

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



UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID – TLEMCCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de L'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement
« LAMAABE »

THESE

Présentée par
Melle BOUALI Waffa

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

Option : Microbiologie

Contribution à l'élaboration d'un soucier bactérien et caractérisation de la flore *Bacillus cereus* dans le Sud -Ouest Algérien

Soutenu le : 22 / 04 / 2017

Jury :

Président	Bendahou Mourad	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Ghalem Said	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Bekada Ahmed Mohamed Ali	Professeur	C.U. de Tissemsilt
Examineur	Barka Mohamed Salih	Dr MCA	U. de Tlemcen
Examineur	Seddiki Sidi Mohamed Lahbib	Dr MCA	C.U. de Naâma
Invitée d'honneur	Malek Fadila	Dr MCB	U. de Tlemcen
Directeur de thèse	Abdelouahid D.E.	Professeur	U. de Tlemcen

Année Universitaire : 2016/2017

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

J'exprime tout d'abord mes remerciements au Professeur Abdelouahid Djamel Eddine qui m'a honoré de sa confiance en acceptant la direction de cette thèse et a fait preuve de patience à mon égard, je lui reconnais d'avoir toujours respecté et facilité mes initiatives, je tiens à le saluer pour son exigence, sa disponibilité, ses encouragements, et ses conseils très précieux, je suis très reconnaissante de la confiance qu'il m'a témoignée.

Je remercie infiniment Mr Bendahou Mourad, Professeur à l'université de Tlemcen, d'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il me soit permis de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Mes remerciements sincères et respectueux vont également Mr Ghalem Said, Professeur à l'université de Tlemcen, pour sa disponibilité et ses précieux conseils, pour avoir accepté de consacrer du temps, examiner et juger ce travail comme rapporteur, et pour siéger dans ce jury en y apportant sa compétence et son expertise. Je lui exprime ma reconnaissance pour ses qualités humaines.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Bekada Ahmed Mohamed Ali, Professeur à l'université de Tissemsilt, pour avoir accepté de venir à Tlemcen honorer de sa présence mon jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie vivement Mr Barka Mohamed Salih, Docteur Maître de conférence à l'université de Tlemcen pour sa participation à mon jury de thèse et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je remercie également Mr Seddiki Sidi Mohamed Lahbib, Docteur Maître de conférence au centre universitaire de Naâma, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger, et de faire partie du jury. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Mme Malek Fadila, Docteur Maitre conférence en microbiologie appliquée, au département de biologie de l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de codiriger cette thèse, en contribuant à la conception et à l'exécution de son sujet, ainsi qu'à l'élaboration de l'article publié dans African journal of Microbiology research. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier de son expérience sur le groupe *Bacillus cereus* et sur le biofilm en me sensibilisant à l'importance du potentiel PGP de cette flore sporulée et en me formant aux techniques d'adhésion et de formation du biofilm ainsi qu'à la technique de caractérisation des propriétés de surface des spores. Je la remercie également d'avoir accepté de me faire l'honneur de participer à ce jury en tant qu'invitée tout en lui présentant mes excuses de ne pas être nommée à la place qui lui revient.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma sincère reconnaissance au professeur Maarouf Abderrazak, directeur du centre universitaire de Naâma pour ses encouragements, et ses précieux conseils.

Mes plus vifs remerciements vont au Professeur Fikrettin Sahin, Directeur du Laboratoire de Microbiologie, department of Genetic and bioengineering, faculty of Engineering and architecture, Yeditepe University, Turkey, pour son accueil et son aide pour l'accomplissement de la partie biologie moléculaire.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mr Bendimerad Khatib, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen. Je souhaite également remercier chaleureusement tous les autres membres du laboratoire vétérinaire qui m'ont, chacun à sa manière, soutenue, aidé et encouragé dans ce travail, en particulier Mr Messli Badis

Je remercie le Professeur Moussa Boudjemaa Boumediene, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire LAMAABE. Je voudrais aussi remercier l'ensemble du personnel du laboratoire LAMAABE

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont traversé ma vie, toutes celles et ceux avec qui j'ai partagé une heure, un mois ou plus et qui ont contribué à leur façon, à faire ce que je suis devenue. Je suis riche de toutes les expériences que nous avons pu partager.

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier du plus profond de mon cœur mes parents pour leur amour quotidien, pour leur présence dans tous les moments, pour les sacrifices consentis pour ma réussite.

Un merci particulier à ma tante Naziha pour son soutien, son aide à distance, sa bonne humeur, et sa curiosité intellectuelle à l'égard de ce sujet en particulier et de la recherche en générale, je tiens à remercier ma sœur et mes frères pour leurs soutiens tout au long de cette thèse.

Enfin je remercie tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ce travail.

*« Dans les champs de
l'observation, le hasard ne
favorise que les esprits
préparés »*

Louis PASTEUR

*« L'expérience est une
observation provoquée dans le
but de faire naître une idée »*

Claude Bernard

ملخص

Bacillus cereus بكتيريا موجودة على نطاق واسع في الطبيعة ذات طبيعة ترابية، التربة هي الخزان الحقيقي لهذه البكتيريا فهي إيجابية الجرام عبارة عن عصيات هوائية أو لاهوائية اختيارية. في بعض الأحيان. هذه الأنواع المتعايشة في التربة هي أيضا قادرة على التكاثرون إنتاج الابواع التي تسمح لها أن تستمر في التربة حيث تتواجد بكثرة

من خلال هذه الاطروحة , تم عزل 70 سلالة *Bacillus cereus* , و45 سلالة *Bacillus cereus* من أربعة تربة الريزوسفيرمن مناطق الجنوب الغربي الجزائري .

سمحت هذه الدراسة بتحديد النمط الظاهري وذلك بدراسة سلوك هذه البكتيريا، وخاصة فيما يتعلق بدرجة الحرارة، مجال النمو عند جميع السلالات هو 15 إلى 45 درجة مئوية، وأظهر النتائج الأولية تنوع قليل للسلالات المعزولة وهيمنة نمط معين في التربة (I. biotype). وتشير الدراسات الخاصة المستندة إلى تحليل FAME وجود FAME 31 مختلفة في عشرة سلالات بكتيرية منجزة في هذه الدراسة، النتائج تظهر أن هناك ثلاثة أنواع من البكتيريا تنتمي إلى مجموعة *Bacillus cereus* صنف "أ"، والسلالات الأخرى تنتمي إلى مجموعة *Bacillus cereus* صنف "ب"، وتؤكد هذه النتائج على تنوع قليل للسلالات المعزولة وهيمنة في التربة لنوع معين (صنف "ب") الأصل المشترك للسلالات وكذلك الضغط الانتقائي للعوامل البيئية وخاصة درجة الحرارة في التربة قد يفسر التنوع القليل للسلالات. بالإضافة إلى هذه التحاليل قمنا بدراسة على المستوى الجزيئي وذلك باختيار سلالتين استنادا على تحليل FAME النتائج المتحصل عليها من خلال التسلسل ARN16S هي *Bacillus ATCC 14579 Bacillus cereus*. *thuringiensis serovar konkukian str.97-27*

وترتبط فعالية اللقاح البكتيري على تصنيف أنشطة PGP متعددة مثل إنتاج حامض الأندول (AIA) ، انحلالية الفوسفات ، تحلل النشا ، قدرة نشاط انزيم *casrinase* ، مضادة الفطريات والقدرة على تشكيل البيوفيلم. 100% من السلالات المعزولة لديها القدرة على تحلل النشا والكازين. فقط عشرة سلالات لديها القدرة على إنتاج AIA و انحلالية الفوسفات، 91% من *B.cereus* فعالة ضد *Aspergillus flavus MNHN 994294* . كما اثبتت تجارب الالتصاق العضوية والتي اظهرت ان السلالات تنقسم الى سلالات نافرة للماء (مسعورة) وسلالات محبة للماء ، و خاصية الالتصاق كانت مرتفعة في الركيزة الزجاجية أكثر من PVC

الكلمات الرئيسية:

Bacillus cereus ، التربة، تحديد، PGP، بيوفيلم.

RESUME

Bacillus cereus est une bactérie largement répandue dans la nature, d'origine tellurique. Le sol est un véritable réservoir de cette bactérie. Celle-ci appartient aux bacilles Gram positif, aérobies ou parfois anaérobies facultatifs. Cette espèce saprophyte du sol est également capable de se multiplier et de produire des spores qui lui permettront de persister dans le sol où elle est extrêmement représentée.

Dans le cadre de cette thèse, un total de 70 souches de *Bacillus spp.* et 45 souches de *Bacillus cereus* sont isolées et sélectionnées à partir de quatre sols rhizosphériques de la région Sud- Ouest Algérien.

Cette étude consiste à une identification via une approche phénotypique basée sur l'étude du comportement de ces bactéries, notamment à l'égard de la température. La gamme de température de croissance de toutes les souches isolées est de 15 à 45°C. L'identification phénotypique préliminaire montre une faible diversité des isolats et la dominance dans le sol d'un type spécifique (biotype I). Les études caractéristiques basées sur l'analyse FAME montrent qu'il ya un total de 31 FAMEs différents présents dans les dix souches bactériennes testées dans la présente étude. Les résultats des analyses des Fatty acid methyl ester montrent qu'il ya trois souches bactériennes appartenant au groupe *Bacillus cereus* sous-groupe « A », les autres souches appartiennent au groupe *Bacillus cereus* sous-groupe « B ». Ces résultats confirment la faible diversité des isolats et la dominance dans le sol d'un type spécifique (sous groupe « B »). L'origine commune des isolats associés aussi à la pression de sélection exercée par des conditions environnementales, spécialement la température dans le sol, peuvent expliquer la faible diversité des isolats. De plus, au niveau moléculaire les deux souches sélectionnées par les analyses des FAME retenues et identifiées par séquençage du gène de l'ARNr16S sont *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *Bacillus thuringiensis serovar konkukian str.97-27*

L'efficacité des inocula bactériens est liée à la caractérisation de multiples activités PGP telles que la production de l'acide indole acétique (AIA), de la solubilisation des phosphates, hydrolyse de l'amidon, l'activité protéolytique, de l'activité antifongique ainsi que de la capacité de la formation de bio-film. 100% des souches isolées ont la capacité d'hydrolyser l'amidon et la caséine. Seules dix souches isolées ont la capacité de la production AIA et de la solubilisation de phosphate, 91% des *B.cereus* sont efficaces

envers *Aspergillus flavus* MNHN 994294. Les souches avaient un caractère hydrophile et hydrophobe moyen selon leurs affinités respectives aux solvants organiques utilisés, et une adhésion plus importante sur un support en verre par rapport à un support en PVC.

Mots clés:

Bacillus cereus, sol, identification, PGP, biofilm.

ABSTRACT

Bacillus cereus is a group of bacteria frequently found in soil, widely distributed in the environment. They are a group of ubiquitously facultative anaerobic spore-forming Gram positive rods and are of health and economic benefits. The present study was conducted to identify, characterize about 70 *Bacillus* and 45 *Bacillus cereus* from 4 soil plots from southwestern Algeria.

This study consists of an identification via phenotypic approach, temperature effect on the maximal specific growth rate was studied in *Bacillus cereus*, all *B. cereus* isolates grown from 15°C to 45°C, the preliminary phenotypic identification showed a low diversity of isolates and dominance in the soil of a specific type (biotype I). The characterization studies based on FAME analysis showed that total 31 different FAMES were present in 10 bacterial isolates tested in the present study. Fatty acid profiles showed that bacterial isolates were classified into *Bacillus cereus* group, three isolates were *Bacillus cereus* Subgroup A, remaining isolates were *Bacillus cereus* Subgroup B. These results confirm a low diversity among the isolates., both the origin of the isolates and the pressure exerted by environmental conditions in the soil can explain the low diversity identified by our results, it has been reported that temperature is assumed to select some bacterial groups. In addition, at the molecular level, the two strains selected and identified by sequencing the 16S rRNA gene are *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* str.97-27.

The effectiveness of the bacterial inoculum is related to the characterization of multiple PGP activities such as indole acetic acid (IAA) production, phosphate solubilization, starch hydrolysis, proteolytic activity, the antifungal activity as well as biofilm formation. 100% of isolated bacterial strains had amylolytic and proteolytic activity. Only ten strains have the ability to AIA production and solubilization of phosphate, 91% of *B.cereus* are effective against *Aspergillus flavus* MNHN 994294. All strains presented a highly hydrophilic and middle hydrophobic character Based on their respective affinities to organic solvents, and adhesion greater in a glass support. Compared with PVC

Key words:

Bacillus cereus, soil, identification, PGP, biofilm

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Observation au microscope optique : de cellules végétatives (A) et de spores (B) de <i>B. cereus</i>	3
Figure 2 : Cellules végétatives de la souche <i>B. cereus</i> NVH 0075/95 en microscopie électronique à balayage.....	3
Figure 3: Colonies de <i>B. cereus</i> ATCC 14579 après 24h d'incubation à 30°C.....	4
Figure 4 : Représentation des cycles de vie de <i>B. cereus</i>	8
Figure 5 : Arbre phylogénétique du groupe <i>Bacillus cereus</i>	12
Figure 6 : Proportion des principaux composants du sol en volume.....	13
Figure 7: Interactions entre plantes et les bactéries coopératives (ici PGPR) dans la rhizosphère.....	17
Figure 8: Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates.....	20
Figure 9: Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale.....	22
Figure 10: The phytohormone ethylène affects a large number of different processes in the growth and development of a plant.....	25
Figure 11 : Mécanisme d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stress abiotiques.....	26
Figure12: Les différentes phases du phénomène d'induction de la résistance chez les plantes par les rhizobactéries.....	32
Figure 13 : Représentation schématique du développement d'un biofilm.....	36
Figure 14 : Colonisation et formation d'un biofilm par <i>Bacillus</i> sur la surface des racines.....	40
Figure 15 : Développement d'un biofilm bactérien sur la surface d'une racine d'une plante.....	41
Figure 16 : Schéma de la composition des parois des bactéries Gram+ et Gram-.....	43
Figure 17: Carte des limites administratives de la wilaya de Nâama.....	46
Figure 18 : Localisation des sites de prélèvement.....	50
Figure 19 : Situation géographique de la zone d'étude (Région de Naâma)	51
Figure 20 : Caractéristiques morphologiques de deux souches <i>de Bacillus spp</i>	64

Figure 21 : Caractéristiques morphologiques de deux souches de <i>B.cereus</i>	66
Figure 22 : Analyse des esters d'acides gras méthylés (FAME)	67
Figure 23 : Amplification 16S rDNA-PCR	67
Figure 24: Activités amylolytiques et protéolytiques de <i>B cereus</i> (Bact2)	73
Figure 25: Formation de biofilms par <i>B. cereus</i> par la méthode TM.....	77
Figure 26: Formation de biofilm dans les microplques de titration à 96 puits	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Diversité génétique et écologique de <i>B.cereus</i>	10
Tableau 2 : Diversité des souches bactériennes identifiées comme inducteurs de la résistance systémique chez les plantes et la diversité des pathosystèmes dans lesquels l'ISR est impliquée.....	31
Tableau 3: Exemple de formation d'un biofilm sur les plantes avec différents sites.....	39
Tableau 4: Echelle d'interprétation de la quantité de l'humus.....	53
Tableau 5 : Echelle d'interprétation de l'acidité actuelle.....	54
Tableau 6 : Echelle d'interprétation de la charge en calcaire dans le sol.....	55
Tableau 7 : Salinité des sols en fonction de la C.E.	55
Tableau 8 : Détermination des paramètres physico-chimiques des sols.....	56
Tableau 9 : Nombre des souches et leurs répartitions.....	63
Tableau 10 : Caractères biochimiques et physiologiques des 45 souches de <i>B. cereus</i>	64
Tableau 11: Composition des acides gras (% w/w) des 10 souches.....	68
Tableau 12 : Activités PGP des 45 souches de <i>B. cereus</i> de quatre différents sites.....	74
Tableau 13 : Pourcentage d'hydrophobicité des 10 <i>Bacillus cereus</i> isolées.....	76

Liste des abréviations

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

C_E : Conductivité électrique

dNTP : désoxy Nucléotide Tri-Phosphate

EPS : extracellular polymeric substances

MATS : Adhésion microbienne aux solvants (microbial adhesion to solvents)

FAME : fatty acid methyl ester

LPS : Lipopolysaccharides

MEB : microscopie électronique à balayage

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

rpm: rotation par minute

S.S: *sensu stricto*

SEM : scanning electron microscopy

μS : microSiemens

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : Groupe <i>Bacillus cereus</i>.....	3
Principaux caractères phénotypiques, considérations taxonomiques	3
Les sept groupes phylogénétiques majeurs.....	5
<i>Bacillus cereus sensus stricto</i>	5
<i>Bacillus anthracis</i>	6
<i>Bacillus thuringiensis</i>	6
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	7
<i>Bacillus cytotoxicus</i>	7
<i>Bacillus mycoides</i> et <i>Bacillus pseudomycoides</i>	7
Cycle de vie.....	8
Diversité écologique de <i>B. cereus</i>	9
CHAPITRE 2 : Le pouvoir PGP des bactéries du sol et de la rhizosphère.....	13
Le sol et ses composants.....	13
Facteurs influençant la structure des communautés bactériennes du sol.....	13
Facteurs abiotiques.....	14
Facteurs biotiques.....	15
Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique.....	16
Mécanismes d'action des PGPR.....	16
Biofertilisation.....	18
Fixation d'azote.....	18
Solubilisation du Phosphate.....	19
Phytostimulation.....	21
Production d'hormones de croissance.....	21
Acide indole acétique (AIA)	21
Cytokinines et gibbérellines.....	23
Rôle de l'éthylène.....	24
Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase.....	25
Biocontrôle.....	26
Compétition pour l'espace et les nutriments.....	27

Compétition pour le fer et production de sidérophores.....	27
Antibiose et parasitisme.....	28
Composés volatiles.....	29
Résistance Systémique Induite (ISR)	29
Les déterminants bactériens de l'ISR.....	33
Les composants de la surface des cellules.....	33
Les sidérophores.....	33
Les antibiotiques.....	33
L'acide salicylique.....	34
CHAPITRE3 : Etude de quelques propriétés PGP : Adhesion et formation des biofilm.....	35
Généralité sur les biofilms.....	35
Formation et développement du biofilm.....	35
Propriétés du biofilm.....	36
Aspects positifs.....	37
Biofilm de la rhizosphère.....	38
Les biofilms associés aux plantes.....	40
Paramètres qui influencent l'adhésion des bactéries.....	41
Influence du matériau.....	41
La charge de surface et le caractère hydrophobe des matériaux.....	41
Le nettoyage des surfaces.....	42
La rugosité des matériaux.....	42
Influence de la cellule bactérienne.....	42
Caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des cellules.....	43
La présence d'appendices (pili, flagelles) ou de substances polymériques extracellulaires.....	44
Le mode et le milieu de culture.....	44
Le temps de contact entre le micro-organisme et son support.....	44
CHAPITRE 4 : Présentation de la zone d'étude et analyses physico-chimique des sols.....	46
1. Matériel et méthodes.....	46
1.1 Présentation de la zone d'étude.....	46
1.1.1 La nature des sols.....	47
1.1.1.1 Sols calcimagnésiques.....	47
1.1.1.2 Sols minéraux bruts.....	47
1.1.1.3 Sols peu évolués.....	48

1.1.1.4. Sols halomorphes.....	48
1.1.2 Type de couvert végétal	48
1.1.2.1 Steppes à alfa (<i>Stipa tenacissima</i>)	49
1.1.2.2 Steppe à armoise blanche.....	49
1.1.2.3 Steppe à sparte (<i>Lygeum spartum</i>)	49
1.1.2.4 Steppe à halophytes	50
1.1.2.5 Steppe à psammophytes.....	50
1.2 Localisation des sites de prélèvement.....	50
1.3 Prélèvement des échantillons.....	52
1.4 Analyses physico-chimiques des sols (Analyses pédologique)	52
1.4.1 Détermination de la texture	52
1.4.2 Détermination de la matière organique.....	53
1.4.3 Mesure de pH	54
1.4.4 Dosage du calcaire total (CaCO_3)	54
Mesure de la conductivité électrique (CE)	55
2. Résultat et discussion	56
2.1 Analyse du sol.....	56
CHAPITRE 5 : Isolement et identification des souches.....	58
1. Matériel et méthodes.....	58
1.1 Isolement des bactéries.....	58
1.2 Identification du genre <i>Bacillus</i>	58
1.3 Conservation des souches.....	59
1.4 Identification du groupe <i>B. cereus</i>	59
1.4.1 Mise en évidence de la production de lécithinase	59
1.4.2 La recherche de l'hémolysine.....	59
1.4.3 Principaux caractères biochimiques et physiologiques	60
1.4.4 Observation au microscope à contraste de phase.....	60
1.4.5 Observation au microscope électronique à balayage.....	60
1.4.6 Extraction et analyse des fatty acid methyl ester (FAME) profiles	61
1.4.7 Identification moléculaire.....	61
1.4.7.1 Extraction d'ADN.....	61
1.4.7.2 Amplification par PCR.....	62
1.4.7.3 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	63

1.4.7.4 Séquençage.....	63
2. Résultats et discussion.....	63
2.1. Caractérisation phénotypique.....	63
2.1.1. Présence de <i>Bacillus spp.</i>	63
2.1.2. <i>B. cereus</i>	64
2.1.2.1 Détermination du profil biochimique.....	64
2.1.2.2Caractéristiques morphologiques des colonies du <i>B. cereus</i> sur gélose Luria.....	65
2.1.2.3 Caractéristiques microscopiques des cultures de <i>B. cereus</i>	65
2.1.2.4 Analyse des FAME	66
2.1.2.1 Identification moléculaire.....	67
CHAPITRE 6 : Activité PGP de <i>B.cereus</i>	69
1. Matériel et méthodes.....	69
1. 2 Mesure des activités PGPR.....	69
1.2.1 Solubilisation des phosphates.....	69
1.2.2 Production d'Acide Indole Acétique (AIA)	69
1.2.3 Mise en évidence des activités enzymatiques.....	70
1.2.3.1 Détermination de l'activité amylolytique	70
1.2.3.2 Détermination de l'activité protéolytique : recherche de la caséinase.....	70
1.2.4. Activité antifongique.....	70
1.2.5 Adhésion de <i>B. cereus</i>	70
1.2.5.1 Adhésion des spores de <i>B. cereus</i>	71
1.2.5.1.1 Préparation des suspensions sporales.....	71
1.2.5.2 Caractérisation des propriétés de surface des spores.....	71
1.2.6 Formation de biofilm de <i>B. cereus</i> en microplaque de PVC.....	72
1.2.7 Formation de biofilm de <i>B. cereus</i> en tube : La méthode tube (TM)	72
2. Résultat et discussion.....	72
2.1 Activités PGP.....	72
2.1.1 Activités amylolytiques, protéolytiques et production AIA.....	73
2.1.2 Solubilisation de phosphates.....	73
2.1.3 Les propriétés de surface des spores.....	75
2.1.4 Evaluation de la formation du biofilm par les deux techniques (microplaque de PVC et TM)	76
2.1.5 Activité antifongique.....	77

CONCLUSION..... 79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 82
ANNEXES
PUBLICATION SCIENTIFIQUE

INTRODUCTION GENERALE

Les communautés microbiennes jouent des rôles fonctionnels très importants dans les écosystèmes où elles vivent. La flore bactérienne aérobie sporulée est une flore qui est largement répandue dans la nature. Parmi les milieux naturels, le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement. Le sol est un véritable réservoir de micro-organismes essentiellement de bactéries, en termes de diversité et de densité. La rhizosphère, définie comme le volume de sol soumis à l'influence de la racine, est une zone d'intense activité microbienne. Parmi les micro-organismes bénéfiques aux plantes, la flore PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) exerce de nombreuses fonctions, améliorant la nutrition de la plante ou lui conférant une meilleure résistance aux agents pathogènes ainsi qu'aux agressions environnementales (Joseph et al., 2007).

Le nombre d'espèces bactériennes identifiées comme PGPR a augmenté récemment en raison de nombreuses études portant sur une plus large gamme d'espèces végétales sur les progrès réalisés en matière de taxonomie bactérienne ainsi que sur les progrès développés dans la compréhension des différents mécanismes d'action de ces rhizobactéries. A l'heure actuelle, les PGPR incluent des taxons bactériens très divers. Un nombre très important de bactéries incluant des espèces de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus* et *Serratia* ont montré une capacité d'améliorer la croissance de la plante. Les *Bacillus* sont très répandues dans la nature et peuvent être récupérées à partir de presque tous les milieux de la biosphère, elles représentent une proportion importante de la microflore (Kloepper et al., 2004)

Le groupe *Bacillus cereus* est parmi les bactéries cultivables les plus abondantes du sol. Ce sont des bacilles Gram positifs, aérobies ou parfois anaérobies facultatifs, capables de produire une endospore quand les conditions deviennent défavorables. Elles ont des capacités physiologiques très diversifiées. En effet, elles peuvent être impliquées dans la solubilisation du phosphate, Production d'Acide Indole Acétique(AIA), la dénitrification, la protéolyse, ou la formation des biofilms. Le groupe *Bacillus cereus* regroupe sept espèces génétiquement très proches; *Bacillus cereus sensu stricto* (au sens strict), *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* et *Bacillus weihenstephanensis*. Les cellules végétatives de ces espèces se ressemblent à tel point qu'il est

très difficile de les distinguer à ce stade. Au moment de la sporulation, seule l'espèce *B. thuringiensis* se distingue des autres par la production d'une inclusion parasporale (Guinebretiere et al., 2008).

L'objectif de cette thèse est de caractériser un groupe bactérien très important dans les sols en particulier les sols désertiques : la flore sporulée : *Bacillus cereus*, avec comme préalable une meilleure connaissance de leurs : isolement, purification, identification et conservation. L'étude porte sur la diversité et la structure de cette flore ainsi que ses propriétés fonctionnelles dans ce type de sol selon une approche phénotypique et moléculaire.

La thèse est structurée en six chapitres. Les trois premiers sont une synthèse bibliographique comportant une description du groupe *Bacillus cereus* et le pouvoir PGP des bactéries du sol et de la rhizosphère ensuite une étude de quelques propriétés PGP, en particulier l'adhésion et la formation des biofilms. Les trois autres chapitres comportent le travail expérimental, les résultats obtenus et la discussion. Enfin la dernière partie concerne la conclusion finale et souligne les perspectives de ce travail.

CHAPITRE 1 : Groupe *Bacillus cereus*

Principaux caractères phénotypiques, Considérations taxonomiques

Le groupe *Bacillus cereus* est parmi les bactéries cultivables les plus abondantes du sol (Von Stetten et al., 1999). Ce sont des bacilles Gram positif, d'environ 1µm de large et de 3 à 5 µm de long, aérobies ou parfois anaérobies facultatifs, possédant une ciliature péritriche. Capables de produire une endospore quand les conditions deviennent défavorables, Les spores ovoïdes de *B. cereus*, non déformantes, sont situées en position centrale ou subterminale, à raison d'une spore par cellule. Cette forme « dormante » de la bactérie confère une résistance accrue à de nombreux stress tels que la chaleur, la dessiccation, le pH et les UV. La gamme de température de croissance varie de 5 à 50°C, avec un optimum compris entre 30°C et 45°C (Kramer and Gilbert, 1989; Guinebretiere et al., 2008).

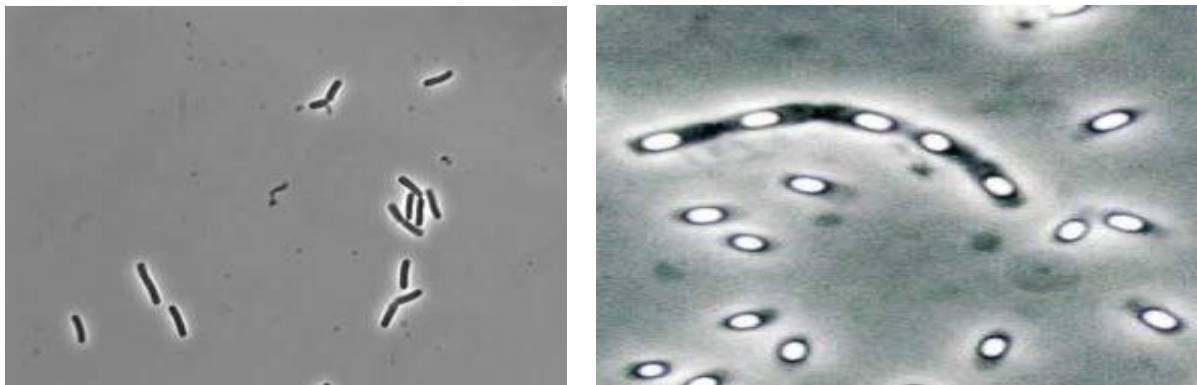


Figure 1: observation au microscope optique de cellules végétatives (A) et de spores (B) de *B. cereus* (INRA, Avignon)

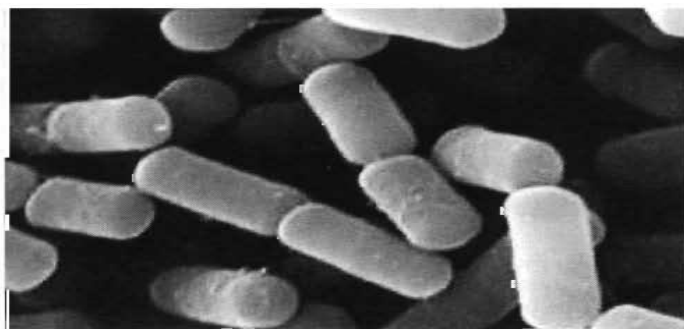


Figure 2 : Cellules végétatives de la souche *B. cereus* NVH 0075/95 en microscopie électronique à balayage (Lund et Granum, 1996).

Il est possible de distinguer *B. cereus* des autres *Bacillus* de morphologie similaire de par la mobilité, l'activité hémolytique, l'incapacité à fermenter le mannitol, ainsi que par la production d'une lécithinase extrêmement active (Guinebretiere and Sanchis, 2003). Le milieu MYP (mannitol-egg yolk-phenol red-polymyxin agar) permet de mettre en évidence l'activité lécithinase par un précipité visible autour de la colonie, et l'incapacité de *B. cereus* à fermenter le mannitol, qui se traduit par une coloration rose rouge autour de la colonie (Fricker et Reissbrodt, 2008) (Figure 3A). L'activité hémolytique est mise en évidence par étalement sur gélose au sang de mouton et se manifeste par une zone de lyse caractéristique aux abords de la bactérie (Figure 3B).



A

B

Figure 3: Colonies de *B. cereus* ATCC 14579 après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MYP (A), gélose au sang de mouton (B) (Fricker et Reissbrodt, 2008)

Ces bactéries ont des capacités physiologiques très diversifiées. En effet, elles peuvent être impliquées dans la minéralisation du phosphate (Fernandez Herrera et al., 1987), la dénitrification (Li et al., 1989), la protéolyse (Bach et al., 1999) ou la production d'antibiotiques (Milner et al., 1996).

Les sept groupes phylogénétiques majeurs

Le groupe *Bacillus cereus* regroupe sept espèces génétiquement très proches (Guinebretière et al., 2008 ; Schmidt et al., 2011 ; Tourasse et al., 2011). Historiquement les espèces de groupe *B. cereus* ont été classées à partir d'un nombre restreint de caractères (caractères macroscopiques et microscopiques, propriétés pathogènes, etc...). *Bacillus cereus sensu stricto* (au sens strict) agent de TIAC mais aussi impliqué dans certains cas de surinfections locales (Bottone, 2010 et Logan, 2012), *Bacillus anthracis* pathogène de l'homme et de l'animal, agent causal de l'anthrax (Mock et Fouet, 2001), *Bacillus thuringiensis* enthomopathogène utilisé en agriculture comme agent de lutte contre les insectes (Schnepf et al., 1998; Aronson and Shai, 2001), *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* espèces caractérisées par la formation de rhizoïdes (Nakamura, 1998), *Bacillus weihenstephanensis* qui réunit des espèces psychrotrophes capables de croître en dessous de 7°C (Lechner et al., 1998 ; Logan et De Vos, 2009) et une espèce nouvellement décrite : *B. cytotoxicus*, et caractérisée par sa toxicité élevée, et sa thermotolérance particulière (croissance à 50°C) (Auger et al., 2008 et Guinebretière et al., 2012). Les cellules végétatives de ces espèces se ressemblent à tel point qu'il est très difficile de les distinguer à ce stade. Au moment de la sporulation, seule l'espèce *B. thuringiensis* se distingue des autres par la production d'une inclusion parasporale (Guinebretière et al., 2008).

Bacillus cereus sensus stricto

L'espèce *B. cereus* au sens strict est capable de coloniser différents habitats. Elle est fréquemment isolée à partir du sol, de plantes et de l'intestin de différents animaux. Elle est capable de synthétiser des enzymes extracellulaires d'intérêt industriel, des toxines et des antibiotiques. La pathogénicité de *B. cereus* provient de sa capacité à produire plusieurs facteurs de virulence tels que des phospholipases, des entérotoxines et des toxines émétiques (céréulides) entraînant des toxi-infections alimentaires (Granum et Lund, 1997; Kotiranta et al., 2000).

La présence de spores de *B. cereus* cause de sérieux problèmes à l'industrie agroalimentaire et en particulier à l'industrie laitière, car elles sont résistantes à la chaleur et adhèrent fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable. Cette adhésion est liée à l'hydrophobicité de la surface des spores et à la présence de filaments (Tauveron et al., 2006). L'espèce *B. cereus* ne contient pas uniquement des souches pathogènes. Elle contient également des souches bénéfiques à l'homme qui sont utilisées comme probiotiques. Ces derniers sont des compléments alimentaires qui

contribuent au rétablissement de la microflore intestinale chez l'homme et les animaux (Fuller, 1989 ; 1991)

Bacillus anthracis

B. anthracis est l'agent étiologique de la maladie du charbon ou anthrax chez les herbivores et en particulier les ruminants qui sont les plus exposés et les plus sensibles à l'infection. Cette maladie est transmise à l'homme par contact direct avec les animaux infectés ou leurs produits (Spencer, 2003).

La virulence de *B. anthracis* repose essentiellement sur la présence d'une capsule et de deux plasmides pX01 et pX02 (Mourez, 2004). La capsule est composée uniquement d'acide poly D-glutamique, un polymère d'acide glutamique, ce qui lui permet d'échapper à la phagocytose. Les deux toxines sont composées de trois protéines : l'antigène protecteur, le facteur oedématogène et le facteur létal. La gravité de l'infection dépend de la combinaison de ces facteurs de virulence. Grâce à son pouvoir hautement pathogène, *B. anthracis* est utilisé comme arme biologique. La contamination peut se faire par des spores qui pénètrent dans l'organisme par des blessures cutanées, inhalation ou ingestion (Mock et Fouet, 2001).

Bacillus thuringiensis

L'espèce *B. thuringiensis* est caractérisée par la production d'une inclusion parasporale au moment de la sporulation. Cette inclusion parasporale, appelée également cristal, présente chez certaines souches des propriétés insecticides (Angus, 1954). Ces cristaux sont principalement constitués d'une ou plusieurs protéines de cristal (toxines Cry) et de cytotoxines (toxines Cyt), aussi appelée δ -endotoxines (Bravo et al., 2007). Les gènes codants pour les toxines Cry et Cyt sont localisés sur les plasmides conjugatifs et sont généralement flanqués d'élément transposable (Gonzalez et al., 1982; Lereclus et al. 1984 ; Schnepf et al., 1998) . L'utilisation de *B. thuringiensis* constitue une alternative de grande valeur par rapport aux pesticides chimiques, grâce d'une part à sa grande spécificité et au respect de l'environnement, et d'autre part au faible coût de sa production. Les bio-insecticides à base de *B. thuringiensis* occupent ainsi 80 à 90 % du marché mondial des agents de contrôle biologique (Gough et al., 2002). Les efforts se sont poursuivis pour isoler des souches de *B. thuringiensis* présentant de nouvelles spécificités insecticides et pesticides. L'activité entomopathogène de *B. thuringiensis* s'est étendue pour inclure les insectes de l'ordre des

hyménoptères (Garcia-Robles et al., 2001) et d'autres invertébrés comme les nématodes (Marroquin et al., 2000; Wellman-Desbiens *et al.*, 2011).

Bacillus weihenstephanensis

Cette espèce a été isolée initialement à partir de lait pasteurisé et conservé à basse température. Elle est caractérisée par sa capacité à croître à 7°C mais non à 43 °C. De plus, elle possède deux séquences signatures au niveau des gènes ARNr 16S (codant pour la petite sous-unité ribosomale) et *cspA* (codant pour la protéine majeure en réponse à un stress dû au froid) (Lechner et al., 1998). C'est une espèce psychrotolérante.

Bacillus cytotoxicus

Cette espèce a été isolée à partir de purées végétales et de semoules contaminées. En 1998, elle a été responsable des décès de trois personnes suite à un empoisonnement alimentaire en France. Elle est capable de produire une entérotoxine appelée cytotoxine K, très pathogène pour l'homme. Elle présente des différences phénotypiques et génétiques avec les autres espèces du groupe *B. cereus* (Fagerlund et al., 2007 ; Afchain et al., 2008 ; Auger et al., 2008 ; Rau et al., 2009). En effet, elle se distingue par son incapacité à croître à une température inférieure à 17°C. Cependant, elle est capable de se multiplier à 53 °C, c'est une espèce thermotolérante (Auger et al., 2008; Guinebretière et al., 2013).

Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides

Les espèces *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* sont des organismes saprophytes qui se distinguent des autres espèces du groupe *B. cereus* par des bâtonnets non mobiles et la morphologie de ses colonies qui sont rhizoïdes ou mycoïdes. Les deux espèces sont très proches, mais elles peuvent être distinguées par la composition en acides gras de leurs parois et le pourcentage d'homologie en acide nucléique. Très peu d'études se sont intéressées à ces deux espèces et leur importance économique demeure inconnue (Nakamura et Jackson, 1995; Nakamura, 1998). Des souches de *B. mycoides* sont associées aux racines de certaines plantes et elles sont impliquées dans la stimulation de la croissance de ces plantes (Nakamura et Jackson, 1995)

Cycle de vie

B. cereus est une bactérie largement répandue dans la nature, présente dans plusieurs réservoirs. Elle pourrait vivre en symbiose dans l'intestin de différentes espèces d'arthropodes, où elle serait capable d'accomplir un cycle complet de multiplication, sporulation, germination des spores (Margulis et al., 1998 ; Jensen et al., 2003). Cette espèce saprophyte du sol est également capable de se multiplier et de produire des spores qui lui permettront de persister dans le sol où elle est extrêmement représentée (Kotiranta et al., 2000; Vilain et al., 2006). Ces spores sont retrouvées comme contaminant des matières premières en contact direct ou indirect avec le sol.

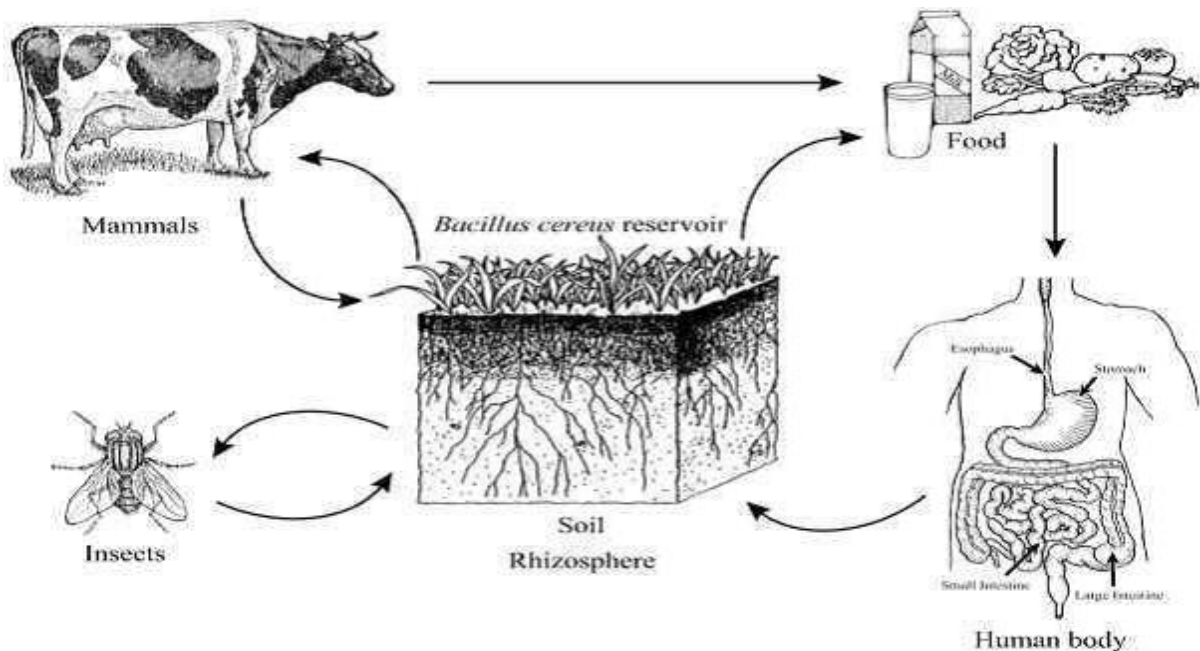


Figure 4 : Représentation des cycles de vie de *B. cereus*, d'après (Mols & Abee, 2011).

Les auteurs décrivent un phénotype multicellulaire avec un mode de croissance filamenteux qui permettrait à *B. cereus* de se déplacer dans le sol. La forme filamenteuse de *B. cereus*, aussi décrite par Margulis et collaborateurs, existe également au niveau de l'intestin d'insecte (Margulis et al., 1998). Ainsi le mode de croissance filamenteux serait associé aux modes de vie saprophytique et symbiotique de *B. cereus* tandis que le mode de croissance rapide serait associé à un cycle de vie en tant qu'agent infectieux. Il est à noter que les souches de *B. cereus* ne sont pas toutes responsables de pathologie chez l'hôte. Plusieurs souches sont inoffensives et certaines sont utilisées comme probiotiques (Cutting, 2011) .

Diversité écologique de *B. cereus*

B. cereus est un groupe composé de différentes espèces proches génétiquement réunies sous la dénomination de "Groupe *B. cereus*" ou "*B. cereus sensu lato*". Les études récentes montrent que la classification en sept espèces basée sur la virulence, la physiologie ou encore la morphologie, ne correspond pas à des critères de divergence génétique (Guinebretiere and Sanchis, 2003; Hill et al., 2004). Une gamme très large de température de croissance est enregistrée au sein du Groupe *B. cereus*. La température de croissance varie entre souche et ne correspond pas à une espèce de ce groupe.

Afin d'éclaircir la classification existante, Guinebretière et al., in Malek (2013) ont rapporté qu'un même groupe phylogénétique de *B. cereus* peut contenir des souches issues d'espèces différentes mais appartenant à une même plage de température

Plusieurs études basées sur différents types d'analyses tels que les profils AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MLST (MultiLocus Sequence Typing), MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis), les séquences des gènes ribosomiaux, la séquence du gène *panC*, et recherche de signatures de psychotrophie sur les séquences des gènes *rrs* et *cspA* ont montré que ces espèces se répartissent en sept groupes phylogénétiques, chacun se divisant en sous-groupes, possédant une gamme de température propre à chacun (Guinebretiere et al., 2008, Tourasse, et al., 2011), et qui sont représentés dans le Tableau 1. Le groupe I regroupe les souches de l'espèce *pseudomycoïdes*, dont la température de croissance est comprise entre 10°C et 43°C. Les groupes III, IV et V regroupent les souches de *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis*, les plus mésophiles du groupe *B. cereus*. Le caractère mésophile est de plus en plus marqué du groupe V vers le groupe III qui regroupe les souches de *B. anthracis*. Le groupe VII contient les souches les plus thermophiles, dont la température de croissance varie de 20°C à 50°C. Ce groupe est très éloigné des 6 autres et il a été récemment proposé que la souche NVH-391.98 soit représentative d'une nouvelle espèce thermophile appelé *B. cytotoxicus* (Auger et al., 2008). Le groupe II est composé des souches psychrotrophes de *B. cereus* et *B. thuringiensis* et le groupe VI contient les souches psychrotrophes de *B. weihenstephanensis* et *B. mycoïdes*. Ces deux groupes psychrotrophes se différencient par leur gamme de température de croissance: les souches du groupe II ne présentent pas de croissance en dessous de 7°C et peuvent croître jusqu'à 40°C, alors que celles du groupe VI sont capables de croître dès 5°C mais sont incapables de croître au-delà de 37°C.

Tableau 1: Diversité génétique et écologique de *B.cereus* (Guinebretiere et al., 2008).

Groupe Phylogénétique	Espèces	Sous- groupes	Gamme de T°C de croissance	% de souches comprenant :				
				hbl	cytK2	cytK1	nhe	ces
I	<i>B. pseudomycooides</i>	I-1	10-43	41	0	0	100	0
		I-2		71	0			
II	<i>B. cereus II</i> <i>B. thuringiensis II</i>	II	7-40	61	13	0	100	0
III	<i>B. cereus III,</i>	III-1	15-45	67	73	0	100	0
	<i>B. thuringiensis III,</i>	III-2		12	31			31
	<i>emetic B. cereus</i>	III-3		14	57			7
	<i>B. anthracis,</i> <i>B. cereus III-4,</i> <i>B. thuringiensis III-4</i>	III-4		14	39			0
IV	<i>B. cereus IV,</i> <i>B. thuringiensis IV</i>	IV-1	10-45	97	79	0	100	0
		IV-2		97	97			
		IV-3		86	79			
V	<i>B. cereus V,</i> <i>B. thuringiensis V</i>	V	8-40	88	6	0	100	0
VI	<i>B. weihenstephanensis</i>	VI-1	5-37	83	0	0	100	0
	<i>B. mycooides,</i> <i>B. thuringiensis VI</i>	VI-2		60	0		100	
VII	<i>B. cytotoxicus sp. nov.</i>	VII	20-50	0	0	100	100	0

Seules les souches appartenant au groupe VI possèdent une signature de psychrophilie dans la séquence du gène *cspA*, qui est un bon marqueur de discrimination entre les deux groupes de souches psychrotrophes. Cette classification confirme que les souches psychrotrophes ne sont pas obligatoirement membres de l'espèce *B. weihenstephanensis* (Stenfors et Granum, 2001).

Le groupe VII serait le groupe le plus proche d'un ancêtre commun, Guinebretière et al., suggèrent que le groupe *B. cereus* soit issu d'un ancêtre thermophile et qu'il évolue vers la psychrophilie, permettant ainsi une adaptation à de nouvelles niches écologiques. La coexistence de deux groupes psychrotrophes semble indiquer des évolutions parallèles, en réponse à une même contrainte. Les souches du groupe VI sont les plus fortement marquées par le caractère psychrotrophe, alors que les souches du groupe II semblent être en cours de différenciation des groupes mésophiles.

Les souches impliquées dans des cas de TIAC sont regroupées majoritairement dans les groupes III, IV et VII. Les souches psychrotrophes du groupe VI n'ont pas été associées à des TIAC et possèdent un faible potentiel cytotoxique *in vitro* (Cadot et al., 2010). Certaines souches du groupe VI sont toutefois capables de produire la toxine émétique et la capacité à synthétiser cette toxine, apportée par un plasmide, pourrait être transférée d'une souche vers une autre (Thorsen et al., 2006). Contrairement au groupe VI, le groupe II (psychrotrophe) comporte des souches isolées de TIAC. Il existe donc un risque d'émergence de souches productrices de toxine et capables de s'adapter aux températures de réfrigération.

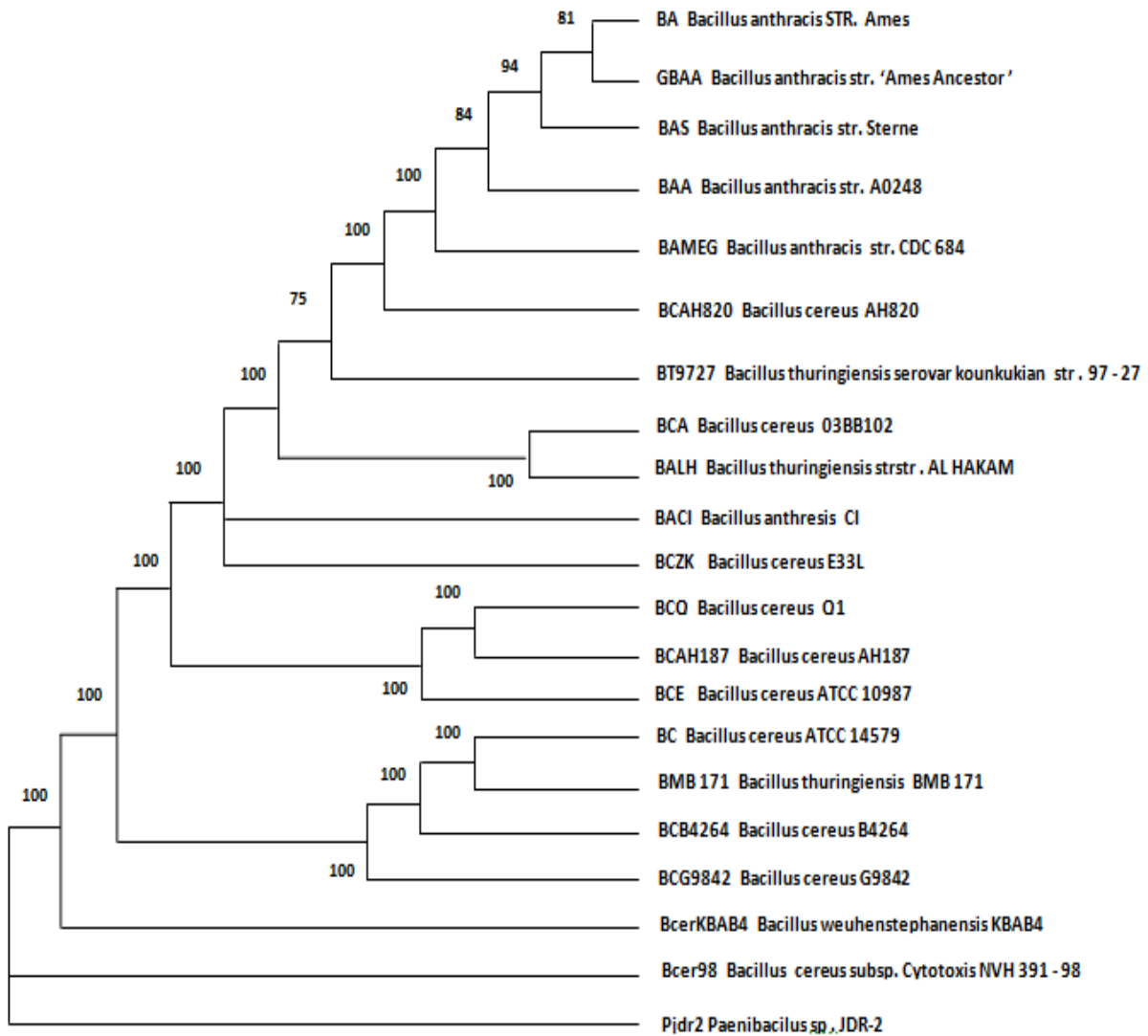


Figure 5 : Arbre phylogénétique du groupe *Bacillus cereus*
 L'arbre a été construit en comparant 157 gènes présents en simple copie au sein du groupe *Bacillus cereus* et en utilisant la méthode maximum de vraisemblance (Schmidt et al., 2011)

CHAPITRE 2 : Le pouvoir PGP des bactéries du sol et de la rhizosphère

Le sol et ses composants

Le sol est à l'interface entre la lithosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère (Alexander, 1977) et sert de support à une partie de la biosphère (Gobat et al., 2003). Il est constitué de cinq composants majeurs : fraction minérale, matière organique, eau, air et organismes vivants (Alexander, 1977) (Figure 6). Les matières organiques et minérales s'organisent de manière à créer des vides alors occupés par l'air et l'eau (les pores).

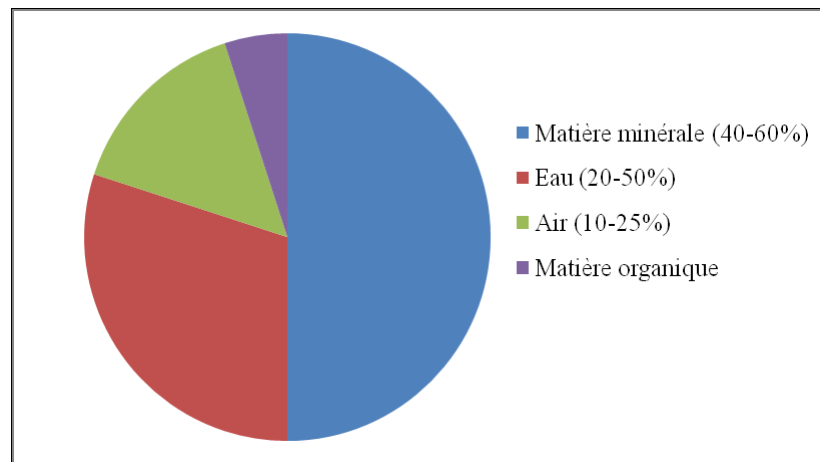


Figure 6 : Proportion des principaux composants du sol en volume (White, 2006)

Le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et est à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne. Dans le sol, les bactéries sont soumises en permanence à des perturbations qui en modifient la structure des communautés (Borneman et al., 1996).

Facteurs influençant la structure des communautés bactériennes du sol

Beaucoup de paramètres biotiques et abiotiques interviennent pour modéliser la structure des communautés bactériennes des sols tant en termes de diversité que d'effectifs (Hassink et al., 1993 ; Borneman et al., 1996 ; Borneman & Triplett, 1997). La dynamique bactérienne est aussi très importante, l'écosystème sol étant soumis en permanence à des perturbations de tous ordres qui vont avoir de profondes répercussions sur la structure des communautés. Il n'est pas encore possible aujourd'hui de prendre en compte tous les paramètres influant sur la composition de la microflore tellurique et surtout leurs interactions qui confèrent une myriade de conditions différentes (Tarlera

et al., 2008). Un certain nombre d'études ont toutefois permis d'identifier les facteurs présentant une influence marquée sur la structure des communautés bactériennes (Tiedje et al., 1999)

Facteurs abiotiques

Les structures des communautés microbiennes sont variables et dépendent de nombreux facteurs (Noguez et al., 2005). En effet, nous savons que la structure des communautés bactériennes ainsi que sa composition peuvent varier considérablement suivant l'espace (Martiny et al., 2006 ; Ramette & Tiedje, 2007). Plusieurs études suggèrent même que les caractéristiques des sols (Girvan et al., 2003 ; Singh et al., 2006), qui conditionnent la distribution spatiale (Nunan et al., 2005 ; Ritz et al., 2004), sont les facteurs les plus importants dans le modelage de la structure des communautés microbiennes. Par exemple le pH influence fortement la composition des *Acidobacteria* et des *Actinobacteria*. Le pH est l'un des forts prédicteurs de la composition des communautés bactériennes et de la diversité, mais suivant le type de sol d'autres facteurs peuvent agir sur la structure des communautés comme la disponibilité des nutriments, la solubilité des métaux (Muller et al., 2002), le contenu en carbone (Asuming-Brempong, 2008) et en azote (Fierer et al., 2007), l'humidité des sols, la salinité (Rajendhran & Gunasekaran, 2008), les variations climatiques (Lauber et al., 2009). Au cours du temps, le sol subit des changements, qui augmentent la complexité globale de l'environnement sol (Nunan et al., 2001 ; Zhou et al., 2002). Tarlera et al., ont montré que le développement de l'écosystème sol favorisait le développement de communautés bactériennes distinctes. Les changements d'utilisation des terres, particulièrement la conversion des forêts en pâturage ou en champs cultivés, est un événement fréquent et un facteur affectant la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes terrestres (Sala et al., 2000). Les effets de l'utilisation des terres sur l'altération des propriétés physiques et chimiques des sols ont été beaucoup étudiés. En effet, des changements d'utilisation des terres (au niveau de la composition des espèces de plantes et des pratiques de gestion utilisées) peuvent avoir des impacts significatifs et de long terme sur le carbone du sol, le contenu en nutriments, la texture du sol et le pH (Murty et al., 2002). La variabilité des facteurs édaphiques à travers différentes utilisations des terres peut avoir un effet significatif sur la structure des communautés bactériennes (Lauber et al., 2008). Les communautés sont dominées par 5 groupes majeurs *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (Janssen, 2006). L'effet d'une perturbation sur les communautés bactériennes dépend de sa durée et de sa spécificité. Après une perturbation transitoire, le système peut retrouver son état, tandis qu'une perturbation permanente résulte en un nouvel état altéré (Rykiel, 1985). Les perturbations avec un mode spécifique d'action altèrent seulement quelques groupes d'organismes (ex : le groupe des *Proteobacteria* réagit de manière sensible au changement

des niveaux de carbone dans le sol (Asuming-Brempong et al., 2008) tandis que celles qui agissent non spécifiquement affectent un grand nombre de bactéries (Muller et al., 2002).

Facteurs biotiques

Pour comprendre les changements de structure des communautés bactériennes il faut prendre en compte différents paramètres incluant le groupe taxonomique en question (Lauber et al., 2008), le niveau de résolution phylogénétique avec lequel sont étudiées les communautés (ex : *Pseudomonas*) (Cho & Tiedje, 2000). Il a été montré que les plantes peuvent avoir un impact identique ou même supérieur à celui des facteurs abiotiques, tel que le climat, dans le contrôle des fonctions des écosystèmes terrestres mais aussi au niveau de la structure des communautés bactériennes du sol (Verville et al., 1998). La présence de plantes résulte en une augmentation significative de l'humidité du sol, de la biomasse et de la respiration microbienne (Singh et al., 2009). La présence de plantes joue sur la croissance des communautés bactériennes des sols et influe aussi sur les propriétés abiotiques du sol. Elle provoque aussi des changements profonds au sein de la communauté bactérienne du sol. Il a été observé que beaucoup de plantes sélectionnent des groupes de micro-organismes spécifiques via l'exsudation de composés dans la rhizosphère, qui représente une association positive où les plantes fournissent le carbone pour la croissance microbienne et les micro-organismes en retour fournissent des éléments majeurs tels que l'azote et le phosphore, ainsi qu'une protection contre les attaques des pathogènes et parasites (Singh et al., 2004).

Des changements significatifs des structures des communautés bactériennes dans le sol ont été montrés lors de changements du couvert végétal. Ces changements induits par la végétation ont été observés aussi bien au niveau des groupes universels bactériens (Grayston et al., 1998 ; Nusslein & Tiedje, 1999) qu'au niveau des groupes fonctionnels (Singh et al., 2007). Bien que les communautés bactériennes et fongiques aient été largement étudiées indépendamment l'une de l'autre dans de nombreux habitats, quelques études ont examiné simultanément ces deux groupes de micro-organismes (Costa et al., 2006 ; Singh et al., 2007), sans toutefois tenter de comprendre les interactions entre ces deux communautés qui demeurent très difficiles à prendre en compte, bactéries et champignons vivant en étroite relation dans le sol. Les interactions champignons bactéries sont très certainement de tous types : positive négative ou neutre. Singh et al., (2009) ont observé une forte corrélation entre les communautés bactériennes et fongiques indépendamment des facteurs abiotiques du sol (humidité, C et N) à l'échelle du champ (Singh et al., 2009). Des résultats précédents avaient déjà montré qu'un champignon *Glomus mossae* (Murty et al., 2002) avait un impact direct sur la structure de la communauté bactérienne au niveau des racines de plantes

(Artursson et al., 2005). Singh et al., (2007) avaient montré aussi que la communauté fongique influence la structure de la communauté bactérienne au niveau du rhizoplan des graminées.

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de micro-organismes par gramme de sol. Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones... Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. (Haas et Defago, 2005). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver in vitro ou à manipuler en laboratoire. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu, avantage aussi pour la formulation du produit (Raaijmakers et al., 2002; Cavaglieri et al., 2005).

Mécanismes d'action des PGPR

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les PGPR dont les modes d'action sont directs ou indirects, bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement leur métabolisme. Ces mécanismes (Figure 7) pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes sont :

- La solubilisation des phosphates, la fixation de l'azote et les minéraux nutritifs, rendant ces aliments disponibles pour la plante.
- La production de phytohormones telles que l'acide indole acétique (AIA).

- La répression des micro-organismes pathogènes du sol (par la production du cyanure d'hydrogène, de sidérophores, d'antibiotiques, et/ou de la concurrence pour les nutriments) (Gupta et al., 2000).

De plus, les PGPR peuvent contribuer dans l'amélioration de la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques (la salinité, la sécheresse et à la toxicité des métaux lourds). Sur la base de leur activités Somers et al., (2004) ont classé les PGPR comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), rhizoremédiateurs (dégradants les polluants organiques) et biopesticides (lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques).

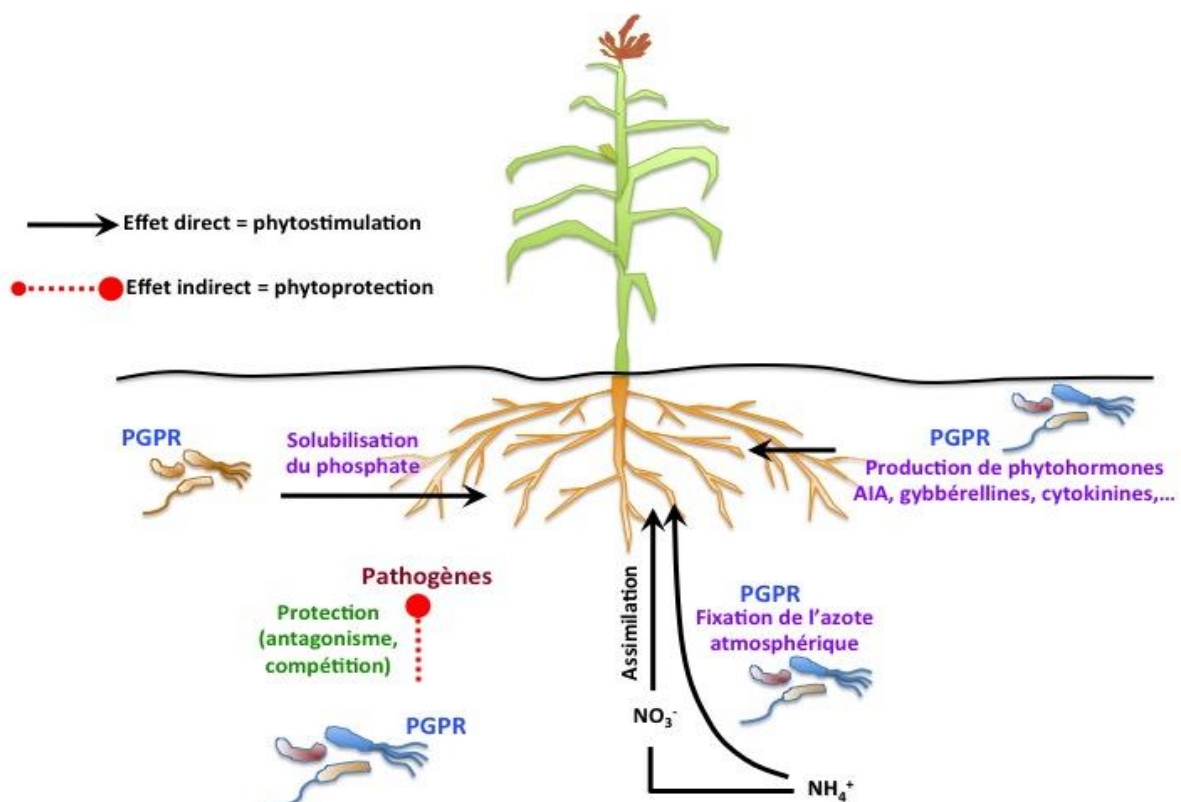


Figure 7: Interactions entre plantes et bactéries coopératives (ici PGPR) dans la rhizosphère (Khan et al., 2009)

Biofertilisation

Fixation d'azote

La fixation biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne. L'azote est un aliment essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes. L'utilisation de bio-engrais tels que les bactéries fixatrices d'azote peut accroître la productivité et constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production. Ainsi, Figueiredo et al., (2008) ont rapporté que, au cours des deux dernières décennies, l'utilisation de PGPR pour le développement durable de l'environnement et de l'agriculture a considérablement augmenté dans plusieurs régions du monde. Les micro-organismes prennent de l'importance dans l'agriculture en favorisant la circulation des éléments nutritifs (Sahin et al., 2004; Orhan et al., 2006). L'un des avantages des bactéries diazotrophes est de fournir aux plantes l'azote en échange du carbone libéré comme exsudats racinaires. Toutefois, la disponibilité du carbone comme source d'énergie est requise pour la fixation intensive de l'azote. Ceci impose à ces diazotrophes de vivre près des plantes soit dans la rhizosphère, le rhizoplan ou comme endophytes.

Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (Graham, 1988). La fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique (Saxena et Tilak, 1998). Les bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère sont de plus en plus utilisées dans les cultures des non légumineuses comme la betterave sucrière, la canne à sucre, le riz, le maïs, et le blé (Dobereiner, 1997; Hecht-Buchholz, 1998; Sahin et al., 2004). Parmi les bactéries fixatrices d'azote non-symbiotiques les plus importantes appartiennent à plusieurs espèces : *Azoarcus sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum sp.*, *Azotobacter sp.*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*. *Azospirillum* est le représentant des PGPR, ses capacités ont été évaluées dans des expériences à travers le monde (Burdman et al., 2000; Dobbelaere et al., 2003; Vessey, 2003; Lucy et al., 2004; Ramirez et Mellado, 2005). De plus, des espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus* (Glick et al., 1994; Alam et al., 2001; Cakmakci et al., 2001; Kokalis-Burelle et al., 2002), et d'autres bactéries endophytiques telles que *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia* et *Stenotrophomonas*, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs ces dernières années en raison de leur association avec des cultures importantes et leur potentiel à améliorer la croissance des plantes (Chelius et Triplett, 2000; Verma et al., 2001; Dong et al., 2003; Ramirez et Mellado, 2005). En outre, l'inoculation réduit de

façon significative le besoin de beaucoup d'espèces végétales en fertilisant azoté, dans de nombreuses expériences menées dans les serres et sur terrain (Bashan et Levanony, 1990; Bashan et Holguin, 1997; Bashan et al., 2004).

Solubilisation du Phosphate

L'amélioration de la fertilité du sol est l'une des stratégies les plus communes pour augmenter la production agricole. En plus de la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates est également importante. Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologiquement disponible (Ezawa et al., 2002). Même dans les sols riches la plupart du phosphore n'est pas disponible pour les plantes, une grande quantité se trouve sous forme insoluble. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). Les micro-organismes permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités (Kucey et al., 1989; Pradhan et Sukla, 2005). La capacité de quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture (Sharma et al., 2007) (Figure 8).

Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. Les acides gluconique et 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. Les acides glycolique, oxalique, malonique et succinique, ont également été identifiés. Certaines souches sont capables de produire en plus des mélanges d'acides lactiques, isovalérique, isobutyrique et acétique. La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduisent à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique. La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases (Kumar et Narula, 1999; Whitelaw, 2000; Gyaneshwar et al., 2002).

Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas spp.* (Subbarao, 1988 ; Kucey et al., 1989). *B. megaterium*, *polymyxa*, *circulans*, *coagulans*, *subtilis*, *sircalmous* sont les plus performantes (Podile et Kishore, 2006) dans la solubilisation des phosphates. Celle-ci permet à *B. megaterium*, par exemple, d'améliorer le nombre

et le poids sec de nodules, le rendement des composants, la disponibilité et l'absorption des nutriments des cultures du soja (Son et al., 2006 ; Sharma *et al.*, 2007) . Ainsi, la co-inoculation de *Bacillus spp* avec d'autres souches PGPR réduit la demande de phosphore par 50 % sans affecter le rendement du maïs (Yazdani et al., 2009). L'inoculation par *B. megaterium* solubilisant les phosphates améliore les rendements de la canne à sucre de 12,6 % (Sundara et al., 2002). Les PSB sont communes dans la rhizosphère des plantes cultivées, et quelques exemples d'association bénéfiques comprennent *B. megaterium* et les pois chiches (Elkoca et al., 2008), *B. licheniformis*, *B. megaterium* et le blé et les épinards (Cakmakci et al., 2007), *Pantoea agglomerans* et la tomate (Kim et al., 1998), *Pseudomonas chlororaphis*, *P. putida* et le soja (Cattelan et al., 1999), *Avena sativa* et les souches PGPR isolées de la rhizosphère de fourrage (Wenxing et al., 2008), *Serratia marcescens*, *Pseudomonas sp.*, et le maïs (Hameeda et al., 2008).

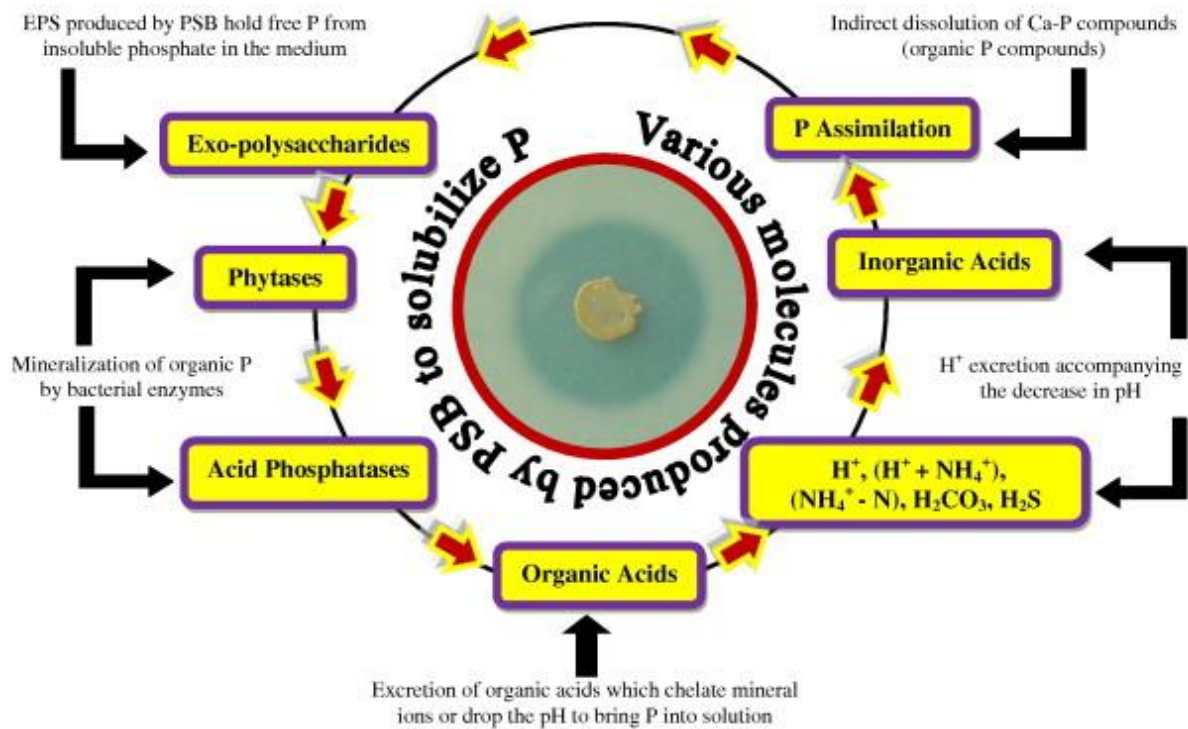


Figure 8: Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates (Khan et al., 2009)

Phytostimulation

Production d'hormones de croissance

Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaires, la différenciation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones. De nombreuses phytohormones sont produites par les PGPR. Bien que le rôle de la biosynthèse de ces phytohormones par ces micro-organismes ne soit pas entièrement expliqué, il est à noter que les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden, 1995 ; Glick et al., 1995; Lucy et al., 2004).

Les régulateurs de croissance des végétaux sont les substances qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations et modifient ou contrôlent un ou plusieurs événements spécifiques du métabolisme d'une plante. Les hormones végétales sont des messagers chimiques affectant la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent que l'utilisation des hormones en tant que molécules signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres micro-organismes (Spaepen et al., 2007).

Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman et al., 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008). Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. Les poids des tiges et des racines des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (Narula et al., 2006) (Figure 9). Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Une grande proportion (80%) de bactéries colonisant la rhizosphère le synthétise, les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices (Loper et Schroth, 1986). Toutefois, l'amélioration de la croissance des plantes par la colonisation racinaire avec des espèces de *Bacillus* et *Paenibacillus* productrices d'AIA est bien connue (Kloepper et al., 2004 ; Idris et al., 2007).

La biosynthèse de l'AIA est affectée par plusieurs facteurs environnementaux. En particulier, il y a une augmentation de sa production dans des conditions de pH élevé et en présence de plus grandes quantités de tryptophane (Spaepen et al., 2009). L'AIA est généralement produit sous forme de métabolite secondaire par les PGPR en utilisant les substrats riches exsudés par les racines des plantes. L'AIA et ses analogues actifs dans la plupart des plantes sont synthétisés à partir du tryptophane principal précurseur. Les exsudats des racines sont la source principale du tryptophane dans le sol (Spaepen et al., 2007). Jusqu'à présent, six voies de biosynthèse ont été identifiées dont cinq dépendent du tryptophane et une en est indépendante. Cette voie dépend de la présence d'indole-3-glycérolphosphate. Chez les plantes, la plupart de l'AIA se trouve sous une forme conjuguée ce qui permet son stockage et empêche sa dégradation (Spaepen et al., 2007).

La capacité de biosynthèse de l'auxine peut être utilisée comme un outil pour le dépistage des souches PGPR efficaces (Khalid et al., 2004). En particulier, la production de l'AIA semble être une propriété de la promotion de la croissance de la plante la plus répandue parmi les PGPR.

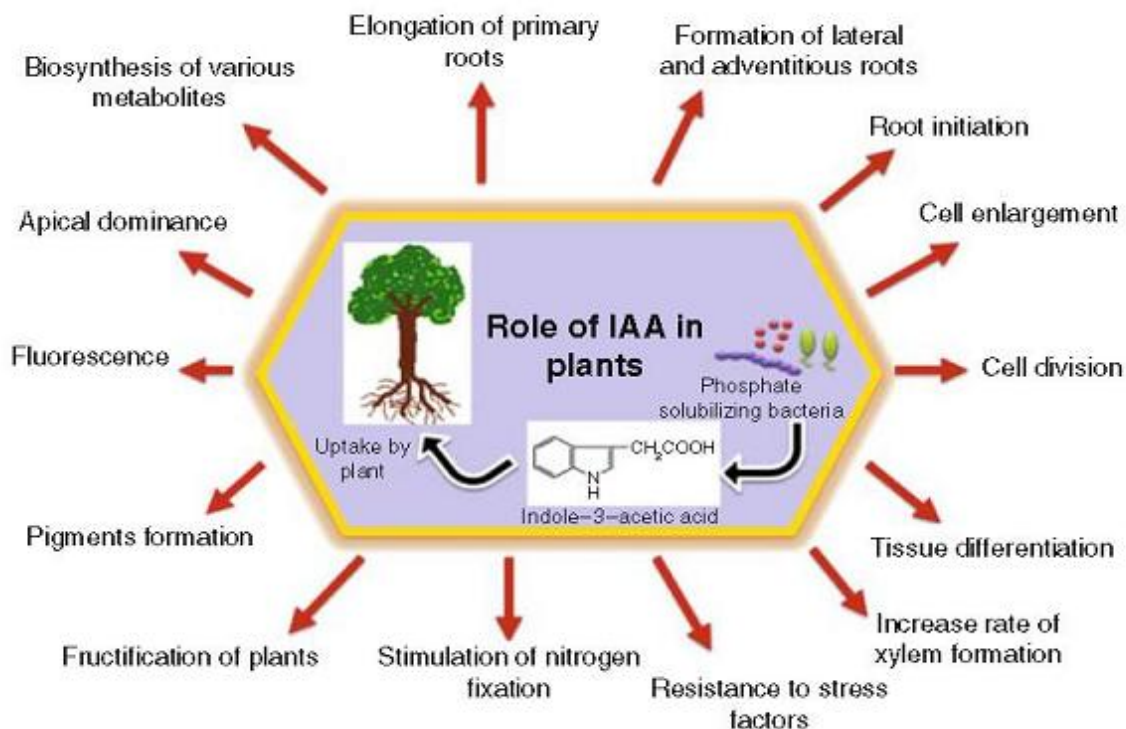


Figure 9: Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan et al., 2009).

Cytokinines et gibbérellines

Les **cytokinines** sont des aminopurines N6-substituées qui jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Salisbury et Ross, 1992). En outre, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansine, protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes en facilitant l'expansion de la cellule végétale et provoquant sa turgescence, ceci a un impact à la fois sur la taille et la forme des cellules (Downes et al., 2001).

Le gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse des cytokinines a été initialement caractérisé chez *Agrobacterium tumefaciens* (Nester et al., 1984) et ensuite chez les bactéries méthylophiles et méthanotrophes (Ivanova et al., 2001). Depuis, de nombreuses PGPR y compris *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas spp.* sont productrices de cette hormone (Nieto et Frankenberger 1989; Timmusk et al., 1999).

L'inoculation de graines avec des bactéries productrices de cytokinines conduit généralement à augmenter le contenu en cytokinines chez les plantes influençant ainsi simultanément la croissance et le développement des plantes (Arkhipova et al., 2005). Divers stress environnementaux peuvent aussi engendrer l'accumulation des taux élevés de cytokinines végétale (Arkhipova et al., 2007). Une corrélation positive est observée chez plusieurs espèces de légumineuses entre le taux de cytokinines chez les plantes et la capacité de *Rhizobium* de former des nodules sur les racines (Yahalom et al., 1990; Hirsch et Fang, 1994).

Les gibbérellines sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries ; ce sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques. Un nombre important (136) de gibbérellines différentes est identifié et caractérisé (MacMillan, 2002). Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (MacMillan, 2002). Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini et al., 2004). La capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérellines a été initialement décrite chez *A. brasilense* (Tien et al.,

1979) et *Rhizobium* (Williams et De Mallorca, 1982) puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Mitter et al., 2002; Tsakelova et al., 2006; Joo et al., 2009). La promotion de la croissance des plantes par les PGPR productrices de gibbérellines est rapportée par plusieurs travaux et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux (Atzhorn et al., 1988; Gutierrez-Manero et al., 2001; Joo et al., 2009).

Rôle de l'éthylène

L'éthylène gazeux produit de manière endogène par les plantes a plusieurs effets sur leur développement et agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante (Ecker, 1995). L'éthylène est impliqué dans beaucoup de processus physiologiques, comme la germination de la graine, la différenciation de tissus, la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons, le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la sénescence d'organe, la maturation de fruit et l'abscission de la feuille et du fruit (Frankenberger et Arshad, 1995) (figure10). A des concentrations élevées, l'éthylène affecte négativement de nombreuses étapes physiologiques des plantes. Une augmentation de la production d'éthylène agissant comme hormone sensitive stimule la maturation des fruits et le vieillissement des fleurs. Ces symptômes sont associés à une perte de la chlorophylle des feuilles, une dégradation des protéines et des ARN, et une perte de pigmentation des fleurs (Oldroyd et al., 2001; Van Loon et al., 2006). De plus, l'éthylène, à forte concentration, empêche le développement des nodules de la luzerne (*Medicago sativa*) (Glick et al., 2007) et des pois (*Pisum sativum*) (Cheng et al., 2008) et affaiblit la défense de la plante contre des pathogènes (Wang et al., 2000).

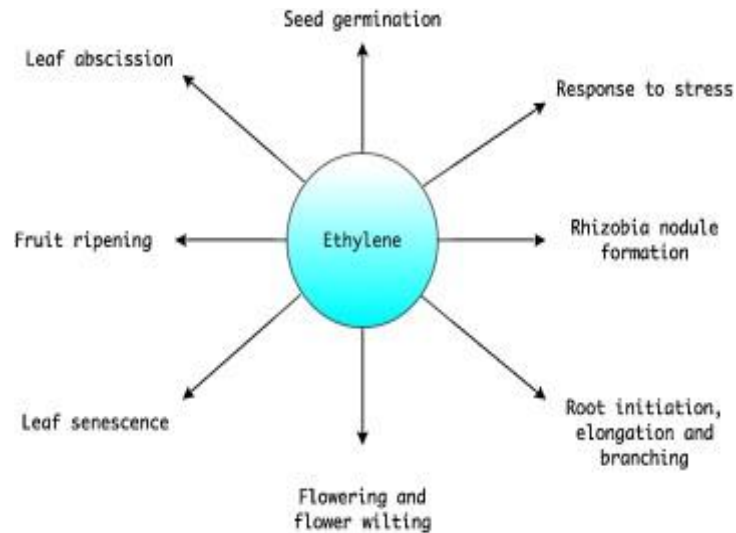


Figure 10: La phytohormone d'éthylène affecte un grand nombre de processus différents dans la croissance et le développement d'une plante (Glick *et al.*, 1998).

Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

Au cours des dernières années, un nouveau mécanisme de promotion de la croissance des plantes impliquant l'éthylène est proposé (Burdman *et al.*, 2000). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène et favoriserait un allongement des racines. Les PGPR produisant cette enzyme soulageraient ainsi la plante de plusieurs stress causés par des infections, l'absorption de métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse (Glick *et al.*, 1998).

Le rôle de l'ACC désaminase chez les PGPR est actuellement bien établi. Elle intervient dans la régulation de l'éthylène chez les plantes. Les PGPR s'attachent aux racines et métabolisent les exsudats racinaires tels que le tryptophane et le transforment en auxines particulièrement en AIA. Cet AIA rhizobactérien ainsi que l'AIA endogène de la plante peuvent induire l'activité de l'ACC-synthase qui produit de l'ACC (Penrose *et Glick*, 2001). Une partie de l'ACC de la plante est excrétée et dégradée par l'ACC-désaminase des rhizobactéries en ammoniacque et α -cétobutyrate, composés rapidement métabolisés par les bactéries (Holguin *et Glick*, 2001) par conséquent la diminution de l'ACC entraîne l'abaissement du taux d'éthylène dans la plante (Figure 11).

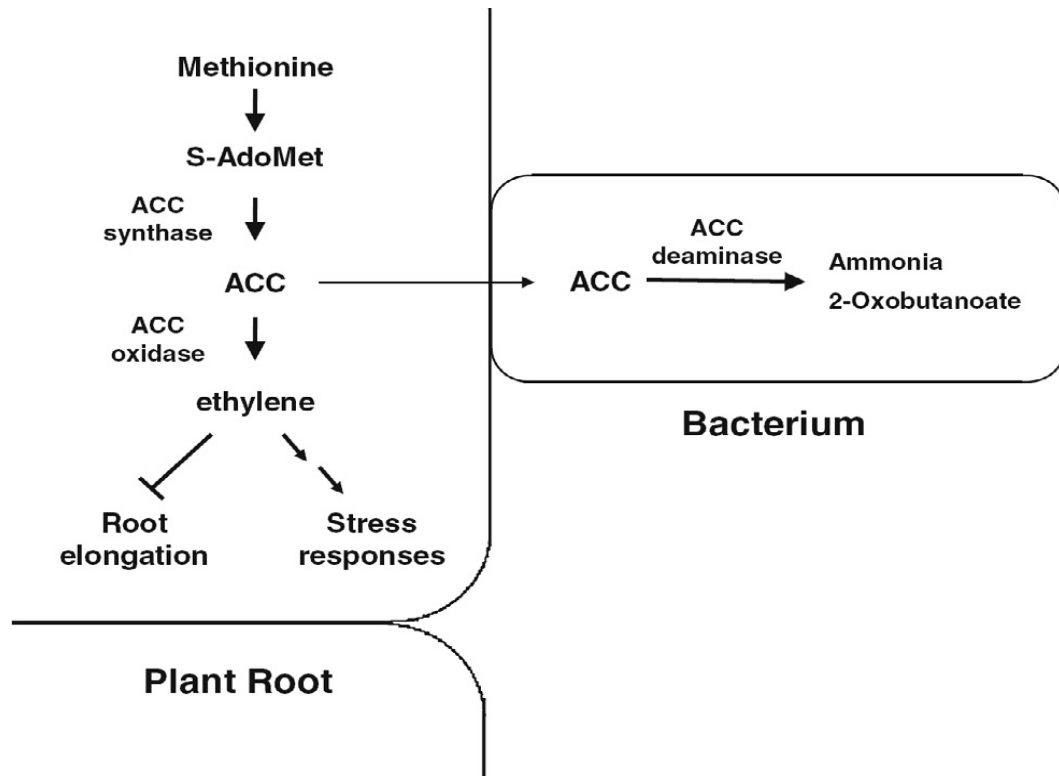


Figure 11 : Mécanisme d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stress abiotiques (Glick et al., 1998).

Biocontrôle

Les micro-organismes, principalement les bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Agrobacterium* (Haas et Defago, 2005). De nombreuses recherches ont concerné *Bacillus* et *Pseudomonas* qui sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ces rhizobactéries ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques (Raaijmakers et al., 2002). Les modes d'action des agents microbiens dans le **biocontrôle** ne sont pas toujours bien connus et peuvent varier pour un micro-organisme donné en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles.

Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano et al., 1997; Reyes et al., 2004). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale.

Une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre et al., 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren et al., 2001; Gupta et al., 2003).

Une illustration de l'effet de la compétition pour l'espace concerne la lutte biologique contre le pathogène *Ceratocytis paradoxa* qui est responsable de la maladie de la pourriture noire sur les fruits d'ananas. On a observé que cette maladie a seulement été réduite dans les fruits prétraités avec l'eau de lavage de fruits d'ananas contenant la levure *Pichia guilliermondii*. Ce traitement permet de réduire la germination des spores, la longueur des germes et le poids sec du pathogène *C. paradoxa* et les résultats montrent que le mode d'action de *P. guilliermondii* serait basé sur la compétition pour l'espace et les nutriments parce qu'on n'a observé aucun effet antagonisme de cette levure lorsqu'elle est appliquée après l'inoculation du pathogène (Reyes et al., 2004).

Compétition pour le fer et production de sidérophores

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des sidérophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe^{3+} . En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Par exemple, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont

pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena et al., 2002). D'autre part, malgré que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l'activité des PGPR, elle est rarement essentielle dans le biocontrôle (Ongena et al., 2000; Meziane et al., 2005). Un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température et la source de carbone) influence la production des sidérophores (Duffy et Défago, 1999; Valdebenito et al., 2006).

Antibiose et parasitisme

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *B. subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple : la zwittermycine-A, la kanosamine (Peypoux et al., 1999), des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine (Peypoux et al., 1999; Bonmatin et al., 2003; Lin et al., 2005; Rahman et al., 2007) et encore des enzymes hydrolytiques (β -1,3-gluconase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Leelasuphakul et al., 2006). Un rôle de ces lipopeptides dans l'effet protecteur par une souche particulière de *B. subtilis* contre la fonte des semis des plantes d'haricots provoquées par *Pythium ultimum* a été récemment montré (Ongena et al., 2005), et contre la moisissure grise de la pomme après la récolte (Touré et al., 2004). D'autre part chez *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4- diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phénazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle (Raaijmakers et al., 1995; Haas et Keel, 2003; Haas et Defago, 2005). Plusieurs facteurs abiotiques (l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote, et des micro-éléments), biotiques (la plante hôte, le pathogène, la microflore indigène, et la densité de cellules de la souche productrice) et physiologiques tels que le quorum sensing ont été identifiés pour influencer la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle. Ces PGPR montrent non seulement un large spectre de diversité dans le type mais également dans le nombre d'antibiotiques produits (Raaijmakers et al., 2002; McGowan et al., 2005). Par exemple, certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée (Whipps, 2001). Une étude

récente a démontré que l'espèce de la plante hôte a une influence significative sur la dynamique, la composition et l'activité des espèces antagonistes indigènes spécifiques de *Pseudomonas* spp. (Bergsma-Vlami et al., 2005).

Composés volatiles

Selon Howell et al., (1988), l'inhibition de *Pythium* par *Enterobacter cloacae* dans des boîtes de Pétri cloisonnées serait dû à des substances volatiles. L'ammoniac est l'agent inhibiteur identifié. Il est produit comme un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie.

Un autre métabolite secondaire produit par certaines rhizobactéries est l'acide cyanhydrique (HCN). Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes, y compris les bactéries par la voie de décarboxylation oxydative en utilisant la glycine, le glutamate ou la méthionine comme précurseurs (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986). Son rôle est d'éviter la prédation ou la compétition. L'HCN joue un rôle dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes (Heydari et al., 2008). La production de HCN est une activité commune chez *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphérique (Ahmad et al., 2008).

D'autres composés volatiles, le 2,3-butanediol et l'acétoïne libérés par des PGPR entraînent une amélioration appréciable de la croissance de la plante en induisant sa résistance aux maladies (Ryu et al., 2003).

Résistance Systémique Induite (ISR)

D'autre part, certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2002).

Lors du phénomène, des rhizobactéries non pathogènes peuvent conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique. Cette «immunité» s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites «élicitrices» produites par le micro-organisme bénéficiaire. Ce phénomène fait appel séquentiellement à la reconnaissance par l'hôte d'éliciteurs produits par l'agent inducteur, à l'émission d'un signal requis pour propager l'état induit de manière systémique et à l'expression de

mécanismes de défense *sensu stricto* qui permettent de limiter la pénétration du pathogène dans les tissus de la plante.

Les évènements moléculaires associés à l'ISR sont de mieux en mieux connus. Ainsi, la transmission du signal émis suite à la perception de l'agent infectieux repose sur différentes voies dans lesquelles l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène jouent un rôle crucial (Glazebrook et al., 2003). Cependant, ces voies s'interpénètrent et agissent avec d'autres mécanismes pour former un réseau de régulation modulable permettant à la plante d'initier une réponse défensive spécifique en fonction de la nature du pathogène, qu'il soit virus, bactérie, champignon, insecte ou nématode (De Vos et al., 2005).

L'expression phénotypique du phénomène de l'ISR peut être divisée en quatre étapes principales (Figure 12) Ces étapes sont :

- 1- La perception par la plante des molécules bactériennes responsables de l'élicitation du phénomène,
- 2- La transmission du signal nécessaire à la systémisation du phénomène dans la plante,
- 3- La mise en alerte de la plante au niveau systémique qui, dans la plupart des cas, n'est pas accompagnée de modifications majeures de l'activité transcriptionnelle avant l'attaque du pathogène
- 4- L'expression du ou des mécanismes de défense *sensu stricto* induits permettant de limiter voire inhiber la pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte végétal.

Le survol de la littérature de ces dernières années illustre la diversité des micro-organismes non pathogènes capables d'induire l'ISR. Le nombre d'espèces décrites comme inductrices de l'ISR a augmenté rapidement au cours des dernières années (Tableau2). Il inclut des bactéries Gram-positives et en particulier des bacilles comme *Paenibacillus polymyxa*, *B. pumilus*, *mycoides*, *subtilis*, *amyloliquefaciens*, *pasteurii*, *thuringiensis* ou *cereus* (Kloepper et al., 2004). Plusieurs espèces Gram-négatives sont également intensivement étudiées dans le contexte de la lutte biologique basée sur l'induction de la résistance parmi lesquelles certaines entérobactéries telles que *Serratia* (*S. marcesens*, *S. plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans*. La plupart de ces bactéries vivent librement dans la rhizosphère mais d'autres telle que *Rhizobium elti* peuvent également pénétrer dans les espaces intercellulaires des tissus racinaires et donc se comporter comme endophytes (Benhamou et al., 2000).

Tableau2 : Diversité des souches bactériennes identifiées comme inducteurs de la résistance systémique chez les plantes et la diversité des pathosystèmes dans lesquels l'ISR est impliquée (Van Loon et Bakker, 2005).

Espèces	Plante hôte/pathogène(s)
<i>1- Gram-négatives</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (souche WCS417)	Cacahuète/ <i>Fusarium</i> ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Fusarium</i> , <i>Pseudomonas</i> ; Tomate/ <i>Fusarium</i> ; Radis/ <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pseudomonas</i>
<i>P. aeruginosa</i> (souche TNSK2)	Haricot/ <i>Botrytis</i> , <i>Colletotrichum</i> ; Tomate/ <i>Botrytis</i> ; Tabac/virus de la mosaïque
<i>Serratia marcescens</i> (souche 90-166)	Concombre/ <i>Colletotrichum</i> , <i>Pseudomonas</i> ; Tabac/ <i>Peronospora</i> ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i> ; Concombre/coléoptère ; Pin/ <i>Cronartium</i> ; Tomate/virus de la mosaïque
<i>S. plymuthica</i>	Tomate/ <i>Fusarium</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	Tabac/ <i>Phytophthora</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pommier/ <i>Erwinia</i>
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Tomate/cucumovirus
<i>Flavomonas oryzae</i>	Concombre/coléoptère
<i>Rhizobium elti</i>	Pomme de terre/nématode
<i>Agrobact. radiobacter</i>	Pomme de terre/nématode
<i>2- Gram-positives</i>	
<i>Bacillus. pumilus</i> (souche SE34)	Tabac/ <i>Peronospora</i> ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i> ; Concombre/coléoptère ; Tomate/virus de la mosaïque ; Pin/ <i>Cronartium</i> ; Pois/ <i>Fusarium</i> ; Tomate/ <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i>
<i>B. amyloliquifaciens</i> (souche IN937)	Tomate/virus de la mosaïque ; Concombre/coléoptère ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Erwinia</i>
<i>B. thuringiensis</i>	Café/ <i>Hemileia</i>
<i>B. mycoides</i>	Betterave sucrière/ <i>Cercospora</i>
<i>B. pasteurii</i>	Tabac/ <i>Peronospora</i>
<i>B. sphaericus</i>	Pomme de terre/nématode
<i>B. cereus</i>	Poivre/nématode
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Erwinia</i>

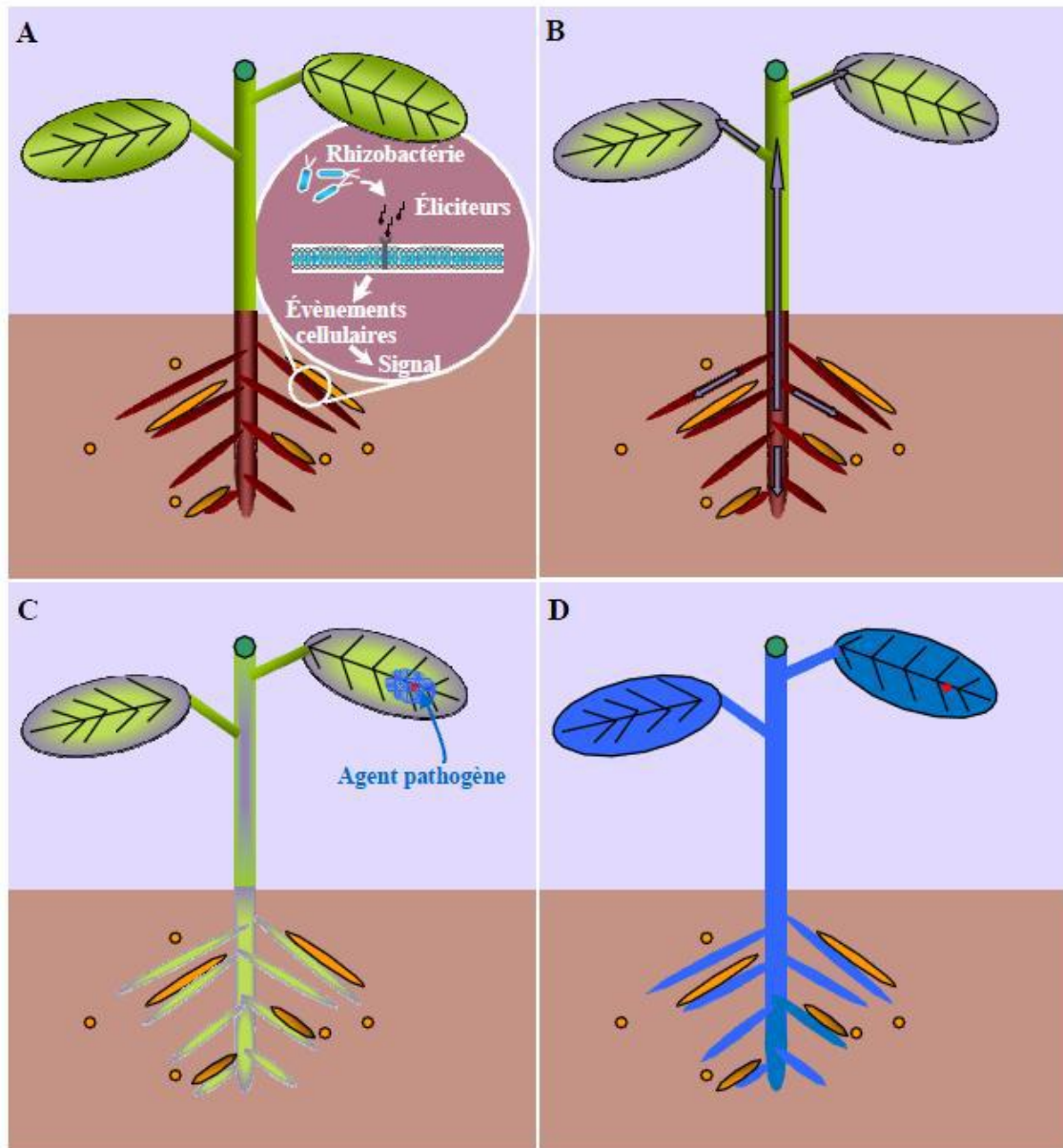


Figure12: Les différentes phases du phénomène d'induction de la résistance chez les plantes par les rhizobactéries (Bakker et al., 2007).

La perception de la bactérie par l'hôte végétal via un ou des éliciteurs moléculaires est la première étape (A). Suite à ce dialogue moléculaire, il y a émission d'un signal à travers toute la plante menant à un état « induit » systémique alors que la bactérie inductrice ne migre pas (B). Cet état induit n'est que peu perceptible d'un point de vue moléculaire mais permet à la plante de réagir rapidement et de limiter une infection ultérieure d'abord localement autour du site d'attaque (C). Il s'en suit une réaction systémique menant à un renforcement de tous les organes qui permet une certaine résistance vis-à-vis d'une agression future (D).

Les déterminants bactériens de l'ISR

Les éliciteurs produits par les PGPR et impliqués dans l'ISR sont moins bien connus, mais les recherches menées ces dernières années ont permis d'identifier plusieurs molécules bactériennes jouant ce rôle (Bakker et al., 2007).

Les composants de la surface des cellules

Les flagelles bactériens sont nécessaires pour la mobilité et l'adhérence des bactéries sur les racines et par conséquent ils sont importants pour une colonisation efficace (Persello-Cartieaux et al., 2003). Il a été récemment démontré que la flagelline (protéine du filament flagellaire des Eubacteria) des rhizobactéries peut agir comme éliciteur de résistance systémique (Meziane et al., 2005).

Le pouvoir éliciteur des lipopolysaccharides (LPS) des PGPR varie avec la plante hôte. Par exemple, *P. putida* WCS358 est capable d'induire l'ISR via le LPS chez plusieurs plantes telles que le haricot, la tomate mais pas chez le radis et *Arabidopsis* (Meziane et al., 2005).

Les sidérophores

Les sidérophores produits par les PGPR dans des conditions de carence en fer, peuvent déclencher l'ISR chez certaines plantes. Les pyoverdines (aussi appelées pseudobactines) et la pyochéline sont des sidérophores synthétisés pour lesquels une activité élicitrice de l'ISR a été démontrée (Bakker et al., 2007 ; Meziane et al., 2005).

Les antibiotiques

Certains composés synthétisés par les PGPR et isolés à l'origine pour leur activité antifongique sont également inducteurs de l'ISR. Ainsi, un rôle dans l'induction de l'ISR de la pyocyanine a été rapporté lors du traitement de plantes de tomate par *P. aeruginosa* 7NSK2 (Audenaert et al., 2002). D'autre part, certaines bactéries à Gram positif telles que *Bacillus spp.* ont démontré leur capacité à stimuler des mécanismes de défense chez la plante, mais le plus souvent la nature de leur déterminant provoquant l'ISR n'est pas connue (Kloepper et al., 2004). Jusqu'à récemment, les composés volatiles organiques, et plus particulièrement le 2,3-butendiol, étaient les seuls déterminants de l'ISR connus chez *Bacillus* (Ping et Boland, 2004).

L'acide salicylique

Certaines souches de PGPR sont capables de produire de l'acide salicylique (SA) sous des conditions limitantes en fer. Dans certains cas, ce SA d'origine bactérienne joue le rôle d'éliciteur de l'ISR. Par exemple, le SA produit par la souche *P. aeruginosa* 7NSK2 élicite l'ISR dans quelques pathosystèmes tels que tabac/virus de mosaïque du tabac (TMV) (De Meyer et al., 1999), haricot/*Botrytis cinerea* et *Colletotrichum lindemuthianum* (De Meyer et Höfte, 1997; Bigirimana et Höfte, 2002). Un mutant de la souche *P. aeruginosa* 7NSK2 qui n'est plus capable de produire le SA, a perdu sa capacité à stimuler l'ISR chez le haricot (De Meyer et Höfte, 1997). Par contre, certaines études ont montré que la production de SA par d'autres souches n'est pas un déterminant de l'ISR (Press et al., 1997; Ran et al., 2005).

CHAPITRE3 : Etude de quelques propriétés PGP : adhésion et formation des biofilms

Généralité sur les biofilms

Un biofilm est formé de micro-organismes établis en population sessile et emprisonnés dans une matrice de polysaccharides (Sutherland, 2001; Fujishige et al., 2006). Les bactéries capables de s'organiser en biofilm adhèrent à un support solide et ont une meilleure capacité d'adaptation et de résistance aux conditions du milieu (Espinosa-Urgel, 2004). Les biofilms sont présents partout. Toutes les installations industrielles possédant une certaine humidité sont exposées à la formation de biofilms. Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures, et permettre ainsi aux bactéries qui le constituent, de devenir résistantes aux agents extérieurs

Formation et développement du biofilm

Le développement d'un biofilm se déroule en plusieurs étapes (Figure 13). La première consiste en l'adhésion primaire (réversible) des bactéries sur une surface, principalement par liaisons chimiques non covalentes, qui sont des liaisons fragiles. Pour pouvoir approcher et adhérer à un support, les bactéries font intervenir des appendices de mobilité appelés pili. Lors de la deuxième étape, les bactéries sécrètent des polysaccharides et des protéines possédant des propriétés adhésives, pouvant empêcher (Busscher et Van Der Mei, 1997) ou favoriser la colonisation par d'autres micro-organismes (Wimpenny et al., 1993). En effet, certaines espèces sont incapables de s'ancrer elles-mêmes et s'attachent au biofilm formé par d'autres espèces déjà installées. Au cours de la troisième étape, les micro-organismes se divisent et forment des microcolonies dont la structuration implique l'expression de gènes liés au *quorum sensing*, et à la production d'exopolymères qui englobent la bactérie. Ces exopolymères constituent entre 50 et 95% du poids sec du biofilm. Cette matrice renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. Le biofilm grandit et s'épaissit jusqu'à devenir macroscopique. La dernière étape est la phase de dispersion induite par le vieillissement du biofilm, des carences ou le stress lié à l'environnement. Les bactéries se détachent de la matrice, retournent à l'état planctonique, et peuvent ainsi coloniser une autre surface.

Le *quorum sensing* est la capacité qu'a une bactérie à communiquer et à coordonner son comportement avec les autres bactéries d'une même colonie en utilisant des molécules de signalisation. Grâce au *quorum sensing*, les bactéries d'une même espèce coordonnent certains comportements ou actions entre elles, en fonction de leurs nombres. Par exemple, les bactéries opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent croître dans l'organisme hôte sans effets

pathogènes jusqu'à ce qu'elles atteignent une certaine concentration. Ces bactéries deviennent alors agressives et leur nombre suffit à dépasser le système immunitaire hôte et à former un biofilm, entraînant la maladie.

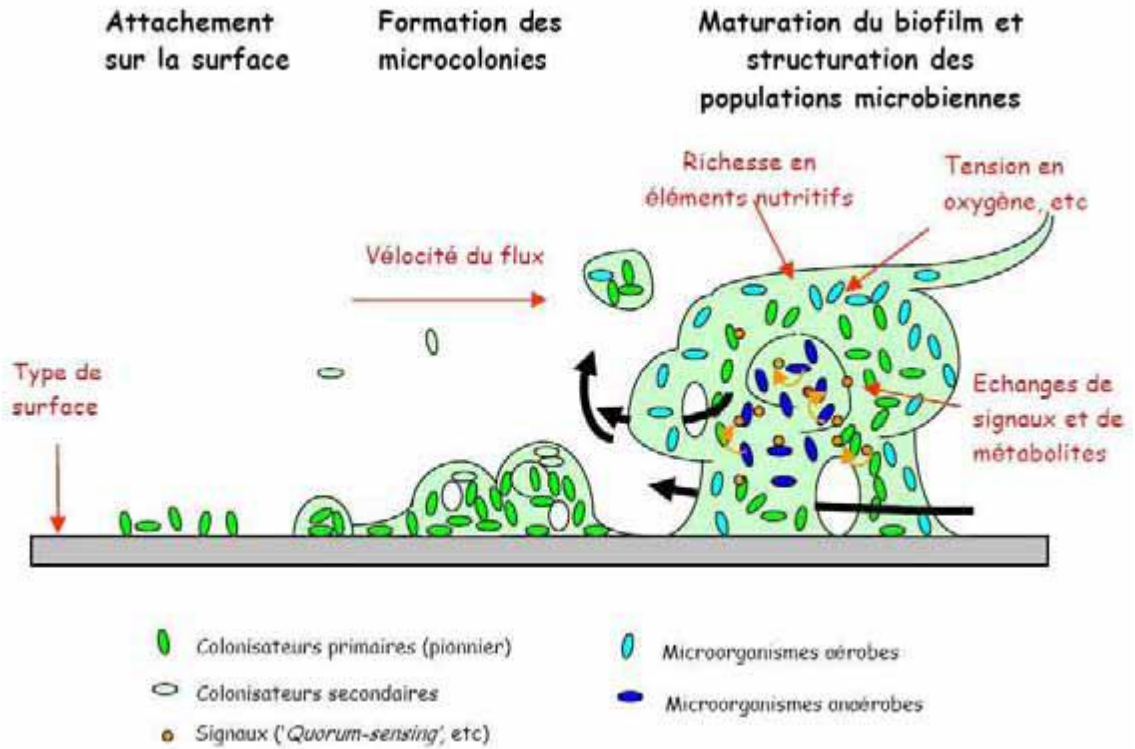


Figure 13 : Représentation schématique du développement d'un biofilm (Prigent-Combaret et al., 2001). En rouge sont indiqués les principaux paramètres qui influencent l'architecture du biofilm mature.

Propriétés du biofilm

Le biofilm mature possède une structure bien établie. Les micro-colonies sont séparées par des canaux qui forment un réseau de circulation permettant d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions profondes du biofilm, mais aussi d'évacuer les déchets. Un gradient d'oxygène et de nutriments est observable depuis le sommet jusqu'au coeur du biofilm. Au sein de cette structure, les bactéries modifient leurs caractéristiques phénotypiques : modification de la morphologie, des caractéristiques énergétiques, disparition de flagelles, (Flemming, 1993; Costerton et al., 1995; Briandet et al., 2001). Il a été démontré qu'en les comparant avec des bactéries planctoniques, 38% des gènes de *E. coli* étaient modifiés au cours de la phase de colonisation (Prigent-Combaret et al., 1999). L'éradication des biofilms bactériens pose de nombreux problèmes, car si les antibiotiques ou biocides sont probants sur les bactéries

planctoniques, ils le sont beaucoup moins sur un biofilm. Les raisons de cette résistance sont encore discutées et plusieurs hypothèses sont avancées. La concentration en nutriments à l'intérieur du biofilm étant faible, les bactéries situées à l'intérieur de celui-ci auraient un métabolisme et une croissance ralentis rendant les antibiotiques inefficaces. La seconde hypothèse serait que la matrice d'exopolymères ralentirait la pénétration d'antibiotiques et de biocides. Ainsi, l'alginate, exopolymère sécrété par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, capture le peroxyde d'hydrogène qui n'atteint alors pas la cellule bactérienne (Filloux et Vallet, 2003).

Aspects positifs

Dans les eaux, sur et sous terre, les biofilms sont des composants essentiels des environnements naturels. Les micro-organismes constituent la majeure partie de la biomasse vivante terrestre et en tant que tel ont un rôle majeur dans le recyclage des éléments essentiels à la vie. Les bactéries ont été associées à la formation de plusieurs types de rocs sédimentaires et de minéraux. D'autre part, les biofilms ont été utilisés depuis des siècles avec succès dans le traitement des eaux et des eaux usées. Des ingénieurs anglais ont développé le premier filtre à sable pour traiter les eaux dans les années 1860. Dans ce type de filtration, la surface du filtre joue le rôle de support pour l'adhésion des bactéries, qui forment ainsi un biofilm apte à dégrader la matière organique de l'eau. La biomasse immobilisée sur le filtre est évacuée durant le cycle de rétrolavage.

Dans les sols, la morphologie des biofilms peut être très variable, allant de quelques colonies à d'épais biofilms, selon les conditions environnementales. Quand des contaminants toxiques (tel que le gasoil, l'essence, ou les solvants chlorés) sont accidentellement rejetés dans le sol, la population bactérienne doit s'adapter à la nouvelle composition du milieu afin d'utiliser ces contaminants comme substrat. Ce procédé est appelé bioremédiation et s'il fonctionne bien, il a la capacité de transformer les matières organiques toxiques en sous-produits inoffensifs. La biolixiviation est l'utilisation de micro-organismes pour extraire des métaux d'un minerai. La lixiviation consiste à séparer une substance soluble d'une structure solide. Pour cela, le solide est incorporé à une préparation liquide qui facilite son extraction. En ce qui concerne la biolixiviation, on utilise une solution bactérienne. La biolixiviation est un procédé utilisé actuellement à grande échelle, à des fins commerciales comme par exemple dans le cas de la biolixiviation du cuivre. De nos jours, environ 10 à 20% des cuivres miniers des USA sont extraits par des procédés faisant intervenir des bactéries. Il existe un investissement considérable dans l'extension des procédés de biolixiviation aux métaux tels que l'uranium, l'argent, l'or et enfin le molybdène. Les micro-organismes sont aussi utilisés pour la bio-oxydation, non pour extraire les métaux mais pour les

préparer en vue de cette opération. La bio-oxydation est principalement employée lors de l'extraction de l'or. Des micro-organismes capables de dégrader l'enrobage minéral des minerais d'or par oxydation avant le procédé d'extraction. Ces interactions bactérie/éléments métalliques sont un point clé des piles à combustible microbiennes (PACMs). En effet, la plupart des bactéries isolées des PACMs sont des bactéries métallo-réductrices.

Biofilm de la rhizosphère

La plupart des bactéries du sol s'organisent en biofilm sur les racines et les particules du sol (Costerton et al., 1987). Toutefois, l'étude de ces structures est compliquée par la difficulté à cultiver une grande partie des espèces présentes (Burmolle et al., 2006). Des méthodes physiologiques, biochimiques et moléculaires peuvent être utilisées pour contourner ces problèmes (Amann et al., 1995 ; Aoi, 2002 ; Singh et al., 2006). Les structures bactériennes formant des biofilms autour des hyphes des champignons mycorhiziens ont probablement un rôle important dans la capacité accrue que certaines plantes ont à faire face aux agents pathogènes dans le sol (Whipps, 2001 ; Timmusk et al., 2005). La formation des biofilms sur les surfaces biotiques est relativement peu connue jusqu'à maintenant. Quelques équipes de recherche ont néanmoins étudié des biofilms se formant sur les racines de plantes (Timmusk et al., 2005 ; Fujishige et al., 2006 ; Rudrappa et al., 2008) (Tableau 3). Des recherches récentes s'intéressent maintenant à la formation des biofilms bactériens associés aux surfaces de champignons du sol et leurs éventuelles applications technologiques (González-Chávez et al., 2008 ; Seneviratne et al., 2008). Certaines études sur les biofilms se font avec des bactéries qui proviennent de collections de cultures (Timmusk et al., 2005 ; Li, et al., 2007 ; Paramonova et al., 2007 ; Wijman et al., 2007), d'autre se font avec des bactéries isolées directement d'échantillons environnementaux (Burmolle et al., 2006 ; Burmolle et al., 2007).

Le plus souvent inoffensifs, les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes en participant notamment au cycle du carbone, de l'eau. D'ailleurs, depuis de nombreuses années, le traitement de nos eaux usées s'effectue grâce à l'utilisation empirique de l'activité épuratrice des biofilms bactériens. Ces derniers jouent aussi un rôle essentiel dans de nombreux processus : ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. La coopération métabolique établie au sein du biofilm permet de réaliser ces réactions qui requièrent l'action concertée de bactéries ayant différentes capacités métaboliques.

Tableau 3: Exemple de formation d'un biofilm sur les plantes avec différents sites (Monier et Lindow, 2004).

Bacteries	plantes hotes	Interaction	Site de colonisation
Aerial tissue colonizers			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Diverse	Mutualist	Leaves
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i>	Commensal/ Beans	Pathogen	Leaves
<i>Methylobacterium</i> spp. <i>Erwinia amylovora</i> ,	Diverse Fruit trees	Commensal Pathogen Fruit	Leaves (stomates) leaves and flowers
Vascular colonizers			
<i>Pantoea stewartii</i>	Maize	Pathogen	Xylem vessels
<i>Xylella fastidiosa</i>	Citrus and grape	Pathogen	Xylem vessels
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	Crucifers	Pathogen	Xylem vessels
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Diverse	Pathogen	Roots to xylem
<i>Clavibacter xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	<i>michiganensis</i> pv. <i>Sepedonicus</i>	Pathogen	Potato Pathogen Xylem vessels Xylem vessels
<i>Spiroplasma</i> spp.	Diverse	Pathogen	Phloem vessels
Root colonizers			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Diverse dicots	Pathogen	Roots and crown tissue
<i>Azospirillum brasilense</i>	Cereals	Mutualist	Root hairs
<i>Bacillus cereus</i>	Diverse	Commensal	Roots
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Onions	Pathogen	Roots
<i>Pseudomonas</i> spp.	Diverse Commensal/	Mutualist	Roots
<i>Rhizobium</i> spp.	Legumes	Mutualist	Root hairs and nodules

Les biofilms associés aux plantes

Le processus de la rhizodéposition (rejet de matières organiques des racines) et celui de la décomposition de la matière organique fraîche (agglomérat de molécules organisées d'une certaine manière) ont permis de développer les sols et de faire de la mycorhizosphère une niche écologique assez riche. La composition et la structure des constituants des sols représentent une véritable mine énergétique et structurante ce qui confère aux sols une meilleure disponibilité en nutriments facilement assimilables. Ces constituants représentent un stock de matières carbonées favorisant ainsi la stabilité de la structure du sol et le développement à long terme de l'activité microbiologique. Les micro-organismes, dont la quasi-totalité sont hétérotrophes, ont développé des mécanismes pour en tirer profit (Davey and O'Toole, 2000). Par exemple, certains micro-organismes bénéfiques du sol vivent en symbiose étroite avec les racines des plantes (Figure 14 et 15), allant jusqu'à former des structures spécialisées et complexes comme les mycorhizes, les nodules et les biofilms. Ces modes de vie permettront à la fois d'améliorer la croissance microbienne et végétale. Dans un biofilm, les mucus bactériens, communément appelés matrice d'exopolysaccharides, permettent d'agglutiner diverses substances (fibres végétales, cristaux de roche et débris d'animaux) et de former par conséquent des microcavités assurant la protection des bactéries ainsi que le transport de l'eau et des nutriments. Dans la mycorhizosphère, les biofilms possèdent diverses particularités intéressantes en agriculture, à savoir l'amélioration des échanges sol/plante, la synergie avec d'autres micro-organismes du sol, la protection contre les pathogènes.

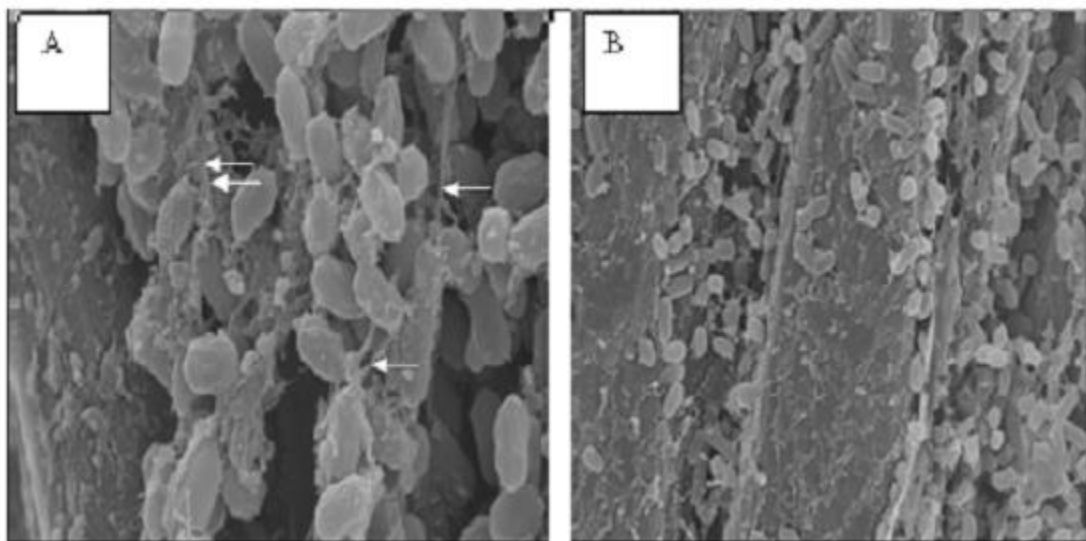


Figure 14 : Colonisation et formation d'un biofilm par *Bacillus* sur la surface des racines (Budiharjo et al., 2011)

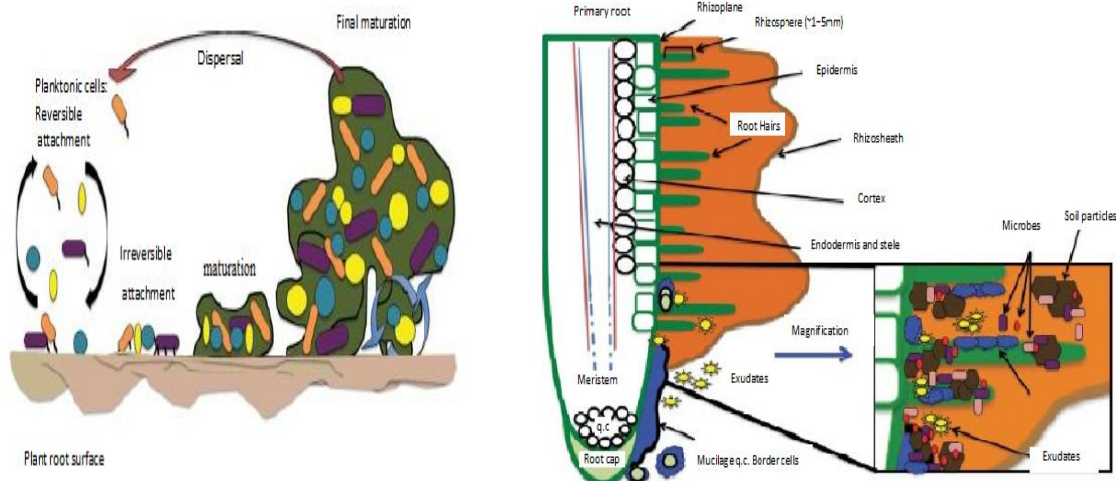


Figure 15 : Développement d'un biofilm bactérien sur la surface d'une racine de la plante (Sauer et al., 2002).

Paramètres qui influencent l'adhésion des bactéries

Il est important de noter, que les paramètres qui vont être présentés jouent un rôle important au cours de l'adhésion primaire du micro-organisme, c'est-à-dire au cours de la première phase de l'adhésion des micro-organismes lors de la formation d'un biofilm.

➤ Influence du matériau

La charge de surface et le caractère hydrophobe des matériaux

La charge à la surface d'un solide peut engendrer des forces électrostatiques d'attraction ou de répulsion lors de l'approche de la bactérie. Les cellules bactériennes possèdent une charge négative sur leur membrane cellulaire (Corpe, 1970) mais cette charge est plus ou moins importante d'une souche à l'autre. La charge de surface du matériau peut être modifiée par le pH et la composition ionique de la solution environnante. Selon Lerebour, rendre la surface d'un matériau hydrophobe et apolaire pourrait réduire l'adhésion microbienne et les liens adhésifs entre le micro-organisme et le matériau (Lerebour et al., 2004). Cependant la charge de surface peut aussi être modifiée par l'adsorption de protéines, qui a lieu au cours des premières étapes de l'adhésion. Cette adsorption augmente avec l'hydrophobicité du support (Nath et al., 2004; Pamula et al., 2004).

Le nettoyage des surfaces

Les traitements de nettoyage des surfaces influencent la charge et l'énergie de surface du matériau (Boulangé-Petermann ,1997). Selon les produits utilisés pour le nettoyage des surfaces (produits acides, basiques, ...), les surfaces peuvent être plus ou moins chargées et posséder des énergies de surface différentes, engendrant ainsi une adhésion différente du micro-organisme. Le nettoyage de l'acier avec un mélange HF/HNO₃ dissout la couche d'oxydes du matériau. Dès que le matériau est exposé à l'air, il se recouvre à nouveau d'oxydes. Selon le temps d'exposition à l'air, la couche d'oxydes ne possède pas les mêmes propriétés et peut donc influencer l'adhésion.

La rugosité des matériaux

La rugosité semble jouer un rôle important dans l'adhésion bactérienne. L'influence de la rugosité du support reste tout de même un paramètre très discuté dans la littérature. Des chercheurs suédois ont comparé le développement de biofilms sur des échantillons d'acier inoxydable présentant différents états de surface, exposés à de l'eau potable municipale (Pedersen, 1990). Après 167 jours, ils constatent qu'un acier inoxydable mat rugueux était 1,4 fois plus recouvert de micro-organismes que l'acier électropoli. Selon les auteurs, des surfaces rugueuses d'une part possèdent une surface active plus importante, et d'autre part protègent les cellules des forces de cisaillement dues à l'écoulement. En revanche, pour d'autres auteurs, la rugosité permet de réduire la surface de contact entre le micro-organisme et le support, favorisant ainsi son détachement (Boulangé-Petermann, 1997). Ainsi, la rugosité des supports ne paraît pas influencer directement l'adhésion. Certains auteurs rapportent que la rugosité des matériaux influence l'adhésion au-dessus d'une valeur de rugosité moyenne de 0,9µm (Hilbert et al., 2003). D'autres auteurs affirment qu'au dessus de 10 µm (Scheuerman et al., 1998), la rugosité n'a plus d'influence sur l'adhésion. Il apparaît alors que pour que la rugosité influence l'adhésion des micro-organismes, la valeur de la rugosité moyenne du support doit être de l'ordre de grandeur du diamètre de l'élément biologique étudié.

Influence de la cellule bactérienne

De nombreux facteurs cellulaires peuvent modifier l'adhésion cellulaire sur des surfaces de matériau. Parmi ceux-ci, certains sont liés à la physiologie du micro-organisme lui-même, la présence d'appendices (pili, flagelle...), le mode de culture, le temps de contact avec le support et la composition du milieu de suspension.

Caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des cellules

L'hydrophobicité globale d'un micro-organisme peut être mesurée à l'aide de la technique MATS (Microbial Adhesion To Solvents (Bellon-Fontaine et al., 1996)). La bactérie *Bacillus cereus*, est une bactérie Gram+. La paroi des bactéries Gram positif est constituée de peptidoglycane : il est composé de glycanes reliés entre eux par des petites chaînes peptidiques, il forme un filet de mailles plus ou moins serrées. Dans le cas des bactéries à Gram négatif une membrane externe supplémentaire existe, dans laquelle sont insérés des lipoprotéines, des Lipo Poly Saccharides (LPS) et des trimères : c'est un réseau lâche et plus mince que la membrane des bactéries Gram+ (Figure 16). Les parois des bactéries Gram- possèdent également davantage d'acides aminés et de lipides. Les bactéries Gram- sont généralement plutôt hydrophiles. Cependant les protéines de surface présentes sur leur paroi peuvent les rendre hydrophobes.

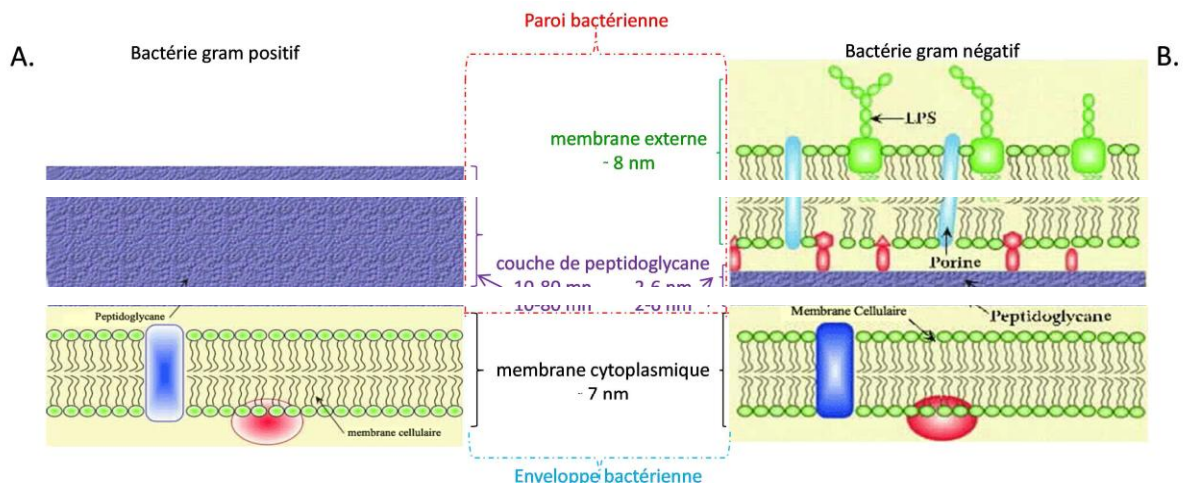


Figure 16 : Schéma de la composition des parois des bactéries A : d'une bactérie à Gram positif, B : d'une bactérie à Gram négatif.

Il a été démontré que cette caractéristique du micro-organisme se révèle importante du point de vue de l'adhésion. Pradier et al., ont récemment montré que, parmi trois souches de bactéries marines Gram-, la souche dont la surface est la plus riche en protéines adhère deux fois plus à l'acier mais aussi au verre et au téflon que les autres souches (Pradier et al., 2005). Faille et al., ont démontré, par exemple, que le nombre de spores hydrophobes adhérentes sur différents supports (PVC, verre, acier inoxydable) de *Bacillus cereus* était dix fois plus élevé que celui des spores hydrophiles de *Bacillus subtilis* (Faille et al., 2002). De plus, les *B.cereus* étaient plus résistants que les *B.subtilis* aux procédures de nettoyage.

La présence d'appendices (pili, flagelles) ou de substances polymériques extracellulaires

La résistance des biofilms, en terme de force d'adhérence, peut être due à la présence d'appendices. Plusieurs auteurs indiquent que la présence de flagelles et la mobilité des bactéries favorisent les premières étapes de formation du biofilm (Gavin et al., 2003; Lejeune, 2003; Moreira et al., 2003). Les flagelles peuvent, en effet, faciliter le contact avec le support en permettant de franchir la zone de répulsion électrostatique (Herald et al., 1988). Ceci favorise l'adhésion des cellules directement en contact avec la surface. Les pilis jouent également un rôle primordial dans l'adhésion et/ou l'auto-aggrégation des micro-organismes (Bieber et al., 1998), les bactéries n'ayant pas de pilis adhèrent moins facilement que les autres (Fletcher et al., 1993). Le rôle des appendices dans l'adhésion explique pourquoi certaines cellules qui possèdent des propriétés de surface différentes peuvent coloniser le même type de support.

Le mode et le milieu de culture

Le mode de culture est une caractéristique importante qui peut modifier fortement l'adhésion des organismes. Il a été démontré que la température de croissance avait un effet significatif sur la mobilité électrophorétique cellulaire et la production de flagelles (Briandet et al., 1999) et, ainsi sur l'adhésion. La surface de la bactérie, et donc son caractère hydrophobe peuvent être affectés par la température de croissance (Briandet et al., 1999), l'aération du milieu de culture (Aguilar- Uscanga et al., 2003), la vitesse de rotation lors des centrifugations. De même, la composition du milieu de culture reste aussi un paramètre important. La force ionique est souvent présentée comme un paramètre qui influence l'adhésion (Fletcher, 1988). Cependant certains auteurs ne trouvent aucune influence de la force ionique sur l'adhésion de levures sur du verre pour des concentrations de 33, 150 et 330 mM (Mercier-Bonin et al., 2004).

Le temps de contact entre le micro-organisme et son support

Le temps de contact entre le micro-organisme et son support est également très important et joue sur l'adhésion. Ainsi, certains auteurs ont pu mettre en évidence que des levures étaient plus résistantes à l'écoulement (se détachaient plus difficilement) sur une plaque de verre après un temps de contact de 15h que de 1h (Mercier-Bonin et al., 2004). Après un temps d'incubation plus long (15 à 180 minutes), le nombre de bactéries adhérentes s'est aussi révélé plus important (Fletcher et al., 1993).

L'adhésion des micro-organismes dépend donc des propriétés des deux entités, à savoir le support et la bactérie, sans oublier le milieu environnant. Il faut noter cependant que le support peut être modifié assez rapidement. En effet, lorsqu'il est placé dans un environnement aqueux contenant des molécules organiques, ces dernières viennent contaminer la surface du support et ainsi modifier les propriétés physicochimiques. De même, les propriétés de surface des bactéries peuvent évoluer avec l'âge de la culture. Notre travail s'est inscrit dans une approche globale puisque l'intérêt s'est préférentiellement porté sur l'étude de l'adhésion d'un biofilm de *B. cereus* de quelques jours. La plupart des conditions expérimentales ont été fixées en vue d'une reproductibilité des manipulations: croissance de bactéries à 30°C dans des milieux de cultures identiques, ... Le seul paramètre modifié étant les matériaux sur lesquels l'adhésion est étudiée.

CHAPITRE 4 : Présentation de la zone d'étude et analyses physico-chimiques des sols

1. Matériel et méthodes

1.1 Présentation de la zone d'étude

La wilaya de Naâma est issue du dernier découpage administratif de 1984. Elle se compose de 7 daïras regroupant 12 communes. Elle est insérée entre l'Atlas tellien au nord et l'Atlas Saharien au sud; elle s'étend sur une superficie de 29825 km² pour une population de 164 894 habitants, soit une densité en moyenne de 5.6.

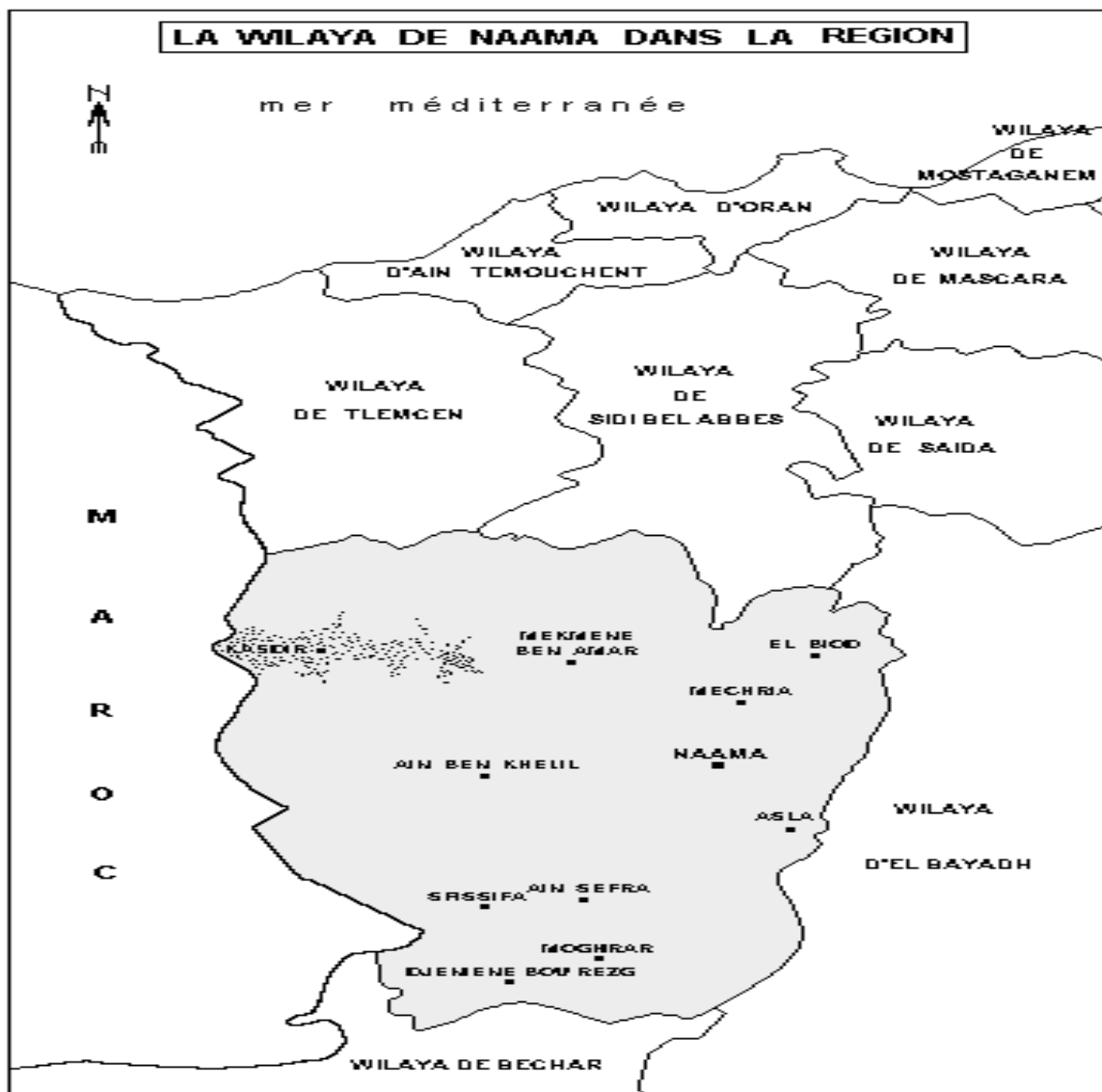


Figure 17: Carte des limites administratives de la wilaya de Nâama (DPAT, 2007)

On distingue trois zones géographiques homogènes :

Une zone steppique constituée par une vaste plaine (74% du territoire de la wilaya) dont l'altitude augmente sensiblement vers le sud (1000 à 1300 m). Elle est caractérisée par la prédominance de l'activité pastorale. D'ouest à l'est, elle couvre l'espace compris entre les reliefs proches de la frontière Algéro-Marocaine et la limite occidentale de la wilaya d'EL Bayadh. Dans cet espace la majeure partie des eaux de ruissellement sont drainées vers les deux endoréismes que constitue la zone, il s'agit du Chott Rharbi (1317 km²) à l'ouest et du Chott Chergui à l'est (12216 km²). (Bensaid, 2006)

Une zone montagneuse localisée dans la région sud-ouest atteignant les 2000 mètres d'altitude et occupant 12 % du territoire de la wilaya. Il s'agit d'une partie des monts des Ksour et des piémonts de l'Atlas Saharien. Elle est caractérisée par une agriculture de type oasisien. (Bensaid, 2006)

Une zone présaharienne qui s'étend sur une superficie de l'ordre de 14% de la superficie totale de la wilaya.

1.1.1 La nature des sols :

Une plus grande superficie est occupée par les sols calcimagnésiques

1.1.1.1 Sols calcimagnésiques :

Elle est représentée par plusieurs types de sols : les rendzines, sols bruns calcaires et sols bruns calciques, sols à encroûtement gypseux. Ces sols occupent les glaciaires du quaternaire ancien et moyen. (Bensaid, 2006)

1.1.1.2 Sols minéraux bruts

Les sols minéraux bruts sont représentés par les sols minéraux bruts d'érosion, les sols minéraux bruts d'apport alluvial et les sols minéraux bruts d'apport éolien.

- **Sols minéraux bruts d'érosion** : sont situés sur de fortes pentes où les couches superficielles sont constamment entraînées empêchant ainsi la formation du sol. Le couvert végétal est très peu significatif avec toutefois quelques reliques de chêne vert (*Quercus ilex*) et le genévrier oxycèdre (*Juniperus oxycedrus*). (Bensaid, 2006)

- **Sols minéraux bruts d'apport alluvial** : se rencontrent au niveau des oueds importants. Ils présentent une texture sableuse, une forte charge caillouteuse et leur profondeur est variable.

- **Sols minéraux bruts d'apport éolien** : ils sont constitués de sable et de dunes plus au moins mobiles. Ces sols sont occupés par une végétation psammophile à *Aristida pungens* et *Arthrophytum scoparium* (Bensaid, 2006).

1.1.1.3 Sols peu évolués

La classe de sols peu évolués est composée par :

- Les sols peu évolués d'érosion sur roche mère dure (calcaire et gré) ou tendre (marnes), présentant une proportion élevée d'éléments grossiers, une forte charge caillouteuse et un faible taux de matière organique (<2%);
- Les sols peu évolués d'apport alluvial occupent particulièrement les zones basses (zone d'épandage, daïa, chenaux d'oued). Ces sols représentent la majeure partie des terres mises en culture.

1.1.1.4. Sols halomorphes

Ils se localisent au niveau des zones de dépressions (Chott et sebkha) et des zones d'épandage des principaux oueds. Ces sols se développent sur des matériaux alluviaux à texture sablo limoneuse, et ils se répartissent en auréoles autour des chotts et des sebkhas et en bas des glaciers. Leur couvert végétal bien qu'homogène dans l'ensemble varie selon leur degré de salinité et leur taux d'humidité. Quand la salure est trop importante, la végétation se compose d'espèces hyper-halophytes (*Halcnemum strobilaceum*). Toutefois, lorsque cette salure diminue on rencontre un couvert végétal halophyte qui se compose de *Salsola vermiculata*, *Attriplex halimus* et *Suaeda fruticosa* (Bensaid, 2006).

1.1.2 Type de couvert végétal :

Végétations steppiques :

L'aridité du climat ne permet pas le développement d'un couvert végétal capable de protéger la surface du sol. La plupart des espèces, en ce milieu aride, ont acquis des caractéristiques biologiques et morphologiques particulières leur permettant de surmonter toutes les conditions défavorables du milieu. Malgré le faible taux de recouvrement la végétation steppique constitue une ressource naturelle de grande importance notamment dans la protection du sol contre le phénomène de l'érosion éolienne et dans la structuration des horizons superficiels du sol. Selon FAO (1960) toutes éliminations ou dégradation du tapis végétal ou des résidus végétaux qui protègent le sol sont la cause principale de l'érosion éolienne. L'aspect de la steppe change avec le gradient

pluviométrique et la nature du sol. La steppe du Sud-Ouest algérien est dominée par les formations végétales suivantes:

- Steppe à alfa (*Stipa tenacissima*),
- Steppe à armoise blanche (*Artemisia herba Alba*),
- Steppe à sparte (*Lygeum spartum*),
- Steppe à halophytes,
- Steppe à psamophyte.

1.1.2.1 Steppes à alfa (*Stipa tenacissima*)

L'alfa est une plante pérenne qui est capable de résister aux aléas climatiques et aux conditions sévères de sécheresse tout en maintenant une activité physiologique même au ralenti (Aidou et Touffet, 1996). Les steppes à alfa investissent les espaces à bioclimats semi-arides à hiver frais et froid et dans l'étage aride supérieur à hiver froid. Elles colonisent tous les substrats géologiques de 400 à 1800 mètres d'altitude. Cette steppe couvre 4 millions d'hectares sur les Hauts-Plateaux, de la frontière marocaine à la frontière tunisienne; à l'ouest, elle déborde jusque dans le Tell, atteignant le littoral; au centre, elle couvre quelques milliers d'hectares dans le Sahara. Selon Nedjraoui (1981) la production de l'alfa peut atteindre 10 tonnes de matière sèche par hectare (MS/ha) mais la partie exploitable est de l'ordre de 1000 à 1500 kg MS/ha.

L'alfa joue un rôle très important dans le maintien du sol et de sa protection contre le phénomène de l'érosion éolienne et les accumulations de sable au cours des périodes de sécheresses et de déficit hydrique du sol (Aidou et Touffet, 1996).

1.1.2.2 Steppe à armoise blanche : Chih (*Artemisia herba alba*)

L'armoise blanche est localisée dans les étages arides supérieurs et moyens à hiver frais et froid avec des précipitations oscillant entre 100 et 300 mm. Elle s'étale dans les zones humides (zone d'épandage) et sur un substrat plus ou moins limoneux ou sur un sol argileux dans les fonds des dépressions non salées (Bouabdellah, 1991).

1.1.2.3 Steppe à sparte (*Lygeum spartum*)

Le sparte est une espèce qualifiée de médiocre sur le plan pastoral comme l'alfa. Seules les jeunes poussent et ses inflorescences sont broutées par les ovins. Sa valeur énergétique (0.3 à 0.4 UF/kg.MS) est assez faible (Bensaid, 2006).

1.1.2.4 Steppe à halophytes

La concentration et la répartition inégale des sels dans l'espace ont donné naissance à une formation particulière de la végétation steppique halophile très appétissante autour des dépressions salées. Les espèces les plus répandues sont : *Atriplex halimus*, *Atriplex glauca*, *Suaeda fruticosa* et *Frankenia Thymifolia* (Nedjraoui, 1981).

1.1.2.5 Steppe à psammophytes

Ce type de steppe se développe sur des terrains à texture sablonneuse et aux apports d'origine éolienne. Dans la plus part des cas elle suit les couloirs d'ensablement et se répartit également dans les dépressions salées. On distingue des steppes graminéennes à *Aristida Pungens* et *Thymellaea Microphyla* et des steppes arbustives à *Retama retama* (raetam) (Bensaid, 2006).

1.2 Localisation des sites de prélèvement

Les échantillons de sol sont collectés stérilement de la rhizosphère de quatre régions différentes : Abdelmoula (sol1), Mekmen Ben Amar (sol2), Mecheria (sol3), et Ain sefra (sol4), (Figure 18 et 19). Leurs sols sont de texture sableuse, pH alcalin, quantité moyenne de calcaire et un taux faible en matière organique.

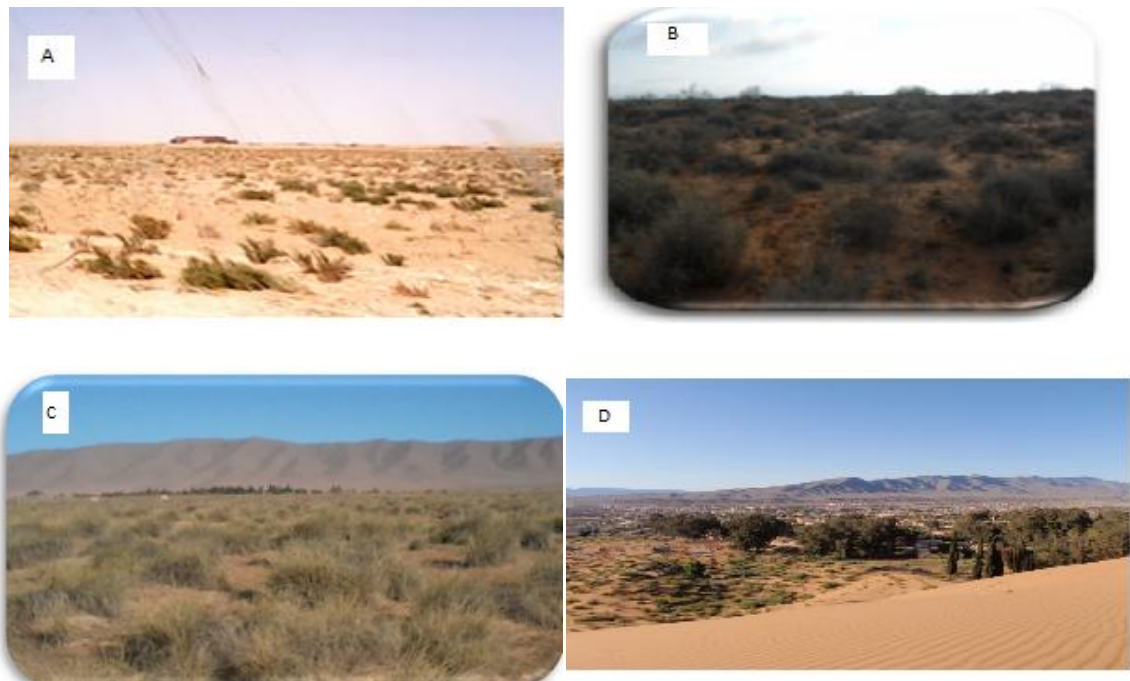
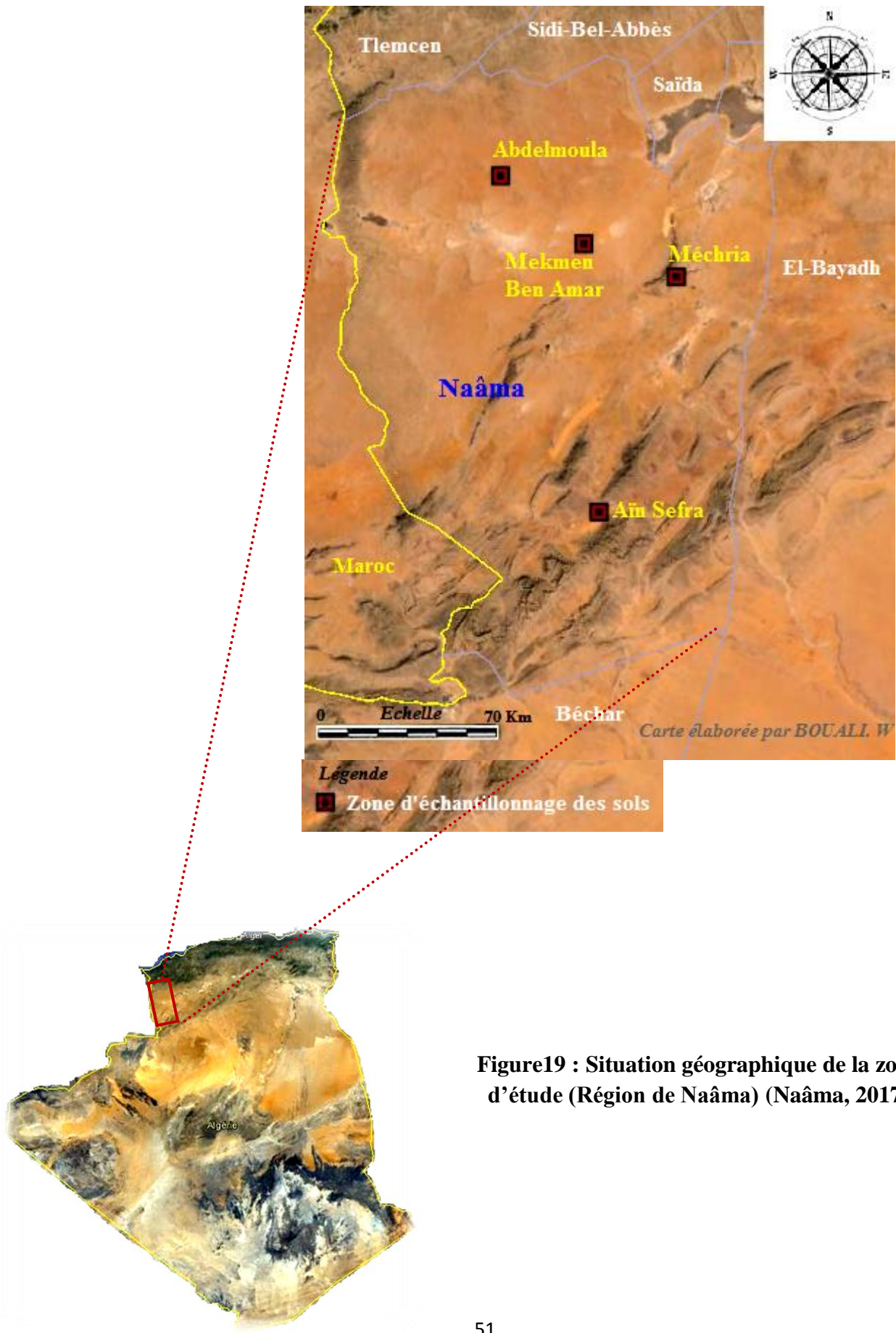


Figure 18 : Localisation des sites de prélèvement. (A): Abdelmoula; (B): Mekmen Ben Amar; (C): Mecheria; (D): Ain Sefra (Naâma, 2017)



1.3 Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sol ont été collectés à partir de la région de Naâma à une profondeur de 10 à 15 cm en dessous de la surface du sol, les prélèvements sont réalisés en enfonçant simplement une cuillère préalablement stérilisée dans le sol, la terre ainsi prélevée est ensuite placée dans des sachets stériles bien scellés.

1.4 Analyses physico-chimiques des sols (Analyses pédologiques)

Nous avons réalisé un certain nombre d'analyses physico-chimiques du sol pour la zone étudiée. Nous avons ainsi pris en considération les paramètres suivants : la texture, la matière organique, l'acidité, le calcaire et la salinité.

Pour les zones étudiées, nous avons pris un échantillon au niveau de l'horizon exploré par les racines. Les échantillons du sol mis à sécher à l'air libre de 4 à 8 jours. Une fois séchée, la terre est tamisée par un tamis à mailles de 2 mm (AFNOR, 1987), séparant les éléments grossiers de la terre fine (> 2mm).

Les analyses physico-chimiques sont effectuées selon la base de Clément et Françoise (1998, 2003). Les analyses sont effectuées au niveau du laboratoire de pédologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et l'univers de l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen.

1.4.1 Détermination de la texture :

Analyse granulométrique :

L'analyse granulométrique porte sur la terre fine du sol (éléments de taille inférieure à 2 mm) obtenue par tamisage, puis dépourvue de matière organique (élimination par l'eau oxygénée). Après destruction des agrégats (par un dispersant, type hexamétaphosphate de Na), les particules sont séparées par sédimentation, au cours de laquelle elles présentent une vitesse de chute en rapport avec leur diamètre.

- L'essai consiste à fractionner au moyen d'une série de tamis un matériau en plusieurs classes granulaires de tailles décroissantes.
- Les masses des différents refus et tamisages sont rapportées à la masse initiale du matériau.
- Les dimensions de mailles et le nombre de tamis sont choisis en fonction de la nature de l'échantillon et de la précision attendue.

- La norme actuelle (EN 933-2) préconise, pour l'analyse granulométrique, la série de tamis suivante en (mm): 0.045, 0.063, 0.125, 0.25, 0.50, 1, 2.

1.4.2 Détermination de la matière organique :

La matière organique du sol est la fraction comprenant les constituants issus, pour l'essentiel, de la transformation des résidus végétaux du sol, des résidus animaux et des corps microbiens.

Le dosage de la matière organique est réalisé à partir du dosage de l'un de ses constituants : le carbone organique; ce dernier est estimé à 58% de la matière organique (M.O) d'où
 $\% \text{ M.O} = \% \text{ C.O} \times 1,72$.

Cette méthode permet le dosage direct du carbone organique par colorimétrie après oxydation de la matière organique par le bichromate de potassium en excès en milieu sulfurique et à 135°C. En effet, la quantité de chrome III+ formée est proportionnelle à la teneur en carbone organique présente dans le sol.

$$\%COx = \frac{(40 - d * f) * 0,3}{g} * 100$$

%Cox : pourcentage de carbone oxydé ;

0,3 : conversion en mg ;

40 ml : de bichromate de potassium;

d : volume de solution de sel de Mohr ;

f = 40% a

a : titrage de la solution témoin contenant seulement K₂Cr₂O₇.

Tableau 4: Echelle d'interprétation de la quantité de l'humus (Baize, 2000).

COX (%)	Humus (%)	Quantité
< 0,6	< 1	Très faible
0,6-1,15	1-2	Faible
1,15-1,75	1-3	Moyenne
1,75-2,90	1-5	Forte
> 2,90	> 5	Très forte

1.4.3 Mesure de pH :

La qualité physico-chimique du sol est importante à connaître car elle conditionne la diversité de la microflore tellurique. Dans ce cas, le pH est un paramètre à déterminer du fait de leur influence sur la composition de la communauté microbienne tellurique.

La mesure du pH consiste à homogénéiser 10 g de sol dans 25 ml d'eau distillée. Après agitation, à l'aide d'un homogénéisateur pendant 15 minutes et décantation le pH du surnageant est déterminé.

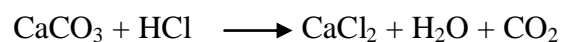
Tableau 5 : Echelle d'interprétation de l'acidité actuelle (Baize, 2000).

pH	Sol
< 3,5	Hyper acide
3,5-5,0	Très acide
5,0-6,5	Acide
6,5-7,5	Neutre
7,5-8,5	Basique
> 8,5	Très basique

1.4.4 Dosage du calcaire total (CaCO₃)

Cette technique est basée sur la réaction caractérisée du carbonate de calcium anhydre (CaCO₃) avec du HCl (6N). Le dosage du calcaire total est réalisé à l'aide du Calcimètre de Bernard (Baize , 2000).

On compare le volume de gaz carbonique dégagé sous l'action du HCl par un poids connu de terre à analyser, avec celui que l'on obtient dans les mêmes conditions de températures et de pression atmosphériques avec Ca CO₃ selon la réaction :



$$\% \text{ CaCO}_3 = \left[\frac{(p.v)}{(P.v)} \right] * 100$$

Tableau 6 : Echelle d'interprétation de la charge en calcaire dans le sol (Baize, 2000).

Carbonate (%)	Charge en calcaire
≤ 0,3	Très faible
0,3-3,00	Faible
3,00-25,0	Moyenne
25,0-60,0	Forte
> 60,0	Très forte

1.4.5 Mesure de la conductivité électrique (CE):

La CE permet de déterminer la salinité d'un sol. Elle s'effectue à partir de l'extrait du sol dilué au 1/5 dans l'eau distillée en homogénéisant 10g de sol/ 50 ml H₂O. Après agitation (30mn) et décantation, la CE de l'extrait est mesurée à l'aide d'un conductivimètre. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{S}/\text{cm}$. L'estimation de la teneur globale en sels dissous a été faite à l'aide de l'échelle de salure des sols.

Tableau 7 : Salinité des sols en fonction de la C.E. (Baize, 2000).

CE 25°C ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Désignation
< 250	Non salé
250 < CE _{25°C} < 750	Moyennement salé
750 < CE 25°C < 2250	Fortement salé
2250 < CE 25°C < 5000	Très fortement salé
5000 < CE 25°C < 20000	Excessivement salé

2. Résultat et discussion

2.1 Analyse du sol

Les résultats de texture, des valeurs de pH, de la CE, CaCO₃ et de la matière organique sont résumés dans le tableau 8. Les quatre sols sont considérés alcalin (pH variant de 8.08 à 8.50), la C_E est élevée pour les quatre sols. Les quatre sols sont moyennement calcaires. De plus, les taux de matière organique ou de carbone total témoignent de la nature et de la localisation des sols. Il est clair que les quatre sols situés en régions semi-arides et arides sont pauvres en matière organique.

Tableau 8 : Détermination des paramètres physico-chimiques des sols

Echantillons	Texture	pH	C_E (μS/cm)	CaCO₃ (%)	Mat org (%)
Sol1	Sableuse (88.27% sable)	8.08	625	8.5	1.03
Sol2	Sableuse (96.24% sable)	8.39	690	11.5	1.23
Sol3	Sableuse (94.33% sable)	8.30	680	19	1.17
Sol4	Sableuse (98.27% sable)	8.50	705	14.5	1.37

Dans notre cas d'étude, les sols testés renferment des taux faibles en éléments grossiers. Les éléments grossiers (EG) sont tous les constituants minéraux individualisés (fragments de roches poly- ou mono-minéraux) de dimensions supérieures à 2 mm. Même s'ils ont perdu, partiellement ou totalement leur structure lithique originelle par altération, ils n'ont pas acquis de structure pédologique (Baize, 2000). La faible présence d'éléments grossiers favorise le développement racinaire, ce qui est favorable pour la culture surtout que nous sommes dans une zone semi-aride et aride. La faible présence de ces éléments grossiers peut jouer un rôle non négligeable, car le sol ne demande pas beaucoup de travail.

Les analyses granulométriques montrent qu'il n'y a pas une différence significative entre les quatre exploitations. Les horizons étudiés sont donc classés comme des textures sableuses selon le triangle textural du groupement d'études des Problèmes de Pédologie Appliquée : G.E.P.P.A.

De plus, la texture d'un sol a une incidence directe sur sa teneur en nutriments, son humidité et sa capacité de drainage. Les sols sableux se drainent facilement mais ils ont tendance à être secs et infertiles. Les sols argileux sont plutôt fertiles, mais sont souvent mouillés et mal drainés. Les quatre sols représentent des régions pauvres en matière organique, moyennes en calcaire, par conséquent le pH est alcalin.

La variation des valeurs de pH est la conséquence de la nature géomorphologique des sols et des conditions climatiques. Les valeurs élevées du pH sont fréquemment corrélatives de difficulté

d'assimilabilité par les plantes de certains éléments qui leurs sont indispensables (phosphore, zinc, manganèse, cuivre et fer) (Gros, 1979). La valeur du pH détermine les comportements physiques (stabilité de la structure...), chimiques (fonctionnement de la C_E , assimilabilité du phosphore, biodisponibilité des oligo-éléments et micro-éléments...) et biologiques (humification et minéralisation des matières organiques) du sol. Le meilleur compromis est obtenu, suivant les cultures, pour des sols neutres, peu acides ou peu basiques. Le pH permet également d'estimer la quantité d'ions H^+ présents dans le sol et le taux de saturation.

La matière organique joue un rôle important dans l'adsorption et la rétention de l'eau et des cations, c'est une source importante d'éléments nutritifs pour les plantes, elle joue aussi un rôle important vis-à-vis de la stabilité structurale d'où une influence sur les phénomènes de battance, ruissellement, érosion (Baize, 2000). Le manque de matière organique réduit la stabilité des sols, donc on déduit que le rapport calcaire- matière organique est essentiel pour une bonne stabilité structurale.

La présence du calcaire dans un sol agricole est importante mais sa quantité doit être compatible avec la texture du sol, ses composantes chimiques et le type de culture pratiqué. La présence de calcaire confère au sol des caractéristiques spécifiques en terme de comportement physique et chimique et influe sur son activité biologique. Son absence totale a pour conséquence une acidification progressive, plus ou moins rapide suivant le contexte pédoclimatique, qu'il est nécessaire de compenser par des apports réguliers d'amendements basiques. Au-delà de 5% de calcaire total, les réserves naturelles de calcium et leur libération progressive par dissolution sous l'effet des précipitations et de l'activité chimique et biologique du sol rend inutile le retour au chaulage sur le très long terme. Les quatre sols étudiés sont considérés comme alcalins. Les accumulations calcaires et l'aridité du climat font augmenter le pH. Dans beaucoup de cas, les carences en oligo-éléments sont dues à un pH du sol trop faible (sol acide) ou plus fréquemment un pH trop élevé (sol alcalin). Ce dernier entraîne la formation d'hydroxydes insolubles (Rogers et al., 2005).

La mesure de la conductivité électrique reflète la minéralisation des sols. Elle est rigoureusement proportionnelle à la salinité. A la base des normes, les quatre sols des régions semi arides et arides, dont la valeur de la C_E permet de conclure qu'ils sont moyennement salins.

CHAPITRE 5 : Isolement et identification des souches

Les *Bacillus* sont très répandus dans la nature et peuvent être récupérés à partir de presque tous les milieux de la biosphère, ils représentent une proportion importante de la microflore, sont des germes souvent rencontrés dans le sol. Les souches appartenant au groupe *B. cereus sensu lato* possèdent un domaine de croissance extrêmement large de 5°C à 50°C. Ces souches sont divisées en 7 groupes phylogénétiques qui regroupent des souches dont le domaine de croissance est proche (Guinebretiere *et al.*, 2008) Le groupe *Bacillus cereus* regroupe 7 espèces génétiquement très proches : *Bacillus cereus sensu stricto* (au sens strict) *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus cytotoxicus*. Ces espèces ont été classées à partir d'un nombre restreint de caractères (caractères macroscopiques et microscopiques, propriétés pathogènes, etc....) (Guinebretière *et al.*, 2008 ; Schmidt *et al.*, 2011 ; Tourasse *et al.*, 2011).

1. Matériel et méthodes

1.1 Isolement des bactéries

L'isolement des bactéries rhizosphériques se fait par prélèvement de 1g de sol. Chaque échantillon extrait est additionné à 9ml d'eau distillée stérile et agité pendant 30mn, c'est la solution mère avec une concentration 10^{-1} . Les solutions décimales ont été réalisées jusqu'à la dilution 10^{-3} . Il servira ensuite à ensemercer deux milieux différents permettant d'isoler le genre *Bacillus* et sélectionner des espèces de groupe *Bacillus. cereus*.

1.2 Identification du genre *Bacillus*

Pour la sélection du genre *Bacillus* uniquement, un prétraitement thermique (10mn à 80°C) est réalisé, afin de sélectionner les spores bactériennes et d'éliminer toutes les formes végétatives (Vinter, 1965). Un inoculum des suspensions de sol et de leurs dilutions a été ensemençé par épuisement sur gélose nutritive ou sur milieu Luria-Bertani Agar (LB) à l'aide d'une anse de platine. Après incubation à $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24h à 48h, les colonies bactériennes ont été isolées puis purifiées par passages successifs entre bouillon nutritif et gélose nutritive plusieurs fois. La purification est nécessaire par le fait de la présence de certains types de cellules autres que *Bacillus*. De chaque type de colonie, un frottis est préparé, puis observé au microscope après la double coloration de Gram.

Les souches de *Bacillus* sont vérifiées par la coloration de Gram et par la formation de l'endospore. La catalase positive, la mobilité à l'état vital, la réaction positive à la coloration de Gram et la visualisation de l'endospore, par observation microscopique, grâce à sa réfringence à la lumière, sont les quatre critères recherchés, ils sont suffisants selon Gordon et al., (1973) et Claus et Barkely,(1986) pour affirmer l'appartenance au genre *Bacillus*. Un total de 70 souches est recueilli et réparti comme suit : 10 souches du sol 1, 15 souches du sol 2, 10 souches du sol 3, et 35 souches du sol 4.

1.3 Conservation des souches

Pour déterminer les micro-organismes prédominant dans chaque échantillon, des colonies avec une morphologie distincte représentant les différents types obtenus sur boîte de pétri, sont transférées dans des tubes de géloses nutritives inclinées et incubées pendant 24h à 37°C. Les souches sont ensuite conservées au réfrigérateur à une température de 4°C.

1.4 Identification au groupe *B. cereus*

La confirmation de l'appartenance des souches au groupe *B. Cereus* a été portée sur des caractères d'identification de ce groupe selon la norme AFNOR (1996).

1.4.1 Mise en évidence de la production de lécithinase

Après 24h d'incubation à 30°C dans un milieu MOSSEL complet (MOSSEL de Base + poly-myxine+ jaune d'œuf) les colonies des espèces de groupe *B. cereus* sont de couleur rose (ne fermentent pas le mannitol), grandes et presque toujours entourées d'une zone blanche de précipité due à l'action d'hydrolyse du jaune d'œuf suite à la production de lécithinase. Les 45 souches sélectionnées appartenant au groupe *B. cereus* sont réparties comme suit : 5 souches du sol 1, 12 du sol 2, 6 du sol 3 et 22 du sol 4.

1.3 .2 La recherche de l'hémolysine

L'hémolyse, ou lyse des hématies, est due à la rupture de leur membrane plasmique, souvent sous l'action de phosphatidyl-choline estérase des bactéries et sous l'action de molécules provoquant la formation de pores membranaires (hémolysine).

La production de l'hémolysine se fait sur gélose au sang, par ensemencement d'une goutte de la suspension cellulaire. Après incubation à 30°C pendant 24h, les colonies hémolytiques apparaissent entourées d'une zone claire d'hémolyse.

Si la digestion de l'hémoglobine est partielle voire totale, la couleur rouge disparaît et on observe une zone éclaircie (hémolyse partielle), voire incolore (hémolyse complète) autour de la colonie. On parle alors d'hémolyse β . La digestion peut être incomplète et il se forme des produits verdâtres ou marrons (dont la méthémoglobine) et on parle d'hémolyse α . On peut trouver des germes non hémolytiques (appelée hémolyse gamma). Et on note que les espèces de groupe *B. cereus* sont habituellement hémolytiques de type β .

1.4.3 Principaux caractères biochimiques et physiologiques

La caractérisation des souches isolées a porté sur l'étude des propriétés biochimiques et physiologiques des souches. 45 souches ont été isolées et identifier par le système API 20 E. Selon Malek 2013, les 12 premiers caractères sont les plus recherchés pour la mise en évidence du groupe *B.cereus*.

Les souches isolées et conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinée sont revivifiées par passage intempestif dans le bouillon nutritif 18-24 h à 30°C, puis sur la gélose nutritive. L'inoculation des galeries API par les suspensions élaborées à partir de la formation des colonies isolées, selon les recommandations du manuel. Les plaques sont incubées à 30°C pendant 24 h et la lecture est faite après avoir additionné les réactifs adéquats.

Pour déterminer l'influence de la température sur la croissance de groupe *Bacillus cereus*, la croissance était suivie durant 72 heures. L'incubation de gélose ensemencée par les bactéries a eu lieu à 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 37 ; 45 ; 50°C. Le développement bactérien est apprécié par l'observation de l'apparition d'un trouble dans le bouillon nutritif

1.4.4 Observation au microscope à contraste de phase

Une partie de colonie ayant donné une croissance sur la gélose nutritive est déposée sur la partie centrale d'une lame contenant une goutte d'eau distillée. L'ensemble est recouvert d'une lamelle et examiné au microscope à contraste de phase (Zeiss AXIA).

1.4.5 Observation au microscope électronique à balayage

Les mêmes échantillons observés au microscopie optique sont utilisés pour l'observation au microscope électronique à balayage (Zeiss EVO), mais sans coloration. Ce dernier est un appareil, d'observation d'échantillons biologiques.

1.4.6 Extraction et analyse des fatty acid methyl ester (FAME) profiles

Nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse (CG) (HP6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) pour identifier FAME. On a identifié le profil des FAME des souches bactériennes par la comparaison avec des données commerciales (TSBA 6) de MIS software package (Sherlock 6.0 MIDI, Inc., Newark, DE, 2005).

Chaque échantillon est traité dans un tube à essai, le protocole est le suivant :

- Prélèvement des bactéries bien isolées.
- Saponification: Mélanger l'eau et le méthanol. Ajouter des pastilles de NaOH à la solution tout en agitant et remuer jusqu'à la dissolution
- Méthylation: ajouter de l'acide au méthanol avec agitation.
- Extraction: ajouter l'éther tert-butyl méthyl (MTBE) à l'hexane et bien mélanger.
- Lavage: ajouter des pastilles de NaOH à l'eau tout en agitant jusqu'à la dissolution.

1.4.7 Identification moléculaire

L'identification moléculaire des souches a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie, Department of Genetic and bioengineering, faculty of Engineering and architecture, Yeditepe University, Turkey. Elle se base sur l'amplification et le séquençage des gènes de l'ARNr 16S.

La détermination génétique de l'espèce se base sur l'étude des gènes des ARN ribosomiques notamment le gène de l'ARNr 16S. Cette séquence d'ADN très conservée au sein des espèces (plus de 99%). La procédure consiste à amplifier le gène, en présence d'une amorce reconnaissant la région sur l'ADN, qui par la suite est séquencée. Les séquences sont comparées avec des bases de données de séquences de nucléotides déjà connues existant dans des banques internationales de données

1.4.7.1 Extraction d'ADN

La préparation de l'ADN bactérien a été réalisée selon la technique de Guinebretière et Nguyen-the, (2003). Les souches sont repiquées sur gélose luria et incubées une nuit à 30°C. Les cultures (2 colonies) sont suspendues dans 575 µl d'un mélange de TSE (525 µl) et de SDS à 20% (50 µl). La suspension ainsi préparée est incubée à 55°C pendant 1 h avec 25 µl de protéinase K (10 µg/ µl). L'ADN a été extrait par des centrifugations successives à 13000 g pendant 5 min, avec du phénol en premier puis du chloroforme. La phase aqueuse est précipitée avec 2,5 volumes d'éthanol froid à 100% et centrifugée à 13 000 g pendant 20 min.

Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 800 µl d'éthanol froid à 70% à 13000 g pendant 10 min. Le culot est ensuite séché et suspendu dans 100 µl d'eau distillée stérile et stocké à - 20°C. L'ADN est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm dans un spectrophotomètre. L'ADN ainsi extrait va subir des amplifications par PCR simple.

1.4.7.2 Amplification par PCR

La PCR permet l'amplification spécifique d'un fragment de l'ADN cible en présence d'oligonucléotides codant cette région d'intérêt. Le principe de la PCR consiste en la répétition d'un cycle triphasique :

-dénaturation de l'ADN à amplifier, hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible et enfin, élongation des amorces par l'activité d'une ADN polymérase en présence de dNTP. La PCR est réalisée dans un thermocycleur après addition des réactifs suivants :

Préparation du mélange

- dNTP mix (2.5Mm) 4µl,
- Tampon 5 X 10µl,
- Taq-polymérase 0,5µl,
- ADN de l'échantillon 5µl,
- Primmer F (100mM) : 1µl
- Primmer R (100mM) : 1µl
- H2O (eau ultra pure stérile) : 28,5µl

Le mélange, distribué dans des tubes de PCR, à raison de 50 µL

Les amorces varient selon le gène d'intérêt à amplifier. Dans ce cas l'amorce spécifique est 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') (Invitrogen).

L'amplication de l'ADN se déroule comme suit : après une première phase de dénaturation (30 sec à 98°C), 35 cycles comprenant chacun trois étapes de variation de température :

- dénaturation de 10 s à 98°C,
- hybridation de 30sec à 55°C,
- élongation de 2mn à 72°C.
- élongation final 8mn à 72°C

1.4.7.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose à 1.5% (p/v) contenant quelques gouttes d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 mg/l). La migration se fait pendant 20mn à 100V. Le gel est visualisé sous lumière UV et photographié avec un système de capture digitale.

1.4.7.4 Séquençage

Le produit de l'amplification du gène de l'ARNr 16S est séquençé dans biotechnology company « Macrogen » in a Korean with a large DNA sequencing service facility

Les séquences partielles de l'ARNr 16S des souches obtenues sont comparées avec les séquences des ARNr 16S disponibles par la recherche des BLAST.

2. Résultats et discussion

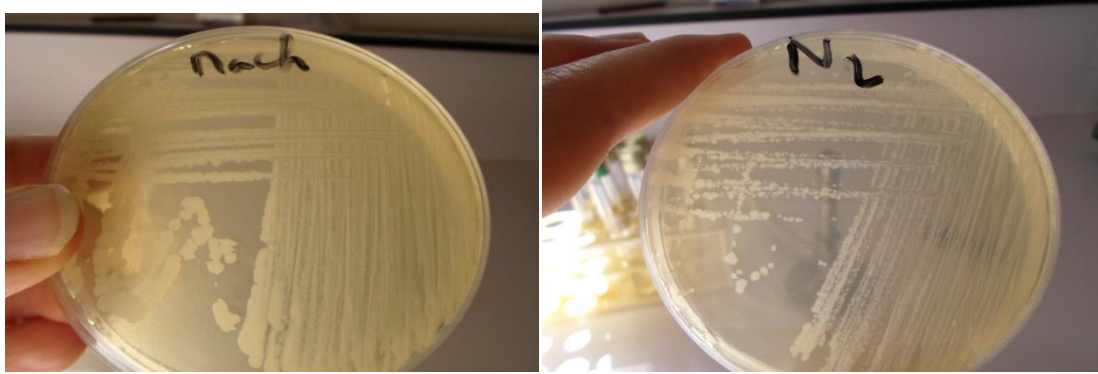
2.1. Caractérisation phénotypique

2.1.1. Présence de *Bacillus spp.*

La présence des bacilles sporogènes aérobies est bien représentée dans les différents types de sol. En se reposant sur la forme bacillaire, rectangulaire ou légèrement arrondie au niveau des bords, la réaction positive à la double coloration de Gram, la possession d'une catalase et sur le critère taxonomique clé, qui est l'endospore visualisée grâce à sa réfringence à la lumière, l'appartenance au genre *Bacillus* a été établit. Un total de 70 souches est recueilli et réparti sur 04 endroits, dans la wilaya de Naâma (Tableau 9)

Tableau 9 : Nombre des souches et leurs répartitions.

Echantillons	Nombre des souches
Sol1	10
Sol2	15
Sol3	10
Sol4	35



A

B

Figure 20 : Caractéristiques morphologiques de deux souches A: *Bacillus spp.* (sol3) sur gélose Luria; B: *Bacillus spp* (sol2) sur gélose Luria

2.1.2. *Bacillus cereus*

2.1.2.1 Détermination du profil biochimique

En se basant sur les 12 premiers tests de la galerie API 20 E, nous avons pu identifier deux types (biotypes) présentant une grande ressemblance : un groupe majoritaire de 42 souches issues de plusieurs origines, et un groupe minoritaire ayant 3 souches seulement. Aussi, le nombre de caractères positifs est très faible : 4 (biotypes I) à 3 (biotypes II) tests, et n'aboutit pas à une discrimination fiable entre les membres du groupe *B. cereus*. Les souches de la partie majoritaire ne possèdent que 4 réactions positives (VP+ Citrate+, ADH+ et Gélatine+) (Tableau 10).. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Malek (2013), concernant des souches de *B. cereus* d'origine laitière.

Tableau 10 : caractères biochimiques et physiologiques des 45 souches de *B. cereus*

Nombre des souches	Origine	Biotypes (Caractères positifs)	Profil thermique
5	Abdelmoula (sol1)	biotype I	Mésophile 15°C to 45°C
12	Mekmen Ben Amar (sol2)	(VP, Citrate, ADH,	
5	Mechria(sol 3)	Gélatine)	
20	Ain Sefra (sol 4)		
1	Mechria(sol 3)	biotype II	
2	Ain Sefra(sol 4)	(VP, Citrate, Gelatine)	

2.1.2.2 Caractéristiques morphologiques des colonies du *B. cereus* sur gélose Luria

L'identification phénotypique préliminaire montre une faible diversité des isolats et la dominance dans le sol d'un type spécifique (biotype I), et rassemblant les différents types de colonies formées sur la gélose Luria

Bacillus cereus est considérée comme une bactérie du sol, cependant *B. cereus* montre un cycle de vie, avec la capacité de germer, de se multiplier et de se sporuler. La capacité de sporulation de ce genre bactérien favorise d'une part l'ubiquité et d'autre part la survie dans des environnements très divers. A côté de sa survie sous forme de spore, *Bacillus cereus* serait donc capable d'une activité de type saprophytique, qui pourrait renforcer sa présence dans le sol.

2.1.2.3 Caractéristiques microscopiques des cultures de *B. cereus*

D'après les photos obtenues aux microscopes à contraste de phase (figure 21), les cellules végétatives correspondent aux critères morphologiques des souches de *B. cereus*. Les bacilles sont grands avec des bouts carrés et des coins arrondis caractéristiques des bactéries du groupe *B.cereus*.

Pour l'identification du groupe *B. cereus*, nous avons utilisé des techniques phénotypique et moléculaire. La caractérisation a porté sur 45 souches de *B. cereus* isolées. L'utilisation des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques ont permis de sélectionner deux souches dans le but d'une étude moléculaire.

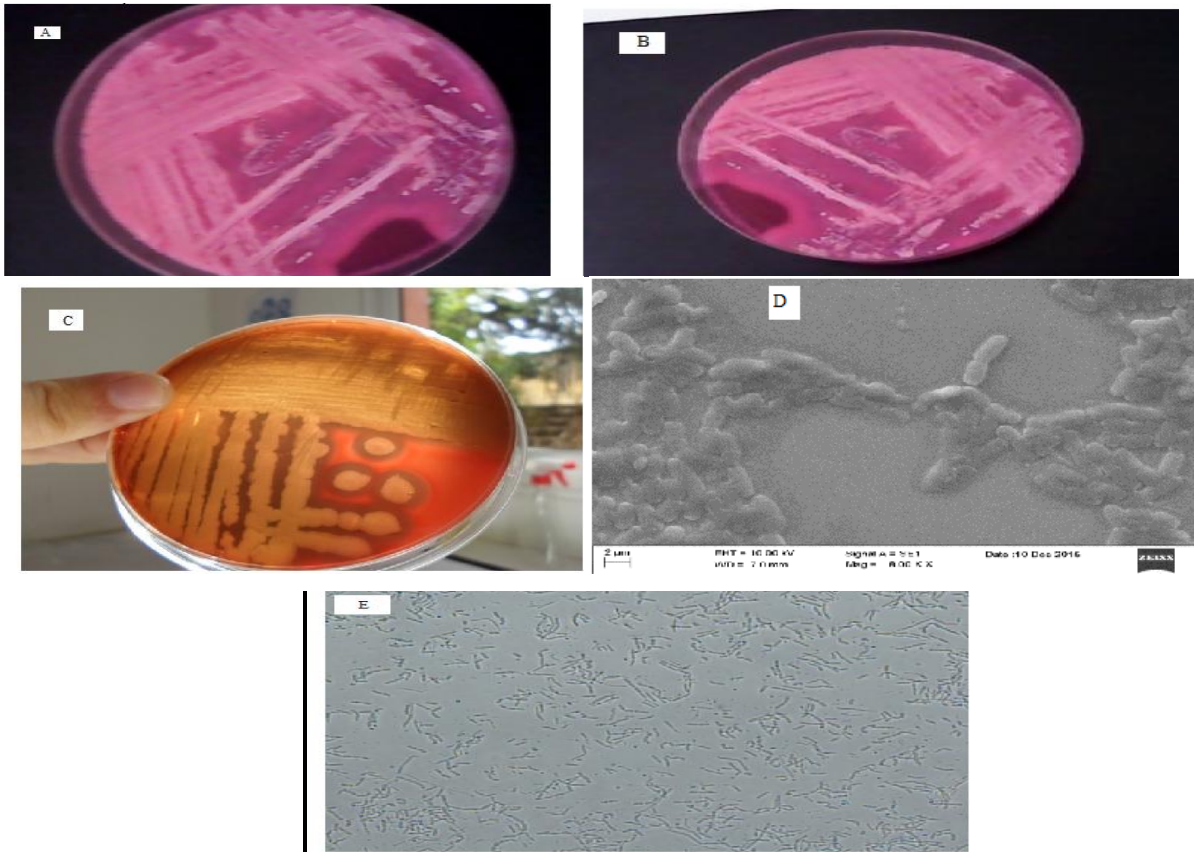


Figure 21 : Caractéristiques morphologiques de deux souches A: *B.cereus* (Bact 2) dans le milieu MYP; B: *B.cereus* (Bact 3) dans MYP; C: activité hémolytique de *B.cereus* (Bact 2) ; D: Observation au microscope électronique à balayage de *B.cereus* (Bact 2) E : Observation au microscope à contraste de phase de *B.cereus* (Bact 2)

2.1.2.4 Analyse des FAME

Dix souches bactériennes ont été examinées dans cette étude (Figure 22). Elles appartiennent au groupe *B. cereus*. Les études caractéristiques basées sur l'analyse FAME montrent qu'il y a un total de 31 FAMEs différents présents dans les dix souches bactériennes testées dans la présente étude (Tableau 11). Les résultats des analyses des fatty acid methyl ester montrent qu'il y a trois souches bactériennes (bact3, bact4, bact7) appartenant au groupe *Bacillus cereus* sous groupe « A », les autres souches (bact1, bact2, bact5, bact8, bact9 et bact10) appartenant au groupe *Bacillus cereus* sous groupe « B ».

Les résultats basés sur le profil fatty acid methyl ester confirment la faible diversité des isolats et la dominance dans le sol d'un type spécifique (sous groupe « B »), l'origine commune des isolats associée aussi à la pression de sélection exercée par des conditions environnementales,

spécialement la température dans le sol, peuvent expliquer la faible diversité des isolats identifiés dans cette étude, il a été rapporté que la température est supposée sélectionner certains groupes bactériens (Von Stetten et al., 1999). Plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer les communautés bactériennes, parmi ces facteurs le type de végétation (Kuske et al., 2002), la température (Ward et al., 1998), l'état des éléments nutritifs (Broughton & Gross, 2000), la salinité (Nubel et al., 2000), et d'autres facteurs environnementaux.

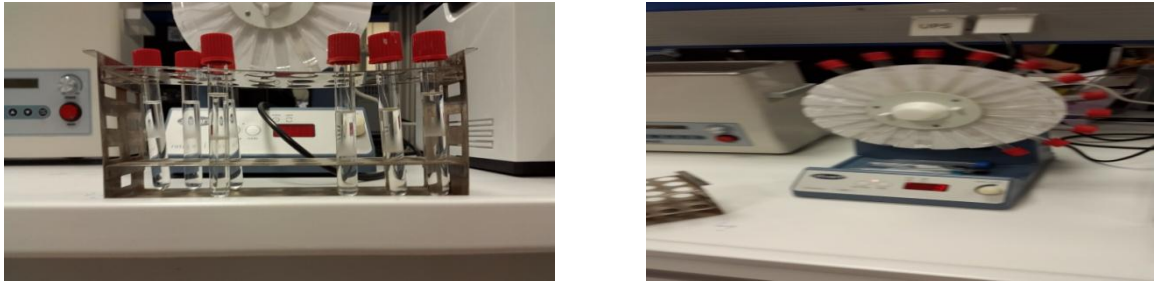


Figure 22 : Analyse des esters d'acides gras méthyles (FAME)

2.1.2.1 Identification moléculaire

Les deux souches sélectionnées par les analyses des FAME sont identifiées par séquençage de l'ADNr 16S Bact 2 (*Bacillus cereus* sous groupe « A »), et Bact 3 (*Bacillus cereus* sous groupe « B »).

Selon BLAST analysis la Bact2 est apparentée (à 66%) aux espèces de *Bacillus cereus* et est identifiée sous le nom de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (numéro d'accèsion NC_004722.1). Par contre la Bact3 présente une homologie de 72% avec l'espèce *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian str.97-27* (numéro d'accèsion NC_005957.1).

L'identification moléculaire par le séquençage du gène de l'ARNr16S a permis l'affiliation phylogénétique d'un type spécifique qui correspond aux groupe phylogénétique III de la classification de Guibretière et al., (2008), la gamme de température de croissance de ce groupe est de 15 à 45°C. Cette étude est basée sur les habitats, les limites de températures et les pouvoirs pathogènes. Dans la présente étude, l'analyse génotypique a confirmé les résultats obtenus par la caractérisation phénotypique notamment à l'égard de la température, La gamme de température de croissance des deux souches identifiées est de 15 à 45°C

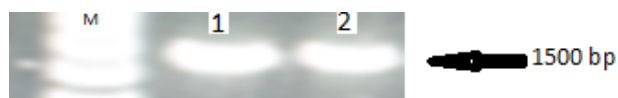


Figure 23 : Amplification 16S rDNA-PCR

Tableau11: composition des fatty acid (%w/w) des 10 souches.

Fatty acids	bact1	Bact2	Bact3	Bact4	Bact5	Bact6	Bact7	Bact8	Bact9	Bact10
12 :0 iso	0.97	1.33	0.48	1.04	0.73	0.88	0.48	1.04	1.25	1.17
12 :0	0.74	0.80	0.38	0.81	0.56	0.66	0.51	0.57	0.71	0.70
13 :0 iso	8.16	7.71	6.57	9.49	7.61	7.46	8.78	8.93	11 .32	8.96
13 :0 anteiso	0.94	1.45	0.79	1.17	1.42	1.62	0.65	1.04	2.16	1.24
13 :0	-----	0.31	-----	-----	----	0.33	-----	0.17	-----	0.36
14 :0 iso	5.99	7.15	4.01	5.10	5.52	5.08	3.71	6.58	5.21	6.34
14 :1 w5c	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.22	-----	-----	-----
14 :0	5.06	6.21	3.29	5.84	5.50	5.02	4.67	4.69	4.43	5.36
15 :0 iso	27.49	24.08	30.99	30.98	29.89	29.16	31.91	28.15	25.28	29.44
15 :0 anteiso	4.29	5.14	4.21	4.05	6.85	6.73	3.36	4.63	6.35	4.75
15 :1 w5c	-----	0.27	-----	0.28	-----	0.27	-----	0.27	-----	0.26
15 :0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----
16 :1 w7c alcohol	0.44	0.55	0.59	0.44	0.50	0.70	0.44	0.49	0.91	0.95
16 :0 iso	9.59	10.72	9.76	7.33	7.89	8.12	6.05	9.77	7.39	9.00
16:1 w11c	0.36	0.34	0.43	0.28	0.40	0.45	0.22	0.29	1.97	0.54
16 :1 w5c	-----	0.26	-----	0.27	0.43	0.37	1.00	-----	-----	-----
16 :0	11.01	10.03	8.12	8.30	9.13	5.90	5.77	10.27	10.51	8.41
15 :0 2OH	-----	-----	0.30	-----	----	0.25	0.34	-----	-----	-----
17 :1 iso w10c	0.94	1.15	1.96	1.29	1.43	1.31	---	0.90	1.93	1.84
17 :1 iso w5c	1.67	1.53	2.59	2.32	2.03	3.16	2.90	1.71	1.19	1.47
17 :1 anteisoA	0.48	0.54	0.81	0.54	0.70	1.39	0.70	0.52	0.49	0.48
17 :0 iso	9.19	7.69	11.71	8.62	7.09	5.84	8.54	8.30	7.91	8.81
17 :0 anteiso	1.87	2.12	2.78	1.52	2.39	2.36	1.40	1.84	2.57	1.84
17 :1 w6c	-----	-----	-----	-----	-----	0.24	0.36	-----	-----	-----
17 :0	0.40	0.41	0.29	0 .27	-----	0.24	-----	0.32	-----	0.36
18 :0 iso	0.26	0.37	-----	-----	-----	-----	-----	0.20	-----	-----
18 :1 iso H	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.29	-----	-----	-----
18:1 w9c	1.62	0.76	1.28	0.31	0.40	0 .23	0.35	0.31	0.79	0.46
18 :1 w5c	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.17	----	-----	-----
18 :0	0.69	0.43	0.59	0.34	0.30	0.19	0.23	0.46	0.49	0.33
18 :1 2OH	-----	-----	-----	0.29	0.29	-----	---	0.19	-----	0.31

CHAPITRE 6 : Activité PGP de *B.cereus*

Les PGPR exercent sur les plantes divers effets bénéfiques. Elles influencent la croissance des plantes par divers mécanismes directs ou indirects. Elles présentent, généralement, plus de deux ou trois activités agissant d'une manière synergique (Joseph et al., 2007; Yasmin et al., 2007). De nombreuses bactéries incluant des espèces de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus* et *Serratia* ont une capacité d'améliorer la croissance de la plante (Kloepper et Beauchamp, 1992; et Glick, 1995). Toutefois, la sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale. Par conséquent, cette partie a pour objectif la perspective d'une sélection des isolats présentant le plus fort potentiel PGP.

1. Matériel et méthodes

1. 2 Mesure des activités PGPR

Un screening des activités PGP de l'ensemble des souches dans le but de sélectionner les souches les plus performantes est effectué :

1.2.1 Solubilisation des phosphates

La méthode décrite par Beneduzi et al, (2008) permet d'évaluer la capacité de solubilisation des phosphates sur milieu glucose yeast extract agar (GYA), deux autres solutions ont été préparées séparément; On dissout d'abord 5 g de K_2HPO_4 dans 50 ml d'eau distillée et ensuite 10 g de $CaCl_2$ dans 100 ml d'eau distillée. Ces deux solutions ont été ajoutées à 1 L de GYA. Un volume de 10 μ l de chaque culture bactérienne de 24h est déposé à la surface du milieu puis incubé à 30°C/7jours, la solubilisation des phosphates se traduit par un halo clair autour de la colonie

1.2.2 Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production de l'acide indole acétique est testée sur milieu LB auquel est ajouté du tryptophane (1g /l) (Penrose et Glick, 2003). Le milieu estensemencé par 100 μ l des cultures bactériennes, par incubation à 30°C/ 3jours.). Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm/ 20min. 1ml du surnageant est mélangé à 2ml du réactif de Salkowski (1.5 ml de $FeCl_3.6H_2O$ 0.5 M dans 80 ml de 60%). La présence de couleur rose indique la production de l'acide indole acétique (IAA) ;

1.2.3. Mise en évidence des activités enzymatiques

1.2.3.1 Détermination de l'activité amylolytique

Ce test a été réalisé en cultivant la souche sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon. Après avoir obtenu une bonne culture bactérienne, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (Gupta et al., 2004).

1.2.3.2 Détermination de l'activité protéolytique : recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (Marchand et al., 2009).

1.2.4. Activité antifongique

La détermination de l'antagonisme des bactéries est effectuée *in vitro* sur milieu Potato-Dextrose- Agar (PDA). Les souches bactériennes sont testées pour leur capacité à inhiber la croissance d'une souche de référence d'un champignon phytopathogène : *Aspergillus flavus* MNHN 994294 . Un disque de gélose de 6 mm de diamètre de la culture de chaque champignon est déposé sur la gélose PDA en boîte de Pétri. 2µl de chaque culture bactérienne de 10⁸ UFC/ml sont ensemencés en spot à 3 cm de la souche fongique. Un témoin négatif de la souche fongique est testé en absence de bactéries. Les boîtes sont incubées à 30°C/4 jours. La zone d'inhibition est calculée et interprétée selon Kumar et al. (2002), les souches qui ont un diamètre de 1 à 5 mm, présentent une faible inhibition, celles qui ont un diamètre de 6 à 10 mm sont moyennement inhibitrices, et les souches de 11 à 15 mm de diamètre ont une forte inhibition

1.2.5 Adhésion de *B. cereus*

L'adhésion aux surfaces est une étape primordiale dans le processus de formation de biofilm. Elle est sous l'influence de nombreux paramètres. Dans cette partie l'intérêt est porté sur des paramètres propres aux bactéries, principalement l'état physiologique (spore) ainsi que les propriétés de surface de spores telles que l'hydrophobicité. L'adhésion est étudiée sur 10 souches isolées de 04 endroits, dans la wilaya de Naâma.

1.2.5.1 Adhésion des spores de *B. cereus*

Les souches conservées sur gélose nutritive inclinée sont revivifiées sur milieu LB puis enrichies par ensemencement de 1ml dans 7 ml du bouillon LB. Ces cultures enrichies vont servir pour la préparation des suspensions sporales.

1.2.5.1.1 Préparation des suspensions sporales

Les suspensions sporales sont préparées selon la technique de Mazas et al. (1995) in Malek (2013). Les cultures enrichies (0.1 ml) sont ensemencées par étalement au râteau sur des boites contenant de la gélose LB fortifiée (additionnée de Mg⁺⁺ (40 mg) et de CaCl₂ (100mg) par litre de milieu. L'ajout de ces sels stimule le phénomène de sporulation. Les boites sont incubées 5 à 7 jours à 30°C. Le taux de sporulation est vérifié par examen microscopique de frottis colorés au bleu de méthylène ou à la fushine. Ces cultures sont utilisées à plus de 90% de spores. Les spores sont récupérées comme suit : le tapis formé à la surface des boites de pétri est inondé d'eau distillée stérile et raclé à l'aide d'un râteau. La suspension ainsi obtenue subit une série de centrifugations. La première à 500 g pendant 5 min, permet de débarrasser les spores des débris du milieu de culture. Le culot est ainsi jeté, et le surnageant transféré dans un autre tube, subit une centrifugation à 2000 g pendant 20 min. A l'issue de cette deuxième centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot suspendu dans le même volume d'eau distillée stérile, est centrifugé à 2000 g pendant 20 min. Le culot est récupéré, additionné d'eau distillée stérile, et soumis à un traitement thermique de 80 °C pendant 10 min afin d'éliminer les cellules végétatives. Enfin et après la mesure de leurs densités optiques, les suspensions sporales sont conservées à 4°C en vue de leur utilisation.

1.2.5.2 Caractérisation des propriétés de surface des spores.

L'identification des propriétés de surface des spores de 10 souches de *B. cereus*, a été exécutée par la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvent). L'aspect hydrophobe/hydrophile des spores est caractérisé par la mesure de l'adhésion au solvant l'hexadécane (Bellon-Fontaine et al., 1996) .

Le protocole adopté est celui décrit par Malek (2013) pour les spores de *B. cereus*. Les suspensions sporales préalablement préparées sont ajustées à une absorbance de 0.6-1 à 595 nm (A₀). Les culots sont lavés en amont de chaque manipulation, puis 2 ml sont ajoutées à 400 µl de solvant. Le mélange est homogénéisé au vortex durant 10 secondes à vitesse maximale. Après 15

minutes d'attente nécessaires à la séparation des deux phases, la DO (595 nm) de la phase aqueuse (A_1) est enregistrée.

La déduction du pourcentage de spores adhérentes au solvant (A), est obtenue selon la formule suivante : $A = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100$ Chaque mesure nécessite au moins trois répétitions. La lecture des résultats est réalisée selon la fourchette proposé par (Simmonds et al., 2003) : $A < 40\%$: la souche est considérée comme hydrophile. $40 < A < 60\%$: la souche est hautement hydrophobe.

1.2.6 Formation de biofilm de *B. cereus* en microplaque de PVC

Des plaques à 96 puits en polystyrènes sont remplies de 100 μ l de bouillon luria etensemencées avec le même volume d'une culture bactérienne de 24h dans un bouillon luria (Wijman et al., 2007). Les plaques sont incubées 24 h à 30°C, puis soumises au traitement suivant : les puits sont vidés, et rincés 3 fois à l'eau pour éliminer les cellules libres ou faiblement attachées. Les plaques sont ensuite, séchées en position renversée puis colorées avec une solution de cristal violet à 1% pendant 30 mn, le colorant est jeté, et les puits lavés 2 fois à l'eau distillée stérile. 100 μ L d'éthanol absolu sont ensuite ajoutés après avoir laissé sécher quelques minutes.

1.2.7 Formation de biofilm de *B. cereus* en tube : La méthode tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen et al. (1982). A partir d'une boîte de culture sur 18-24 heures, ensemencer une colonie dans 10 mL de bouillon luria puis incuber à 30°C pendant 24 h. Les tubes ont été lavés avec du PBS (pH=7,3) puis séchés. Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet (0,1%) pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (Mathur et al., 2006). La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et la formation d'un anneau se fait à l'interface liquide (Wijman et al., 2007).

2. Résultat et discussion

2.1 Activités PGP

Les réponses des bactéries isolées aux différents tests inhérents à la promotion de la croissance végétale permettent la mise en évidence des potentialités naturelles de chaque souche. S'agissant dans cette partie de déterminer les propriétés ayant des effets bénéfiques directs sur les plantes par l'apport d'éléments nutritifs, ou indirects par la protection contre les phytopathogènes.

2.1.1 Activités amylolytiques, protéolytiques et production IAA

Le profil des activités amylolytiques et protéolytiques des 45 souches a montré que ces derniers ont la capacité d'hydrolyser l'amidon et la caséine (Tableau 12).

Dix souches de *Bacillus cereus* ont la capacité de la production IAA (Tableau 12). Selon (Mirza et al., 2001), la production d' IAA par des micro-organismes peut varier au sein d'une même espèce, plusieurs facteurs peuvent influencer la production de l'IAA ,le pH du milieu peut modifier la biosynthèse des IAA (Spaepen et al., 2007). Il existe peu d'études relatives à la quantification des IAA par des *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*. Gomes et al. (2003) ont démontré que les *Bacillus cereus* sont connues pour leurs capacité à produire de l'acide gibbérellique, IAA (Karadeniz et al., 2006). En outre, Tilak et al. (2006) ont confirmé l'implication de *B. cereus* dans la promotion de la croissance de *Cajanus cajan* sp (L.) Mill., Tandis que Bullied et al. (2002) ont constaté que cela favorise la croissance des bactéries soja (*Glycine max*).

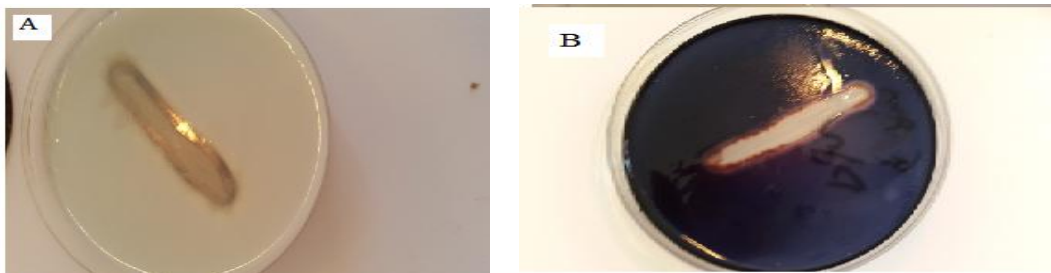


Figure 24: Activités amylolytiques et protéolytiques de *B. cereus* (Bact2). A: hydrolyse de caséine. B: starch hydrolyse d'amidon

2.1.2 Solubilisation de phosphates

La solubilisation des phosphates sur milieu solide, est révélée par un halo de transparence autour de la colonie après 7 jours d'incubation à 30°C, nos résultats ont montré la capacité de dix souches isolées à solubiliser le phosphate (Tableau 12). Les espèces du genre *Bacillus* ont la capacité d'augmenter la disponibilité du phosphates dans le sol (Bhattacharyya and Jha, 2012) et plusieurs facteurs environnementaux tels que le pH et le type de sol peut affecter fortement les phénomènes de fixation et la précipitation du P dans le sol. Compte tenu de la nature des sols de prélèvement et de la variation de leurs caractéristiques physico-chimiques, il s'est avéré nécessaire d'apprécier le comportement des souches selon leur site natif, le sol a un effet positif sur la solubilisation des phosphates pour les bactéries à Gram+ sporulées.

Tableau 12 : Activités PGP des 45 souches de *B. cereus* de quatre différents sites. (A): Abdelmoula; (B): Mekmen Ben Amar; (C): Mechria; (D): Ain Sefra

Souches	Production AIA ^a	Solubilisation de Phosphate ^b	Activité amylolytique et proteolytique ^c	Formation du biofilm en microplaque PVC ^d	Formation du biofilm en tube ^d	activité antifongique <i>A.flavus</i> ^e	Sites
Bact1	-	-	+	-	+	-	B
Bact2	+	-	+	-	+	+	D
Bact3	+	+	+	++	+	+++	D
Bact4	+	+	+	-	+	+++	D
Bact5	-	-	+	-	+	-	A
Bact6	-	-	+	-	+	++	D
Bact7	+	-	+	-	+	+++	D
Bact8	-	-	+	-	+	+	B
Bact9	+	+	+	-	+	++	C
Bact10	-	-	+	-	+	+++	D
Bact11	-	-	+	-	+	+	D
Bact12	-	-	+	-	+	+++	D
Bact13	-	-	+	-	+	+	C
Bact14	-	-	+	-	+	-	C
Bact15	-	-	+	-	+	++	C
Bact16	-	-	+	-	+	+++	A
Bact17	-	-	+	-	+	+	A
Bact18	-	-	+	-	+	+	D
Bact19	-	-	+	-	+	+++	D
Bact20	-	-	+	-	+	+	D
Bact21	-	-	+	-	+	+++	D
Bact22	-	-	+	-	+	-	D
Bact23	-	-	+	-	+	+	C
Bact24	-	-	+	-	+	+++	A
Bact25	-	-	+	-	+	+	A
Bact26	-	-	+	-	+	+++	B
Bact27	-	-	+	-	+	+++	D
Bact28	-	-	+	-	+	+++	D
Bact29	-	-	+	-	+	++	D
Bact30	-	-	+	-	+	+++	B
Bact31	-	-	+	-	+	++	B
Bact32	-	-	+	-	+	++	D
Bact33	-	-	+	-	+	+	D
Bact34	-	-	+	-	+	+	D
Bact35	-	-	+	-	+	++	B
Bact36	-	-	+	-	+	+	D
Bact37	+	+	+	+	+	+	D
Bact38	+	+	+	++	+	++	D
Bact39	-	-	+	+	+	+++	B
Bact40	+	+	+	++	+	++	B
Bact41	-	+	+	+	+	++	B
Bact42	-	-	+	+	+	+++	B
Bact43	-	+	+	+	+	+++	B
Bact44	+	+	+	+	+	+++	B
Bact45	+	+	+	+	+	+++	C

^a): +: capacité de la production IAA, -: ne produit pas IAA; (^b): +: capacité de la solubilisation de Phosphate, - : ne solubilise pas P ; (^c): +: Activité amylolytique et proteolytique; (^d): +: formation de biofilm, - : pas de formation de biofilm; (^e): - : ne présente pas une inhibition; + : inhibition faible (1 à 5 mm); ++ : inhibition moyenne (6 à 10 mm); +++ : inhibition forte (11 à 15 mm).

2.1.3 Les propriétés de surface des spores

Le caractère hydrophobe des spores des 10 souches de *B. cereus* varie de 18.5% à 57% d'adhérence à l'hexadécane (Tableau 13). Les spores sont considérées comme hydrophiles et hydrophobes modérés car le pourcentage d'adhésion à l'hexadécane le plus élevé (57%) est inférieur à 60%. Les 07souches hydrophiles sont plus nombreuses que les 03 souches hydrophobes. Sachant que les valeurs de l'hydrophobicité des spores hydrophobes, comme montrées par le pourcentage d'adhérence à l'hexadécane couvrent un faible intervalle de 47.37 à 57%. On note alors l'absence de spores hautement hydrophobes. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Malek 2013, concernant la l'hydrophobicité des spores des souches de *B. cereus* d'origine laitière. De plus, le caractère hydrophile des spores est présent, les pourcentages d'adhésion à l'hexadécane se situent entre 18,5% et 36%. La prépondérance de spores hydrophiles parmi les souches de *B.cereus*, préalablement signalée par Malek (2013) dans le cas des souches de *B. cereus* d'origine laitière, est à noter par la même occasion et que les spores de ces bactéries sont de manière générale considérées comme hydrophobes et hautement hydrophobes. Selon Malek 2013, les spores hydrophiles dans le groupe *B. cereus* ont été très peu décrites.

Dans le groupe *B. cereus*, la variabilité entre des souches dans les propriétés de surface, principalement l'hydrophobicité a déjà été citée (Tauveron et al., 2006). D'après Malek (2013), la morphologie de la surface des spores ne permet pas de faire la différence seulement entre les espèces du groupe *B. cereus* mais aussi entre souches étroitement apparentées dans la même espèce. L'hydrophobicité des souches peut également être perturbée par des facteurs liés à l'environnement et représenter une adaptation exceptionnelle à des environnements spécifiques (Malek 2013). Ceci pourrait concerner des souches isolées dans la présente étude. Par ailleurs, Selon Malek (2016), le caractère hydrophile des isolats du sol de *B. cereus* pourrait aussi être en relation avec une adaptation à des conditions de pH basique. Dans nos résultats, les quatre sols sont considérés comme basique (pH variant de 8.08 à 8.50).

Tableau 13 : Pourcentage d'hydrophobicité des 10 *Bacillus cereus* isolées

Isolates	Hydrophobicity (%)
Bact1	19%
Bact2	36%
Bact3	44.15%
Bact4	18.5%
Bact5	26%
Bact6	35.13%
Bact7	32.55%
Bact8	57%
Bact9	43.37%
Bact10	20%

2.1.4 Evaluation de la formation du biofilm par les deux techniques (microplaque de PVC et TM)

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms. Ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou, 2009). Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm in vitro ont été établies, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96puits [(Freeman et al., 1989); (Mathur et al., 2006)], la méthode qualitative en tube TM (Christensen et al., 1982).

Les 45 souches isolées lors de cette étude ont été testées pour leur capacité à former des biofilms par les deux de techniques.

La technique TM a montré que toutes les souches (45) sont de bonnes formatrices de biofilm (Figure26). Selon la technique de microplaque 96 puits et sur l'ensemble des souches (45), 3 ont été fortement formatrices du biofilm, 7 souches l'étaient modérément et 35 souches ont été non formatrices du biofilm.

Selon (Deighton et Balkau, 1990) la capacité d'adhésion des staphylocoques a été influencée par de nombreux facteurs comprenant différents mécanismes d'adhérence pour les surfaces en plastique et en verre. Le nombre de spores attachées à la surface de polystyrène a été considérablement affecté par hydrophobicité. Auger et al. (2006) ont confirmé les mêmes observations et ils ont indiqué que la souche *B.cereus* ATCC 14579 n'a pas la capacité de produire de biofilms dans les microplaques.

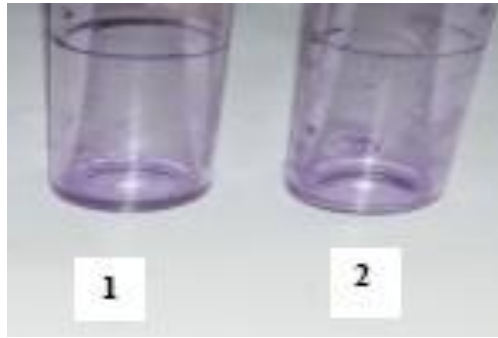


Figure 25: Formation de biofilms par la méthode TM. *B. cereus* Bact2 (1), *B. cereus* Bact3 (2)

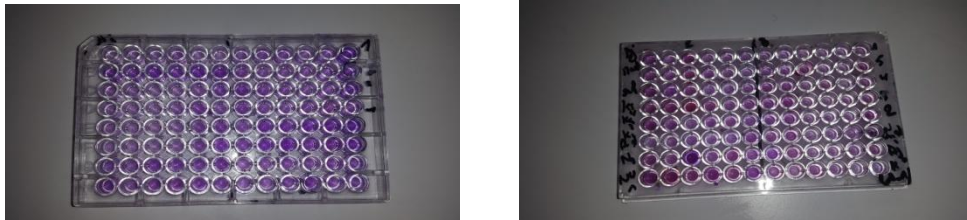


Figure 26 : Formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits

2.1.5 Activité antifongique

L'activité antifongique des bactéries isolées testée sur milieu PDA envers un champignon connu pour leur pouvoir phytopathogène : *Aspergillus flavus* MNHN 994294 a fourni les résultats suivants :

La majorité des souches de *Bacillus cereus* ont une action inhibitrice sur la souche fongique. *Aspergillus flavus* est inhibé par un nombre de 41 souches.

Sur un ensemble des 45 souches testées lors de cette étude pour leur activité antifongique, 18 ont été fortement inhibitrices, 10 souches l'étaient modérément et 13 souches ont été faiblement inhibitrices. Par contre 4 souches (Bact1, Bact5, Bact14 et Bact22) ne manifestent aucune activité antifongique.

Les *Bacillus* sont connus pour leur activité antifongique importante, ils produisent une variété de métabolites puissants et des enzymes hydrolytiques (Rahman et al., 2007). Ce genre a plusieurs espèces bactériennes qui excrètent des lipopeptides actifs (Ongera et al., 2005). L'activité biologique de ces composés est surtout liée à leur effet sur les lipides de la membrane cellulaire où ils peuvent favoriser selon la concentration, la formation de pores irréversible dans la double couche de phospholipides. Ces peptides antifongiques inhibent la croissance d'un grand nombre de

champignons, y compris *Aspergillus*, les bactéries et les oomycètes (Munimbazi et Bullerman, 1998). Les souches de *Bacillus cereus* sont connues comme de puissants producteurs de molécules antibiotiques très efficaces. Elles sont aussi largement utilisées en lutte biologique comme un agent de bio-contrôle puissant (Knaak *et al.*, 2007).

CONCLUSION

Les micro-organismes ont un puissant impact sur l'homme et sur ses activités: agent fertilisant des sols agricoles, énergie et environnement et dans des applications futures. L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Les micro-organismes rhizosphériques, en général, exercent sur les plantes divers effets influençant leur développement. Ils peuvent également améliorer leur compétitivité et leurs réponses aux facteurs de stress externes. Les *Bacillus* sont des habitants de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. De plus, les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes aux changements des conditions environnementales. En outre, la sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale. Ces propriétés sont le plus souvent la production d'AIA, la solubilisation du phosphate, l'activité antifongique, formation de biofilms....

Cette énorme faculté d'adaptation de micro-organismes et leur intervention dans divers domaines nous a poussé à contribuer à la mise en place d'une collection et d'une caractérisation de la flore sporulée spécialement le groupe *Bacillus cereus* dans le sol, pour une meilleure appréciation du potentiel PGP de la flore tellurique de la région Sud-ouest Algérien.

Ce travail nous a permis d'identifier et de caractériser 45 souches de *Bacillus cereus* selon une approche phénotypique et moléculaire. Le profil biochimique construit sur la base des 12 premiers tests de la galerie API 20 E a permis de définir deux groupes (biotypes) présentant une grande similarité, un groupe majeur comportant 42 souches de diverses origines, et un groupe mineur comprenant 3 souches. Le nombre de caractères positifs est très faible : 4 (biotypes I) à 3 (biotypes II). Dix souches bactériennes ont été testées par le profil FAME, les résultats montrent la présence d'un total de 31 FAMES différents. Cette étude a permis de distinguer trois souches bactériennes appartenant au groupe *Bacillus cereus* sous groupe « A », et sept souches appartenant au groupe *Bacillus cereus* sous groupe « B ». La gamme de température de croissance de toutes les souches isolées est de 15 à 45°C. Les deux souches sélectionnées pour l'identification moléculaire sur la base de leur profil FAME sont la Bact2 (*B. cereus* sous groupe « B ») et la Bact 3 (*B. cereus* sous groupe « A »). Selon la séquence du gène de l'ARNr16S, il s'agit de *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* str.97-27

Ces résultats nous permettent de confirmer la faible diversité des isolats et la dominance dans le sol d'un type spécifique qui correspond aux groupes phylogénétiques III. L'origine commune des isolats, associés aussi à la pression de sélection exercée par des conditions environnementales, spécialement la température dans le sol, peuvent expliquer la faible diversité des isolats.

L'évaluation de l'activité PGP telle que la production de l'acide indole acétique (AIA), la solubilisation des phosphates, hydrolyse de l'amidon, l'activité protéolytique, l'activité antifongique ainsi que de la capacité de la formation de biofilm a révélé que toutes les souches isolées ont une activité amylolytique et protéolytique. Seules dix souches isolées ont la capacité de la production AIA et la solubilisation des phosphates. Un autre aspect important est le biocontrôle des agents phytopathogènes : il confère à l'ensemble des souches de *B. cereus* l'inhibition envers la souche fongique testée. L'impact de la nature du sol sur la performance des souches vis-à-vis des différentes activités influe sur la solubilisation des phosphates et la production d'AIA

L'hydrophobicité des spores des 10 souches de *B. cereus* varie de 18.5% à 57% d'adhérence à l'hexadécane. Les spores sont classées en hydrophiles et hydrophobes modérés. La technique MATS a révélé que 7 sur 10 souches de *B. cereus* isolées présentaient un caractère hydrophile et 3 souches présentaient un caractère hydrophobe modéré.

La technique TM a montré que toutes les souches (45) sont de bonnes formatrices de biofilm. Cependant la technique de microplaque de PVC et sur l'ensemble des souches (45), 3 ont été fortement formatrices du biofilm, 7 souches l'étaient modérément et 35 ont été non formatrices du biofilm. L'évaluation de la formation de biofilm de nos isolats par les deux techniques (microplaque PVC, TM) a révélé que les souches isolées avaient une adhésion plus importante sur un support en verre par rapport un support en PVC.

La formation de biofilms est influencée par le type de support : de façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité d'une surface et la présence préalable de films protéiques influencent l'attachement des micro-organismes à cette surface et favorisent la formation d'un biofilm.

Comme dans tout travail de recherche, des questions subsistent et de nouvelles perspectives s'ouvrent afin de compléter les connaissances sur le groupe *Bacillus cereus* et l'implication des

rhizobactéries comme inoculants dans la composante microbienne d'un sol. La capacité de survie et de colonisation racinaire des souches et la conservation de leurs activités PGP dans cet écosystème doivent être élucidées.

Ce travail a abouti à la production d'un important soucier de groupe *Bacillus cereus* des régions arides et semi-arides. Certaines souches améliorent la croissance et la santé des plantes. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de ces souches en réalisant d'autres tests physiologiques et moléculaires ainsi que la caractérisation d'autres propriétés favorisant la croissance végétale telle que la production d'auxines, la fixation d'azote, l'antagonisme phytopathogène, la cyanogénèse (HCN), la production des sidérophores et l'activité ACC désaminase.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Afchain, A.L., Carlin, F., Nguyen-The, C. & Albert, I. (2008). Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *Int J Food Microbiol*, 128: 165-173.

AFNOR (1996). NF ISO 7932. Directives générales pour le dénombrement de *Bacillus cereus*. In *Analyse Microbiologique. Tome 1. Méthodes Horizontales*. pp. 203-218. Paris La Défense: AFNOR.

Aguilar Uscanga, M.G. and Délia, M.L., (2003). Strehaiano P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 61(2):157–162.

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

Aidoud A. ; et Touffet J. (1996). La régression de l'alfa (*stipa tenacissima*) graminée pérenne, un indicateur de désertification des steppes algériennes. *Sécheresse* (Paris), 7: 187-193.

Alam, M.S., Cui, Z.J., Yamagishi, T. et Ishii R. (2001). Grain yield and related physiological characteristics of rice plants *Oryza sativa* L. inoculated with free-living rhizobacteria, *Plant Prod. Sci.*, **4**:125–130.

Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology, second edn. *United States of America: John Wiley & Sons, Inc.*

Amann, R.I. Ludwig, W. and Schleifer, K.H.(1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59: 143-169

Angus, T.A. (1954). A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature*, 173: 545–546.

Aoi, Y. (2002). In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 94: 552-556.

Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V. et Kudoyarova, G.R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil.*, **272**: 201–209.

Arkhipova, T.N., Prinsen, E.A., Veselov, S.U., Martinenko, E.V., Melentiev, A.I. et Kudoyarova, G.R. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil.*, 292: 305–315.

Aronson, A.I. and Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters.*, 195 : 1-8

- Artursson, V., Finlay, R.D. & Jansson, J.K. (2005).** Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal-restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environ Microbiol.*, 7: 1952-1966.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Ismail, M.R., Hoque, M.A., Islam, M.Z., Shahidullah, S.M. et Meon, S. (2009).** Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol.*, 8 : 1247-1252.
- Asuming-Brempong, S., Gantner, S., Adiku, S.G.K., Archer, G., Edusei, V., Tiedje, J.M. (2008).** Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments. *Soil Biol Biochem.*, 40: 2811-2818.
- Atzhorn, R., Crozier, A., Wheeler, C.T. et Sandberg, G. (1988).** Production of gibberellins and indole- 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*, 175:532–538.
- Audenaert, K., De Meyer, G.B. et Höfte, M.M. (2002).** Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol.*, 128: 491–501.
- Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., Gohar, M. (2006).** Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:937-941.
- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S. D., Lapidus, A. et Sorokin, A. (2008).** The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1276-1280.
- Bach, H.J., Errampelli, D., Leung, K.T., Lee, H., Hartmann, A., Trevors, J.T. et Munch, J.C. (1999).** Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7): 3226-3228.
- Baize, D. (2000).** Guide des analyses en pédologie.: choix, expression, présentation, interprétation 2 e éd, INRA-paris France 255.
- Bakker, P.A., Pieterse, H.M., C.M.J. et Van Loon, L.C. (2007).** Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97:239-243.
- Bashan, Y., et Levanony, H. (1990).** Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 36:591–608.
- Bashan, Y. et Holguin, G. (1997).** *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Can. J. Microbiol.*, 43:103–121.
- Bashan, Y., Holguin, G. et De-Bashan, L.E. (2004).** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), *Can. J. Microbiol.*, 50:521-577.

- Bellon-Fontaine, M.N., Rault, J., Van Oss, C.J. (1996).** Microbial adhesion to solvents, a novel method to determine the electron–donor/electron–acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloid. Surface. B.*, 7: 47-53.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P. (2008).** Evaluation of Genetic Diversity and Plant Growth Promoting Activities of Nitrogen-Fixing Bacilli Isolated from Rice Fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39(3): 311-320.
- Benhamou, N., Gagné D.L. et Quéré Dehbi L. (2000).** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopath.* 90: 45–56.
- Bensaid, A.(2006).** Sig et télédétection pour l'étude de l'ensablement dans une zone d'étude : le cas de la wilaya de Naama (Algérie). Thèse de doctorat en Géographie, Université Es – Senia et Université Joseph Fourier, Algérie et France.
- Berggren, I., Van Vuurde J. W. L. et Martensson, A. M. (2001).** Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Appl. Soil Ecol.* 17: 97-105.
- Bergsma-Vlami, M., Prins, M. E. and Raaijmakers, J.M. (2005).** Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52(1):59-69.
- Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 1327–1350.
- Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C. Y., Murray, W. J., Tobe, T., Fernandez, R., & Schoolnik, G. K. (1998).** Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 280(5372): 2114-2118.
- Bigirimana, J. and Höfte, M. (2002).** Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica*, 30(2):159-168.
- Bonmatin, J.M., Laprevote, O. and Peypoux, F. (2003).** Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity–structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 6(6):541-556.
- Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., ... & Triplett, E. W. (1996).** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6):1935-1943.
- Borneman, J. & Triplett EW. (1997).** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol.*, 63: 2647-2653.
- Bottini, R., Cassan, F. et Picolli, P. (2004).** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65:497–503.

- Bottone, E.J. (2010).** *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 23(2): 382-398.
- Bouabdellah, H. (1991).** Dégradation du couvert végétal steppique de la zone sud-ouest oranaise (Le cas d'El Aricha). Université d'Oran, Institut de géographie et de l'aménagement du territoire. Oran, 180 p.
- Boulangé-Petermann, L., Rault, J., & Bellon-Fontaine, M. N. (1997).** Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling*, 11(3), 201-216.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007).** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423-435.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. and Bellon-Fontaine, M.N. (1999).** *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 5328-5333.
- Briandet, R., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N. (2001).** Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21: 299–310.
- Broughton, L.C., & Gross, K.L. (2000).** Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia*, 125(3): 420-427.
- Budiharjo, A. Fan, B., Chen, X.H. , Bleiss, W. Vater, J. and Borriss, R. (2011).** Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151: 303-311.
- Bullied, W.J., Buss, T.J. and Vessey, J.K. (2002).** *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies. *Canadian J. Plant Sci.*, 82: 291–298.
- Burdman, S., Jurkevitch, E. et Okon, Y. (2000).** Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, *In: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, 2: 229-250.
- Burmolle, M. Webb, J.S. Rao, D. Hansen, L. H. Sorensen, S.J. and Kjelleberg, S. (2006).** Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 3916-3923.
- Burmolle, M., Hansen, L.H. & Sorensen, S.J. (2007).** Establishment and Early Succession of a Multispecies Biofilm Composed of Soil Bacteria. *Microbial Ecology*, 54: 352–362.
- Busscher, H. J., & Van der Mei, H. C. (1997).** Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in dental research*, 11(1): 24-32.

- Cadot, C., Tran, S. L., Vignaud, M. L., De Buyser, M. L., Kolstø, A. B., Brisabois, A., ... & Ramarao, N. (2010).** InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *Journal of clinical microbiology*, 48(4): 1358-1365.
- Cakmakci, R., Kantar, F. et Sahin, F. (2001).** Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 164:527–531.
- Cakmakci, R., Erat, M., Erdogan, U. et Donmez, MF. (2007).** The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170:288–295.
- Castric, P.A. (1977).** Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 130 : 826-831.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G. et Fuhrmann, J.J. (1999).** Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1670-1680.
- Cavaglieri, I., Orlando, J., Rodriguez, M.I., S. Chulze et Etcheverry, M. (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the Maize root level. *Res. Microbiol.*, 156:748–754.
- Chávez, M. D. C. G., Newsam, R., Linderman, R., Dodd, J., & Valdez-Carrasco, J. (2008).** Bacteria associated with the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus in an As/Cu polluted soil. *Agrociencia*, 42(1): 1-10.
- Chelius, M.K. et Triplett, E.W. (2000).** Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:783–787.
- Cheng, Z., Duncker, B.P., McConkey, B.J. et Glick, B.R. (2008).** Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4. *Can. J. Microbiol.*, 54:128–136.
- Cho, J.C. & Tiedje, J.M. (2000).** Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl Environ Microbiol.*, 66: 5448-5456.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachy, E.H. (1982).** Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37: 318-326.
- Claus, D., Berkely, R.C.W. (1986).** Genus *Bacillus* in Bergy's Manual of systematic bacteriology, 131: 2659-2663.
- Clément, M. et Françoise, P. (1998).** *Analyse physique des sols, méthodes choisies*, Paris, Éditions Lavoisier, Tec et Doc, 1er janvier, 275 p.

- Clément, M. et Françoise, P. (2003).** *Analyse chimique des sols, méthodes choisies*, Paris, Éditions Lavoisier, Tec et Doc, 388 p.
- Corpe, W.A. (1970).** Attachment of marine bacteria to solid surfaces. Adhesion in biological systems, 73-87.
- Costa R, Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. & Smalla, K. (2006).** Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol.*, 56: 236-249.
- Costacurta, A., et Vanderleyden, J. (1995).** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 21:1–18.
- Costerton, J.W., Cheng, J.J., Geesy, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. (1987).** Bacterial biofilms in nature and disease. Annual reviews of microbiology, 41: 435-464.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R, Lappin-Scott, H.M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 711–745.
- Curl, E.A. et Truelove, B. (1986).** The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.
- Cutting, S.M. (2011).** Bacillus probiotics. *Food Microbiology*, 28: 214-220.
- Davey, M.E., O'toole, G.A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64:847-867.
- Deighton, M.A. and Balkau, B. (1990).** Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2442–2447.
- De Meyer, G. and Höfte, M. (1997).** Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, 87(6):588-593.
- De Meyer, G., Audenaert, K. and Höfte, M. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105(5):513-517.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Van Loon L.C. et Dicke, M. (2005).** Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18: 923–937
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Yaacov Okon, Y. (2003).** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22: 147–149.
- Dobereiner, J. (1997).** Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.*, 29:771–774.

- Dong, Y., Iniguez, A.L. et Triplett, E.W. (2003).** Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil*, 257:49–59.
- Downes, B.P., Steinbaker, C.R., Crowell, D.N. (2001).** Expression and processing of a hormonally regulated b-expansin from soybean. *Plant Physiol.*, 126:244–252.
- D.P.A.T. (2007).** Direction de la planification de la wilaya de Nâama. Monographie de la wilaya de Nâama. Edition 2007. 65 p.
- Duffy, B.K. et Defago, G. (1999).** Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2429–2438.
- Ecker, J.R. (1995).** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* , 268:667-675.
- Elkoca, E., Kantar, F. et Sahin, F. (2008).** Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *J. Plant Nutr.*, 31:157–171.
- Espinosa-Urgel, M. (2004).** Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid*, 52: 139-150.
- Ezawa, T., Smith, S.E. et Smith, F.A. (2002).** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, 244: 221–230.
- Fagerlund, A., Brillard, J., Fürst, R., Guinebretière, M. H., & Granum, P. E. (2007).** Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC microbiology*, 7(1) : 43.
- F.A.O. (1960).** La défense contre l'érosion éolienne. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, 99 p.
- Fernandez-Herrera, M., De-Mingo, I.G., and Blat-Martin, N. (1987).** Inositol hexaphosphate 'in vitro' mineralization by means of two *B. cereus* strains. *Anal Edafologia Agrobiologia*, 46: 423-432.
- Fierer, N., Bradford, M .A. & Jackson, R.B. (2007).** Toward an ecological classification of soil. bacteria. *Ecology*, 88: 1354-1364.
- Figueiredo, V.B., Burity, H.A. Martinez, C.R. et Chanway, C.P. (2008).** Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.*, 40:182–188.
- Filloux, A. et Vallet, I. (2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences*, 19 : 77-83
- Flemming, H. C. (1993).** Biofilms and environmental protection. *Water Science and Technology*, 27(7-8): 1-10.

- Fletcher, M. (1988).** Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol.*, 170 (1988): 2027–2030.
- Fletcher, E.L., Weissman, B.A., Efron, N., Fleiszig, S.M.J., Curcio, A.J., and Brennan, N.A. (1993).** The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Curr Eye Res.*, 12: 1067–1071.
- Frankenberger, W.T.J., et Arshad, M. (1995).** Phytohormones in soil. Microbial production and function. Marcel Dekker, New York, p 503.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R. and Keane, C.T. (1989).** New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42: 87-84.
- Fricker, M., Reissbrodt, R. (2008).** Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1): 27-34.
- Fuller, R. (1989).** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5):365-378.
- Fuller, R. (1991).** Probiotics in Human Medicine. *Gut*, 32(4): 434-442.
- Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., de Hoff, P.L., Hirsch, A.M. (2006).** Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 56: 195–206.
- Garcia-Robles, I., Sanchez, I., Gruppe, A., Martinez-Ramirez, A.C., Rausell, C., Real, M.D. et Bravo, A. (2001).** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests *Insect. Biochemistry and Molecular Biology*, 31(9): 849-856.
- Gavín, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J. G., & Tomás, J. M. (2003).** Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS microbiology letters*, 224(1): 77-83.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., Ball, A.S. (2003).** Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (3): 1809-1900.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J-P., Zhu T., Katagiri, F. (2003)** .Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.*, 31: 217–228.
- Glick , B.R., Jacobson, C.B. Schwarze, M.M.K. et Pasternak, J.J. (1994)** .1-Aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.*, 40:911–915.
- Glick, B.R., Patten C.L., Holguin, G. et Penrose, D.M. (1995).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College Press*, London.

- Glick., B.R., D.M. Penrose et L. Jiping (1998).** A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Bio.l*, 190:63–68.
- Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J. McConkey, B. (2007).** Promotion of Plant Growth by Bacterial Acc Deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 26(5-6): 227-242.
- Gobat, J., Aragno, M. & Matthey, W. (2003).** Le sol vivant, second edn. *Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes.*
- Gomes, A.M.A., Mariano, R.L.R. Silveira, E.B. and Mesquita, J.C.P. (2003).** Isolamento, selecao de bacterias e efeito de *Bacillus spp.* na producao de mudas organicas de alface. *Horticultura Brasileira*, 21: 701–705.
- González, J. M., Brown, B. J., & Carlton, B. C. (1982).** Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(22): 6951-6955.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H.N.(1973).** The Genus *Bacillus*, U.S. Department of Agriculture Handbook, 427: 116–119. Washington, DC: USDA.
- Gough, J. M., Akhurst, R. J., Ellar, D. J., Kemp, D. H. et Wijffels, G. L. (2002).** New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of live stock ectoparasites. *Biological Control*, 23(2):179-189.
- Graham, P. H. (1988).** Principles and Application of Soil Microbiology, pp: 322–345.
- Granum, P. E. et Lund, T. (1997).** *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2): 223-228.
- Grayston, S.J., Wang, S.Q., Campbell, C.D. and Edwards, A.C. (1998).** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rizhosphere. *Soil Biol Biochem.*, 30: 369-378.
- Gros, A., (1979).** Engrais. Guide pratique de la fertilisation. 7ième édition. La Maison Rustique. Paris. France. 121-205.
- Guinebrière, M.H., Nguyen-The, C. (2003).** Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 207-215.
- Guinebriere, M.H. et Sanchis, V. (2003).** *Bacillus cereus sensu lato*. *Bull Soc Fr Microbiol.*, 18: 95–103.
- Guinebrière, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P. (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*, 10: 851-865.

- Guinebretiere, M.H., Auger, S., Galleron, N., et al. (2012).** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 17: 17.
- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M. L., ... & De Vos, P. (2013).** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1): 31-40.
- Gupta, A., Gopal, M. and Tilak, K.V. (2000).** Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian J Exp Biol.*, 38:856–862.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003).** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11): 1599-1616.
- Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. (2004).** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Microbiology and Biotechnology*, 6:763-81.
- Gutierrez-Manero, FJ., Ramos, B., Probanza, A., Mehouchi, J. et Talon, M. (2001).** The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.*, 111:206–211.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J. et Poole, P.S. (2002).** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, 245(1):83-93.
- Haas, D. and Keel, C. (2003).** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopath.*, 41:117-153.
- Haas, D., et Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Natra. Rev. Microb.*, 1129.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O.P., Wani, S.P. et Reddy, G. (2008).** Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.*, 163:234–242.
- Hassink, J., Bouvman, L.A., Zwart, K.B. & Brussaard, L. (1993).** Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grasslands soils. *Soil Biol Biochem.*, 25: 47-55.
- Hecht-Buchholz, C. (1998).** The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixing bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonlegumious plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 161:509–520.
- Herald, P.J. and Zottola, E.A. (1988).** Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*, 53:1549-1552.

- Heydari, S., Moghadam, P.R. et Arab, S.M. (2008).** Hydrogen Cyanide Production Ability by *Pseudomonas Fluorescence* Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. *Proceedings "Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development"*, Tropentag, Hohenheim.
- Hilbert, L.R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., Gram, L. (2003).** Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International journal of biodeterioration and biodegradation*, 52: 175-185.
- Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K. A., ... & Beecher, D. J. (2004).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and environmental microbiology*, 70(2): 1068-1080.
- Hirsch, A.M. et Fang, Y. (1994).** Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol. Biol.*, 26: 5-9.
- Holguin, G., et Glick, B.R. (2001).** Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.*, 41:281-288.
- Howell, C.R., Beier, R.C. et Stipanovic, R.D. (1988).** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathologia*, 78:1075- 1078.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R. (2007).** Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (Iaa) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus Amyloliquefaciens* Fz42. *Mol. Plant Microb.*, 20(6): 619-626.
- Ivanova, E.G., Doronina, N.V. et Trotsenko, Y.A. (2001).** Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiol.*, 70: 392-397.
- Janssen, P.H. (2006).** Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 72: 1719-1728.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J. & Mahillon, J. (2003).** The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5: 631-640.
- Jofre, E., Lagares, A. et Mori, G. (2004).** Disruption of d'TDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231(2):267-275.
- Joo, G.J., Kang, SM., Hamayun, M., Kim, Na. CI., Shin, DH. et Lee. IJ. (2009).** *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *J Microbiol.*, 47:167-171.
- Joseph, B., Patra, R.R. et Lawrence, R. (2007).** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152.
- Karadeniz, A., Topcuoglu, S.F. and Inan, S. (2006).** Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnol.*, 22: 1061-1064.

- Khalid, A., Arshad, M. et Zahir, Z.A. (2004).** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 473-480(8).
- Khan, M. S., Zaidi, A. et Javed, M. (2009).** Microbial Strategies for Crop Improvement. 1-371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kim, K.Y., Jordan, D., McDonald, G.A. (1998).** *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilising bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biol. Biochem.*, 30:995–1003.
- Kloepper, J.W. et Beauchamp, C.J. (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 38: 1219–1232.
- Kloepper, JW., Ryn, C.M. et Zhang, S. (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. *Phytopathol.*, 94: 1259-1266.
- Knaak, N., Rohr, A.A. et Fiuza, L.M. (2007).** In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz. J. Microbiol.* 38(3):526-530.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J.W. and Reddy, M.S. (2006).** Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 31: 91–100.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K. & Haapasalo, M. (2000).** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2: 189-198.
- Kramer, J.M. & Gilbert, R.J. (1989).** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Foodborne Bacterial Pathogens (Doyle MP, ed) pp. 21-70. Marcel Dekker, New York.
- Kucey, R.M.N., Janzen, H.H. et Legget, M.E. (1989).** Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.*, 42:199–228.
- Kumar, V. et Narula, N. (1999).** Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils*, 28(3):301-305.
- Kumar, NR., Arasu, V.T. et Gunasekaran, P. (2002).** Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Sci.* 82:1463–1466.
- Kuske, C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E., Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M. & Belnap, J. (2002).** Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1854–1863.
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A. & Fierer, N. (2008).** The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 2407-2415.

- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R. & Fierer, N. (2009).** Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. *Appl Environ Microbiol.*, 75(15), 5111-5120.
- Lechner, S., MAYR, R., Francis, K. P., PRÜ, B. M., KAPLAN, T., WIEßNER-GUNKEL, E. L. K. E., ... & SCHERER, S. (1998).** *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4): 1373-1382.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S. (2006).** Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.*, 38(7):990-997.
- Lejeune, P. (2003).** Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends in microbiology*, 11(4): 179-184.
- Lerebour, G., Cupferman, S., & Bellon-Fontaine, M.N. (2004).** Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *Journal of applied microbiology*, 97(1): 7-16.
- Lereclus, D., Ribier, J., Klier, A., Menou, G., and Lecadet, M.M. (1984).** A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *EMBO J.*, 3(11): 2561–2567.
- Li, X., Hauer, B. & Rosche, B. (2007).** Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76: 1255-1262.
- Li, Z., Pan, Y., WU, Q. et Li, L. (1989).** Numbers, compositions and enzyme activities of denitrifiers in paddy soils of Taihu Lake district (China). *Acta Pedologica Sinica*, 26(1): 79-86.
- Lin, T.P., Chen, C.L., Fu, H.C., Wu, C.Y., Lin, G.H., Huang, S.H., Chang, L.K. and Liu, S.T. (2005).** Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*. 1730(2):159-164.
- Logan, N. A. et De Vos, P. (2009).** Genus 1. *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer et W. B. Whitman (dir.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, 21-128. New York, 2ème édition. Springer.
- Logan, N.A. (2012).** *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol.*, 112: 417–429.
- Loper, J.E. et Scroth, M.N. (1986).** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, 76: 386-389.
- Lucy, M., Reed, E. and Glick, B.R. (2004).** Applications of free living plant growthpromoting rhizobacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 86:1-25.

- Lund, T. et Granum, P.E. (1996).** Characterisation of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food-borne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, 141(2-3): 151-156.
- MacMillan, J. (2002).** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.*, 20: 387-442.
- Malek, F. (2013).** Le biofilm en industrie laitière: Caractérisation, facteurs de développement et élimination. Cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laiteries de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat en Sciences option Microbiologie, Université de Tlemcen, Algérie, pp. 168.
- Malek, F. (2016).** Hydrophobicité and specific biofilm features of *Bacillus cereus* spores subjected to pH-stresses. *Afr. J. Microbial. Res.* 10 : 744-751.
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J., Heyndrickx, M. (2009).** Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ Microbiol.*, 11(2): 467-482
- Margulis, L., Jorgensen, J.Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F.A. & Lo, S.C. (1998).** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1236-1241.
- Marroquin, L.D., Elyassnia, D., Griffiths, J. S., Feitelson, J. S. et Aroian, R.V. (2000).** *Bacillus thuringiensis* toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 155(4): 1693-1699.
- Martiny, J.B., Bohannan, B.J., Brown, J.H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., ... & Morin, P. J. (2006).** Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol.* 4: 102-112.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T. and Rattan, A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 24: 25-29.
- Mazas, M., Gonzalez, I., Lopez, M., GONZÁLEZ, J., & SARMIENTO, R. (1995).** Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International journal of food science & technology*, 30(1), 71-78.
- McGowan, S.J., Barnard, A.M.L., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J.L., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. and Salmond, G.P.C. (2005).** Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol. Microbiol.* 55(2):526-545.
- Mercier-Bonin, M., Ouazzani, K., Schmitz, P., & Lorthois, S. (2004).** Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 271(2): 342-350.

- Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C., Höfte, M. & Bakker, P.A. (2005).** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.*, **6**:177-185.
- Milner, I.L., Silo-Suh, L., Lee, J.C., He, H., Clardy, J. et Handelsman, J. (1996).** Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(8): 3061-3065.
- Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., & Malik, K. A. (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, **237**(1): 47-54.
- Mitter, N., Srivastava, A.C., Renu, A.S., Sarbhoy, A.K. et Agarwal, D.K. (2002).** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia*, **153**:187–193.
- Mock, M. and Fouet, A. (2001).** Anthrax. *Ann Rev Microbiol.*, **55**: 647–671.
- Mols, M. & Abee, T. (2011).** *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology*, **13**:2835-2843.
- Monier, J.M., and Lindow, S.E. (2004).** Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 346–355.
- Moreira, C.G., Carneiro, S. M., Nataro, J. P., Trabulsi, L. R., & Elias, W. P. (2003).** Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, **226**(1): 79-85.
- Mourez, M.(2004).** Anthrax toxins. *Rev. Physiol, Biochem and Pharmacol.*,**152**: 135-164
- Muller, A.K., Westergaard, K., Christensen, S. & Sorensen, S.J. (2002).** The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microb Ecol.*, **44**: 49-58.
- Munimbazi, C. et Bullerman, L.B. (1998).** Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* **84**:959-969.
- Murty, D., Kirschbaum, M.F.U., McMurtrie, R.E. & McGilvray, A. (2002).** Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? *Global Change Biology.*, **8**: 105-123.
- Nakamura, L.K et Jackson, M.A. (1995).** Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**(1), 46-49.
- Nakamura, L.K. (1998).** *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, **48**: 1031–1035.
- Narula, N., Deubel, A., Gans, W., Behl, R.K. et Merbach, W. (2006).** Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ.*, **52**: 119–129.

- Nath, N., Hyun, J., Ma, H., & Chilkoti, A. (2004).** Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions. *Surface Science*, 570: 98-110.
- Nedjraoui, D. (1981).** Évolutions des éléments biogènes et valeurs nutritives dans les principaux faciès de végétation des hautes plaines steppiques de la wilaya de Saïda. Thèse 3ème cycle, USTHB, Alger, Algérie, 156 p.
- Nester, E.W., Gordon, M.P., Amasino, R.M. et Yanofsky, M.F. (1984).** Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35:387–413.
- Nieto, K.F. et Frankenberger, W.T. (1989).** Biosynthesis of Cytokinins in Soil. *Sci. Soc. Am. J.*, 53 (3): 735-740.
- Noguez, A.M., Arita, H.T., Escalante, A.E., Forney, L.J., Garcia-Oliva, F. & Souza, V. (2005).** Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecol. Biogeogr.*, 14(3): 241-248.
- Nubel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. & Muyzer, G. (2000).** Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ. Microbiol.*, 2: 217–226.
- Nunan, N., Ritz, K., Crabb; D., Harris, K., Wu, K.J., Crawford, J.W. & Young, I.M. (2001).** Quantification of the in situ distribution of soil bacteria by large scale imaging of thin sections of undisturbed soil. *FEMS Microbiol Ecol.*, 37: 67-77.
- Nunan, N., Daniell, T.J., Singh, B.K., Papert, A., McNicol, J.W. & Prosser, J.I. (2005).** Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol.*, 71: 6784-6792.
- Nusslein, K. & Tiedje, J.M. (1999).** Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3622–3626.
- Oldroyd, G.E., Engstrom, E.M. et Long, S.R. (2001).** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell.*, 13:1835–1849.
- Ongena, M., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T.C., et Bélanger, R.R. (2000).** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Pathol.*, 49(4):523-530.
- Ongena, M., Jacques, P., Delfosse, P. and Thonart, P. (2002).** Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals.*, 15(1):1-13.
- Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane, A. and Thonart, P. (2005).** Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69(1):29-38.

- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. et Sahin, F. (2006).** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hortic.*, 111:38–43.
- Pamula, E., De Cupere, V., Dufrière, Y.F., & Rouxhet, P.G. (2004).** Nanoscale organization of adsorbed collagen: Influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. *Journal of colloid and interface science*, 271: 80-91.
- Paramonova, E., De Jong, E.D., Krom, B.P., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J. & Sharma, P.K. (2007).** Low-Load Compression Testing: a Novel Way of Measuring Biofilm Thickness. *Applied & Environmental Microbiology*, 73: 7023-7028.
- Pedersen, K. (1990).** Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water Research*, 24: 239-243.
- Penrose, D.M. et Glick BR. (2001).** Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can. J. Microbio.*, 47:368–372.
- Penrose, D.M., Glick, BR. (2003).** Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant*, 118:10–15.
- Persello-Cartieaux, L., Nussaume, F., et Robaglia, C. (2003).** Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.*, 26:189-199.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. and Wallach, J. (1999).** Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.*, 51(5): 553-563.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q. et Gullino, M.L. (1997).** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.*, 11(3):131-140.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C. (2002).** Signaling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 4(5):535-544.
- Ping, L. et Boland, W. (2004).** Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 9:263-266.
- Podile, AR. et Kishore, GK. (2006).** Plant growth-promoting rhizobacteria. *In: Gnanamanickam SS (ed) Plant-associated bacteria: rhizosphere bacteria.* Springer, Netherlands, 195–230.
- Pradhan, N. et Sukla, L.B. (2005).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol.*, 5(10): 850-854.
- Pradier, C.M., Rubio, C., Poleunis, C., Bertrand, P., Marcus, P. and Compere, C. (2005)** Surface characterisation of three marine bacteria strains by FT-IR, XPS and ToF-SIMS, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. *J Phys Chem.*, 109: 9540-9549.

- Press, C.M., Wilson, M., Tuzun, S. and Kloepper, J.W. (1997).** Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10(6):761-768.
- Prigent-Combaret, C., Vidal O., Dorel, C., et Lejeune, P. (1999).** Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181, 5993-6002.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. and Dorel, C. (2001).** Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene. *J. Bacteriol.*, 183:7213-7223.
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., Van Oorschot, M. M., Van der Sluis, I., Schippers, B., & Bakker, P. A. H. M. (1995).** Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85(10): 1075-1080.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. et De Souza, J.T. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 537-547.
- Rahman, M.S., Ano, T. and Shoda, M. (2007).** Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.*, 127(3):503-507.
- Rajendhran, J. & Gunasekaran, P. (2008).** Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol Adv.* 26: 576-590.
- Ramette, A. & Tiedje, J.M. (2007).** Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microb Ecol.*, 53: 197-207.
- Ramirez, L.E.F., Mellado, J.C. (2005).** Bacterial biofertilizers. *In: Siddiqui ZA (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization.* Springer, Dordrecht, Netherlands, 143–172..
- Ran, L.X., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. (2005).** No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacteria induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology*. 95(11):1349-1355.
- Rau, I., Perz, R., Klittich, G. et Contzen, M. (2009).** Cereulide forming presumptive *Bacillus cereus* strains from food - differentiating analyses using cultural methods, LC-MS/MS, PCR, and infrared spectroscopy in consideration of thermotolerant isolates. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 122(1-2): 25-36.
- Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. et Paull, R.E. (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* , 33(2):193-203.
- Ritz, K., McNicol, W., Nunan, N., Grayston, S., Millard, P., Atkinson, D., Gollotte, A., Habeshaw, D., Boag, B., Clegg, C.D., Griffiths, B.S., Weatley, R.E., Glover, L.A., McCaig, A.E. & Prosser, J.I. (2004).** Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiol Ecol.*, 49: 191-205.
- Rogers, M.E., Craig, AD., Munns, R., Colmer, T.D., Nichols, P.G.H., Malcolm, C.V., Barrett-Lennard, EG., Brown, AJ., Semple, W.S., Evans, P.M., Cowley, K., Hughes,**

- S.J., Snowball, R., Bennett, S.J., Sweeney, G.C., Dear, B.S. et Ewing, M.A. (2005)** .The potential for developing fodder plants for the salt-affected areas of southern and eastern Australia: An overview. *Aust. J. Exp. Agr.*, 45:301–329.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Bais, H.P. (2008)**. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 64, 153–166.
- Rykiel, E.J. (1985)**. Towards a definition of ecological disturbance. *Aus J Ecol.*, 10: 361-365.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W. et Kloepper, J.W. (2003)**. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 4927-4932.
- Ryu, R. et Patten, C.L. (2008.)** Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4 TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Am. Soc. Microbiol.*, 19: 1-35.
- Sahin, F., Cakmakci, R. et Kantar, F. (2004)**. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil*, 265:123–129.
- Saitou, K., Furuhashi, K., Kawakami, Y. and Fukuyama, M. (2009)**. Biofilm formation abilities and disinfectant resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Science*, 14: 65-68.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., ... & Leemans, R. (2000)**. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *science*, 287(5459), 1770-1774.
- Salisbury, F.B. et Ross, C.W. (1992)**. Plant physiology (No. Ed. 4).. Wadsworth, Belmont, CA.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. (2002)**. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.*, 184:1140–1154.
- Saxena, A.K. et Tilak, K.V.B.R. (1998)**. Free-living nitrogen fixers: Its role in crop production. *In : Microbes for Health, Wealth and Sustainable Environment*, Malhotra Publ Co, New Delhi. Edited by Verma AK, 25–64.
- Scheuerman, T. R., Camper, A. K., & Hamilton, M. A. (1998)**. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Journal of colloid and interface science*, 208: 23-33.
- Schmidt T. R., Scott, E. J. and Dyer, D.W. (2011)**. Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics* , 12: 430.
- Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., ... & Dean, D. H. (1998)**. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3) : 775-806.

- Seneviratne, G., Zavahir, J., Bandara, W. & Weerasekara, M. (2008).** Fungalbacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 739-743.
- Sharma, K., Dak, G., Agrawal, A., Bhatnagar, M. et Sharma, R. (2007).** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed sand seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, 1: 61-63.
- Simmonds. P, Mossel, B.L., Intaraphan, T. and Deeth, H.C. (2003).** Heat resistance of Bacillus spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of food protection*, 66: 2070-2075.
- Singh, B.K., Millard, P., Whiteley, A.S. & Murrell, J.C. (2004).** Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends Microbiol.*, 12: 386-393.
- Singh, B.K., Nazarie, L., Munro, S., Anderson, I. & Campbell, C.D. (2006).** Use of multiplexterminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol.*, 72: 7278-7285.
- Singh, B.K., Munro, S., Potts, J. & Millard, P. (2007).** Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Appl. Soil Ecol.*, 36: 147-155.
- Singh, B.K., Tate, K.R., Kolipaka, G., Hedley, C.B., Macdonald, C.A., Millard P & Murrell JC. (2007).** Effect of afforestation and reforestation of pastures on the activity and population dynamics of methanotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 73: 5153-5161.
- Singh, B.K., Dawson, L.A., McDonald, C.A. & Buckland, S.M. (2009).** Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *App. Soil Ecol.*, 41: 239-248.
- Somers, E., Vanderleyden, J. et Srinivasan, M. (2004).** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 304:205–240.
- Son, T.T.N., Diep, C.N. et Giang, T.T.M. (2006).** Effect of bradyrhizobia and phosphate solubilizing Bacteria application on Soybean inrotational system in the Mekong delta. *Omonrice*, 14:48–57.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. et Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31 (4): 425-448.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. et Okon, Y. (2009).** Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *In: van Loon LC (ed) Advances in botanical research*, 51: 283–320.
- Spencer, R. C. (2003).** Bacillus anthracis. *Journal of Clinical Pathology*, 56(3); 182-187.
- Stenfors, L.P. and Granum, P.E. (2001).** Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 197: 223–228.

- Subbarao, N.S. (1988).** Phosphate solubilizing micro-organism. *In: Biofertilizer in agriculture and forestry.* Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, 133–142.
- Sundara, B., Natarajan, V. et Hari, K. (2002).** Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane yields. *Field Crops Res.*, 77:43–49.
- Sutherland, I.W. (2001).** The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9 (5): 222-7.
- Tarlera, S., Jangid, K., Ivester, A.H., Whitman, W.B. & Williams, M.A. (2008).** Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *FEMS Microbiol Ecol.*, 64: 129-140.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C. and Faille, C. (2006).** Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int J Food Microbiol.*, 110: 254-262.
- Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Hendriksen, N. B., Phipps, R. K., & Budde, B. B. (2006).** Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7):5118-5121.
- Tiedje, J.M. Assuming-Bremppong S, Nusslein K, Marsh TL & Flynn SJ. (1999).** Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, 13: 109-122.
- Tien, T.M, Gaskins, M.S. et Hubbel, D.H. (1979).** Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Micro.*, 37(5): 1016-1024.
- Tilak, K.V.B.R., Rauganayaki, N., and Manoharachari, C. (2006).** Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and Rhizobium on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Europ J Soil Sci.*, 57:67–71.
- Timmusk, S.N.S., Nicander, B., Granhall, U. et Tillberg, E. (1999).** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1847–1852.
- Timmusk, S. Grantcharova, N. and Wagner, E.G.H. (2005).** *Paenibacillus polymyxa* Invades Plant Roots and Forms Biofilms; *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7292-7300
- Tourasse, N.J., Helgason, E., Klevan, A., Sylvestre, P., Moya, M., Haustant, M., Økstad, O. A., Fouet, A., Mock, M. and Kolstø, A.B. (2011).** Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *FoodMicrobiology*, 28: 236-244.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. and Thonart, P. (2004).** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.*, 96(5):1151-1160.
- Tsakelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., et Netrusov, A.I. (2006).** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 42:117–126.

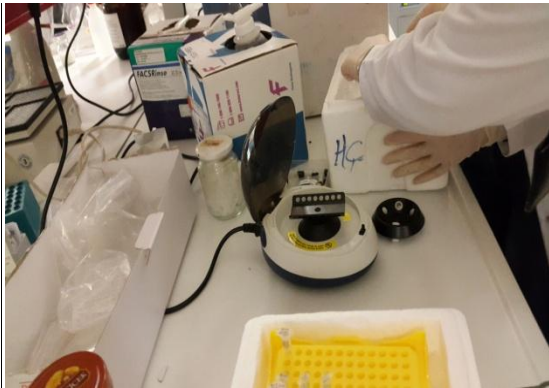
- Valdebinito, M., A.L Crumbliss., G. Winkelman et K. Hantke (2006).** Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersinianbactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.* 296:513-520.
- Van Loon, L.C., Bakker, P. and Pieterse, C. M. J. (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36:453-483.
- Van Loon, LC. et Bakker, P.A. (2005).** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: Siddiqui Z.A., ed. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 39-66.
- Van Loon, LC., Geraatset, P.B.J. and Linthorst, H.J.M. (2006).** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, 11:184–190.
- Verma, S.C., Ladha, J.K. et Tripathi, A.K. (2001).** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.*,91:127–141
- Verville, J.H., Hobbie, S.E., Chapin, F.S. & Hooper, D.U. (1998).** Response of tundra CH₄ and CO₂ flux to manipulation of temperature and vegetation. *Biogeochemistry.* 41: 215-235.
- Vessey, J.K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255 : 571–586.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M.B., & Brozel, V.S. (2006).** Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4970-4977.
- Vinter, V. (1965).** Spores of microorganisms. XVII. The fate of preexisting diaminopimelic acid-containing structures during germination and postgerminative development of bacterial spores. *Folia Microbiol (Praha)*, 10(5):280–287.
- Von Stetten, F., Mayr, R. and Scherer, S. (1999).** Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ Microbiol.*, 1(6): 503-515.
- Wang, C., Knill, E., Glick, B.R. et Défago, G. (2000).** Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.*, 46:898–907.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S.C., & Bateson, M. M. (1998).** A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4): 1353-1370.
- Wellman-Desbiens, É., Lucas, É., et Côté, J.C. (2011).** Screening of the nematicidal activity and sub-lethal effects of the bacterium *Bacillus thuringiensis* on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Nematology*, 21(2): 169-180.
- Wenxing, H., Tuo, Shongyang, Y. et Lina, S. (2008).** PGPR bio-fertilizers producing and its effect on *Avena sativa* growth and quality development. *Acta Pratac. Sinica*, 17:75-84.

- Whipps, J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52:487-511.
- White, R.E. (2006).** Principles and practice of soil science. The soil as a natural resource. . *Fourth edn: Blackwell Publishing.*
- Whitelaw, M.A. (2000).** Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.*, 69:99–151.
- Wijman, J.G.E, de Leeuw, P.P.L.A, Moezelaar, R., Zwietering, M.H. and Abee T. (2007).** Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion. *Appl Environ. Microbiol.*, 73: 1481-1488.
- Williams, P.M. & De Mallorca M. S. (1982).** Abscisic acid and gibberellin-like substances in root nodule of *Glycine max.* *Plant Soil*, 65: 19-26.
- Wimpenny, J. W.T., Kinniment, L. & Scourfield, M.A. (1993).** The physiology and biochemistry of biofilm. In *Microbial Biofilms: Formation and Control*. Societ for Applied Bacteriology Technica 1 Series 30, 51-94. Edited by S. P. Denyer, S. P. Gorman & M. Sussman. Oxford : Blackwell Scientific.
- Yahalom, E., Okon, Y. et Dovrat, A. (1990).** Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). *Can. J. Microbiol.*, 36: 10-14.
- Yasmin, F., Othman, R., Saad, M. S., & Sijam, K. (2007).** Screening for beneficial properties of Rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *J Biotechnol.*, 6(1):49-52.
- Yazdani, M., Bahmanyar, M.A., Pirdashti, H. et Esmaili, M.A. (2009).** Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of Corn (*Zea mays L*). *World Academy of Science, Engin. Technol.*, 49: 90-92.
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D. S., Wu, L. Y., Marsh, T. L., O'Neill, R. V., ... & Tiedje, J. M. (2002).** Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1): 326-334.

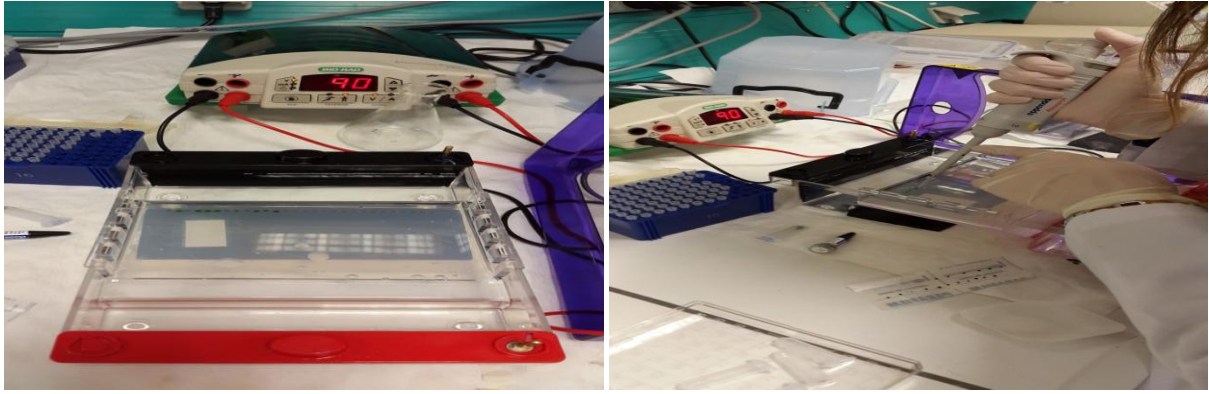
Annexes



Mesure de la quantité d'ADN



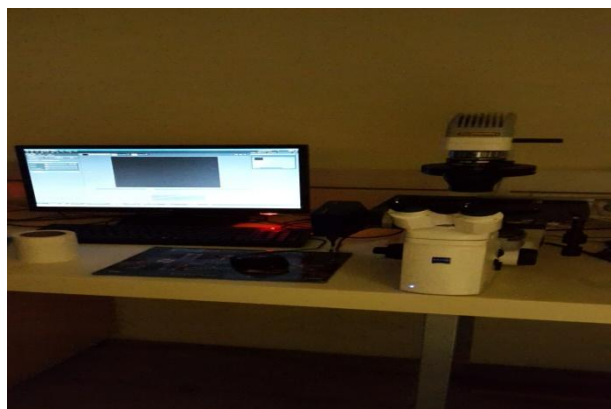
Amplification par PCR



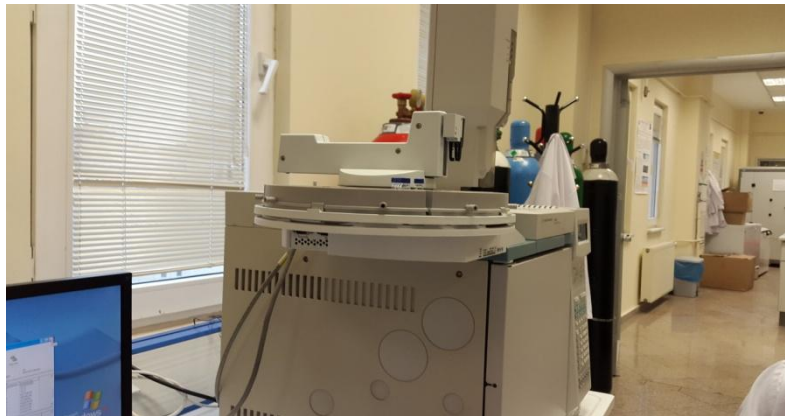
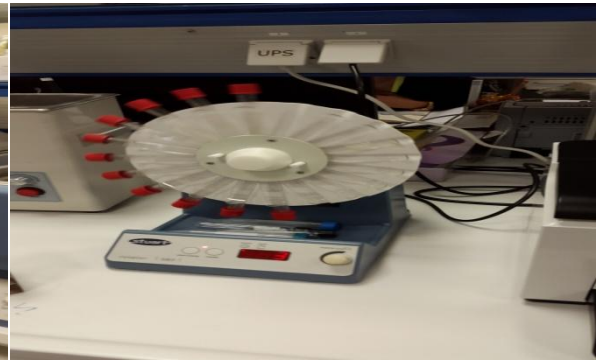
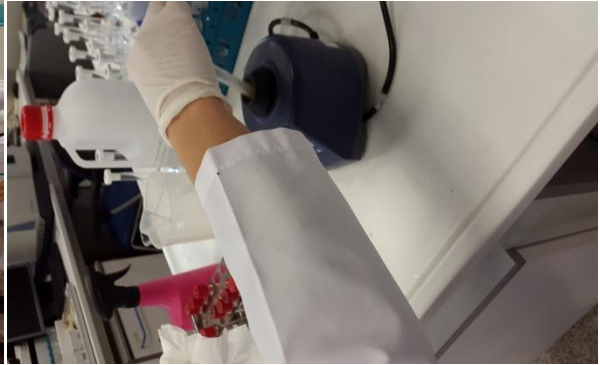
Electrophorèse sur gel d'agarose



Le microscope électronique à balayage



Le microscope à contraste de phase



Analyse des FAME (chromatographie en phase gazeuse)

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 3 ID Number: 10725
 Type: Samp Bottle: 2 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 9:39:54 AM
 Sample ID: Bact 1

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6546	472	0.010	----	6.4375		----	< min rt	
0.6636	317	0.006	----	6.5052		----	< min rt	
0.6964	9.257E+8	0.012	----	6.7497	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7611	518	0.010	----	7.2333		----	< min rt	
0.7901	3608	0.011	----	7.4499		----	< min rt	
1.4374	1283	0.008	1.077	11.6187	12:0 iso	0.97	ECL deviates -0.002	Reference -0.006
1.5194	992	0.008	1.057	12.0010	12:0	0.74	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
1.6754	11297	0.008	1.027	12.6239	13:0 iso	8.16	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
1.6981	1307	0.008	1.023	12.7146	13:0 anteiso	0.94	ECL deviates 0.001	Reference -0.005
1.9459	8622	0.008	0.988	13.6286	14:0 iso	5.99	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
2.0506	7368	0.008	0.976	14.0020	14:0	5.06	ECL deviates 0.002	Reference -0.005
2.1230	313	0.007	----	14.2438		----		
2.2391	40758	0.008	0.959	14.6310	15:0 iso	27.49	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
2.2667	6378	0.008	0.957	14.7232	15:0 anteiso	4.29	ECL deviates -0.002	Reference -0.009
2.3503	1779	0.009	0.951	15.0020	15:0	----	ECL deviates 0.002	
2.4778	668	0.009	0.943	15.4124	16:1 w7c alcohol	0.44	ECL deviates -0.002	
2.5066	2795	0.009	0.941	15.5050	Sum In Feature 2	1.85	ECL deviates 0.004	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5465	14488	0.009	0.939	15.6335	16:0 iso	9.56	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
2.5923	544	0.009	0.936	15.7808	16:1 w11c	0.36	ECL deviates -0.001	
2.6220	9149	0.009	0.935	15.8761	Sum In Feature 3	6.01	ECL deviates 0.001	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6605	16789	0.009	0.933	16.0001	16:0	11.01	ECL deviates 0.000	Reference -0.008
2.7896	1436	0.010	0.927	16.4125	17:1 iso w10c	0.94	ECL deviates -0.001	
2.8118	2568	0.010	0.927	16.4833	17:1 iso w5c	1.67	ECL deviates 0.000	
2.8386	735	0.008	0.926	16.5690	17:1 anteiso A	0.48	ECL deviates -0.002	
2.8593	14136	0.009	0.925	16.6352	17:0 iso	9.19	ECL deviates -0.002	Reference -0.010
2.8895	2873	0.009	0.924	16.7316	17:0 anteiso	1.87	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
2.9740	624	0.009	0.921	17.0014	17:0	0.40	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
3.1729	408	0.009	0.917	17.6367	18:0 iso	0.26	ECL deviates 0.001	Reference -0.008
3.2209	2513	0.011	0.916	17.7897	18:1 w9c	1.62	ECL deviates -0.004	
3.2868	1067	0.010	0.914	18.0004	18:0	0.69	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
----	2795	---	----	----	Summed Feature 2	1.85	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	----	---	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	9149	---	----	----	Summed Feature 3	6.01	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 149111
 Percent Named: 99.79%

Reference ECL Shift: 0.007
 Total Named: 148798
 Total Amount: 143907

Number Reference Peaks: 15

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.567	Bacillus-cereus-GC subgroup B
	0.408	Bacillus-cereus-GC subgroup A

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 4 ID Number: 10726
 Type: Samp Bottle: 3 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 9:48:18 AM
 Sample ID: Bact 2

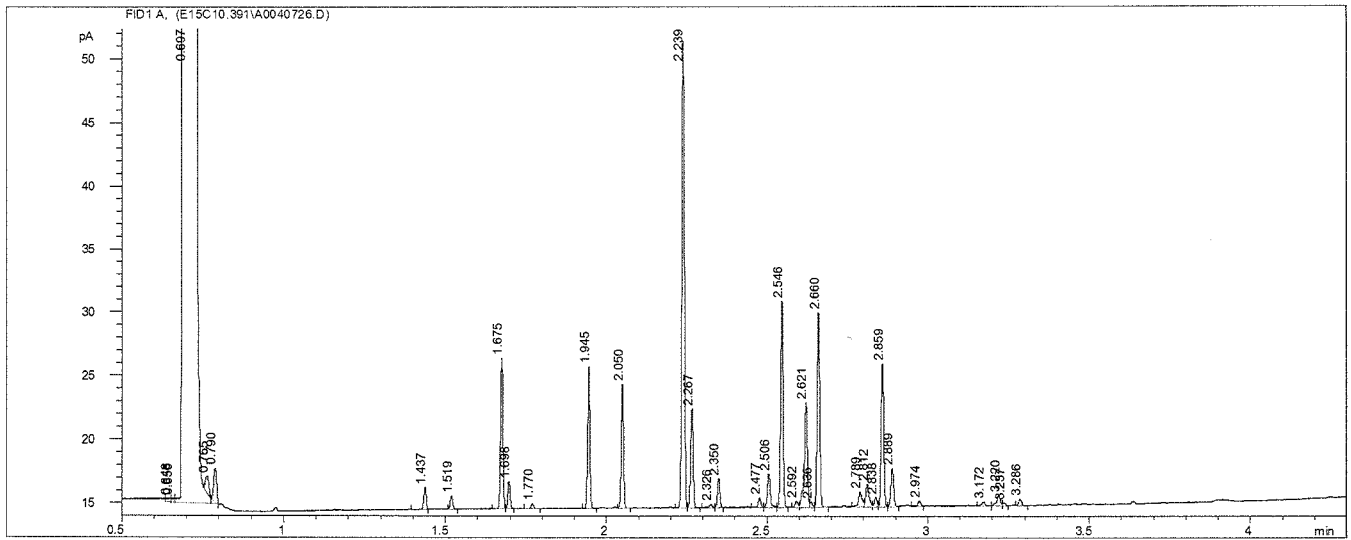
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6483	601	0.013	----	6.3900			< min rt	
0.6565	393	0.009	----	6.4508			< min rt	
0.6966	9.546E+8	0.012	----	6.7502	SOLVENT PEAK		< min rt	
0.7649	2010	0.011	----	7.2610			< min rt	
0.7900	3535	0.011	----	7.4486			< min rt	
1.4372	1927	0.008	1.077	11.6186	12:0 iso	1.33	ECL deviates -0.002	Reference -0.007
1.5193	1177	0.009	1.057	12.0014	12:0	0.80	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
1.6751	11729	0.008	1.027	12.6231	13:0 iso	7.71	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
1.6979	2217	0.008	1.023	12.7142	13:0 anteiso	1.45	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
1.7702	484	0.009	1.011	13.0026	13:0	0.31	ECL deviates 0.003	Reference -0.004
1.9453	11303	0.008	0.988	13.6273	14:0 iso	7.15	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
2.0502	9933	0.008	0.976	14.0013	14:0	6.21	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
2.2387	39209	0.008	0.959	14.6307	15:0 iso	24.08	ECL deviates -0.001	Reference -0.009
2.2665	8392	0.009	0.957	14.7233	15:0 anteiso	5.14	ECL deviates -0.002	Reference -0.010
2.3258	450	0.010	0.952	14.9212	15:1 w5c	0.27	ECL deviates -0.005	
2.3499	2521	0.009	0.951	15.0014	15:0		ECL deviates 0.001	
2.4770	912	0.009	0.943	15.4108	16:1 w7c alcohol	0.55	ECL deviates -0.003	
2.5061	3378	0.010	0.941	15.5044	Sum In Feature 2	2.04	ECL deviates 0.003	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5462	17838	0.009	0.939	15.6334	16:0 iso	10.72	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.5916	570	0.009	0.936	15.7795	16:1 w11c	0.34	ECL deviates -0.003	
2.6212	10711	0.010	0.935	15.8750	Sum In Feature 3	6.41	ECL deviates 0.000	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6361	430	0.007	0.934	15.9229	16:1 w5c	0.26	ECL deviates -0.005	
2.6601	16789	0.008	0.933	16.0002	16:0	10.03	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.7894	1936	0.011	0.927	16.4134	17:1 iso w10c	1.15	ECL deviates -0.001	
2.8117	2577	0.010	0.927	16.4844	17:1 iso w5c	1.53	ECL deviates 0.001	
2.8379	907	0.009	0.926	16.5683	17:1 anteiso A	0.54	ECL deviates -0.003	
2.8590	12993	0.009	0.925	16.6357	17:0 iso	7.69	ECL deviates -0.001	Reference -0.011
2.8890	3589	0.009	0.924	16.7316	17:0 anteiso	2.12	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
2.9737	698	0.009	0.921	17.0023	17:0	0.41	ECL deviates 0.002	Reference -0.008
3.1723	633	0.012	0.917	17.6368	18:0 iso	0.37	ECL deviates 0.001	Reference -0.010
3.2202	1289	0.011	0.916	17.7898	18:1 w9c	0.76	ECL deviates -0.004	
3.2368	316	0.009	0.915	17.8429	Sum In Feature 8	0.19	ECL deviates -0.005	18:1 w7c
3.2859	732	0.010	0.914	17.9996	18:0	0.43	ECL deviates 0.000	Reference -0.012
----	3378	---	----	----	Summed Feature 2	2.04	12:0 aldehyde ?	unknown I0.9525
----	----	---	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	10711	---	----	----	Summed Feature 3	6.41	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	316	---	----	----	Summed Feature 8	0.19	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 163118
 Percent Named: 100.00%

Reference ECL Shift: 0.008
 Total Named: 163118
 Total Amount: 158570
 Number Reference Peaks: 16

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.707	Bacillus-cereus-GC subgroup B



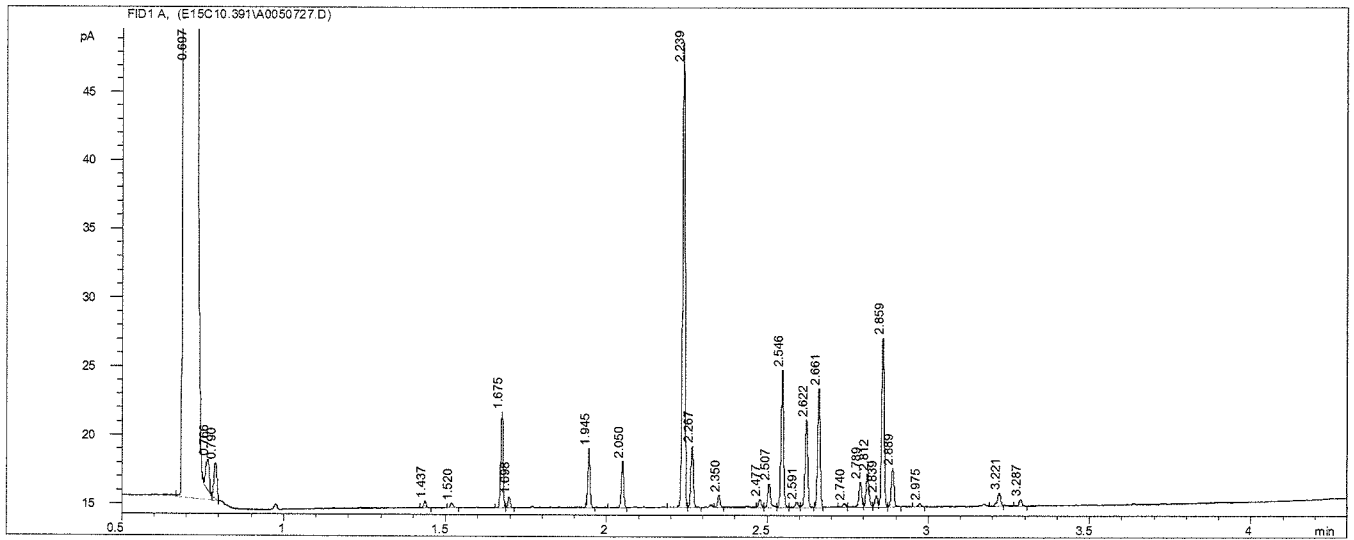
Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 5 ID Number: 10727
 Type: Samp Bottle: 4 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 9:56:50 AM
 Sample ID: Bact 3

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6968	9.558E+8	0.012	----	6.7549	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7658	3221	0.011	----	7.2702		----	< min rt	
0.7904	3492	0.011	----	7.4533		----	< min rt	
1.4372	494	0.008	1.077	11.6183	12:0 iso	0.48	ECL deviates -0.003	Reference -0.007
1.5198	396	0.009	1.057	12.0039	12:0	0.38	ECL deviates 0.004	Reference -0.001
1.6751	7077	0.008	1.027	12.6234	13:0 iso	6.57	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
1.6976	849	0.008	1.023	12.7132	13:0 anteiso	0.79	ECL deviates -0.001	Reference -0.007
1.9453	4483	0.008	0.988	13.6273	14:0 iso	4.01	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
2.0500	3728	0.008	0.976	14.0007	14:0	3.29	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
2.2389	35723	0.008	0.959	14.6312	15:0 iso	30.99	ECL deviates -0.001	Reference -0.009
2.2667	4866	0.008	0.957	14.7239	15:0 anteiso	4.21	ECL deviates -0.001	Reference -0.009
2.3501	1009	0.009	0.951	15.0021	15:0	----	ECL deviates 0.002	
2.4770	697	0.009	0.943	15.4106	16:1 w7c alcohol	0.59	ECL deviates -0.003	
2.5065	2147	0.009	0.941	15.5054	Sum In Feature 2	1.83	ECL deviates -0.010	14:0 3OH/16:1 iso I
2.5463	11499	0.009	0.939	15.6334	16:0 iso	9.76	ECL deviates 0.000	Reference -0.008
2.5914	510	0.010	0.936	15.7783	16:1 w11c	0.43	ECL deviates -0.004	
2.6217	7375	0.009	0.935	15.8760	Sum In Feature 3	6.24	ECL deviates 0.001	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6606	9623	0.009	0.933	16.0009	16:0	8.12	ECL deviates 0.001	Reference -0.008
2.7401	361	0.009	0.929	16.2548	15:0 2OH	0.30	ECL deviates 0.000	
2.7895	2334	0.010	0.927	16.4125	17:1 iso w10c	1.96	ECL deviates -0.002	
2.8120	3091	0.009	0.927	16.4844	17:1 iso w5c	2.59	ECL deviates 0.001	
2.8385	965	0.009	0.926	16.5692	17:1 anteiso A	0.81	ECL deviates -0.002	
2.8593	14001	0.009	0.925	16.6355	17:0 iso	11.71	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
2.8895	3321	0.009	0.924	16.7317	17:0 anteiso	2.78	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
2.9745	343	0.009	0.921	17.0034	17:0	0.29	ECL deviates 0.003	Reference -0.006
3.2210	1542	0.011	0.916	17.7901	18:1 w9c	1.28	ECL deviates -0.004	
3.2865	715	0.010	0.914	17.9991	18:0	0.59	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
----	2147	---	----	----	Summed Feature 2	1.83	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	-----	---	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	7375	---	----	----	Summed Feature 3	6.24	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c

ECL Deviation: 0.003 Reference ECL Shift: 0.008 Number Reference Peaks: 14
 Total Response: 116140 Total Named: 116140
 Percent Named: 100.00% Total Amount: 111520

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.542	Bacillus-cereus-GC subgroup A
	0.363	Bacillus-cereus-GC subgroup B



Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 6 ID Number: 10728
 Type: Samp Bottle: 5 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 10:05:32 AM
 Sample ID: Bact 4

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6967	9.281E+8	0.012	----	6.7539	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7650	1266	0.011	----	7.2642		----	< min rt	
0.7904	3429	0.011	----	7.4538		----	< min rt	
1.4371	1580	0.008	1.077	11.6191	12:0 iso	1.04	ECL deviates -0.002	Reference -0.008
1.5190	1254	0.009	1.057	12.0013	12:0	0.81	ECL deviates 0.001	Reference -0.005
1.6749	15053	0.008	1.027	12.6237	13:0 iso	9.49	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
1.6978	1869	0.008	1.023	12.7151	13:0 anteiso	1.17	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
1.9451	8418	0.008	0.988	13.6278	14:0 iso	5.10	ECL deviates 0.000	Reference -0.008
2.0499	9742	0.008	0.976	14.0011	14:0	5.84	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
2.2383	52625	0.009	0.959	14.6303	15:0 iso	30.98	ECL deviates -0.002	Reference -0.011
2.2663	6901	0.009	0.957	14.7234	15:0 anteiso	4.05	ECL deviates -0.002	Reference -0.011
2.3259	477	0.011	0.952	14.9224	15:1 w5c	0.28	ECL deviates -0.004	
2.3499	1712	0.008	0.951	15.0026	15:0	----	ECL deviates 0.003	
2.4767	756	0.008	0.943	15.4106	16:1 w7c alcohol	0.44	ECL deviates -0.003	
2.5060	3326	0.009	0.941	15.5050	Sum In Feature 2	1.92	ECL deviates 0.004	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5459	12719	0.009	0.939	15.6334	16:0 iso	7.33	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.5912	481	0.008	0.936	15.7790	16:1 w11c	0.28	ECL deviates -0.003	
2.6214	12577	0.010	0.935	15.8760	Sum In Feature 3	7.22	ECL deviates 0.001	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6362	473	0.007	0.934	15.9238	16:1 w5c	0.27	ECL deviates -0.004	
2.6602	14501	0.009	0.933	16.0010	16:0	8.30	ECL deviates 0.001	Reference -0.009
2.7892	2261	0.011	0.927	16.4129	17:1 iso w10c	1.29	ECL deviates -0.001	
2.8109	4080	0.010	0.927	16.4821	17:1 iso w5c	2.32	ECL deviates -0.001	
2.8381	948	0.009	0.926	16.5690	17:1 anteiso A	0.54	ECL deviates -0.002	
2.8586	15179	0.009	0.925	16.6347	17:0 iso	8.62	ECL deviates -0.002	Reference -0.013
2.8890	2680	0.009	0.924	16.7317	17:0 anteiso	1.52	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
2.9744	478	0.011	0.921	17.0045	17:0	0.27	ECL deviates 0.004	Reference -0.006
3.2197	543	0.012	0.916	17.7877	18:1 w9c	0.31	ECL deviates -0.006	
3.2859	599	0.010	0.914	17.9990	18:0	0.34	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
3.6368	521	0.009	0.911	19.1461	18:1 2OH	0.29	ECL deviates 0.000	
----	3326	---	----	----	Summed Feature 2	1.92	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	-----	---	----	----		----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	12577	---	----	----	Summed Feature 3	7.22	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c

ECL Deviation: 0.002

Reference ECL Shift: 0.009

Number Reference Peaks: 14

Total Response: 170041

Total Named: 170041

Percent Named: 100.00%

Total Amount: 164586

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.635	Bacillus-cereus-GC subgroup A
	0.506	Bacillus-cereus-GC subgroup B
	0.414	Bacillus-thuringiensis-kurstakii

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 7 ID Number: 10729
 Type: Samp Bottle: 6 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 10:14:00 AM
 Sample ID: Bact 5

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6968	9.184E+8	0.013	----	6.7523	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7660	3729	0.012	----	7.2696		----	< min rt	
0.7905	3349	0.011	----	7.4524		----	< min rt	
1.4373	1139	0.008	1.077	11.6196	12:0 iso	0.73	ECL deviates -0.001	Reference -0.007
1.5192	904	0.010	1.057	12.0018	12:0	0.56	ECL deviates 0.002	Reference -0.004
1.6747	12529	0.008	1.027	12.6230	13:0 iso	7.61	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
1.6976	2354	0.008	1.023	12.7145	13:0 anteiso	1.42	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
1.9450	9452	0.008	0.988	13.6277	14:0 iso	5.52	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.0495	9523	0.008	0.976	14.0005	14:0	5.50	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.2382	52719	0.008	0.959	14.6308	15:0 iso	29.89	ECL deviates -0.001	Reference -0.011
2.2660	12108	0.008	0.957	14.7234	15:0 anteiso	6.85	ECL deviates -0.002	Reference -0.011
2.3493	1610	0.009	0.951	15.0016	15:0	----	ECL deviates 0.002	
2.4769	906	0.009	0.943	15.4123	16:1 w7c alcohol	0.50	ECL deviates -0.002	
2.5056	3146	0.010	0.941	15.5046	Sum In Feature 2	1.75	ECL deviates 0.004	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5457	14222	0.009	0.939	15.6339	16:0 iso	7.89	ECL deviates 0.001	Reference -0.010
2.5915	731	0.009	0.936	15.7811	16:1 w11c	0.40	ECL deviates -0.001	
2.6098	1551	0.006	0.935	15.8399	Sum In Feature 3	0.86	ECL deviates 0.000	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6210	11044	0.009	0.935	15.8762	Sum In Feature 3	6.10	ECL deviates 0.001	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6364	781	0.008	0.934	15.9256	16:1 w5c	0.43	ECL deviates -0.002	
2.6601	16558	0.009	0.933	16.0020	16:0	9.13	ECL deviates 0.002	Reference -0.009
2.7893	2606	0.012	0.927	16.4146	17:1 iso w10c	1.43	ECL deviates 0.001	
2.8115	3708	0.013	0.927	16.4856	17:1 iso w5c	2.03	ECL deviates 0.003	
2.8373	1284	0.010	0.926	16.5680	17:1 anteiso A	0.70	ECL deviates -0.003	
2.8587	12964	0.009	0.925	16.6363	17:0 iso	7.09	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
2.8888	4367	0.009	0.924	16.7327	17:0 anteiso	2.39	ECL deviates 0.000	Reference -0.012
3.2197	747	0.012	0.916	17.7893	18:1 w9c	0.40	ECL deviates -0.005	
3.2361	396	0.009	0.915	17.8418	Sum In Feature 8	0.21	ECL deviates -0.006	18:1 w7c
3.2856	561	0.008	0.914	17.9999	18:0	0.30	ECL deviates 0.000	Reference -0.013
3.6360	542	0.012	0.911	19.1454	18:1 2OH	0.29	ECL deviates -0.001	
----	3146	---	----	----	Summed Feature 2	1.75	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	----	---	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	12596	---	----	----	Summed Feature 3	6.96	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	396	---	----	----	Summed Feature 8	0.21	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.010 Number Reference Peaks: 13
 Total Response: 176843 Total Named: 176843
 Percent Named: 100.00% Total Amount: 170707

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.581	Bacillus-cereus-GC subgroup B
	0.504	Bacillus-cereus-GC subgroup A

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 8 ID Number: 10730
 Type: Samp Bottle: 7 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 10:22:26 AM
 Sample ID: Bact 6

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6906	370790	0.004	----	6.7060		----	< min rt	
0.6974	9.894E+8	0.017	----	6.7564	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7664	3611	0.013	----	7.2721		----	< min rt	
0.7906	4022	0.011	----	7.4529		----	< min rt	
1.4371	1567	0.008	1.077	11.6185	12:0 iso	0.88	ECL deviates -0.002	Reference -0.007
1.5193	1211	0.009	1.057	12.0018	12:0	0.66	ECL deviates 0.002	Reference -0.004
1.6749	13993	0.008	1.027	12.6232	13:0 iso	7.46	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
1.6977	3052	0.008	1.023	12.7140	13:0 anteiso	1.62	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
1.7699	627	0.014	1.011	13.0021	13:0	0.33	ECL deviates 0.002	Reference -0.005
1.9451	9900	0.008	0.988	13.6274	14:0 iso	5.08	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
2.0500	9908	0.008	0.976	14.0015	14:0	5.02	ECL deviates 0.002	Reference -0.007
2.2384	58515	0.008	0.959	14.6307	15:0 iso	29.16	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
2.2660	13531	0.008	0.957	14.7230	15:0 anteiso	6.73	ECL deviates -0.002	Reference -0.011
2.3249	544	0.009	0.952	14.9194	15:1 w5c	0.27	ECL deviates -0.007	
2.3493	2472	0.009	0.951	15.0008	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.4764	1427	0.009	0.943	15.4101	16:1 w7c alcohol	0.70	ECL deviates -0.004	
2.5057	6547	0.010	0.941	15.5045	Sum In Feature 2	3.20	ECL deviates 0.003	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5456	16648	0.009	0.939	15.6328	16:0 iso	8.12	ECL deviates 0.000	Reference -0.010
2.5913	927	0.008	0.936	15.7800	16:1 w11c	0.45	ECL deviates -0.002	
2.6092	1921	0.006	0.935	15.8374	Sum In Feature 3	0.93	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6210	13795	0.009	0.935	15.8754	Sum In Feature 3	6.70	ECL deviates 0.000	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6363	760	0.008	0.934	15.9247	16:1 w5c	0.37	ECL deviates -0.003	
2.6601	12169	0.009	0.933	16.0012	16:0	5.90	ECL deviates 0.001	Reference -0.009
2.7397	524	0.009	0.929	16.2556	15:0 2OH	0.25	ECL deviates 0.001	
2.7897	2719	0.010	0.927	16.4155	17:1 iso w10c	1.31	ECL deviates 0.001	
2.7968	2162	0.007	0.927	16.4382	Sum In Feature 9	1.04	ECL deviates 0.003	16:0 10-methyl
2.8114	6561	0.013	0.927	16.4847	17:1 iso w5c	3.16	ECL deviates 0.002	
2.8380	2881	0.010	0.926	16.5697	17:1 anteiso A	1.39	ECL deviates -0.001	
2.8589	12145	0.009	0.925	16.6365	17:0 iso	5.84	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
2.8887	4910	0.009	0.924	16.7318	17:0 anteiso	2.36	ECL deviates -0.001	Reference -0.013
2.9355	501	0.009	0.922	16.8815	17:1 w6c	0.24	ECL deviates 0.000	
2.9731	493	0.011	0.921	17.0014	17:0	0.24	ECL deviates 0.001	Reference -0.010
3.2199	494	0.012	0.916	17.7899	18:1 w9c	0.23	ECL deviates -0.004	
3.2369	387	0.008	0.915	17.8441	Sum In Feature 8	0.18	ECL deviates -0.003	18:1 w7c
3.2857	391	0.009	0.914	18.0001	18:0	0.19	ECL deviates 0.000	Reference -0.012
3.9012	767	0.010	----	20.0304		----		
----	6547	----	----	----	Summed Feature 2	3.20	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	----	----	----	----		----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	15716	----	----	----	Summed Feature 3	7.63	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	387	----	----	----	Summed Feature 8	0.18	18:1 w7c	18:1 w6c
----	2162	----	----	----	Summed Feature 9	1.04	16:0 10-methyl	17:1 iso w9c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.009 Number Reference Peaks: 15
 Total Response: 201977 Total Named: 201210
 Percent Named: 99.62% Total Amount: 194867

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.645	Bacillus-cereus-GC subgroup B
	0.555	Bacillus-cereus-GC subgroup A
	0.485	Bacillus-thuringiensis-kurstakii

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 9 ID Number: 10731
 Type: Samp Bottle: 8 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 10:30:59 AM
 Sample ID: Bact 7

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6965	9.686E+8	0.013	----	6.7458	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7665	5927	0.011	----	7.2689		----	< min rt	
0.7906	3676	0.011	----	7.4494		----	< min rt	
1.4376	838	0.008	1.077	11.6187	12:0 iso	0.48	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
1.5198	908	0.008	1.057	12.0020	12:0	0.51	ECL deviates 0.002	Reference -0.002
1.6754	16182	0.008	1.027	12.6234	13:0 iso	8.78	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
1.6982	1199	0.008	1.023	12.7145	13:0 anteiso	0.65	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
1.9456	7112	0.008	0.988	13.6280	14:0 iso	3.71	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
2.0266	430	0.008	0.979	13.9170	14:1 w5c	0.22	ECL deviates 0.001	
2.0502	9056	0.008	0.976	14.0011	14:0	4.67	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
2.1996	657	0.009	0.962	14.5001	Sum In Feature 1	0.33	ECL deviates -0.003	13:0 3OH/15:1 iso H
2.2388	62965	0.008	0.959	14.6312	15:0 iso	31.91	ECL deviates -0.001	Reference -0.009
2.2665	6654	0.009	0.957	14.7237	15:0 anteiso	3.36	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
2.3497	1366	0.009	0.951	15.0012	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.4771	885	0.009	0.943	15.4118	16:1 w7c alcohol	0.44	ECL deviates -0.002	
2.5056	4648	0.011	0.941	15.5034	Sum In Feature 2	2.31	ECL deviates 0.002	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5460	12209	0.009	0.939	15.6334	16:0 iso	6.05	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.5915	450	0.008	0.936	15.7799	16:1 w11c	0.22	ECL deviates -0.002	
2.6095	4833	0.008	0.935	15.8379	Sum In Feature 3	2.39	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6213	10880	0.009	0.935	15.8760	Sum In Feature 3	5.37	ECL deviates 0.001	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6365	2017	0.008	0.934	15.9248	16:1 w5c	1.00	ECL deviates -0.003	
2.6600	11698	0.009	0.933	16.0005	16:0	5.77	ECL deviates 0.001	Reference -0.010
2.7397	682	0.009	0.929	16.2555	15:0 2OH	0.34	ECL deviates 0.000	
2.7971	8252	0.013	0.927	16.4388	Sum In Feature 9	4.04	ECL deviates 0.004	16:0 10-methyl
2.8117	5930	0.009	0.927	16.4856	17:1 iso w5c	2.90	ECL deviates 0.003	
2.8185	4307	0.007	0.926	16.5074	Sum In Feature 4	2.11	ECL deviates -0.005	17:1 anteiso B/iso I
2.8378	1431	0.010	0.926	16.5690	17:1 anteiso A	0.70	ECL deviates -0.002	
2.8589	17476	0.009	0.925	16.6364	17:0 iso	8.54	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
2.8890	2870	0.010	0.924	16.7326	17:0 anteiso	1.40	ECL deviates 0.000	Reference -0.012
2.9354	731	0.011	0.922	16.8809	17:1 w6c	0.36	ECL deviates 0.000	
3.1261	590	0.009	0.917	17.4905	18:1 iso H	0.29	ECL deviates 0.001	
3.2198	715	0.011	0.916	17.7898	18:1 w9c	0.35	ECL deviates -0.004	
3.2362	837	0.010	0.915	17.8423	Sum In Feature 8	0.40	ECL deviates -0.005	18:1 w7c
3.2656	356	0.009	0.915	17.9363	18:1 w5c	0.17	ECL deviates -0.001	
3.2858	483	0.009	0.914	18.0005	18:0	0.23	ECL deviates 0.001	Reference -0.012
----	657	---	----	----	Summed Feature 1	0.33	15:1 iso H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 iso H
----	4648	---	----	----	Summed Feature 2	2.31	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	-----	---	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	15714	---	----	----	Summed Feature 3	7.76	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	4307	---	----	----	Summed Feature 4	2.11	17:1 iso I/anteiso B	17:1 anteiso B/iso I
----	837	---	----	----	Summed Feature 8	0.40	18:1 w7c	18:1 w6c
----	8252	---	----	----	Summed Feature 9	4.04	16:0 10-methyl	17:1 iso w9c

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 198283
 Percent Named: 100.00%

Reference ECL Shift: 0.008
 Total Named: 198283
 Total Amount: 190592

Number Reference Peaks: 13

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.547	Bacillus-cereus-GC subgroup A
	0.418	Bacillus-thuringiensis-kurstakii
	0.403	Bacillus-thuringiensis-israelensis

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 10 ID Number: 10732
 Type: Samp Bottle: 9 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 10:39:23 AM
 Sample ID: Bact 8

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.3867	455	0.010	----	4.4415		----	< min rt	
0.4112	1023	0.021	----	4.6244		----	< min rt	
0.4269	411	0.008	----	4.7420		----	< min rt	
0.4451	730	0.013	----	4.8776		----	< min rt	
0.4589	710	0.013	----	4.9811		----	< min rt	
0.4864	1217	0.021	----	5.1859		----	< min rt	
0.5094	352	0.007	----	5.3582		----	< min rt	
0.5279	899	0.016	----	5.4958		----	< min rt	
0.5397	547	0.009	----	5.5840		----	< min rt	
0.5560	863	0.015	----	5.7062		----	< min rt	
0.5732	477	0.008	----	5.8342		----	< min rt	
0.5893	1244	0.026	----	5.9547		----	< min rt	
0.6169	380	0.006	----	6.1604		----	< min rt	
0.6296	630	0.010	----	6.2555		----	< min rt	
0.6452	1168	0.016	----	6.3716		----	< min rt	
0.6965	9.476E+8	0.013	----	6.7553	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7648	1631	0.010	----	7.2654		----	< min rt	
0.7896	3418	0.011	----	7.4503		----	< min rt	
1.4366	1873	0.008	1.077	11.6184	12:0 iso	1.04	ECL deviates -0.003	Reference -0.010
1.5186	1045	0.008	1.057	12.0006	12:0	0.57	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
1.6746	16791	0.008	1.027	12.6239	13:0 iso	8.93	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
1.6974	1955	0.008	1.023	12.7148	13:0 anteiso	1.04	ECL deviates 0.001	Reference -0.008
1.7695	324	0.008	1.011	13.0022	13:0	0.17	ECL deviates 0.002	Reference -0.006
1.9450	12845	0.008	0.988	13.6284	14:0 iso	6.58	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.0494	9277	0.008	0.976	14.0006	14:0	4.69	ECL deviates 0.001	Reference -0.009
2.1222	317	0.007	----	14.2438		----		
2.2382	56642	0.008	0.959	14.6307	15:0 iso	28.15	ECL deviates -0.001	Reference -0.011
2.2659	9335	0.008	0.957	14.7232	15:0 anteiso	4.63	ECL deviates -0.002	Reference -0.012
2.3247	556	0.010	0.952	14.9194	15:1 w5c	0.27	ECL deviates -0.007	
2.3492	2646	0.009	0.951	15.0009	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.4764	1007	0.009	0.943	15.4106	16:1 w7c alcohol	0.49	ECL deviates -0.003	
2.5054	4218	0.009	0.941	15.5037	Sum In Feature 2	2.06	ECL deviates 0.003	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5457	20081	0.009	0.939	15.6334	16:0 iso	9.77	ECL deviates 0.000	Reference -0.010
2.5912	589	0.008	0.936	15.7797	16:1 w11c	0.29	ECL deviates -0.002	
2.6210	12995	0.009	0.935	15.8754	Sum In Feature 3	6.29	ECL deviates 0.000	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6597	21243	0.009	0.933	16.0001	16:0	10.27	ECL deviates 0.000	Reference -0.010
2.7884	1882	0.010	0.927	16.4110	17:1 iso w10c	0.90	ECL deviates -0.003	
2.8113	3562	0.009	0.927	16.4841	17:1 iso w5c	1.71	ECL deviates 0.001	
2.8380	1090	0.009	0.926	16.5693	17:1 anteiso A	0.52	ECL deviates -0.002	
2.8585	17322	0.009	0.925	16.6350	17:0 iso	8.30	ECL deviates -0.002	Reference -0.013
2.8888	3833	0.009	0.924	16.7316	17:0 anteiso	1.84	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
2.9733	663	0.009	0.921	17.0015	17:0	0.32	ECL deviates 0.002	Reference -0.009
3.1729	414	0.011	0.917	17.6386	18:0 iso	0.20	ECL deviates 0.003	Reference -0.009
3.2202	658	0.011	0.916	17.7895	18:1 w9c	0.31	ECL deviates -0.004	
3.2857	980	0.010	0.914	17.9989	18:0	0.46	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
3.4496	583	0.012	----	18.5332		----		
3.6363	405	0.011	0.911	19.1449	18:1 2OH	0.19	ECL deviates -0.001	
----	4218	----	----	----	Summed Feature 2	2.06	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	----	----	----	----	----	----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	12995	----	----	----	Summed Feature 3	6.29	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 202484
 Percent Named: 99.56%

Reference ECL Shift: 0.010
 Total Named: 201584
 Total Amount: 195519

Number Reference Peaks: 16

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.651	Bacillus-cereus-GC subgroup B
	0.460	Bacillus-cereus-GC subgroup A

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 11 ID Number: 10733
 Type: Samp Bottle: 10 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 10:47:55 AM
 Sample ID: Bact 9

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.5170	433	0.010	----	5.4133		----	< min rt	
0.5339	612	0.013	----	5.5394		----	< min rt	
0.5552	942	0.019	----	5.6988		----	< min rt	
0.5809	586	0.011	----	5.8906		----	< min rt	
0.6072	966	0.017	----	6.0870		----	< min rt	
0.6304	874	0.014	----	6.2598		----	< min rt	
0.6444	597	0.009	----	6.3648		----	< min rt	
0.6556	886	0.013	----	6.4485		----	< min rt	
0.6965	9.348E+8	0.013	----	6.7540	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7899	3505	0.011	----	7.4515		----	< min rt	
1.4367	1833	0.008	1.077	11.6187	12:0 iso	1.25	ECL deviates -0.002	Reference -0.009
1.5189	1056	0.010	1.057	12.0020	12:0	0.71	ECL deviates 0.002	Reference -0.006
1.6746	17440	0.008	1.027	12.6238	13:0 iso	11.32	ECL deviates 0.001	Reference -0.008
1.6973	3337	0.008	1.023	12.7146	13:0 anteiso	2.16	ECL deviates 0.001	Reference -0.008
1.9446	8337	0.008	0.988	13.6275	14:0 iso	5.21	ECL deviates 0.000	Reference -0.010
2.0494	7182	0.008	0.976	14.0009	14:0	4.43	ECL deviates 0.001	Reference -0.009
2.2379	41682	0.008	0.959	14.6303	15:0 iso	25.28	ECL deviates -0.002	Reference -0.012
2.2658	10493	0.008	0.957	14.7233	15:0 anteiso	6.35	ECL deviates -0.002	Reference -0.012
2.3490	700	0.008	0.951	15.0011	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.4763	1522	0.009	0.943	15.4110	16:1 w7c alcohol	0.91	ECL deviates -0.003	
2.5056	1626	0.009	0.941	15.5050	Sum In Feature 2	0.97	ECL deviates 0.004	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5458	12450	0.009	0.939	15.6345	16:0 iso	7.39	ECL deviates 0.002	Reference -0.010
2.5911	3329	0.009	0.936	15.7801	16:1 w11c	1.97	ECL deviates -0.002	
2.6207	9998	0.009	0.935	15.8752	Sum In Feature 3	5.91	ECL deviates 0.000	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6600	17820	0.009	0.933	16.0017	16:0	10.51	ECL deviates 0.002	Reference -0.010
2.7882	3292	0.009	0.927	16.4112	17:1 iso w10c	1.93	ECL deviates -0.003	
2.8114	2036	0.010	0.927	16.4854	17:1 iso w5c	1.19	ECL deviates 0.002	
2.8374	838	0.009	0.926	16.5685	17:1 anteiso A	0.49	ECL deviates -0.002	
2.8586	13529	0.009	0.925	16.6361	17:0 iso	7.91	ECL deviates -0.001	Reference -0.013
2.8887	4405	0.009	0.924	16.7322	17:0 anteiso	2.57	ECL deviates -0.001	Reference -0.013
2.9547	482	0.010	----	16.9429		----		
3.2086	468	0.007	0.916	17.7537	Sum In Feature 5	0.27	ECL deviates -0.002	18:2 w6,9c/18:0 ante
3.2202	1364	0.012	0.916	17.7906	18:1 w9c	0.79	ECL deviates -0.003	
3.2859	839	0.009	0.914	18.0003	18:0	0.49	ECL deviates 0.000	Reference -0.012
----	1626	---	----	----	Summed Feature 2	0.97	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	-----	---	----	----		----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	9998	---	----	----	Summed Feature 3	5.91	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	468	---	----	----	Summed Feature 5	0.27	18:0 ante/18:2 w6,9c	18:2 w6,9c/18:0 ante

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.010 Number Reference Peaks: 13
 Total Response: 165360 Total Named: 164877
 Percent Named: 99.71% Total Amount: 158841

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.664	Bacillus-cereus-GC subgroup B
	0.455	Bacillus-cereus-GC subgroup A

Volume: DATA File: E15C103.91A Samp Ctr: 12 ID Number: 10734
 Type: Samp Bottle: 11 Method: RTSBA6
 Created: 12/10/2015 10:56:27 AM
 Sample ID: Bact 10

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.5673	812	0.019	----	5.7822		----	< min rt	
0.5806	378	0.009	----	5.8813		----	< min rt	
0.5888	645	0.015	----	5.9425		----	< min rt	
0.6086	426	0.010	----	6.0907		----	< min rt	
0.6299	430	0.009	----	6.2496		----	< min rt	
0.6964	9.594E+8	0.012	----	6.7464	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.7644	1801	0.011	----	7.2551		----	< min rt	
0.7899	3577	0.011	----	7.4456		----	< min rt	
1.4374	1635	0.008	1.077	11.6184	12:0 iso	1.17	ECL deviates -0.003	Reference -0.006
1.5194	992	0.010	1.057	12.0011	12:0	0.70	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
1.6752	13138	0.008	1.027	12.6231	13:0 iso	8.96	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
1.6981	1822	0.008	1.023	12.7146	13:0 anteiso	1.24	ECL deviates 0.001	Reference -0.005
1.7705	533	0.009	1.011	13.0035	13:0	0.36	ECL deviates 0.003	Reference -0.002
1.9454	9667	0.008	0.988	13.6274	14:0 iso	6.34	ECL deviates -0.001	Reference -0.007
2.0501	8275	0.008	0.976	14.0007	14:0	5.36	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
2.2384	46247	0.008	0.959	14.6295	15:0 iso	29.44	ECL deviates -0.003	Reference -0.010
2.2666	7485	0.009	0.957	14.7236	15:0 anteiso	4.75	ECL deviates -0.001	Reference -0.010
2.3254	413	0.008	0.952	14.9201	15:1 w5c	0.26	ECL deviates -0.006	
2.3496	3086	0.009	0.951	15.0009	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.4769	1520	0.009	0.943	15.4109	16:1 w7c alcohol	0.95	ECL deviates -0.003	
2.5058	2488	0.009	0.941	15.5038	Sum In Feature 2	1.55	ECL deviates 0.003	16:1 iso I/14:0 3OH
2.5460	14447	0.009	0.939	15.6332	16:0 iso	9.00	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.5916	870	0.008	0.936	15.7801	16:1 w11c	0.54	ECL deviates -0.002	
2.6213	8171	0.009	0.935	15.8756	Sum In Feature 3	5.07	ECL deviates 0.001	16:1 w6c/16:1 w7c
2.6601	13586	0.009	0.933	16.0004	16:0	8.41	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
2.7886	2985	0.009	0.927	16.4113	17:1 iso w10c	1.84	ECL deviates -0.003	
2.8116	2383	0.010	0.927	16.4849	17:1 iso w5c	1.47	ECL deviates 0.002	
2.8384	777	0.009	0.926	16.5705	17:1 anteiso A	0.48	ECL deviates 0.000	
2.8590	14344	0.009	0.925	16.6363	17:0 iso	8.81	ECL deviates -0.001	Reference -0.011
2.8890	2998	0.009	0.924	16.7323	17:0 anteiso	1.84	ECL deviates -0.001	Reference -0.012
2.9734	595	0.009	0.921	17.0022	17:0	0.36	ECL deviates 0.002	Reference -0.009
3.2202	755	0.012	0.916	17.7910	18:1 w9c	0.46	ECL deviates -0.003	
3.2855	551	0.010	0.914	17.9997	18:0	0.33	ECL deviates 0.000	Reference -0.013
3.4502	569	0.012	----	18.5373		----		
3.6363	511	0.009	0.911	19.1479	18:1 2OH	0.31	ECL deviates 0.002	
----	2488	---	----	----	Summed Feature 2	1.55	12:0 aldehyde ?	unknown 10.9525
----	----	---	----	----		----	16:1 iso I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 iso I
----	8171	---	----	----	Summed Feature 3	5.07	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.009 Number Reference Peaks: 15
 Total Response: 157759 Total Named: 157190
 Percent Named: 99.64% Total Amount: 153597

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.604	Bacillus-cereus-GC subgroup B
	0.515	Bacillus-cereus-GC subgroup A

Full Length Research Paper

Morphological, physiological and biochemical characterizations of some soil isolates of *Bacillus cereus* group from Algeria

Waffa Bouali^{1,3*}, Fadila Malek², Fikrettin Sahin⁴ and Djamel Eddine Abdelouahid¹

¹Laboratory of Food, Biomedical and Environmental Microbiology, Aboubakr Belkaid University, Tlemcen, 13000 - Algeria.

²Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, Tlemcen University, P. O. Box 119, 08000 - Algeria.

³Naama University, Algeria.

⁴Department of Genetic and Bioengineering, Faculty of Engineering and Architecture, Yeditepe University, Kayisdagi, 34755 Istanbul, Turkey.

Received 14 April, 2016; Accepted 21 July, 2016

Bacillus cereus is a group of bacteria frequently found in soil, widely distributed in the environment. They are a group of ubiquitously facultative anaerobic spore-forming Gram-positive rods and are of health and economic benefits. The present study was conducted to identify, characterize about 36 *B. cereus* and examined for their potential plant growth promoting (PGP), which was tested *in vitro*. Parameters assessed were indole acetic acid (IAA) production, phosphate solubilization, starch hydrolysis, proteolytic activity and biofilm formation. Multiple *B. cereus* were isolated from several soil plots from South-Western region of Algeria and characterized by using phenotypic methods including fatty acid methyl ester. Ten bacterial isolates were examined in this study. Fatty acid profiles showed that bacterial isolates were classified into *B. cereus* group, three isolates were *B. cereus* Subgroup "A" and seven isolates were *B. cereus* Subgroup "B". Temperature effect on the maximal specific growth rate was studied in *B. cereus* between 10 and 50°C, no growth was observed in 10°C, all *B. cereus* isolates grown from 15 to 45°C and no growth observed in 20 to 50°C. This study demonstrates adaptation of isolates of the *B. cereus* group to different habitats. The ability to solubilize precipitated phosphate was positively exhibited by three isolates, five isolates showed ability to produce IAA. All the isolated bacterial isolates had amyolytic and proteolytic activity. All isolates did not form a biofilm in the microtiter plate assays, while all *B. cereus* in our study formed biofilm in tubes at air-liquid interfaces.

Key words: *Bacillus cereus*, soil, identification, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), phosphate solubilization, biofilm

INTRODUCTION

In soil, microbes are especially active in the rhizosphere, which can contain more than a million microorganisms

per gram of soil. Microbial community structures are variable and depend on factors such as temperature, pH,

or geographic location, but are able to tolerate environmental change. Microorganisms found in this environment use energy substrates released by roots such as and necessary to their metabolism: sugars, amino acids, organic acids, hormones. Some of these microorganisms, mainly bacteria, are able to effectively colonize the root systems and stimulating plant growth and / or protecting against infections by plant pathogens. These rhizosphere bacteria are sometimes called Plant Growth-Promoting rhizobacteria (PGPR) (Kloepper et al., 1986).

The beneficial effects of rhizobacteria on plant growth are the result of either direct or indirect mechanisms by PGPR. Indirect mechanisms occur outside of the plant, while direct mechanisms are those that occur inside of the plant and directly affect their metabolism. These mechanisms can function simultaneously or sequentially at different stages of plant growth. Many strains of PGPR can affect plant growth directly by solubilizing phosphates, nitrogen fixation and mineral nutrients, making these foods available for the plant, by producing phytohormones such as indole-3-acetic acid (IAA), and repressing of soil pathogenic microorganisms (production of hydrogen cyanide, siderophores, antibiotics, and / or competition for nutrients). In addition, PGPR can contribute to the improvement of plant resistance to biotic and abiotic stress such as salinity, drought and heavy metal toxicity (Canbolat et al., 2006).

Bacillus cereus sensu lato (s.l.) are Gram-positive endospore forming bacteria that are abundant in different ecological environments. The growth temperature range varies from 5 to 50°C (Guinebretiere et al., 2008).

This group of bacteria includes seven species that are genetically very similar. *B. cereus sensu stricto (B. cereus s.s.)* which is associated with food borne illness but is also involved in some cases of local super infections (Logan, 2012). *Bacillus thuringiensis* is an entomopathogen used with success in agriculture as a biocontrol agent against insects (De Maagd et al., 2001). *Bacillus anthracis* is the agent of anthrax (Mock and Fouet, 2001). This group (*B. cereus sensu lato (s.l.)*) also species (Lechner et al., 1998). *Bacillus cytotoxicus* characterized by its high toxicity and its particular thermotolerance (Guinebretière et al., 2013), and *Bacillus mycoides* and *Bacillus pseudomycoides* species that are characterized by the formation of rhizoids colonies (Nakamura, 1998).

This study was aimed to characterized thirty six isolates of *B. cereus* from soil for a better appreciation for their potential plant growth promoting (PGP), that is, IAA production, phosphate solubilizer, starch hydrolysis,

proteolytic activity and biofilm formation.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of strains

Samples were isolated from several soil plots in the Naama region (South-Western region of Algeria) (Figure 1) over ten months (March till December 2014), from four different areas (about 100 m² each). 1 g of each sample of soil was added to a tube containing 9 mL of sterile distilled water. Serial dilutions were heated at 80°C for 10 min to eliminate vegetative cells and to select for spores. Each dilution (0.1 ml) was spread on Luria-Bertani (LB) agar plates. A total of thirty-six isolates of *B. cereus* group, were isolated according to the International Organization for Standardization (ISO, 1993).

Morphological, physiological and biochemical characterizations of isolates

It is possible to differentiate *B. cereus* from other *Bacillus* species because they share similar morphology mobility, hemolytic activity, inability to utilize mannitol, and the production of an extremely active lecithinase, on Mossel culture media (MYP agar) *B. cereus* forming rough and dry colonies with a violet pink background surrounded by egg yolk precipitation. Hemolytic activity is tested using on Columbia blood agar incubated at 30°C for 24 h and is manifested by a characteristic lysis area near the bacterium (Fricker et al., 2008). To characterize the effect of temperature on the growth of *Bacillus cereus* group, isolates, were incubated on LB plates at 10, 15, 20, 30, 37, 45 and 50°C for 72 h. For long term conservation, obtained isolates were stored in Eppendorf tubes containing LB with 20% glycerol at -20°C (Guinebretiere et al., 2008). Other biochemical characterizations of isolates are tested using the API 20E.

Extraction and analysis of fatty acid methyl ester (FAME) profiles

We used gas chromatography (HP6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) to separate FAME. We identified FAME profiles of each bacterial strain by comparing the commercial databases (TSBA 6) with the MIS software package (Sherlock 6.0 MIDI, Inc., Newark, DE, 2005).

Each samples is processed in a single test tube; a summary of the processing activities associated with each step includes:

- Harvest bacteria from third quadrant.
- Saponification: Combine water and methanol. Add NaOH pellets to the solution while stirring and stir until the pellets dissolve.
- Methylation: add acid to methanol while stirring.
- Extraction: add the methyl tert- butyl ether (MTBE) to the hexane and stir well.
- Wash: add NaOH pellets to the water while stirring and stir the pellets are dissolved.

*Corresponding author. E-mail: wafaa_bio@yahoo.fr.

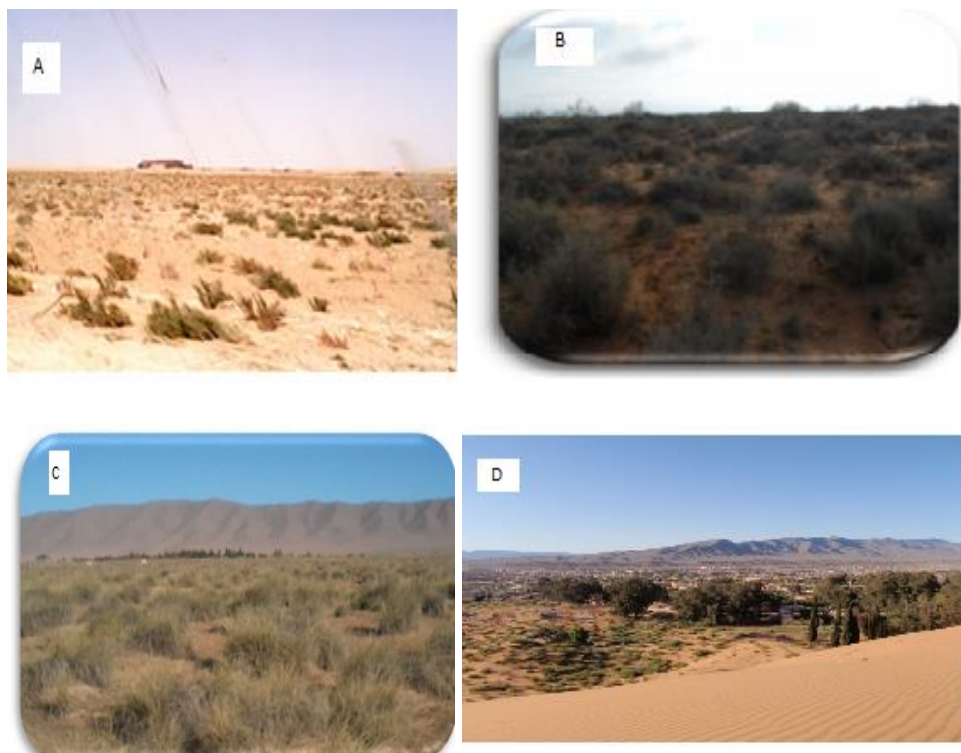


Figure 1. Locations of soil sampling (A) Abdelmoula (B) Mekmen Ben Amar (C) Mechria (D) Ain Sefra.

Plant growth promotion activities for isolates

Production of Indole acetic acid

40 µg/ml of L-tryptophan was added to LB medium to assure growth of our isolates. They were incubated at 30°C for 48 h. Cultures of bacteria were centrifuged for 15 min at 10000 rpm, and 1 ml of culture filtrate was mixed with 1 ml of Salkowski's reagent and the mixture incubated at room temperature for 30 min. A pink color was indicative to indole acetic acid production (Gordon and Weber, 1951).

Phosphate solubilization

Prepared GYA according to Beneduzi et al. (2008): 10 µL aliquot of each culture was plate on GYA and incubated at 28°C for 7 days, presence of clear halos around their colonies indicate that isolate can solubilize phosphate.

Starch hydrolysis

This test was performed by cultivating the isolates on a nutrient agar containing 1% starch. After incubation at 30° for 48 h, cultures bacteria were covered with Lugol's solution. Hydrolysis of starch is well demonstrated by the appearance of a clear zone around the colony when placed against a negative result revealing a brown color around culture (Gupta et al., 2004).

Proteolytic activity: Search for caseinase

The hydrolysis of casein was studied on an agar medium containing 5% skim milk. After incubation at 30°C for 48 h, a clear halo around the streak indicated the hydrolysis of casein by against a negative result showed no hydrolysis zone around culture (Marchand et al., 2009).

Formation of biofilm in microtiter plate

Polystyrene microtiter plates were filled with 200 µl cultures grown in LB and inoculated. The plates were incubated at 30°C. After 24 h, we washed wells three times with 200 µl of phosphate buffered saline, and stained with 0.1% (wt/vol) crystal violet for 30 min to color biofilm. The cultures were destained twice with 200 µl sterile deionized water. The remaining crystal violet was dissolved in 200 µl 96% ethanol, and we measured at 595 nm the absorbance (Djordjevic et al., 2002).

Biofilm formation in tube

A loopful of isolates was inoculated in 10 mL LB medium in test tubes at 30°C for 24 h. After incubation, tubes were decanted and washed with phosphate buffer saline and dried. Tubes were then colored with crystal violet (0.1%). Excess isolate was washed with deionized water. Tubes were dried in inverted position. Isolates which showed a visible film lined the wall of the tube were considered as positive biofilm formation (Christensen et al., 1982).

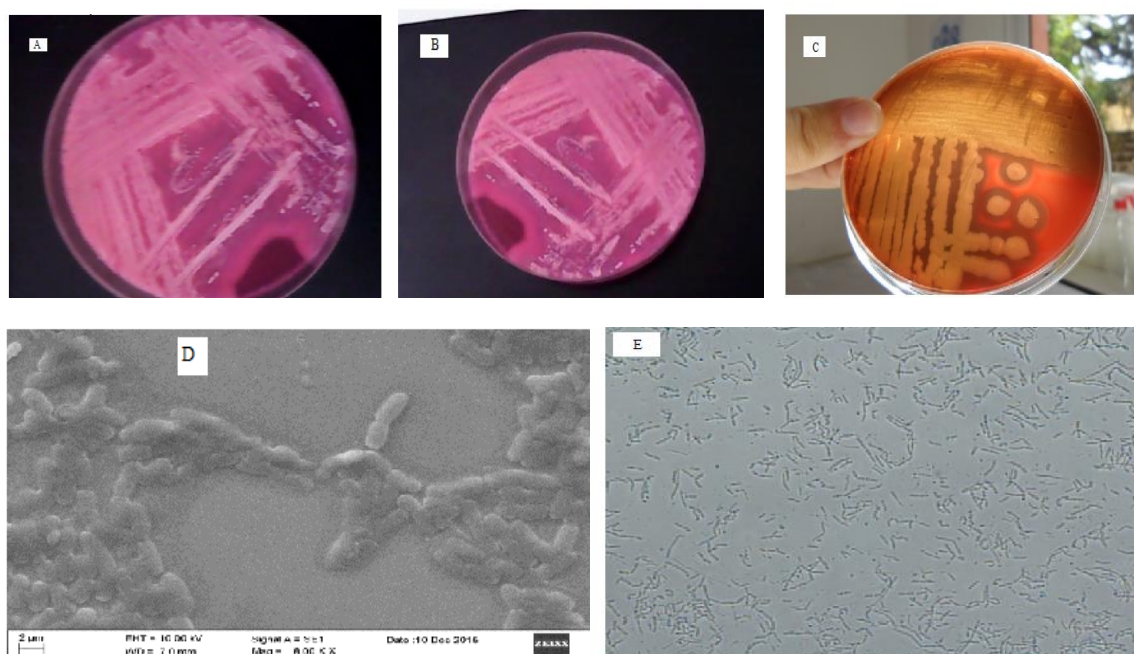


Figure 2. Morphological characteristics of two isolates A: *B. cereus* (Bact 2) in MYP; B: *B. cereus* (Bact 3) in MYP; C: hemolytic activity by *B. cereus* (Bact 2); D: Scanning Electron Microscopy (SEM) picture of *B. cereus* (Bact 2) E: phase contrast microscopy picture of *B. cereus* (Bact 3).

Hydrophobicity

The hydrophobicity of 10 *B. cereus* isolates was determined according to the microbial adhesion to solvents (MATS) (Bellon-Fontaine et al., 1996). Hydrophobicity is expressed as percentage of adhesion to hexadecane. The prepared suspension was adjusted at 595 nm of 0.6-1 (A_0). Samples of each suspension (2 ml) were added to 400 μ L of hexadecane mixed on a vortex mixer for 10 S for 15 min. the absorbance of the aqueous phase was measured at 595 nm (A_1). The percentage of hydrophobicity (%h) was determined from the absorbance of the initial bacterial cell, or spore suspensions (A_0) and the absorbance of the aqueous phase after mixing with hexadecane (A_1) using the following equation: $\%h = [(A_0 - A_1) \times 100] / A_0$. Spores are very hydrophilic ($\%h < 20\%$), hydrophilic ($20 > \%h < 40\%$), moderately hydrophobic ($40 > \%h < 60\%$) and highly hydrophobic ($\%h > 60\%$).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and characterization of bacterial strains

We obtained thirty six *B. cereus* group isolates from various localities in Naama south-western Algeria. All isolates showed typical colony morphology with a zone of precipitation. All of the isolates were Gram positive, rod shaped, endospore forming, catalase positive, lecithinase positive and hemolytic (Figure 2). All isolates were able to grow in the range of temperature tested 15 to 45°C (Table 1). To clarify the existing diversity of *B. cereus*

group and its special ability to adapt to widely diverse habitats, Guinebrière et al. (2008) showed that the genetic structure of *B. cereus* group belong the same phylogenetic group, describe more that found. All isolates of this study affiliated to group III. This genetic group includes isolates whose growth temperature is between 15 to 45°C. Temperature is one of the most important environmental factors to which microorganisms tolerate different kinds of environmental changes. In the API 20 E, all isolates were VP, Citrate, ADH, Gelatine positive, except three isolates were ADH negative, however the results given by other tests are always negative (Table 1).

FAME analysis

Ten bacterial isolates were examined in this study (Figure 3). They were classified into *B. cereus* groups. The characterization studies based on FAME analysis showed that total 31 different FAMES were present in 10 bacterial isolates tested in the present study (Table 2). The data of fatty acid analysis showed that three isolates (bact3, bact4, bact7) were *B. cereus* Subgroup A, remaining isolates were *B. cereus* Subgroup B.

According to the results based on fatty acid profiles we can deduce a low diversity among the isolates. The ten samples were isolated from several soil plots, both the origin of the isolates and the pressure exerted by



Figure 3. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis.

Table 1. Biochemical and physiological characteristic of 36 *B. cereus* isolates.

Number of strains	Origin	Positif biotype character	Thermic profile of growth
5	Abdelmoula	Biotype I (VP, Citrate, ADH, Gelatine)	Mesophilic 15 to 45°C
6	Mekmen Ben Amar		
4	Mechria		
18	Ain Sefra		
1	Mechria	Biotype II (VP, Citrate, Gelatine)	
2	Ain Sefra		

environmental conditions in the soil can explain the low diversity identified by our results, it has been reported that temperature is assumed to select some bacterial groups (Von Stetten et al., 1999). Major environmental variables that may influence bacterial-community composition include vegetation type and temperature, plant species variables influence the composition of bacterial communities (Kuske et al., 2002), agricultural growing practice (Buckley and Schmidt 2001), temperature (Ward et al., 1998), nutrient status (Broughton and Gross, 2000), salinity (Nubel et al., 2000), and other environmental variables.

Plant growth promotion activities for isolates

Five isolates of *B. cereus* showed IAA production (Table 3). According to Mirza et al. (2001), IAA by the production of microorganisms may vary between different species and strains of the same species. The culture conditions and substrate stage growth conditions may also cause variations in production. Also, Idris et al. (2007) showed that reduction in IAA concentration in *B. amyloliquefaciens* FZB42 was caused by inactivating of gene responsible for IAA biosynthesis consequently causing in decrease plant growth promotion activity. The level of IAA production was affected also by two genetic

factors, the location of auxin biosynthesis genes in the bacterial genome and the mode of expression.

Among environmental stress factors, acidic pH, osmotic and matrix stress, and carbon limitation modulate the IAA biosynthesis in different bacteria (Spaepen et al., 2007). The ability to produce heat resistant endospores is one of the main features of *Bacillus*, tailoring it to design and marketing, since these microorganisms can be stored for a longer period and may stay longer in the soil (Kokalis-Burelle et al., 2006). The isolation efficient of bacteria depends on some factors of the interaction of plant-soil-climatic conditions (Chagas-Junior et al., 2012). There are few studies related to quantification of IAA by bacteria of the species *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Gomes et al. (2003) demonstrated that both bacteria, *B. thuringiensis* and *B. pumilus*, isolated from the cabbage plant, increased the growth of lettuce in the greenhouse. *B. cereus* is known for its ability to produce gibberellic acid, IAA, zeatin and gibberellins (Karadeniz et al., 2006). In addition, Tilak et al. (2006) confirmed the involvement of *B. cereus* in promoting the growth of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp., while Bullied et al. (2002) found that this promotes the growth of bacteria soybean (*Glycine max*). Three isolates showed capability to solubilize inorganic phosphate (Table 3). *Bacillus* species have been reported for their capacity to increase availability of phosphorus in soil (Bhattacharyya and Jha, 2012) and

Table 2. Fatty acid composition (%w/w) of isolates.

Fatty acids	bact1	Bact2	Bact3	Bact4	Bact5	Bact6	Bact7	Bact8	Bact9	Bact10
12:0 iso	0.97	1.33	0.48	1.04	0.73	0.88	0.48	1.04	1.25	1.17
12:0	0.74	0.80	0.38	0.81	0.56	0.66	0.51	0.57	0.71	0.70
13:0 iso	8.16	7.71	6.57	9.49	7.61	7.46	8.78	8.93	11.32	8.96
13:0 anteiso	0.94	1.45	0.79	1.17	1.42	1.62	0.65	1.04	2.16	1.24
13:0	-	0.31	-	-	-	0.33	-	0.17	-	0.36
14:0 iso	5.99	7.15	4.01	5.10	5.52	5.08	3.71	6.58	5.21	6.34
14:1 w5c	--	-	-	-	-	-	0.22	-	-	-
14:0	5.06	6.21	3.29	5.84	5.50	5.02	4.67	4.69	4.43	5.36
15:0 iso	27.49	24.08	30.99	30.98	29.89	29.16	31.91	28.15	25.28	29.44
15:0 anteiso	4.29	5.14	4.21	4.05	6.85	6.73	3.36	4.63	6.35	4.75
15:1 w5c	-	0.27	-	0.28	-	0.27	-	0.27	-	0.26
15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:1 w7c alcohol	0.44	0.55	0.59	0.44	0.50	0.70	0.44	0.49	0.91	0.95
16:0 iso	9.59	10.72	9.76	7.33	7.89	8.12	6.05	9.77	7.39	9.00
16:1 w11c	0.36	0.34	0.43	0.28	0.40	0.45	0.22	0.29	1.97	0.54
16:1 w5c	-	0.26	-	0.27	0.43	0.37	1.00	-	-	-
16:0	11.01	10.03	8.12	8.30	9.13	5.90	5.77	10.27	10.51	8.41
15:0 2OH	-	-	0.30	-	-	0.25	0.34	-	-	-
17:1 iso w10c	0.94	1.15	1.96	1.29	1.43	1.31	-	0.90	1.93	1.84
17:1 iso w5c	1.67	1.53	2.59	2.32	2.03	3.16	2.90	1.71	1.19	1.47
17:1 anteisoA	0.48	0.54	0.81	0.54	0.70	1.39	0.70	0.52	0.49	0.48
17:0 iso	9.19	7.69	11.71	8.62	7.09	5.84	8.54	8.30	7.91	8.81
17:0 anteiso	1.87	2.12	2.78	1.52	2.39	2.36	1.40	1.84	2.57	1.84
17:1 w6c	-	-	-	-	-	0.24	0.36	-	-	-
17:0	0.40	0.41	0.29	0.27	-	0.24	-	0.32	-	0.36
18:0 iso	0.26	0.37	-	-	-	-	-	0.20	-	-
18:1 iso H	-	--	-	-	-	-	0.29	-	-	-
18:1 w9c	1.62	0.76	1.28	0.31	0.40	0.23	0.35	0.31	0.79	0.46
18:1 w5c	-	--	-	-	-	--	0.17	-	-	-
18:0	0.69	0.43	0.59	0.34	0.30	0.19	0.23	0.46	0.49	0.33
18:1 2OH	-	-	-	0.29	0.29	-	-	0.19	-	0.31

many environmental factors such as pH and soil type can affect highly the phenomena of fixation and precipitation of P in soil. Thus, according to Jones et al. (1991) in alkaline soils it is fixed by calcium, causing a low efficiency of soluble P fertilizers.

From the present study, pH of soil isolates was alkaline (8.5), Hwangbo et al. (2003) reported that the inverse relationship between pH and soluble phosphate. However, P-solubilizing bacteria (PSB) are widely distributed in soil; environmental stress factors can affect establishment and performances of these bacteria (Ahemad and Khan, 2012).

Furthermore, obtained results showed that all *Bacillus cereus* in our study were starch hydrolysis and proteolytic activity (Figure 4A and 4B). There are many reports (Sellami-Kamoun et al., 2008) indicating that *Bacillus sp.* were able to produce a large variety of extracellular

enzymes, such as amylases and proteases are the most significant industrial. It has been confirmed that variation of amylases and proteases not only in type but also in pH and optimum temperature (Gupta et al., 2003).

Role of hydrophobicity of spores in attachment

The hydrophobicity of *B. cereus* spores was determined and expressed a percentage and illustrated in Table 4. Surface hydrophobicity of untreated *B. cereus* spores (ranged between 18.5 and 57%). In this study, it is interesting to note that hydrophobicity of spores varied among the analyzed *B. cereus* soil isolates which displayed either a hydrophilic or moderate hydrophobic character. Three isolates were moderately hydrophobic, adherence to hexadecane range between 43, 37 and

Table 3. IAA production, phosphor solubilization, amyolytic and proteolytic activity and biofilm-forming capacities in tube and microtiter plate of the thirty six *B. cereus* strains from four different sites. (A): Abdelmoula; (B): Mekmen Ben Amar; (C): Mechria; (D): Ain Sefra.

Strains	IAA production ^a	Phosphor Solubilization ^b	Amyolytic activity ^c	Proteolytic activity ^c	Microtiter plate biofilm formation ^d	Biofilm-forming capacities in tube ^d	Sites
Bact1	-	-	+	+	-	+	B
Bact2	+	-	+	+	-	+	D
Bact3	+	+	+	+	-	+	D
Bact4	+	+	+	+	-	+	D
Bact5	-	-	+	+	-	+	A
Bact6	-	-	+	+	-	+	D
Bact7	+	-	+	+	-	+	D
Bact8	-	-	+	+	-	+	B
Bact9	+	+	+	+	-	+	C
Bact10	-	-	+	+	-	+	D
Bact11	-	-	+	+	-	+	D
Bact12	-	-	+	+	-	+	D
Bact13	-	-	+	+	-	+	C
Bact14	-	-	+	+	-	+	C
Bact15	-	-	+	+	-	+	C
Bact16	-	-	+	+	-	+	A
Bact17	-	-	+	+	-	+	A
Bact18	-	-	+	+	-	+	D
Bact19	-	-	+	+	-	+	D
Bact20	-	-	+	+	-	+	D
Bact21	-	-	+	+	-	+	D
Bact22	-	-	+	+	-	+	D
Bact23	-	-	+	+	-	+	C
Bact24	-	-	+	+	-	+	A
Bact25	-	-	+	+	-	+	A
Bact26	-	-	+	+	-	+	B
Bact27	-	-	+	+	-	+	D
Bact28	-	-	+	+	-	+	D
Bact29	-	-	+	+	-	+	D
Bact30	-	-	+	+	-	+	B
Bact31	-	-	+	+	-	+	B
Bact32	-	-	+	+	-	+	D
Bact33	-	-	+	+	-	+	D
Bact34	-	-	+	+	-	+	D
Bact35	-	-	+	+	-	+	B
Bact36	-	-	+	+	-	+	D

(^a): +: able to produce IAA, -: not able to produce IAA; (^b): +: able able to solubilize Phosphor, -: not able to solubilize; (^c): +: amyolytic and proteolytic activity; (^d): +: forms a biofilm, -: does not form a biofilm.

57%. Remaining isolates were hydrophilic character, with hydrophobicity values between 18.5% and 36%.

According to the literature, spores of *B. cereus* groups generally considered hydrophobic. On the other hand, the hydrophilic character of the soil isolates of *B. cereus* could also be related to an adaptation to alkaline pH conditions. This notice is an accordance with those

mentioned by Seale et al. (2008). They stated that hydrophobicity increased at acidic pH while it decreased at alkaline pH (Giotis et al., 2009). Decreased hydrophobicity was observed for the spores of a strain of *B. cereus* alkali-tolerant (Bernardes et al., 2010). These data are confirmed by the results of Hamadi et al. (2004) who found that the hydrophilicity of strains of *S. aureus*

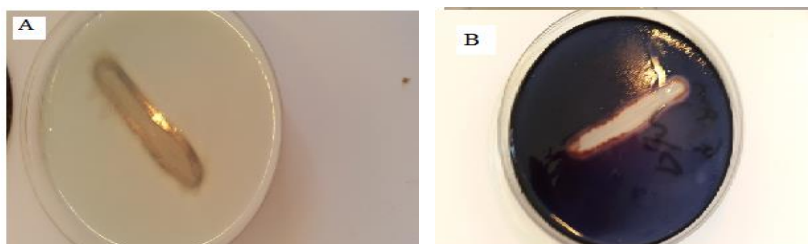


Figure 4. Starch hydrolysis, proteolytic activity by *B. cereus* (Bact2). A: proteolytic activity B: starch hydrolysis.

Table 4. Hydrophobicity percentage of the ten *Bacillus cereus* selected isolates.

Isolates	Hydrophobicity (%)
Bact1	19
Bact2	36
Bact3	44.15
Bact4	18.5
Bact5	26
Bact6	35.13
Bact7	32.55
Bact8	57
Bact9	43.37
Bact10	20



Figure 5. Biofilms formed by *B. cereus* on LB at 30°C for 48 h at air-liquid interfaces. *B. cereus* Bact2 (lane 1), *B. cereus* Bact3 (lane 2).

and *E. coli* is low apparent for neutral to alkaline pH (> 5 to 11) so that the hydrophobicity is more apparent at acidic pH (2-3). In our results, pH of soil isolates was alkaline between (8 to 9) and hydrophobicity associated with very moderate hydrophobicity is an argument for adaptation at pH alkaline conditions.

Biofilm formation

In our study, we use a tube method and microtiter plate assay to test the capacity of thirty six isolates to form biofilms. The tube test showed significantly different results from the results obtained by the standard microtiter-plate test. All isolates did not form a biofilm in the microtiter plate assays, while in the Tube assays, formation of biofilm took place preferentially at the point of the interface between the liquid and air for all *B. cereus* (Figure 5). According (Deighton and Balkau, 1990) the adherence capability of Staphylococci was influenced by many factors include different mechanisms of adherence for plastic and glass surfaces. Number of spores attached to the polystyrene surface was dramatically affected by hydrophobicity. Auger et al. (2006) assured same

observations and reported that *B. cereus* ATCC14579 did not produce biofilm in the microtiter plate.

The dynamic condition had negative effect not only on attachment of *B. cereus* cells to polystyrene surface but also on biofilm development, where all tested isolates were no biofilm producer. According to Carpentier and Cerf (2011), the conditions for growth are not always favorable for the adhesion of bacteria. The choice of material in which these microtiter are produced, also remains imperative to avoid negative interference with the adhesive properties of the tested microorganisms. This illustrates the need for reliable and reproducible techniques to culture and biofilm development. It is recognized that biofilms are formed in response to environmental signals which differ from one species to another. These signal nutrient availability and quorum-sensing involved in the regulation of maturation of the biofilm (Stanley and Lazazzera, 2004). Factors which influence structure and development of biofilm, and the composition of the microbial community include nutrient availability and type of sugar provided (Stoodley et al., 2001). Finally, the results indicate that the bacteria tested in this study may be promising in promoting plant growth.

Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the laboratories of the Veterinary Center of Tlemcen, the LAMAABE of the Biology Department, University of Tlemcen, Algeria and the Head of LASNABIO for their assistance.

REFERENCES

- Ahemad M, Khan MS (2012). Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere* 86:945-950.
- Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss CJ (1996). Microbial adhesion to solvents, a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloid. Surface. B.* 7:47-53.
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP (2008). Evaluation of Genetic Diversity and Plant Growth Promoting Activities of Nitrogen-Fixing Bacilli Isolated from Rice Fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39(3):311-320.
- Bernardes PC, NJ de Andrade, SO Ferreira, JP N de Sá, EA Araújo, DM Z Delatorre, LM Pinheiro Luiz (2010). Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. *Braz. J. Microbiol.* 41:984-992.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1327-1350.
- Buckley D & Schmidt T (2001). The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.* 42:11-21.
- Bullied WJ, TJ Buss and J K Vessey (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies. *Canadian J. Plant Sci.* 82:291-298.
- Canbolat M, Bilen S, Cakmakci R, Fiahin F, Aydin A (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol. Fertil. Soils* 42:50-357.
- Carpentier B, Cerf O (2011). Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145:1-8.
- Chagas-Junior AF, GR Santos, RCL Melo, AG Oliveira, B Vizioli, LF Borges-Chagas and JL Costa (2012). Effect of natural nodulation in the development of leguminous trees on soils of cerrado in Tocantins. *J. Biotechnol. Biodivers.* 3:38-44.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL and Beachey EH (1982). Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37:318-326.
- De Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* 17:193-199.
- Deighton MA, Balkau B (1990). Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 28:2442-2447.
- Djordjevic D, M Wiedmann and LA McLandsborough (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2950-2958.
- Fricke M, R Reissbrodt (2008). Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 121(1):27-34.
- Giotis ES, Blair IS, McDowell DA (2009). Effect of short-term alkaline adaptation on surfaces properties of *Listeria monocytogenes* 10403S. *Open Food Sci. J.* 3:62-65.
- Gomes AMA, RLR Mariano, E B Silveira and JCP Mesquita (2003). Isolamento, selecao de bacterias e efeito de *Bacillus spp.* na producao de mudas organicas de aface. *Hortic. Bras.* 21:701-705.
- Gordon SA, Weber RP (1951). Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiol.* 26(1):192-195.
- Guinebretière MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B (2013). *Bacillus cytotoxicus sp. nov.* is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:31-40.
- Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-schulz M, Svensson B, sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.* 10:851-865.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, and Chauhan B (2003). Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38(11):1599-1616.
- Gupta R, Gupta N and Rath P (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Microbiol. Biotechnol.* 6:763-81.
- Hamadi F, H Latrache, A El Ghmari, M El louali, M Mabrouki, N Kouider (2004). Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annal Microbiol.* 54:213-225.
- Hwangbo H, Park RD, Kim YW, Rim YS, Park KH, Kim TH, Suh JS, Kim KY (2003). 2-Ketogluconic production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. *Curr. Microbiol.* 47:87-92.
- Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007). Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (Iaa) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus Amyloliquefaciens* Fz42. *Mol. Plant Microbe.* 20(6):619-626.
- International Organization for Standardization (1993). 2nd Ed., Geneva, Switzerland, Method ISO. P 793.
- Jones DA, Smith BFL, Wilson MJ, Goodman BA (1991). Solubilizer fungi of phosphate in rise soil. *Mycol Res.* 95:1090-1093.
- Karadeniz A, SF Topcuoglu and S Inan (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:1061-1064.
- Kloepper JW, Scher FM, Laliberte M, Tipping B (1986). Emergence promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: Swinburne, T.R. (Ed.), *Iron, Siderophores and Plant Disease*. Plenum Publishing Co, New York. pp. 155-164.
- Kokalis-Burelle N, Kloepper JW, Reddy MS (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Appl. Soil Ecol.* 31:91-100.
- Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, Dunbar JM, Davis JA, Barns SM & Belnap J (2002). Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1854-1863.
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Pru"b BM, Kaplan T(1998) *Bacillus weihenstephanensis sp. nov.* is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1373-1382.
- Logan NA (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.* 112:417-429.
- Marchand S, Heylen K, MessensW, Coudijzer K, De Vos P, Dewettinck K, Herman L, De Block J, Heyndrickx M (2009). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ. Microbiol.* 11(2):467-482
- Mirza MSW Ahmad, F Latif, J Haurat, R Bally, P Normand and KA Malik (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-romoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil.* 237:47-54.
- Mock M, Fouet A (2001). Anthrax. *Ann. Rev. Microbiol.* 55:647-671.
- Nakamura LK (1998). *Bacillus pseudomycoides sp. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1031-1035.
- Nubel U, Garcia-Pichel F, Clavero E, Muyzer G (2000). Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and

- diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ. Microbiol.* 2:217-226.
- Seale RB, Flint SH, McQuillan AJ, Bremer PJ (2008). Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:731-737.
- Sellami-Kamoun A, Haddar A, El-Hadj Ali N, Ghorbel-Frikha B, Kanoun S, Nasri M. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol. Res.* 163(3):299-306.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007). Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling *FEMS. Microbiol. Rev.* 31:425-448.
- Stanley NR, Lazazzera BA. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52:917-924.
- Stoodley P, Hall-Stoodley L, Lappin-Scott HM (2001). Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Methods Enzymol.* 337:306-319.
- Tilak KVBR, Rauganayaki N, Manoharachari C (2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Eur. J. Soil Sci.* 57:67-71.
- Von Stetten F, Mayr R, Scherer S (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ. Microbiol.* 1(6):503-515.
- Ward DM, Ferris MJ, Nold SC & Bateson MM (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol.* 62(4):1353-1370.

ملخص

Bacillus cereus بكتيريا موجودة على نطاق واسع في الطبيعة ذات طبيعة ترابية، التربة هي الخزان الحقيقي لهذه البكتيريا فهي إيجابية الجرام عبارة عن عصيات هوائية أو لاهوائية اختيارية. في بعض الأحيان. هذه الأنواع المتعايشة في التربة هي أيضا قادرة على التكاثر وإنتاج الأبواغ التي تسمح لها أن تستمر في التربة حيث تتواجد بكثرة من خلال هذه الأطروحة، تم عزل 70 سلالة *Bacillus cereus*، و 45 سلالة *Bacillus cereus* من أربعة تربة الريزوسفير من مناطق الجنوب الغربي الجزائري.

سمحت هذه الدراسة بتحديد النمط الظاهري وذلك بدراسة سلوك هذه البكتيريا، وخاصة فيما يتعلق بدرجة الحرارة، مجال النمو عند جميع السلالات هو 15 إلى 45 درجة مئوية، وأظهر النتائج الأولية تنوع قليل للسلالات المعزولة وهيمنة نمط معين في التربة (I. biotype). وتشير الدراسات الخاصة المستندة إلى تحليل FAME وجود 31 FAME مختلفة في عشرة سلالات بكتيرية منجزة في هذه الدراسة، النتائج تظهر أن هناك ثلاثة أنواع من البكتيريا تنتمي إلى مجموعة *Bacillus cereus* صنف "أ"، والسلالات الأخرى تنتمي إلى مجموعة *Bacillus cereus* صنف "ب"، وتؤكد هذه النتائج على تنوع قليل للسلالات المعزولة وهيمنة في التربة لنوع معين (صنف "ب") الأصل المشترك للسلالات وكذلك الضغط الانتقائي للعوامل البيئية وخاصة درجة الحرارة في التربة قد يفسر التنوع القليل للسلالات. بالإضافة إلى هذه التحاليل قمنا بدراسة على المستوى الجزيئي وذلك باختيار سلالتين استنادا على تحليل FAME النتائج المتحصل عليها من خلال التسلسل ARN16S هي *Bacillus cereus* ATCC 14579 *Bacillus thuringiensis serovar konkukian str.97-27* وترتبط فعالية اللقاح البكتيري على تصنيف أنشطة PGP متعددة مثل إنتاج حامض الأنول (AIA)، انحلالية الفوسفات، تحلل النشا، قدرة نشاط انزيم casrinase، مضادة الفطريات والقدرة على تشكيل البيوفيلم. 100% من السلالات المعزولة لديها القدرة على تحلل النشا والكاثرين. فقط عشرة سلالات لديها القدرة على إنتاج AIA و انحلالية الفوسفات، 91% من *B.cereus* فعالة ضد *Aspergillus flavus MNHN 994294*. كما اثبتت تجارب الالتصاق العضوية والتي اظهرت ان السلالات تنقسم إلى سلالات نافرة للماء (مسعورة) وسلالات محبة للماء، وخاصة الالتصاق كانت مرتفعة في الركيزة الزجاجية أكثر من PVC

الكلمات الرئيسية: *Bacillus cereus*، التربة، تحديد، PGP، بيوفيلم

RESUME

Bacillus cereus est une bactérie largement répandue dans la nature, d'origine tellurique. Le sol est un véritable réservoir de cette bactérie. Celle-ci appartient aux bacilles Gram positif, aérobies ou parfois anaérobies facultatifs. Cette espèce saprophyte du sol est également capable de se multiplier et de produire des spores qui lui permettront de persister dans le sol où elle est extrêmement représentée.

Dans le cadre de cette thèse, un total de 70 souches de *Bacillus spp.* et 45 souches de *Bacillus cereus* sont isolées et sélectionnées à partir de quatre sols rhizosphériques de la région Sud- Ouest Algérien.

Cette étude consiste à une identification via une approche phénotypique basée sur l'étude du comportement de ces bactéries, notamment à l'égard de la température. La gamme de température de croissance de toutes les souches isolées est de 15 à 45°C. L'identification phénotypique préliminaire montre une faible diversité des isolats et la dominance dans le sol d'un type spécifique (biotype I). Les études caractéristiques basées sur l'analyse FAME montrent qu'il ya un total de 31 FAMES différents présents dans les dix souches bactériennes testées dans la présente étude. Les résultats des analyses des Fatty acid methyl ester montrent qu'il ya trois souches bactériennes appartenant au groupe *Bacillus cereus* sous groupe «A», les autres souches appartiennent au groupe *Bacillus cereus* sous groupe «B». Ces résultats confirment la faible diversité des isolats et la dominance dans le sol d'un type spécifique (sous groupe «B»). L'origine commune des isolats associée aussi à la pression de sélection exercée par des conditions environnementales, spécialement la température dans le sol, peuvent expliquer la faible diversité des isolats. De plus, au niveau moléculaire les deux souches sélectionnées par les analyses des FAME retenues et identifiées par séquençage du gène de l'ARNr16S sont *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *Bacillus thuringiensis serovar konkukian str.97-27*

L'efficacité des inocula bactériens est liée à la caractérisation de multiples activités PGP telles que la production de l'acide indole acétique (AIA), de la solubilisation des phosphates, hydrolyse de l'amidon, l'activité protéolytique, de l'activité antifongique ainsi que de la capacité de la formation de bio-film. 100% des souches isolées ont la capacité d'hydrolyser l'amidon et la caséine. Seules dix souches isolées ont la capacité de la production AIA et de la solubilisation de phosphate, 91% des *B.cereus* sont efficaces envers *Aspergillus flavus MNHN 994294*. Les souches avaient un caractère hydrophile et hydrophobe moyen selon leurs affinités respectives aux solvants organiques utilisés, et une adhésion plus importante sur un support en verre par rapport à un support en PVC.

Mots clés: *Bacillus cereus*, sol, identification, PGP, biofilm.

ABSTRACT

Bacillus cereus is a group of bacteria frequently found in soil, widely distributed in the environment. They are a group of ubiquitously facultative anaerobic spore-forming Gram positive rods and are of health and economic benefits. The present study was conducted to identify, characterize about 70 *Bacillus* and 45 *Bacillus cereus* from 4 soil plots from southwestern Algeria. This study consists of an identification via phenotypic approach, temperature effect on the maximal specific growth rate was studied in *Bacillus cereus*, all *B. cereus* isolates grown from 15°C to 45°C, the preliminary phenotypic identification showed a low diversity of isolates and dominance in the soil of a specific type (biotype I). The characterization studies based on FAME analysis showed that total 31 different FAMES were present in 10 bacterial isolates tested in the present study. Fatty acid profiles showed that bacterial isolates were classified into *Bacillus cereus* group, three isolates were *Bacillus cereus* Subgroup A, remaining isolates were *Bacillus cereus* Subgroup B. These results confirm a low diversity among the isolates., both the origin of the isolates and the pressure exerted by environmental conditions in the soil can explain the low diversity identified by our results, it has been reported that temperature is assumed to select some bacterial groups. In addition, at the molecular level, the two strains selected and identified by sequencing the 16S rRNA gene are *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Bacillus thuringiensis serovar konkukian str.97-27*.

The effectiveness of the bacterial inoculum is related to the characterization of multiple PGP activities such as indole acetic acid (IAA) production, phosphate solubilization, starch hydrolysis, proteolytic activity, the antifungal activity as well as biofilm formation. 100% of isolated bacterial strains had amyolytic and proteolytic activity. Only ten strains have the ability to AIA production and solubilization of phosphate, 91% of *B.cereus* are effective against *Aspergillus flavus MNHN 994294*. All strains presented a highly hydrophilic and middle hydrophobic character Based on their respective affinities to organic solvents, and adhesion greater in a glass support. Compared with PVC

Key words: *Bacillus cereus*, soil, identification, PGP, biofilm