



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Ibn Khaldoun–Tiaret**  
**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**  
**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master académique**

**Domaine : Science de la Nature et de la vie.**

**Filière : Sciences Biologiques.**

**Spécialité : Biotechnologie microbienne**

**Présenté par : HAMZA Afaf**

**GUENANE Fatima**

**HAMEL Chérifa**

***Thème :***

***Formulation des bioengrais sur la base des souches de PGPR  
par des procédés biotechnologiques***

**Soutenu publiquement le 14/07/2021**

**Jury :**

**Grade**

**Présidente : Dr Nehila Afaf**

**MCB**

**Encadreur : Dr Rahmoune Bilal**

**MCA**

**Co-encadreur : Dr Dahlia Fatima**

**MCA**

**Examineur : Dr Ait Abderrahim Leila**

**MCA**

**2020-2021**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۴۳۸

## **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions notre dieu ﷻ de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de réaliser ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements aux personnes qui ont bien voulu encadrer ce travail : notre promoteur **Mr RAHMOUNE BILAL.**, et notre copromotrice **Mme DAHLIA FATIMA.**, D'avoir accepté de nous encadrer et de nous suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire par leurs esprits scientifiques de haut niveau, et par leurs caractères de noblesse incomparable, pour leurs générosités et leurs grandes patiences dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

*Nos profonds remerciements vont aussi au membre du jury pour avoir accepté l'examen et la discussion de notre travail, pour leurs remarques judicieuses et leurs optiques enrichissantes qui vont valoriser notre mémoire.*

*Nous remercions vivement **Mme Nehila A.** d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous remercions **Mme Ait Abderrahim L.** d'avoir consacré de son temps pour examiner ce modeste travail.*

*Merci à tous nos collègues pour tous les bons moments, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur compétence. Merci du fond du cœur.*

*En fin, à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.*

## *Dédicace*

*Avant tout chose, je remercie Dieu ﷻ le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*Je dédie ce modeste travail*

*À la plus forte et patiente femme au monde **Ma très chère maman Aïcha** pour ses grands sacrifices et qui m'a jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs, C'est grâce à elle que je suis arrivée à ce stade et à **Mon très cher tendre pété Mohamed** pour tout l'amour qu'il m'a donné, si je dois consacrer tout ma vie pour eux je ne peux pas rendre ce qu'il mon fait, qui **ÀLLAH** les garde et leurs accordé une longue vie.*

*À Mes chéries sœurs et frères*

*À mes amis (e) : Zineb, Hanane, Ahlem, Houda, Karima, Fouzia, Samia, Mbarkàa, Fatima, chaimàa, Khadra*

*qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.*

*À mes trinôme : Fatima et Chérifa et leur famille*

*À tout mes collègues de la promotion de **2 ème année Master Biotechnologie microbienne***

*À tous ceux et celles, qui de prés ou de loin ont permis par leurs conseils et leurs compétences, la réalisation de mémoires.*

***Afaf***

## ***Dédicace***

*C'est grâce à Dieu le tout puissant qui m'a guidé et aide durant tout mon cursus universitaire.*

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :*

*À mes très chers parents,*

*habri et Fatiha, à qui je dois tout le bonheur du monde, pour leurs sacrifices et leurs amour, patience et surtout pour leur soutien et encouragements, notamment tout au long de mon étude.*

*Que Dieu leur procure bonheur, santé et longue vie.*

*À mes chères sœurs,*

*Ahlam ,ikram et chamimaa , à mon frère Karim, à mon petit frère Mohamad Taha .a mes chers amis et tout mes professeurs.*

*À ceux que je n'ai pas cité mais que je porte toujours dans mon cœur.*

***Fatima***

## *Dédicace*

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents : khadra et sàad

A mes sœurs : Amina et Amel

A tous mes amis sans exception surtout Afaf et Fatima

Et leur autres collègues

A tout qui m'ont apporté du soutien tout ma vie

*Chérifa*

## ***Table des matières***

***Liste des figures***

***Liste des tableaux***

***Liste des abréviations***

## ***Sommaire***

***Introduction générale***.....01

### ***Chapitre I : Matériel et méthodes***

1. Matériel.....	06
1.1. Matériel utilisés aux laboratoires.....	06
1.2. Matériel bactériens.....	06
1.2.1. Isolement et purification des PGPR.....	06
1.2.2. Ensemencement et incubation.....	07
1.2.3. Sélection des colonies bactériennes.....	07
1.2.4. Identification et caractérisation des PGPR.....	07
1.2.4.1. Caractéristiques culturelles.....	08
1.2.4.2. Caractérisation morphologique.....	08
1.2.4.3. Caractérisation biochimique.....	09
. Fixation d'azote.....	09
. Test catalase.....	09
. Test Indole.....	10
. Solubilisation du Zinc.....	10
1.3. Préparation des isolats pour l'encapsulation.....	10
1.4. Encapsulation des isolats et formulation des bioengrais.....	11

1.5. Vérification de la viabilité des souches et des bioengrais.....	12
1.6. Matériel végétale.....	13
1.6.1. Germination des graines et application des bioengrais... ..	13
1.6.1.1. Paramètres mesurés.....	15
1.6.1.1.1. Longueur des tiges et de la racine principale.....	15

## ***Chapitre II : Résultats et discussion***

1. Caractérisation et identification de PGPR.....	17
1.1. Identification phénotypique des souches bactériennes.....	17
1.2. Caractérisation biochimique des souches bactériennes.....	19
1.2.1. Fixation d'azote.....	19
1.2.2. Test catalase.....	20
1.2.3. Test d'indole.....	20
1.2.4. Solubilisation de zinc.....	21
2. Encapsulation et formulation des bioengrais.....	21
3. Vérification de la viabilité.....	22
4. Effet des bioengrais sur la germination et la croissance de maïs.....	22
5. Discussion.....	24
<b><i>Conclusion</i></b> .....	27
<b><i>Les références bibliographiques</i></b> .....	29
<b><i>Les annexes</i></b> .....	34
<b><i>Résumé</i></b>	



## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Différentes étapes des isolements des PGPR .....	07
<b>Figure 2</b> : Coloration de gram des isolats .....	08
<b>Figure 3</b> : Milieu Ashby original et test de fixation d'azotes.....	09
<b>Figure 4</b> : Réalisation du test de catalase.....	09
<b>Figure 5</b> : Préparation pour la réalisation d'un test de production d'indole... ..	10
<b>Figure 6</b> : Préparation de l'inoculum bactérien pour l'encapsulation.....	11
<b>Figure 7</b> : Préparation des microcapsules .....	12
<b>Figure 8</b> : Différents étapes de vérification de la viabilité des souches et de bioengrais....	13
<b>Figure 9</b> : Mise en germination des graines du maïs dans des boîtes de pétries.....	14
<b>Figure 10</b> : Mise en germination des grains de maïs dans des papiers filtre après application des bioengrais.....	14
<b>Figure 11</b> : Observation microscopique des bactéries isolées sur microscopique optique.....	18
<b>Figure 12</b> : Aspect morphologique des Rhizobactéries sur milieu King B Après 72h D'incubation.....	19
<b>Figure 13</b> : Croissance des bactéries isolées sur milieu de culture Ashby.....	19
<b>Figure 14</b> : Réaction de test de catalase.....	20
<b>Figure 15</b> : Réaction positive du test d'indole.....	20
<b>Figure 16</b> : Bioengrais à base de nos isolats.....	21
<b>Figure 17</b> : Test de viabilité et croissance des souches sur le milieu King B.....	22
<b>Figure 18</b> : Longueur des racines des plantes de maïs après application des bioengrais à base des PGPR.....	23
<b>Figure 19</b> : Longueur des tiges des plantes de maïs après application des bioengrais à base des PGPR.....	24

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1 :</b> Matériel utilisés aux laboratoires.....	06
<b>Tableau 2 :</b> Caractéristique culturelles et phénotypiques des PGPR isolées.....	17
<b>Tableau 3 :</b> Caractérisation biochimique de nos isolats PGPR.....	21

## *Liste des abréviations*

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**AIA:** Acide Indole-3-Acétique

**Do:** Densité optique

**Cm:** Centimètres

**g:** Gramme

**h:** Heure

**° C :** Degré celsius

**% :** pourcentage

**Tpm:** Tour par minute

**ml:** Millilitre

**pH:** Potentiel hydrogène

# *Introduction générale*

## INTRODUCTION GENERAL

---

Selon l'Organisation des Nations Unies, la population mondiale actuelle de 7,6 milliards devrait augmenter au-delà de 9,8 milliards d'ici 2050 (FAO, 2020). Cette croissance spectaculaire de la population mondiale s'accompagne de l'augmentation prévue de la demande de produits agricoles destinés à l'alimentation humaine et animale. Et de l'augmentation évidente des activités humaines destructrices de l'environnement et des agroécosystèmes, telles que la déforestation et la surutilisation d'engrais et de pesticides chimiques dans les pratiques agricoles (Kong et al., 2018). Par la suite, ces activités ont conduit à des réductions des terres cultivables et de la productivité des cultures (Rosegrant et al., 2009). La combinaison de ces problèmes avec d'autres facteurs tel que la sécheresse... constituent une menace sérieuse pour la sécurité alimentaire mondiale et la stabilité des économies, en particulier dans les pays en voie de développement (Patil & Solanki, 2016). La solution à ces défis nécessite la combinaison de multiples approches, y compris l'utilisation des techniques biotechnologiques et l'application à grande échelle des bactéries favorisant la croissance des plantes, aussi appelée les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), comme biostimulants et biofertilisants pour améliorer la fertilité des sols et pour augmenter la productivité des cultures (Kong et al., 2018).

Les plantes attirent leurs microorganismes autour des microenvironnements réservoirs tels que la rhizosphère (autour des racines), la phyllosphère (autour des feuilles), l'anthère (autour des fleurs), la spermosphère (autour de la graine germée) et de la carposphère (autour des fruits).

Le microbiome rhizosphérique est principalement transféré horizontalement, c'est-à-dire qu'il dériver de l'environnement du sol, dominés par les acidobactéries, les verrucomicrobia, les bactéroïdes, les protéobactéries, les planctomycètes et les actinobactéries. Cependant, les bactéries peuvent également être transmises verticalement via des graines. Les graines représentent également une source importante de micro-organismes, qui prolifèrent dans les racines de la plante en développement (Patil & Solanki, 2016). Les racines sont également colonisées par une gamme diversifiée de bactéries endophytes. La colonisation et la transmission des bactéries endophytes au sein des plantes dépendent de nombreux facteurs. Les taxa endophytes les plus abondant sont les groplactéries, les acidobactéries, les actinobactéries, les bactéroïdes, les verrucomicrobie, les planctomycètes, les chloroflexi, les firmiceutes et les gemmatimonons (Sindhu et al. 2016).

Les micro-organismes bénéfiques trouvés dans la rhizosphère des plantes contribuent de manière significative à la santé des sols via différents processus tels que le cycle des nutriments, la décomposition de la matière organique et la formation d'humus (Patil & Solanki, 2016). Elles jouent un rôle essentiel dans la productivité agricole et leurs processus sont cruciaux pour la croissance des plantes et comprennent la fixation de l'azote (N), la solubilisation du phosphate (P), la production de substances favorisant la croissance des plantes (antibiotiques, métabolites,

## INTRODUCTION GENERAL

---

hormones, etc.) et la dégradation des tissus végétaux et des pathogènes ainsi que des polluants (**Berg, 2009**). Les PGPR contribuent également à l'amélioration de la capacité de maintien et de rétention de l'eau dans le sol en produisant des substances telles que les polysaccharides qui détiennent ensemble des agrégats de sols. En conséquence, Elles peuvent régler la dynamique de la structure et des fonctions du sol et la disponibilité des macronutriments et des micronutriments des plantes (**Prasad et al. 2015**).

PGPR est un groupe de bactéries capables de coloniser activement le système racinaire des plantes et d'améliorer leur croissance et leur rendement (**Wu et al., 2021**). Ils colonisent toutes les niches écologiques de la racine à tous les stades du développement des plantes, même en présence d'une microflore concurrente. Le PGPR représente environ 4 à 6% de la totalité des bactéries rhizosphérique (**Upadhyay et al. 2012**). Le terme PGPR a été proposé par **Kloepper et al., (1980)** et a été utilisé depuis longtemps, en particulier pour les *Pseudomonas fluorescents* impliqués dans le contrôle biologique des agents pathogènes et l'amélioration de la croissance des plantes. Selon leur degré d'association avec les cellules racinaire, les PGPR peuvent être classés en EPGPR (PGPR extracellulaires) et IPGPR (PGPR intracellulaires). Les genres les plus abondants sont : *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Serratia* (**Gray et Smith, 2005**).

Au cours des dernières années, l'utilisation d'inoculants biologiques pour la production végétale durable a attiré l'attention des chercheurs et des investisseurs dans ce domaine. Les PGPR sont essentielles non seulement pour la croissance et la productivité des plantes, mais également pour la santé et le bon fonctionnement des écosystèmes et de la planète. Elles améliorent la production des plantes par le biais de plusieurs mécanismes directs et indirects (**Upadhyay et al. 2012**).

En premier lieu, elles jouent le rôle d'un biofertilisant naturel, par **i**) la fixation d'azote (N) : le N<sub>2</sub> atmosphérique est converti en formes assimilable par la plante par les bactéries en utilisant un système enzymatique complexe appelé nitrogénase (**Munees et Mulugeta, 2013**). **ii**) la solubilisation du phosphate (P) : ce dernier est le deuxième nutriment important et limitant la croissance des plantes après l'azote, il est largement disponible dans le sol sous deux forme organique et inorganique (**khan et al., 2009**). Mais, les plantes sont incapables d'utiliser le phosphate car 95 à 99% de phosphate présents sous la forme insoluble, immobilisée et précipitée. La solubilisation du phosphate par PGPR joue un rôle important dans la conversion du P insoluble en P soluble et assimilable par les racines des plantes (**Salma, 2015**). **iii**) Solubilisation du potassium qui est le troisième nutriment essentiel des plantes et joue un rôle major dans l'activation des enzymes, la synthèse des protéines et la photosynthèse. La concentration de potassium soluble est généralement très faible dans le sol. La capacité de

## INTRODUCTION GENERAL

---

quelques PGPR à solubiliser cet élément et le rendre disponible pourrait fournir une technologie alternative. Et enfin iv) par production de sidérophores : pour surmonter les difficultés et les carences en fer dans le sol, les PGPR a développé diverses stratégies d'absorption du fer pour survivre et s'adapter à son environnement. L'une de ces stratégies est la production de sidérophores. Les sidérophores sont de petites molécules organiques produites par les micro-organismes dans des conditions limitantes en fer qui améliorent la capacité d'absorption du fer (**Gray et Smith, 2005**).

Par ailleurs, les PGPR peuvent être joués un rôle de phytostimulateurs. La production de ces phytostimulateurs peut être également induite par certaines bactéries, comme les PGPR. Elles sont capables de produire une large gamme de phytohormones comme l'acide indole acétique, les cytokinines, les gibbérellines et les inhibiteurs de la production d'éthylène. Les phytostimulateurs, de types IAA synthétisés par les PGPR affectent la division cellulaire, l'initiation des racines, le taux de croissance, le phototropisme, et la dominance apicale (**Kumari et al. 2018**).

En outre, Les PGPR peuvent être considérés comme biopesticides. Les micro-organismes phytopathogènes constituent une menace majeure pour l'agriculture durable. L'utilisation régulière de pesticides et de fongicides chimiques a suscité des préoccupations environnementales et même provoqué une résistance aux agents pathogènes, forçant le développement constant de nouveaux agents (**Fernando et al., 2005**). Les PGPR avec leurs traits de biocontrôle peuvent être considérés comme une alternative à l'intensification des pesticides sur les cultures pour dissuader les agents pathogènes et réduire la gravité de la maladie. Un grand nombre de mécanismes utilisés par les PGPR dans le biocontrôle tels que la production d'antibiotiques, de sidérophores, de HCN, d'enzymes hydrolytiques (chitinases, protéases, lipases, etc.) (**Lugtenberg et Kamilova 2009**).

Bien que l'utilisation de PGPR puisse améliorer la production végétale, par ces différents mécanismes, leurs applications dans le monde réel sont toujours limitées par des méthodes peu efficaces. Les analyses et les collections récentes de plusieurs bactéries rhizosphériques ont facilité le développement de bioengrais et de communautés artificiellement construites et ont fourni des méthodes hautement efficaces pour trouver et appliquer les PGPR pour promouvoir la santé et la croissance des plantes (**Kaul et al., 2021**). Ces bioengrais sont effectués artificiellement, en utilisant les techniques d'encapsulation par les polysaccharides. Un bioengrais peut contenir une ou plusieurs souches sélectionnées dans des milieux bien définis (**Jishma et al. 2019**).

## INTRODUCTION GENERAL

---

En général, les engrais biologiques ou organiques sont un mélange soit de déchets ou des tissus d'origine animale, végétale ou de microorganisme. Par exemple, les engrais biologiques d'origine végétale sont les résidus de cultures provenant de l'exploitation agricole comme des feuilles, tiges, pailles ou des racines de préférence transformés en compost de bonne qualité (**Lugtenberg et Kamilova 2009**).

Cependant, un bioengrais bactérien est un produit liquide, ou sur support solide, contenant des microorganismes bénéfiques (PGPR). Ces bioengrais sont obtenus par des procédés chimiques tels que l'encapsulation. L'encapsulation de PGPR vivant dans un polymère approprié est une approche émergente pour augmenter ses performances dans le domaine agricole. Ici, les cellules microbiennes vivantes sont immobilisées dans une matrice polymère sans perdre leur viabilité et leurs propriétés (**Upadhyay et al. 2012**). Les formulations de PGPR peuvent avoir un meilleur fonctionnement dans diverses conditions agricoles et environnementales en raison de sa protection physique contre les conditions environnementales stressantes. Parmi les matériaux utilisés pour l'encapsulation du PGPR, l'alginate de sodium qui est le matériau le plus préféré car il forme des billes instantanément en présence de cations polyvalents. L'alginate de sodium est également un matériau biodégradable qui n'est pas toxique pour l'environnement. Cela a également été décrit comme ayant la capacité de libérer progressivement les rhizobactéries piégées dans le sol (**Fernando et al., 2005**).

Ainsi, le présent travail s'inscrit dans le but de valoriser, par des méthodes biotechnologiques, les ressources bactériennes dans l'agriculture.

Pour ce faire, on a :

- ✓ Isoler des nouvelles souches PGPR à partir de la rhizosphère d'asphodèle ;
- ✓ Caractériser morphologiquement et biochimiquement les isolats ;
- ✓ Formuler des bioengrais à base de ces PGPR e, utilisant la technique d'encapsulation ;
- ✓ Evaluer le potentiel des bioengrais sur la germination des graines de *Zea mays*

Pour répondre à ces objectifs, le présent travail s'articule autour de trois parties.

La première partie aborde une introduction générale sur les PGPR et les bioengrais.

La deuxième, décrit le matériel et les méthodes utilisés durant notre travail.

Et, la troisième décrit tous les résultats obtenus et les discute en les comparants avec d'autres travaux dans cet axe de recherche.

Une conclusion générale est donnée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus et quelques perspectives ont été suggérées.



# *Chapitre I*

## *Matériel et méthodes*

Notre expérimentation s'est déroulée aux laboratoires d'analyse du sol et de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun-Tiaret.

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel utilisés aux laboratoires

Le matériel et l'appareillage utilisé aux laboratoires lors la réalisation de notre travail expérimentale sont illustrés dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Matériel utilisés aux laboratoires

<b>Appareillage</b>	Microscope, pH mètre, Réfrigérateur, Spectrophotomètre, Vortex, Balance, Agitateur magnétique, Autoclave, Bain marie, Etuve, Bec bunsen, Chambre de culture et Agitateur soucoueur.
<b>Verrerie</b>	Erlenmeyers, Verre de montre, Tubes à essai, Pipettes graduées, Micropipette, Eprouvette graduée, Pissette, Pince, Mortier, Compte-gouttes, Spatule, Pipettes Pasteur, Lames et lamelles, Boîtes de pétries, Flacons, Entonnoirs, Barreau magnétique et Bêchers
<b>Produits chimiques</b>	Eau distillé, Alcool, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Réactif Kovac, Eau de Javel, Folin-Ciocalteu, Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ), Chlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> ), Amidon, Alginate de sodium...
<b>Milieus de cultures</b>	King B, Milieu Ashby sans azote, Tryptone sel (bouillon), Milieu spécifique pour la solubilisation de zinc
<b>Colorants</b>	Lugol, Cristal violet et Safranine

### 1.2. Matériel bactériens

Des échantillons de sol ont été prélevés dans la rhizosphère d'asphodèle dans la wilaya d'Ain Defla durant le mois de février 2021.

#### 1.2.1. Isolement et purification des PGPR

L'isolement des bactéries a été effectué selon la méthode décrite par kushwaha et al. (2013), 1g du sol rhizosphérique a été mis dans des tubes à essai stériles qui contiennent 09 ml d'eau distillée stérile et ensuite ont été mis sous agitation rotative à 150 tpm (Tours par minute) pendant 20 minute. Par la suite, une série de dilutions jusqu'à 10<sup>-6</sup> a été réalisée (**Fig. 1**).



**Figure 1** : Différentes étapes d'isolement des PGPR

### 1.2.2. Ensemencement et incubation

Le milieu de culture qui a été utilisé pour permettre la croissance des isolats dans les différents tests décrit dans cette étude est le King B. C'est un milieu spécifique pour les bactéries rhizosphérique (**Fig. 1**)

Des boîtes de pétri contenant le milieu de culture King B (**nnexe 01**) ont été ensemencés avec 01 ml de chaque dilution puis incubés dans l'étuve pendant 72 heures à une température de 28 °C.

### 1.2.3. Sélection des colonies bactériennes

Les colonies bactériennes ayant la même morphologie ont été observées sur les boîtes de pétri, après 72h de culture. Cinq colonies bien isolées ont été sélectionné (**Fig. 1**), prélevées et ré-striées sur un milieu King B frais puis ont été incubés de manière similaire que précédemment. Les cinq souches sélectionnées ont été codées pour faciliter leurs utilisations plutard. Ensuite elles ont subi une série de multiplication (03 fois), afin d'assurer leurs puretés.

### 1.2.4. Identification et caractérisation des PGPR

Après l'isolement on a nommé les cinq souches isolées A, B, C, D, E et ensuite des examens macroscopique, microscopique et biochimique ont été effectués dans le but d'identifier ces dernières.

### 1.2.4.1. Caractéristiques culturelles

Après 03 jours d'incubation des bactéries, les cinq isolats on présentés des différentes caractéristiques des colonies telles que la forme des colonies (rondes, irrégulière...) la chromogène (couleur de la colonie), la surface des colonies (lisse, rugueuse, séché ou dentelée). Ces variations ont été observées à l'aide d'un microscope optique.

### 1.2.4.2. Caractérisation morphologique

Afin de caractériser le Gram et la morphologie des bactéries utilisées. On a réalisé une coloration de Gram qui est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Dennis, 2007**).

En effet, les colonies de chaque bactéries sont prélevées à partir des boîtes de pétri, ensuite sont mises sur une lame stérile contenant de l'eau stérile et séchées sur le feu de Bec benzène. Les frottis sont ensuite mis au contact du violet de gentiane pendant 2 min puis soumises à l'action du lugol 30 S, il se forme un complexe colorants qui coloré en violet toute la couche en peptidoglycane de la membrane des bactéries. Ces bactéries colorées sont mises à l'action de décoration en utilisant l'alcool qui est rajouté goutte à goutte jusqu'à obtention des gouttes claires, seules celles à Gram négatif (présence membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après lavage avec l'eau et coloration par la fuchsine 2min. Les bactéries à Gram positif possédant une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violette mémé après l'ajout de fuchsine. L'observation microscopique des échantillons a été faite au microscope optique à faible grossissement (mis en point) et au grossissement 100 (objectif à immersion), qui nécessite l'ajout d'une goutte d'huile d'immersion sur la lame de frottis préparé (**Fig. 2**).



**Figure 2** : Coloration de gram des isolats



### 1.2.4.3 Caractéristique biochimique

- **Fixation d'azote**

Afin de sélectionner les bactéries fixatrices d'azote, un test a été réalisé selon la méthode décrite par **Rodoge et al. (2016)**, les isolats ont été striés sur le milieu gélosé Ashby stérile, sans mannitol (ne contient aucun Source d'azote), (annexe 02), et incubés dans l'étuve à 25°C pendant 48 heures. La croissance des bactéries sur ce milieu de culture indiquent leurs capacités de fixer l'azote atmosphérique (**Fig. 3**).



**Figure 3 : Milieu Ashby original et test de fixation d'azote**

- **Test catalase**

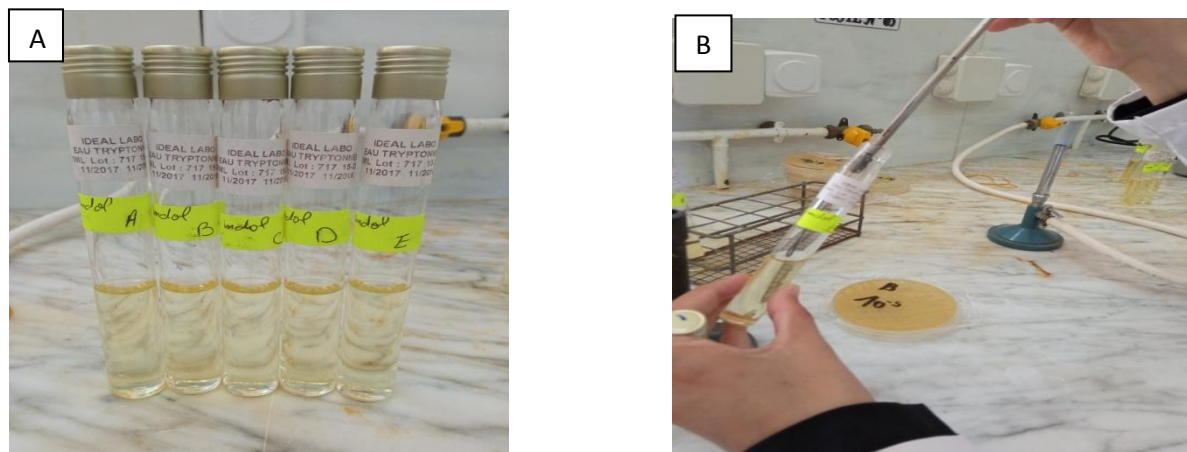
Les isolats bactériens ont été examinés pour leur activité catalase selon la méthode de (**Lévy et al. 1992**). Des cultures bactériennes fraîches ont été transférées sur une lame en verre, puis une quantité appropriée de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à 3% a été ajoutée sur les lames. La formation de bulles d'aires en 10 secondes confirme que la souche à une activité catalase (**Fig. 4**)



**Figure 4 : Réalisation du test de catalase.**

- **Test d indole**

Les isolats ont été inoculés dans des tubes contenant un bouillon tryptone. Ensuite, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 48h. Après incubation, quelques gouttes de réactif Kovac ont été ajoutées aux tubes. L'apparition d'un anneau rouge crise dans la couche supérieure indique que le test est positif, alors que, son absence indique que le test négatif (**Fig. 5**).



**Figure 5** : Préparation pour la réalisation d'un test de production d'indole

- **Solubilisation de Zinc**

Ce teste a été réalisée selon la méthode décrite par **Goteti et al, (2013)**, les isolats ont été striés sur le milieu gélosé stérile contenant l'oxyde de zinc (Zno) insoluble comme seule source de Zinc (Annexe 3), puis ils ont été incubés à 30 °C pendant 72h. La formation d'une zone claire autour des colonies bactériennes indique la solubilisation du Zinc par ces bactéries.

### 1.3. Préparation des isolats pour l'encapsulation

Les bactéries A. B. C. D et E ont été cultivées dans un milieu King B liquide dans des flacons de 250 ml contient 50 ml de King B liquide et incubés sous agitation à 120 tpm, pendant 24h à 28 °C. Après 24h d'incubation on a mesurées la densité bactérienne (lecture à la spectrophotométrie à 630 mn de longueur d'onde) (**Fig. 6**).



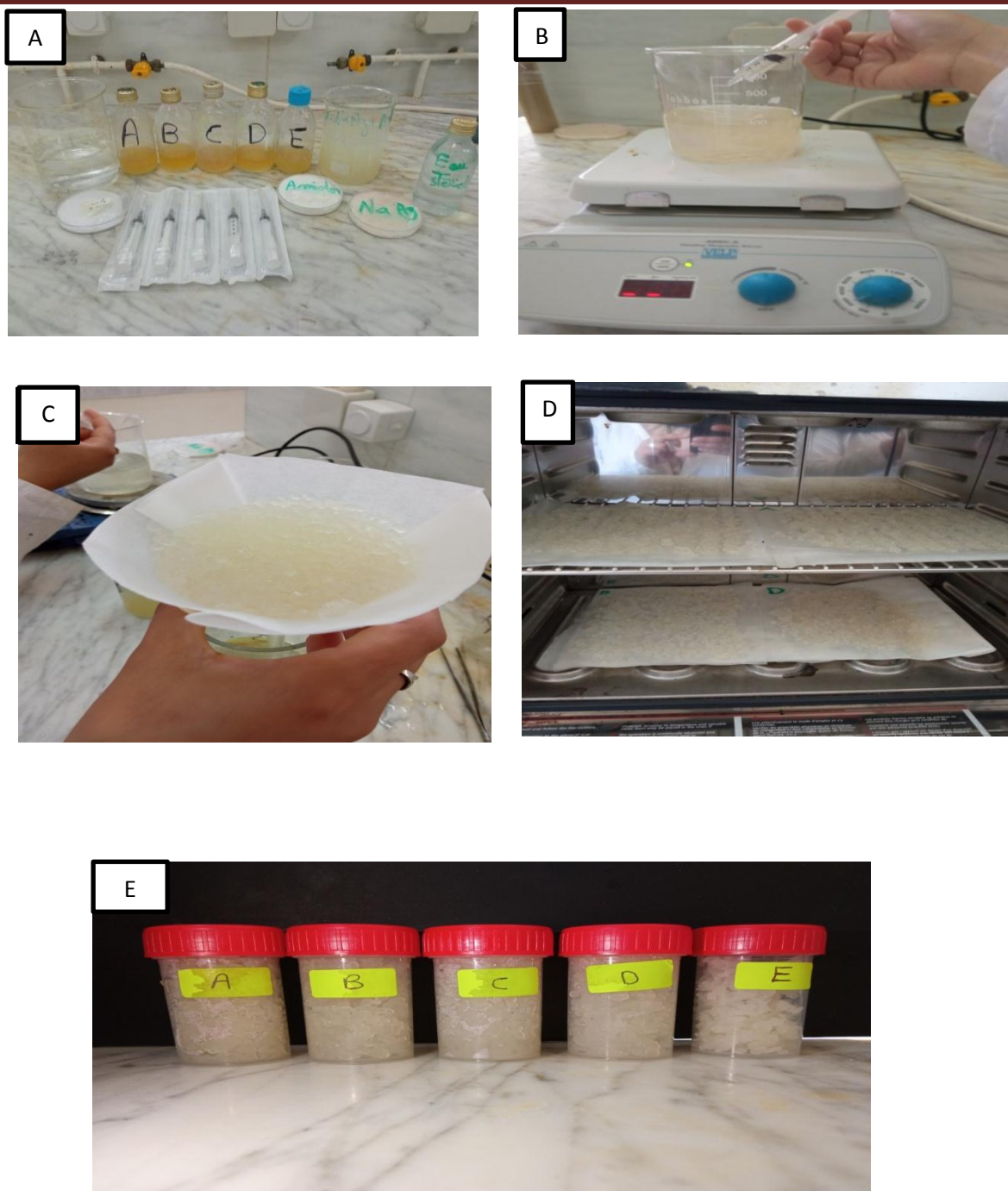
**Figure 6** : Préparation de l'inoculum bactérien pour l'encapsulation : (A) Mélanges des colonies dans le bouillon du King B liquide ; (B) Agitation du mélange pendant 24h.

#### 1.4. Encapsulation des isolats et formulation des bioengrais

L'encapsulation des isolats (A, B, C, D et E) après 24h d'incubation avec les composites de l'alginate de sodium (NaAlg), et d'amidon, a été réalisé en suivant le protocole proposé par **Wen et al., (2016)**. Les solutions ont été préparées en utilisant des teneurs en NaAlg à 1,5%, et en amidon à 3%, par la suite ont été mélangées de manière homogène avec les bouillons de chaque souche PGPR dans un rapport de 2:1 respectivement (**Fig. 7**). Les mélanges contenant les cellules de cinq souches ont été ajoutées goutte à goutte avec une aiguille d'injection (taille de l'aiguille 0.7 mm) dans la solution de réticulation de  $\text{CaCl}_2$  à 2% (150ml pour chaque souche) (**Fig. 7**).

Après la réaction de formation de billes, les microcapsules obtenues ont été nettoyées par l'eau stérile trois fois (**Fig. 7**). Ensuite, toutes les microcapsules ont été collectées et séchées dans l'étuve à 40 °C. Après le séchage les bioengrais ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C pendant 10 jours pour effectuer le test de germination.





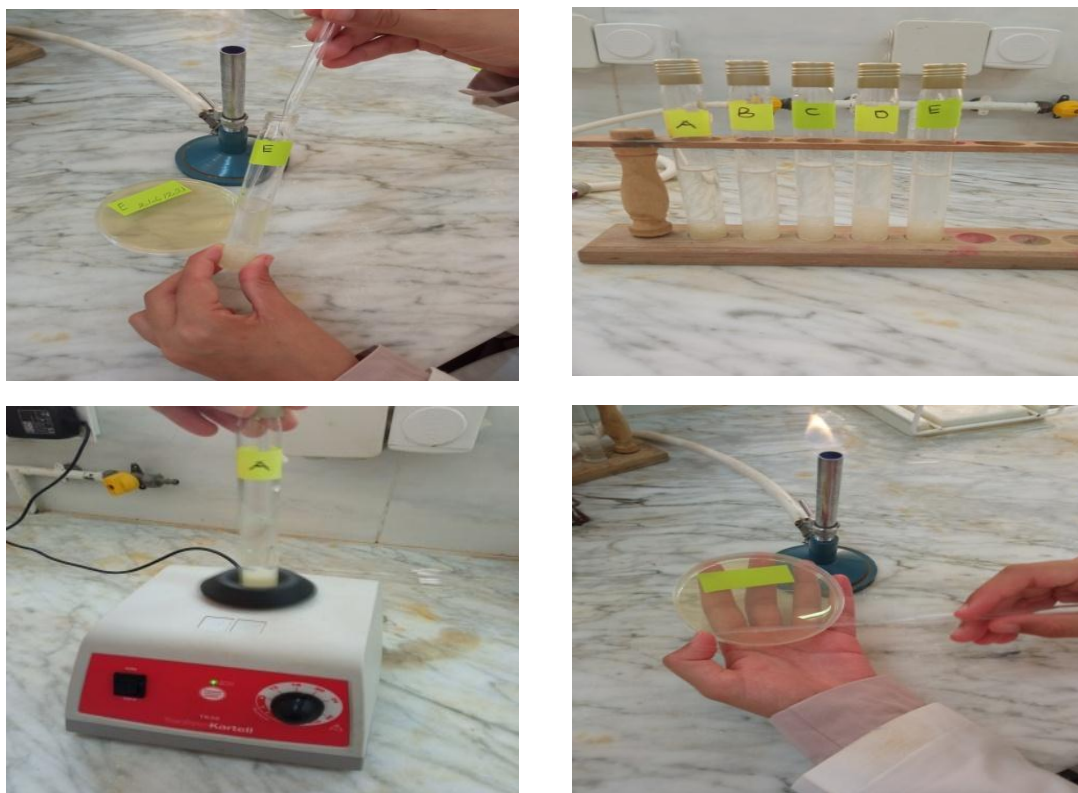
**Figure 7 :** Préparation des microcapsules : **(A)** Préparation des solutions d’alginate et d’amidon ; **(B)** Ajout de mélange avec une aiguille d’injection ; **(C)** Nettoyage des microcapsules par l’eau distillée stérile ; **(D)** Séchage des microcapsules dans l’étuve ; **(E)** Stockage des microcapsules séchées dans des pots stérile.

### 1.5. Vérification de la viabilité de la souche et des bioengrais :

Après un stockage de 10 jours. Un test de vérification de viabilité des souches à l’intérieure des capsules a été réalisé.



Les microcapsules ont été met dans un tube à essai avec 10 ml d'eau distillée pour chaque échantillon, et le mélange a été agité pendant quelques minutes à l'aide d'un Vortex. Une quantité de la solution a été prélevé à l'aide d'une pipette pasteurs stérile puis chaque souche a été ensemencé dans deux boîtes pétri rempli par le milieu King B. Ces boites ont été laissées dans l'étuve pendant 24h à 28 °C. La croissance de la souche dans le milieu King B indique que la souche est encore vivante (**Fig. 8**).



**Figure 8** : Différents étapes de vérification de la viabilité des souches et de bioengrais.

### 1.6. Matériel végétale

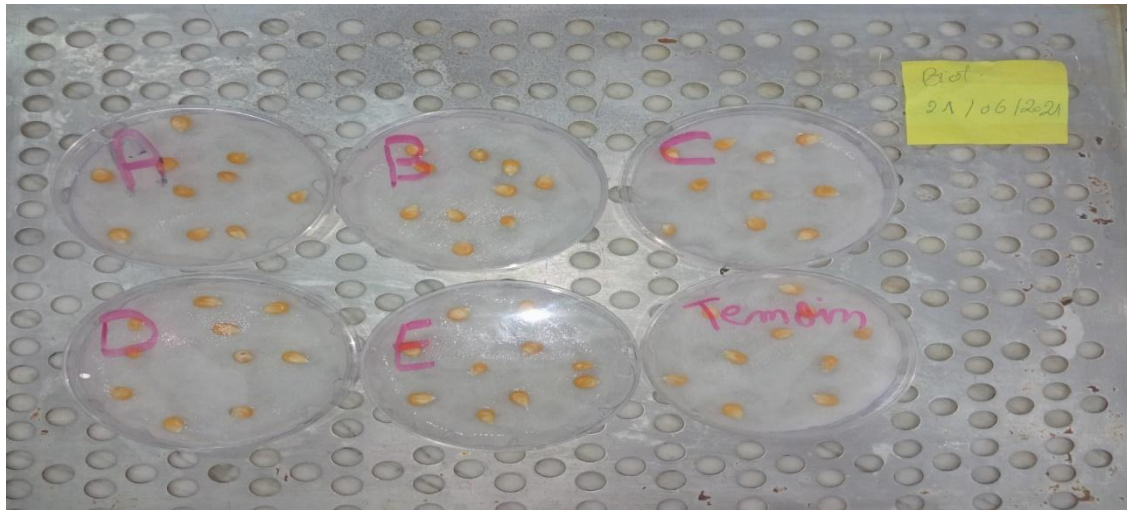
Ce test a été réalisé en utilisant le maïs (*Zea mays*), sur une population achetée du marché à Tiaret.

#### 1.6.1. Germination des graines et application des bioengrais

Les graines de maïs ont été désinfectées puis mises en germination selon les étapes suivantes : (**Schwachtje et al. 2011**).

- 1- Mises des graines de maïs dans de l'eau de javel pendant 2 min ;
- 2- Rinçage par l'eau distillée, plusieurs fois ;
- 3- Mettre des graines dans des boîtes de pétri couvert par un papier filtre imbibé ;

- 4- Enfin, les boîtes Pétri sont mises dans des conditions ambiantes pour la germination (**Fig. 9**).



**Figure 9 :** Mise en germination des graines du maïs dans des boîtes de pétri (graines du maïs sur un papier filtre imbibé)

Après deux jours de germination à l'étuve, les graines ont été mis dans un papier filtre qui a été enroulé par la suite et disposés verticalement dans 06 gobelets contenant de l'eau distillée au début. Dans le 3<sup>ème</sup> jour, les bioengrais à base de PGPR (A, B, C, D et E) ont été appliqué (20 g de bioengrais dans chaque gobelet). Le 6<sup>ème</sup> gobelet ne contient que l'eau distillé et a été considéré comme témoin (**Fig. 10**). L'application des bioengrais a été répétée pour une deuxième fois après 6 jours de culture.



**Figure 10 :** Mise en germination des graines de maïs dans des papiers filtre après application des bioengrais.

Les gobelets ont été mis en incubation dans la chambre de culture réglée à 28 °C avec un photopériodisme de 16h lumière/8h obscurité, jusqu'à l'apparition des premiers feuilles (10 jours après la mise en culture).

### **1.6.1.1. Paramètres mesurés**

10 jours après l'application des bioengrais des mesures de paramètre de croissance ont été effectués pour évaluer l'effet des bioengrais à courte terme.

#### **1.6.1.1.1. Longueur des tiges et de la racine principale**

Tout la partie qui s'étale du point d'initiation de la racine dans la graine jusqu'à la coiffe et toute la partie qui s'étale du point d'initiation de la tige dans grain jusqu'à le sommet de la plantule ont été mesurées.

# *Chapitre II*

## *Résultats et Discussions*

Les PGPR favorisant la croissance des plantes auxquelles elles sont associées. Elles représentent environ 5% des rhizobactéries et appartiennent à différents groupes taxonomique *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*... (Kishore et al., 2006).

## 1. Caractérisation et identification des PGPR

L'identification des souches isolées a porté sur l'étude de leurs caractères phénotypiques, culturels et biochimiques. Dans notre étude, cinq isolat ont été obtenus. Ces souches ont été nommées A, B, C, D et E.

### 1.1. Identification phénotypique des souches bactériennes

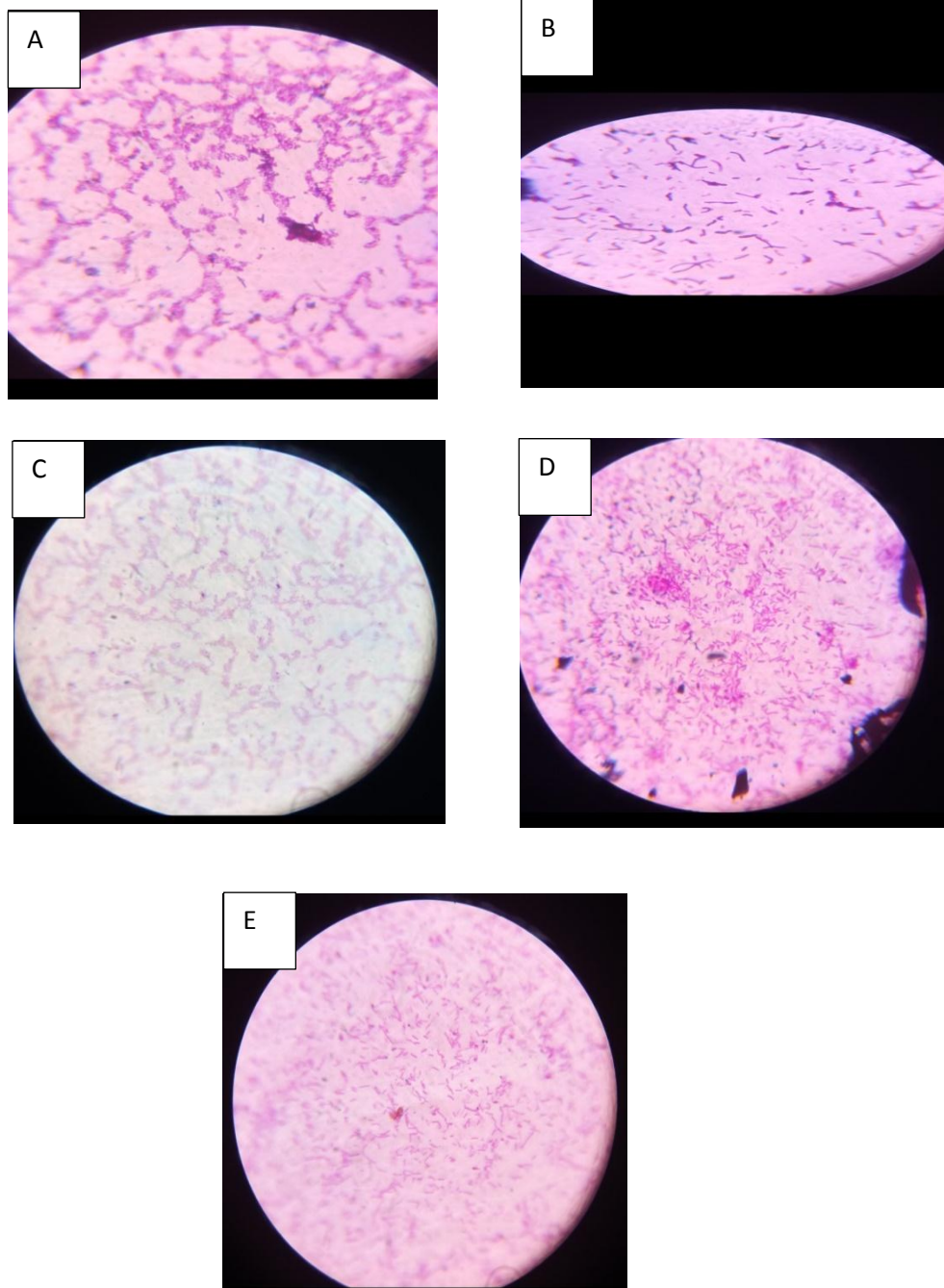
L'observation microscopique permet de déterminer la morphologie des cellules d'une espèce bactérienne. Le tableau 2 présente toutes les caractéristiques morphologiques de nos souches bactériennes A, B, C, D et E.

**Tableau 02 :** Caractéristiques culturales et phénotypiques des PGPR isolées.

Isolats	Marge	Odeur	Couleur	Forme	Réaction de gram
<b>A</b>	Lisse	+	Jaune clair	Coccobacille	-
<b>B</b>	Lisse	+	Jaune	Bacille	+
<b>C</b>	Lisse	+	Jaune clair	Coque	-
<b>D</b>	Lisse	+	Jaune	Bacille	-
<b>E</b>	Lisse	+	Crème	Bacille	-

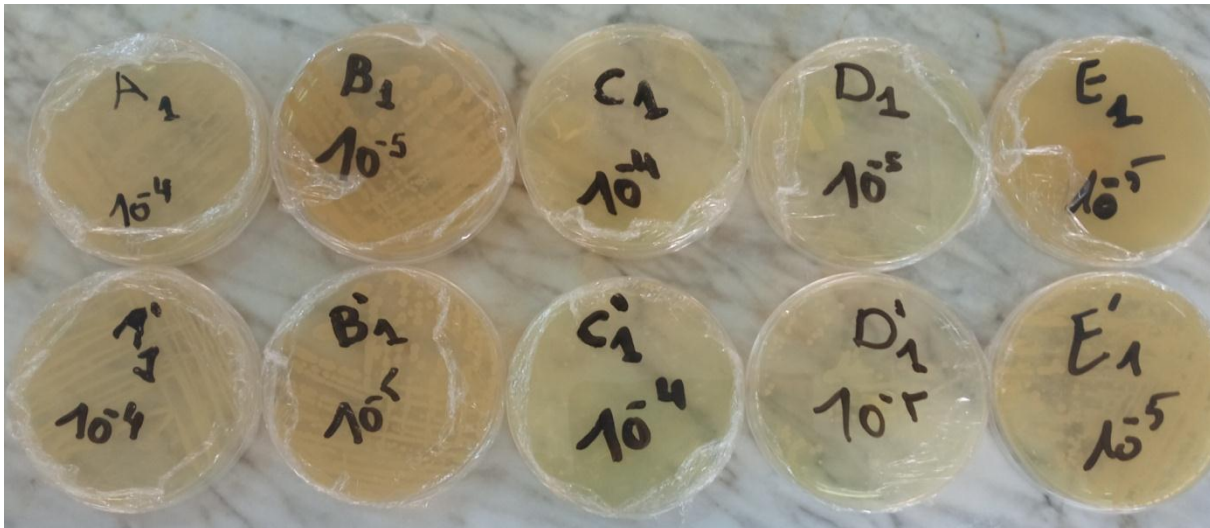
Selon le tableau 2, tous les isolats ont présenté des colonies avec des surfaces lisses avec odeur spécifique. L'observation par le microscope optique (grossissement 100) a permis de distinguer les formes, les marges et les couleurs des isolats. Les résultats obtenus ont montré que la souche A présente une forme coccobacille, et la souche C une forme coque, tandis que les trois souches qui restent (B, D et E) ont une forme bacille.

Après la coloration de gram (**Fig. 11**), les quatre isolats A, C, D et E ont donné une coloration rose, elles ont donc une réaction de Gram négative (Gram -). Cependant, la souche B a été montrée une coloration violette, c'est une souche de Gram positive (Gram +). Par ailleurs, l'ensemencement des souches sur le milieu King B solide a montré que la majorité ont une couleur jaune (les souches B et D) ou jaune clair (les souches A et C). Alors que, la souche E a une couleur crème (**Fig. 11**).



**Figure 11** : Observation microscopique des bactéries isolées sous microscopique optique (G X 100) : (1) souche A, (2) souche B, (3) souche C, (4) souche D, et (5) souche E.



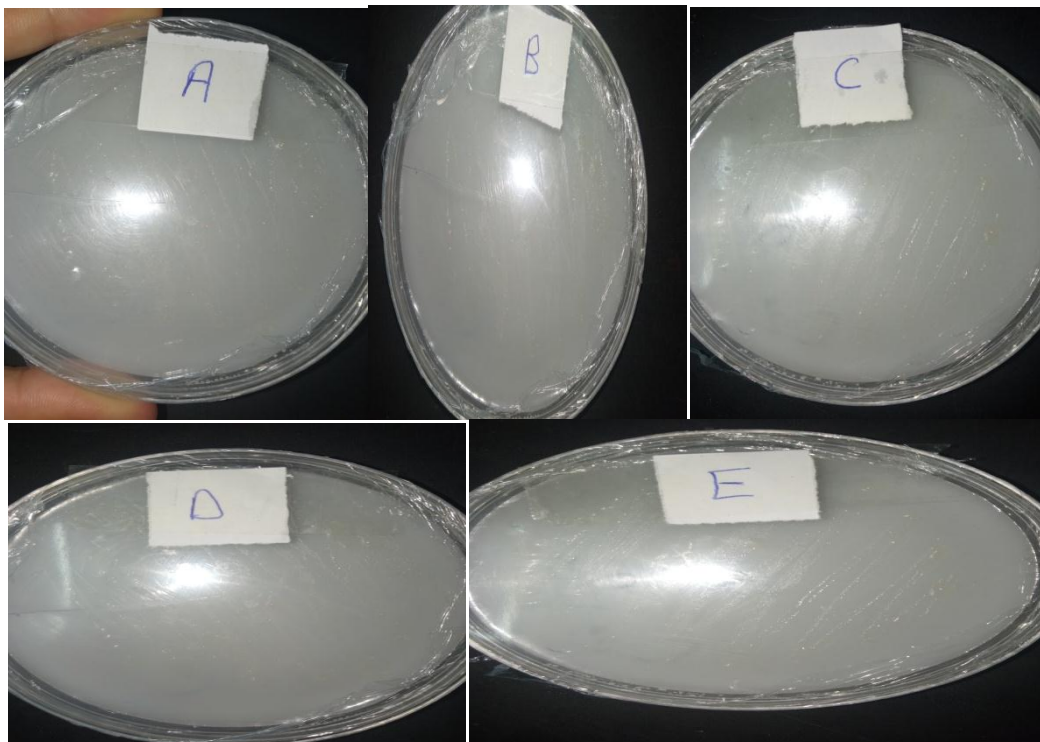


**Figure 12 :** Aspect morphologique des rhizobactéries sur le milieu King B après 72h d'incubation.

## 1.2. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

### 1.2.1. Fixation de l'azote

La capacité de fixation de l'azote a été évaluée par l'étude de la croissance de cinq souches PGPR sur un milieu de culture "Ashby" sans azote. Nos résultats ont montré que trois souches isolées (B, D et E) ont une capacité fixatrice de l'azote atmosphérique (**Fig. 13**).



**Figure 13 :** Croissance des souches isolées sur le milieu de culture Ashby

### 1.2.2. Test de catalase

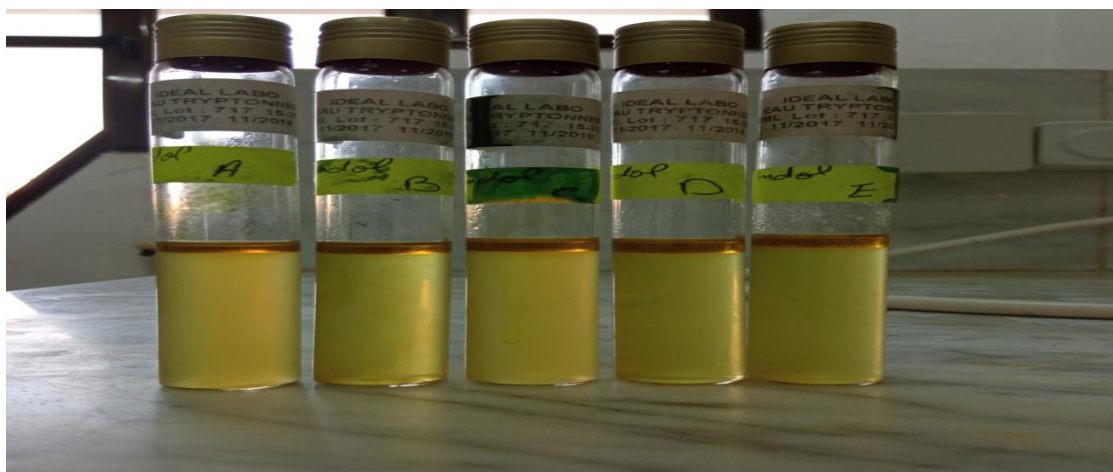
Pour caractériser une bactérie, il est préférable de connaître son type respiratoire. Après l'ajout de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), toutes nos souches ont réagi positivement par la production des bulles d'air (**Fig. 14**).



**Figure 14** : Test de catalase des PGPR

### 1.2.3. Test d'indole

Le test d'indole des souches isolées a montré la formation des anneaux rouge-cerise dans la couche supérieure des solutions bactériennes, ce qui indique que le test est positif pour les cinq isolats (**Fig. 15**).



**Figure 15** : Réaction positive du test d'indole



### 1.2.4. Solubilisation du zinc

La solubilisation de zinc sur le milieu de culture "gélosé stérile» révélée par l'apparition d'un anneau claire autour de colonies. Nos résultats ont montré que seule la souche B est capable de solubiliser cet élément. Les autres isolats ont montré un résultat négatif.

Les résultats de caractérisation biochimique des cinq souches isolées sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3** : Caractérisation biochimique de nos isolat PGPR.

Souches isolées	Fixation de l'azote	Test de catalase	Test indole	solubilisation de zinc
A	-	+	+	-
B	+	+	+	+
C	-	+	+	-
D	+	+	+	-
E	+	+	+	-

## 2. Encapsulation et formulation des bioengrais

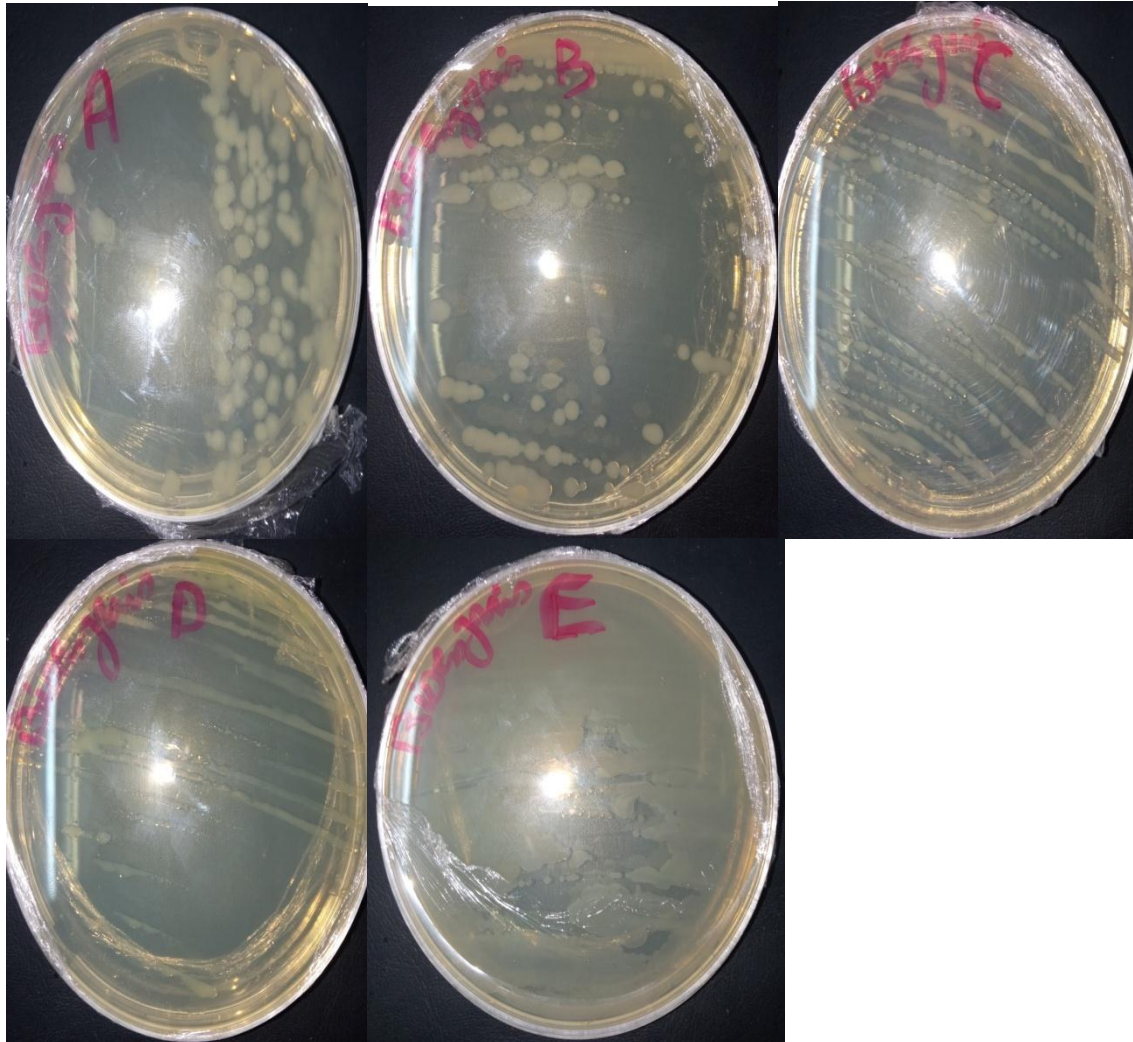
La microencapsulation est considérée comme une méthode efficace et pratique pour la conservation et l'application des microorganismes (*szczzech et maciorowski, 2016*). Dans notre étude, le produit obtenu ayant une couleur blanche, sont lisses et solides, ce qui a permet leur conservation pendant 10 jours (**Fig. 16**).



**Figure 16** : Bioengrais à base de nos isolats

### 3. Vérification de la viabilité

Après 10 jours de stockage des microcapsules à 4 °C. Un test de viabilité a été réalisé. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches ont été apparait sur le milieu King B solide ce qui montre leur viabilité après ce stockage (**Fig. 17**).



**Figure 17** : Test de viabilité et croissance des souches sur le milieu King B.

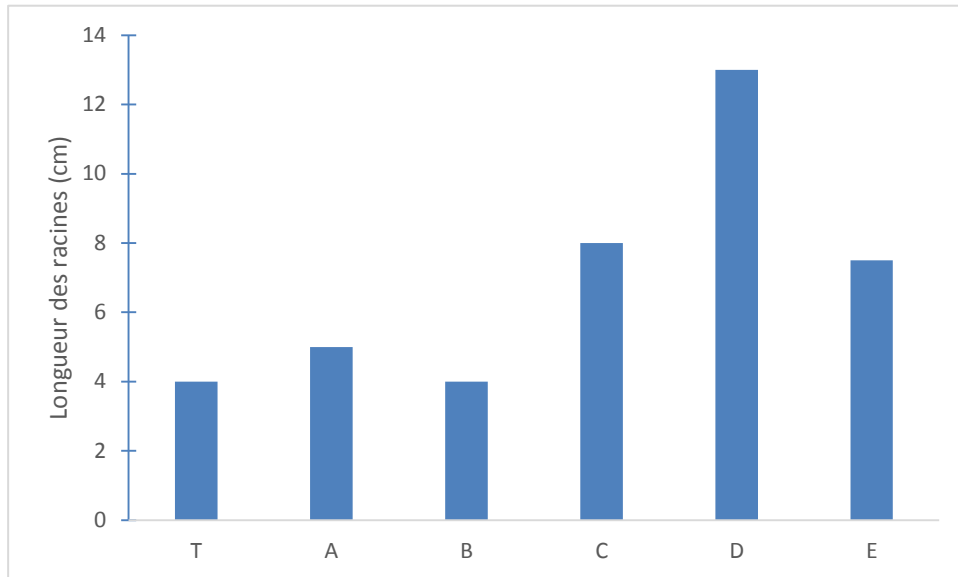
### 4. Effet des bioengrais sur la germination et croissance des graines de maïs

Pour vérifier et confirmer l'effet des bioengrais sur les plantes après une courte durée de stockage. Les 5 bioengrais ont été appliqués et évalués pour leur effet sur la germination et la croissance de graine de maïs.

#### Longueur moyenne des racines

Les bioengrais de PGPR ont augmenté de manière significative la croissance en longueur des racines maïs par rapport au témoin.

Après dix jours d'application des engrais, les valeurs les plus élevées ont été obtenues chez les racines des plantes après application du bioengrais de la souche D, où la longueur moyenne des racines est de 13 cm. Suivi par les racines des bioengrais C et E avec des longueurs de 8 et 7,5 cm respectivement. Cependant la longueur des racines du témoin est de 4 cm (**Fig.18**).

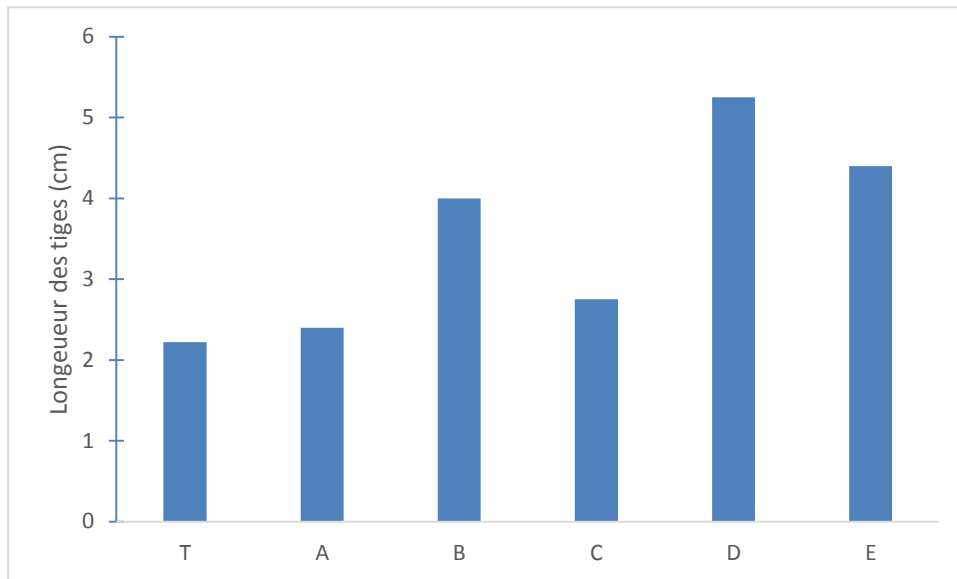


**Figure 18** : Longueur des racines des plantes de maïs après application des bioengrais à base des PGPR.

### Longueur moyenne des tiges

Les bioengrais de PGPR affectent de manière peu significative la croissance des tiges des de la plante par rapport au témoin.

A la fin de la culture, la valeur la plus élevée a été obtenue au niveau des tiges des plantes traitées par l'engrais de la souche D avec 5,25 cm, suivi par les engrais des souches E et B avec 4,4 cm et 4 cm respectivement. Alors que les autres bioengrais ont montré un effet similaire au témoin avec 2,57 cm, 2,4 cm et 2,2 cm pour les souches C et A et le témoin respectivement (**Fig. 19**).



**Figure 19** : Longueur des tiges des plantes de maïs après application des bioengrais à base des PGPR

## 5. Discussion

La rhizosphère est un environnement écologique remarquable, colonisé par de nombreux microorganismes. Ces bactéries jouent un rôle important dans l'amélioration de la croissance des plantes et la de la fertilité des sols (**Mohamed et al, 2019**).

Dans cette étude, cinq souches PGPR ont été isolées à partir de la rhizosphère d'asphodèle dans la région de Zaccar et ont été évalué par la suite pour leurs traits PGPR et enfin ont été utilisé dans la formulation des bioengrais qui ont été testé sur la germination du maïs.

Par ailleurs, l'azote (N) et le phosphore (P) sont les deux principaux éléments de la nutrition des plantes. L'azote est l'un des facteurs les plus importants affectant la croissance des cultures et détermine la qualité et la quantité des rendements (**Amâncio et Stulen 2004**). De plus, certains PGPR facilitent la croissance et le développement des plantes en fixant l'azote atmosphérique (**Figueiredo et al., 2008**). Dans notre étude, la majorité des isolats ont été indiqués un test positif pour la fixation d'azote. Plusieurs auteurs ont supposé que la majorité des bactéries rhizosphérique ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique, ce qui augmente le rendement des cultures (**Rodge et al., 2016**). La fixation de l'azote par les bactéries pour les légumineuses est bien connue et étudiée (**Esitken et al., 2006**). En outre, l'AIA est l'auxine (phytohormone) la plus importante produite par les plantes et de nombreuses bactéries rhizosphérique. Dans cette étude, les cinq isolats A, B, C, D et E sont capables de produire d'AIA sauf. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par **Kushwaha et al. (2013)**, qui ont découvert que l'isolat AK3 est un bon producteur d'AIA. En revanche, les isolats AK2 et AK4 ont montré une faible production d'AIA.

Le plus souvent, on pense que les PGPR producteurs d'AIA augmentent la croissance et la longueur des racines, ce qui entraîne une plus grande surface racinaire qui permet à la plante d'accéder à plus de nutriments du sol (**Reddy 2014**). Nos résultats ont révélé que tous les isolats sont positifs pour le test de catalase. L'activité catalase dans les souches bactériennes pourrait être bénéfique pour la plante, mais cette exposition d'activité devrait être associée à une bactérie très résistante aux stress environnementaux, mécaniques et chimiques (**Singh et al, 2016**).

De petites macrobilles, contenant des PGPR, insolubles sphériques et de couleur blanche se sont formées lorsqu'une solution d'alginate de sodium avec une solution PGPR ont été introduite goutte à goutte dans la solution de chlorure de calcium. La taille des billes d'alginate peut avoir un effet déterminant sur la libération et l'efficacité de bactéries (**Reddy 2014**). L'encapsulation des rhizobactéries peut constituer une stratégie efficace pour améliorer la survie cellulaire des microbes pendant le stockage et les cellules encapsulées pourraient être libérées dans le milieu cible de manière lente et contrôlable ce qui augmenterait l'efficacité à long terme (**He et al. 2016**).

Dans notre étude, l'évaluation de l'effet de ces bioengrais sur la croissance des graines de maïs. Chez La plupart des traitements, les longueurs de tiges et de racines qui ont été obtenues sont supérieures à celles obtenues chez le témoin sans bioengrais. Ces résultats rejoignent ceux de **RoyChowdhury et al. (2016)**, qui ont trouvé que des formulations à base de PGPR ont été appliquées et elles ont montré une croissance améliorée des plantules d'épinards en ce qui concerne la longueur des racines (cm), la longueur des pousses (cm) et la teneur en chlorophylle (mg/g de tissu) par rapport au témoin. La plupart des travaux de recherche ont révélé que la biofertilisation a permis d'améliorer considérablement la productivité et le rendement des plantes. **Naserirad et al. (2011)** ont indiqué que l'inoculation avec des biofertilisants contenant *Azotobacter* et *Azospirillum* augmentait la hauteur de la plante, le nombre de feuilles, le poids moyen des fruits et le rendement par rapport au témoin qui est similaire à notre travail mais avec un biofertilisant microbien différent. De même, **Chauhan et al. (1995)** ont constaté que l'application de bioengrais à base d'*Azospirillum* a augmentait considérablement le nombre de gousses et le rendement en graines de *Brassica napus* L.

# *Conclusion*

Cette étude renferme trois volets : l'isolement et la caractérisation des nouvelles PGPR, formulation des bioengrais à base de ces PGPR et évaluation du potentiel des bioengrais à améliorer la croissance des plantes de maïs.

Dans la première partie : cinq souches appelées A, B, C, D, E, ont été isolées à partir de la rhizosphère et qui ont été identifiées morphologiquement et biochimiquement. La majorité de ces souches sont gram positif avec une couleur jaune. De même, ils ont enregistré des capacités de fixation d'azote, de production de phytohormones (indole), de solubilisation de zinc et une activité enzymatique intéressante (catalase).

Dans la deuxième partie : les cinq isolats ont été encapsulés avec l'alginate de sodium et l'amidon pour formuler des bioengrais utilisés à long terme. Des microcapsules blanches et rigides ont été obtenues. Ces microcapsules ont assuré la vitalité des souches PGPR pour 10 jours selon notre étude.

Et enfin ces bioengrais ont été testés et évalués sur les graines de maïs : L'apport des bioengrais à base de nos souches a influé significativement la croissance des racines et des tiges de maïs. Des augmentations importantes ont été obtenues pour les deux paramètres étudiés.

Au terme de ce travail, nous tenons à proposer quelques recommandations afin d'améliorer la formulation et l'application des bioengrais à base de PGPR, pour cela il serait intéressant d'utiliser :

- Des combinaisons de plusieurs souches/espèces PGPR pour augmenter l'efficacité des bioengrais ;
- Optimiser les doses et les concentrations en Alginate pour améliorer la durée de stockage des bioengrais ;
- Tester d'autres polymères naturels pour remplacer l'alginate au futur.

# *Références bibliographiques*



## Références bibliographiques

### **A:**

Amâncio, S., & Stulen, I. (Eds.). (2004). Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants. Kluwer Academic Publishers.

### **B:**

Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.

### **C:**

Chauhan, D. R., Paroda, S., Kataria, O. P., & Singh, K. P. (1995). Response of Indian mustard (*Brassica juncea*) to biofertilizers and nitrogen. *Indian Journal of Agronomy*, 40(1), 86-90.

### **D:**

Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M. C., & Poyart, C. (2007). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. Elsevier Masson.

### **E:**

Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, 110(4), 324-327.

### **F:**

FAO: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (2020).

Fernando, W. D., Nakkeeran, S., & Zhang, Y. (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In *PGPR: biocontrol and biofertilization* (pp. 67-109). Springer, Dordrecht.

### **G:**

Goteti, P. K., Emmanuel, L. D. A., Desai, S., & Shaik, M. H. A. (2013). Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.). *International journal of microbiology*, 2013.

Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil biology and biochemistry*, 37(3), 395-412.

### **H:**

He , Y., Wu, Te, B, -C., Wang,J., Guan, X., Zhang,J., 2016. Viabilité évaluation of alginate - encapsulated *Pseudomonas putida* Rs- 198 under simulated salt - stress condition and its effect on cotton Growth. *EUR.J. soul Biol.* 75, 135-141.https : // doi.org/10.1016/j.enjsobi.2016.05.002.http://www.fao.org/home/fr/

## Références bibliographiques

### J:

Jishma, P., Remakanthan, A., & Radhakrishnan, E. K. (2019). Engineering Rhizobacterial functions for the improvement of plant growth and disease resistance. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment* (pp. 451-469). Springer, Singapore.

### K:

Kaul, S., Choudhary, M., Gupta, S., & Dhar, M. K. (2021). Engineering Host Microbiome for Crop Improvement and Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1125.

Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J agric biol sci*, 1(1), 48-58.

Kishore, G. K., Pande, S., & Podile, A. R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18 inhibits the cell wall degrading enzymes of *Aspergillus niger* and activates defence-related enzymes of groundnut in control of collar rot disease. *Australasian Plant Pathology*, 35(2), 259-263.

Kloepper J.W, leong J, Teinteze M., M., Schroth M.N.(1980). Enhancing plant growth by siderophores produced by growth promoting rhizobacterias. *Nature* 286:885-886.

Kong, Z., Hart, M., & Liu, H. (2018). Paving the way from the lab to the field: using synthetic microbial consortia to produce high-quality crops. *Frontiers in plant science*, 9, 1467.

Kumari, P., Meena, M., Gupta, P., Dubey, M. K., Nath, G., & Upadhyay, R. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria and their biopriming for growth promotion in mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 163-171.

Kushwaha, A., Baily, S. B., Maxton, A., & Ram, G. D. (2013). Isolation and characterization of PGPR associated with cauliflower roots and its effect on plant growth. *The Bioscan*, 8(1), 95-99.

### L:

Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., & Hochman, A. (1992). Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and molecular plant pathology*, 40(3), 163-171.

Lévy, E., Eyal, Z., Chet, I., & Hochman, A. (1992). Résistance mécanismes or septoria to antifungal produs of pseudomonas. *Phsiol.MOL. Plant pathol* 40(3) 163-71

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.

## Références bibliographiques

### M:

Mohamed, I., Eid, K. E., Abbas, M. H., Salem, A. A., Ahmed, N., Ali, M., ... & Fang, C. (2019). Use of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae to improve the growth and nutrient utilization of common bean in a soil infected with white rot fungi. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 171, 539-548.

Munees, A., & Mulugeta, K. (2013). Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: A review. *Biochem. Molecular Biol*, 1, 19-26.

### N:

Nakkeeran, S., Fernando, W. D., & Siddiqui, Z. A. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 257-296). Springer, Dordrecht.

Naserirad, H., Soleymanifard, A., & Naseri, R. (2011). Effect of integrated application of bio-fertilizer on grain yield, yield components and associated traits of maize cultivars. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, 10(2), 271-277.

### P:

Patil, H. J., & Solanki, M. K. (2016). Microbial inoculant: modern era of fertilizers and pesticides. In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity* (pp. 319-343). Springer, New Delhi.

Podil AR Kishore Gk. plant growth - promoting Rhizobacteria.in: Gnanamanickam ss, éditoriale. *Plant - Associated bacteria* .springer, Netherlands ; 2006 pp195- 230.

Prasad, R., Kumar, M., & Varma, A. (2015). Role of PGPR in soil fertility and plant health. In *Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants* (pp. 247-260). Springer, Cham.

### R:

Reddy, P. P. (2014). Potential role of PGPR in agriculture. In *Plant growth promoting Rhizobacteria for horticultural crop protection* (pp. 17-34). Springer, New Delhi.

Rodge, Seema P., et al (2016) " Isolation and characterization or PGPR fromRoots of ficusreligiosa growing on concrète walls and its Effecton Plant Grawth in Drought Condition." *Int.J.Microbiol.App.Sci* 5.9:583-593.

Rosegrant MW, ferna dez M, sinha A ( coordinating lead authors) 2009. Looking into the future for agriculture and AkST (Agric. Know ledge, sci, technologie)In agriculture at a crossroads: global Report : International assessment of agriculture knowledge sciences and technologie, ed. BD MCIntyre HR Heren .jn wakhlungu, RT Watson .pp 307-76. Washington .Dc.Iisland.

## Références bibliographiques

RoyChowdhury, A., Bagchi, A., & Sengupta, C. (2016). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from agricultural field and their potential role on germination and growth of spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. *Int. J. Curr. Agric. Sci*, 6, 128-131.

### S:

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

Schwachtje, J., Karojet, S., Thormählen, I., Bernholz, C., Kunz, S., Brouwer, S., ... & van Dongen, J. T. (2011). A naturally associated rhizobacterium of *Arabidopsis thaliana* induces a starvation-like transcriptional response while promoting growth. *PLoS One*, 6(12), e29382.

Sindhu, S. S., Parmar, P., Phour, M., & Sehrawat, A. (2016). Potassium-solubilizing microorganisms (KSMs) and its effect on plant growth improvement. In *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (pp. 171-185). Springer, New Delhi.

Singh, J.s.2016.plant Growth promoting Rhizobacteria , *Résonance* 18,275.281

Szczech,M., Maciorowski,R., 2016. Microencapsulation Technique with Organic Additives for Biocontrol Agents. *J. Hortic. Res.* 24.111-122

### U:

Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K., & Singh, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.

### W:

Wen, P., Zhu, D. H., Wu, H., Zong, M. H., Jing, Y. R., & Han, S. Y. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*, 59, 366-376.

Wen, P., Zhu, D.-H., Wu, H., Zong, M.-H., Jing, Y.-R., Han, S.-Y., 2016. Encapsulation Wetland rhizosphere bacteria associated with *juncus effusus* L.cannadian journal Wine Solution by Different Bentonites

Wu, F., Wan, J. H. C., Wu, S., & Wong, M. (2012). Effects of earthworms and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on availability of nitrogen, phosphorus, and potassium in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(3), 423-433.

# ***ANNEXE***

**Annexe 01**

Milieu King B on a préparé ce milieu pour la culture des bactéries : 43,6 g/l de poudre ; pH=7,2

**Annexe 2 : Composition du milieu Ashby sans azote en g/l**

Mannitol.....	20g
Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2 HPO_4$ ).....	0,20g
Sulfate de magnésium ( $Mg So_4$ ).....	0,20g
Chlorure de sodium ( $Na Cl$ ).....	0,20g
Sulfate de potassium ( $K_2 So_4$ ).....	0,10g
Carbonate de calcium ( $CaCo_3$ ).....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

**Annexe 3 : Composition du milieu de solubilisation de Zinc**

Glucose.....	10g
Sulfate d'ammonium .....	0,1g
Chlorure de potassium.....	0.2g
Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ ).....	0,1g
Sulfate de magnésium ( $Mg So_4$ ).....	0,2g
Oxyde de Zinc.....	0,1%
Eau distillée.....	500ml

**Annexe 4 : Composition du milieu King B liquide (King et Al, 1954) en g/l PH=7,2 autoclave 20 min 120 °C**

Peptone .....	20g
Glycérol .....	15ml
$K_2 HPO_4$ .....	1,5g
$MgSo_4$ .....	1,15g
Agar .....	15g
Eau distillée.....	1000ml

## **Résumé**

Dans le but d'isoler des PGPR à haut potentiel et de formuler un bioengrais à base de ces PGPR. On a isolé cinq souches bactériennes à partir de la rhizosphère d'asphodèle, qui sont nommées par la suite A, B, C, D et E. Ces bactéries ont été caractérisées selon des traits morphologiques et des traits PGP (biochimiques) pour leur capacité à produire des phytohormones de croissance végétales comme l'AIA, la fixation d'azote, la solubilisation du zinc et leurs activités enzymatiques (catalase). La majorité des souches testées ont présenté des résultats positifs avec les tests précités.

En outre, pour valoriser ces PGPR, on a formulé des bioengrais à base de ces isolats par la technique de microencapsulation par l'alginate et l'amidon. L'évaluation de ces formulations sur les graines de maïs a montré leur effet bénéfique sur la croissance de la plantes. Nos résultats obtenus ont montré que les bioengrais, notamment celui produit à base de la souche D, ont améliorée significativement la longueur des racines et la longueur des tiges.

**Mots clés** : PGPR, bioengrais ; encapsulation, fixation d'azote, *Zea mays*

## **Abstract**

With the aim of isolating high potential PGPR and formulating a bio-fertilizer based on these PGPR. Five bacterial strains were isolated from the rhizosphere of asphodel, which are named hereafter A, B, C, D and E. These bacteria have been characterized according to morphological traits and PGP (biochemical) traits for their ability to produce plant growth phytohormones such as IAA, nitrogen fixation, zinc solubilisation and their enzymatic activities (catalase) .The majority of the strains tested showed positive results with the above tests. In addition, to enhance these PGPRs bio-fertilizers based on these isolates have been formulated by the technique of microencapsulation with alginate and starch. Evaluation of these formulations on corn seeds showed their beneficial effect on plant growth . Our results have shown that biofertilizers, in particular that produced based on strain D, significantly improved the length of the roots and the length of the stems.

**Keywords** : PGPR, bio-fertilizer, encapsulation, nitrogen fixation, *Zea mays*

## ملخص

بهدف عزل PGPRs عالية الإمكانات وصياغات سماد حيوي بناء على هذه PGPRs. تم عزل خمسة سلالات بكتيرية من جذور الغلاف الجوي النباتات، والتي تمت تسميتها في ما بعد A,B,C,D,E. وقد تما تصنيف هذه البكتيريا وفقا للسمات المورفولوجية وخصائص pgp الكيمياء الحيوية لقدرتها على انتاج هرمونات نباتية لنمو النبات مثل AIA. تثبيت النيتروجين ، اذابة الزنك وأنشطتها الإنزيمية (كتالاز) اظهرت غالبية السلالات المختبرة نتائج اجابية مع الإختبارات الذكورة اعلاه بالاضافة إلى ذلك ، لتعزيز PGPRs. تم صياغة الأسمدة الحيوية القائمة على هذه الهوايات بتقنية الكبسلة الدقيقة مع الألبينات والنشاء. أظهر تقييم هذه التركيبات على بذور الذرة تأثيرها مفيد على النبات. اظهرت نتائجنا ان الأسمدة الحيوية ، خاصة تلك التي يتم انتاجها على اساس السلالة Dحسنت بشكل كبير من طول الجذور وطول الساق

**الكلمات المفتاحية:** PGPR سماد حيوي تغليف تثبيت النيتروجين .