

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*



*Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie*

Mémoire de fin de cycle

*En vue de l'obtention du diplôme de
Master en Biotechnologie Microbienne*

Thème

*Recherche de caractères d'intérêt agricole chez certaines
bactéries rhizosphériques*

Réalisé par :

M^{lle} AZROU Silia

M^{lle} GUETTAFI Narimane

Membres de Jury :

Président : M^r BENSAID K.

Examineur : M^r BENDJEDOU K.

Examineur : M^r MOUSSAOUI B.

Promoteur : M^r NABTI EL-H.

Co-Promotrice : M^{lle} BENSIDHOUM L.

2013/2014



REMERCIEMENT



Avant tout, Nous tenons à remercier Allah le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience ;

Nous tenons à remercier très profondément Mr. NABTI El-Hafid de nous avoir encadré, conseillé et encouragé et de nous avoir permis de travailler dans un cadre très agréable, nous vous somme infiniment reconnaissantes.

On tient à exprimer nos profonde reconnaissance à M^{lle} BENSIDHOUM Leila notre Co-promotrice, pour son suivi attentif, son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés tout au long de ce travail.

Nous remercions tous les membres du jury d'avoir évalué notre travail.

Nous remercions particulièrement Mr. BENSaid K. pour son aide et ces précieux conseils.

Nous remercions également, Mr. MESSIS Aziz, Mr. BETTACHE Azzedine et l'équipe de laboratoire LMER : Abdelwahab, Nassira et Kamel.

En fin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Silia & Narimane



Dédicace



Je dédie ce travail

A la mémoire de mes grands-parents Allaoua, Mouhou et Louiza

et à notre collègue HAMAR Monir ;

À mes chers parents qui m'ont tant soutenu tous le long de mon parcours. Aucun hommage ni remerciement ne saurait être suffisant

À mon fiancé Mnd Cherif ;

À ma grande mère ;

À mes deux frères adorables Hilal et Kkhalef ;

À mes très chères sœurs Noura, Bina, Chafia, et leur chers maris Boukhelfa, Lyes et Nacer ;

À ma plus belle ange Mira ;

À mes nièces Sissa et Maya et mon neveu Smaili ;

À ma belle-famille surtout la petite Meriem et mon neveu Yani,

À tous mes cousins et cousines,

À toute la famille Azrou et Smaili ;

À ma collègue Narimane, une copine avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, ainsi qu'à sa famille surtout sa sœur Déhia ;

À mes très cher copines Souad, Fatima ; Soraya, Saliha et Naima

À tous mes amis de la promotion BM ; Tous ceux qui m'ont aidé et soutenu.

Silia



Dédicace



À la mémoire de mes grands-parents Mohand Ameziane et Takhelite ;

À l'hommage de notre frère et camarade HAMAR Mounir ;

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert que je dédie mon travail à mes très chers et magnifiques parents qui m'ont soutenu tout au long de ma vie ;

À mon cher fiancé, que je remercie pour le soutien et le réconfort qu'il m'a apporté ;

À mes deux adorables sœurs Nadia et Déhia et leurs maris Malek et Halim ;

À mes deux chers frères Salim et Amirouche ;

À ma grand-mère Tassadit (Mamani) et mon grand-père Yahia,

À tous mes oncles et tantes

À mon beau neveu Ahmad et ma très chère nièce Nouna et à mon adorable Bébéto

À toute la famille, Guettafi et Aziez ;

À ma très chère copine Silia avec qui j'ai partagé ce parcours et passé de bons moments ainsi qu'à toute sa famille ;

Et je ne saurais terminer sans citer ma belle-famille : tata Fatiha et mon beau-père Cherif ;

À tous mes cousins et cousines ;

À toutes mes chères amies en particulier Lydia, Khadidja, Rima, Souhila et Naima

À tous mes amis de la promotion BM

Qu'ils trouvent à travers ce travail ma sincère reconnaissance

Narimane

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les bactéries d'intérêt agricole

1. Le sol 02

1.1-La rhizosphère..... 02

1.2-Les bactéries d'intérêt agricole 02

1.2.1-Les PGPR..... 03

1.2.2-Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des
plantes par les PGPR 03

a. Les mécanismes directs..... 03

1). Fixation d'azote..... 03

2). Solubilisation de phosphore..... 04

3). Formation de sidérophores..... 04

4). Production des régulateurs de la croissance végétale..... 04

b. Mécanismes indirectes 05

1). La Compétition 05

2). L'antibiose 05

3). Production d'enzymes..... 06

4). Résistance systémique induite (ISR) 06

Chapitre II : Les enzymes d'intérêt d'agricole

1. Activités enzymatiques	07
1.1-Activité cellulasique	07
1.2-Activité chitinasique	07
1.3-Activité amylasique	07
1.4-Activité protéasique	08
1.5-Activité phosphatasique	08
1.6- Activité uréasique	08
1.7-Activité esrérasique et lipasique09

Partie pratique

Chapitre I : Matériel et méthodes

I-Prélèvements et isolement des bactéries	10
I.1-Tests physicochimiques du sol	11
I.1.1-Humidité	11
I.1.2-pH	12
a .pH- eau	12
b .L'acidité titrable ou de réserve.....	12
II- Identification bactérienne	12

III. Recherche des enzymes d'intérêt agricole.....	13
III.1.Activités enzymatiques.....	13
1)..Détermination de l'activité cellulasique.....	13
2).Détermination de l'activité estérasique et lipasique.....	13
3).Détermination de l'activité chitinasique	13
4).Détermination de l'activité protéasique.....	14
5). Détermination de l'activité amylasique.....	14
6).Détermination de l'activité uréasique.....	14
7).Solubilisation de phosphate.....	14
III.2-Production de sidérophore.....	15
III.3-Production de phytohormone.....	15
III.4-L'activité antifongique.....	16
1).Mise en évidence de l'activité antifongique.....	16
2).Analyse statistique des résultats obtenus.....	16
III.5-Tolérance aux métaux lourds.....	17
III.6-Production d'ammoniac.....	17

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Tests physicochimiques du sol.....	18
I.1.Humidité.....	18
I.2 .pH.....	19
II- Identification bactérienne.....	19

III. Recherche des enzymes d'intérêt agricole.....	22
III.1.Activités enzymatiques.....	22
1).Activité cellulasique.....	23
2).Activité estérasique et lipasique.....	24
3).Activité chitinasique.....	24
4). Activité amylasique.....	25
5).Activité protéasique.....	25
6).Activité uréasique.....	26
7).Solubilisation de phosphate.....	26
III.2-Production de sidérophore.....	27
III.3-Production d'AIA.....	28
III.4-L'activité antifongique.....	29
III.5-Tolérance aux métaux lourds.....	35
III.6-Production d'ammoniac.....	36
Conclusion et perspectives.....	38
Références bibliographiques.....	39
Annexes	

Liste des abréviations

ACC 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate

AIA Acide Indole Acétique

CAS Chrom AsuroI S

CMC CarboxyMethyl Cellulose

HDTMA Hexadécyl-Ttriméthyl-Ammonium

PBS Phosphate Buffered Saline

PGI Percentage Growth Inhibition

PGPR Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PGP Plant Growth Promoting

RSA Résistance Systémique Acquise

RSI Résistance Systémique Induite

SNK Student-Newman-Keuls

Liste des figures

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
1	Mécanismes d'action des Rhizobactéries.	06
2	Les lieux de prélèvement des échantillons.	10
3	Etapes d'isolement à partir des échantillons du sol.	11
4	Aspects des colonies obtenues sur milieu de culture GN.	20
5	Images des résultats des tests d'activités enzymatiques testées	23
6	Résultats obtenus pour le test de production de sidérophore.	27
7	Quantités d'AIA produites par les différentes bactéries testées.	28
8	Taux d'inhibition de la croissance des phytopathogènes en présence des bactéries testées.	30
9	Graphiques des moyennes des PGI% obtenus par l'analyse statistique : A ; Souches ; B ; Souches-champignons.	32
10	Images des résultats de test d'antagonisme des différentes bactéries vis-à-vis des champignons phytopathogènes.	34

Liste des tableaux

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Les valeurs de l'humidité de deux échantillons	18
II	Les valeurs du pH-eau et pH-KCl de deux échantillons.	19
III	Caractères biochimiques et physiologiques des quatre isolats	20
IV	Résultats des tests biochimiques des deux souches réalisés sur API 50 CHB/ E	21
V	Résultats des différents tests d'activités enzymatiques appliqués sur les bactéries sélectionnées.	23
VI	Résultats de production de sidérophores.	27
VII	Pourcentages d'inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes	30
VIII	Effet de la souche, champignons et de l'interaction souches-champignons sur le PGI%	31
IX	Les groupements homogènes (souches) obtenus par l'analyse statistique (ANOVA) à intervalle de confiance 95% (Test de Newma –Keuls (SNK) $p \leq 0,05$)	31
X	Classement des groupements homogènes (champignons obtenus par l'analyse statistique (ANOVA) à intervalle de confiance 95% (Test de Newma –Keuls (SNK) $p \leq 0,05$)	32
XI	Résultats de la tolérance des bactéries testées aux métaux lourds	35
XII	Résultats de production de L'ammoniac.	36

Introduction

La quête constante de l'homme pour l'amélioration de la productivité et la réduction des coûts des produits agricoles ont eu des incidences négatives et à plusieurs niveaux. Les produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace, mais l'utilisation accrue de ces substances a des conséquences néfastes sur l'environnement (Kouassi, 2001 ; Thakore, 2006). En plus des produits chimiques, les régions désertiques, non utilisées par l'agriculture et la salinité constituent d'autres obstacles pour l'agriculture (Nabti *et al.*, 2007).

L'utilisation des bactéries dites promotrices de la croissance des plantes peut constituer une solution alternative prometteuse pouvant réduire l'application des produits chimiques (Nabti *et al.*, 2014).

A ce titre, beaucoup de travaux ont été publiés ces dernières années sur l'application des bactéries rhizosphériques pour améliorer le rendement des récoltes et la santé des plantes. Ces bactéries appelées PGPR (Rhizobactéries promotrices de croissance des plantes) présentent un grand intérêt scientifique et agronomique, car elles jouent un rôle important dans le fonctionnement biologique de la rhizosphère, et ont donc un effet important sur la croissance des plantes ainsi que la lutte biologique contre les agents phytopathogènes (De Salamon *et al.*, 2005). L'effet des PGPR offre donc des possibilités intéressantes pour une agronomie respectueuse de l'environnement. En effet, une meilleure connaissance de l'utilisation de ces populations bactériennes pourrait permettre une diminution des intrants phosphatés et des pesticides polluants dans les sols agricoles (Wojcieh et Lise, 2002).

C'est dans cette optique que notre travail est dirigé, il s'agit d'un isolement de bactéries à partir d'un sol agricole de la région d'Akbou (wilaya de Bejaïa) pour la mise en évidence de caractères promoteurs de la croissance des plantes.

Les isolats sélectionnés additionnés de quatre souches de la collection de Laboratoire de maîtrise des énergies renouvelables (LMER), équipe : Biomasse & Environnement), de l'université de Bejaïa, sont testées pour leur aptitude à synthétiser des enzymes d'intérêt agricole, des phytohormones, leur activité inhibitrice de certains champignons phytopathogènes et leur résistance aux métaux lourds.

1. Le sol :

Le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité d'organismes (notamment les microorganismes) de composés chimiques et une structure physique complexe (Wild, 1993). Il est également le substrat qui fournit un soutien physique et des éléments minéraux pour les plantes constituant un élément fondamental pour l'écosystème terrestre (Nehl *et al.*, 2006).

1.1. Rhizosphère :

Le terme rhizosphère dérive d'un mot grec « Rhizo » ou « Rhiza » =racine et « Sphère »= champs d'influence (Morgan *et al.*, 2005). En 1904, Lorenz Hiltner a défini la rhizosphère comme étant la région spécifique du sol affectée par les racines des plantes (Wasaki *et al.*, 2005), par la suite, plusieurs définitions ont été proposées, à savoir, le sol autour de la racine qui est influencée par l'effet combiné des caractéristiques des plantes, des propriétés du sol et les interactions racinaires avec les micro-organismes et le sol environnant (Marschner et Rengel, 2007). La rhizosphère est également définie comme le volume du sol entourant les racines, elle est composée de deux parties, l'endorhizosphère (l'intérieur des racines) et le rhizoplan (la surface des racines). Les micro-organismes dans la rhizosphère réagissent avec de nombreux métabolites libérés par les racines des plantes (Morgan *et al.*, 2005). Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et De Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «l'effet rhizosphère» (Whipps, 2001).

1.2. Les bactéries d'intérêts agricoles :

Certains microorganismes, principalement des bactéries (*Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*) (Gray et Smith, 2005) et *Streptomyces* spp. (Tokala *et al.*, 2002) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre les infections par des agents phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

1.2.1-les PGPR

Le terme PGPR nous vient de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » et désigne les rhizobactéries naturelles qui colonisent les racines en contribuant à la croissance et la santé des plantes. En échange, la plante fournit des sources de carbone aux PGPR par ses exsudats racinaires (Abnatura, 2013).

PGPR est également un acronyme générique qui indique les bactéries dont certaines sont souvent inconnues (Banerjee et *al.*, 2006). Il est divisé en deux grands groupes en fonction de leur relation avec les plantes hôtes : bactéries symbiotiques et bactéries libres (Khan et *al.*, 2009). Diverses espèces considérées comme PGPR stimulent la croissance des plantes comme : *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Enterobacter*, *Caulobacter*, *Serratia* , *Flavobacterium*, *Actinobacter* Sp. (Antoun et Prevost, 2005 ; Karnwal, 2009 ; Khan et *al.*, 2009).

En effet, la présence des PGPR dans la rhizosphère constitue un intérêt incontestable dans la croissance et le développement des plantes, leurs mécanismes stimulateurs de la croissance des plantes sont multiples (Nabti, 2007).

1.2.2-Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR :

Les PGPR influencent la santé des plantes et la productivité par une variété de mécanismes qui impliquent la solubilisation des minéraux, l'apport d'éléments nutritifs, la stimulation de la croissance des racines, la suppression des maladies racinaires (Martinez-Viveros et *al.*, 2010), la synthèse d'enzymes hydrolytiques, l'élimination des agents phytopathogènes à travers la compétition et l'induction des mécanismes de résistance de la plante (Antoun et Prevost, 2005). Ces mécanismes influencent la croissance des plantes par action directe ou indirecte (Kloepper, 1993 ; Glick et *al.*, 1999 ; Vessey, 2003 ; Martinez-Viveros et *al.*, 2010).

A-Les mécanismes directs :

La promotion directe de la croissance des plantes peut se produire par plusieurs processus :

1)-Fixation d'azote :

Parmi les éléments nutritifs nécessaires pour la croissance des plantes, l'azote constitue le plus souvent le facteur limitant.

La partie majeure de cet élément se trouve sous forme gazeuse (N₂), inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). Par ailleurs, ils existent des bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère. Ces dernières peuvent vivre librement (*Azotobacter*, *Bacillus*, *Acétobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *diazotrophicus* et *Pseudomonas*) (Vessey, 2003), en symbiose (*Rhizobium*) ou en association avec certaines plantes (*Azospirillum*) (Okon et Kapulnik, 1986 ; Gray et Smith, 2005)

2)-Solubilisation du phosphate :

Après l'azote, le phosphate est considéré comme le deuxième facteur limitant de la croissance des plantes (Vessey, 2003). Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère, cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et divers microorganismes associés. La sécrétion d'acide organique et la production de la phosphatase facilitent la conversion de la forme insoluble du phosphate en une forme soluble (Kim et McDonald , 1998 ; Richardson, 2001). Les espèces du genre *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont la capacité de solubiliser le phosphate dans le sol (Qureshi et al., 2012).

3)-Production de sidérophores :

Le fer est un élément capital aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol souvent sous une forme insoluble (le fer ferrique (Fe³⁺)) (Compant et al., 2005 ; Weyens et al, 2010). Plusieurs bactéries produisent des molécules appelées sidérophores, ces derniers fixent le fer ferrique et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe²⁺). Les sidérophores sont utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. Ces derniers seront privés de Fer détourné par les bactéries (Glick et Pasternak, 1998). Une grande variété de sidérophores est produite par des bactéries (Sayyed et Patel, 2011), à titre d'exemple, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* (Zahir et al., 2004).

4)-Production des régulateurs de la croissance végétale :

Il existe cinq catégories de régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir et al., 2004).

L'auxine ou l'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, elle est connue par son implication directe dans l'initiation de la croissance des racines, la division cellulaire et l'élargissement de la cellule (Vessey, 2003). Il est bien établi qu'il existe deux sources de phytohormones naturellement disponibles pour les plantes : production endogène par les tissus de la plante et exogène par des micro-organismes associés, y compris de nombreuses bactéries du sol appartenant aux genres *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas spp* (Baca et Elmerich , 2007).

De même, les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de la croissance de la partie aérienne (Van Loon, 2007). L'acide abscissique intervient également dans la régulation de la germination des graines. Pour l'éthylène, il agit comme stimulateur à des concentrations modérées, mais au-delà de ce niveau, il devient un inhibiteur de l'élongation racinaire, de la croissance latérale des racines et de la formation des poiles (Glick *et al.*, 2007)

B-Mécanismes indirectes

1)-Compétition :

La compétition est un mécanisme important dans la lutte biologique, puisque les deux agents (pathogènes et non pathogènes) et les bactéries associées aux plantes colonisent des niches écologiques similaires et utilisent les mêmes nutriments (Weyens *et al.*, 2010). Les PGPR doivent être présents en nombre suffisant sur les racines pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capables d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Podile et Kishore, 2006). Beaucoup de PGPR, en particulier *Pseudomonas*, produisent des sidérophores qui lient le fer disponible, ce qui peut limiter la croissance d'autres bactéries de la rhizosphère et des champignons (Weyens *et al.*, 2010).

2)-Antibiose :

L'antibiose consiste en une production et une libération de molécules qui tuent ou limitent la croissance de l'agent pathogène cible, c'est le mécanisme le plus efficace par lequel les microbes peuvent contrôler les maladies des plantes (Harman et Shores, 2007 ; Weyens *et al.*, 2010). Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique, la viscosamide, la pyrrolnitrine et les phénazines (khan *et al.*, 2009).

3)-Production d'enzymes :

L'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique est un autre mécanisme utilisé par les PGPR. Les souches bactériennes peuvent produire certaines enzymes telles que la cellulase, ACC desaminase et la chitinase. Grâce à l'activité de ces enzymes, les bactéries jouent un rôle très important dans la promotion de la croissance des plantes en les protégeant des stress biotiques et abiotiques (Nadeem *et al.*, 2013).

4)-Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par stimulation de mécanismes de défense inductible dans la plante en rendant l'hôte beaucoup plus résistante aux futures agressions des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé « résistance systémique induite » (ISR Induced Systemic Resistance) (Van Loon *et al.*, 1998) et sert à protéger les plantes contre des attaques subséquentes des virus, bactéries et champignons pathogènes. La résistance systémique peut être induite par des microorganismes variés, des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcescens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

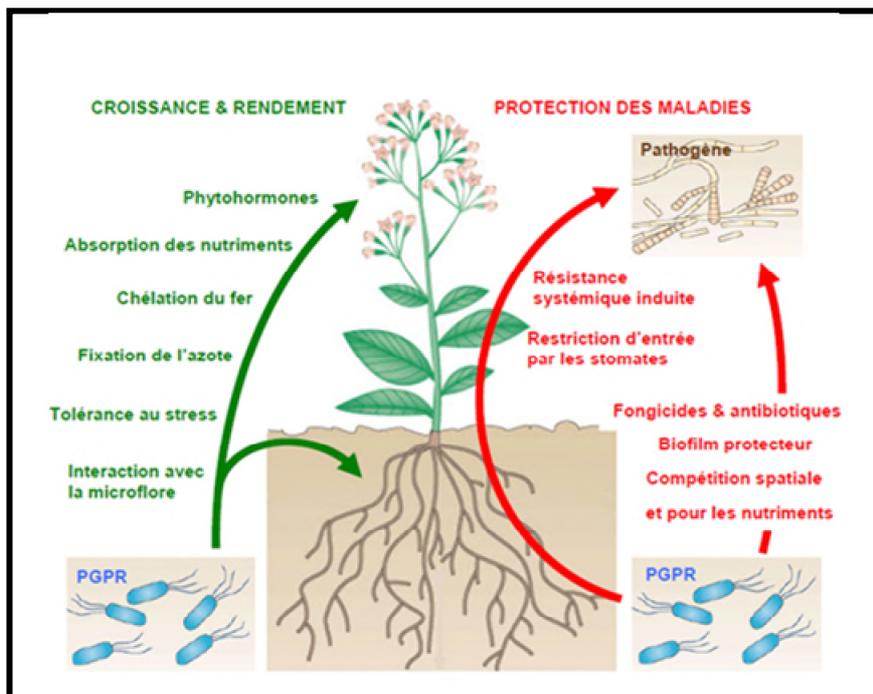


Fig. 1 : Mécanismes d'action des Rhizobactéries (Abnatura, 2013)

1. Activités enzymatiques :

Les enzymes sont des catalyseurs essentiels dans le processus de la vie, même dans le sol, elles sont connues par leur importance dans le maintien de la santé du sol. L'activité enzymatique dans le sol est principalement d'origine microbienne (Shonkor et Ajit, 2011), telles que : l'amylase, protéase, phosphatase, lipase, cellulase, estérase et l'uréase (Carrim et *al.*, 2006).

Ces enzymes jouent un rôle clé dans le processus global de la décomposition de la matière organique dans les écosystèmes (Petit et Jobin, 2005).

1.1-Activité cellulasique :

La cellulose est le principal composant de la biomasse végétale, il s'agit d'un polymère de glucose lié par des liaisons de type β -1,4. Sa structure cristalline insoluble représente un grand défi pour son hydrolyse enzymatique (Irfan et *al.*, 2012). La cellulase est une enzyme inductible complexe impliquant une action synergique d'endoglucanase, exoglucanase et cellobiase (Otajevwo et Aluyi, 2011). Les cellulases provoquent l'hydrolyse des différentes fibres de cellulose pour la diviser en plus petites unités de sucres et enfin produire des molécules de glucose (Vipul et *al.*, 2012).

1.2-Activité chitinasique :

La chitine est un constituant majeur de la paroi cellulaire de nombreux champignons, d'insectes et des coquilles des crustacés (Chien-Jui et *al.*, 2005). Les chitinases sont des enzymes responsables de l'hydrolyse de la chitine au niveau de la liaison glycosidique β (1-4) N-acétyl-glucosamine (Bhushan et Hoondal, 1998). Il est bien documenté que les microorganismes producteurs de la chitinase sont révélés comme agents de lutte biologique contre différents types de maladies des plantes (Chien-Jui et *al.*, 2005). C'est le cas, par exemple, de chitinase produite par *Pseudomonas sp.* qui inhibe la croissance de *Rhizoctonia solani* par dégradation de la paroi cellulaire (Nadeem et *al.*, 2013).

1.3-Activité amylasique :

Les amylases sont connues par l'accélération du processus de dégradation de l'amidon (Tang-Um et Hataichanoke, 2012). Deux grandes classes d'amylases ont été identifiées ;

la α -amylase (endo 1,4-glucohydrolase α D-glucane) est une enzyme extracellulaire synthétisée par les plantes, les animaux et les microorganismes, la β -amylase (exo-1,4 glucohydrolase α D-glucane) synthétisée principalement par les plantes (Thoma et *al.*, 1971 ; Vinoth et *al.*, 2009) .

1.4-Activité protéasique :

Les protéases sont les enzymes les plus importantes en industrie avec 60% du totale des enzymes vendues (Ningthoujam et *al.*, 2009). Plusieurs souches microbiennes, y compris les champignons (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*) et les bactéries (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*) produisent des protéases (Kuberan et *al.*, 2010). Elles sont utilisées dans le domaine alimentaire, l'industrie fromagère, les détergents, l'industrie de soie, le domaine de la pharmacologie et production des médicaments...etc. (El-Safey et Abdul-Raouf, 2004). Quant à l'application des protéases dans le domaine agricole, ces enzymes dégradant les protéines jusqu'au stade élémentaire pour produire une source d'azote (Ammoniac) et une source de carbone sont d'une importance incontestable pour la fertilisation des sols (Mansour et *al.*,1994 ;Petit et Jobin ,2005).

1.5- Solubilisation du phosphate :

Les Phosphatases sont des enzymes qui hydrolysent les esters et les anhydrides de l'acide phosphorique (Nannipieri et *al.*, 2011). Dans le sol, ces enzymes jouent un rôle essentiel dans les cycles du phosphate (Shonkor et Ajit, 2011) et jouent un rôle principal dans l'activité biologique du sol (Eivazi et Tabatabai, 1977 ; Dick et *al.*, 2000). Plusieurs études ont montrés une présence excessive de phosphatases chez les bactéries vivantes en interaction avec les légumineuses et certaines céréales (Yadav et Tarafdar, 2001).

1.6- Activité uréasique :

L'uréase est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'urée en NH_3 et CO_2 (Shonkor et Ajit, 2011). Elle est utilisée comme indicatrice de la qualité du sol car sa concentration est en fonction du taux de la matière organique. (Martinez-Salgado et *al.*, 2010). L'activité uréasique dans le sol est effectuée par l'uréase extracellulaire qui est stabilisée par immobilisation sur les colloïdes organiques et minéraux du sol.

Cette activité est influencée dans le sol par de nombreux facteurs, à savoir la teneur en matière organique, la profondeur du sol, les métaux lourds et les facteurs environnementaux telle que la température (Yang et *al.*2006).

1.7-Activités estérasique et lipasique :

Deux grandes classes d'hydrolases ont une grande importance : les lipases (hydrolases des tri-acyl-glycérols) et les estérases (hydrolases d'esters carboxyliques). Les estérases représentent un groupe diversifié d'hydrolases, elles catalysent le clivage et la formation des liaisons ester et sont largement distribués chez les animaux, les plantes et les micro-organismes (Uwe, 2002). Les lipases sont des enzymes atypiques de part, par leur mécanisme d'action et leur spécificité pour le substrat (Sharma et *al.*, 2001). De plus, certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et parfois même certains esters synthétiques. Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles jouent un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses, elles sont largement répandus chez les bactéries à Gram positif (Fickers et *al.*, 2008).

I- Prélèvement et isolement de bactéries :

Deux échantillons du sol (E1, E2) sont collectés pendant le mois de Mars (2014) dans la région de Thighilte Makhloof, Akbou (Bejaïa, Algérie, 36° 27'47" N, 4° 30'19" E) située à 300 m d'altitude. Les échantillons sont prélevés stérilement à l'aide des carottiers métalliques de 20 cm de longueur, stérilisés préalablement au four pasteur et bien fermés dans les deux extrémités avec du coton cardé et du papier aluminium, puis transportés au laboratoire, où ils sont immédiatement traités aux fins d'isolement bactérien. Celui-ci est réalisé comme suit :

1 g de chaque échantillon du sol est dissous dans 9 ml de PBS (Annexe I). Des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) sont effectuées. 1 ml de chacune de ces dilutions servira donc à inoculer le milieu de gélose nutritive (Annexe I) puis incubé à 30°C/ (2J-7J).

Des repiquages successifs sont ensuite effectués à partir des différentes colonies obtenues, cela par ensemencement en stries jusqu'à l'obtention de colonies pures.

En plus des quatre isolats sélectionnés, quatre souches bactériennes sont utilisées dans cette étude, il s'agit de : *Pseudomonas sp* ; *Microbacterium sp* S9LiBe ; *Bacillus sp* S7LiBe et *Bacillus sp* S6LiBe, de la collection du Laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables : Equipe Biomasse et Environnement, université de Béjaïa. La revivification a été réalisée par repiquage dans le bouillon nutritif (Annexe I) suivi d'une incubation à 30°C/24h.



Figure 2. Les lieux de prélèvement des échantillons

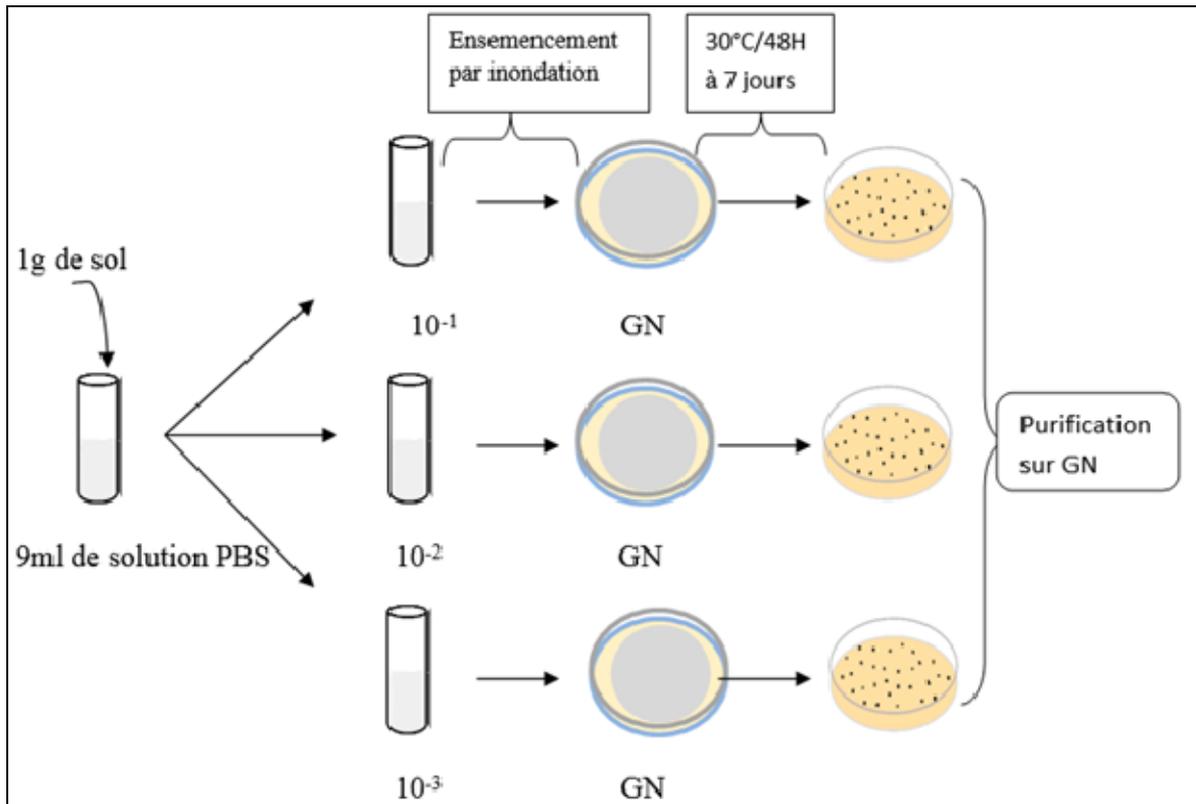


Figure 3 : Etapes d'isolement à partir des échantillons du sol.

I.1- Tests physicochimiques du sol

I.1.1. Humidité

C'est la perte au séchage d'un produit frais (sol) à haute température jusqu'à stabilité du poids (Mathieu et Pieltain, 2003). Pour cela, 2 g de chaque échantillon du sol sont soumis à la dessiccation à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Les résultats des taux d'humidité sont donc déterminés selon l'équation suivante :

$$\text{L'humidité (\%)} = \frac{(P1-P2) \times 100}{(P1-P3)} \text{ où ;}$$

P1 : Poids initial de l'échantillon et du creuset ;

P2 : Poids final de l'échantillon et du creuset après séchage ;

P3 : Poids du creuset vide.

I.1.2. pH

La mesure du pH est réalisée suivant le protocole de Mathieu et Pieltain (2003). Le pH d'un sol est déterminé selon deux protocoles :

a. pH- eau (acidité effective), dans ce cas, 2g de terre tamisée sont séchés à 40°C pendant 15 à 20min et additionnés de 5ml d'eau déminéralisée, puis agités et laissés au repos pendant 2h. Ensuite, le pH du surnageant sera mesuré par un pH mètre (HANNA HI2210).

b. L'acidité titrable ou de réserve :

Dans ce second cas, il s'agit d'un échange avec une solution saline de KCl. Où une partie des ions H⁺ absorbés est échangée par des ions K⁺. Donc le même test est répété en remplaçant le solvant qui est l'eau déminéralisée par une solution de KCl à 1N.

II. Identification bactérienne :

L'identification préliminaire des colonies sélectionnées est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques et certains tests biochimiques- clés : (aspect cultural), coloration de Gram, mobilité, recherche de la catalase et d'oxydase, production de H₂S et d'autre gaz, voie d'utilisation du glucose, dégradation de citrate et réaction de Voges- Proskauer, respectivement.

L'identification sur galerie biochimique API 50CHB/E est effectuée pour les isolats S1 et S3 sélectionnés sur la base de leurs caractères PGP (plant growth promoting) qui semblent être intéressants. Cette galerie comporte 50 tests révélant l'utilisation de différentes sources de carbone. A partir des tubes du bouillon nutritif (5ml) ensemencés avec une colonie pure de chaque isolat et incubés à 28°C/24h. 50 µl de la pré-culture sont repris dans 5 ml du bouillon nutritif neuf et incubés à nouveau à 28°C/24h. Ensuite, la suspension bactérienne est additionnée au réactif CHB/E. 100 µl du mélange (couleur rouge) sont déposés dans chaque cupule de la galerie API 50. Enfin, les galeries sont incubées à 28°C, la lecture est réalisée après 24 h et 48 h d'incubation sur la base de la couleur apparue :

- Couleur rouge = résultat négatif, - Couleur jaune = résultat positif,
- Couleur noire = production H₂S, - Couleur orange = résultat positif.

III. Recherche des propriétés d'intérêt agricole :

III.1. Activités enzymatiques

Dans le but de déterminer l'utilité des isolats dans la fertilisation des sols et la lutte contre les champignons phyto-pathogènes, plusieurs enzymes sont recherchées. L'étude est donc effectuée par la méthode des cylindres d'agar.

1).Détermination de l'activité cellulasique

L'activité cellulasique est recherchée sur milieu de Carder (1986) contenant en g/l : Na_2HPO_4 (6) ; KH_2PO_4 (3) ; NaCl (0,5) ; NH_4Cl (1) ; Extrait de levure (3) ; CMC (5) ; Agar (15). Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C pendant 7 jours. A la fin de l'incubation, une solution aqueuse de rouge de Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies (Nermeen et *al.*, 2010). Après 20 min, la surface est inondée par une solution de NaCl à 1M puis conservée une nuit à 5°C (Jaradat et *al.*, 2008). L'activité cellulasique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des cylindres.

2).Détermination de l'activité estérasique et lipasique

Ces activités sont recherchées sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient en g/l : peptone (10) ; NaCl (5) ; $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1) ; Agar (18), le Tween 80 (1%, v/v) est ajouté pour révéler l'activité estérasique, alors que le Tween 20 est utilisés pour mettre en évidence l'activité lipolytique. Le pH est ajusté à 7,4 (Carrim et *al.* 2006). Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 30°C /48h. La présence d'une activité est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

3).Détermination de l'activité chitinasique

Le milieu de culture suivant est utilisé, il est composé en g/l de : la chitine colloïdale : (0,6 - 0,8) ; K_2HPO_4 (2,7) ; KH_2PO_4 (0,3) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,7) ; NaCl (0,5) ; KCl (0,5) ; Extrait de levure (0,13) ; Agar (15). L'incubation dure 7 jours au minimum à 30°C. L'activité chitinasique se manifeste par un halo transparent autour de ces disques (Kopečný et *al.*, 1996).

4).Détermination de l'activité protéasique

La présence des protéases est révélée par le repiquage des cultures sur milieu contenant en g/l : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levures (2,5) ; Glucose (1) et Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7. Parallèlement, 100 ml d'une solution du lait écrémé à 10% autoclavée (120°C/10 min) est préparée et ajoutée au milieu. Les bactéries ayant une activité protéasique montrent un halo transparent autour des disques. (Bach et Munch, 2000)

5).Détermination de l'activité amylasique

La capacité des isolats à dégrader l'amidon soluble est mise en évidence par un test d'activité sur gélose à base d'amidon. Le milieu contient en g /l : KNO₃ (0,5) ; K₂HPO₄ (1,0) ; MgSO₄ (0,2) ; CaCl₂ (0,1) ; FeCl₃ (0,001) ; amidon soluble (10) ; agar (15). Le pH est ajusté à 7,2. Une solution de lugol est préparée comme suit : 1 g d'iode cristallin, 2 g de KI, 300 ml d'eau distillée. Le tout est mélangé est laissé au repos puis filtré. Le milieu est ensemencé puis incubé à 30°C/48-72h. Après apparition des colonies, la solution de lugol préalablement préparée est éparpillée sur la surface du milieu. Après quelques minutes du contact, l'excès est éliminé et les boîtes sont rincées à l'eau distillée. L'apparition d'une zone claire autour des disques indique la présence d'une activité amylasique (Vinoth et *al.*, 2009).

6).Détermination de l'activité uréasique

Le milieu est préparé en ajoutant en g / 950 ml d'eau distillée, peptone (1) ; glucose (1) ; NaCl (5) ; Na₂HPO₄ (1,2) ; KH₂PO₄ (0,8) ; rouge de phénol (0,012) ; Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 6,8. Après autoclavage, 50 ml d'une solution d'urée à 40%, préalablement stérilisée par filtration (porosité 0.22 µm), est ajoutée au milieu. L'activité uréasique est traduite par la présence d'un halo rose autour des colonies (Christensen, 1946).

7).Détermination de l'activité phosphatasique

L'activité phosphatasique est effectuée sur le milieu Pikovskaya's agar (PKA) contenant en g/l : extrait de levure (0 ;5) ; glucose (10) ; MgSO₄.7H₂O(0.1) ; Agar (1,5) ;(NH₄)₂SO₄ (0,5) ; Ca₃(PO₄)₂ (5) ; NaCl (0,2) ; KCl (0,2) ; MnSO₄.2H₂O (0,002) et FeSO₄.7H₂O (0,002).

Le milieu est autoclavé 120°C/20 min, ensuite, 20 ml d'une solution du phosphate tricalcique (10%) autoclavée est rajoutée. L'activité phosphatasique est révélée par apparition d'un halo transparent autour des colonies (Sonam, 2011).

III.2. Production de sidérophores

La recherche des protéines fixatrices du fer est réalisée sur le milieu Chrom Azurol S Agar (CAS). Ce milieu est constitué de quatre solutions préparées et stérilisées séparément (Alexander et Zubeer, 1991). Par la méthode de cylindre d'agar.

La solution 1 : Fe-CAS indicateur : 10 ml de 1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ préparés dans 10 mM HCl sont mélangés avec 50 ml d'une solution aqueuse de CAS (1,21 mg/ml). Le mélange est ajouté lentement sous agitation constante à 40 ml d'une solution aqueuse d'HDTMA (1,82 mg/ml).

La solution 2 : Solution tampon : 30,24 g de PIPES sont dissout dans 750 ml d'une solution saline contenant 0,3g KH_2PO_4 , 0,5g de NaCl et 1 g de NH_4Cl . Le pH est ajusté a 6,8 avec KOH à 50% et 15g de gélose sont ajoutés.

La solution 3 : Dans 70 ml d'eau distillée sont dissouts : 2g de glucose, 2g de mannitol, 493 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11 mg CaCl_2 , 1,17 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg H_3BO_3 , 0,04 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,2 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1 mg de $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Les trois solutions sont autoclavées puis refroidies à 50°C.

La solution 4 : 30 ml de casamino-acide à 10% sont stérilisés par filtration.

Les solutions 2, 3 et 4 sont mélangées après. La solution d'indicateur est ajoutée en dernier lieu sous agitation pour mélanger les ingrédients.

III.3. production d'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA (auxine) par les isolats bactériens est déterminée selon la méthode de Bric et al (1991). Les bactéries sont inoculées dans le milieu LB (Annexe I) supplémenté de 0,5% de glucose et 0,5mg/ml de tryptophane puis incubées à 30°C/4 jours. Après centrifugation (SIGMA 1-14) à 10000 tr/min/20 min, 1,2ml du surnagent sont récupérés et additionnés à 4,8 ml du réactif de Salkowsky (150 ml H_2SO_4 98% + 250 ml H_2O + 7,5 ml FeCl_3 0,5M). Le mélange est ensuite vortexé et gardé à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance de la coloration rose apparue est mesurée au spectrophotomètre (UV mini 1240.SHIMADZU) à 530 nm.

La concentration de l'AIA est déterminée par établissement d'une courbe d'étalonnage de l'absorbance à 530 nm en fonction de la concentration d'AIA (Sigma-Aldrich) pur en µg/ml (annexe III).

III.4. Activité antifongique :

1). Mise en évidence de l'activité antifongique :

3 espèces différentes des champignons phytopathogènes sont testées : *Botrytis cinerea* (souche de laboratoire de mycologie-UAMB-Algérie), *Fusarium culmorum*, *Aspergillus niger* (Souches de Laboratoire de Microbiologie Appliqué). Les champignons sont repiqués sur milieu gélosé à l'extrait de Malt (Annexe I), dans le but d'obtenir des cultures jeunes. Le test d'activité antifongique est réalisé selon la méthode décrite par Sagahón et al (2011). Un disque de champignon (7 mm de diamètre) est inoculé dans le centre de la boîte de Pétri contenant le milieu TSA (Annexe I). Trois disques d'une culture jeune de chaque souche sont déposés chacun à une distance de 2,5 cm du champignon. Des boîtes de Pétri ne contenant que le champignon cible sont préparées en parallèle pour servir de témoins. Toutes les boîtes sont incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}/5-7\text{J}$. Selon la vitesse de croissance du champignon.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI) est mesuré en utilisant la formule décrite par Saddiki, (1999) :

$$\text{PGI}\% = \frac{\text{KR} - \text{R}_1}{\text{KR}} \times 100$$

Où :

KR : Distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans le témoin.

R₁ : Distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de pétri traitée.

2). Analyse statistique des résultats obtenus :

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique avec le logiciel XLSTAT version 2009.1.02. Les méthodes statistiques utilisées sont : l'analyse de la variance a deux facteurs et le test SNK de comparaisons multiples. Tous les tests sont

réalisés avec un risque de %5. Ces analyses ont pour but d'évaluer l'effet des deux facteurs (souches et champignon) ainsi que leurs interactions.

Dans cette analyse les isolats sont nommés comme suit : S1, S2, S3 et S4
Les souches fournies par le laboratoire LMER sont nommés : *pseudomonas sp.* (S5); *Bacillus sp.* S6 LiBe (S6); *Bacillus sp.* S7 LiBe (S7) et *Microbaterium sp.* S9LiBe (S8).

5/ Tolérance aux métaux lourds

Les isolats bactériens obtenus sont testés pour leur résistance aux métaux lourds par la méthode de dilution en gélose. Un milieu de gélose nutritive est additionnés à des concentrations de (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 mM) en métaux lourds ($K_2Cr_2O_7$, $HgSO_4$, $CdSO_4 \cdot 8H_2O$, $CoSO_4$, $PbCl_2$), les boitesensemencées et incubées à 30°C. La tolérance aux métaux lourds est déterminée par l'observation de la croissance des bactéries après incubation (Sajani et Muthukkaruppan, 2011).

6/ Production d'ammoniac (NH₃)

Les isolats sont testés pour la production d'ammoniac dans l'eau peptonée. Une culture jeune de 24 h est utilisée pour inoculer 5 ml d'eau peptonée puis incubée à 30°C/48h. 0,25 ml de réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube. Le résultat positif se traduit par l'apparition d'une couleur jaune ou marron (Kavitha et al., 2013).

I. Tests physico-chimiques du sol

I.1. Humidité

Les résultats des tests d'humidité sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau I : Les valeurs de l'humidité des deux échantillons du sol.

E	E1	E2
H(%)	16.5	9

La teneur en humidité du sol est très variable, tant point de vue spatial que point de vue temporel, en raison de l'hétérogénéité des propriétés du sol, de la topographie ainsi que la distribution des précipitations et de l'évapotranspiration (Juglea, 2011).

La différence du pourcentage de l'humidité entre les deux échantillons du sol est due principalement à la région du prélèvement. L'échantillon (E1) présente un taux d'humidité élevé avec 16,5%. L'échantillon (E1) est un sol agricole plus riche en matière organique et en eau que l'échantillon (E2) qui présente un taux d'humidité de 9%. D'après Mathieu et Pieltain (2003), les échantillons qui présentent une humidité de 1% sont des sols sableux et 7% sont des sols argileux et organiques.

I.2. pH

Les valeurs du pH des deux échantillons sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau II : Les valeurs du pH-eau et pH-KCl des deux échantillons.

E	E1	E2
pH eau	7.12	7.83
pH Kcl	6.76	6.52

Les valeurs du pH-eau sont supérieures aux valeurs du pH-KCl, ce qui confirme le protocole expérimental suivi.

L'acidité du sol est définie par la concentration en ions H^+ : l'acidité réelle qui correspond à la concentration en ions H^+ libre existant dans la solution du sol, appelée aussi pH-eau et l'acidité titrable qui est représentée par les ions H^+ échangeable (beaucoup plus abondants) est mesurée par échange avec une solution saline (KCl) (Mathieu et Pieltain, 2003). Les ions K^+ s'échangent avec les ions H^+ qui n'étaient pas dissociés en

solution aqueuse. La différence entre le pH eau et le pH KCl donne une idée sur l'acidité potentielle. Le pH des échantillons est situé entre 6,5 et 7,5. D'après Denis (2000), le sol qui présente un pH situé entre ces deux valeurs est un sol neutre.

Par ailleurs, la diversité bactérienne tellurique est intrinsèquement liée à l'humidité et au pH du sol. Les deux échantillons du sol prélevés présentent des valeurs d'humidité et de pH moyennes favorables pour la croissance d'une large gamme de microorganismes.

II. Identification bactérienne :

L'observation de l'aspect cultural et morphologique des quatre isolats est réalisée sur milieu TSA. D'autres observations au microscope optique sont aussi effectuées sur ces derniers, à l'état frais et après coloration de Gram (X100). Une galerie classique avec un nombre limité de caractères est aussi effectuée.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau et les figures suivants :

Tableau III : Caractères biochimiques et physiologiques des quatre isolats

Souche	S1	S2	S3	S4
Forme des cellules	Bacille	Petit Bacille	Bacille en chaînette	Petit Bacille
Gram	+	+	+	+
Mobilité	Immobile	Immobile	Mobile	Mobile
Catalase	+	+	++	+
Citrate	+	+	++	++
Mannitol	+	+	+	-
RM	-	-	-	-
VP	-	+	-	-
Lactose	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
H2S	-	-	-	+
Production de gaz	-	-	-	-
Oxydase	+	+	+	+
Indole	+	+	-	-



Figure 4 : Aspects des colonies obtenues sur milieu de culture GN

Les résultats d'identification classique montre que les quatre isolats sont des bactéries à Gram positif, leur aspect sous microscope et à l'état frais montre des différences de forme et de mobilité.

L'identification biochimique de S1 et S3 est effectuée sur galerie API 50 CHB/E. Après 48 h d'incubation à 28°C, le changement de couleur dans chaque cupule est noté (Annexe II), et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant

Tableau IV : Résultats des tests biochimiques des deux isolats réalisés sur API 50 CHB/ E.

Numéro	Code	Nom complet	S1	S3
0	-	Témoin	-	-
1	GLY	Glycérol	+	+
2	ERY	Erythritol	-	+
3	DARA	D-arabinose	-	-
4	LARA	L-arabinose	-	-
5	RIB	D-ribose	+	-
6	DXYL	D-xylose	+	-
7	LXYL	L-xylose	+	-
8	ADO	D-adonitol	+	-
9	MDX	Méthyl-βD-hylopyranoside	+	-
10	GLA	galactose	-	+
11	GLU	D-glucose	+	+
12	FRU	D-fructose	+	+
13	MNE	D-mannose	-	+
14	SBE	L-sorbose	+	+
15	RHA	L-rhamnose	-	+
16	DUL	Dulcitol	+	+
17	INO	Inositol	-	+
18	MAN	D-mannitol	-	+
19	SOR	D-sorbitol	+	+
20	MDM	Méthyl-αD-mannopyranoside	+	+
21	MDG	Méthyl-αD-glucopyranoside	+	+
22	NAG	N-acétylGlucosamine	+	+
23	AMY	Amygdaline	+	+
24	ARB	Arabutine	+	+
25	ESC	Esculine citrate de fer	+	-
26	SAC	Salicine	+	+
27	CEL	D-cellobiose	+	+
28	MAL	D-maltose	+	+
29	LAC	D-lactose	-	+
30	MEL	D-melibiose	-	+
31	SAC	D-saccharose (sucrose)	-	+
32	TRE	D-trehalose	+	+
33	INU	Inuline	-	+
34	MLZ	D-mélézitose	-	+
35	RAF	D-raffinose	-	+
36	AMD	Amidon	+	+
37	GLYG	Glycogène	+	+
38	XLY	Xylitol	-	+
39	GEN	Gentiobiose	+	+
40	TUR	D-turanose	+	+
41	LXY	D-lyxose	+	+
42	TAG	D-tagatose	+	+
43	DFUC	D-fucose	+	+
44	LFUC	L-fucose	+	+
45	DARL	D-arabitol	+	+
46	LARL	L-arabitol	+	+
47	GNT	Gluconate de potassium	-	-
48	2KG	Potassium2-cétogluconate	-	-
49	5KG	Potassium5-cétogluconate	+	+

La bactérie S1, assimile 65,30% des substrats testés : Glycérol, D-Ribose, D-xylose, L-Xylose, D-Adonitol, Méthyl-βD-Xylopyranoside, D-glucose, D-fructose, L-

sorbose, L-rhamnose, Dulcitol, D-sorbitol, Méthyl- α D-mannopyranoside, Méthyl- α D-glucopyranoside, N-acétylGlucosamine, Amygdaline, Arabutine, Esculine citrate de fer, Salicine, D-cellobiose, D-maltose, D-tréhalose, Amidon, Glycogène, Xyllitol, Gentiobiose, D-turanose, D-Lyxose, D-tagatose, D-Fucose, L-fucose, D-Arabitol, L-Arabitol et Potassium 5-cétogluconate.

Cependant, la bactérie S3 présente des réactions positives avec un taux de 79,59% des substrats testés : Glycérol, Erythritol, galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, Dulcitol, Inositol, D-mannitol, D-sorbitol, Méthyl- α D-Mannopyranoside, Méthyl- α D-glucopyranoside, N-acétylGlucosamine, Amygdaline, Arabutine, Salicine, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-Mélibiose, D-Saccharose, D-Trehalose, Inuline, D-mélézitose, D-raffinose, Amidon, Glycogène, D-saccharose (sucrose), Xyllitol, Gentiobiose, D-turanose, D-Lyxose, D-tagatose, D-Fucose, L-fucose, D-arabitol, L-Arabitol et potassium 2-Cétogluconate.

Après avoir comparé les résultats de la mini-galerie obtenus pour les isolats S1, S2, S3 et S4 à ceux de Garcia et *al.* (2005) ; Woo et *al.* (1996), Singh et *al.* (2010), et au Manual de Bergey (Garrrity, 2004), on a constaté que ces isolats pourraient être affiliés au genre *Bacillus*.

La majorité des résultats de l'API 50CHB/E des isolats S1 et S3 concordent avec ceux obtenus avec (Tabli, 2012) pour la souche *Bacillus Sp S15*. Garveba et *al.* (2003) ont montré que 95% des bactéries à Gram positif du sol appartiennent au genre *Bacillus* : *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus firmus*.

III. Recherche des propriétés d'intérêt agricole

Plusieurs auteurs ont décrit les mécanismes d'amélioration de la croissance des plantes par les PGPR.

Les quatre souches fournies du laboratoire et les souches isolées sont testées pour rechercher divers caractères promoteurs de la croissance végétale : activités enzymatiques (cellulase, chitinase, estérase, lipase, amylase, urease et protéase), production de sidérophores, solubilisation du phosphate, production d'AIA, tolérance aux métaux lourds et effet antifongiques à l'égard des champignons phytopathogènes.

III.1. Activités enzymatiques

L'utilisation de bactéries productrices d'enzymes d'intérêt agricole, afin d'améliorer la disponibilité des nutriments pour la plante, a été largement étudiée par plusieurs auteurs et présente beaucoup d'avantages.

Tableau V : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques appliqués sur les bactéries sélectionnées :

Bactéries	Activité enzymatiques							
	Cellulase	Lipase	Estérase	Protéase	Amylase	Phosphatase	Uréase	Chitinase
<i>Pseudomonas sp</i>	++	++	+	-	-	+	++	+
<i>Bacillus sp S6LiBe</i>	++	++	+	++	++	-	++	+
<i>Bacillus sp S7LiBe</i>	++	++	+++	+++	++	+	++	+
<i>Microbacterium sp S9LiBe</i>	+	++	++	+	+	+	++	+
S1	+	+	++	+	++	+	+++	++
S2	++	+	++	+	++	+	++	++
S3	-	+	-	+	+	+	+	+
S4	-	+	+	-	-	+	+	+

+: Activité faible; ++ : activité moyenne ; +++ : activité forte ; - : Pas d'activité enzymatique

D'après les résultats obtenus, les bactéries étudiées lors de ce travail produisent la majorité des enzymes ciblées.

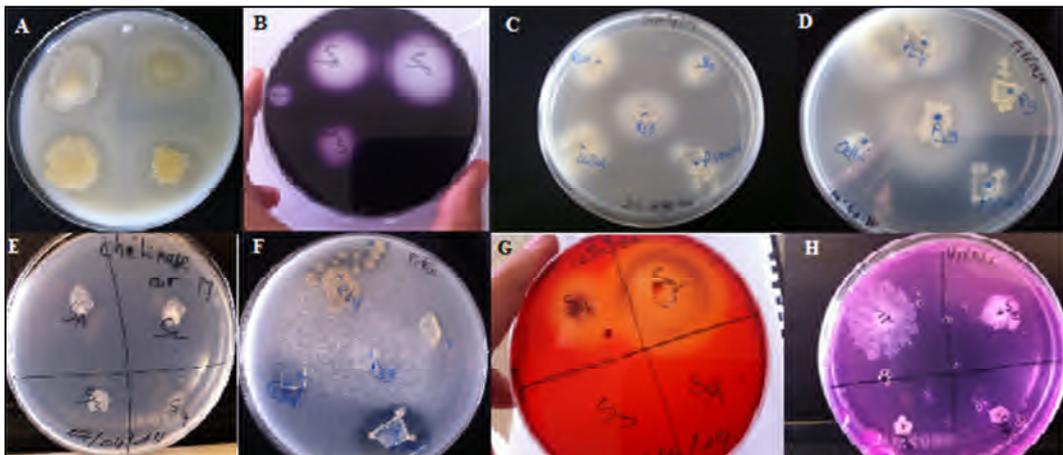


Figure 5 : Images des résultats des tests d'activités enzymatiques testés :

A : Protéase ; B : Amylase ; C : Lipase ; D : Estérase ; Uréase ; E : Chitinase; F : Phosphatase ;G : Cellulase; H : Uréase.

1). Activité cellulasique :

Pendant de nombreuses années, les bactéries dégradant la cellulose ont été ciblées et caractérisées pour l'obtention de cellulases plus efficaces (Otajewwo et Aluyi, 2011).

Les résultats obtenus montrent que l'activité cellulasique est observée chez toutes les bactéries testées à l'exception de S3 et S4. D'après Maki et *al.* (2011), Plusieurs souches de *Bacillus* et de *Microbacterium* produisent les cellulases.

Otajewwo et Aluyi (2011) ont isolé plusieurs souches de *Bacillus circulans* et de *Bacillus subtilis* productrices de cellulases. Selon Lu et *al.* (2005), les espèces de *Bacillus* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de haut poids moléculaires, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* sont fréquemment signalées parmi les espèces cellulolytiques.

2). Activité estérasique et lipasique :

Les estérases et les lipases ont été mises en évidence, dès 1901, chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* (Fickers et *al.*, 2007).

A l'exception de l'isolat S3, qui n'a montré aucune activité estérasique, toutes les souches testées ont révélé des activités estérasique et lipasique importantes. Ce qui confirme que ce sont des souches productrices d'enzymes extracellulaires responsables de ce type d'activité.

D'après Sharma et *al.* (2001) ; Gupta (2004) ; Fickers et *al.* (2007), Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram + (*Bacillus* et *Staphylococcus*) que les bactéries Gram –(*Pseudomonas*). D'après Ji et *al.* (2014), les bactéries du genre *Bacillus* produisent des estérases et des lipases. (Honda et *al.*, 2002 ; Ji et *al.*, 2014) ont constaté que *Microbacterium sp.* possède une grande activité estérasique.

La synthèse des lipases et des estérases par les bactéries testées contribue à la dégradation de la matière grasse et par conséquent, ces bactéries pourraient donc participer au recyclage de la matière organique en fournissant les éléments nécessaires aux plantes.

3). Activité chitinasique :

L'activité chitinasique est observée chez les souches *Pseudomonas Sp.*, *Bacillus Sp* S7LiBe *Bacillus Sp.* S6 LiBe, *Microbacterium Sp.* S9 LiBe et les trois isolats S1,S2 et S3.

Les micro-organismes produisant de la chitinase sont classés dans la catégorie des agents de la lutte biologique contre différents types de maladies fongiques des plantes (Bhushan et Hoondal, 1998 ; Huang et al., 2005).

D'après Gupta et al. (2012), les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont capables de dégrader la chitine. En plus des chitinases, *Pseudomonas* produit d'autres types d'enzymes lytiques en l'occurrence des protéases (Naik et Sakyhivel, 2006).

Peu d'auteurs ont parlé de l'activité chitinasique de *Microbacterium sp.* D'après Quecine et al. (2008), la majorité des souches de *Bacillus Sp* sont connues pour leur activité chitinasique élevée.

4). Activité amylasique :

Dans ce travail, 6 souches sur 8 se sont révélées productrices d'amylase, *Microbacterium sp.* S9LiBe, *Bacillus sp.* S6 LiBe, S1, S2 et S3. (Whipps, 2001 ; Siddiqui, 2005 ; Viollet, 2010) ont trouvé que les *Pseudomonas* productrices d'amylase stimulent la croissance et la santé des plantes. A partir de nos résultats on peut conclure que *Microbacterium sp* est capable de dégrader l'amidon en exprimant une forte production d'amylase.

La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour leur croissance. Shonkor et al. (2011) ont montré que les espèces du genre *Bacillus* sont capables de produire des métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases, chitinases ...etc.).

5). Activité protéasique :

Les protéases d'origine microbienne sont parmi les enzymes les plus secrétées (Ningthoujam et al., 2009). La dégradation des protéines par les protéases microbiennes

joue un rôle important dans le cycle d'azote au niveau du sol en le rendant disponible pour les plantes et les micro-organismes (Petit et Jobin, 2005).

L'activité protéasique est observée chez toutes les bactéries testées sauf chez *Pseudomonas sp.* et S4. On remarque que cette activité est beaucoup exprimée chez *Bacillus sp.* S7 LiBe. Cette activité est aussi observée chez *Microbacterium sp.* S9LiBe, ce qui signifie que cette souche est capable de dégrader la caséine et les parois cellulaires fongiques.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Thys et *al.* (2006) qui ont constaté que la production de protéase par *Microbacterium sp.* est très importante. L'activité protéasique peut avoir un effet plus poussé, elle influence indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'AIA et d'autres substances appariées (Mansour et *al.*, 1994).

6). Activité uréasique :

Les souches et les isolats testés sont tous producteurs d'uréase où l'isolat S1 révèle une forte activité. Ramesh et Mathivanan (2009) ont obtenu 208 isolats dont *Bacillus sp.* productrice de cellulase, protéase, amylase et uréase.

Il faut également signaler que les enzymes telles que les protéases, lipases, amylases et cellulases sont d'intérêt agricole remarquable à cause de leur implication dans la fertilisation des sols par la dégradation des polymères organiques.

L'uréase est une enzyme extracellulaire représentant 63% de l'activité totale du sol, son rôle réside dans l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO₂ et de l'ammoniac (NH₃). Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol, car sa concentration est fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et *al.*, 2010).

7). Solubilisation du phosphate :

Le phosphate joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration du rendement agricole. C'est un élément indispensable pour les besoins vitaux des plantes (Lindsay, 1979). Dans les sols agricoles, la dissolution des phosphates inorganiques dans le sol est étroitement liée à l'activité des microorganismes (Richardson, 2001).

Les résultats des tests d'activités enzymatiques obtenus sur les isolats montrent que l'activité phosphatasique est présente chez toutes les souches sauf chez *Bacillus sp* S6LiBe.

Rivas *et al.* (2004) ont rapporté que *Microbacterium ulmi sp.* solubilise le phosphate inorganique. Dans leurs travaux, (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Hamdali *et al.*, 2008) ont constaté que *Bacillus megaterium* est le meilleur producteur du phosphate parmi les souches du genre *Bacillus*. Qureshi *et al.* (2012) ont montré que *Bacillus sp* est caractérisée par la biosynthèse de l'auxine et la solubilisation du phosphate.

Gull *et al.* (2004) ont aussi rapporté que les espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ont un grand potentiel de solubilisation de phosphate présent dans le sol. Irving et Cosgrove (1971) et Singh *et al.* (2013) ont constaté que *Pseudomonas* solubilise le phosphate en améliorant la biodisponibilité des nutriments essentiels pour les plantes.

III.2. Production de sidérophores

Tableau VI : Résultats de production de sidérophores :

Bactéries	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Bacillus sp</i> S6LiBe	<i>Bacillus sp</i> S7LiBe	<i>Microbacterium sp</i> S9LiBe	S1	S2	S3	S4
Production de Sidérophores	+++	+++	+++	+	+	+	+++	-

+: faible production;+++ : moyenne ;++++ : forte production ;- : Pas de production



Figure 6 : Résultats obtenus pour le test de production de sidérophores.

A partir des résultats obtenus, la souche *Pseudomonas sp* et l'isolat S3 se sont avérés de bons producteurs de sidérophores, *Bacillus sp*. S7LiBe marque aussi une production

moyenne et une faible production pour S1 et S2 est remarqué par le changement de couleur bleue du milieu vers la couleur orange (fig.7), par contre l'isolat S4 ne possède pas ce caractère.

Les résultats de cette activité sont en accord avec les résultats obtenus par Mezzaache (2012) qui a montré que le genre *Pseudomonas* produit des sidérophores avec un pourcentage de 100%. Alabouvette et al. (1998) et Chincholkaret al. (2007) ont rapportés que la production de sidérophores par *Pseudomonas fluorescens* appelés pseudobactines ou pyoverdines réprime des maladies causées par le genre *Fusarium*.

Les *Pseudomonas* produisent des sidérophores *in vitro* qui interviennent dans l'élimination des maladies causées par les phytopathogènes comme *Aspergillus niger* (Sindhu et al., 2010). Meyer et Abdallah (1978) ont rapporté que la synthèse de sidérophores est observée chez les souches : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas aureofaciens*. D'après Ji et al. (2014), la production des sidérophores est observée chez les souches de *Paenibacillus kribbensis*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Microbacterium binotii* et *Microbacterium trichotecenolyticum*.

III.3. Production de phytohormone (AIA) :

Les valeurs d'AIA produit par chaque bactérie sont illustrées dans la **figure** suivante.

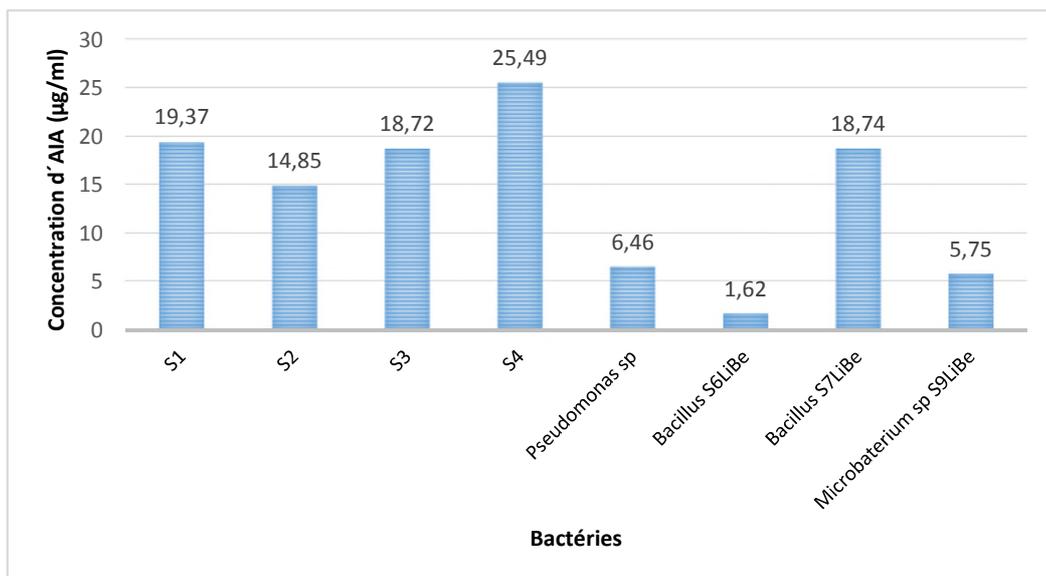


Figure 7 : quantités d'AIA produite par les différentes bactéries testées

Il est bien établi que le mécanisme le plus important dans la stimulation de la croissance directe des plantes par les PGPR est la production des régulateurs de croissance (Baca et Elmerich, 2007). D'après Sandhya *et al.* (2009) environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables de produire l'AIA.

A partir de nos résultats on constate que toutes les bactéries testées sont productrices d'AIA, mais avec des concertations déférentes. Les isolats S1, S2, S3 et S4 produisent l'AIA avec des quantités élevées (19,37 ; 14,85 ; 18,72 et 25,49 $\mu\text{g/ml}$), ce qui confirme les résultats obtenus par Ji *et al.* (2014) qui ont montré que *Bacillus subtilis* ; *Microbacterium binotii*, *Microbacterium trichotecenolyticum* et *Microbacterium trichotecenolyticum* sont des souches productrices d'AIA, et les résultats de Egamberdieva *et al.* (2010) qui ont aussi révélé que les deux souches de *Pseudomonas trivialis* 3Re27 et *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 produisent 12 $\mu\text{g/ml}$ et 10,1 $\mu\text{g/ml}$ d'AIA respectivement.

La quantité de l'AIA produite par l'isolat S4 est deux fois supérieures à celle produite par les isolats S1, S2, S3 et *Bacillus sp* S7LiBe. D'après Calvo *et al.* (2010) et Tri-Wahyudi *et al.* (2011), la production d'auxine et l'effet stimulateur de la croissance des plantes vont de paire, cet isolat pourrait donc être un bon stimulateur de la croissance des plantes.

La production de cette hormone est influencée par les conditions de culture, le stade de croissance et par la disponibilité du substrat dans le milieu. Les bactéries productrices d'AIA stimulent la germination des graines, la division , l'élargissement des cellules et des tissus, l'expansion des feuilles et jouent un rôle majeur dans l'élongation racinaire (Egamberdieva, 2008 ; Maleki *et al.*, 2010; Martínez -Viveros *et al.*, 2010).

III.4. L'activité antifongique :

La recherche de nouvelles stratégies de lutte biologique pour inhiber la croissance des micro-organismes phytopathogènes est devenue largement répandue, en raison des préoccupations environnementales.

Plusieurs études ont montré que les champignons peuvent être phytopathogènes et causent des pertes considérables dans la récolte. Ces champignons ont attiré l'attention des chercheurs (Soylu et *al.*, 2005).

De nombreux mécanismes sont impliqués dans l'élimination des phytopathogènes par les bactéries tels que la compétition vis-à-vis du fer en produisant des sidérophores, production d'antibiotiques et des enzymes (chitinase et cellulase) (compant et *al.*, 2005 ; Mahmoud et *al.*, 2008).

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures, les tableaux et les graphes suivants.

Au terme de sept jours d'incubation à 28°C, la majorité des souches ont manifesté une action inhibitrice vis-à-vis de *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* et *Aspergillus niger* avec des pourcentages variés (fig 8, tableau VII).

Tableau VII : Pourcentages d'inhibition de la croissance des champignons phytopathogène

Souche bactériennes	Pourcentage d'inhibition(%)		
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pseudomonas sp</i>	96,62±0,096	14,00±0,028	76,08±0,030
<i>Bacillus sp S6LiBe</i>	93,25±0,019	26,00±0,028	83,65±0,014
<i>Bacillus sp S7LiBe</i>	98,65±0,019	68,00±0,113	93,48±0,030
<i>Microbactérium sp S9LiBe</i>	97,30±0,0001	46,00±0,028	81,50±0,015
S1	98,5±0,021	69,00±0,014	84,75±0,030
S2	95,27±0,005	56,00±0,113	86,95±0,061
S3	95,95±0,019	18,00±0,028	82,39±0,033
S4	98,53±0,001	14,00±0,028	82,39±0,033

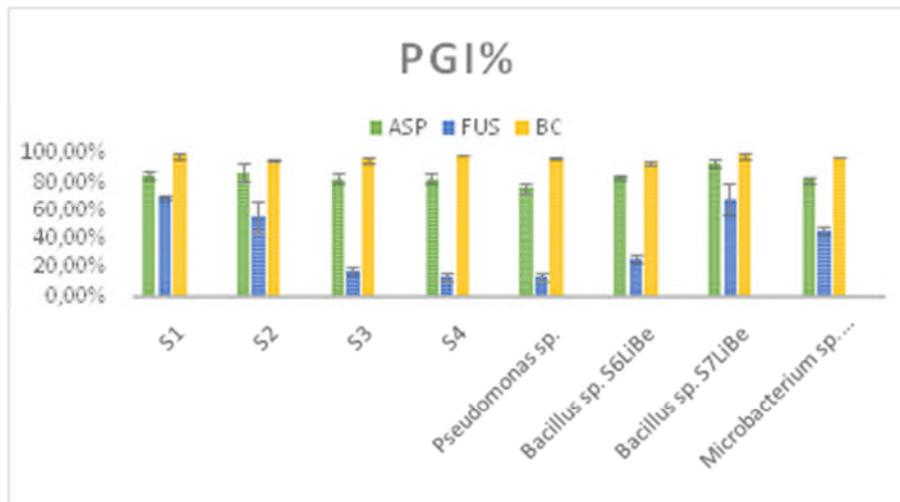


Figure 8 : Taux d’inhibition de la croissance des phytopathogènes en présence des bactéries testées

ASP : *Aspergillus niger* ; FUS : *Fusarium culmorum* ; BC : *Botrytis cinerea*.

Les résultats de l’analyse de la variance (ANOVA) (Tableau VIII) montrent une différence significative au niveau des activités antagonistes, souche ($p \leq 0,0001$), champignons ($p \leq 0,0001$) et souche-champignons ($p \leq 0,0001$).

Tableau VIII : Effet de la souche, champignons et de l’interaction souches-champignons sur le PGI%

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
souches	7	3726,598	532,371	31,340	< 0,0001
champ	2	29548,905	14774,452	869,759	< 0,0001
souches*champ	14	4551,100	325,079	19,137	< 0,0001

La résistance des champignons cibles varie par rapport aux souches. Cette variation est démontrée par le test ANOVA de Newman-Keuls (SNK) ($p \leq 0,05$). (tableau IX, fig 9).

Tableau IX : Classement des groupements homogènes (souches) obtenus par l’analyse statistique Test de Newman-Keuls (SNK $p \leq 0,05$).

Modalité	Moyenne estimée	Groupes			
S7	86,707	A			
S1	84,083	A	B		
S2	79,407		B	C	
S8	74,832			C	
S6	67,633				D
S3	65,447				D
S4	64,973				D
S5	62,233				D

Le groupe D représente les bactéries ayant le plus faible effet antagoniste mais il constitue un groupe très homogène

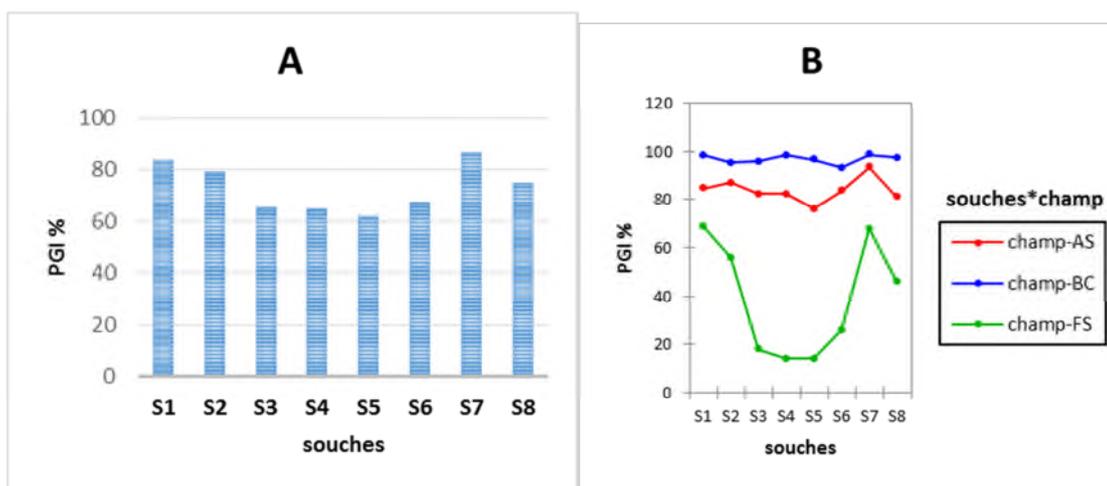


Figure 9 : Graphiques des moyennes des PGI obtenus par l'analyse statistique : A ; Souches, B ; Souches-Champignons.

Tableau X. Classement des groupements homogènes (champignons) obtenus par analyse ANOVA de Newman-Keuls (SNK, $p \leq 0,05$).

Modalité	Moyenne estimée	Groupes		
BC	96,758	A		
AS	83,861		B	
FS	38,875			C

D'après le tableau suivant on constate que selon le champignon, le PGI est nettement différent, il est meilleur avec *Botrytis cinerea* (96,785), moyen avec *Aspergillus niger* (83,861%) et faible avec *Fusarium culmorum* (38,875).

La croissance de *Botrytis cinerea* a été fortement réduite en présence des souches antagonistes, comparé au témoin non inoculé (fig 9). Siddiqui (2005) a révélé l'effet de *Pseudomonas PsJN* sur la réduction de la maladie de la tomate causée par *Botrytis cinerea*.

En revanche, la souche *Pseudomonas sp* et les deux isolats S3 et S4 présentent une faible action antagoniste à l'égard de *Fusarium culmorum*. Tandis que *Bacillus sp* S6LiBe, *Bacillus sp* S7LiBe, *Microbacterium sp* S9LiBe et les deux isolats S1 et S2 ont révélé une activité inhibitrice moindre à l'égard de *Fusarium culmorum* comparée à celle observée contre *Botrytis cinerea* (Fig. 9).

D'après Fernando et al. (2005), *Bacillus subtilis* s'est révélé comme un inhibiteur de plusieurs espèces de *Fusarium* y compris *Fusarium oxysporum*. Il a été découvert que *Bacillus subtilis* synthétise l'iturine qui est un antifongique destiné pour éliminer *Fusarium oxysporum*.

De nombreuses souches de *Bacillus* sont aujourd'hui utilisées dans la lutte biologique grâce à leurs substances antimicrobiennes et leurs enzymes (Killani et al., 2011).

Le genre *Pseudomonas* et *Bacillus* sont largement connus pour leur activité antagoniste à l'égard des bactéries et des champignons phytopathogènes (Sindhu et al., 2010).

Pseudomonas est connu par sa forte production de la chitinase et de la β -1,3-glucanase qui dégrade la chitine et le glucane de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Arora et al., 2007), ces espèces sont également productrices de métabolites à action antifongique (Haas et Défago, 2005)

L'analyse statistique de l'interaction des champignons cibles avec les souches testées montre que les interactions des Bactéries S7 (*Bacillus sp*. S7LiBe), S4 et S1 avec le champignon *Botrytis cinerea* sont les meilleurs avec un taux d'inhébiton de : 98.645, 98.530, 98.500 respectivement (Annexe V).

D'après Intra et al. (2011) *Bacillus sp* présente une très grande richesse en enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation des parois cellulaires fongiques. De plus, elle produit différentes enzymes et sidérophores, son mode d'antagonisme est l'antibiose. Ce genre produit divers antibiotiques comme : la bacillomycine, la fongicine et la mycosubtiline, ces substances sont efficaces pour éliminer la croissance des pathogènes cibles (Kim et al., 2008). Cette évidence permet de supposer la présence de telle substance

antifongique responsable de la formation des zones d'inhibition entre la bactérie et les champignons montrés dans cette étude.

Un bon agent de biocontrôle doit avoir un bon degré de persistance et d'agressivité à l'égard des pathogènes, mais, en même temps il ne doit pas être pathogène pour la plante. En effet, les *Bacillus* et les actinomycètes sporulant répondent largement à ces critères.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition des champignons phytopathogènes par *Bacillus spp* y compris la production d'antibiotiques, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, la compétition pour les nutriments ou une combinaison de ces mécanismes (Calvo et al., 2010).

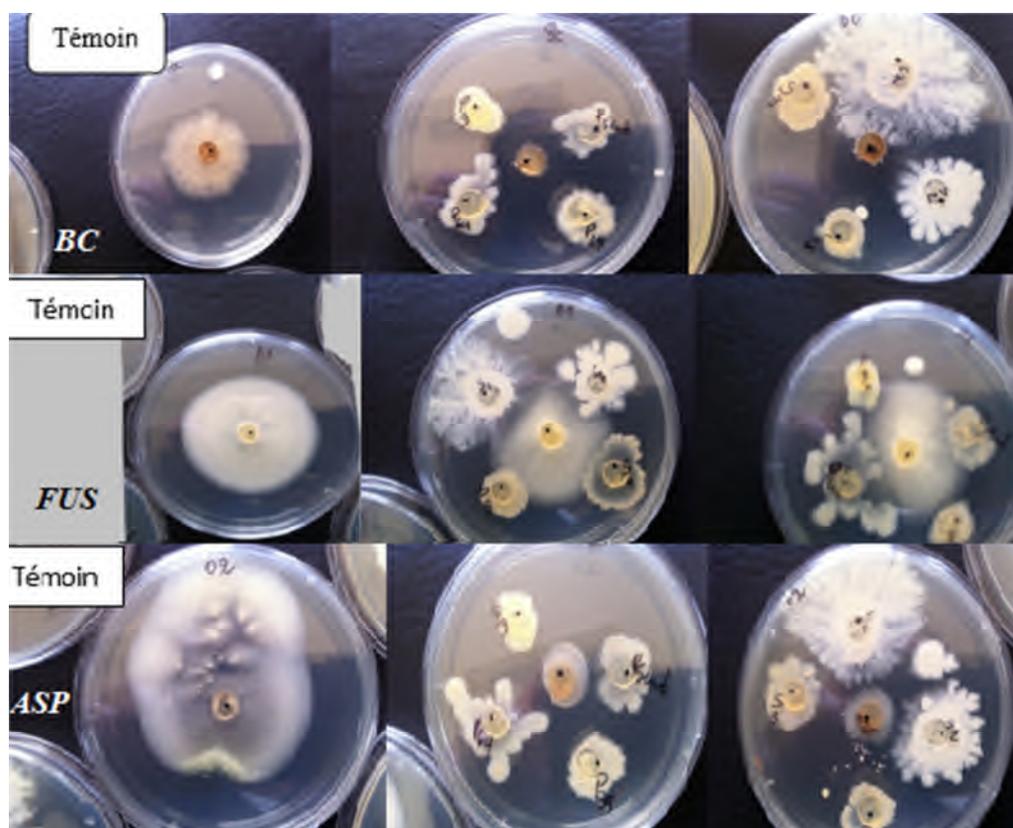


Figure 10 : Images des résultats de test d'antagonisme des différentes bactéries vis-à-vis des champignons phytopathogènes

III.5. Tolérance aux métaux lourds :

Les résultats de la tolérance des bactéries aux métaux lourds sont illustrés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats de la tolérance des bactéries testées aux métaux lourds :

		Métaux lourds (mM)								
		<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Bacillus sp s7ibe</i>	<i>Bacillus sp s6ibe</i>	<i>Microbactérium sp</i>	S1	S2	S3	S4	
Métaux lourds (mM)	K2CrO7 (mM)	0,5	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
		1	+	+	+++	++	+++	+++	+++	+++
		1,5	+	+	+++	+	++	+	++	+
		2	+	-	+	-	+	+	+	+
		2,5	+	-	+	-	+	+	-	-
		3	+	-	+	-	+	+	-	-
	HgSO4 (mM)	0,5	+	++	+	++	+	+	+	+
		1	+	+	+	++	+	+	+	+
		1,5	+	+	+	+	+	+	+	+
		2	+	+	-	-	+	+	+	+
		2,5	-	+	-	-	+	+	-	-
		3	-	-	-	-	+	+	-	-
	CdSO4.8h2O (mM)	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+
		1	+	+	+	+	+	+	+	+
		1,5	+	+	-	-	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+	+	+	+
		2,5	+	+	+	-	+	+	+	+
		3	+	-	+	-	+	+	+	+
CoSO4 (mM)	0,5	+	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	
	1	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	
	1,5	++	++	-	+	+	++	+	+	
	2	+	-	-	-	+	+	+	+	
	2,5	+	-	-	-	+	+	+	+	
	3	+	-	-	-	+	+	+	+	
PbCl2 (mM)	0,5	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	
	1	+	+	++	++	+++	+++	++	++	
	1,5	+	+	++	++	+	+	+	+	
	2	+	+	+	-	+	+	+	+	
	2,5	+	+	+	-	+	+	+	+	
	3	+	+	+	-	+	+	+	+	

Une tolérance à 3 mM de tous les métaux lourds est observée chez la majorité des bactéries testées, une concentration allant jusqu'à 1mM n'a empêché la croissance d'aucune d'entre elles.

La tolérance des isolats sélectionnés au stress dû aux métaux lourds est meilleure, comparée à celle observée chez les souches (*Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* S6LiBe, *Bacillus sp* S7LiBe et *Microbacterium sp* S9LiBe).

Microbacterium sp S9LiBe montre une tolérance qui ne dépasse pas 1,5 mM et cela pour tous les métaux lourds testés. Gunaseelan et Ruban (2011) ont bien démontré que *Microbacterium sp* résiste jusqu'à une concentration de 1,78 mM de K₂Cr₂O₄.

Dans cette étude, les isolats S1 et S2 tolèrent la présence de tous les métaux lourds à 3mM. Alors que les deux autres résistent contre 3 mM de (K₂Cr₂O₇ et HgSO₄) et 2 mM de (CdSO₄.8H₂O, CoSO₄et PbCl₂). Des résultats similaires sont obtenus avec la souche de *Pseudomonas sp* qui survit à une concentration de 3 mM pour tous les métaux lourds à l'exception de HgSO₄ où la croissance est inhibée à 2,5 mM.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Kermanshahi et al. (2007) et qui ont révélé la tolérance de *Pseudomonas* et *Bacillus* au cuivre (2,5 mM), et selon Mullen et al. (1989), la résistance de *Pseudomonas* et *Bacillus* au cadmium était de l'ordre de 2 à 2,5 mM. Gupta et al. (2012) ont mis en évidence la résistance de certaines souches de *Bacillus* à des concentrations élevées en Cr (8 mM). Gunaseelan et Ruban (2011) ont situé la résistance de *Pseudomonas* à 1,78mM de K₂Cr₂O₇.

Quant à *Bacillus sp* S7LiBe, elle peut résister jusqu'à 1,5 mM de K₂Cr₂O₇, ce résultat est corroboré avec celui de Gunaseelan et Ruban (2011) qui ont montré que la souche de *Bacillus* peut résister jusqu'à 1,78mM de K₂Cr₂O₄.

III.6. Production d'ammoniac

Tableau XII : Résultats de production de L'ammoniac :

Bactéries	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Bacillus sp</i> S6LiBe	<i>Bacillus sp</i> S7LiBe	<i>Microbactérium sp</i> S9LiBe	S1	S2	S3	S4
Production d'ammoniac	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	++

La production d'ammoniac est un autre critère important des PGPR qui influence indirectement la croissance des plantes. Les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont de bons producteurs d'ammoniac (Ahmad et al., 2008).

Le test de production d'ammoniac montre que toutes les bactéries testées le produisent. D'après Kavitha et al. (2013), la production d'ammoniac a été considérée comme un mécanisme de biocontrôle, dont 80% de ses isolats ont produit l'ammoniac et où toutes les souches de *Pseudomonas sp* et de *Bacillus sp* se sont révélées productrices d'ammoniac. (Yadav et al., 2010 ; Kannapiran et Ramkumar, 2011) ont trouvé que *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus sp* et *Bacillus subtilis* expriment des résultats positifs de production d'ammoniac.

Conclusion et perspectives

Bien que l'application des PGPR ait une importance majeure dans l'agriculture, elle reste toujours insuffisante devant l'utilisation des pesticides et des engrais chimiques.

Dans cette étude, deux échantillons du sol sont prélevés d'une manière aléatoire de la région d'Akbou de la wilaya de Bejaïa. Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement de bactéries d'intérêt agricole.

Quatre isolats ont été sélectionnés et purifiés sur la base d'une observation macroscopique. En plus de ces derniers, quatre souches bactériennes provenant de la collection du laboratoire (LMER) sont parallèlement étudiées.

Les résultats des tests d'activités enzymatiques, synthèse des lipases, estérases, chitinases, cellulases, amylases, uréases et protéases ainsi que la solubilisation du phosphate, la synthèse des sidérophores, la tolérance aux métaux lourds et la production de phytohormones (auxine) ont permis de montrer l'intérêt des bactéries testées en agriculture.

L'identification des quatre isolats est effectuée par la réalisation d'une mini-galerie. Alors que l'identification biochimique sur galerie API 50CHB/E est effectuée pour les isolats S1 et S3. Ces tests ont permis d'affilier ces isolats au genre *Bacillus*.

En plus de leurs richesses en différentes métabolites, ces bactéries se sont révélées inhibitrices de la croissance de certains champignons phytopathogènes.

Ces résultats ont permis de constater que les bactéries étudiées seraient capables de stimuler la croissance végétale, de contrôler la rhizosphère de fertiliser et dépolluer le sol.

A l'issue de ce travail, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives pour l'amélioration de l'utilisation des isolats obtenus :

- ✓ l'identification génotypique des isolats ;
- ✓ Réaliser des Tests de stimulation de la croissance des plantes ;
- ✓ Production d'autres phytohormones comme les gibbérellines et les cytokinines ;
- ✓ Réaliser des tests d'antagonisme *in vitro* et *in vivo* avec d'autres champignons ;
- ✓ Déterminer leurs modes d'action dans l'activité antifongique ;
- ✓ Essayer d'extraire et d'identifier les molécules impliquées dans la lutte biologique.

A

Abnatura RD. (2013). Les Rhizobactéries PGPR. Bulletin Technique. Avril 2013 Issue. <http://www.abnatura.com/ESW/Files/abnatura_bulletin. (accessed 01.04.14).

Ahmad F, Ahmad I et Khan MS. (2008). Screening of freeliving rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research*. **163**, 173–181.

Alabouvette C, Olivain C et Steinberg C. (2006). Biological control of plant diseases. The European situation. *European Journal of Plant Pathology*. **114**, 329–341.

Alexander DB. et Zuberer DA.(1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils*. **12**, 39-45.

Antoun H et Prévost D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.

Arora NK, Kim KJ, Kang SC et Maheshwari DK. (2007). Role of Chitinase and β -1, 3-glucanases activities produced by a fluorescent *pseudomonad* and in vitro inhibition of phytophthora capsici and Rhizoctonia solani. *Can. J. Microbiol.* **53**, 207-212.

B

Baca BE et Elmerich C. (2007). Microbial Production of Plant Hormones. *Bacteria and Cyanobacterial Associations*. p.113-143.

Bach HJ et Munch JC. (2000). Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol Fertil Soils*. **31**, 219–224

Banerjee MR, Yesmin L et Vessey JK.(2006) .Plant-growth promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides,” in *Handbook of Microbial Biofertilizers*, M. K. Rai, (Ed.), Food Products Press, Binghamton, NY, USA. pp. 137–181.

Bergey’s Manual, (2004). Systematic of bacteriology, Taxonomic outline of the prokaryotes. Second edition. Garrity. G.M; Bell. J.A; Lilburn. T.G, Springer, New York Berlin Heidelberg.

Bhushan B et Hoondal GS.(1998). Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnology Letters*, **20**, 157–159.

Bric JM, Bostock RM et Silverstone SE.(1991). Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 535-538.

C

Calvo P, Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E et Zúñiga D. (2010). Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology.* **41**, 899-906.

Carder JH. (1986). Detection and quantification of cellulase by congo red staining of sunstrates in a cup-plate difussion assay. *Anal. Biochem.* **153**, 75-79.

Carrim AJI, Barbosa EC et Gonçalves VJD. (2006). Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology.* **49** , 353-359.

Chien-Jui H , Tang-Kai W , Shu-Chun C et Chao-Ying C. (2005) . Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* **Vol. 38**, (1): 82-88.

Chincholkar SB, Chaudhari BL et Rane MR.(2007). Microbial Siderophore:A State of Art *.Soil Biology.* **12**, 233-242.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C et Ait Barka E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4951-4959.

Choundhury P et Kumar R. (1996). Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistances of enteropathogenic organisms isolated from coastal region of deltatic sunder bans. *Ind. J. Med. Resear.* **104**, 148-151.

Christensen WB. (1946). Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of Bacteriology.*

D

Denis B. (2000). Guide des analyses en pédologie, 2eme édition. 266P.

De Salamon IG, Hynes RK et Nelson LM. (2005). Role of Cytokinins in plant growth promotion by rhizosphère bacteria. In Siddiqui A. A. (ed.), PGPR : Biocontrol and Biofertilization. P. 173-195.

Dick WA., Cheng L. and Wang P. (2000). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol Biochem.* **32**, 1915–1919.

E

Egamberdieva D. (2008). Plant Growth Promoting Properties of Rhizobacteria Isolated from Wheat and Pea Grown in Loamy Sand Soil. *Turk J Biol.* **32**, 9-15.

Egamberdieva D, Berg G, Lindström K et Räsänen LA.(2010). Co-inoculation of *Pseudomonas spp.* with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega(*Galega orientalis* Lam.). *European Journal of Soil Biology*, **46**, 269-272.

Eivazi F et Tabatabai MA. (1977). Phosphatases in soils. *soil biol.Biochem.* **9**, 167-172.

El-Safey EM et Abdul-Raouf UM. (2004). Production, purification and characterization of protease enzyme From *bacillus subtilis*. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, Assiut Univ. ,p14.

F

Fernando WGD, Nakkeeran S et Zhang Y. (2005). Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its relation in Biocontrol of Plant Diseases. In Siddiqui Z. A. (ed.), PGPR : *Biocontrol and Biofertilization*. P. 67-109.

Fickers P , Destain J et Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications .*Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12** (2) : 119-130.

G

Garcia CR , Quesada E , Checa FM , Inmaculada L , Urdaci MC et Bejar V.(2005). Bacillus axarquiensis sp. nov. and Bacillus malacitensis sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1279–1285.

Garveba P, Van Veen JA et Van Elsas JD. (2003). Predominant of *Bacillus spp* in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microb Ecol.* **45**, 302-316.

Glick BR et Pasternak JJ.(1998). Plant growth promoting bacteria in molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. 2nd Ed. ,ASN press, Washington DC .glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and experimental Botany.* **60**, 121-126.

Glick BR, Patten CL, Holguin G et Penrose DM. (1999). Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK, 267 p.

Glick BR , Cheng Z et Czarny J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminas-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**, 329-339.

Gray EJ et Smith DL. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 395- 412.

Gull I, Hafeez FY, Saleem M et Malik KA. (2004). Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilizing bacteria and a mixed rhizobial culture. *Aust. J. Exp. Agric.* **44**, 623-628.

Gunaseelan C et Ruban P.(2011). Heavy metal resistance Bacterium isolated from KrishnaGodavari basin, Bay of Bengal. *International journal of environmental sciences.***1** (7): 1856-1865.

Gupta K , Chatterjee C et Gupta B.(2012). Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), *West Bengal, India. Biologia.* **67** (5): 827-836.

Gupta R , Gupta N et Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* **64**, 763–781.

H

Haas D et Défago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 307–319.

Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ et Ouhdouch Y. (2008). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J Microbiol Biotechnol.* **24**, 2565–2575.

Harman GE et Shores M. (2007). The Mechanisms and Applications of Symbiotic Opportunistic Plant Symbionts.. *In* Vurro M. and Gressel J. (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management.* P.131-155.

Honda K , Kataoka M , Ono H , Sakamoto K , Kita S et Shimizu S.(2002). Purification and characterization of a novel esterase promising for the production of useful compounds from *Microbacterium sp.* 7-1W. *FEMS Microbiology Letters.* **206** , 221-227.

Huang CJ, Wang TK, Chung SC et Chen CY. (2005). Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* **38** (1): 82- 88.

I

Intra B, Mungsuntisuk I, Nihira T, Igarashi Y et Panbangred W. (2011). Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum spp.*, the causative agent of anthracnose disease. Intra et al. *BMC Research Notes.* **4**, p.98.

Irfan M, Safdar A, Quratulain S et Nadeem M.(2012). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, **37** (3), 287–293.

Irving GCJ et Cosgrove DJ .(1971). Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin .Some ome properties of a partially purified bacterial(*Pseudomonas sp*) phytase. *Aust. J. biol. Sci.* **24**, 547-57.

J

Jaradat Z, Dawagreh A, Ababneh Q et Saadoun I. (2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces sp.* (Strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences.* **1**, 141- 146.

Ji SH , Gururani MA et Chul CS. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research.* **169**, 83– 98.

Jourdan E, Ongena M et Thonar P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **4**, 437-449.

Juglea S. (2011). Simulation de l'humidité du sol/ température de brillance à partir des données in situ dans le cadre de la validation des produits SMOS- site test Valencia Anchor Station. Thèse de Doctorat en sciences de la terre et des planètes solide. Université Toulouse 3 Sabatier (UT3 Paul Sabatier).175p.

K

Kannapiran E et Ramkumar SV. (2011). Inoculation effect of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth of black gram (*Phaseolus mungo* Roxb; Eng.) *Annals of Biological Research.* **2** (5): 615-621.

Karnwal A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* **91**, 61-63.

Kavitha T, Nelson R et Josephin JS. (2013). Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Int J Pharm Bio Sci.* **4** (4) : 177 – 186.

Kennedy AC et De Luna LZ .(2004). Rhizosphere, In D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment*. Columbia University, USA. **03**.

Kermanshahi KR, Ghazifard A et Tavakoli A.(2007). Identification of bacteria resistant to heavy metals in the soils of Isfahan province. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A.* **31**, 8-16.

Khan MS, Zaidi APA, Ahmed M et Oves M. (2009). Functional Diversity among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria :Current Status M.S.Khan et Microbial Strategies For Crop Improvement.105-132

- Killani AS, Abaidoo RC, Akintokun AK et Abiala MA. (2011).** Antagonistic Effect of Indigenous *Bacillus subtilis* on Root-/Soil-borne Fungal Pathogens of Cowpea. **3** (3): 11- 18.
- Kim KY et McDonald GA.(1998).** Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Fert. Soils* **26**, 79-87.
- Kim WG, Weon HY, Seok SJ et Lee KH. (2008).** In Vitro Antagonistic Characteristics of *Bacilli* Isolates against *Trichoderma spp.* and Three Species of Mushrooms. *Mycobiology*. **36** (4): 266- 269.
- Kloepper JW. (1993).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents in Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management. Metting, F.B. Jr. (ed.). Merceel Dekker, New York, pp 255-27.
- Kole SC and Hajra JN. (1997).** Isolation and evaluation of tricalcium and rock phosphate solubilizing microorganisms from acidic terai and lateritic soils of west Bengal. *J. Interac.***1**, 126-128.
- Kopečný J, Hodrová B et Stewart CS. (1996).** The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 195-198.
- Kouassi M. (2001).** La lutte biologique: une alternative viable à l'utilisation des pesticides, *Vertigo*. **2** (2).
- Kuberan T, Sangaralingam S et Thirumalai AV.(2010).** Isolation and optimization of Protease producing Bacteria from Halophilic soil. *Journal of Biosciences Research* . **1**(3): 163-174.

L

- Lindsay WL.(1979).** Chemical equilibria in soils. *Wiley, Chuchester*, 449 p.

Lu WJ, Wang HT, Yang SJ, Wang ZC et Yong FN.(2005). Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **51** ,353–360.

M

Mahmoud DAR, Mahmoud AA et Gomaa AM. (2008). Antagonistic activities of potato Associated bacteria via their production of hydrolytic enzymes with special reference to Pectinases .*Journal of agriculture and biological sciences.* **4(5):** 575-584.

Maki ML , Broere M , Leung KT et Qin W. (2011). Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J. Biochem. Mol. Biol.* **2 (2):** 146-154.

Maleki M, Mostafae S, Mokhtarnejad L and Farzaneh M. (2010). Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. *A J C S.* **4 (9):** 676-683.

Mansour FA, Aldesuquy HS et Hamedo HA. (1994). Studies on Plant Growth Regulators and Enzymes Production by Some Bacterie. *Qatar Univ.Sci. J.***14 (2):** 281-288.

Marschner P et Rengel Z. (2007). Contributions of Rhizosphere Interactions to Soil Biological Fertility. *Soil Biological Fertility - A Key to Sustainable Land Use in Agriculture.* 81-98.

Martinez-Salgado MM, Gutiérrez-Romero V, Janssens M et Ortega-Blu R. (2010). Biological soil quality indicators: a review. *In A.Mendez-Vilas (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* p. 319-328.

Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G et Mora ML. (2010). Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10 (3):** 293 – 319.

- Mathieu C et Pieltain F. (2003).** Prélèvement et préparation des échantillons de terre, *In* Analyse chimique des sols « méthodes choisies » Edition TEC&DOC. p1-22.
- Meyer JM et Abdallah MA.(1978).** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 319-328.
- Mezaache S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat en Sciences. Option : Microbiologie.Université Ferhat ABBAS Sétif.221 p.
- Morgan JAW, Bending GD et White PJ.(2005).** Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany.* **56**,1729-1739.
- Mullen MD, Wolf DC, Ferris FC, Beveridge TJ, Flemming CA et Baily GW. (1989).** Bacterial sorption of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3143-3149.

N

- Nabti E. (2007).** Restauration de la croissance de *Azospirillum brasilense* et de Blé dur et leur osmoprotection par *Ulva lactucaen* Milieux Salés.thèse de Doctorat en Science Biologique. Université Abderrahmane Mira de Bejaia.147p.
- Nabti E , Sahnoune M, Adjrad S, Van Dommelen A, Ghoul M, Schmid M et Hartmann A. (2007).** A halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilense* Strain from Algerian Soil restores Wheat Growth under Saline Conditions. *Eng. Life. Sci.* **7**, 354-360.
- Nabti E, Bensidhoum L, Tabli N, Dahel D, Weiss A, Rothballer M, Schmid M et Hartmann A. (2014).** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium sp.* strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology.* **61**, 20-26.
- Nadeem SM, Naveed M, Zahir ZA et Asghar HN.(2013).** Plant–Microbe Interactions for Sustainable Agriculture. In: Arora NK. (Eds.), *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances Fundamentals and Recent Advances.* Springer, India, pp. 51-84.

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

Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L et Renella G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bunemann EK, Obreson A, Frossard E (eds) Phosphorus in action. Springer, Berlin, pp 215–243.

Nehl DB et Knox OGG. (2006). Significance of Bacteria in the Rhizosphère. In Mukerji K.G. C.Manoharachary, J.Singg (eds.), Microbial Activity in the rhizosphère. *Soil Biology.* **7**, p.89-119.

Nermeen AE, Hanan A, Gehan MA, Hassan AHI et Nabil MKE.(2010). Optimization, economization and characterization of cellulose produced by marine *streptomyces ruber*. *Africa journal of biotechnology.* **9** (38): 6355-6364.

Ningthoujam DS, Kshetri P, Sanasam S et Nimaichand S.(2009). Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. *World Applied Sciences Journal* **7**, 907-916.

O

Okon Y et Kapulnik Y. (1986). Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil.* **90**, 3-16.

Otajevwo FD et Aluyi HSA. (2011). Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium. *Modern Applied Science.* **5** (3): 141-151.

P

Petit J et Jobin P. (2005). La fertilisation organique des cultures *Les bases*. Fédération d'agriculture biologique du Québec. Bibliothèque nationale de Canada, 48p.

Podile AR et Kishore KG. (2006). Plant growth –promoting rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria*, p195–230.

Pujic P et Normand P.(2009). La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*. **298**, 26-29.

Q

Quecine MC, Araujo WL, Marcon J, Gail CS, Azevedo JL et Pizzirani-Kleiner AA. (2008). Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. Original Article.

Qureshi MA, Ahmad ZA, Akhtar N, Iqbal A, Mujeeb F and Shakir MA. (2012). Role of phosphate solubilizing bacteria (psb) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **22**(1): 204-210.

R

Ramesh S et Mathivanan N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J Microbiol Biotechnol*. **25**, 2103–2111.

Richardson AE. (2001).Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust.J.Plant Physiol*. **28**, 897-906.

Rivas R , Trujillo ME, Sanchez M, Mateos PF, Molina EM et Velazquez E.(2004) . Microbacterium ulmi sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54**, 513–517.

Rodriguez H et Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. **17**, 319-339.

S

Saddiki S. (1999). Utilisation du *Bradyrhizobium japonicum* comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes chez le maïs. Thèse pour obtenir le grade de maitre en Science. Université LAVAL. p65.

Sagahón IP, Reyes MAA, Rojas HVS , Cuenca AA , Jurado AT, Álvarez IOC et Flores YM. (2011). Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 5522-5537.

Sajani S et Muthukkaruppan SM. (2011). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and fungi associated with rice, mangrove and effluent contaminated soil. *Curr. Bot.* **2**(3): 22-25.

Sandhya V, Ali SKZ, Venkateswarlu B, Reddy G et Grover M. (2010). Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Arch. Microbiol.* **192**, 867-876.

Sayyed RZ et Patel PR. (2011). Biocontrol Potentiel of Sidérophore Producing Heavy Métal Resistant *Alcaligenes* sp and *Pseudomonas aeruginosa* RZS3 vis-a vis Organophosphorus Fungicide .*India J. Microbiol.* **51**(3): 266-272.

Sharma R , Chisti Y et Banerjee UC. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* .**19** , 627–662 .

Shonkor KD et Ajit V. (2011). Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. *soil enzymology.* **2**, 25-45.

Siddiqui ZA. (2005). PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. In Siddiqui Z. A. (ed.), PGPR: biocontrôle and Biofertilization. P.111-142.

Sierra GA. (1957). A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. *Antonine van Leeuwenhoeck*, **28**, 15-22.

Sindhu SS, Dua S, Verma MK et Khandelwal A. (2010). Growth Promotion of Legumes by Inoculation of Rhizosphere Bacteria .In .M .S.Khan et al.(eds),Microbes for legume Improvement. p.195-235.

Singh M, Saurav K, Srivastava N et Kannabiran K. (2010). Lipase Production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in Solid State Fermentation Using Ground Nut Oil Cakes as Substrate. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 2(4): 241-245.

Singh Y, Ramteke PWet Shukla PK. (2013). Isolation and characterization of heavy metal Resistant *Pseudomonas spp.* And their plant growth promoting activities. *Advances in Applied Science Research*. 4(1):269-272.

Sonam S,Vijay K et Tripathi RB. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *J. Microbiol. Biotech. Res*. 1 (2): 90-95.

Soylu S, Soylu EM, Kurt S et Ekici OK. (2005). Antagonistic potentials of rhizosphere associated bacterial isolates against soil-born diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*.*Pakistan J. Of Boil. Sci*. 8, 43-48.

T

Tabli N. (2012). Recherche de bactéries stimulatrices de la croissance de la tomate et leur application dans la lutte biologique.These de Magistere en Microbiologie. Université Abderrahmane Mira de Bejaia.149p.

Tang-um J et Hataichanoke N. (2012). Extracellular Amylase Activity from Endophytic *Streptomyces griseoflavus* P4. *Chiang Mai J. Sci.*, 39(2) : 346-350.

Thakore Y. (2006) .The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2(3): 294-208.

Thoma JA, Spradlin JE et Dygert S. (1971) .Plant and animal amylases. In: Boyer PD (ed) The enzymes, 5th edn. Academic, New York, pp 115–189.

Thys RCS, Guzzon SO, Olivera F et Brandelli C. (2006). Optimization of protease production by *Microbacterium sp.* in feather meal using response surface methodology. *Process Biochemistry*. **41**, 67–73.

Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove H, Deobald LA, Bailey FJ et Morra MJ. (2002). Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S.lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2161-2171.

Tri -Wahyudi A, Puji AR, Widyawati A, Meryandini A et Asih Nawangsih A. (2011). Characterization of *Bacillus sp.* strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. **3**(2): 34-40.

U

Uwe TB. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* .**26**, 73-81.

V

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

Van Loon LC. (2007). Plant responses to plant growth –promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol.***119**, 243-254.

Vessey JK. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.* **255**, 571–586.

Vinoth RS, Kanikkai RA, Babu VA, Manoj GT, Naman HS, Johnson AJ, Infant SB et Sathiyaseelan K. (2009). Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology* 1(1): 008–013.

Viollet A. (2010). Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas spp.* Fluorescents non pathogènes. Thèse de Doctorat de Microbiologie des Sols et de l'Environnement. Spécialité : Ecologie Microbienne. Université de Bourgogne.

Vipul V, Alpika V, Kushwaha A. (2012). Isolation & production of cellulase enzyme from bacteria isolated from agricultural fields in district Hardoi, Uttar Pradesh, India. *Advances in Applied Science Research*, 3 (1):171-174.

W

Wasaki J, Rothe A, Kania A, Neumann G, Romheld V, Shinano T, Osaki M et Kandeler E. (2005). Root exudation, phosphorus acquisition, and microbial diversity in the rhizosphere of white lupine as affected by phosphorus supply and atmospheric carbon dioxide concentration. *Journal of Environmental Quality*, 34, 2157–2166.

Weyens N, Monchy S, Vangronsveld J, Taghariani et Lelie DV. (2010). Plant- Microbe Partnerships (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. p. 547-257.

Whipps JM. (2001). Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52, 487-511.

Wild A.(1993). Soils and the Environment .Cambridge University Press. 300p.

Wojciech JJ et Lise K. (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopatol.* 40, 411-441.

Woo, Cheol-Joo, Un-Jung Y et Heui-Dong P.(1996). Isolation of chitin-utilizing Bacterium and Production of its Extracellular Chitinase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(6): 439-444.

Y

Yadav RS et Tarafdar JC. (2001). Influence of Organic and Inorganic Phosphorous Supply on the Maximum Secretion of Acid Phosphatase by Plants. *Biology and Fertility of Soils.* **34**(3): 140-143, ISSN 1432-0789.

Yadav J, Verma JP et Tiwari KN. (2010). Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on seed germination and plant growth Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under in *Vitro* conditions. *Biological Forum — An International Journal*, **2**(2): 15-18.

Yang Z, Liu S, Zheng D et Feng S. (2006). Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *J. Environ. Sci.* **18**, 1135–1141.

Z

Zahir ZA, Arshad M et Frankenberger WTJ. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria : application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro.* **81**, 97-198.

Annexe I. Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu) :➤ **Bouillon Nutritif :**

Composition	Quantité (g)
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
pH	7.2

➤ **Bouillon PBS :**

Composition	Quantité (g)
NaCl	18
KCl	0.2
Na₂HPO₄	1.44
KH₂PO₄	0.24
pH	7

➤ **GNO**

Compositions	Quantité (g)
Peptone	5
Extrait de levure	2
Extrait de viande	1
NaCl	5
Agar	18
pH	7.5

➤ **Milieu TSA :**

Compositions	Quantité (g)
Peptone de Caséine (pancréatique)	15
Peptone de soja	5
Chlore de sodium	5
Agar	15
pH	7.4

➤ **Milieu Luria Bertani (LB) :**

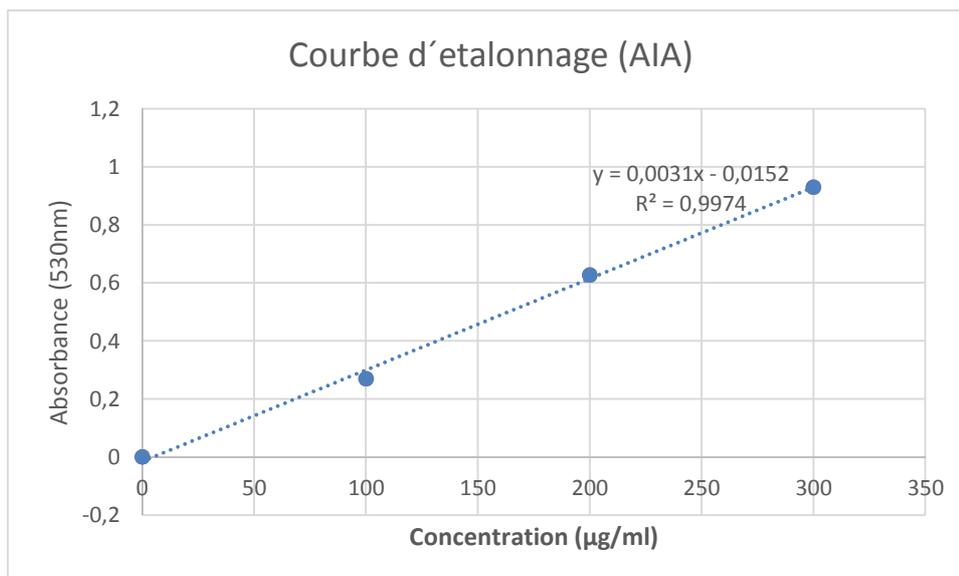
Compositions	Quantité (g)
Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	4
Agar	8
pH	7.4

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C /20minutes

➤ **Agar à l'extrait de malt :**

Compositions	Quantité (g)
Extrait de malt	30
Peptone mycologique	5
Agar	15
pH	5,4± 0,2

Le milieu est stérilisé à l'autoclave à une température de 115°C/10min.

Annexe II. Résultats de l'identification sur galerie API50CHB/E des deux isolats *S1* et *S3**S1**S3***Annexe III.** Courbe d'étalonnage d'Acide Indole Acétique (AIA) à 530nm

Annexe IV. La matrice des résultats de PGI % telle qu'ils sont saisis sur XLSTAT

souches	champ	diam
S1	BC	100
S1	BC	97
S2	BC	94,6
S2	BC	95,94
S3	BC	94,6
S3	BC	97,3
S4	BC	98,46
S4	BC	98,6
S5	BC	97,3
S5	BC	95,94
S6	BC	91,9
S6	BC	94,6
S7	BC	100
S7	BC	97,29
S8	BC	97,3
S8	BC	97,29
S1	FS	68
S1	FS	70
S2	FS	64
S2	FS	48
S3	FS	16
S3	FS	20
S4	FS	16
S4	FS	12
S5	FS	16
S5	FS	12
S6	FS	28
S6	FS	24
S7	FS	76
S7	FS	60
S8	FS	44
S8	FS	48
S1	AS	86,9
S1	AS	82,6
S2	AS	91,3
S2	AS	82,6
S3	AS	80
S3	AS	84,78
S4	AS	80
S4	AS	84,78
S5	AS	73,9
S5	AS	78,26
S6	AS	82,6
S6	AS	84,7
S7	AS	91,3
S7	AS	95,65
S8	AS	80,4
S8	AS	82

Résumé : 4 isolats (S1, S2, S3 et S4) obtenus à partir de 2 échantillons du sol (Akbou- Bejaïa) et 4 souches bactériennes de la collection du laboratoire (LMER) (*Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*S6LiBe, *Bacillus sp.*S7LiBe et *Microbacterium sp.*) ont fait l'objet de la recherche des caractères promoteurs de la croissance des plantes. Des activités enzymatiques (cellulase, protéase, amylase, chitinase, uréase, estérase et lipase), production d'AIA et de sidérophores ; solubilisation du phosphate ; tolérance aux 5 métaux lourds ($K_2Cr_2O_7$, $HgSO_4$, $CdSO_4 \cdot 8H_2O$, $CoSO_4$ et $PbCl_2$) et l'activité antifongique sont ciblés. L'identification biochimique des bactéries est effectuée sur mini- galerie, à l'exception des 2 isolats (S1 et S3) qui sont étudiées sur galerie biochimiques API 50CHB/E. Les résultats obtenus ont révélé que les 8 bactéries étudiées produisent la majorité des enzymes, solubilisent le phosphate, excepté *Bacillus sp.*S6LiBe. Ces bactéries produisent l'AIA ($\mu g/ml$) : S1 (19,37), S2 (14,85), S3 (18,72) et S4 (25,49), *Pseudomonas sp.* (6,46), *Bacillus sp.*S6LiBe (1,62), *Bacillus sp.* S7LiBe (18,74) et *Microbactérium sp.* (5,75). Ces microorganismes produisent également des sidérophores, sauf l'isolat 4. Une tolérance à 3 mM de tous les métaux lourds est observée chez la majorité des bactéries testées et une concentration allant jusqu'à 1mM n'a empêché la croissance d'aucune d'entre elles. Une bonne activité antagoniste contre *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger* avec des PGI >76% est bien observée chez les 8 bactéries. Alors que les PGI observés contre *Fusarium colmorum* sont plus faible 12%-69%.

Mots-clés : Rhizosphère, PGPR, biocontrol, AIA, Sidérophores, Solubilisation de phosphate ; Métaux lourds.

Abstract: Four isolates (S1 , S2 , S3 and S4) obtained from two soil samples (Akbou - Bejaia) and four bacterial strains of the laboratory Mastery energy renewable collection (*Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, S6LiBe, *Bacillus sp.*, S7LiBe and *Microbacterium sp.*) have been subjected to research plant growth promoters characteristics . Enzyme activities (cellulase , protease, amylase , chitinase , urease , esterase and lipase), IAA and sidérophores production ; phosphate solubilization ; tolerance to 5 heavy metals ($K_2Cr_2O_7$, $HgSO_4$, $CdSO_4 \cdot 8H_2O$, $CoSO_4$ et $PbCl_2$) and antifungal activity are targeted. The biochemical identification of the bacteria is carried out on mini - gallery, except the two isolates (S1 and S3) which are studied on biochemical API gallery 50CHB / E. The results revealed that the eight bacteria tested produce the majority of the searched enzymes and solubilize phosphate except *Bacillus sp.*S6LiBe. These bacteria produce IAA ($\mu g / ml$) : S1 (19,37), S2 (14,85), S3 (18,72) and S4 (25,49), *Pseudomonas sp.* (6,46), *Bacillus sp.*S6LiBe (1,62), *Bacillus sp.* S7LiBe (18,74) and *Microbactérium sp.* (5,75) . These microorganisms also produce siderophores, except the isolate 4. A tolerance of 3 mM of all heavy metals is observed in the majority of the tested bacteria and concentrations of up to 1 mM did not inhibit the growth of any of the tested strains. A good antagonistic activity against *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger* with a PGI > 76% observed the eight bacteria. While the PGI observed against *Fusarium colmorum* are lower than 12% -69 %.

Keywords: Rhizosphère, PGPR, biocontrol, IAA, Sidérophores, Phosphate solubilization; Heavy Metals

Introduction

*Synthèse
bibliographique*

Matériel
et
Méthodes

Résultats
et
Discussion

Chapitre I

Les bactéries d'intérêt agricole

Conclusion
et
Perspectives

*Références
bibliographique*

Annexes

Chapitre II

Les enzymes d'intérêt agricole

Partie pratique