Durum*), récolté dans la région de Tessala willaya de Sidi Bel Abbes.

### 2.2. Matériel végétal

Les plantes de blé dur utilisées proviennent de la commune de tessala, willaya de Sidi Bel Abbes (*Figure 3*).



**Figure 3:** Localisation du site d'échantillonnage (Source :Google Maps 2020).

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

## 3. Méthodes

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

#### 3.1.1. Isolement et purification des *Azotobacter*

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

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

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

#### 3.1.2. Purification

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

#### 3.1.3. Conservation des isolats

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

## 3.1.4. Caractérisation des isolats

### 3.1.4.1. Examen macroscopique

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

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

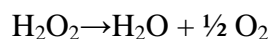
### 3.1.4.2. Examen microscopique

#### ○ **Technique de Coloration de Gram**

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

### 3.1.4.3. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygéné qui se dégage.



## Matériels et méthodes

Prendre une lame porte objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène : le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles : le test catalase est négatif (Delarras, 2007).

### 3.1.4.4. Test d'oxydase

L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes.

Déposer, sur une lame porte-objet propre, une goutte d'eau physiologique stérile puis faire une suspension épaisse de bactéries à partir d'une culture jeune sur gélose puis ajouter un disque \*Ox\*.

Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir : test oxydase +.

### 3.1.4.5. Test de mobilité des isolats

Le milieu de culture mannitol mobilité (Annexe I) est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

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

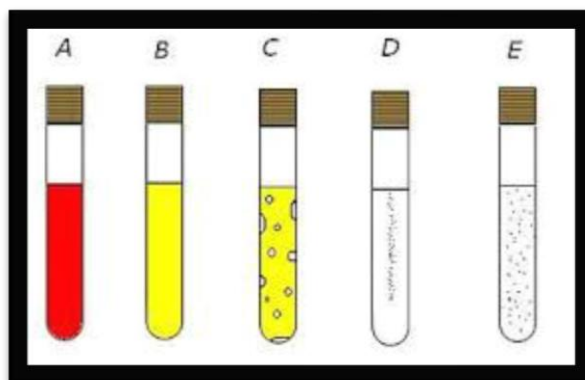


Figure 4: Lecture des résultats du test mannitol mobilité.





## Matériels et méthodes

- A: pas de dégradation du mannitol.
- B: Dégradation du mannitol.
- C: Dégradation du mannitol avec production de gaz.
- D: Bactérie non mobile, colonies au lieu de l'ensemencement.
- E: Bactérie mobile, répartition des colonies dans le milieu de culture.
- milieu jaune : mannitol + .
- milieu rouge : mannitol – .

### 3.1.4.6. Mise en évidence du type respiratoire

Le milieu viande foie permet de déterminer le type respiratoire d'une bactérie, c'est-à-dire définir son comportement vis-à-vis du dioxygène. Dans des tubes à essai stériles, le milieu de culture en surfusion est aseptiquement ensemencé en réalisant un mouvement en hélice du bas vers le haut à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Le milieu de culture solidifié est incubé à 30°C pendant 48h. Les résultats obtenus sont interprétés selon [le tableau 3](#) et le germe est dit soit : aérobie strict, anaérobie aéro-tolérant, anaérobie strict ou microaérophile.

**Tableau III:** Détermination du type respiratoire.

Observation				
	<b>culture dans tout le tube</b>	<b>culture a la surface</b>	<b>culture qu'a un endroit précis du tube</b>	<b>culture partout sauf a la surface</b>
<b>Interprétation</b>	Culture quel que soit la concentration en	Culture seulement en présence d'O <sub>2</sub>	Culture en présence d'une concentration	Culture seulement en absence de O <sub>2</sub>

	O <sub>2</sub>		d'o <sub>2</sub> moins que celle de l'air	
<b>Conclusion</b>	Type aero-anaerobie facultatif(AAF)	Type aérobie strict	Type micro aérophile	Type anaérobie strict

#### 4. Analyse des modes d'actions des PGPR

##### 4.1. Test de la solubilisation de phosphate

###### 4.1.1. Test de solubilisation de phosphate sur milieu solide

La solubilisation de phosphate inorganique a été déterminée qualitativement sur le milieu Pikovskaya agar (**Annexe I**) préparé et additionné de tricalcium phosphate comme une source insoluble de phosphate **Nautiyal (1999)**. Les pré-cultures des isolats ajustées à 10<sup>8</sup> cell/ml sont déposées sous forme de spots (10 µl) sur le milieu de culture solide Pikovskaya.

Après incubation à 30°C pendant 5 jours, Les bactéries solubilisant le phosphate vont former un halo clair autour des colonies (**Alam et al., 2002**). Le taux de solubilisation est évalué par l'indice de solubilisation. La mesure de l'index de solubilisation est effectuée selon la formule suivante :

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

###### 4.1.2. Test de solubilisation de phosphate en milieu liquide

Pour une estimation quantitative du phosphate solubilisé, 100 µl des cultures bactériennes sont ensemencés dans 5ml de milieu PVK liquide puis incubés à 30°C/7 jours sous agitation modérée. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 20mn. La quantité du phosphore soluble est mesurée dans le surnageant par la méthode colorimétrique de Olsen (**Olsen et Sommers, 1995**). Dans une fiole de 50 ml contenant 1 ml du surnageant, sont ajoutés 10 ml de molybdate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) à 12 mM et 1ml de chlorure d'étain (SnCl<sub>2</sub>) 5 mM. Le volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la

## *Matériels et méthodes*

couleur bleue mesurée à 620 nm est directement proportionnelle à la concentration de phosphates dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Olsen et Sommers, 1995).

### **4.2. Production des auxines (acide indole acétique)**

La production de l'AIA est évaluée, selon la technique rapportée par Acuña *et al.*, (2011), sur milieu de culture Luria-Bertani liquide additionné de glucose à 1% en présence et en absence du L-tryptophane (5g/l) (Annexe I). Le milieu de culture dilué à 1/10ème est inoculé avec un volume de 100  $\mu\text{l}$  d'une pré-culture bactérienne âgée de 48 heures, ajustée à 0.5 Mc Farland. Les tubes sont incubés à une température de 30°C pendant 5 jours. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 10min. Un volume de 2 ml du réactif de Salkowski (12g de  $\text{FeCl}_3$  dans 429ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) est ajouté à un volume de 1ml du surnageant.

Le mélange est incubé pendant 30 mn. La lecture est effectuée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 535 nm. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Les concentrations utilisées pour l'établissement de la courbe d'étalonnage sont de l'ordre de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$  et 5  $\mu\text{g/ml}$ .

### **4.3. Production d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ )**

Ce test est réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992) avec modification. Il consiste à inoculer 100 $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne dans 2ml d'eau peptonée. Après une incubation 30°C pendant 96 h, les cultures sont centrifugées à 3000 rpm pendant 20mn. La quantité du  $\text{NH}_3$  est mesurée dans le surnageant des cultures. Un volume du réactif de Nessler est ajouté à quatre volumes du surnageant. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de  $\text{NH}_3$ . L'intensité de la couleur bleue mesurée à 425 nm est directement proportionnelle à la concentration de  $\text{NH}_3$  dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution d'ammonium sulfate.

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

Dans le but d'apprécier l'effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azote 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 *Azotobacter*, les charges bactériennes sont ajustées à 0.5 Mc Farland. Les graines sont mises pour une durée de 30 min, dans les béciers 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 boîtes de pétri de 10 cm de diamètre contenant un papier filtre imbibé d'eau distillée stérilisée. Chaque boîte a reçu 5 graines.

Sept 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 radicule et de la longueur de la tige, poids sec et l'indice de vigueur calculé selon la formule :

$$IV (\%) = (\text{longueur moyenne de la partie racinaire} + \text{longueur moyenne de la partie aérienne}) \times \text{le taux de germination } \%$$

# **CHAPITRE 3**

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

# Résultats et discussions

## 1. L'intérêt du genre *Azotobacter*

Le genre *Azotobacter* est un exemple pertinent des biofertilisants fixateurs d'azote. Il est aussi une composante essentielle des préparations commerciales de celles-ci. Du point de vue économique, outre le rabais des coûts de production qu'engendre l'utilisation des biofertilisants fixateurs d'azote, ces produits représentant environ **76,9%** du chiffre d'affaires du marché mondial de biofertilisants évalué à **1326,6** millions USD en 2018 et qui d'après Hexa Research, devrait atteindre **2 Mds\$** d'ici 2024 (**Anonyme A**).

En Algérie, peu d'intérêt est porté aux biofertilisants et surtout au genre *Azotobacter*, les productions scientifiques à ce sujet se font de plus en plus rares. Une recherche sur le Portail National de Signalement des Thèses (PNST) **montre l'existence de seulement deux thèse en cours de réalisation**. Sur Google, et avec un peu de chance on risque de trouver deux autres thèses (soutenus) présentés par **Silini, 2013** et **Ghalem, 2016** et trois articles de ces mêmes auteurs.

Au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Djilali Liaïbes, on dénombre, outre la thèse de **Ghalem, 2016**, 3 mémoires de master rédigés par : **Malki et Lahmar, 2014 ; Aidouni et Mesmoudi, 2018 et Fellah et Bensahla, 2019**. Le présent travail constitue une contribution aux efforts des chercheurs algériens dans ce domaine, il ressort de notre conviction que l'utilisation des espèces efficaces *d'Azotobacter* peut très bien booster la conversion du système agricole vers une agriculture biologique et durable. L'application à grande échelle de ces PGPR peut réduire la dépendance aux produits chimiques agricoles. De plus, il s'agit d'une technologie facilement accessible aux développements des céréales. (**Gamalero et al., 2009**).

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

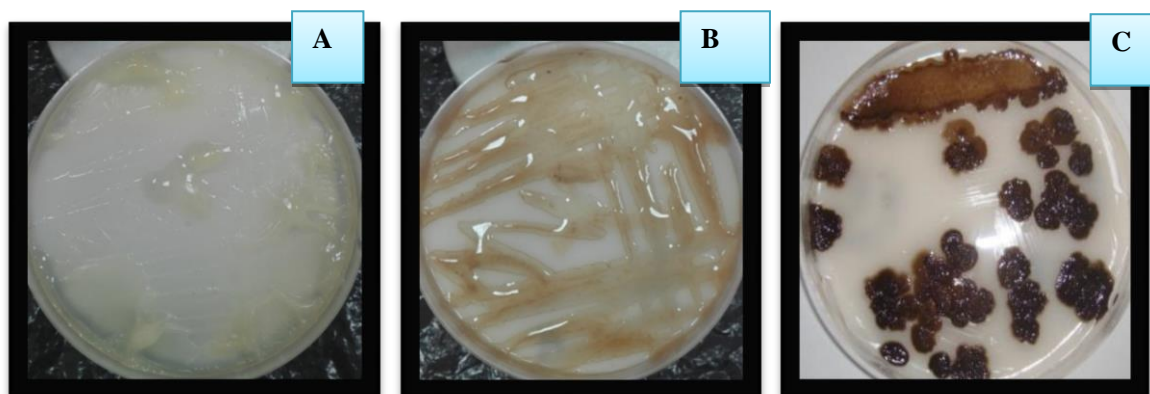
L'isolement de souches PGPR biofertilisantes efficaces du genre *Azotobacter* devait être effectué à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur cultivées sur le sol de la région Tessala wilaya de Sidi Bel Abbés.

## Résultats et discussions

La stratégie d'isolement devant être adoptée repose sur la faculté des *Azotobacter* à fixer l'azote atmosphérique, ces bactéries sont isolées après une étape d'enrichissement sélectif sur bouillon exempt d'azote, le bouillon Azotobacter, suivie d'un repiquage sur milieu gélosé sélectif exempt d'azote le milieu Ashby. La culture des prélèvements sur milieu Ashby permet l'élimination des microorganismes incapable de fixer l'azote atmosphérique, la croissance des bactéries diazotrophes asymbiotiques se trouve ainsi favorisée.

L'intérêt porté dans cette étude au genre *Azotobacter* est dû à son caractère biofertilisant potentiel, les bactéries de ce genre sont des fixateurs non symbiotiques d'azote, ils peuvent fixer jusqu'à 20 kg/ha/ ans d'azote (Jnawali et al., 2015).

L'isolement des *Azotobacter* est facilité par l'aspect particulier que les colonies de ces bactéries produisent sur milieu Ashby. En effet, en plus de leur croissance lente (temps d'apparition des colonies des 72 heures), les *Azotobacters* produisent des colonies blanches (Figure 5.A), opaques, brillantes, lisses, bombées à contour irrégulier d'un diamètre compris entre 2.5 à 5 mm prenant une couleur beige à marron après 6 jours d'incubation (Figure 5.B). Cette pigmentation est due à l'accumulation de mélanine produite par oxydation de la tyrosine par une tyrosinase a copper. Des temps d'incubation plus important peuvent engendre une modification de l'aspect des clonies qui devient plutôt sèches et rugueuses (Figure 5.C).

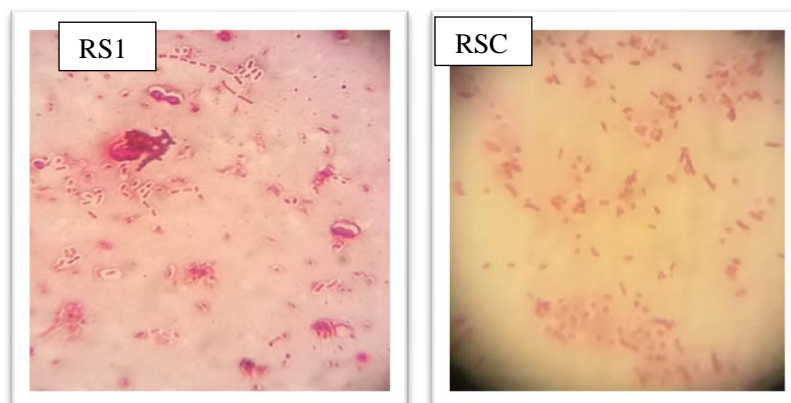


**Figure 5:** Aspects macroscopiques des isolats (Silini, 2013 ; Fellah et Bensahla, 2019).

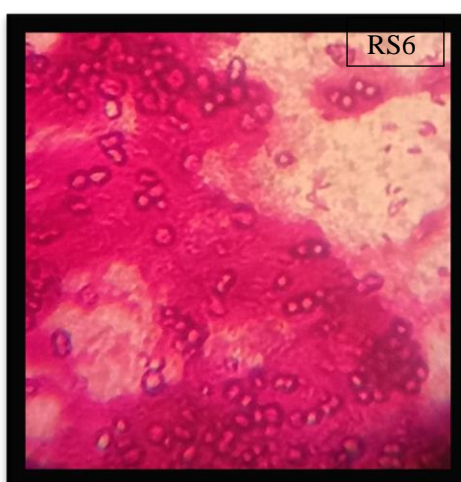
Au niveau microscopique, les *Azotobacter* se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif (Figure 6), ils sont typiquement polymorphes et leur dimension varient de 2–10µm long and 1–2µm de large (Jnawali et al., 2015). L'observation des cultures âgées des isolats d'azotobacter permet la mise en évidence de leur aptitude à la formation des cystes (Figure 7). Les cystes remplis de poly-β-hydroxybutyrates (PHB) sont des formes de résistances, semblables aux spores des *Bacillus*, utilisés par ces bactéries en cas de stress

## Résultats et discussions

environnementaux comme source d'énergie (Silini, 2013 ; Jnawali *et al.*, 2015). Ils favorisent l'ubiquité et la survie dans des *Azotobacter* dans des environnements très divers. En effet, les cysts restent viables 10 ans sur milieu gélosé sous les conditions du laboratoire et 24 ans dans sol sec (Chennappa, 2015).



**Figure 6:** Observation microscopique des isolats sélectionnés fixateurs d'azote (Grossissement x100) (Fellah et Bensahla, 2019).



**Figure 7:** Observation microscopique des isolats après coloration de Gram et mise en évidence de la formation des cystes (Grossissement x100) (Fellah et Bensahla, 2019).

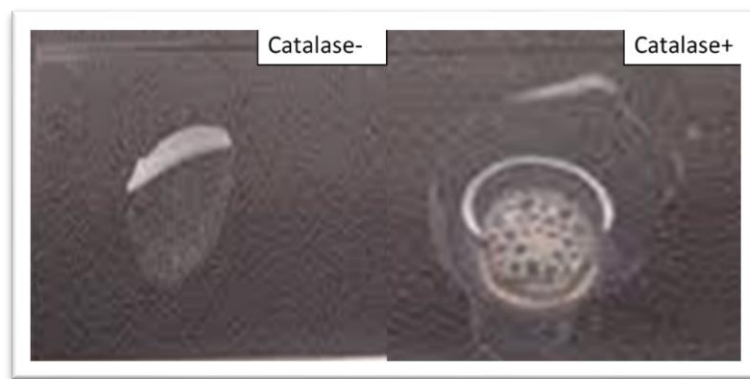
### 2.1. Test de catalase, test d'oxydase & recherche du type respiratoire :

L'oxydase, de la catalase et du type respiratoire sont des éléments clés de l'identification bactérienne (Figure 8, Figure 9 & Figure 10).

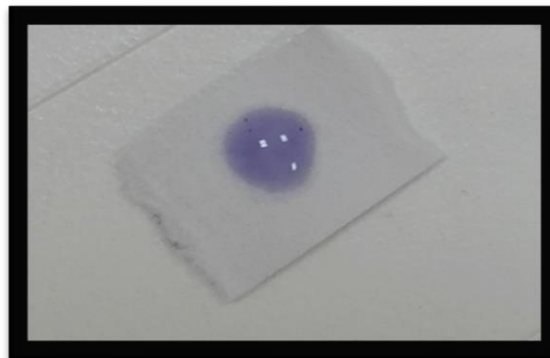
L'identification du genre *Azotobacter* repose essentiellement sur la recherche de l'oxydase, de la catalase et de l'utilisation du glucose et du rhamnose (Upadhyay *et al.*, 2015).

## Résultats et discussions

Les *Azotobacters* sont des bactéries aérobie strictes et la production des enzymes catalases et oxydases est une caractéristique commune des bactéries de ce genre, ces enzymes agissent en protégeant la nitrogénase (enzyme responsable de la fixation d'azote) (Upadhyay *et al.*, 2015). Selon Malleswari et Bagyanarayana, (2013), l'expression d'une activité catalase confère aux souches une hautement résistantes aux stress environnementaux. Les peroxydases représentent une composante de la réponse précoce des plantes aux attaques des pathogènes et aux stress environnementaux, ces enzymes jouent un rôle clé dans la biosynthèse de la lignine qui limite l'extension des phytopathogène (Khan *et al.*, 2009).



**Figure 8:** Exemple d'un résultat positif et un résultat négatif au test de catalase.



**Figure 9 :** Exemple d'un résultat positif au test d'oxydase.

## Résultats et discussions

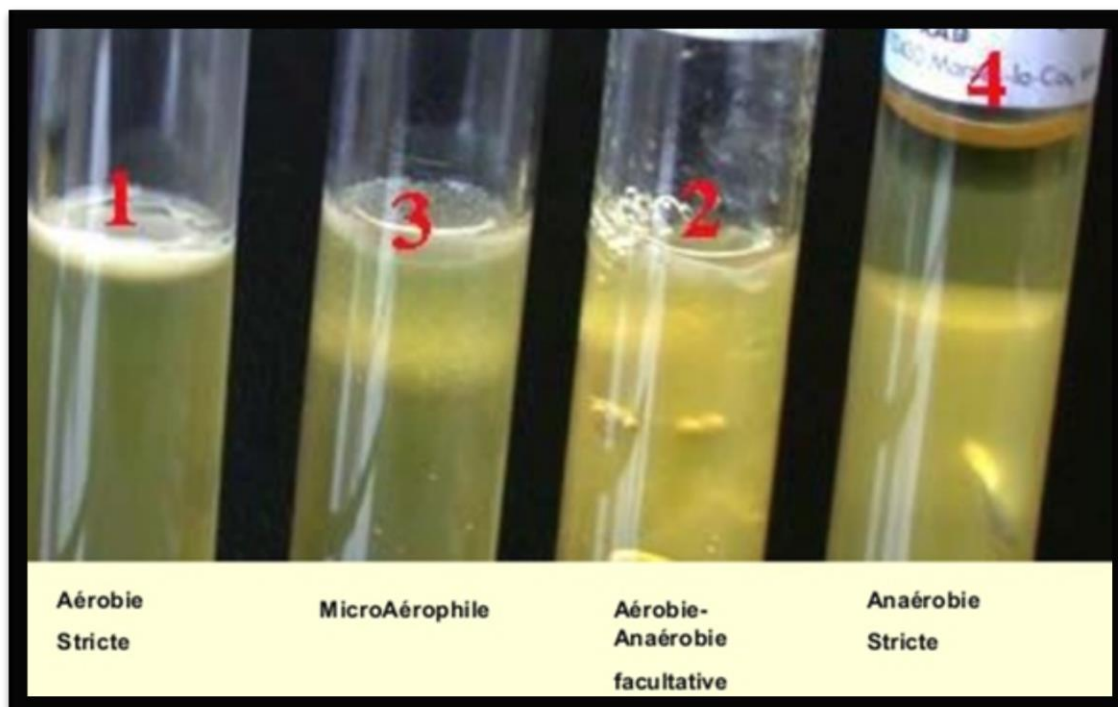


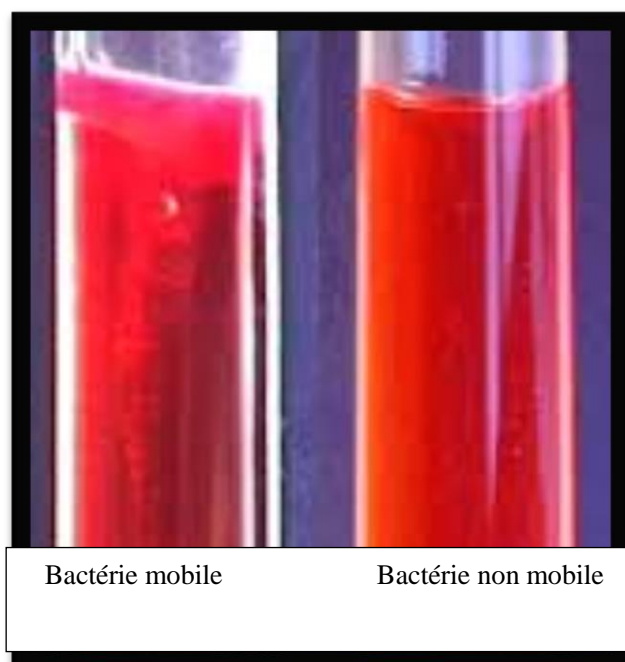
Figure 10 : Exemple des résultats du test pour la recherche du type respiratoire.

### 2.2. Test de mobilité des isolats

Le test de mise en évidence de la mobilité se réalise sur le milieu de culture mannitol-mobilité (Figure 11), la mobilité des bactéries testées se traduit par la diffusion des bactéries sur la gélose. La mobilité constitue un trait important des PGPR car elle leur permet une meilleure colonisation de la rhizosphère et une meilleure interaction avec la plante hôte (Nihorimbere *et al.*, 2011). En effet, les PGPR, ne peuvent atteindre la surface des racines que par une mobilité active facilitée par la présence de flagelles et guidée par des signaux moléculaires, chimiotactisme. (Nihorimbere *et al.*, 2011).

Le genre *Azotobacter* comprend 7 espèces, certaines de ces espèces sont mobiles au moyen de flagelles péritriches (*A. chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. paspali* et *A. salinestrus*, *A. vinelandii*. et d'autres non (Brenner *et al.*, 2005 ; Jnawali *et al.*, 2015).

## Résultats et discussions



*Figure 11:* Aspect des résultats de test de mobilité sur mannitol mobilité.

### 3. Screening des activités PGPR

L'intérêt des bactéries PGPR du genre *Azotobacter* réside dans la diversité de leurs modes d'action, elles peuvent afficher presque tous les mécanismes de lutte biologique, de biostimulation et de biofertilisation (Chennappa, 2015). La capacité des souches sélectionnées à l'expression des mécanismes implique dans la biofertilisation est mise en évidence via une série de test dont : la solubilisation de phosphore, d'acide indole-acétique et de production d'ammoniac.

#### 3.1. Solubilisation du phosphore inorganique

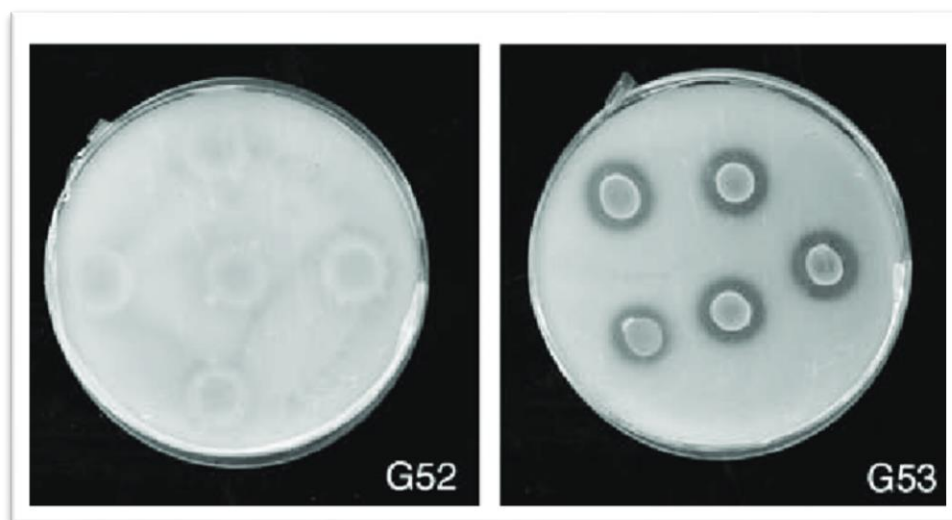
Le phosphore, le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote, est très abondant dans les sols sous forme organique et inorganique. Mais, malgré la richesse des sols en phosphore, une faible proportion est assimilable par les plantes. Dans le sol, la plus importante fraction de phosphore se trouve sous une forme insoluble: oxydes de fer et d'aluminium dans les sols acides, et oxydes de calcium dans les sols basiques (Ahemad et Kibret, 2014 ; Shrivastava *et al.*, 2015). En plus, le phosphore apporté par les

## Résultats et discussions

fertilisants appliqués au sol est re-précipité en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Ahemad, et Kibret, 2014).

L'amélioration de la disponibilité du phosphate est une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Les *Azotobacter* peuvent contribuer à l'amélioration de la nutrition des plantes via la solubilisation du phosphore. Les bactéries solubilisant le phosphore secrètent des acides organiques de faible poids moléculaire, qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates soluble monobasique ( $H_2PO_4^-$ ) et dibasique ( $HPO_4^{2-}$ ), seuls formes assimilables par les plantes (Kaymak, 2011).

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 12). 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., 2013).



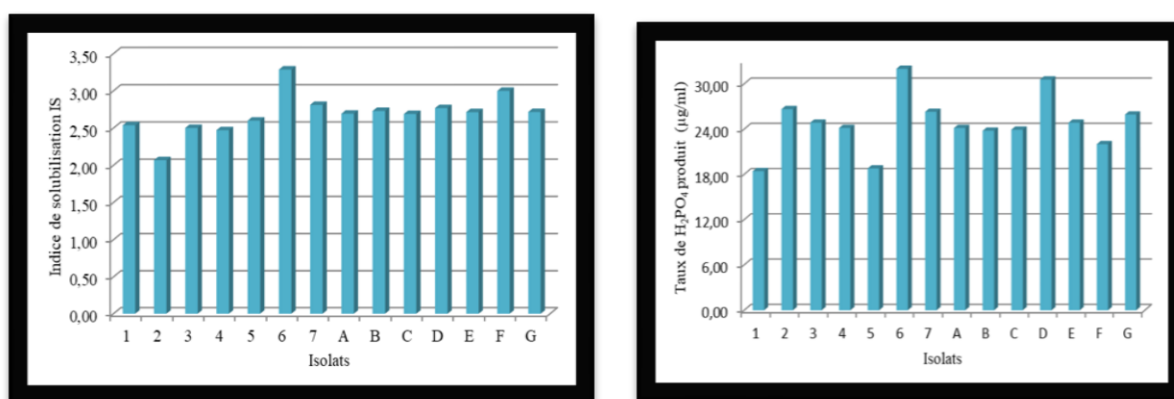
**Figure 12:** Aspect des résultats du test de solubilisation de phosphore sur milieu Pikovskaya (Schwachtje et al., 2015).

La sélection des candidats solubilisateurs de phosphate dépend du type de sol (alcalin, acide ou riche en matières organiques) où ces microorganismes seront utilisés. Il est

## Résultats et discussions

suggéré d'ajouter, au milieu Pikovskaya, des composés du phosphate de calcium pour les sols alcalins (cas des sols Algériens), des composés de phosphate de fer / aluminium pour les sols acides et des phytates pour les sols riches en P organique (Sharma *et al.*, 2013).

Plusieurs autres ont rapporté l'expression d'une activité de solubilisation de phosphore chez des souches d'*Azotobacter* (Figure 13) (Narula *et al.*, 2002 ; Ahmad *et al.*, 2008a ; Silini, 2013 ; Prakash et Karthikeyan, 2013 ; Nosrati *et al.*, 2014 ; Ghalem, 2016 ; Aidouni et Mesmoudi, 2018 ; Fella et Bensahla, 2019). Les taux de solubilisation de phosphore rapportés par ces auteurs sont comparables que ce soit sur milieu solide ou sur milieu liquide. Certains de ces auteurs ont souligné l'expression, pour certaines souche d'*Azotobacter*, d'une activité de solubilisation sur milieu liquide de façon exclusive (Sharma *et al.*, 2013). Ces chercheurs expliquent ce constat par le fait que les acides organiques soient difficilement libérés dans le milieu solide (Nautiyal, 1999 ; Behera *et al.*, 2017).



**Figure 13:** Exemple des résultats du test de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya liquide (à gauche) et solide (à droite) (Fella et Bensahla, 2019).

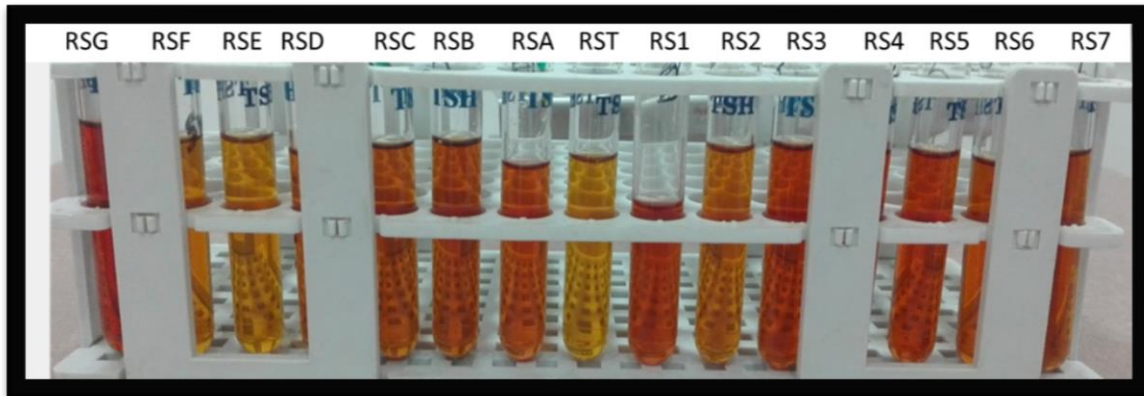
### 3.2. Production d'acide indole acétique (AIA)

L'acide indole-acétique est l'auxine principale et la plus active de la majorité des plantes. Cette phytohormone, synthétisé à partir du tryptophane, induit la formation des poils racinaires et/ou des racines latérales et augment, ainsi, la capacité des plantes à absorber les nutriments à partir du sol et améliore le rendement (Ambreen Akhtar *et al.*, 2012).

## Résultats et discussions

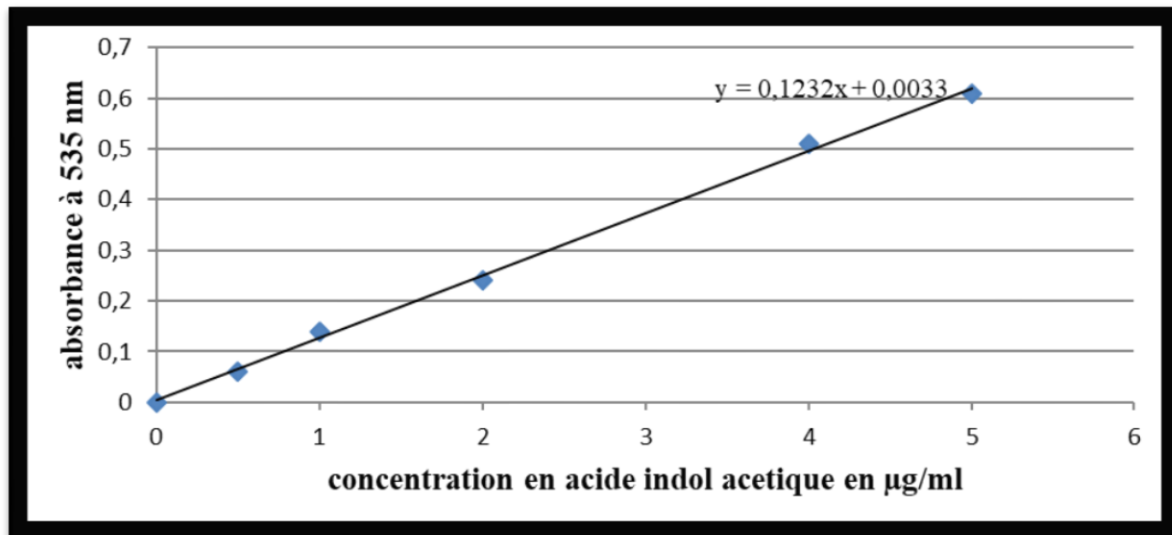
La synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est le plus efficace, est une faculté commune chez les bactéries PGPR. Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2010). L'acide indole acétique produit par les PGPR est libéré dans la rhizosphère comme métabolite secondaire (Khan *et al.*, 2009).

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 additionné ou non de L-tryptophane. La détection de la phytohormone est réalisée grâce à la réaction de Salkowski (Silini, 2013 ; Fellah et Bensahla, 2019). Cette dernière est spécifique aux auxines et composés similaires. Le réactif de Salkowski est un mélange de 0,5 M de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) et 35% d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) qui, lors de la réaction avec l'IAA, donne une couleur rose-rouge en raison de la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  et la formation d'un complexe d'IAA-fer (Figure 14) (Gang *et al.*, 2019). Les taux de production d'acide indol-acétique sont déterminés en se reportant au courbe étalon (Figure 15).



**Figure 14:** Production de l'acide indole acétique chez des isolats fixateurs d'azote en milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence de (5g/l) de L-tryptophane (Fellah et Bensahla, 2019).

## Résultats et discussions



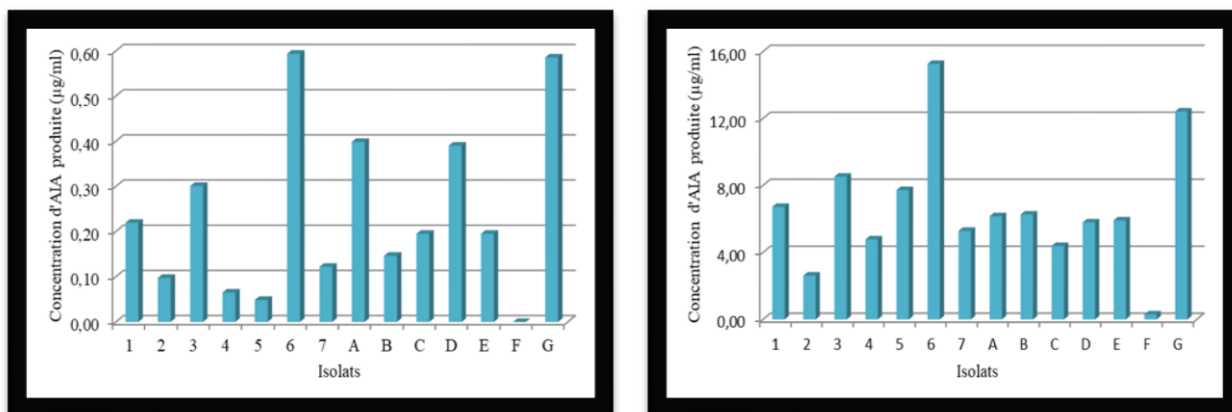
**Figure 15 :** Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique (Fellah et Bensahla, 2019).

La production d'acide indole acétique est une activité caractéristique des *Azotobacter*, elle a été rapportée par Ahmad *et al.*, (2008b), Ahmad *et al.*, 2008a ; Vikram, (2011), Ponnurugan *et al.*, (2012) Silini, (2013) ; Kumar *et al.*, (2014) ; Ojha et Marahatta, (2015) ; Ghalem, (2016) ; Aidouni et Mesmoudi, (2018) ; Fellah et Bensahla, (2019), les taux rapportés par ces autres varient de 1 µg/ml à 82.00 µg/ml

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

D'après Aidouni & Mesmoudi, (2018) et Fellah & Bensahla, (2019) le taux d'expression de cette activité est fortement corrélé à la concentration du précurseur dans le milieu de culture, ainsi l'ajout de 5 g/l de précurseur accroît la production en acide indole-acétique. Le seuil maximal de production passe de 0.59 µg/ml à 15.26 µg/ml (Figure 16). Ces observations sont en accord avec ceux rapportés par El-Mahrouk et Belal, (2007) et Ponnurugan *et al.*, (2012) et Sethi et Adhikary, (2012). Ces auteurs ont aussi remarqué, chez des bactéries diazotrophes notamment des *Azotobacter*, la dépendance de la production d'AIA de la présence du L- tryptophane dans le milieu de culture.

## Résultats et discussions



**Figure 16:** Exemple des résultats du test de production d'AIA d'isolats fixateurs d'azotes sur milieu de culture luria-Bertani (à gauche) additionné de (5g/l) de L- tryptophane (à gauche) (Fellah et Bensahla, 2019).

### 3.3. Production d'ammonium (NH<sub>3</sub>)

L'ammoniac est une source importante d'azote pour les plantes. Il favorise la croissance des plantes et améliore la production de fruits et de graines, ce qui se traduit par un meilleur rendement. Il est également essentiel pour la photosynthèse. Les ions ammonium sont efficaces comme engrais (Caines, 2018).

L'enzyme nitrogenase joue un rôle important dans la réduction de N<sub>2</sub> fixé en NH<sub>3</sub> chez les bactéries fixatrices d'azote. L'ammoniac fixé est assimilé en glutamate et glutamine qui sont importants pour former des composés azotés organiques dans les cellules telles que les acides aminés, les acides nucléiques, les protéines, etc. Après la mort bactérienne et la lyse, ces composés sont rejetés dans l'environnement et utilisés comme sources d'azote par d'autres organismes tels que les plantes (Hartono *et al.*, 2016).

Outre la fixation d'azote, L'ammoniac peut être produit par ammonification au nitrite, par dégradation de divers acides aminés des milieux complexes, par décarboxylation d'acides aminés, par désamination, et par la dégradation de l'urée médiée par l'uréase (Weise *et al.*, 2013).

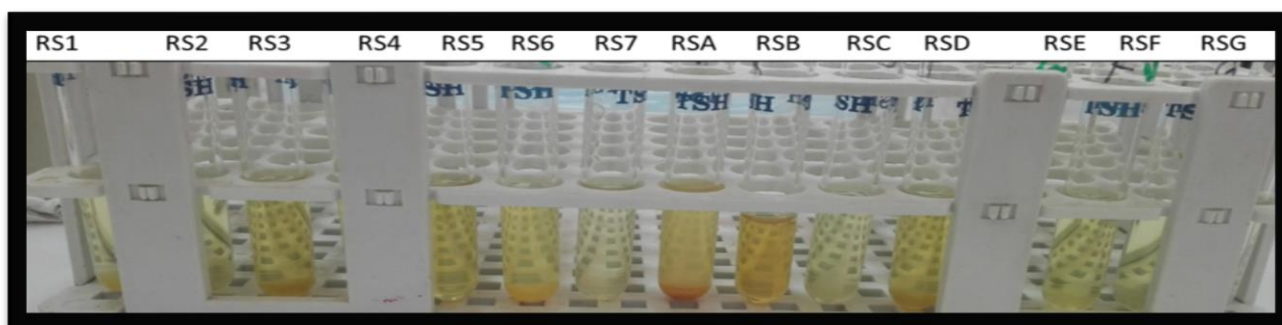
En plus de son effet bio fertilisant, Cherif, (2014) a rapporté sur l'action inhibiteur de l'ammoniac sur certains phytopathogènes.

En général, La production d'ammoniac est recherchée par la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Cette méthode permet une estimation qualitative de la production de ce métabolite. Fellah & Bensahla, (2019) ont apporté des modifications à cette méthode afin d'en tirer une estimation quantitative, selon ces auteurs l'examen de l'aspect du milieu après

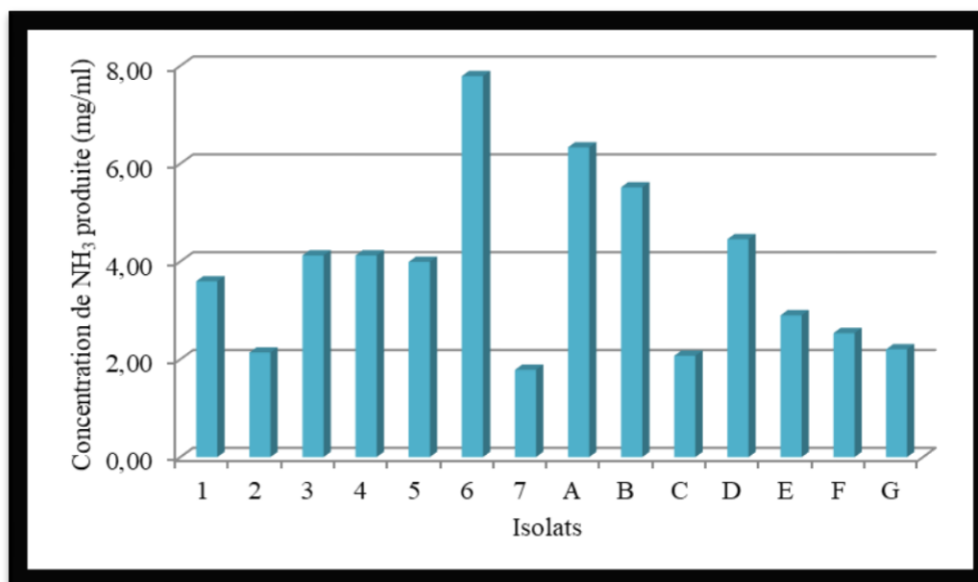
## Résultats et discussions

inoculation, incubation et l'ajout du réactif de Nessler, permet une appréciation qualitative (développement d'une couleur jaune ou orange) (*Figure 17*). Les taux de production d'ammoniac  $\text{NH}_3$  (*Figure 18*) sont, cependant, déterminés en se rapportant à la courbe étalon (*Figure 19*).

Les taux de production d'ammoniac  $\text{NH}_3$  reporté par **Fellah & Bensahla, (2019)** a varié de 1.8 mg/ml à 7.8 mg/ml. Le taux maximal étant observé avec l'isolat RS6.

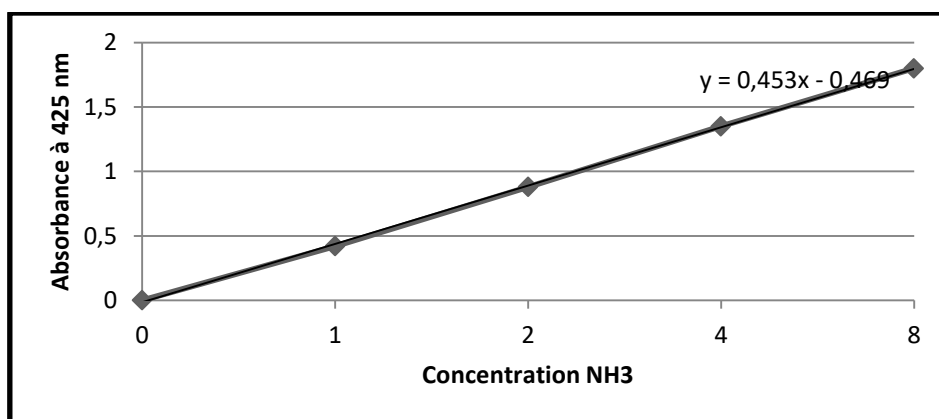


**Figure 17:** Résultats de la capacité des quatorze isolats à produire l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) (**Fellah et Bensahla, 2019**).



**Figure 18:** Concentrations d'ammoniac  $\text{NH}_3$  produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur milieu eau péptonée (**Fellah et Bensahla, 2019**).

## Résultats et discussions



**Figure 19** : Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH<sub>3</sub> (Fellah et Bensahla, 2019).

La production de NH<sub>3</sub>, propriété commune des PGPR, est très fréquente chez *Azotobacter*, elle fut déjà rapportée par de nombreux auteurs (Joseph et al., 2007; Silini, 2013 ; Aouane et Hamani, 2017 ; Plunkett, 2018 ; Plunkett et al. 2020).

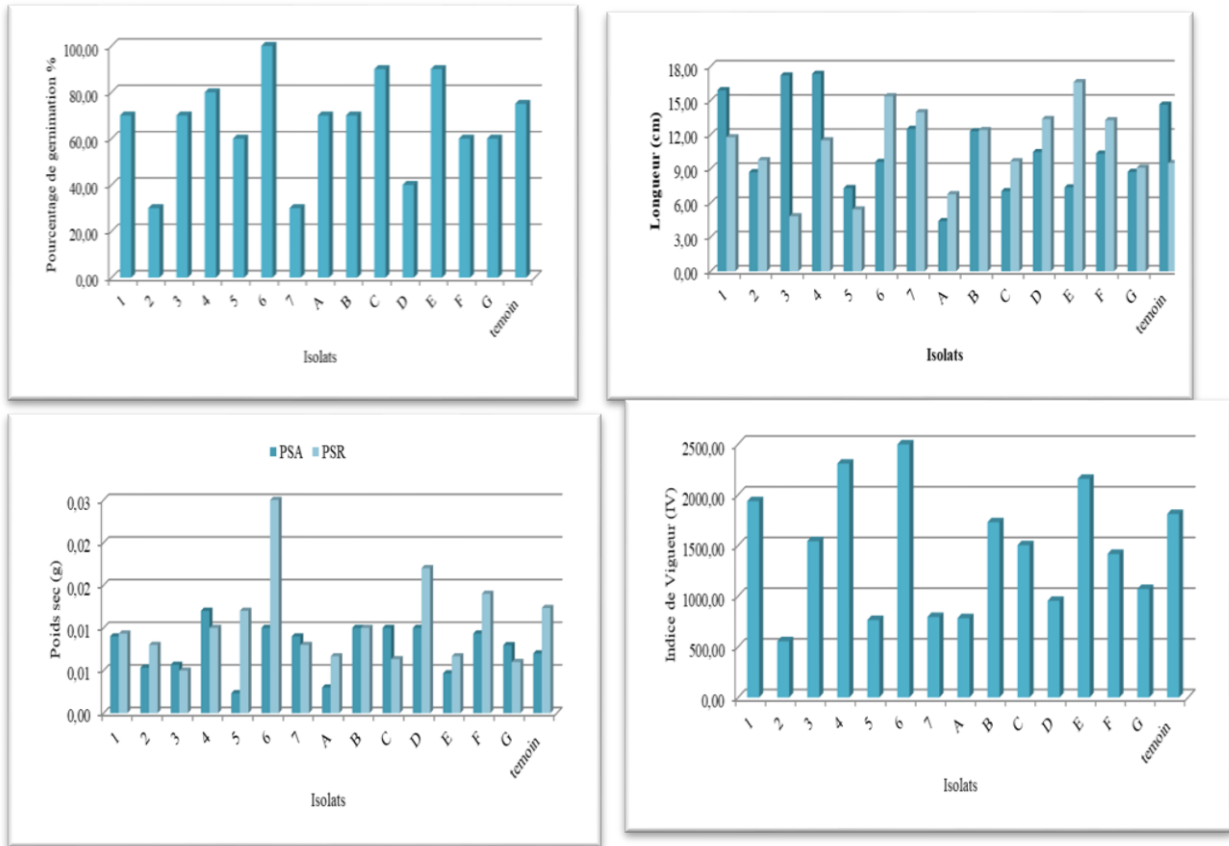
#### 4. Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du blé dur

Selon Backer et al., (2018), une fois que les souches PGPR cultivables ont été isolées, elles 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.

Le criblage des isolats d'*Azotobacter* pour leur capacité à améliorer la germination peut être réalisé en utilisant divers sorte de grains tel que le blé, la tomate, le pois chiche, le riz, le coton...etc. l'évaluation de l'efficacité des souches est effectuée par le relever et le calcul ou même le dosage de certains paramètres : pourcentage de germination, longueur de la radicule et de la tige, poids sec, l'indice de vigueur, le taux d'accumulation d'azote, de carbone et de phosphore ainsi que le dosage de la chlorophylle. Les résultats sont analysés statistiquement et représentés sous forme de tableaux ou d'histogrammes (Figure 20). Parfois l'effet des souches est visible à l'œil nue (Figure 21) Plusieurs auteurs ont rapporté sur effet

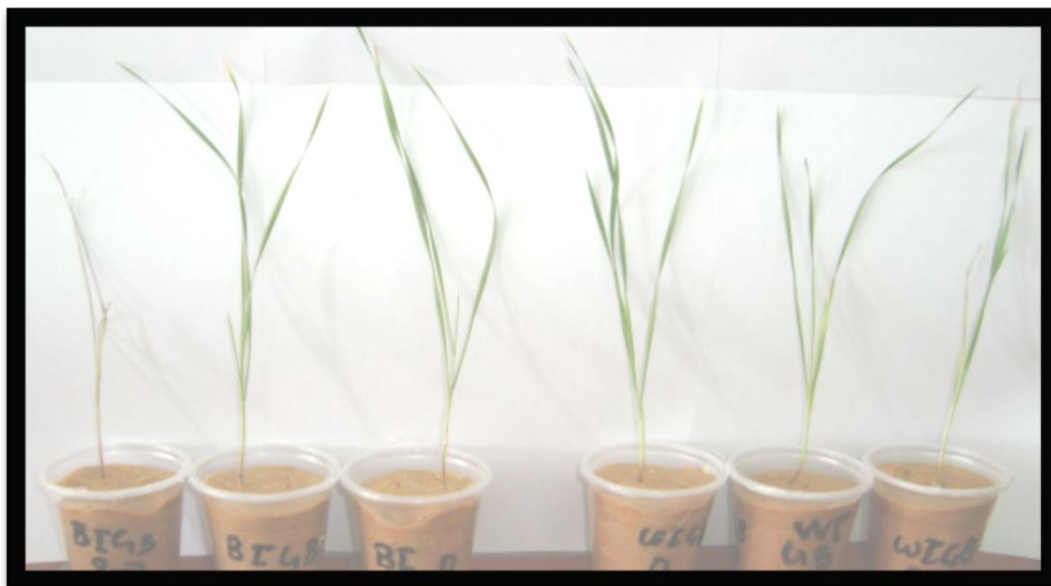
## Résultats et discussions

positif de l'inoculation par *Azotobacter* sur la germination (Silini, 2013 ; Malki et Lahmar, 2014 ; Jnawali *et al.*, 2015 ; Ghalem, 2016 ; Aidouni et Mesmoudi, 2018 et Fellah et Bensahla, 2019).



**Figure 20:** Effet des isolats sélectionnés fixateurs d'azotes sur : le taux de germination, la longueur des racines (LR) et des tiges (LT), le poids sec des racines (PSR) et des tiges (PST) et l'indice de vigueur des graines de blé dur (Fellah et Bensahla, 2019).

## Résultats et discussions



**Figure 21:** Aperçu des résultats de test de germination (Silini, 2013).

Selon Magda *et al.*, (2012), le trempage des graines de blé stérilisées dans le filtrat des cultures d'*Azotobacter* producteur d'AIA a amélioré significativement le taux de germination et l'indice de germination des graines. Les bactéries du genre *Azotobacter*, en plus d'être des diazotrophes, synthétise des substances biologiquement actives telles que les sidérophores et les phytohormones (les auxines) stimulant ainsi la croissance des plantes (Ahmed *et al.*, 2005). Ils facilitent également la solubilité de certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration des sols (Rajaei *et al.*, 2007).

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

L'inoculation du riz par les *Azotobacter* permet une amélioration significative des rendements avec des augmentations atteignant les 20%. Elle permet, aussi, d'augmenter la teneur en azote des plantes jusqu'à plus de 15 kg/ ha (Saharan et Nohra, 2011).

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

## *Résultats et discussions*

Enfin, selon **Aidouni et Mesmoudi, (2018) et Fellah et Bensahla, (2019)**, les *Azotobacters* 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 et du poids est observée chez les lots traités et l'état de santé des plantules est fortement amélioré, les IV obtenus sont nettement supérieur à l'IV témoin.

**CONCLUSION**

## Conclusion

Un bio fertilisants également appelés «biostimulant» ou «activateur de sol» (Faessel *et al.*, 2015), est un matériel qui contient une (des) substance(s) et/ou microorganisme(s) dont la fonction, quand il sont appliqués aux plantes ou à la rhizosphère, est de stimuler les processus naturels pour améliorer/avantager l'absorption des nutriments, l'efficacité des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques, et la qualité des cultures». L'objectif tracé pour le présent travail été l'isolement et la sélection de souches PGPR diazotrophes (du genre *Azotobacter*) à fort potentiel biofertilisant à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur cultivées sur le sol de la région de Tessela (willaya de Sidi Bel Abbès), de caractériser leur potentiel PGP, et d'étudier l'impact des inocula formulés de ces souches sur la germination du blé dur.

L'avènement de la pandémie du Covid 19 et l'instauration des mesures préventifs par l'état, plus particulièrement le confinement et le gel des activités au sein des laboratoires des établissements universitaires du pays, ont entravés la bon conduite de la présente étude et de ce faite on s'ait retrouver contraint à transformés le travail expérimental prévu en une analyse bibliographique ou ont été revus et discutés les contributions des scientifiques et chercheurs Algériens autour du thème abordé.

A travers cette étude on a pu constater qu'en Algérie peu d'intérêt est porté aux biofertilisants et surtout au genre *Azotobacter*. les productions scientifiques à ce sujet se font de plus en plus rare (deux thèse en cours de réalisation, deux thèse, trois articles scientifiques et 3 mémoire de master).

Les travaux analysé adoptent tous la même startegies d'isolement et des protocols de caractérisation qui se rapprochent. Les auteurs de ces travaux admettent la faible abondance de ces microorganismes dans nos sols. Ils se consentent sur le potentiel PGPR de ces bacteries. Tous les isolats qu'il décrivent expriment des activités PGPR majeurs tel que : la solubilisation de phosphate tricalcique, la production du  $\text{NH}_3$  la production d'acide indol-acétique et la fixation d'azote.

Ces travaux assurent l'efficacité du traitement d'inoculation réalisés sur les graines de blé dur et de pois chiche. Selon leurs auteurs les *Azotobacters* exercé un très bon pouvoir de promotion sur la germination elle-même et sur le développement des jeunes plantules

## *Conclusion*

(pourcentage de germination, longueur et le poids des plantules obtenus). Ils sont aussi rapportés une nette amélioration de l'état de santé des plantules sous l'effet des inoculation réalisés.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

# Références bibliographique

## Références bibliographique :

**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., I. Ahmad et M.S. Khan (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.

**Ahmed, O.H., H. Aminuddin et M.H.A. Husni (2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agric. Scand.*, 58: 182-186.

**Aidouni, A. et Mesmoudi, A. (2018).** isolement, identification et caractérisation des *Azotobacter* PGPR et leurs effets sur le blé dur (*Triticum durum*) Université Sidi Bel Abbes Algérie.

**Alam.S., Nargis Akhter., Most.Ferdousi Begum., Saina Ban.M. , Rafiqul Islam., Arfatun Nahar Chowdhry and M.S. Alam (2002).** Antifungal Activities (in vitro) of some Plant Extract and Smok ou Four fungal pathogens of different Host. *Pakistan Journal Biological Sciences* 307-309.

**Allioui N. (1997).** : Etude de quelques altérations physiologiques et biochimiques causées par la rouille brune du blé – Thèse Magistère – Univ. ANNABA.

**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.

## *Références bibliographique*

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

**ANOUA, B., Jaillard, B., RUIZ, J., Bénét, J. C., & Cousin, B. (1997).** Couplage entre transfert de matière et réactions chimiques dans un sol. Partie 2: Application à la modélisation des transferts de matière dans la rhizosphère. *Entropie (Paris)*, 33(207), 13-24.

**Antoun, H., & Prévost, D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1-38). Springer, Dordrecht.

**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.

**Atlas, R.M. ( 2005).** Handbook of media for environmental microbiology. 2nd ed. Crc Press. Boca Raton.USA.

**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>.

**Baldini, M., R. Giovanardi, S. Tahmasebi-Enferadi et G.P.Vannozzi (2000).** Effects of water regime on fatty acid accumulation and final fatty acid composition in the oil of standard and high oleic sunflower hybrids. *Ital. J. Agron.*, 6(2): 119-126.

**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.

**Barea, J.M., M.J. Pozo, R. Azcón et C. Azcón-Aguilar (2005).** Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 56: 1761-1778.

**Bashan, Y., G. Holguin et LE. De-Bashan (2004).** Azospirillum-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50: 521-577.

**Beauchamp, C. J. (1993).** Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents, *Phytoprotection* 71:19-27.

## *Références bibliographique*

**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, (1986).** Aspect sur la céréaliculture Algérienne. Ed. OPU. pp 75-86.

**BENDJIDA, H., & AOUADI, S. (2019).** Effet promoteur des bactéries PGPR sur la croissance de la fève (*vicia faba* L). (Abnatura., 2013)

**Berg G., (2009).** Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:11–18.

**Bloemberg, G. and Lugtenberg, B.( 2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:343-350.

**BODDEY, R.M., and DOBEREINER,J.,( 1988).** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals :Recent results and perspectives for future research. *Plant and soil* 108,53-65.

**Botton, B., Breton, A., Febre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J. P., ... & Veau, P. (1990).** Useful and harmful moulds. Industrial importance. *Useful and harmful moulds. Industrial importance.*, (Ed. 2).

**Bova , F. (2012).** Bilan céréalier & oléo-protéagineux. *Les marchés de FranceAgriMer*.168-170-173.

**Bowen, G. D., & Rovira, A. D. (1991).** The rhizosphere: the hidden half of the hidden half.

**Brenner, D. J., R.N. Krieg et J.T. Staley(2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Michigan State University publishers, pp. 384-402.

**Benmati, M., & Djekoun, A. (2014).** PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.)”: Aspects moléculaires et génétiques. *Université Constantine*, 1, 87-150.

**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.

## *Références bibliographique*

**Cappuccino, J. C. et N. Sherman (1992).** Microbiology: A Laboratory Manuel, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.

**Chaiharn et Lumyong ( 2011).** screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization rhizobacteria aimed at improving plant growth currnt microbiology ,62(1),173\_181

**Cheng, Z., E. Park et B. Glick (2007).** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can J. Microbiol.*,53(7):912–918.

**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).

**Cleveland, C.C., A.R. Townsend, D.S. Schimel, H. Fisher, R.W. Howarth, L.O. Hedin, S.S Perakis, E.F. Latty, J.C. Von Fischer, A. Elseroad, et M.F. Wasson (1999).** Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N-2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 13: 623-645

**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.

**Delarras C (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques.

**Dénarié, J., F. Debellé, et C. Rosenberg (1992).** Signaling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.*, 46: 497-531.

**Djermoun A . (2009).** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques.

**Ecker, J.R. (1995).** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* ,268:667-675

**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.

## *Références bibliographique*

**El HadeF El Okki, L. (2018).** Valeurs d'appréciation de la qualité technologique et biochimique des nouvelles obtentions variétales de blé dur en Algérie (Doctoral dissertation).

**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.

**Faessel, L., Tostivint, C., et Schaller, N. (2015).** Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes : état des lieux et perspectives. Rapport final d'une étude commanditée par le Centre d'Etude et de Prospective du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. 2015. 8 p.

**Fallik, E., S. Sarig et Y. Okon (1994).** Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. pp: 77–85. In: *Azospirillum–Plant Associations*. Okon Y. (ed.). CRC Press, Boca Raton.

**FEILLET. (2000).** « Le grain de blé composition et utilisation ». INRA.

**Fellah, S. et Bensahla, M. (2019).** Isolement et caractérisation des bactéries rhizosphérique à potentiel biofertilisant, Université Sidi Bel Abbas Algérie .

**Feldman M. (2001).** Origin of cultivated wheat. Dans Bonjean A.P. et Angus W.J. (ed). *The world wheat Book: a history of wheat breeding*. Intercept limited, Andover, Angle Terre, 3-58.

**Franssen, H.J., I.Vijn, W.C. Yang, et T. Bisseling (1992).** Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.*, 19: 89-107

**Frey-Klett, P., J.Garbaye, et M. Tarkka (2007).** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176: 22-36.

**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.

**Garbaye, J. (1994).** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley review,76). *New Phytologist*, 128: 197-210.

## *Références bibliographique*

**Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W.A. and Krieg N.R.,( 1994).** Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington DC, ASM, USA.

**Gouzou, L. (1992).** Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante: Cas de *Bacillus Polymyxa* (Doctoral dissertation).

**HAMDI F.( 1994).** Etude de fertilisation azotée du blé dur (*Triticum durum* Desf)

Mitidja. Mem. Ing. Agro. INA. Alger. pp 19-24.

**Harlan J.R., (1975) .**Our vanishing genetics resources. Science, 188:618-621.

**HARRAT W, (2005).** Fertilisation azotée du blé dur (*Triticum durum* Desf) variété

simeto, en Mitidja : comparaison des formes et modalités d'apport de l'azote (au sol et foliaire). Mem. Ing. Agro. INA. Alger. 16p.

**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. ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences. 11. 11735-11741.

**Herve Y ., (1979 )-** Introduction à l'amélioration des plantes. Cours. École nationale supérieure agronomique De Rennes.

**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.

**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.

## *Références bibliographique*

- 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.
- 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.
- Kellou R (2008).** Analyse du marché Algérien de blé dur et les opportunités d`exportation pour les céréaliers français dans le cadre du pôle de compétitivité. Mémoire de Master :169Montpellier.
- 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.
- 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, M. S ., A. Zaidi., et M. Javed (2009).** *Microbial Strategies for Crop Improvement*. pp: 1371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 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 Abbès.
- 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.

## *Références bibliographique*

- 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.
- Mebarkia, A., Benkohila, H. S., Hamza, M., & Makhlouf, M. (2012).** Efficacité d'une protéine entomotoxique du type a1b des graines de légumineuses.
- Morgan, J.A.W., Bending, G. D. et White, P. J (2005).** Biological costs and benefits to plant microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1729–1739
- 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 Microbiol. Lett.*, 170: 260-270.
- Nautiyal C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170: 260-270.
- 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.
- Neyra CA, Döbereiner J, Lalande R, R Knowles. (1977) .** La dénitrification par  $N_2$  fixatrices *Spirillum lipoferum* . *Can J Microbiol* 23: 300–305
- 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.
- O'Hara, G. W., A. Hartzook, , R. W. Bell et J. F. Loneragan (1988).** Response to *Bradyrhizobium* strain of peanut cultivars grown under iron stress. *J. Plant Nutr.* 11: 6-11.

## *Références bibliographique*

- 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.
- Olsen, S.R., et L.E. Sommers (1982).** Phosphorus. pp: 403-430. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbial Properties.* Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), second ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Oudjani W (2009).** Diversité de 25 géotypes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) : étude des Caractères de production et d`adaptation. Mémoire de magister : 113 Constantine.
- 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.
- Perret, X., C. Staehelin et W.J. Broughton (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 180-201.
- Peshin,R .,Dhawan,A .K .,(2009).** *Integrated Pest Management: Innovation\_ Development Process* .Springer, south Carolina, usa. 668P.
- Peshin,R .,Dhawan,A .K .,(2009).** *Integrated Pest Management: Innovation\_ Development Process* .Springer, south Carolina, usa. 668P.
- Pivato, B., P. Offre, S. Marchelli, B. Barbonaglia, C. Mougel, P. Lemanceau, et G. Berta (2009).** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19: 81-90
- 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.

## *Références bibliographique*

**POUSSET J,( 2002).** Engrais vert et fertilité des sols. 2ème édition. Ed Agri décisions Agriculture d'aujourd'hui. Ed Lavoisier Paris. 333p.

**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.

**Rajae S., H.A Alikham et F. Raiesi. (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.

**Rangarajan S., L.M. Saleena et S. Nair (2002).** Diversity of Azospirillum strains isolated from rice plants in coastal agri-ecosystems. Microb. Ecol., 44: 271-277.

**Remans, R., A. Croonenborghs, R.D. Gutierrez, J. Michiels et J. Vanderleyden (2007).** Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of Phaseolus vulgaris are dependent on plant P nutrition. pp: 341-351. In : New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. Lemanceau, P., Bakker, P., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas

**RENNIE, R.J.,(1980).**DINITROGEN\_fixing bacteria: computer-assisted identification of soil isolates. Can .J.MicrobioL .26,1275-1283.

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

**Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P,(1990).**Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.

**Schippers, B., A.W. Bakker, R. Bakker et R. van Peer. (1990).** Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. Plant Soil, 129: 75- 83.

**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.

## *Références bibliographique*

**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.

**Sharma, K., G. Dak, A. Agrawal, M. Bhatnagar et R. Sharma (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>

**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.

**Siddiqui, Z. (2006).** PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 111-142.

**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.

**SIMON H, CODACCIONI P et LECOEUR X, (1989).** Produire des céréales à paille. *Agriculture d'aujourd'hui*. Ed Lavoisier Paris. 333p.

**Spaepen, S., J. Vanderleyden et R. Remans (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31 (4): 425-448.

**Steenhoudt, O. et J. Vanderleyden (2000).** Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects, *FEMS Microb.Rev.*,24: 487-506.

**Schroth, M. N., & Hancock, J. G. (1982).** Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, 216(4553), 1376-1381.

**Thakuria, D., N.C Talukdar, C. Goswami, S. Hazarika, S. Boro et M.R. Khan (2004).** Characterization and screening of bacteria from the rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr. Sci.*, 86: 978-985.

## *Références bibliographique*

- Thoma, R. E., Brunton, G. D., Penneman, R. A., & Keenan, T. K. (1970).** Equilibrium relations and crystal structure of lithium fluorolanthanate phases. *Inorganic Chemistry*, 9(5), 1096-1101.
- 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.
- Van der Heijden, M.G.A., R.D. Bardgett, et N.M. van Straalen (2008).** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.*, 11: 296-310.
- Vessey, J.K (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255 : 571– 586.
- 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.
- Weller, D.M. (1988).** Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.
- Whipps J.M. (1990).** Carbon utilization. pp: 59-97. In: *The Rhizosphere*. Lynch J.M. (ed.). Wiley Interscience, Chichester, UK.
- Wipps , J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Experimen. Bot.*, 52: 487-511.
- Zahir,Z.A., ArshadM.,William,T.,Frankenberg, Jr.,(2004).**Plant Growth Promoting Rhizobacteria.*Agriculture Advances in Agronomy* **81**,97\_168.

# **ANNEXES**

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

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

PH  $7.2 \pm 0.2$  à 25°C

## Gélose nutritive :

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH = 7,4

## Milieu VF (Viande-Foie) :

Base viande foie	30,0g
<u>Glucose</u>	2,0g
Agar	6,0g
Eau distillée qsp	1000ml
pH = 7,0	

## Milieu luria-bertani dilué au 1/10eme :

Tryptone	1g
Na Cl	1g
Extrait de levure	0.5g
Agar	15g
pH=7	

## Milieu mannitol mobilité :

Hydrolysate tryptique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
Eau distillée qsp	1000ml
PH = 7,6	

## Milieu Ashby :

Composition en g/l d'eau distillée est :

Mannitol	20g
----------	-----

## *Annexes*

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

### **Bouillon *Azotobacter* :**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2g
Na Cl	0.2g
FeSO <sub>4</sub>	5mg
Solution de sol	100ml
Eau distillée q.s.p	1000ml

PH =7

**Tableau 01** : Composition des standards de turbidité de Mc Farland d'après NCCLS site dans Sekkour 2008

Standard de turbidité numéro	Di hydrate de chlorure de baryum (1.175%), en ml	Acide sulfurique (1%), en ml	Densité approximative correspondante de bactéries /ml
<b>0.5</b>	0.5	99.5	<b><math>1.10^8</math></b>
<b>1</b>	0.1	9.9	<b><math>3.10^8</math></b>
<b>2</b>	0.2	9.8	<b><math>6.10^8</math></b>
<b>3</b>	0.3	9.7	<b><math>9.10^8</math></b>
<b>4</b>	0.4	9.6	<b><math>12.10^8</math></b>
<b>5</b>	0.5	9.5	<b><math>15.10^8</math></b>
<b>6</b>	0.6	9.4	<b><math>18.10^8</math></b>
<b>7</b>	0.7	9.3	<b><math>21.10^8</math></b>
<b>8</b>	0.8	9.2	<b><math>24.10^8</math></b>
<b>9</b>	0.9	9.1	<b><math>27.10^8</math></b>
<b>10</b>	1.0	9.0	<b><math>30.10^8</math></b>

