

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



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

**Mémoire de fin d'études**

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Génétique moléculaire et amélioration des plantes**

**Présenté par :**

**MERZOUG Fatima Zohra**

**KADA Ikram**

**Thème**

**Isolement et caractérisation des souches de Rhizobium  
pour la production de bioengrais**

**Soutenu publiquement le 15/07/2021**

**Jury:**

**Grade**

**Présidente:** ALINEHARI Abdelkader « MCA »

**Encadrant:** Dr RAHMOUNE Bilal « MCA »

**Examineur:** Dr DAHLIA F « MCA »

**Invité :** Mr BENAÏSSA Toufik « MAA »

**Année universitaire 2020-2021**

# Remerciements

On tient sincèrement remercier toutes les personnes qui ont participé à réaliser ce mémoire, que ce soit en nous conseillant ou en nous faisant partager leurs expériences.

On tient à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrant **Dr RAHMOUNE Bilal** qui nous a conseillés et orientés tout au long de la réalisation de ce Projet.

Il a su enrichir notre mémoire grâce à ses remarques. Toujours à l'écoute et réactive, ses conseils nous ont beaucoup servis et nous ont permis de nous remettre en permanence sur la bonne voie, quand c'était nécessaire.

Nos profonds remerciements vont aussi au membre du jury pour avoir accepté d'examiner notre travail, pour leurs remarques judicieuses et leurs optiques enrichissantes qui vont valoriser notre mémoire.

Nous remercions vivement **Mr Alinehari A.** d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions **Mme Dahlia F.** d'avoir consacré de son temps pour examiner ce modeste travail.

Un grand merci à Monsieur **Benaissa T.** pour son aide et sa présence

A tous les membres des laboratoires : **eau et sol, physiologie végétale, microbiologie** et **science alimentaire** qui par leur bonne humeur, leur disponibilité et leur aide m'ont non seulement permis de mener ce projet à bien mais également de profiter d'une agréable ambiance de travail.

Enfin, on remercie nos familles et nos amis pour leurs encouragements et leur soutien qui nous ont permis de faire ce mémoire dans de bonnes conditions.

# Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

**A l'âme de mon très cher père** disparu trop tôt.

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu étais.

Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accueille dans son vaste paradis.

Je dédie aussi ce travail à mon oncle dans l'au-delà, qui a été pour moi un deuxième père après le départ de mon papa Qui a fini par le suivre que dieu l'accueille dans son vaste paradis.

## *A ma douce maman*

Ma mère, mon vrai binôme durant cinq années d'études, cette merveilleuse femme qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, ses prières, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, et les longues nuits blanches qu'elle a fait de bon cœur pour m'encourager et me remonter le moral, pour m'avoir donnée la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire et le finir. Qu'elle puisse recevoir à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

## *A mes frères et sœurs*

Qui m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A mes amies **Fatima, Ikram, Kaouthar et Israa** Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

*Ikram*

# Dédicaces

## A ma chère mère

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour ton soutien et encouragements. Je te dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que tu m'offre quotidiennement et ta bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant te garde pour moi et te procure santé et bonheur.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mes sœurs **Kheira** et g et mon frère qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A ma précieuse amie et sœur **Khalida** à tous les moments d'enfance passés avec toi, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apportée. Tu m'as soutenue, réconfortée et encouragé. Puissent nos liens sororaux se consolider et se pérenniser encore plus.

A mes amis **Bohra, Ikram, Nassira** et mon frère **Oussama**

*Fatima*

## Table de Matières

Liste des Figues.....	i
Liste des Tableaux.....	ii
Liste des Abréviations.....	iii
Introduction.....	1

### Partie Bibliographique

#### Chapitre 1 : PGPR& Rhizobium

1 Généralités et définitions .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.1 Rhizosphère.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.2 Microbiome.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.3 Microbiome rhizosphérique ou Rhizobactéries .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.4 Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2 Rhizobiums.....	
<b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
2.1 Définition.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2 Rhizobium et fixation biologique de l'azote.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.3 Description et Taxonomie .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4 Rôle potentiel des PGPR (rhizobium) dans l'amélioration des plantes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.1 Fixation d'azote .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.2 Solubilisation des phosphates et des potassiums .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.3 Production des phytohormones.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.4 Production des sidérophores.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.5 Production d'H <sub>2</sub> CN.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

#### Chapitre 2 :Engrais et Bioengrais

1 Généralités.....	<b>Erreur !</b>
<b>Signet non défini.</b>	
2 Définition.....	<b>Erreur !</b>
<b>Signet non défini.</b>	
3 Engrais chimiques et leurs formulations.....	<b>Erreur !</b>
<b>Signet non défini.</b>	
4 Effet des engrais chimiques sur les paramètres du sol.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
5 Biofertilisation.....	<b>Erreur !</b>
<b>Signet non défini.</b>	
6 Types des biofertilisants.....	<b>Erreur !</b>
<b>Signet non défini.</b>	
6.1 Composte .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6.2 Fumiers .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6.3 PGPR comme biofertilisant.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6.4 Application et commercialisation des bioengrais de rhizobium .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6.5 Production et application d'inoculants .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

6.6	Encapsulation des bactéries : une méthode de production de bioengrais	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7	Technologie d'encapsulation.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7.1	Techniques de microencapsulations -----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7.1.1	Extrusion-----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7.1.2	Technique d'émulsion -----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7.1.3	Séchage par pulvérisation-----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7.1.4	Coacervation -----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7.2	Avantage des microcapsules-----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

## Partie Expérimentale

### Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1	Objectifs de travail.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2	Matériel.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1	Matériel utilisés aux laboratoires-----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2	Matériel bactérien -----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2.1	Isolement et purification des souches de rhizobiums.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2.2	Ensemencement et incubation -----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2.3	Sélection des colonies bactériennes-----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2.4	Purification des isolats-----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2.5	Conservation des isolats-----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3	Identification et caractérisation des rhizobiums .....	34
3.1	Caractéristiques culturelles -----	34
3.2	Caractéristique morphologique-----	35
3.3	Caractéristique biochimique-----	36
3.3.1	Fixation d'azote -----	36
3.3.2	Solubilisation de Zinc-----	37
3.3.3	Production de sulfate d'hydrogène-----	37
3.3.4	Test d'indole -----	37
3.3.5	Test catalase-----	37
3.4	Encapsulation des isolats et formulation des bioengrais-----	39
4	Evaluation du potentiel des bioengrais.....	40
4.1	Matériel végétal -----	40
4.1.1	Germination des graines et application des bioengrais-----	40
4.2	Paramètres mesurés-----	41
4.2.1	Longueur des tiges et de la racine principale-----	41

### Chapitre 4 : Résultats et Discussion

1	Résultats et Discussion.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.1	Caractérisation et identification des rhizobiums-----	43
1.2	Identification phénotypique des souches rhizobiums -----	43

1.3	Caractérisation biochimique des souches rhizobiums -----	44
1.3.1	Fixation de l'azote -----	44
1.3.2	Solubilisation du zinc -----	45
1.3.3	Production de sulfate d'hydrogène -----	45
1.4	Test d'indole -----	46
1.5	Test de catalase -----	46
1.6	Encapsulation et formulation des bioengrais -----	47
1.6.1	Effet des bioengrais sur la germination et croissance des graines de maïs -----	48
1.6.2	Longueur moyenne des racines -----	48
1.6.3	Longueur moyenne des tiges -----	48
<b>Conclusion</b> -----		42
<b>Reference Bibliographique</b>		
<b>Annexes</b>		
<b>Résumé</b>		

### Liste des Figures

<b>Figure 1</b>	:Nodules des racines et des tiges de légumineuses induits par les rhizobiums - <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
<b>Figure 2</b>	:Isolement de rhizobium à partir du sol rhizosphérique -----	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 3</b>	: Aspect morphologique des rhizobiums sur le milieu YEM -----	35
<b>Figure 4</b>	: Étapes du test de coloration de Gram -----	36
<b>Figure 5</b>	: Ensemencement des isolats sur le milieu Ashby. -----	36
<b>Figure 6</b>	: Préparation de bouillon tryptone et réalisation du test d'indole -----	37
<b>Figure 7</b>	: Test catalase -----	38
<b>Figure 8</b>	: Préparation de l'inoculum bactérien pour l'encapsulation -----	38
<b>Figure 9</b>	: Préparation des microcapsules(A) : Solutions composites ont été mélangées de manière homogène avec le bouillon bactérien, (B) : Ajout de mélange goutte à goutte avec une aiguille d'injection, (C) : Microcapsules obtenues nettoyées à l'eau stérile, (D) : Séchage de microcapsule à 40 °C, (E) Stockage des microcapsules séchées granulées. -----	39
<b>Figure 10</b>	:Mise en germination des graines du maïs dans des boîtes de Pétri,A : Désinfection des graines B : rinçage par l'eau distillé ; C : graines du maïs sur un papier filtre imbibé. D : incubation des grains -----	40
<b>Figure 11</b>	:Mise en germination des graines de maïs dans des papiers filtre après application des bio engrais. -----	41
<b>Figure 12</b>	: Observation microscopique des bactéries isolées sous microscopique optique -----	44
<b>Figure 13</b>	: Croissance des souches isolées sur le milieu de culture Ashby -----	44
<b>Figure 14</b>	: Résultats du test de solubilisation de zinc. -----	45
<b>Figure 15</b>	: Résultats de test de production de sulfate d'hydrogène -----	46
<b>Figure 16</b>	: Résultats du test d'indole -----	46
<b>Figure 17</b>	: Test de catalase positifs des rhizobiums. -----	46
<b>Figure 18</b>	: Bio engrais à base de nos isolats -----	47
<b>Figure 19</b>	: Longueur des racines des plantes de maïs après application des bioengrais à base des PGPR. -----	48
<b>Figure 20</b>	: Longueur des tiges des plantes de maïs après application des bioengrais à base des PGPR <b>Erreur ! Signet non</b>	





## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Comparaison entre les engrais biologiques et chimiques. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau 2</b> :Matériel et appareils utilisés aux laboratoires. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques culturales et phénotypiques des rhizobiums isolées. ....	43
<b>Tableau 4</b> : Caractères biochimiques des isolats. ....	47

## Liste des abréviations

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

**HCN :**Acide cyanhydrique

**N<sub>2</sub> :** Azote atmosphérique

**NH<sub>3</sub> :** Ammoniac

**P :** Phosphate

**MOS :** Matière organique de sol

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonate de sodium

**ALC L<sub>3</sub>:** chlorure d'aluminium

**HCL:** acide chlorhydrique

**YEM:**Yeast Extract-Mannitol

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :**Peroxyde d'hydrogène

**NaAlg :** Alginate de sodium

**CaCL<sub>2</sub> :** chlorure de calcium

**AIA :**Acide Indole-3-acétique

# *Introduction*

À l'échelle mondiale, l'agriculture est mise au défi de produire durablement des aliments suffisants, sûrs et sains pour la population mondiale croissante (**Yadav et al. 2020**). Les systèmes agricoles et l'adaptation de l'agriculture aux changements climatiques doivent être abordés pour une agriculture efficiente à l'avenir. Pour l'Algérie, les principaux problèmes agricoles entraînant une faible production agricole sont **a)** des changements progressifs des conditions environnementales et climatiques (notamment la sécheresse), **b)** une diminution de la fertilité des sols, et **c)** une mauvaise maîtrise des techniques agricoles en général et la fertilisation en particulier (**Bencheikh et al. 2017**). Remédier à ces problèmes nécessite une utilisation intensive de produits chimiques, notamment des engrais et des pesticides chimiques pour améliorer les rendements des plantes. Cependant, la continuation de l'utilisation de ces produits chimiques pour assurer la fertilité des sols et les nutriments des plantes affectera négativement la santé humaine et du sol et détruira les écosystèmes naturels (**Zerrouk et al. 2019**).

Récemment de nouvelles approches ont été proposées, elles pourraient assurer la durabilité des systèmes agricoles et l'amélioration de la productivité des plantes face aux contraintes environnementales et aux changements climatiques (**Gupta et al. 2018**). Dans ce contexte, la valorisation des ressources génétiques microbiennes (le microbiome végétal et spécialement le microbiome rhizosphérique bénéfique aussi appelé PGPR dont les rhizobiums) et l'application des voies biotechnologiques modernes et innovantes sont considérées comme des outils prometteurs pour fournir des avantages substantiels à l'agriculture (**Chen et al. 2018**). Ce microbiome est capable de soutenir la croissance, la nutrition et la santé des plantes par plusieurs modes d'action (**Rahmoune et al. 2017**), dont les plus importants sont : la fixation de l'azote atmosphérique, la facilitation de l'absorption des nutriments, la solubilisation du phosphore, du potassium et du fer, ou la production de phytohormones (**Zerrouk et al. 2020**). De plus, Il peut favoriser la croissance des plantes en diminuant les effets des micro-organismes pathogènes via la production de plusieurs métabolites, dont les sidérophores et le HCN et de nombreuses enzymes. Le microbiome végétal, en particulier le PGPR, peut jouer un rôle important dans l'amélioration de la santé des plantes et de la fertilité des sols, la gestion du stress et l'élicitation des substances naturelles (**Rahmoune et al. 2017**).

Les rhizobiums, l'un des principaux groupes de PGPR et l'un des bactéries les plus anciennement connu. Elles sont des bactéries à Gram négatif qui peuvent former des nodules racinaires chez les légumineuses et établir avec eux une symbiose pour fixer l'azote atmosphérique (**Mhatre et al. 2019**). Les rhizobiums, comme tous les PGPR, peuvent jouer un rôle essentiel dans l'amélioration de la productivité des cultures 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, hormones, etc.) et la dégradation des tissus végétaux et des pathogènes ainsi que des polluants (**Berg, 2009**).

Bien que l'utilisation de PGPR et des rhizobiums puisse améliorer la production des plantes, les applications dans le monde réel sont toujours limitées par des méthodes de recherche peu efficaces. Les analyses génomique récentes des microbiomes des végétaux et les collections de cultures indépendantes ont facilité le développement des bioengrais et de plusieurs communautés bactériennes artificiellement construites, appelées communautés synthétiques (SynComs) qui ont fourni des méthodes hautement efficaces pour appliquer et valoriser les PGPR dans l'amélioration de la santé et la croissance des plantes (**Carlström et al., 2019**). 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**).

Ainsi, le présent travail s'inscrit dans le but de valoriser les ressources en rhizobium dans l'agriculture.

Pour ce faire, on a :

- ✓ Isoler des nouvelles souches rhizobium à partir de la rhizosphère de la fève (*Vicia faba*) ;
- ✓ Caractériser morphologiquement et biochimiquement les isolats ;
- ✓ Formuler des bioengrais à base de ces souches rhizobiums, en utilisant la technique d'encapsulation dans l'alginate ;
- ✓ Evaluer le potentiel des bioengrais sur la germination des graines de *Zea mays*

Ce travail s'articule autour de trois grandes parties :

- La première partie est une revue de la littérature qui donne une présentation générale des PGPR et des rhizobiums et leurs modes d'actions bénéfique sur les plantes, ainsi que des généralités sur les engrais et la formulation de bioengrais à base de PGPR et de rhizobiums
- 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



# *Synthèse Bibliographiques*

***Chapitre I:***  
***PGPR et Rhizobium***



## **Généralités et définitions**

### **1.1. Rhizosphère**

Le terme rhizosphère du grec « rhiza : racine » et « sphaera : ce qui entoure » a été utilisé pour la première fois par **Lorenz Ailtner, (1904)**. La rhizosphère est la zone du sol entourée par les racines et influencée par leurs exsudats. Elle est définie aussi comme la couche de sol qui adhère fermement aux racines des plantes. Elle est le siège de nombreux processus physico-chimiques induits par l'activité racinaire (**Bravin, 2008**).

### **1.2. Microbiome**

Ensemble des microbes (bactéries, archées et champignons) dans un environnement particulier (par ex : Rhizosphère, phyllosphère...). Elle fait référence à la taxonomie et à l'abondance des membres de la communauté (**Schlaepfi et Bulgarell, 2015**).

### **1.3. Microbiome rhizosphérique ou rhizobactéries**

Les bactéries présentes dans la rhizosphère, appelées aussi bactéries rhizosphérique, peuvent s'installer à l'intérieur (endo) ou à l'extérieur (exo) des racines de toutes les espèces végétales. Ces bactéries peuvent être soit bénéfiques et ont une relation de symbiose avec les racines de la plante, soit sont des bactéries pathogènes et vivent en compétition avec les bactéries bénéfiques pour les plantes. Selon plusieurs chercheurs les plantes consacrent plus de 20% de ses réserves en carbone pour recruter et pour attirer que des bactéries bénéfiques pour elles (**Berg et al. 2016**).

### **1.4. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)**

Ce sont les bactéries qui colonisent la racine de la plante et agissent comme une source supplémentaire d'hormones et de vitamines de croissance qui sont très utiles pour améliorer la croissance et le rendement des plantes. Ces bactéries non-pathogènes possèdent un effet inhibiteur sur les agents pathogènes des plantes (**Berg et al. 2016**).

Les PGPR ont des applications diverses dans l'agriculture, l'horticulture et la foresterie. Elles sont utilisées comme biofertilisants, bioinoculants et agents de lutte biologique, avec un potentiel pratique d'amélioration (**Reddy 2014**). Ces rhizobactéries bénéfiques peuvent améliorer la germination des graines, la croissance des racines, des pousses, le rendement, l'absorption des nutriments, la tolérance au stress des plantes et sont capables aussi de contrôler plusieurs maladies (**Schlaepfi et Bulgarell, 2015**).

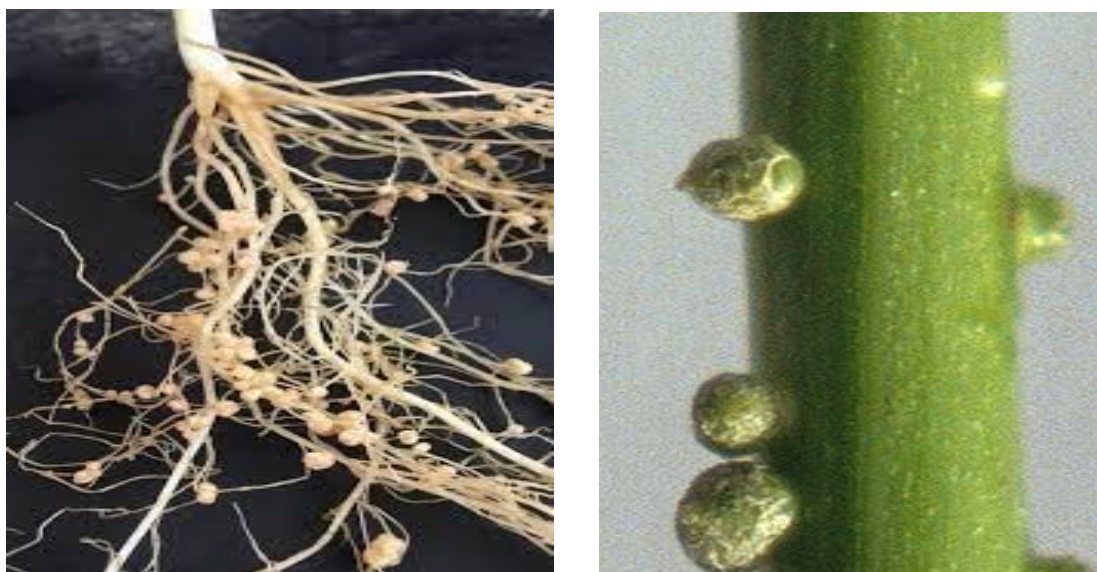
Les PGPR comprennent plusieurs genres de bactéries tel que : *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium* (**Egamberdieva et al. 2013**).

## 2. Rhizobiums

### 2.1. Définition

Le terme de rhizobium, ou bactérie des nodules racinaires, est le nom collectif commun pour diverses bactéries rhizosphériques symbiotiques et généralement sont capables de fixer l'azote atmosphérique et induire des nodules (**Fig. 1**) racinaires et/ou des tiges sur les légumineuses, tel que le pois, le haricot, la fève, l'arachide, le trèfle, la luzerne... (**Saad et al. 2020**). À l'intérieur des nodules, les cellules de ces bactéries se différencient en bactéroïdes, qui sont des cellules polymorphes avec des parois cellulaires modifiées, entourées d'une membrane cellulaire végétale pour former une structure appelée symbiose. Cette structure fournit les conditions qui permettent la fonction de la nitrogénase, l'enzyme qui réduit l'azote élémentaire en ammoniac dans les bactéroïdes. De cette association, les légumineuses et les rhizobiums peuvent bénéficier : les plantes hôtes fournissent aux rhizobiums des acides C4-dicarboxyliques comme source de carbone et d'énergie, et les rhizobiums offrent aux plantes des nutriments azotés produits en réduisant l'azote atmosphérique et en l'incorporant à des acides aminés tels que l'alanine (**Poole et Allaway 2000**).

Les rhizobiums partagent également de nombreuses caractéristiques avec les autres PGPR. En fait, ces bactéries peuvent solubiliser les phosphates organiques et inorganiques, solubiliser le potassium et le zinc, produire des phytohormones, des sidérophores et du HCN et elles peuvent aussi produire des enzymes hydrolytiques (**Mueller et Sachs, 2015**).



**Figure 1** : Nodules des racines et des tiges de légumineuses induits par les rhizobiums (**Chen et Wang 2014**).

## **2.2. Rhizobium et fixation biologique de l'azote**

La fixation de l'azote est l'un des processus biologiques les plus importants sur Terre, se classant de près derrière la photosynthèse. Contrairement à la photosynthèse, la fonction de fixation biologique de l'azote (FBA) est limitée à un petit nombre de procaryotes. Bien que l'azote représente environ 78 % de l'atmosphère, cet azote gazeux (N<sub>2</sub>) est chimiquement inerte en raison de ses triples liaisons, et sa réduction est une procédure coûteuse en énergie (Sylvia et al. 2005). Par conséquent, l'azote est toujours le nutriment le plus limité dans le sol pour soutenir la croissance des plantes. En général, la FBA peut être réalisée par des diazotrophes libres, par des rhizobiums symbiotiques et par des bactéries diazotrophes endophytes. La quantité globale de N fixée par les bactéries dans les systèmes agricoles et naturels est d'environ 122 Tg N par an (Lindström et Mousavi, 2020). Par conséquent, les rhizobiums sont l'une des bioressources les plus importantes.

## **2.3. Description et Taxonomie**

A ce jour, tous les rhizobiums décrits sont des bâtonnets à Gram négatif, non sporulés, se déplaçant avec un ou plusieurs flagelles polaires ou péritriches. Taxonomiquement, ils sont répartis dans environ 100 espèces de 15 genres appartenant aux classes *Alphaproteobacteria* et *Betaproteobacteri*

## **3. Rôle potentiel des PGPR (rhizobium) dans l'amélioration des plantes**

Les souches PGPR dont les Rhizobiums ont des applications diverses dans l'agriculture, et l'amélioration des plantes. Il existe plusieurs rapports dans la littérature indiquant que les PGPR pourraient être prouvés comme une aubaine dans l'agriculture durable et biologique. Les PGPR sont utilisés comme bioinoculants, biofertilisants et agents de biocontrôle, avec un potentiel très élevé.

Les souches PGPR peuvent favoriser la croissance et le développement des plantes principalement par les actions suivantes :

- ✚ Fixation biologique de l'azote ;
- ✚ Solubilisation des phosphates minéraux, des potassiums, zinc et autres nutriments ;
- ✚ Production de phytohormones ;
- ✚ Production de sidérophores qui chélatent le fer et le rendre disponible pour la plante ;
- ✚ Production des sidérophores et du HCN.

### **3.1. Fixation d'azote**

Les PGPR et notamment les rhizobiums (voir 2.2.) facilitent la croissance et le développement des plantes directement par l'apport d'azote aux plantes grâce à la fixation de l'azote. L'azote (N) est l'un des principaux nutriments des plantes, devenant un facteur limitant dans les

écosystèmes agricoles en raison des grandes pertes dues aux précipitations ou à la lixiviation des minéraux. L'azote est un élément essentiel pour toutes les formes de vie – une condition de base pour la synthèse des acides nucléiques, des protéines et d'autres composés azotés organiques. Malheureusement, aucune espèce végétale n'est capable de fixer le diazote atmosphérique dans l'ammoniac et de le dépenser directement pour sa croissance. Ainsi, les plantes dépendent de la fixation biologique de l'azote (BFA). Les PGPR peuvent fixer la N<sub>2</sub> atmosphérique de manière symbiotique ou non symbiotique (**Mehmood et al. 2018**).

### **3.2. Solubilisation des phosphates et des potassiums**

Le phosphore est le deuxième nutriment important et limitant la croissance des plantes après l'azote, il est largement disponible dans le sol sous deux formes 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**).

Le potassium 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 des PGPR à solubiliser cet élément et le rendre disponible aux plantes pourrait fournir une technologie alternative dans la fabrication des engrais (**Mehmood et al. 2018**).

### **3.3. Production des phytohormones**

Les PGPR dont les rhizobium produisent des phytohormones liées à leur capacité à stimuler la croissance des plantes. Les hormones sont des composés organiques efficaces à très faible concentration ; ils sont généralement synthétisés dans une partie de la plante et transportés vers un autre endroit. Ils interagissent avec les tissus cibles pour provoquer des réponses physiologiques, telles que la croissance ou la maturation des fruits. Les botanistes reconnaissent cinq grands groupes d'hormones : les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique (**Salma, 2015**).

AIA est une phytohormone qui est connue pour être impliquée dans l'initiation des racines, la division cellulaire et l'élargissement des cellules. L'auxine la plus active des plantes est l'acide indole-3-acétique (AIA), qui stimule à la fois les réponses rapides (par exemple, augmentation de l'élongation cellulaire) et à long terme (division et différenciation cellulaire) chez les plantes. Il a été estimé que 80% des bactéries isolées de la rhizosphère peuvent produire les régulateurs de croissance des plantes « AIA » (**Mueller et Sachs, 2015**).

### **3.4. Production des sidérophores**

Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des composés adaptés aux ions fer présents dans la rhizosphère. Bien que le fer soit l'un des minéraux les plus abondants sur terre, on constate que la forme oxydée du fer inorganique est  $Fe^{3+}$ , qui produit des composés presque insolubles (tels que les oxydes, les phosphates). Pour l'obtenir, les organismes doivent produire de petites molécules capables de chélater le  $Fe^{3+}$ , qui ont une forte affinité pour cet élément de faible poids appelé sidérophores. Les sidérophores libérés par PGPR chélatent le fer minéral en formant des complexes de fer solubles ( $Fe^{3+}$ ) à l'aide de récepteurs spécifiques situés sur la membrane cellulaire externe des bactéries (**Gobatet al. 2010**).

### **3.5. Production d'HCN**

L'acide cyanhydrique (HCN) est un composé volatil qui s'évapore rapidement dans l'air à des températures supérieures à  $28^{\circ}C$  et se dissout rapidement dans l'eau. Il peut être toxique pour les humains et les animaux, et le degré de toxicité dépend de la consommation. Le cyanure est un métabolite secondaire produit directement à partir de la glycine ou du cyanure dans la rhizosphère de plusieurs micro-organismes (**Meena et al., 2001**).

*Chapitre 2 :*  
*Engrais et bioengrais*

## 1. Généralités

Le sol est une matrice complexe dans laquelle de nombreux processus se déroulent en même temps. Les fonctions et les réactions du sol sont impératives pour comprendre le comportement des nutriments dans le sol. Ces processus affectent la disponibilité des nutriments pour les plantes. Les plantes ont besoin d'environ 18 nutriments comme l'azote, le phosphore et le potassium essentiels à leur croissance et à l'achèvement de leur cycle de vie. Lorsque la culture est récoltée, ces nutriments ne sont pas remboursés au sol et les niveaux de ces nutriments diminuent avec le temps. Cette diminution du niveau de nutriments affecte la culture à la fois qualitativement et quantitativement. Désormais, ces nutriments doivent être rémunérés soit par le processus de décomposition naturelle (pourriture des plantes et des organismes), soit en appliquant directement ces nutriments sous forme d'engrais (**Zaman et al. 2019**). L'application d'engrais doit s'avérer être une pratique cruciale de l'agriculture pour nourrir la population croissante. L'application d'engrais chimiques, est devenue une consécration pour l'humanité. L'utilisation d'engrais chimiques aide à vaincre la faim et la mort dans de nombreuses régions du monde.

## 2. Définition

Les engrais chimiques sont des amendements comprenant des nutriments nécessaires à la croissance des plantes. Ces nutriments sont classés en nutriments primaires, nutriments secondaires, micronutriments et éléments non minéraux. Les nutriments primaires et secondaires sont mutuellement appelés macronutriments. Les macronutriments sont nécessaires aux plantes en grandes quantités, tandis que les micronutriments sont nécessaires en plus petites quantités (**Riaz et al. 2020**).

La fertilisation du sol peut se faire en ajoutant des formes nutritives organiques ou inorganiques. L'utilisation d'engrais chimiques et organiques a ses propres avantages et inconvénients dans le contexte de l'approvisionnement en éléments nutritifs, de la productivité des cultures et de l'impact sur l'environnement (**Kaur, 2016**). Bien que, les prérogatives de la fertilisation doivent être intégrées pour utiliser au mieux chaque type d'engrais et parvenir à une gestion équilibrée des nutriments pour la croissance des cultures (**Jen-Hshuan, 2006**).

La fertilisation consiste alors à restituer au sol ce qu'il a perdu suite aux exportations minérales par les plantes. Les techniques de fertilisation ne se limitent pas aux apports de fumures. Elles visent également à améliorer la structure du sol par un bon drainage, une irrigation bien conduite, des travaux de sol bien conduits appropriés et effectués dans de bonnes conditions d'humidité du sol (**Baldi et al., 2015**).

### **3. Engrais chimiques et leurs formulations**

Les engrais chimiques sont fabriqués industriellement et disponibles dans de nombreuses formulations sur les marchés. Les engrais chimiques à action rapide et à faible coût, disponibles dans le commerce, sont sous forme de solides (granulés, cristallins, poudre et pilules), de pointes et de pastilles à libération lente, de liquides et de comprimés. Les engrais contiennent principalement des nutriments majeurs (azote, phosphore et potassium) dans un rapport spécifique. Des engrais chimiques comprenant des micronutriments et des macronutriments secondaires sont également disponibles.

### **4. Effet des engrais chimiques sur les paramètres du sol**

L'application des engrais améliore les nutriments, mais affecte également la santé du sol de manière positive ou négative. La santé du sol est décrite collectivement par les aspects physiques, chimiques et biologiques du sol. Les engrais azotés contiennent de l'azote sous forme d'ammonium, de nitrate et d'urée. Les plantes peuvent absorber l'azote sous forme d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) ou de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Au moment où une particule chargée est absorbée par les racines de la plante, la plante décharge habituellement une particule avec des charges similaires pour maintenir un pH équilibré. Le carbone organique du sol (COS) et l'azote total ont diminué dans les sols à faible pH (<7) en raison de l'application d'engrais chimiques. La séquestration du carbone organique du sol contribue à l'amélioration de la fertilité des sols (**Reddy et al. 2017**). L'azote total a été réduit davantage sous l'application d'engrais chimiques en raison de la disponibilité rapide des nutriments à partir de ces sources. La diminution du COS et de l'azote total résulte de la décomposition stimulée de la matière organique dans le sol et les résidus de culture en raison de l'application d'engrais. La conductivité électrique est la mesure du courant électrique traversant une solution. La conductivité électrique a augmenté lorsque des engrais chimiques sont ajoutés au sol. Un grand nombre de sels et de nutriments sont ajoutés dans le sol avec l'application d'engrais inorganiques. Une augmentation des sels augmente la salinité qui entraîne finalement une augmentation de la conductivité électrique (**Azizi et al. 2016**).

Les engrais chimiques (azote, phosphore et potassium) affectent la diversité microbienne de deux manières. L'effet des engrais chimiques dépend du type, de la nature et de la composition de la communauté microbienne (**Rousk et al. 2010**).

### **5. Biofertilisation**

Les biofertilisants ou les fertilisants biologique sont définis comme des préparations contenant des cellules vivantes ou des cellules latentes de souches efficaces de micro-organismes qui aident les plantes cultivées à absorber les nutriments par leurs interactions dans



la rhizosphère lorsqu'elles sont appliquées à travers les semences ou le sol. Ils accélèrent certains processus microbiens dans le sol et augmentent l'étendue de la disponibilité des nutriments sous des formes facilement assimilables par les plantes (**Annonym, 2008**). Les biofertilisants contiennent des microorganismes vivants qui colonisent la rhizosphère et augmentent la disponibilité de nutriments et / ou stimulent la croissance des plantes. Ils ont un grand potentiel en tant que sources supplémentaires, renouvelables et respectueuses des nutriments des plantes. Les biofertilisants constituent des éléments importants dans la gestion intégrée de nutrition des plantes (**Kaur, 2016**).

## **6. Types des biofertilisants**

### **6.1. Composte**

Le compostage est un processus de décomposition et de transformation « contrôlés » de déchets organiques biodégradables, d'origine végétale et/ou animale, sous l'action de populations microbiennes diversifiées (**Mark, 2015**). Les compostes sont principalement utilisés en agriculture pour augmenter ou maintenir la concentration de matière organique du sol. Leur comportement après incorporation au sol dépend de la stabilité de leur matière organique (MO) (**Shafawati et Siddiquee, 2013**).

### **6.2. Fumiers**

Le fumier est une excellente source de nutriments pour les plantes, car la plupart de ce que mangent les animaux provient des plantes, et la plupart de ce que mangent les animaux passe dans les excréments. Les propriétés physicochimiques et biologiques du fumier font un amendement du sol vraiment incroyable (**Mark, 2015**). Selon **Gérald et al., 2011**, les fumiers stimulent en quantité et en activité la biomasse du sol et augmentent la minéralisation de l'azote.

### **6.3. PGPR comme biofertilisant**

Les analyses et les collections récentes de plusieurs bactéries rhizosphérique 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**). Cependant, un bioengrais de PGPR est un produit liquide, ou 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**).

#### **6.4. Application et commercialisation des bioengrais de rhizobium**

L'application commerciale d'inoculants rhizobiens en agriculture remonte à la fin du XIXe siècle (Nobbe et Hiltner 1896), juste après l'obtention des premières cultures pures de rhizobiums et la confirmation de la fonction des nodules racinaires fixateurs d'azote (**Brockwell et Bottomley 1995**). Aujourd'hui, certaines entreprises produisent encore des inoculants rhizobiens efficaces aux États-Unis. La société ABM produit la bradyrhizobia de marque America's Best Inoculant® utilisée pour inoculer le soja, les arachides et les pois/lentilles dans une grande variété de sols. Les autres producteurs d'inoculants et marques déposées incluent Monsanto BioAg Alliance (Optimize®), BASF (Vault®), ABM (Excalibre™), MycoGold™, XiteBio Technologies (XiteBio® et SoyRhizo®). La consommation totale de biofertilisants contenant des rhizobiums aux États-Unis était de 87842,1 t en 2017 (**Wookroof 2018**). Les genres populaires de rhizobiums utilisés sont Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium, Mesorhizobium et Allorhizobium (**Wookroof 2018**).

#### **6.5. Production et application d'inoculants**

Dans la production d'inoculants, les rhizobiums sélectionnés sont cultivés à plus petite échelle dans des flacons ou à plus grande échelle dans des fermenteurs jusqu'au stade exponentiel tardif, puis la culture est utilisée directement ou en mélange avec des supports solides. Deux formulations d'inoculants rhizobiens, liquides et solides (granulés ou en poudre), sont généralement utilisées pour inoculer les légumineuses en agriculture (**Denton et al. 2017**). Le produit principal de l'inoculant rhizobien est généralement un liquide fermenté, et il peut être appliqué directement sur les graines de légumineuses ou le sillon de graines, après avoir vérifié la pureté et le comptage des cellules viables. Les inoculants solides ont diverses formulations : granulés de tourbe, granulés d'argile bentonite, argile attapulgite et poudres lyophilisées (**Deaker et al. 2016**). Des inoculants à base solide peuvent être utilisés pour enrober la graine à l'aide d'une solution adhésive ou saupoudrés directement dans la rangée de graines. Des

précautions doivent être prises pour éviter la sécheresse, les températures élevées et basses, les combinaisons avec des engrais chimiques, des bactéricides et des herbicides, de l'eau chlorée, l'eau acide ou alcaline et divers déchets, car ces facteurs ou conditions tueront les rhizobiums vivants.

### **6.6. Encapsulation des bactéries : une méthode de production de bioengrais**

Différentes formulations solides et liquides ont été développées pour l'application de biofertilisant ou d'agents de biocontrôle microbien en agriculture.

L'encapsulation est une technique nouvelle et efficace pour la libération lente de cellules dans le sol cible et pour augmenter les taux de survie des cellules dans le sol après l'inoculation ce qui augmenterait l'efficacité à long terme (**He et al., 2016**).

Les microcapsules sont considérées comme une méthode efficace et pratique pour la conservation et l'application des micro-organismes (**Szczeczek and Maciorowski, 2016**). Ces microparticules incluses dans l'enrobage de la graine ou la granulation permettront le transport d'inoculum aux racines (**Szczeczek and Maciorowski, 2016**).

## **7. Technologie d'encapsulation**

L'encapsulation est une technique consistant à fabriquer une coque ou une capsule protectrice autour du principe actif ou des cellules (par exemple, une cellule ou un tissu microbien, macrobien) (**John et al., 2011**).

### **7.1. Techniques de microencapsulation**

Les méthodes d'encapsulation varient en fonction de la nature des applications provenant de divers domaines pour des objectifs divers (**John et al., 2011**). Les techniques d'encapsulation utilisées pour l'immobilisation de cellules peuvent être classées en deux types en fonction de la taille de la perle polymère produite, à savoir la macroencapsulation et la microencapsulation (**Rathore et al., 2013**).

#### **7.1.1. Extrusion**

L'extrusion est une méthode très ancienne et simple de fabrication de gélules avec des hydrocolloïdes. Le processus d'extrusion pourrait être effectué en mélangeant le microorganisme avec des hydrocolloïdes, puis en extrudant dans une solution de durcissement (**John et al., 2011**).

#### **7.1.2. Technique d'émulsion**

Les matériaux solubles dans l'eau sont largement utilisés pour des applications dans l'agriculture, l'alimentation et les produits pharmaceutiques. De manière générale, une émulsion

eau dans huile a été utilisée pour fabriquer des microbilles. La technique d'émulsion comme suit ; un petit volume de la suspension de polymère soluble dans l'eau des cellules (par exemple, de l'alginate, de la gélatine) est ajouté à un grand volume d'une huile végétale (**John et al., 2011**).

### **7.1.3. Séchage par pulvérisation**

La microencapsulations par séchage par pulvérisation est un processus bien établi capable de produire une grande quantité de matériau. Cette technologie n'est pas considérée comme une bonne technique d'immobilisation cellulaire en raison d'une mortalité élevée résultant d'une déshydratation simultanée et d'une inactivation des microorganismes à haute température (**John et al., 2011**).

### **7.1.4. Coacervation**

Ceci est principalement utilisé comme une technique pour la libération contrôlée de médicament, et le procédé repose sur la diminution de la solubilité du polymère de revêtement par l'addition d'un autre composé à la solution de polymère, le changement de pH ou de température (**John et al., 2011**).

### **7.1.5. Avantage des microcapsules**

L'utilisation de cellules encapsulées pour des applications environnementales présente plusieurs avantages par rapport aux formulations à cellules libres : L'amélioration de la survie et de l'activité physiologique, apport d'additifs nutritionnels encapsulés (**Young et al., 2006**). Il peut protéger les cellules bactériennes contre les bactériophages et le séchage (**John et al., 2011**). La matrice de microbilles protège les cellules internes à la fois des contraintes mécaniques et des conditions défavorables de l'environnement extérieur.

	<b>Engrais biologiques</b>	<b>Engrais chimiques</b>
<b>Fabrication</b>	Obtenu par des procédés naturels tels que le séchage, broyage et l'extraction.	Obtenu par isolation d'une ou plusieurs éléments par réaction chimique.
<b>Contenus</b>	Contient en plus des trois éléments principaux (l'azote, phosphore et de potasse) une infinité d'éléments majeurs.	Contient l'azote, phosphore et la potasse et la possibilité d'ajouter quelques éléments fertilisants.

**Tableau 1 :** Comparaison entre les engrais biologiques et chimiques.

<b>Action sur la plante</b>	Peut être assimilé rapidement par la plante. Toutefois, une partie sera dégradée par les microorganismes et la microfaune. Il contribue à rendre une plante plus résistante aux attaques des parasites.	Soluble dans l'eau, l'engrais chimique possède la facilité d'être immédiatement assimilable par la plante
<b>Le coût</b>	Coûteux et le cout de main d'œuvre	Moins coûteux
<b>Durée de fabrication</b>	Lente	Rapide

*Partie*  
*Expérimentale*

*Chapitre 3*  
*Matériel et Méthodes*



## 1. Objectifs de travail

Notre expérimentation s'est déroulée dans les laboratoires de microbiologie, eau et sol et physiologie végétale, de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun Tiaret. Elle a comme objectifs de :

- ✚ Isoler et identifier morphologiquement et biochimiquement quelques souches derhizobiumisolées à partir de la rhizosphère de la fève dans la Wilaya de Tiaret ;
- ✚ Formuler des bioengrais à base de ces isolats rhizobium en utilisant la méthode d'encapsulation ;
- ✚ Evaluer le potentiel PGP (capacité de promouvoir la croissance des plantes) de cesbioengraisen testant leur efficacité surla germination et croissance desgraines du maïs.

## 2. Matériel

### 2.1. Matériel utilisés aux laboratoires

Le matériel et l'appareillage utilisés aux laboratoires lors la réalisation de nos expérimentations sont illustrés dans le tableau suivant.

**Tableau 2 :** Matériel et appareils utilisés aux laboratoires.

<b>Appareillage</b>	Microscope, pH mètre, Réfrigérateur, Vortex, Balance, Agitateur magnétique, Autoclave, Bain marie, Etuve, Bec bunsen, Chambre de culture et Agitateur secoueur.
<b>Verrerie</b>	Erlenmeyers, Verre de montre, Tubes à essai, Pipettes graduées, Pipette pasteur Micropipette, anse de platine, 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, Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ), Chlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> ), Solution de sulfate ferreux, Butanol et Méthanol et HCl.
<b>Milieux de cultures</b>	YEM, Milieu Ashby sans azote, Milieu SIM, Tryptone sel (bouillon), Milieu solide spécifique pour la solubilisation de zinc Colorants Lugol, Cristal violet et fuchsine.

## **2.2. Matériel bactérien**

Des échantillons de sol ont été prélevés dans de la fève dans la wilaya de Tiaret durant le mois de Mars 2021.

## **3. Isolement et purification des souches de rhizobiums à partir du sol rhizosphérique**

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  $10^{-6}$  a été réalisée (**Fig.2**). Et l'isolement a été faite sur les deux dilutions  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  afin d'assurer la présence de plusieurs genres dans nos isolats.

### **3.1. 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 YEM (**Annexe 01**). C'est un milieu spécifique pour les bactéries rhizobiums (**Fig.2**).

Des boîtes de pétri contenant le milieu YEM ont été ensemencés avec 01 ml de chaque dilution puis incubés dans l'étuve pendant 72 heures à une température de 28 °C.

### **Sélection des colonies bactériennes**

Les colonies bactériennes ayant la même morphologie ont été observées sur les boîtes de pétri, après 72h de culture. Huit colonies (quatre souches de la dilution  $10^{-4}$  et quatre de la  $10^{-6}$ ) bien isolées ont été sélectionné (**Fig.2**), prélevées et ré-striées sur le milieu YEM puis ont été incubés de manière similaire que précédemment. Les huit souches sélectionnées ont été codées pour faciliter leurs utilisations plutard.

### **Purification des isolats**

La purification des isolats a été faite par des repiquages successifs à partir d'une colonie bien isolée. La confirmation de la pureté de la souche était effectuée par une observation de l'aspect macroscopique des colonies de Rhizobium (couleur, forme, diamètre, contour, surface et viscosité) et microscopique par l'observation à l'état frais (observation vitale) et après coloration de Gram.

### **Conservation des isolats**

Les isolats purs sont ensemencés sur milieu YEM gélosé incliné et incubés à 28°C pendant 48h, puis conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.



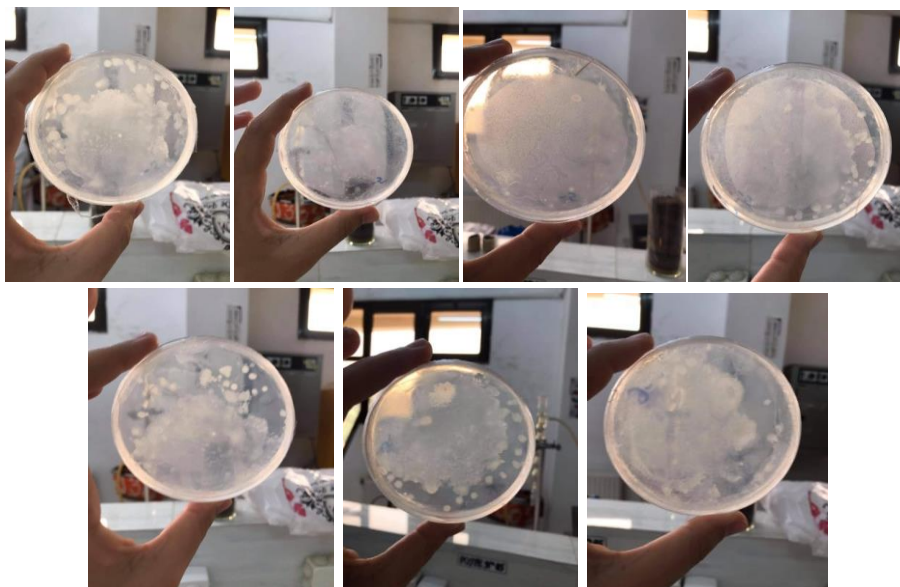
**Figure 2 :** Isolement de rhizobium à partir du sol rhizosphérique

### **3. Identification et caractérisation des rhizobiums**

Après l'isolement, les huit souches ont été nommées **Ik1, Ik2, Ik3, Ik4, F1, F2, F3 et F4** et ensuite des examens macroscopique, microscopique et biochimique ont été effectués afin d'identifier et de caractériser ces dernières.

#### **3.1. Caractéristiques culturelles**

Après 3 jours d'incubation, les 8 isolats ont présentés de différentes caractéristiques culturelles. Des observations ont été effectuées on basant sur les critères les plus importants tel que la forme des colonies (rondes, irrégulières...), la chromogène (couleur de la colonie), la surface des colonies (lisse, rugueuse, sèche, ou dentelée). Ces critères ont été observés à l'aide d'un microscope optique.



**Figure 1 :** Aspect morphologique des rhizobiums sur le milieu YEM

### 3.2.Caractéristique morphologique

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de diviser les bactéries en deux groupes : Gram+ (bien colorées en violet) et Gram- (colorées en rose). Avec la détermination de la forme (bacille, coccobacille, coque), la taille et le mode de regroupement (en amas, en chaînette, isole, diplocoque ou diplobacille).

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 Bunsen. 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 même 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. 4**).

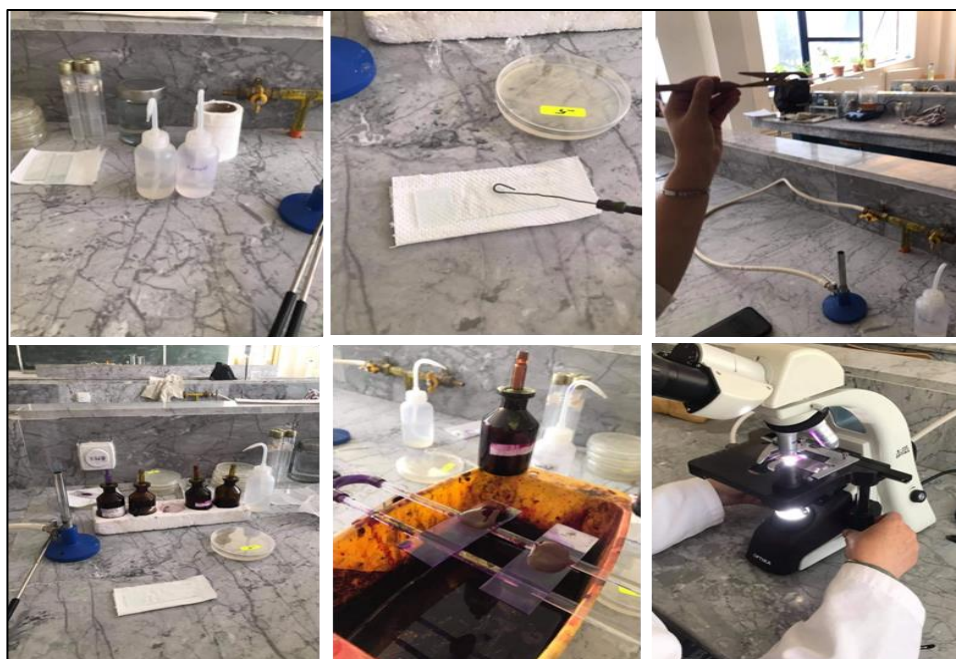


Figure 2 : Étapes du test de coloration de Gram

### 3.3.Caractéristique biochimique

#### 3.3.1. Fixation d'azote

Afin de s'assurer que nos isolats ont la capacité de fixation d'azote comme tous les rhizobiums test a été réalisé, en suivant le protocole de **Rodge et al. (2016)**, brièvement, les isolats ont été striés sur le milieu gélosé Ashby stérile, sans mannitol (ne contient aucune source d'azote) (**annexe 2**). Par la suite ont été incubées dans l'étuve à 28 °C pendant 48 heures. La croissance des bactéries sur ce milieu de culture indique leurs capacités fixatrices de l'azote atmosphérique (**Fig.5**).



Figure 3 : Ensemencement des isolats sur le milieu Ashby.

### 3.1.2. Solubilisation de Zinc

Ce teste a été réalisé 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 4**), puis ils ont été incubés à 28°C pendant 72h. La formation d'une zone claire autour des colonies bactériennes indique la solubilisation du Zinc par ces souches

### 3.1.3. Production de sulfate d'hydrogène

Les souches ont été ensemencées sur le milieu gélose SIM (**annexe 5**) et incubé à 37°C pendant 48h. Le noircissement du milieu de culture indique un test positif, cependant aucun changement de la couleur du milieu de culture n'indique un test négatif.

### 3.1.4. Test d'indole

Les isolats ont été inoculés dans des tubes à essai contenant un bouillon tryptone (**annexe3**). Ensuite, les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 48 h. Après incubation, quelques gouttes de réactif Kovac ont été ajoutées aux tubes. L'apparition d'un anneau rouge cerise dans la couche supérieure indique que le test est positif alors que, son absence indique un test négatif (**Fig.6**).



**Figure 4** :Préparation de bouillon tryptone et réalisation du test d'indole

### 3.1.5. Test catalase

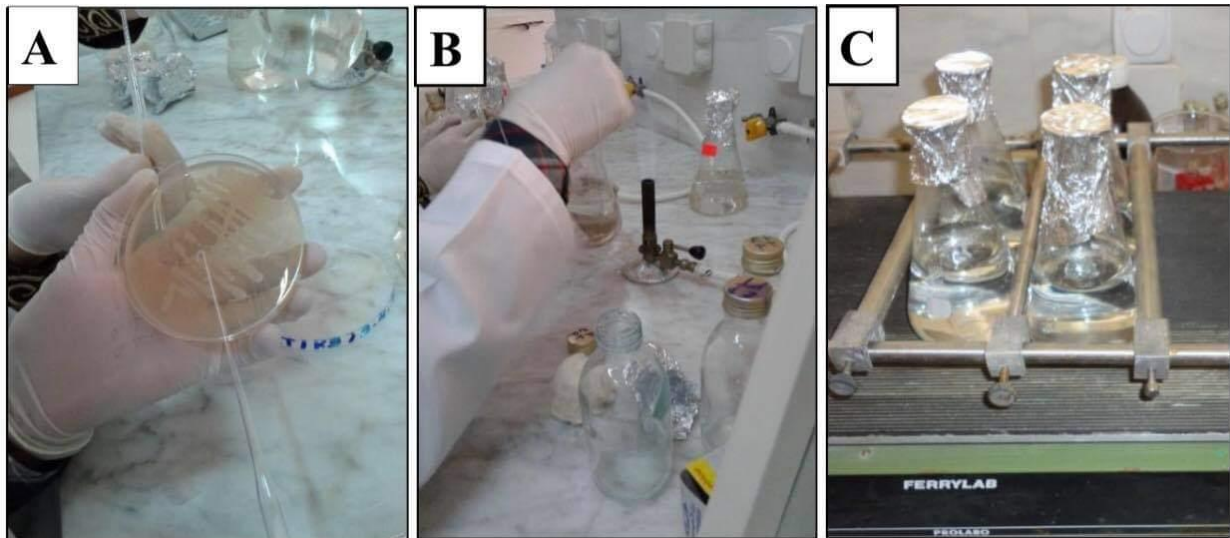
Les souches bactériennes ont été examinées pour leur activité catalase selon la méthode de **Lévy et al.(1992)**. Des cultures bactériennes fraîches ont été transférées sur une lame en verre, puis une quantité appropriée de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% a été ajouté sur les lames. La formation de bulles d'aires en 10 secondes confirme que la souche à une activité catalase (**Fig.7**).



**Figure 5 :** Test catalase

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

Les isolats ont été cultivés dans un milieu YEM liquide dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de YEM liquide et incubés sous agitation à 120 tpm, pendant 24h à 28 °C. Après 24h d'incubation on a mesuré la densité bactérienne (lecture à la spectrophotométrie à 630 nm de longueur d'onde) (**Fig.8**).

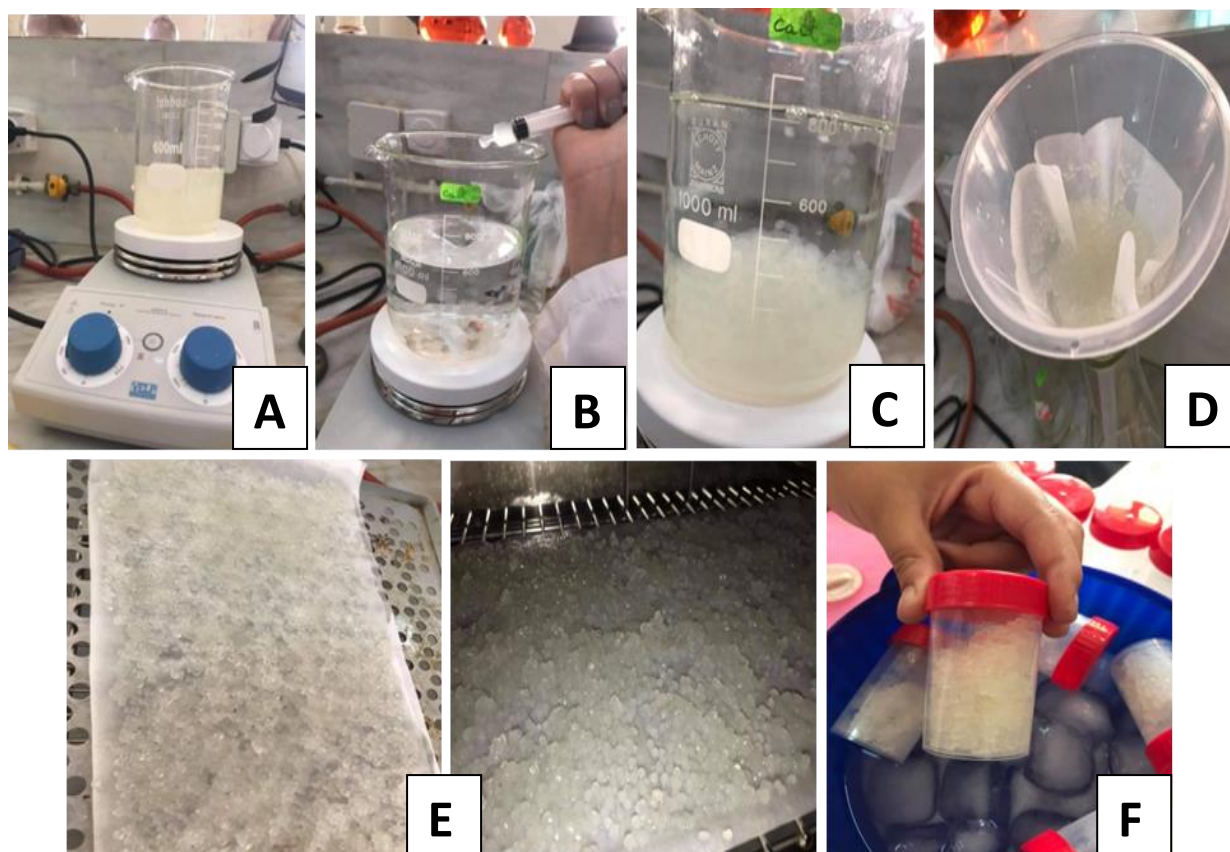


**Figure 6 :** Préparation de l'inoculum bactérien pour l'encapsulation : (A) Mélanges des colonies dans le bouillon du YEM liquide ; (B) Agitation du mélange pendant 24h.

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

L'encapsulation des huit isolats **Ik1, Ik2, Ik3, Ik4, F1, F2, F3** et **f4** 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 rhizobium dans un rapport de 2:1 respectivement **(A)**. Les mélanges contenant les cellules des huit 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) **(B) (Fig.9)**.

Après la réaction de formation de billes **(C)**, les microcapsules obtenues ont été nettoyées par l'eau stérile trois fois **(D)**. Ensuite, toutes les microcapsules ont été collectées et séchées dans l'étuve à 40 °C pendant 1 h **(E)**. Après le séchage les bioengrais formulés ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C pendant 10 jours jusqu'à la réalisation du test de germination **(F) (Fig.9)**.



**Figure 7 :** Préparation des microcapsules(A) : Solutions composites ont été mélangées de manière homogène avec le bouillon bactérien, (B) : Ajout de mélange goutte à goutte avec une aiguille d'injection, (C) : Microcapsules obtenues nettoyées à l'eau stérile, (D) :Séchage de microcapsule à 40 °C, (E) : Stockage des microcapsules séchées granulées.



## 5. Evaluation du potentiel des bioengrais après une courte durée de stockage

### 5.1. Matériel végétal

Le test de germination et l'application des bioengrais formulé ont été réalisés sur la plante modèle : le maïs (*Zea mays*), en utilisant une population achetée du marché à Tiaret.

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

Les graines du maïs ont été désinfectées puis mises en germination selon les étapes suivantes (Schwachtje et al., 2011)(Fig.10) :

- Mise des graines dans de l'eau de javel pendant 2 min ;
- Rinçage par l'eau distillée, plusieurs fois ;
- Mettre dans des boîtes de Pétri couvert par un papier filtre imbibé ;
- Enfin, les boîtes Pétri sont mises dans des conditions ambiantes pour la germination.



**Figure 8 :** Mise en germination des graines du maïs dans des boîtes de Pétri, A : Désinfection des graines ; B : rinçage par l'eau distillée ; C : graines du maïs sur un papier filtre imbibé ; D : incubation des grains

Après deux jours de germination, les grains ont ensuite été mis dans des papiers filtre (témoin + les 8 souches) en raison de 8 graines/papier. Par la suite, les papiers ont été enroulés (Fig. 11) et disposés verticalement dans 04 gobelets contenant de l'eau distillée au début. Après 2 jours, les bioengrais à base de rhizobium (Ik1, Ik2, Ik3, Ik4, F1, F2, F3 et F4) ont été appliqués (20 g de bioengrais dans chaque gobelet). Le 5ème gobelet ne contient que l'eau distillée sans ajout de bioengrais et a été considéré comme témoin (Fig. 11). L'application des bio engrais a été répétée pour une deuxième fois après 6 jours de culture (Fig. 11).

Les gobelets ont été mis en culture dans une chambre de culture réglée à 28°C avec un photopériodisme de 16h lumière/8h obscurité.



**Figure 9** : Mise en germination des graines de maïs dans des papiers filtre après application des bioengrais.

### **5.3. Paramètres mesurés**

10 jours après l'application des bioengrais des mesures de paramètre de croissance ont été effectués pour évaluer l'effet des bioengrais sur le développement de la plante.

#### **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.

# *Résultats et Discussion*

Les rhizobiums constituent environ de 6% de la flore bactériennes du sol. Elles sont capables d'établir une relation symbiotique avec les plantes et notamment avec les légumineuses. Outre leurs activités fixatrices de l'azote atmosphérique, les rhizobiums contribuent considérablement à l'amélioration de la disponibilité des phosphates comme elles peuvent produire des phytohormones, des siderophores et de l'HCN (Kishore et al., 2006).

#### 5.4. Caractérisation et identification des rhizobiums

L'identification des souches isolées a porté sur l'étude de leurs caractères phénotypiques, culturels et biochimiques. Dans notre étude, 8 rhizobiums ont été identifiés. Ces souches ont été nommées **Ik1, Ik2, Ik3, Ik4, F1, F2, F3 et F4**.

#### 5.5. Identification phénotypique des souches rhizobiums

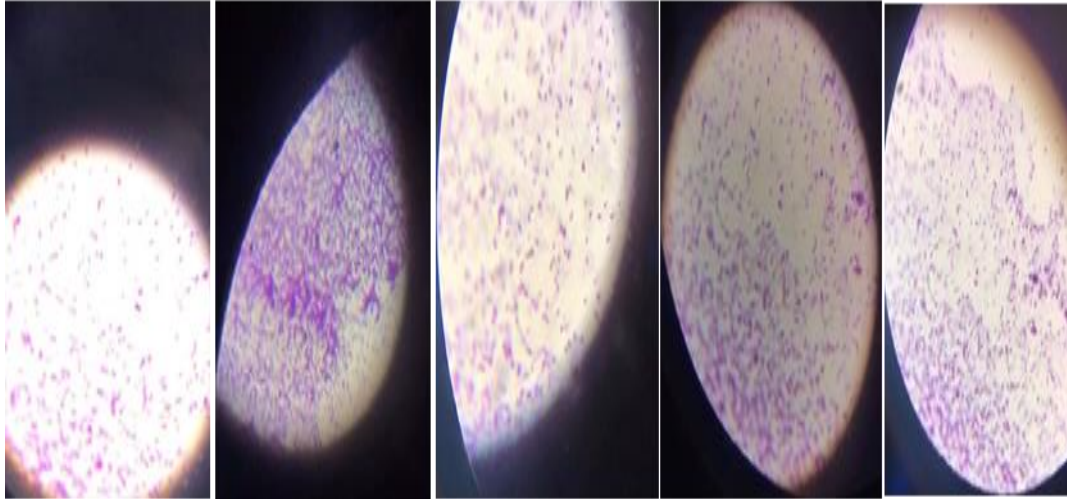
L'observation microscopique permet de déterminer la morphologie des cellules d'une espèce bactérienne. Le **tableau 03** montre toutes les caractéristiques morphologiques de nos isolats.

**Tableau 2** : Caractéristiques culturelles et phénotypiques des rhizobiums isolés.

Isolats	Marge	Odeur	Couleur	Forme	Réaction degram
<b>Ik1</b>	Lisse	-	Jaune clair	Coccobacille	-
<b>Ik2</b>	Lisse	-	Jaune	Bacille	-
<b>Ik3</b>	Lisse	+	Jaune clair	Bacille	-
<b>Ik4</b>	Lisse	+	Jaune	Bacille	-
<b>F1</b>	Lisse	+	Crème	Bacille	-
<b>F2</b>	Lisse	+	Jaune	Bacille	-
<b>F3</b>	Lisse	+	Jaune	Bacille	-
<b>F4</b>	Lisse	+	Jaune	Bacille	-

Selon le tableau 3, 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 Ik1 présente une forme coccobacille, et la souche, tandis que les souches qui restent ont une forme bacille.

Après la coloration de gram (**Fig. 12**), les huit isolats Ik1, Ik2, Ik3, Ik4, F1, F2, F3 et F4 ont données une coloration rose, elles ont donc une réaction de Gram négative (Gram -). Par ailleurs, l'ensemencement des souches sur le milieu YEM solide a montré que la majorité ont une couleur jaune ou jaune clair (les souches Ik1 et Ik3). Alors que, la souche F1 a une couleur crème **tableau 3**.



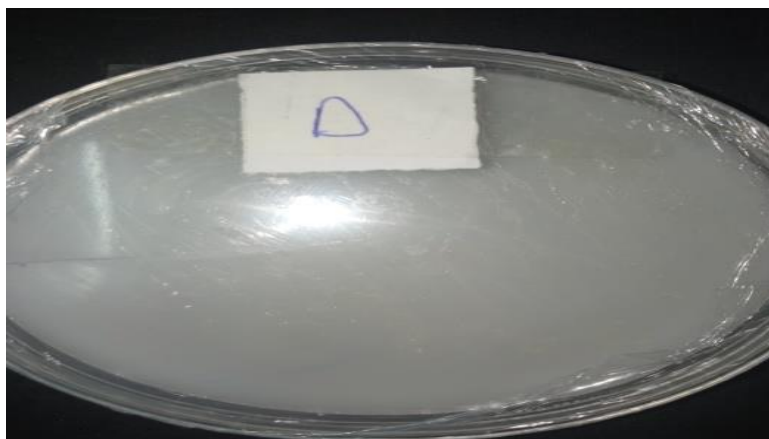
**Figure 10 :** Observation microscopique des bactéries isolées sous microscopique optique

### **5.6. Caractérisation biochimique des souches rhizobiums**

Les résultats de la caractérisation biochimiques des huit souches bactériennes isolées du sol rhizosphérique sont résumés dans le tableau et sont détaillés en dessous.

#### **5.6.2. Fixation de l'azote**

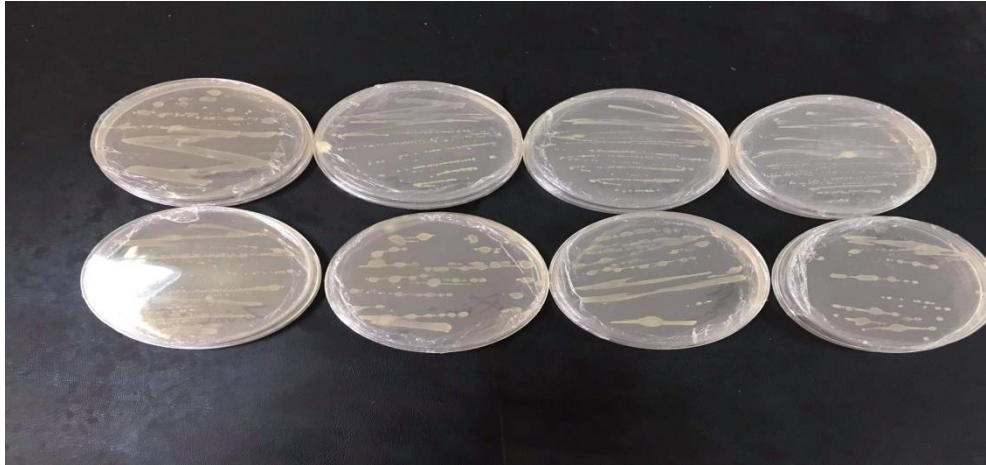
Les rhizobiums sont connus par leur pouvoir à fixer l'azote atmosphérique pour les plantes. La capacité de fixation de l'azote a été évaluée par l'étude de la croissance de cinq souches rhizobiums sur un milieu de culture "Ashby" sans azote. Nos résultats ont montré que les huit souches isolées ont une capacité fixatrice de l'azote atmosphérique (**Fig. 13**).



**Figure 11 :** Croissance des souches isolées sur le milieu de culture Ashby

**5.6.3. Solubilisation du zinc**

La solubilisation de zinc sur le milieu de culture spécifique révélée par l'apparition d'un anneau claire autour de colonies. Les résultats obtenus ont montré que la majorité des souches rhizobiums (Ik1, Ik2, Ik3, F1, F3 et F4) ont pu solubiliser le zinc par la formation d'un anneau



claire autour des colonies (Fig. 14).

**Figure 12 :** Résultats du test de solubilisation de zinc.

**5.6.4. Production de sulfate d'hydrogène**

Les souches Ik1, Ik2, Ik3, F2, F3 et F4 ont présenté un pouvoir de production de sulfate d'hydrogène. Cependant les souches qui restent ont montré un résultat négatif avec ce test

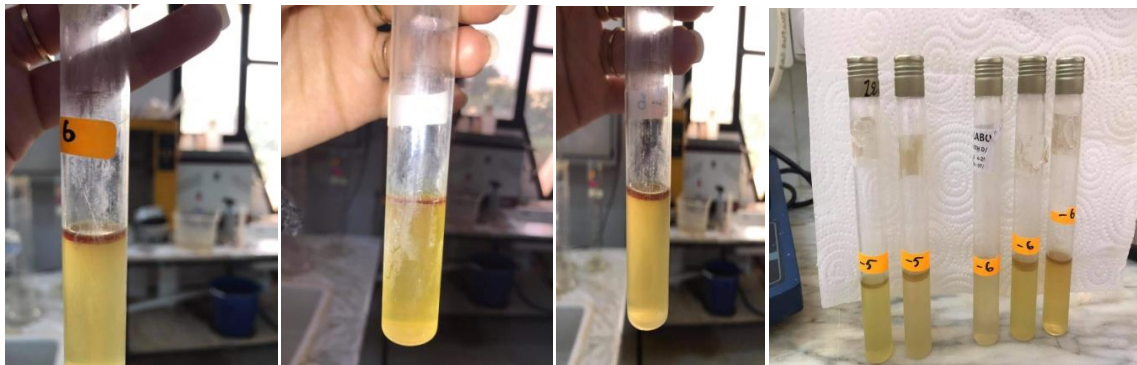


(Fig. 15).

**Figure 13** : Résultats de test de production de sulfate d'hydrogène

### 5.7. 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 sept souches (**Fig.16**).

**Figure 14** : Résultats du test d'indole

### 5.8. Test de catalase

Pour caractériser une bactérie, il est préférable de connaître son type respiratoire. Après l'ajout de quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), toutes nos souches ont réagi positivement par la production des bulles d'air (**Fig.17**).

**Figure 15** : Test de catalase positifs des rhizobiums.

Tableau 3 : Caractères biochimiques des isolats.

Souches bactériennes	Fixation d'azote	Production de sulfate d'hydrogène	Solubilisation de zinc	Test d'indole	Test de catalase
<b>Ik1</b>	+	+	+	+	+
<b>Ik2</b>	+	+	+	+	+
<b>Ik3</b>	+	+	+	+	+
<b>Ik4</b>	+	-	-	+	+
<b>F1</b>	+	-	+	+	+
<b>F2</b>	+	+	-	+	+
<b>F3</b>	+	+	+	+	+
<b>F4</b>	+	+	+	+	+

### 5.9. Encapsulation et formulation des bioengrais

La micro encapsulation est considérée comme une méthode efficace et pratique pour la conservation et l'application des microorganismes (**szczech et maciorowski, 2016**). Dans notre étude, les bioengrais obtenus sont une couleur blanche, sont lisses et solides, ce qui permet leur conservation pendant 10 jours (**Fig. 18**).





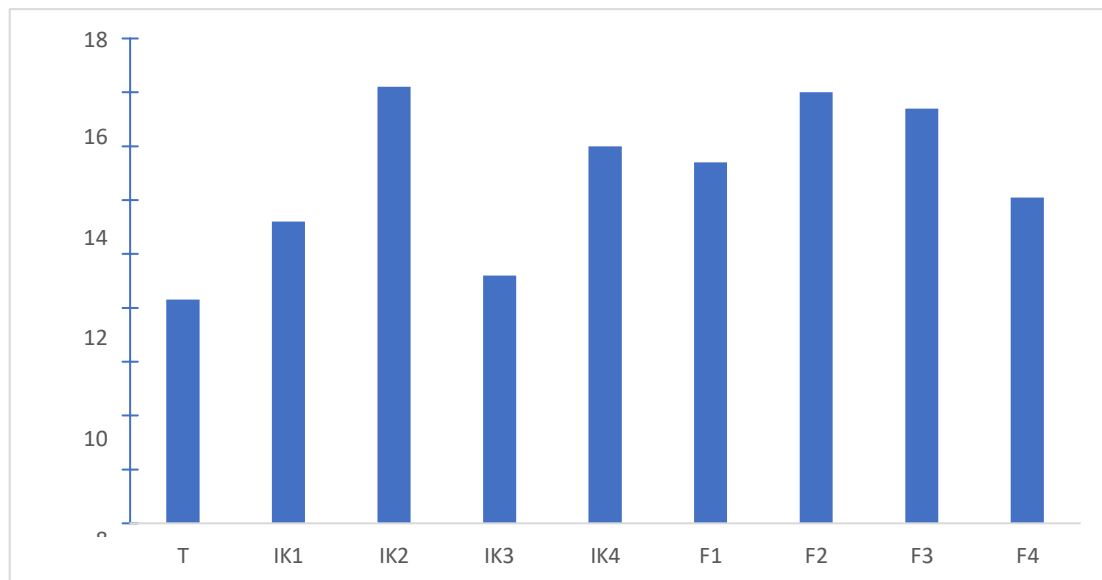
**Figure 16 :** Bioengrais à base de nos isolats**5.9.2. Effet des bioengrais sur la germination et croissance des graines de maïs**

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

**5.9.3. Longueur moyenne des racines**

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

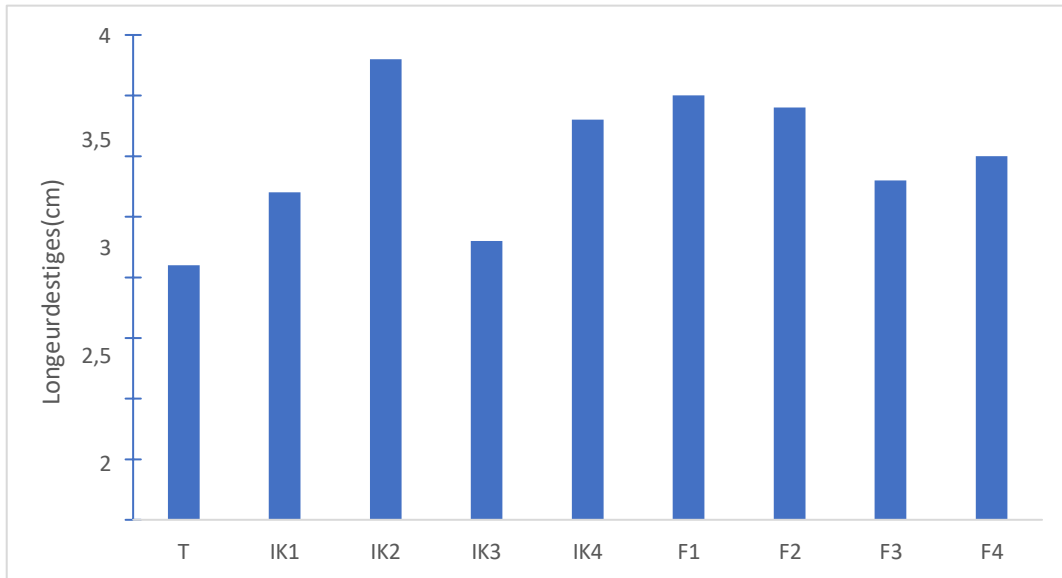
Après dix jours d'application des engrais, les valeurs les plus élevées ont été obtenues chez les racines des plantes après application du bioengrais de la souche Ik2, où la longueur moyenne des racines est de 16,2 cm. Suivi par les racines des bioengrais F2 et F3 avec des longueurs de 16 et 15,4 cm respectivement. Cependant la longueur des racines du témoin est de 8,3 cm (**Fig.19**).

**Figure 17 :** Longueur des racines des plantes de maïs après application des bioengrais à base des rhizobiums.**5.9.4. Longueur moyenne des tiges**

Les bioengrais de PGPR affectent légèrement 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 Ik2 avec 3,8 cm, suivi par les engrais des souches F1 et F2

avec 3,5 cm et 3,4 cm respectivement. Alors que quelques bioengrais ont montré un effet légèrement supérieure au témoin avec 2,7 cm, 2,3 cm et 2,1 cm pour les souches Ik1 et Ik3 et le témoin respectivement (**Fig. 20**).



**Figure 20** : Longeur des tiges des plantes de maïs après application des bioengrais à base des rhizobiums

**Discussion**

Les PGPR y'a compris les rhizobiums offrent un moyen efficace pour remplacer les engrais chimiques, les pesticides, dans l'agriculture. Ces bactéries peuvent améliorer la germination des graines, la croissance des racines et des pousses, le rendement, l'absorption des nutriments et la tolérance au stress des plantes et, aussi sont capables de contrôler quelques maladies (**Egamberdieva et al., 2011**).

Les analyses par séquençage d'ADN des communautés bactériennes rhizosphérique ont facilité le développement de bioengrais et de communautés bactériennes artificiellement construites et ont fourni une approche hautement efficace pour appliquer les PGPR en tant que bioengrais 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**).

Dans cette étude, 8 souches de rhizobiums ont été isolées à partir de la rhizosphère de la fève. Ces souches ont été utilisées dans la formulation des bioengrais par la technique d'encapsulation. Ainsi, afin d'avoir une idée sur le potentiel des rhizobiums et des bioengrais formulés à base de ces souches dans l'amélioration de la croissance des plantes il fallait tout d'abord les identifier et les caractériser en basant sur les traits PGP (promouvoir la croissance des plantes).

Les rhizobiums sont des bactéries à Gram négatif qui peuvent former des nodules racinaires chez les légumineuses et établir une symbiose avec un hôte pour réduire l'azote atmosphérique en ammonium (**Ahmed F, Khan MS, 2008**). En plus de son rôle essentiel dans la fixation symbiotique de l'azote (SNF), les rhizobiums jouent également un rôle important dans les activités PGP telles que la sécrétion d'hormones de croissance comme l'acide indole acétique (IAA), qui montre une réponse positive sur la croissance des plantes, et effectuent également une fonction principale dans la formation et le développement des nodules radiculaires. Les espèces potentielles de *Rhizobium* avec le trait de solubilisation du phosphate ont un double avantage pour les plantes et réduisent le coût des engrais et améliorent potentiellement le rendement des plantes grâce à la libération de phosphate (**Arshad, Met, Frankenberger, 1993**).

L'azote (N) est l'élément principal pour la nutrition des plantes et sa teneur est l'un des facteurs les plus importants qui affectent la croissance des cultures et détermine la quantité des rendements des cultures (**Amâncio et Stulen, 2004**). L'atmosphère est la principale source d'azote, sous forme diatomique (N<sub>2</sub>), il est rendu disponible pour les plantes par minéralisation liée à l'activité des bactéries. En outre, certains PGPR facilitent la croissance et le développement des plantes par l'apport d'azote aux plantes par fixation d'azote atmosphérique (**Figueiredo et al., 2008**).

La croissance des bactéries sur le milieu « Ashby » dépend de leur aptitude à fixer l'azote. Dans notre étude, on a trouvé que tous les isolats rhizobium ont fixé l'azote. Plusieurs auteurs ont supposé que la majorité des bactéries rhizosphériques ont la capacité de fixer le N atmosphérique ce qui augmente le rendement des cultures (**Rodge et al., 2016**).

La fixation d'azote par les bactéries pour les cultures légumineuses est bien connue et étudiée. Les études montrent que la fixation d'azote se fait principalement par ; *Rhizobium* sp. ; *Pseudomonas* Sp. ; *Azotobacter* sp. ; *Bacillus* sp...etc. (**Vogel et al., 2016**). Le BNF symbiotique par *Rhizobium* associé aux légumineuses à graines est de 10 Tg Ainsi, la fixation totale d'azote terrestre est de 140 Tg N/an.

Ce sont des bactéries à Gram négatif, immobiles, strictement aérobies et oxydase positives. Les colonies de cette bactérie sont grises, collantes, rondes, en forme de dôme et opaques (**Pilet et al., 1979**).

En outre, l'AIA est l'auxine (phytohormone) la plus importante produite par les plantes et de nombreuses bactéries rhizosphériques. 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'IAA 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**).

Tous les isolats ont montré des résultats positifs pour la production de catalase. L'activité de la catalase dans les souches bactériennes peut être potentiellement très avantageuse et les souches bactériennes montrant une activité catalase doivent être très résistantes aux stress environnementaux, mécaniques et chimiques (**Singh et al, 2016**).

De petites macrobilles, contenant des rhizobiums, insolubles sphériques et de couleur blanche se sont formées lorsqu'une solution d'alginate de sodium avec une solution des rhizobiums 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 **Roy Chowdhury 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 *Brassic napus* L.

# *Conclusion*

Les PGPR dont les rhizobiums peuvent être amélioré la productivité agricole à travers différents mécanismes et processus. Pour cette raison, il est urgent d'appliquer des outils et des techniques modernes pour l'amélioration de l'application des PGPR qui pouvant servir de clé à une agriculture durable.

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

Dans la première partie : huit souches codées Ik1, Ik2, Ik3, Ik4, F1, F2, F3 et F4, ont été isolées à partir de la rhizosphère de la fève dans la wilaya de Tiaret. Ces souches ont été identifiées morphologiquement et biochimiquement. Les huit souches ont un Gram négatif avec une couleur jaune. De même, ils ont enregistré des capacités de fixation d'azote, de production de phytohormones (indole), de solubilisation de zinc, de production de sulfate d'hydrogène et un test de catalase positifs pour la majorité de nos souches isolées.

Dans la deuxième partie : des bioengrais ont été formulées à base de chaque souche. Ces bioengrais ont été obtenus par encapsulation des souches dans l'alginate de sodium et l'amidon. Des bioengrais sous forme de billes blanches et rigide ont été obtenues.

Après une courte durée de stockage et afin d'évaluer et confirmer le pouvoir de ces bioengrais. Ces dernières ont été appliquées sur les graines de maïs : L'apport des bioengrais à base de nos souches a montré un résultat positif sur 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 et de rhizobiums, pour cela il serait intéressant d'utiliser :

- ✚ Des combinaisons de plusieurs souches/espèces de rhizobiums pour augmenter l'efficacité des bioengrais ;
- ✚ Sélectionner des souches sur la base des traits PGP
- ✚ 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 Bibliographique*



Abnatura RD. (2013). Les Rhizobactéries PGPR. Bulletin Technique. Avril 2013 Issue.

Allaire, Gilles (editor) Daviron, Benoit (editor) Classification Agronomy & crop production Pages432

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

Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 705.

Arshad M et Frankenberger WT. (1993). Microbial production of plant growth regulators. *Plant and Soil*, 133(1) : 1-3 .

Baldi, R. D., Capetti, A., & Giovannini, G. 2015, *A&A* , 576, A38, 5P. Baldi, R. D.,

Basil Britto Xavier , Christine Lammens , Rohit Ruhel , Samir Kumar-Singh , Patrick Butaye, Herman Goossens, Surbhi Malhotra-Kumar, Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016 V 21, I 27, 07/Jul/2016 Article.

Bencheikh, A., Nourani, A., & Chabaca, M. N. (2017). Sustainability evaluation of agricultural greenhouse structures in southern of Algeria using AHP, case of study: Biskra province. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 19(1), 56-64.

Benson, D.R. & Silvester, W.B. (1993)• *Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbial Rev* 5: 293-319.

Benson, D.R., Vanden Heuvel, B. & Potter, D. (2004) *Actinorhizal symbioses: diversity and biogeography. Plant Microbiology* (ed Gillings M, Holmes A), pp. 100-127.

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.

Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of experimental botany*, 67(4), 995-1002.

Bravin, M. N., Martí, A. L., Clairotte, M., & Hinsinger, P. (2009). Rhizosphere alkalisation— a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper- contaminated soil. *Plant and soil*, 318(1), 257-268.

Saharan, V Nehra (2011) *Life Sciences and Medicine Research, Volume 2011: LSMR-21; Pub: April 30, 2011.*

Carlström, C. I., Field, C. M., Bortfeld-Miller, M., Müller, B., Sunagawa, S., & Vorholt, J. A. (2019). Synthetic microbiota reveal priority effects and keystone strains in the *Arabidopsis* phyllosphere. *Nature ecology & evolution*, 3(10), 1445-1454.

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.

Chen, H., Wu, H., Yan, B., Zhao, H., Liu, F., Zhang, H., ... & Liang, Z. (2018). Core microbiome of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* seed: a rich reservoir of beneficial microbes for secondary metabolism?. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 672.

Dal Cortivo, C., Barion, G., Visioli, G., Mattarozzi, M., Mosca, G., & Vamerali, T. (2017). Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: assessment of plant-microbe interactions by ESEM. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 247, 396-408.

Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M. C., & Poyart, C. (2016). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. Elsevier Masson.

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.

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.

Gagandeep Kaur, Dhiraj Sharma, Vikramjit Kaur 2016/4 *Indian Journal of Science and Technology* V9 I15 P 1-6.

Gobat, Alessandro Rettura<sup>1</sup>, P. Rosati, M. Nonino, R. A. E. Fosbury<sup>4</sup>, R. N. Menci, V. Strazzullo, S. Mei, R. Demarco, and H. C. Ford (2010) Published 2010 January 4 *The Astrophysical Journal*, V709, N 1.

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.

Großkopf, T., & Soyer, O. S. (2014). Synthetic microbial communities. *Current opinion in microbiology*, 18, 72-77.

Gupta, N., Vats, S., & Bhargava, P. (2018). Sustainable agriculture: role of metagenomics and metabolomics in exploring the soil microbiota. In *In Silico Approach for Sustainable Agriculture* (pp. 183-199). Springer, Singapore.

Harbort, C. J., Hashimoto, M., Inoue, H., Niu, Y., Guan, R., Rombolà, A. D., ... & Schulze-Lefert, P. (2020). Root-secreted coumarins and the microbiota interact to improve iron nutrition in *Arabidopsis*. *Cell host & microbe*, 28(6), 825-837.

He, Y., Wu, T., 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. Soil Biol.* 75, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.enjsobi.2016.05.002>.

<http://www.fao.org/home/fr/>

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.

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

Khalid, A. M. Arshad et Z. A. Zahir (2006). phytohormone: microbial production and application. In *biological to sustainable soil systems*. (Eds): N. Uphoff; A. S. Ball, E. Taylor et Francis/ CRC? Boca Raton, Florida p.207-220.

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 rhizobacteria. *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.

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.

Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1314-1335.

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

Mansour Ghorbanpoura, Javad Hadianb Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro- carbon V94, Nov 2015, P 749-759.

Mark (2015),. *Mechanisms of Ageing and Development* 151 2015 p 18-25.

Mehmood, A., Khan, N., Irshad, M., Hamayun, M., Husna, I., Javed, A., & Hussain, A. (2018). IAA producing endopytic fungus *Fusarium oxysporum* wlv colonize maize roots and promoted maize growth under hydroponic condition. *Eur Exp Biol*, 8(4), 24.

Mehmood, U., Inam-ul-Haq, M., Saeed, M., Altaf, A., Azam, F., & Hayat, S. (2018). A brief review on plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a key role in plant growth promotion. *Plant protection*, 2(2), 77-82.

Messaoudi hanane, Effets de l'inoculation avec des bactéries rhizosphériques sur la croissance du blé et le développement de quelques bio-agresseurs qui lui sont associés. l'ENSA 17/2014 P132.

Mhadhbi H, Moez J, Zitoun A, Limam F, Aouani M. Symbiotic effectiveness and response to mannitol-mediated osmotic stress of various chickpea–rhizobia associations. *World J Microbiol Biotechnol*. 2007;24:1027–35.

Mhatre, P. H., Karthik, C., Kadirvelu, K., Divya, K. L., Venkatasalam, E. P., Srinivasan, S., ... & Shanmuganathan, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 119-128.

Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, Parlett JH. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods*. 1984;2:233–41.

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.

Mueller, U. G., & Sachs, J. L. (2015). Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends in microbiology*, 23(10), 606-617.

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

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.

Nguyen TM, Kim J. A rapid and simple method for identifying bacterial polar lipid components in wet biomass. *J Microbiol.* 2017;55(8):635–9.

Pagan JD, Child JJ, Scowcroft WR, Gibson AH. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature (London).* 1975;256:40–407.

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.

Perret X, Broughton WJ. Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. *Plant Soil.* 1998;204:457–62.

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

Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: perspectives and challenges. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture* (pp. 129-157). Woodhead Publishing.

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.

Rahmoune, B., Morsli, A., Khelifi-Slaoui, M., Khelifi, L., Strueh, A., Erban, A., ... & van Dongen, J. T. (2017). Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. *Journal of plant interactions*, 12(1), 1-6.

Rahmoune, B., Zerrouk, I. Z., Bouzaa, S., Morsli, A., Khelifi-Slaoui, M., Ludwig-Müller, J., & Khelifi, L. (2019). Amino acids profiling in *Datura stramonium* and study of their variations after inoculation with plant growth promoting Rhizobacteria. *Biologia*, 74(10), 1373-1383.

Rao CR. The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhyaá.* 1964;26:329–58.

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.

Rency, A. S., Satish, L., Pandian, S., Rathinapriya, P., & Ramesh, M. (2017). In vitro propagation and genetic fidelity analysis of alginate-encapsulated *Bacopa monnieri* shoot tips using *Gracilaria salicornia* extracts. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 481-494.

Rodge, Seema P., et al (2016) " Isolation and characterization or PGPR from Roots of *Ficus religiosa* growing on concrete walls and its Effect on Plant Growth in Drought Condition." *Int.J.Microbiol.App.Sci* 5.9:583-593.

Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT. Bypassing cultivation to identify bacterial species. *Microbe*. 2014;9(3):111–8.

Rosegrant MW, Fernandez M, Sinha A (coordinating lead authors) 2009. Looking into the future for agriculture and AkST (Agriculture Knowledge, Science, Technology) In agriculture at a crossroads: global Report : International assessment of agriculture knowledge sciences and technology, ed. BD McIntyre HR Heren .jn wakhlungu, RT Watson .pp 307-76. Washington .Dc. Island.

Roy Chowdhury, 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.

Saad, M. M., Eida, A. A., & Hirt, H. (2020). Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. *Journal of experimental botany*, 71(13), 3878-3901.

Sahai, P., & Sinha, V. B. (2020). Microbiome: The Holobiont, Its Application and Effect on the Plant System. *The Plant Microbiome in Sustainable Agriculture*, 65-80.

Saidi S, Ramírez-Bahena MH, Santillana N, Zúñiga D, Álvarez-Martínez E, Peix A, Mhamdi R, Velázquez E. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:242–7.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406–25.

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

Sambrook JF, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Schlaeppli, K., & Bulgarelli, D. (2015). The plant microbiome at work. *Molecular Plant-microbe interactions*, 28(3), 212-217.

Schneider M, de Bruijn FJ. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer- assisted phylogenetic pattern analysis. *World J Microbiol Biotechnol.* 1996;12:163–74.

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

Sokolowska, E. M., Schlossarek, D., Luzarowski, M., & Skirycz, A. (2019). PROMIS: global analysis of PROtein-metabolite interactions. *Current protocols in plant biology*, 4(4), e20101.

Sprent JI, Ardley J, James EK. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol.* 2017;215(1):40–56.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1043–7.

Stan V, Gament E, Cornea CP, Voaideş C, Duşa M, Plopeanu G. Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. *Not Bot Hort Agrobot Cluj.* 2011;39(1):88–95.

Stepkowski T, Moulin L, Krzyzanska A, McInnes A, Law IJ, Howieson J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and South Africa. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7041–52.



Sullivan J, Joyce P. Model selection in phylogenetics. *Ann Rev Ecol Evol Syst.* 2005;36(1):445–66. Tan ZY, Xu XD, Wang ET, Gao JL, Martínez-Romero E, Chen WX. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:874–9.

Sweta Rathore, Parind Mahendra, kumar, Desai, Celine Valeria, Liew, Lai Wah, Chan, Paul Wan Sia, Heng. *Journal of Food Engineering* V 116, 2, May 2013, P 369-381.

Szczech and maciorowski : Microencapsulation Technique with Organic Additives for Biocontrol Agents March 2015 *Journal of Horticultural Research* 24(1) 10.1515/johr-2016-0013.

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

Thi Hai Yen, Tran; Thi Phuong Thao, Dang; Linh Thuoc, Tran *Protein and Peptide Letters*, Volume 21, Number 3, 2014, pp. 306-317(12).

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Res.* 1997;24:4867–82.

Tian CF, Wang ET, Han TX, Sui XH, Chen WX. Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Arch Microbiol.* 2007;188(3):273–82.

Tighe SW, de Lajudie P, Dipietro K, Lindström K, Nick G, Jarvis BD. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock microbial identification system. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50:787–801.

Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:249–66.

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.

Van Berkum P, Beyene D, Bao G, Campbell TA, Eardly BD. *Rhizobium mongolense* sp. nov., is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:13–22.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 1996;60:407–38.

Versalovic J, Schneider M, De Bruijin FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 1994;5:25–40.

Vincent JM. *A manual for the practical study of root nodule Bacteria.* Oxford: Blackwell Scientific; 1970.

Wang ET, Rogel MA, Sui XH, Chen WX, Martínez-Romero E, van Berkum P. *Mesorhizobium amorphae*, a rhizobial species that nodulates *Amorpha fruticosa*, is native to American soils. *Arch Microbiol.* 2002;178:301–5.

Wang JY, Wang R, Zhang YM, Liu HC, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Chen WX. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(2):616–24.

Wang Q, Zhu W, Wang E, Zhang L, Li X, Wang G. Genomic identification of rhizobia-related strains and threshold of ANI and core-genome for family, genus and species. *IJOEAR.* 2016;2(6):76–86.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray EGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 1987;37:463–4.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173:697–703.

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. Canadian Journal of Microbiology, 52(12), 1855-1864.

White LO. The taxonomy of the crown gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. J Gen Microbiol. 1972;725:65–574.

Wilson K. Current protocols in molecular biology. New York: Wiley; 1997. p. 2.4.1–5. Yoon SH, Ha SM, Lim JM, Kwon SJ, Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. Antonie Van Leeuwenhoek. 2017;110:1281–6.

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.

Yadav, A. N., Rastegari, A. A., Yadav, N., & Kour, D. (2020). Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture. Springer Singapore.

Zaloğlu, S., Kafkas, S., Doğan, Y., & Güney, M. (2015). Development and characterization of SSR markers from pistachio (*Pistacia vera* L.) and their transferability to eight *Pistacia* species. Scientia Horticulturae, 189, 94-103.

Zerrouk, I. Z., Rahmoune, B., Auer, S., Rößler, S., Lin, T., Baluska, F., ... & Ludwig-Müller, J. (2020). Growth and aluminum tolerance of maize roots mediated by auxin- and cytokinin-producing *Bacillus toyonensis* requires polar auxin transport. Environmental and Experimental Botany, 176, 104064.

Zerrouk, I. Z., Rahmoune, B., Khelifi, L., Mounir, K., Baluska, F., & Ludwig-Müller, J. (2019). Algerian Sahara PGPR confers maize root tolerance to salt and aluminum toxicity via ACC deaminase and IAA. Acta Physiologiae Plantarum, 41(6), 91.

Zhang YM, Li Y Jr, Chen WF, Wang ET, Tian CF, Li QQ, Zhang YZ, Sui XH, Chen WX. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain. Appl Environ Microbiol. 2011;77(18):6331–42.

Zhang YM, Tian CF, Sui XH, Chen WF, Chen WX. Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of rhizobia. PLoS One. 2012;7(9):e44936.

**Annexe**

**Annexe 1 :** Composition de milieu de culture Milieu YEM (Yeast Extract-Mannitol) (Vincent 1970).

- ❖ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0,5g/l
- ❖ MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O .....0,2g/l
- ❖ NaCl .....0,1g/l
- ❖ Extrait de levure..... 0,6g/l
- ❖ Mannitol .....10g/l

**Annexe 2 :** Composition du milieu de fixation de l'azote : milieu Ashby sans azote Gms / Litre

- ✓ Mannitol .....20.000
  - ✓ Hydrogénophosphate de potassium (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) .....0.20
  - ✓ Sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>).....0.20
  - ✓ Chlorure de sodium (NaCl).....0.200
  - ✓ Sulfate de potassium (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).....0.100
  - ✓ Carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) .....5.00
  - ✓ Agar.....15.000
- pH (à 25° C) 7.4 ± 0.2

**Annexe 3 :** Composition du tryptone sel (bouillon) pour 500 ml litre

- ✚ Peptone de caséine.....5 g
- ✚ NaCl ..... 2,5 g
- ✚ Eau distillée..... 500 ml

**Annexe 4 :** Composition du milieu de solubilisation de Zinc

- Glucose.....10g

- Sulfate d'ammonium .....0,1g
- Chlorure de potassium.....0.2g
- Hydrogénophosphate de potassium (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....0,1g
- Sulfate de magnésium (Mg So 4).....0,2g.
- Oxyde de Zinc.....0,1%
- Eau distillée.....500ml

**Annexe 5 : Composition de milieu de test de production de sulfure d'hydrogène Milieu****SIM g /L**

- Peptone de caséine.....20.0
- Peptone de viande ..... 6.6
- Citrate ferrique ammoniacal.....0.2
- Thiosulfate de sodium .....0.2
- Agar .....3

**Résumé**

Dans le but d' évaluer et caractériser les trait PGP des *rhizobiums* et le potentiel de promouvoir la croissance des plantes, 08 souches de *rhizobium* ont été isolé à partir de la rhizosphère de la fève dans la région de Tiaret.

Ces isolats ont été identifiés morphologiquement et biochimiquement, les résultats ont montrés que la majorité ont un gram négatif. Ensuite ces bactéries ont été caractérisé selon des traits biochimiques (PGP) pour leur capacité à fixer l' azote atmosphérique, solubiliser le zinc, le pouvoir de produire le sulfate d' hydrogène et leurs activité enzymatiques (catalase). La majorité des souches testées ont présenté des résultats positifs avec les tests précités.

Ultérieurement, des formulations des bioengrais à base des souches de *rhizobium* ont été réalisées en utilisant l' alginate de sodium et l' amidon (1.5% alginate de sodium et 3% d' amidon). L' évaluation de ces bioengrais a été faite après une courte durée stockage de 10 jours. Les bioengrais ont été testés sur les grains de maïs pendant 10 jours.

Nos résultats obtenus ont montré que les bioengrais, notamment celui produit à base des souches AF2 et IK4, ont améliorée significativement la longueur des racines et la longueur des tiges.

**Mots clés :** Rhizobium ; Bioengrais ; Encapsulation ; Fixation d' azote ; *Zea mays*

**Abstract**

In order to evaluate and characterize the PGP traits of rhizobia and their potential to promote plant growth, 08 rhizobia strains were isolated from the rhizosphere of the bean in the region of Tiaret.

These isolates were identified basic on morphologically, the results showed that the majority of our strains are gram negative. Then these bacteria were characterized according to biochemical traits (PGP) for their ability to fix atmospheric nitrogen, solubilize zinc, power to produce hydrogen sulphate and their enzymatic activity (catalase). The majority of the strains tested showed positive results with the above tests.

Subsequently, formulations of the bio-fertilizers based on the rhizobium strains were made using sodium alginate and starch (1.5% sodium alginate and 3% starch). The evaluation of these bio-fertilizers was made after a short storage period of 10 days. The bio-fertilizers were tested on the maize for 10 days.

Our results have shown that bio-fertilizers, in particular that produced based on strains AF2 and IK4, significantly improved the length of the roots and the length of the stems.

**Keywords :** Rhizobium ; Bio-fertilizer ; Encapsulation ; Nitrogen fixation ; *Zea mays*

#### ملخص

من أجل تقييم ووصف سمات وقدرات PGP للبكتيريا من نوع Rhizobium وكذا امكانية تعزيز نمو النبات. تم عزل 08 سلالات Rhizobium من جذور نبات الفول في مدينة تيارت. تم التعرف على هذه السلالات تشكيلها وبيوكيميائيا. أظهرت النتائج المتحصلة عليها ان جلها تها بالبكتيريا ذات Gram سالب. تم بعد ذلك توصيف هذه البكتيريا وفقاً للصفات البيوكيميائية (PGP) لقدرة على تثبيت النيتروجين و جين في الغلاف الجوي، وإذابة الزنك، والقدرة على إنتاج كبريتات الهيدروجين ونشاطها الأنزيمي (الكاتالاز). أظهرت غالبية السلالات المختبر نتائج ايجابية مع الاختبار المذكور أعلاه. بعد ذلك، تم عمل تركيبات الأسمدة الحيوية القائمة على سلالات التريز وبيومباستخدام الجينات الصوديوم والنشا 1.5 (% الجينات الصوديوم 3% نشا). تم تقييم هذه الأسمدة الحيوية بعد فترة تخزين تقصير مدتها 10 أيام. تم اختبار الأسمدة الحيوية على حبات الذرة لمدة 10 أيام. أظهرت نتائجنا أن الأسمدة الحيوية، خاصة تلك التي تم إنتاجها بناءً على سلالات AF2 و IK4، حسنت بشكل كبير من طول الجذور وطول السيقان

**الكلمات الرئيسية:** Rhizobium. الأسمدة الحيوية. التغليف؛ تثبيت النيتروجين؛ *Zea mays*