

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES.....	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les bactéries bénéfiques pour les plantes.....	1
1.1.1 Les PGPR.....	1
1.1.1.1 Mode d'action des PGPR.....	2
1.1.1.2 PGPR et recherche.....	3
1.1.1.3 PGPR et performance.....	4
1.1.2 Le genre <i>Bacillus</i>	4
1.1.2.1 Morphologie, phénotype et environnement.....	5
1.1.2.2 Génétique.....	6
1.1.2.3 Taxonomie des <i>Bacillus</i>	7
1.1.2.4 Utilisation des <i>Bacillus</i>	8
1.2 Les différentes caractéristiques PGPR d'intérêts	9
1.2.1 Fixation d'azote.....	9
1.2.1.1 Le cycle de l'azote.....	9
1.2.1.2 Génétique de la nitrogénase.....	11
1.2.1.3 Mise en évidence de la fixation d'azote	13
1.2.2 Production d'acide indole-acétique.....	14
1.2.2.1 Mode d'action de l'IAA.....	14
1.2.2.2 Voie de biosynthèse de l'IAA.....	15
1.2.2.3 Génétique de la biosynthèse de l'IAA	17
1.2.2.4 Méthode de détection de l'IAA	18

1.2.3	Solubilisation de phosphate	19
1.2.3.1	Mécanismes et génétique de la solubilisation du phosphate	20
1.2.3.2	Méthode pour tester la solubilisation du phosphate	23
1.2.4	Sidérophore	24
1.2.4.1	Type de sidérophore	25
1.2.4.2	Régulation de la biosynthèse de sidérophore.....	26
1.2.4.3	Méthode pour tester la production de sidérophore	29
1.3	Les plantes utilisées	29
1.3.1	Tomates	29
1.3.2	Poivrons	31
1.4	Objectifs de l'étude.....	32
CHAPITRE II		
MATÉRIEL ET MÉTHODES		34
2.1	Contrôles.....	34
2.2	Isolement de bactéries provenant de différentes rhizosphères	34
2.3	Test de caractérisation PGPR	35
2.3.1	Production d'IAA.....	35
2.3.2	Production de sidérophore.....	35
2.3.3	Solubilisation de phosphate	36
2.3.4	Fixation d'azote.....	37
2.4	Test antifongique	38
2.5	PCR conventionnelle	38
2.6	Test de germination	39
2.7	Test sur différentes plantes avec souches bactériennes sélectionnées.....	39
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		41
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		53
CHAPITRE V		
CONCLUSION.....		63
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Liste des cycles utilisés pour les différentes PCR	39
3.1	Criblage des 34 souches capables de dégrader le mannitol pour différentes caractéristiques PGPR.....	41
3.2	Identification par PCR des souches Sol sélectionnées.....	46
3.3	Longueur moyenne (cm) de la germination des graines de tomates selon le traitement reçu.....	47
3.4	Longueur moyenne (cm) de la germination des graines de tomates selon le traitement reçu.....	48
3.5	Résumé des mesures moyennes prises durant les tests sur les plants de tomates soit pour la hauteur des plants à différents moments et le poids des racines sèches à la fin des traitements	50
3.6	Résumé des mesures prises durant l'expérience avec les poivrons, soit la hauteur (cm) des plants à différent temps et le poids des racines sèches	52

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Cycle de l'azote atmosphérique.....	10
1.2	Molécule d'IAA et son précurseur le tryptophane.....	15
1.3	Différentes voies de biosynthèse de l'IAA à partir de son précurseur	16
1.4	Principales voies pour l'assimilation du fer chez <i>B. subtilis</i> [99]	28
2.1	Configuration des plants de tomates et de poivrons lors des essais de croissance.....	40
3.1	Tests antifongiques pour <i>Fusarium solani</i> avec les cinq souches sélectionnées	42
3.2	PCR <i>nifH</i> chez les cinq souches Sol sélectionnées.....	43
3.3	Tests IAA. A : production d'IAA chez les cinq souches sélectionnées, B : meilleur producteur d'IAA, C moins bon producteur d'IAA.....	44
3.4	Solubilisation du phosphate. A : Réaction positive de la souche Sol 2-8-2, B : Réaction positive de la souche Sol 37-5-1, C : Résultats en bouillon de la solubilisation du phosphate.....	44
3.5	Production de sidérophore après incubation durant 4 jours.....	45
3.6	Croissance moyenne des graines de radis lors des tests de germination	46
3.7	Germination des graines de radis; contrôle : eau distillé, traité: bouillon bactérien.....	47
3.8	Croissance moyenne des graines de tomate lors des tests de germination	47
3.9	Test germination sur graine de tomate; contrôle: eau distillé, traité: bouillon bactérien.....	48
3.10	Mesures des plants de tomates durant l'expérience	49
3.11	Plants de tomates après 4 traitements. De gauche à droite : Contrôle négatif, GB03, Sol 2-8-2 et Sol 4-1D	49
3.12	Poids moyen des racines de plants de tomates après 8 traitements	50

3.13	Mesures des plants de poivrons durant l'expérience.....	51
3.14	Plants de poivrons après 4 traitements. De gauche à droite : Contrôle négatif, GB03, Sol 2-8-2 et Sol 4-1D	51
3.15	Poids moyen des racines séchées de plants de poivrons après 8 traitements.....	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABC	ATP binding cassette
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Azote free medium
ARA	Acétylène réduction assay
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BPP	Phytase β -propeller
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphate de calcium
CAS	Chrome azurol S
CP	Cystéine phosphatase
Da	Dalton
Fe	Fer
$\text{Fe}(\text{OH})_3$	Oxyde de fer
FeCl_3	Chlorure de fer
G+C	Contenu en guanine et cytosine
H_2SO_4	Acide sulfurique
HAP	Histidine phosphatase acide
HClO_4	Acide perchlorique
HDTMA	Hexadecyltrimethylammonium bromide
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IAA	Acide indole-3-acétique

IAM	Indole acétamide
IPyA	Acide indole-pyruvique
K_2HPO_4	Phosphate de potassium dibasique
Kpb	kilo paires de bases
KCl	Chlorure de potassium
KH_2PO_4	Phosphate de potassium monobasique
KOH	Hydroxide de potassium
Mb	Mégabase
MFS	Major facilitator superfamily
Mg-ATP	ATP biologiquement active
$MgCl_2$	Chlorure de magnésium
$MgSO_4$	Sulfate de magnésium
N_2	Azote
Na_2MoO_4	Molybdate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NBRIP	National Botanical Research Institute's phosphate growth medium
NH_3	Ammoniaque
NH_4^+	Ammonium
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfate d'ammonium
NO_3^-	Nitrate
NRPS	Nonribosomal peptide synthetase
PAP	Phosphatase acide mauve
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
PDA	Potato dextrose agar
PGPR	Plant-growth-promoting rhizobacteria

Pi	Phosphate
PIPES	1,4-piperarinediethansulfonic acid
PO ₄	Phosphate
PSB	Bactérie solubilisant le phosphate
R2A	Milieu de culture
RND	Resistance, nodulation and cell division superfamilly
RPM	Rotation par minute
S	Souffre
sRNA	Bacterial Small RNA
TCA	Acide trichlorique
TLC	Chromatographie à couche mince

LISTE DES SYMBOLES

α	Alpha
β	Bêta
μ	Micro
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celcius
g	Gramme
h	Heure
l	Litre
cm	Centimètre
M	Molaire
m	Milli
k	Kilo
Da	Dalton

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les bactéries bénéfiques pour les plantes

Beaucoup de recherche sur les micro-organismes a été effectuée durant le siècle dernier afin de comprendre, de développer et d'utiliser leurs actions bénéfiques tant au niveau médical, industriel qu'agricole. L'agriculture durable a été l'objet de beaucoup de recherche étant donné que l'agriculture traditionnelle engendre des coûts de production de plus en plus élevés, une diminution de la production et même parfois les deux [1]. L'utilisation de pesticides et d'engrais chimiques dans l'agriculture peut être nocive pour l'environnement. Les grandes quantités de fertilisants chimiques utilisées représentent un coût élevé et sont liées à la pollution de l'environnement par son utilisation excessive. Une étude a démontré que l'utilisation d'engrais chimique peut graduellement augmenter l'acidité du sol, ce qui peut limiter la croissance des plantes [2]. C'est pourquoi le besoin de trouver des alternatives respectueuses de l'environnement se fait pressant.

1.1.1 Les PGPR

Plusieurs chercheurs ont identifié des bactéries du sol possédant des propriétés bénéfiques pour les plantes tant pour leur croissance que pour leur santé. Ils ont regroupé ces bactéries sous le nom de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Les PGPR sont retrouvés dans la rhizosphère, à la surface des racines ou encore en association avec les racines dû à la richesse des nutriments disponibles [3].

La rhizosphère peut être définie comme la zone du sol qui entoure les racines. La rhizosphère est une zone riche en nutriments pour les bactéries principalement grâce aux exsudats des racines. Les exsudats racinaires sont composés de sucres solubles, d'acides

organiques, d'acides aminés, mais peuvent aussi contenir des hormones, des vitamines, des composés aminés, des composés phénoliques et d'ester de phosphate de sucre [4].

Plusieurs souches bactériennes ont été identifiées comme étant PGPR, notamment des bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* [5]. Parmi ceux-ci, les bactéries appartenant au genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ssp. sont prédominantes [6].

1.1.1.1 Mode d'action des PGPR

Les PGPR peuvent influencer la croissance des plantes de façon directe ou indirecte. Les mécanismes impliqués directement sont la sécrétion d'hormones (auxines, gibberellines, cytokinines, etc.) ou en facilitant l'absorption de nutriments (fixation d'azote, solubilisation de phosphate ou de potassium et synthèse de sidérophore). Indirectement, les PGPR vont aider la croissance des plantes via la sécrétion d'antibiotiques ou d'enzymes limitant les phytopathogènes [7].

Il est possible de diviser les PGPR en différents groupes selon leur mode d'action soit les biofertilisants, les biopesticides (agent de biocontrôles) et les phytostimulateurs. Un biofertilisant peut être défini comme une substance contenant des micro-organismes vivants ayant la possibilité de coloniser la rhizosphère ou l'intérieur des plantes (endophyte) et de promouvoir la croissance des plantes [8]. Les PGPR peuvent augmenter le niveau de nutriments des plantes de cinq façons : la fixation d'azote, l'augmentation de nutriments, l'induction de l'augmentation des racines, l'augmentation d'autres symbioses bénéfiques et une combinaison de ces modes d'action [8]. Cependant, les biofertilisants ne sont pas composés uniquement de rhizobactéries, mais peuvent aussi contenir des fungi ou encore un mélange des deux (bactérie et fungi).

On peut définir un biopesticide (agent de biocontrôle) comme des micro-organismes qui sont capables de promouvoir la croissance de plantes via la production

d'antibiotiques et de métabolites antifongiques permettant le contrôle des phytopathogènes [9]. Les agents de biocontrôle peuvent utiliser les mécanismes suivants afin d'aider la promotion de croissance des plantes : la production de métabolites antifongiques (antibiotiques, enzyme lysant la paroi cellulaire, production de HCN), l'habilité de compétitionner pour les nutriments, l'induction de la résistance systémique et la production de sidérophore [10]. Par exemple, la production de sidérophore par les PGPR peut être considérée comme un trait biocontrôle et un trait de biofertilisant car les sidérophores font partie du métabolisme primaire étant donné que le fer représente un élément essentiel, mais peuvent être aussi utilisés comme antibiotiques qui sont des métabolites secondaires [11].

Un phytostimulateur est défini comme un micro-organisme capable de produire ou changer la concentration de phytohormones impliquées dans la régulation de la croissance [9]. La production de phytohormones telles que l'IAA, les cytokinines, les gibbérellines ou encore la production d'ACC déaminase (enzyme réduisant les niveaux d'éthylène) sont des traits de phytostimulateur.

1.1.1.2 PGPR et recherche

Certaines bactéries sont reconnues pour une caractéristique PGPR particulière. Par exemple, les *Rhizobium* sont reconnus pour leur capacité à fixer l'azote. Les *Bacillus* et *Pseudomonas fluorescens* sont reconnus pour leur capacité de produire des métabolites secondaires, certaines espèces de *Bacillus* dont *Bacillus megaterium* sont reconnues pour leur capacité de solubiliser le phosphate. Les *Azospirillum* sont reconnus pour leur capacité à fixer l'azote et produire des phytohormones [12].

Une étude a démontré que l'utilisation de PGPR combinée à une quantité moindre de fertilisant chimique était aussi efficace que l'utilisation seule de fertilisant [13]. Un biofertilisant à base de quatre différentes bactéries a été démontré comme efficace pour augmenter la croissance du maïs et de légumes [14]. Une autre étude a démontré que l'inoculation de PGPR permettait la protection de plants de concombre contre trois

phytopathogènes et que le mélange de PGPR comme inoculant permettait d'obtenir une plus grande constance dans la réduction de maladies causées par un mélange de phytopathogènes [15]. Plusieurs études ont ainsi démontré l'efficacité des PGPR à diminuer la quantité d'engrais ou de pesticides chimiques utilisée.

1.1.1.3 PGPR et performance

La performance des PGPR comme bio-fertilisant fait face à différents problèmes. Pour qu'un bio-fertilisant soit performant celui-ci doit être capable de compétitionner avec la flore indigène de la plante, rester stable dans le sol, survivre aux différentes saisons et changements de température. De plus, l'utilisation de bactérie non-sporulante apporte différents problèmes pour la formulation, la stabilité ainsi que l'entreposage du produit.

Beaucoup de PGPR ont été testés pour leur potentiel comme bio-fertilisant pour la plupart des tests ont été effectués dans des conditions contrôlées. Cependant le manque de données sur l'écologie, la survie des PGPR ainsi que la rhizosphère de la plante contribue à l'utilisation peu efficace des PGPR dans les champs [9]. Le manque de constance des PGPR dans les différents types de sol ainsi qu'avec les différents cultivars joue un rôle sur la faible utilisation des PGPR. Jusqu'à présent les bio-fertilisants qui ont démontré le plus de succès commercialement étaient à base de bactéries à gram positif sporulantes [9].

1.1.2 Le genre *Bacillus*

Le genre bactérien *Bacillus* pourrait être intéressant à utiliser comme PGPR. Ce genre bactérien appartient à la famille des *Bacillaceae* de l'ordre des Bacillales dans l'embranchement des Firmicutes.

1.1.2.1 Morphologie, phénotype et environnement

Les *Bacillus* sont des cellules en forme de bâtonnet droit ou légèrement recourbé que l'on retrouve seul ou en pair, parfois en chaîne et occasionnellement en long filament [16]. Les *Bacillus* se distinguent des autres membres des *Bacillaceae* par leur nature aérobique stricte ou facultative [17]. *Bacillus* représente une fraction d'un large consortium taxonomique de bactéries productrice d'endospore. La production d'endospore en condition aérobique représente le caractère définissant les *Bacillus* depuis 1920 [16]. Les endospores sont formées de façon intracellulaire à la fin de la phase exponentielle de croissance et une seule endospore par cellule sera formée et leur position dans la cellule est aussi caractéristique [16]. Les endospores sont extrêmement dormantes métaboliquement et ne possèdent pas d'ATP [16]. Cet état de dormance est la clé qui leur permet de résister à différents stress (chaleur, radiation, produit chimique, etc.) et leur survie sur de longue période [16].

Leur membrane cellulaire est composée de peptidoglycane contenant de l'acide mésodiaminopimélique (m-DAP). Elle contient aussi de large quantité d'un polymère anionique tel que l'acide teichoïque ou l'acide teichurionique lié par des résidus d'acide muranique [17] et cette liaison est de nature directe [16].

Les *Bacillus* sont phénotypiquement et génétiquement hétérogènes. Ils exhibent diverses propriétés physiologiques ainsi ils sont capables de dégrader la plupart des dérivés animal ou de plantes, sont des producteurs d'antibiotiques, des nitrificateurs hétérotrophes, sont capables de dénitrification, de fixation d'azote, des précipitateurs de fer, des oxydants de sélénium, des oxydants et réducteurs de manganèse, des chemiliotrophes facultatifs, des acidophiles, des alcalophiles, des psychrophiles et des thermophiles [16]. Ils sont aussi mobiles grâce à des flagelles péritriches ou péritriches dégénérés ou non mobiles [16]. Les espèces de *Bacillus* sont reconnues pour produire une grande variété de molécules biologiquement actives incluant des polyketides, des lipopeptides, des sidérophores et des peptides [18]. Les *Bacillus* peuvent produire au moins une enzyme extracellulaire ce qui peut inclure plusieurs carbohydrates, différentes

protéases, pénicillinases, nucléases, phosphatases et lipases [17]. Il est possible pour les *Bacillus* de produire des antibiotiques comme métabolites secondaires en fin de phase logarithmique et au début de la phase stationnaire [17].

La plupart des *Bacillus* sont des saprophytes et sont largement distribués dans l'environnement [16]. Les *Bacillus* sont des bactéries ubiquitaires. Ils sont retrouvés dans divers environnements tels que les plantes et sols, les événements hydrothermaux, des environnements extrêmes, l'eau de mer, etc. [18] et cette distribution dans divers environnements démontre la grande capacité métabolique des *Bacillus*. Il est possible de cultiver plusieurs espèces de *Bacillus* à partir d'échantillons de sols. Les espèces retrouvées en abondances dans les échantillons de sols sont *B. subtilis* et *B. cereus* [20].

1.1.2.2 Génétique

L'hétérogénéité des *Bacillus* est aussi retrouvée au niveau de leur ADN ainsi leur contenu en G+C varie entre 32-66 % [16]. Le genre *Bacillus* contient en moyenne 4973 ± 923 gènes. *B. coahuilensis* représente le plus petit génome (3.35 Mb) répertorié tandis que les espèces du groupe *cereus* ($5\ 716 \pm 354$ gènes) ont les plus grands génomes parmi les différentes espèces de *Bacillus* [19].

Bacillus subtilis représente l'espèce type des *Bacillus*. Le genre *Bacillus* peut être divisé en plusieurs groupes selon leurs différentes caractéristiques et leur séquence génomique. Le groupe *cereus* est composé des espèces suivantes soit *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* ainsi que *B. weihenstephanensis*. Il est très difficile de différencier les espèces au niveau physiologique [21]. Le groupe *subtilis* est composé des sept souches suivantes : *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus* et *B. vallismortis* [21]. Les espèces de ce groupe ont une séquence pour le gène de l'ARN 16S ribosomique presque qu'identique variant entre 99.2-99.6 % d'homologie [22]. Le groupe *megaterium* rassemble les espèces *B. megaterium*, *B. simplex* et *B. flexus* [21]. Le groupe *sphaericus* contient les espèces suivantes soit

B. sphearicus, *B. fusiformis*, *B. glovisporus*, *B. insolitus*, *B. marinus*, *B. pasteurii*, *B. psychrophilus*, *B. silvestris* et *B. thermosphaericus* [23].

La majorité des espèces de *Bacillus* sont non pathogènes, mais quelques-unes sont pathogéniques soit pour les insectes, les animaux ou les humains. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus thuringiensis* représentent le groupe pathogène tandis que les bacilles environnementaux sont plutôt divers [18]. *Bacillus anthracis* est l'agent causal de la maladie du charbon (anthrax), *Bacillus cereus* est impliqué dans des cas d'intoxication alimentaire et *Bacillus thuringiensis* est pathogène pour les larves des lépidoptères, des coléoptères, des diptères et des hyménoptères [24].

1.1.2.3 Taxonomie des *Bacillus*

La taxonomie des *Bacillus* a été modifiée avec l'avènement des différentes technologies moléculaires et génomiques. Il a été démontré qu'il est possible de différencier plusieurs espèces de *Bacillus* par leur ARN ribosomique et que la plupart de ces espèces ne sont pas distribuées dans un ordre apparent [25]. Certaines espèces de *Bacillus* ont été transférées dans de nouveaux genres tels que *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, etc. Malgré le transfert de certaines espèces, *Bacillus* reste toujours un grand groupe avec plus de 150 espèces [29]. Les espèces bien connues telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus* ainsi que *Bacillus megaterium* font toujours partie du genre *Bacillus* [29]. La taxonomie du groupe *B. cereus* est restée au *statu quo* tandis que le groupe *B. subtilis* a subi plusieurs modifications [29].

Les *Bacillus* représentent le plus large et proéminent groupe de bactéries aérobiques formant des endospores et ont reçu une attention considérable au niveau taxonomique, car les différentes espèces ont des applications remarquables dans différents secteurs. Il est possible de distinguer des groupes pour le genre *Bacillus*. Parmi ceux-ci on retrouve deux groupes qui représentent un intérêt particulier au niveau médical et industriel, soit le groupe *B. subtilis* et le groupe *B. cereus* [27]. Les

deux groupes sont facilement distinguables entre eux, mais les espèces retrouvées dans chacun des groupes ne sont pas facilement distinguables entre elles [27].

1.1.2.4 Utilisation des *Bacillus*

Certaines souches de *Bacillus* sont utilisées au niveau industriel. Il est estimé que les enzymes produites par *Bacillus* représentent 50 % des enzymes sur le marché [28]. Divers *Bacillus* tels que *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. clausii* sont utilisés au niveau industriel [28]. Les différentes enzymes (amylase, protéase, β -glucanase, etc.) produites par les *Bacillus* sont utilisées dans différents procédés industriels. On les retrouve dans les détergents (protéase alcaline), pour la cuisson (amylase), l'amidon (α -amylase, pullunase, glucose isomérase), le textile (pectate lyase, amylase, mannanase) et les boissons (amylase, β -glucanase) [28].

Il y a quatre espèces entomopathogéniques qui sont actuellement utilisées ou qui possèdent le potentiel d'être utilisées comme insecticide [28]. Parmi celles-ci, l'espèce *Bacillus thuringiensis* est utilisée comme biopesticide depuis plusieurs années. Les autres espèces pouvant servir comme insecticide sont *B. sphaericus*, *B. popilliae* et *B. lentimorbus* [28]. Plusieurs produits à base de *B. thuringiensis* sont homologués pour leur utilisation au Canada [29].

Les différents traits physiologiques (formation de spores, sécrétion de métabolites secondaires (antibiotiques, enzymes extracellulaires, etc.), leur membrane cellulaire, etc.) des *Bacillus* leur permettent de survivre dans différents environnements, ce qui en fait un genre intéressant à utiliser comme PGPR. Il est possible de cultiver plusieurs *Bacillus* à partir de différents sols, car les bactéries formant des endospores en condition aérobie sont ubiquitaires dans l'écosystème des agricoles [30].

Certaines espèces de *Bacillus* sont déjà commercialisées comme biofertilisant ou biopesticide par exemple la souche *Bacillus amyloliquefaciens* FBZ42 est

commercialisée comme biofertilisant par ABiTEP GbmH sous le nom de RhizoVital® [31]. Il existe plusieurs bioformulations à base de *Bacillus* disponibles commercialement tel que Kodiak (*B. subtilis* GB03), Yield Shield (*B. pumilus* GB34), Bioyield (*B. amyloliquefaciens* GB99 + *B. subtilis* GB122), VAULT (*B. subtilis* MBI600 + souches rhizobia) pour n'en nommer que quelques-unes [31].

1.2 Les différentes caractéristiques PGPR d'intérêts

1.2.1 Fixation d'azote

L'azote est un nutriment important pour plusieurs activités chez la plante et est souvent un facteur limitant pour leur croissance. La fixation d'azote par les micro-organismes vivant librement, en association avec les plantes ou vivant en symbiose représente la source la plus importante d'azote dans les écosystèmes naturels [32]. Les plantes peuvent acquérir l'azote sous deux formes minérales, soit le nitrate (NO_3^-) ou l'ammonium (NH_4^+) [33]. Les micro-organismes diazotrophes peuvent permettre à la plante d'acquérir l'azote nécessaire sous forme minérale. Plusieurs espèces de micro-organismes, telles que *Paenibacillus azotofixans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus ciruclans*, etc., ont été caractérisées comme étant fixatrices d'azote [34].

1.2.1.1 Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote peut être simplifié de la manière suivante (Figure 1.1) : l'azote atmosphérique est fixé par des bactéries fixatrices d'azote. Une fois l'azote dans sa forme fixée, l'ammoniac (NH_3) se transforme en NH_4^+ grâce à des ions H^+ retrouvés dans le sol. L'ammonium (NH_4^+) peut être assimilé directement par les plantes ou transformé en nitrate par des bactéries nitrifiantes. Le nitrate (NO_3^-) peut être par la suite assimilé par les plantes ou retransformé en N_2 et retourné dans l'atmosphère par des bactéries dénitrifiantes.

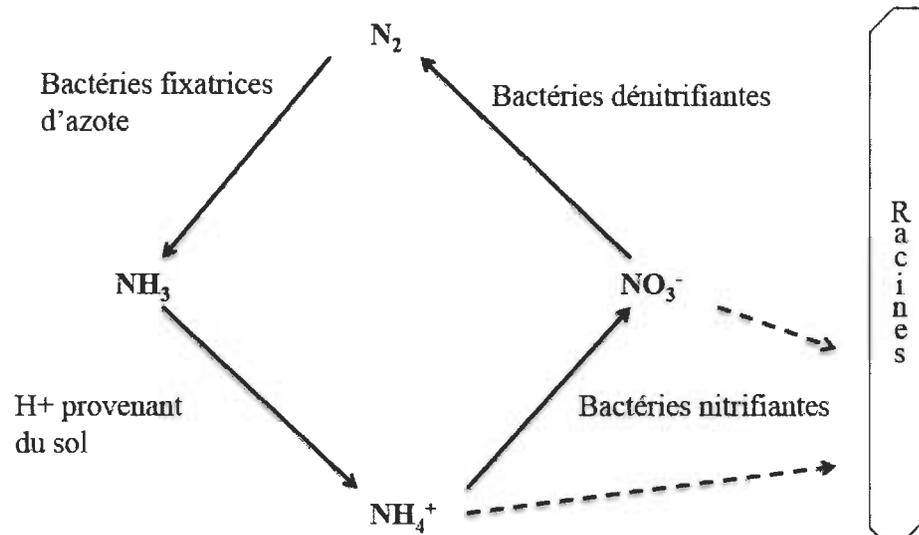


Figure 1.1 Cycle de l'azote atmosphérique.

Le cycle de l'azote permet donc aux plantes d'acquérir l'azote sous ses deux formes assimilables (NH_4^+ ou NO_3^-) par la fixation de l'azote atmosphérique. Les micro-organismes qui fixent l'azote le font à l'aide d'un complexe protéique conservé lors de l'évolution : l'enzyme nitrogénase [35]. La nitrogénase catalyse la réaction suivante : $N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16P_i$. Cette réaction est irréversible et demande beaucoup d'énergie. La nitrogénase peut être classée dans quatre familles selon la nature de son centre actif [36]. La famille la plus commune et la mieux étudiée est la nitrogénase, dont son centre actif est composé de [7Fe-9S-1Mo-X-homocitrate] : la nitrogénase Mo-dépendante [37]. La forme conventionnelle est donc la forme contenant le molybdène (Mo) en son centre actif. Deux autres alternatives sont aussi retrouvées soit le Mo est remplacé par du vanadium (*vnfH*), soit le Mo est substitué par du fer (*anfH*) [35]. La nitrogénase que possède *Streptomyces thermoautotrophicus* constitue la quatrième famille, car cette nitrogénase est composée d'une CO-déhydrogénase et d'une oxydoréductase manganèse-dépendante [38]. Malgré le fait que les nitrogénases contenant du vanadium ou du fer dans leur centre actif soient génétiquement différentes de la nitrogénase avec le molybdène, des études biochimiques et génétiques ont indiqué que les trois enzymes possèdent des sous-unités et des cofacteurs similaires [39].

1.2.1.2 Génétique de la nitrogénase

La nitrogénase est composée de deux métalloprotéines désignées comme la protéine de fer (Fe-protéine) et la molybdène-fer protéine (MoFe-protéine) [40]. La MoFe-protéine représente la composante la plus large de la nitrogénase. Deux polypeptides formant deux dimères ($\alpha_2\beta_2$) composent la protéine. Un groupement-P (un groupement [8Fe-7S]) lie chaque dimère et chaque unité α lie un cofacteur FeMo ([7Fe-9S-1Mo-X-homocitrate]) [37]. Les polypeptides sont codés par les gènes *nifD* et *nifK* [41]. Cette protéine représente le site de réduction du substrat et possède un poids moléculaire d'environ 240 KDa [40].

La Fe-protéine est la plus petite composante de la nitrogénase et est composée de deux sous-unités identiques (α_2). Les sous-unités sont liées par un simple groupement [4Fe-4S] et chaque sous-unité possède un site pour lier le Mg-ATP. La Fe-protéine médie l'hydrolyse de l'ATP et le transfert d'électrons. De plus, cette protéine est la seule donneuse d'électrons connue qui supporte la réduction de substrat par la MoFe-protéine [40]. Les sous-unités sont codées par le gène *nifH* [41] et possèdent un poids moléculaire d'environ 60KDa.

Le mécanisme biochimique de la nitrogénase a été établi et peut être expliqué de la façon suivante [42] :

1. Formation d'un complexe entre la Fe-protéine avec la MoFe protéine. La Fe-protéine réduite possède 2 Mg-ATP et est dans le stade d'oxydation +1 [37].
2. Changement de conformation pour la Fe-protéine associée avec l'hydrolyse des deux Mg-ATP causant un transfert d'électrons entre les deux protéines. Le groupement-P médierait le transfert d'électrons entre les deux protéines [36].
3. Dissociation des deux protéines avant la répétition de ce cycle appelé le cycle Fe-protéine.

Pour la réduction de N_2 , le cofacteur FeMo doit accepter huit électrons durant la catalyse. Le cycle de la Fe-protéine doit être effectué au moins huit fois, car un seul électron est transféré durant l'association entre les deux protéines [36].

Les gènes *nif* sont hautement conservés parmi les bactéries fixatrices d'azote [43]. L'arrangement et la fonction des gènes *nif* sont mieux connus chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif. Il est connu que, chez *Azotobacter*, les gènes sont répartis en deux ensembles tandis que, chez *Klebsiella pneumoniae*, les gènes sont regroupés sur un segment de 23 kpb [44]. Les gènes *nifHDK* sont les gènes codant pour les composantes structurales de la nitrogénase. Les gènes *nifUBEN* servent d'échafaudage moléculaire et les gènes *nifXY* transportent les précurseurs entre les sites d'assemblage. Les gènes *nifSQV* codent pour les enzymes fournissant le sulfure, le molybdate et l'homocitrate pour la synthèse du cofacteur [45]. Un complexe ayant un effet protecteur contre l'oxygène est codé par les gènes *nifWZ* [44]. Le gène *nifA* est un activateur qui favorise l'amorçage de la transcription et, en combinaison avec le facteur sigma σ^{54} , il est capable d'induire l'expression de 19 gènes [45]. Le gène *nifL* agit comme inhibiteur du gène *nifA* et certains gènes, comme *nifT*, ne possèdent pas de fonction connue [44].

Une étude faite chez *Paenibacillus massiliensis* T7 a démontré que l'arrangement des gènes *nif* est différent des autres micro-organismes, mais que la structure primaire caractéristique du promoteur, soit la séquence consensus CTGG-N8-TTGCA s'étendant de la position -24 à la position -12 relativement au site d'initiation de la transcription, est la même que chez la plupart des espèces fixatrices d'azote [46].

La transcription des gènes *nif* aura lieu dans des conditions spécifiques dépendant des bactéries [44]. La régulation des gènes *nif* s'effectue au niveau de la transcription par les gènes *ntr* (*nitrogen regulation*) chez les bactéries gram négatif [47]. Cette régulation est habituellement effectuée à deux niveaux; un système contrôle coordonnant le métabolisme cellulaire de l'azote et un mécanisme *nif* spécifique facilitant la réponse aux divers signaux [48].

Aucun homologue des gènes *ntr*, retrouvé chez les Proteobacteria, n'est présent chez les genres *Bacillus*, *Clostridium* et *Streptomyces* [48]. Il a été démontré chez *Bacillus subtilis* que les protéines TnrA et GlnR régulent l'expression du métabolisme de l'azote. [49]. Malgré le fait que GlnR soit retrouvé chez la plupart des espèces *Bacillus*, TnrA est retrouvé chez quelques espèces seulement. TnrA est retrouvé chez les familles *Bacillaceae*, *Paenibacilliaceae* et du genre *Exigobacterium* avec l'exception des espèces et souches du groupe *Bacillus cereus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Brevibacillus brevis* et de *Lysinibacillus sphaericus* [50]. L'activité de ces deux protéines est régulée par la glutamine synthétase, une enzyme impliquée dans l'assimilation d'azote [49]. La protéine TnrA active l'expression de gènes lorsque la présence d'azote est limitée, tandis que la protéine GlnR réprime l'expression génique en excès d'azote [51].

1.2.1.3 Mise en évidence de la fixation d'azote

La nitrogénase est capable de réduire d'autres substrats, tels que l'oxyde nitreux (N_2O), le cyanate, les ions cyanures, le thiocyanate, l'azoture et l'acétylène [44]. Dans les années soixante, des chercheurs ont découvert que l'enzyme nitrogénase de certaines bactéries diazotrophes, impliquée dans la fixation d'azote, pouvait réduire l'acétylène en éthylène [52]. D'autres chercheurs ont démontré des similitudes entre la fixation d'azote par la nitrogénase (la conversion de N_2 en ammonium) et la réduction d'acétylène [53]. Il est donc possible de déterminer si un micro-organisme est capable de fixer l'azote par un test de réduction d'acétylène (ARA). Étant donné la conservation des gènes *nif*, il est possible d'utiliser des amorces universelles pour la détection des gènes *nif* par PCR impliqués dans la fixation d'azote, principalement le gène *nifH* (impliqué dans la formation de la nitrogénase). Par contre, il n'est pas possible d'utiliser ces amorces comme outils de diagnostic direct de micro-organismes diazotrophes provenant du sol ou de déduire une mesure quantitative de la composition de la communauté de diazotrophes [32]. Cette impossibilité provient du fait que certaines espèces sont bien caractérisées pour la fixation d'azote, comme pour *Azospirillum*, mais d'autres espèces

sont plus ou moins bien caractérisées. Par exemple, chez *Bacillus*, il est difficile de démontrer la capacité à fixer l'azote par PCR [54].

La capacité à fixer l'azote peut être démontrée par réduction d'acétylène ainsi que par la mise en évidence de la présence des gènes *nif*, souvent le gène *nifH*. Cependant, il n'est pas toujours possible de mettre en évidence un des gènes *nif*.

L'expression des gènes *nif* ou la fixation active d'azote n'implique pas qu'il y aura un transfert d'azote nouvellement fixé aux plantes [33].

1.2.2 Production d'acide indole-acétique

Les PGPR peuvent directement influencer la croissance des plantes, soit par la production de phytohormones (auxines, gibbérellines, etc.) ou par la promotion de l'accès aux nutriments. Les bactéries vivant en association avec les plantes ou dans la rhizosphère sont plus aptes à prospérer à partir des substrats excrétés par les racines des plantes et ainsi convertir les différents substrats en hormones ou autres substances bénéfiques à la croissance des plantes [55]. La production de phytohormones par les rhizobactéries pouvant aider à la croissance des plantes représente une caractéristique importante dans l'association plante-rhizobactérie.

1.2.2.1 Mode d'action de l'IAA

La famille des auxines est une importante famille de phytohormones de croissance. L'acide-indole-acétique (IAA) est l'auxine la plus naturellement distribuée chez les plantes vasculaires, les mono et dicotylédones, les filicophyta et les gymnospermes [56].

L'IAA est impliqué dans presque tous les aspects de la croissance et du développement chez la plante [56] et est connu pour être impliqué dans l'initiation des racines, la division et l'élargissement cellulaire [8]. La production d'IAA a été détectée chez plus de 80 % des bactéries en provenance de la rhizosphère. Cependant, la

documentation de la production d'IAA par les bactéries Gram positive est rare [57]. Parmi les espèces bactériennes capables de produire de l'IAA, on retrouve les genres *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Bacillus* [58].

1.2.2.2 Voie de biosynthèse de l'IAA

Il existe une grande similarité entre les voies de biosynthèse d'IAA chez les plantes et les bactéries. La biosynthèse d'auxine chez les plantes est complexe et de multiples voies ont été identifiées. Deux voies majeures chez la plante ont été déterminées, soit une voie tryptophane indépendante, soit une voie tryptophane dépendante. Les précurseurs pour la voie tryptophane indépendante sont probablement l'indole et l'indole-3-glycérol phosphate. Du côté de la voie tryptophane dépendante, plusieurs sous-voies sont connues, telles que la voie de l'indole-3-acétamide, de l'indole-3-pyruvic acide, de la tryptamine et de l'indole-3-acétaldoxine [59].

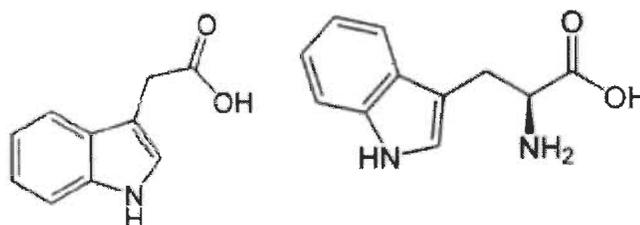
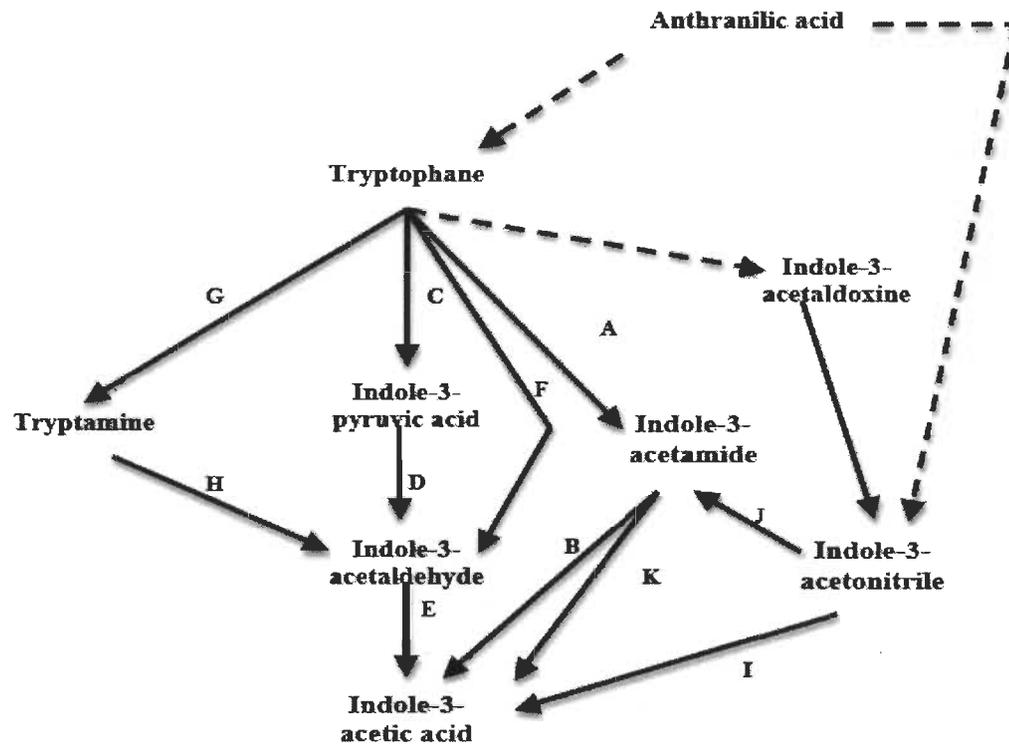


Figure 1.2 Molécule d'IAA et son précurseur le tryptophane.

La biosynthèse d'IAA chez les différentes rhizobactéries peut être influencée par plusieurs facteurs environnementaux, tels que le pH acide, le stress osmotique ou la limitation de carbone [60]. Une étude faite sur la composition de la rhizosphère chez le soya résistant au glyphosate a démontré une modification de la rhizosphère de même que le potentiel à produire de l'IAA chez les rhizobactéries [61].

Plusieurs voies de synthèse existent et leur utilisation varie selon le micro-organisme étudié. Il est possible qu'un micro-organisme possède plus d'une voie

de biosynthèse. Le tryptophane a été identifié comme le précurseur de la biosynthèse de l'IAA. Les différentes voies de synthèse sont classées selon les intermédiaires entre le tryptophane et l'IAA.



A) Tryptophan 2-monooxydase, B) Indole acétamide hydrolase, C) Tryptophan transférase, D) Indole-3-pyruvate décarboxylase, E) Indole-3-acétaldéhyde oxidase, F) Tryptophan side chain oxidase, G) Tryptophan décarboxylase, H) Amine oxidase, I) Nitrilase, J) Nitrile hydratase, K) Amidase

Figure 1.3 Différentes voies de biosynthèse de l'IAA à partir de son précurseur.

Parmi les différentes voies, la voie de synthèse de l'indole-3-acétamide est la mieux caractérisée chez les bactéries [60]. Lors des différentes études sur les voies de biosynthèse de l'IAA, il a été établi que la voie de l'indole-acétamide (IAM) est une voie de nature constitutive, tandis que les voies de l'indole-3-acide-pyruvique (IPyA) et de l'indole-acétonitrile sont de natures inductibles [62]. Il est possible de déterminer la nature de la bactérie, car la voie biosynthèse d'IAA diffère si le micro-organisme est pathogène ou non. La voie de l'IAM est principalement utilisée par les bactéries

pathogènes, tandis que la voie de l'IPyA est majoritairement utilisée par les PGPR pour la biosynthèse de l'IAA [60]. De plus, la voie de l'IAM a été identifiée chez les phytopathogènes induisant des tumeurs chez la plante hôte, telle que *P. syringae* pv. *savastanoi*, *P. agglomerans* pv. *gypsophilliae* et *Agrobacterium tumefaciens* [63].

Une étude a démontré que, lorsque du tryptophane (précurseur de l'IAA) était ajouté dans le milieu de culture, il y avait une différence significative au niveau de la production d'IAA, la production étant en moyenne supérieure de 10 fois [58]. Cependant, la présence de tryptophane n'influence pas la croissance des rhizobactéries, mais seulement leur production de l'IAA. Un autre groupe de chercheurs, travaillant avec des mutants tryptophanes auxotrophiques et le marquage aux isotopes, a établi que la synthèse d'IAA peut se produire via la voie de synthèse tryptophane-indépendante, mais les bactéries produisent une plus grande quantité d'IAA en présence de tryptophane [57]. Si la production d'IAA peut être augmentée par la présence de tryptophane, elle peut aussi être inhibée par l'anthranilate (un précurseur du tryptophane) [64] et la biosynthèse d'IAA peut aussi être modulée par l'IAA et par ses intermédiaires [60].

1.2.2.3 Génétique de la biosynthèse de l'IAA

Il existe des études sur l'identification et la caractérisation des gènes et protéines clés de la synthèse d'IAA. Cependant, ces études sont dirigées vers un gène ou une protéine particulière chez une voie de synthèse [65]. Chez les bactéries à Gram positif, il n'y a pas de produit de gènes impliqué dans la synthèse d'IAA qui a été identifié jusqu'à présent [66]. Certaines études ont démontré, chez *Bacillus amyloliquefasciens* FBZ42, l'existence de gènes homologues à certains gènes impliqués dans la biosynthèse d'IAA. Par exemple, on retrouve le gène *ysnE* qui encode pour une protéine similaire à l'IAA acétyltransférase chez *Azospirillum brasilense*, le gène *dhaS* similaire à l'indole-3-acétaldéhyde déhydrogénase chez *Ustilago maydis* et le gène *yhcX* codant pour une nitrilase putative semblable à la nitrilase 2 retrouvé chez *Arabidopsis thaliana* [66]. La α -cetoacide décarboxylase des firmicutes *Saphylococcus*, *Lactococcus*, *Clostridium* et *Bacillus* est étroitement liée à l'indole pyruvate décarboxylase [63].

L'IAA est un acide faible ($pK_a = 4.8$) qui a un pH neutre se retrouve dans son état dissocié [56]. Moins de 1 % d'IAA est retrouvé sous sa forme protonée à pH physiologique et peut diffuser à travers la membrane cellulaire des bactéries [63]. Chez les plantes, l'IAA est retrouvé de façon prédominante sous sa forme conjuguée, soit avec un sucre ou un sucre alcool, par un lien ester ou encore lié à un acide aminé ou peptides et même une protéine par un lien amide [56]. L'IAA conjuguée est impliquée dans le transport, l'entreposage, la protection de l'IAA contre la dégradation enzymatique et permet même de réguler le niveau cellulaire d'IAA [60]. Du côté des bactéries, la présence d'IAA conjugué a été démontrée seulement chez *P. savastanoi* pv. *Savastanoi* [67].

Chez les bactéries, l'IAA peut servir de signaux entre les cellules et peut aussi servir pour l'acquisition d'azote, le catabolisme d'acide aminé. Certaines bactéries, telles que *Pseudomonas* et *Arthrobacter*, peuvent s'en servir comme source de carbone [63]. Il a été démontré que l'IAA permet de moduler les réponses à divers stress chez *E. coli* et *B. subtilis* [68].

1.2.2.4 Méthode de détection de l'IAA

La détection *in vitro* de l'IAA peut se faire de plusieurs façons. La détection peut se faire à l'aide de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), de TLC (Thin Layer Chromatography), ou encore de façon colorimétrique avec le réactif de Salkowski. Le réactif de Salkowski permet de détecter la présence d'IAA dans le surnageant d'une culture, ce qui représente une méthode simple et rapide pour la détection de l'IAA.

Le test avec le réactif de Salkowski est souvent utilisé comme premier test pour les rhizobactéries produisant de l'IAA. Lorsqu'une réaction positive se produit suite à l'ajout du réactif au surnageant, un changement de couleur a lieu (rose à rouge foncé). La couleur rosée est due à la formation d'un complexe (tris-(indole-3-acétate)-ferIII) [69] entre le fer contenu dans le réactif et l'IAA produit par la bactérie. Cependant, le réactif n'est pas spécifique seulement à l'IAA, il réagit aussi avec l'indole-acide

pyruvique et l'indole-acétamide [70]. Il est impossible de distinguer l'IAA de l'IPyA avec une méthode colorimétrique, car leur spectre d'absorption est étroitement lié [70].

L'efficacité de l'IAA bactérien dépend de la sensibilité de la plante pour celui-ci, des niveaux de production par les bactéries ainsi que de l'influence indirecte par l'induction d'autres phytohormones [65]. Certains intermédiaires de l'IAA (indole-acide pyruvique, indole-acétaldéhyde et indole-acétonitrile) ont une faible activité auxine. De plus, les niveaux d'IAA produits auront des effets différents sur la plante. Une production optimale d'IAA par les bactéries aura des effets bénéfiques pour la plante, tandis qu'une production supra-optimale aura pour effet de rendre la plante malade ou de développer des symptômes de maladies. De plus, les auxines sont capables de bloquer, au niveau de l'ARNm, plusieurs enzymes liés à la pathogénicité [60].

La production d'IAA par les rhizobactéries permet de fournir une source d'IAA exogène et ainsi représente une caractéristique importante de l'association plante-rhizobactérie étant donné l'implication de l'IAA dans plusieurs processus du développement de la plante.

1.2.3 Solubilisation de phosphate

Le phosphore est, après l'azote, le nutriment limitant le plus la croissance des plantes, et ce, malgré son abondance tant sous forme organique qu'inorganique dans le sol [71]. Le phosphore est requis pour la croissance et le développement des plantes. Il promeut la fixation d'azote et implique, dans la photosynthèse, la biosynthèse de macromolécules, la transduction de signaux, le transfert d'énergie et la respiration [72]. Moins de 10 % du phosphore total retrouvé dans le sol est accessible aux plantes [73]. La très grande réactivité du phosphore avec les autres métaux du sol (fer, aluminium et calcium) résulte en la précipitation de celui-ci, le rendant ainsi indisponible pour les plantes [74]. On retrouve, dans le sol, le phosphore sous forme minérale, telles l'apatite, l'oxyapatite et l'hydroxyapatite. Le phosphore minéral peut-être associé à des hydroxydes de fer, d'aluminium ou de manganèse. Selon le type de sol, le phosphore

précipitera avec différents métaux. Dans les sols acides, le phosphore précipite avec les oxydes et hydroxydes de fer ou d'aluminium tandis que, dans les sols alcalins, le phosphore est retrouvé fixé au calcium [75]. Le phosphore est aussi retrouvé sous forme de matière organique. Le phosphore organique est majoritairement retrouvé sous la forme d'inositol phosphate (phytate) [75]. Le phosphore organique doit être déphosphorylé sous forme inorganique afin que son assimilation par les plantes soit possible [71].

Les souches bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* sont parmi les meilleurs pour la solubilisation du phosphate. Les bactéries solubilisant le phosphate (PSB) mobilisent les phosphates insolubles de leur matrice minérale vers le sol environnant où ils peuvent être absorbés par les plantes [76]. La majorité des PSB solubilisent les complexes Calcium-P et seulement quelques-uns peuvent solubiliser les complexes Fer-P et Aluminium-P [77].

1.2.3.1 Mécanismes et génétique de la solubilisation du phosphate

Différents mécanismes sont utilisés par les PSB pour transformer le phosphate insoluble sous sa forme soluble. Les acides organiques qu'ils produisent sont de bons chélateurs pour le Ca^{2+} et peuvent aussi former des complexes solubles avec les ions métalliques associés au phosphate insoluble afin de permettre le relargage de phosphore [75]. De plus, la production d'enzymes, tels que des phosphatases non spécifiques (aussi appelés phosphohydrolase), des phytases, des phosphonatases et des C-P lyases, permet la solubilisation de phosphate organique [78].

Les acides organiques sécrétés peuvent soit dissoudre directement les phosphates minéraux (échange d'anion PO_4^{2-} par un anion acide) ou peuvent chélater l'ion de fer ou d'aluminium associé avec le P [77]. Les bactéries Gram négatives sont plus efficaces pour ce qui est de dissoudre les phosphates minéraux comparativement aux bactéries Gram positives, car elles ont une plus grande sécrétion d'acides organiques dans l'environnement extracellulaire [79]. Il a été démontré que des bactéries Gram positives

du genre *Bacillus*, soit *Bacillus licheniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens*, produisent un mélange d'acide acétique, isobutyrique, isovalérique et lactique [75].

Les phosphatases non spécifiques vont permettre la déphosphorylation des liens phosphoester et phosphoanhydre chez la matière organique [78]. Les phosphohydrolases non spécifiques sont classées en trois groupes sur la base de leur séquence d'acide aminé. La classe A est composée de phosphohydrolase contenant un polypeptide de masse moléculaire d'environ 25-27 KDa ayant pour séquence signature le motif GSYPSGHT. La classe B possède un motif signature composé FDIDDTVLFSSP et une composante polypeptide de 25 KDa. La classe C regroupe des lipoprotéines avec une activité phosphatase acide non spécifique et ont une masse moléculaire relative de 30 KDa [74].

Une autre source de phosphore pouvant être utilisée est le phosphonate. Le phosphonate contient un lien C-P à la place du lien plus commun C-O-P retrouvé chez les phosphoesters. Certaines bactéries, pouvant cliver le lien C-P, peuvent utiliser le phosphonate comme source de phosphore lorsqu'il y a limitation de phosphate [80]. Il existe quatre voies de dégradation connue et chacune des voies possède un substrat et un mécanisme spécifique. Les phosphonatases dégradent les α -aminoalkylphosphates, les phosphopyruvates hydrolase utilisent comme substrat le phosphinopyruvate et le phosphonoalanine après sa transamination, les phosphonoacétates hydrolases catalysent la réduction de l'acide phosphonoalkylcarboxylique tandis que les C-P lyase peuvent utiliser une panoplie de phosphonate incluant le phénylphosphonate [76]. La dégradation du phosphonate via les C-P lyase est beaucoup plus fréquente chez les bactéries Gram négatives que les Gram positives [81]. *B. cereus* possède une activité phosphonatase capable de catalyser l'hydrolyse du phosphonoacetylaldéhyde ainsi que les gènes *phnC*, *phnD* et *phnE* [76]. Ces trois gènes codent pour un transporteur alkylphosphonate chez *E. coli* [81].

Les phytases permettent de relâcher le phosphore de l'acide phytique. Il existe plusieurs classes de phytase, soit les histidines phosphatases acide (HAP), les phytases

β -propeller (BPP), les cystéines phosphatases (CP) et les phosphatases acides mauves (PAP). Les HAP sont caractérisés par un motif N-terminal RHGXRXR et un motif C-terminal HD. L'histidine du N-terminal forme un intermédiaire phosphohistidine et le C-terminal agit comme donneur de proton [82]. Les phytases produites par *Bacillus* font partie d'une classe à part des autres phytases, car elles ne possèdent pas le motif conservé RHGXRXR de la famille des histidines phosphatases acides [83]. Les BPPs possèdent une structure de feuillets β assemblés en six pales d'hélice et ont besoin de Ca^{2+} pour son activité et sa thermostabilité. Les BPP possèdent un site d'affinité qui attire le substrat et un site de clivage qui hydrolyse le groupe phosphate [82]. Les CP possèdent un motif de site actif HCXXGXXR(T/S). Son site actif forme une boucle pour accommoder le substrat et un mécanisme de tyrosine phosphatase clive le groupement phosphate [82]. Les PAPs sont des métalloprotéines qui possèdent un des cinq motifs consensus suivants DXG/GDXXY/GNH(E,D)/VXXH/GHXXH et son mécanisme d'adaptation au phytate n'est pas encore connu. Quelques gènes codant pour des phytases ont été identifiés chez différents *Bacillus*, tels que *phyL* chez *B. licheniformis*, *168phyA* chez *B. subtilis* 168, *TS-phy* chez *B. amyloliquefaciens* ainsi que *phyC* chez *B. subtilis* [84]. De plus, *phyC*, chez *B. subtilis*, est induit lorsque le phytate est la seule source de phosphate et lorsque le phosphate inorganique est un facteur limitant [83].

Le régulon Pho est un système universel qui régule la réponse cellulaire en fonction de la déficience en phosphate inorganique. Les gènes *PHO* sont régulés par un système de transduction de signal à deux composantes qui consiste en les protéines PhoP-PhoR chez les Gram positives et PhoB-PhoR chez les Gram négatives [85].

Chez *Bacillus subtilis*, le régulon Pho code pour plus d'une vingtaine de protéines. L'opéron *PhoP-PhoR* code pour les protéines phoP et phoR, qui sont des régulateurs de la transcription se liant au promoteur du gène et une histidine kinase transmembranaire senseur respectivement. Le gène *phoA* code pour la phosphatase A (phosphatase alcaline), le gène *phoB* code pour une phosphomonoestérase synthétisée sous deux promoteurs, soit Ps (pour la formation de spore) et Pv (lors d'une carence en phosphate). Le gène *phoD* code pour une enzyme ayant à la fois l'activité phosphomonoestérase et

phosphodistérase. On retrouve aussi l'opéron *tuaABCDEFGH* qui code pour la synthèse de l'acide teïchuronique. Les opérons *tagAB* et *tagDEF*, codant pour la synthèse de l'acide teïchoïque, ainsi que l'opéron *pstSCAB₁B₂*, codant pour les protéines du système de transport du phosphate, sont aussi retrouvés dans le régulon *pho*. [85]. L'opéron *pst* code pour un système de transport ABC typique [86]. On retrouve aussi le gène *glpQ*, appartenant à l'opéron *glpQT*, sur l'opéron *p* codant pour une glycérol-3-phosphate perméase et une glycérophosphoester phosphodisestérase [85]. De plus, chez *B. subtilis*, le régulon Pho est sous le contrôle de PhoR et PhoP ainsi que de la protéine Spo0A [85]. La protéine Spo0A est un régulateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de gènes exprimés en phase post-exponentielle, tels que les gènes pour la synthèse d'antibiotique, la synthèse de protéase ainsi que pour l'initiation de la formation de spore [85].

L'opéron PhoB-PhoR chez *E. coli*, régule 137 gènes, dont 19 qui sont réprimés et 118 qui sont induits lorsqu'il y a carence de phosphore [85]. De plus, les gènes *phn*, impliqués dans la dégradation du phosphonate, sont sous le contrôle du régulon Pho ainsi que des orthophosphates exogènes [81]. Chez *E. coli*, les gènes *phn* sont retrouvés dans le régulon Pho.

Il a été démontré que l'activité phosphatase acide et alcaline ainsi que l'activité phytase des isolats *Bacillus* contribuaient à la mobilisation du phosphore et à son acquisition par les cultures de soya [87]. L'activité phytase de la souche *Bacillus amyloliquefasciens* FBZ45 a été démontrée comme étant importante pour la stimulation de la croissance des plantes lorsqu'il y a limitation de phosphate [88]. Il a démontré que la souche *B. megaterium* A6 favorisait la croissance et le rendement des graines de colza en améliorant l'assimilation du phosphore chez la plante [89].

1.2.3.2 Méthode pour tester la solubilisation du phosphate

Il est possible de tester la solubilisation de phosphate à l'aide de différents milieux tel que le milieu NBRIP ou le milieu Pikovskaya dans lesquels on retrouve une source

de phosphate insoluble. De plus, la méthode développée par Fiske et Subbarow permet de quantifier le phosphate soluble dans le surnageant d'une culture [91].

Le fait que les bactéries soient capables de solubiliser le phosphate ne veut pas nécessairement dire que les plantes vont absorber le phosphate qui a été solubilisé. Il est donc important de caractériser la solubilisation de phosphate par les PGPR, car ils rendent accessible aux plantes du phosphore qui, en temps normal, serait sous forme insoluble, donc inaccessible pour l'assimilation par les plantes. Il est bien accepté que les bactéries solubilisant le phosphate ont d'autres propriétés bénéfiques pour les plantes, telle la production de différentes substances promouvant la croissance des plantes [90].

1.2.4 Sidérophore

Le fer est un élément commun retrouvé dans le sol et représente un élément important pour différentes fonctions biologiques, telles que les réactions d'oxydoréduction, le transport d'électrons, la formation du hème, la photosynthèse, *etc.* Les bactéries poussant en condition aérobie ont besoin de fer pour différentes fonctions, telles que la réduction d'oxygène pour la synthèse d'ATP, la réduction des précurseurs ribonucléotides de l'ADN, la formation d'hème et autres fonctions essentielles [92]. Malgré la très grande présence du fer, il est peu disponible en milieu aérobie. Cet indisponibilité s'explique par l'extrême insolubilité du fer inorganique qui se dissout à des niveaux beaucoup plus faibles que celui requis afin de supporter la croissance des plantes et des bactéries [93] ainsi que par le fait que, lorsque le fer existe sous forme Fe^{3+} en conditions aérobiques, il a tendance à s'hydrolyser et à former des polymères insolubles $Fe(OH)_3$ [94].

Le fer inorganique est retrouvé dans une variété de minéraux, tels que l'argile, l'humus, la pyrite, l'hématite, *etc.* [94]. La rapide oxydation du fer ferreux (II) vers l'état ferrique (III), qui est virtuellement insoluble à pH neutre, réduit considérablement la biodisponibilité du fer en dessous du niveau requis pour une croissance optimale [95].

Chez les plantes, 10^{-9} M est requis pour une croissance optimale et, chez les bactéries, la quantité requise varie entre 10^{-7} et 10^{-5} M tandis que la quantité disponible à pH neutre est de 10^{-17} M [97]. Afin de combler leur besoin en fer, les bactéries sécrètent des molécules de faible poids moléculaire (500-1500 Da) appelées sidérophore (du grec porteur de fer) afin de chélater le fer retrouvé dans l'environnement. Il est aussi possible pour les bactéries d'utiliser des moyens alternatifs pour combler leur besoin en fer. Parmi ceux-ci, on retrouve la réduction de surface ferreuse plus soluble, la diminution du pH, l'utilisation de protéine hème ou l'extraction de protéines associées à des métaux complexés [92]. Les sidérophores sont relâchés dans l'environnement en fonction de la biodisponibilité du fer et sont capables de chélater le fer avec une très haute affinité. La constante d'affinité calculée est au-dessus de 10^{30} M^{-1} [97].

1.2.4.1 Type de sidérophore

Le type de sidérophore produit dépend du micro-organisme qui les sécrète et il est possible de les classer en fonction de leur groupe fonctionnel qui chélate le fer. Les différents types de sidérophore sont le type hydroxamate, qui chélate le fer via des acides hydroxamiques, le type catécholates, qui lie le fer avec des hydroxyles de l'anneau catéchole, le type citrate, qui utilise des ions carboxylates pour la liaison avec le fer, le type complexe, qui utilise une combinaison des différents groupes fonctionnels, et le type pyoverdine, qui est produit par plusieurs espèces de *Pseudomonas* et qui est composé d'un chromophore dyhydroxyquiline conservé ainsi que d'une chaîne peptide variable [96]. Les sidérophores sont retrouvés dans deux groupes principaux : les hydroxamates et les catécholates [98].

On retrouve comme sidérophore chez *Bacillus* la bacilibactine, l'anthrobactine, l'acide itoïque, le citrate, la pétrobactine et la schizokinene pour n'en nommer que quelques-uns. Il y a plus de 500 sortes de sidérophores connues à ce jour. Il est possible pour les bactéries d'utiliser des sidérophores exogènes pour combler leur besoin en fer. Il est connu que *B. subtilis* est capable d'utiliser des sidérophores produits par d'autres

bactéries. Une augmentation de croissance a été observée avec les sidérophores ferrichrome, ferrioxamine, coprogen, schizokinene et arthrobactine [99].

1.2.4.2 Régulation de la biosynthèse de sidérophore

La production de sidérophore est régulée selon la quantité de fer présente dans l'environnement des bactéries. Les gènes qui sont impliqués dans la consommation du fer sont négativement par des métalloprotéines utilisant le fer comme corépresseur [97]. Chez plusieurs bactéries, l'expression des gènes liés à la biosynthèse des sidérophores est médiée par une protéine liée à l'ADN sensible aux métaux, la protéine Fur (Ferric Uptake Repressor) [100]. Fur est le régulateur global du fer chez plusieurs bactéries Gram négatif et Gram positif à faible contenu G+C [101]. Le régulon Fur consiste en une quarantaine de gènes impliqués dans la synthèse et dans l'absorption des sidérophores [102]. La boîte Fur est représentée comme une répétition de 19bp inversée, qui comprend deux sites opérateurs se chevauchant avec comme élément minimal de reconnaissance 7-1-7 [103]. La séquence consensus de la boîte Fur dans l'opérateur est GATAATGATAATCATTATC, qui se produit avec une certaine variation dans l'ADN régulateur des systèmes affectés par le fer de différentes espèces microbiennes [92]. *Bacillus subtilis* contient trois homologues Fur, soit PerR (réponse au stress peroxyde), Zur (consommation du zinc) et Fur (consommation du fer) [100].

B. subtilis contient un seul opéron (*dhbACEBF*) pour la biosynthèse de sidérophore codant pour les enzymes impliqués dans la biosynthèse du sidérophore bacillibactine [99]. Les gènes *dhb* sont organisés en un opéron qui comprend *dhbACEBF*, qui est similaire aux gènes codant pour l'entérobactine chez *E. coli* [104]. Le gène *dhbA* code pour une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate déhydrogénase [106], *dhbC* code pour une isochorismate synthase [105], *dhbE* code pour une 2,3-dihydroxybenzoate adénylase [106], *dhbB* code pour une isochorismate lyase et une protéine porteuse de peptidyl (PCP) [106] et *dhbF* code pour un peptide dimoléculaire synthétase [106]. Fur régule l'expression de plusieurs opérons impliqués dans le transport du fer, incluant l'opéron *dhb* (dihydroxybenzoate siderophore biosynthesis)

[100]. Fur, chez *B. subtilis*, agit comme un répresseur fer dépendant *in vivo* tandis qu'*in vitro* Fur agit comme un répresseur fer indépendant de la transcription de *dhb* [100].

La transcription de l'opéron *dhb* est sous le contrôle d'un seul promoteur σ^A -dépendant comprenant un site se liant à la boîte Fur [105] et le promoteur se trouve en amont de *dhbA* [102]. La pétrobactine produite par *Bacillus anthracis* est produite de façon NRPS-indépendante [101]. L'assemblage des sidérophores est fait par des peptides non-ribosomique synthétase (NRPS) qui sont aussi impliqués dans la synthèse de peptides d'une grande diversité structurale ainsi que des peptides possédant un large spectre biologique [107]. La biosynthèse du sidérophore bacillibactine peut être expliquée de façon simplifiée en trois étapes [107] :

1. Adénylation du substrat acide (aminé)
2. Transfert du fragment aminoacyle de l'adénylate au groupement thiol du domaine adjacent de la protéine de transport
3. Condensation du substrat suivie de la relâche du produit catalysé par le domaine Te

La sécrétion de sidérophore a été caractérisée chez quelques bactéries et la sécrétion est faite par des pompes à efflux appartenant aux superfamilles MFS (major facilitator superfamily), RND (resistance, nodulation and cell division) et ABC (ATP binding cassette) [101].

La capture des sidérophores relâchés dans l'environnement implique différents systèmes selon le type de sidérophore. Le régulon Fur inclut au moins quatre transporteurs ABC avec cinq lipoprotéines liant le substrat. Le locus FeuABC codant, pour un transporteur de type ABC, comprend la protéine périplasmique FeuA et les perméases membranaires FeuB et FeuC sont cruciaux pour la croissance en pénurie de fer pour l'assimilation de bacillibactine [108]. L'assimilation de sidérophore de type hydroxamate requiert FhuBCG (transporteur de type ABC ; FhuBG est une protéine transmembranaire et FhuC est une ATPase) avec FhuD (lipoprotéine qui agit comme

une protéine liant le substrat) pour le ferrichrome ou YxeB pour la ferrioxamine [109]. Le système YwbLMN est un système élémentaire d'assimilation de fer orthologue au système cuivre oxydase Fe(III) dépendant chez *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine YwbLMN fournit une voie dominante pour l'assimilation de fer lorsque le milieu est pauvre en acide citrique [109]. En présence de citrate, le transporteur de type ABC YfmCDEF est requis pour une croissance optimale [109].

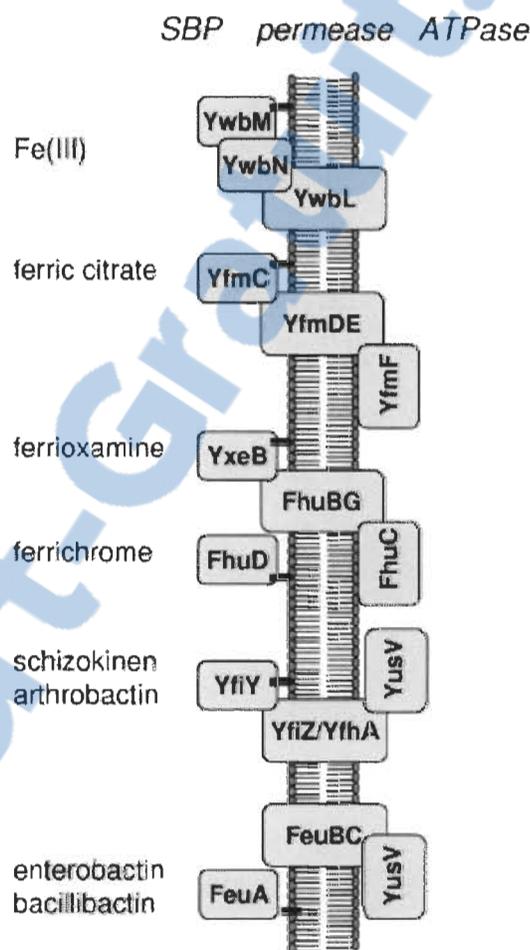


Figure 1.4 Principales voies pour l'assimilation du fer chez *B. subtilis* [99].

La relâche de fer suite à la capture de sidérophore est médiée par différentes enzymes. Chez *Bacillus subtilis*, la relâche du fer implique la protéine Yuil, une trilactone hydrolase qui catalyse l'hydrolyse de la bacillicactine pour la relâche de fer cytosylique [108]. La réponse pour épargner le fer chez *B. subtilis* implique FsrA, un

sRNA qui régule à la baisse la synthèse d'enzymes contenant du fer et des voies de synthèses consommant du fer, et les protéines *fpbA*, *fpbB* et *fpbC* qui ont comme fonction de chaperonner l'ARN régulé par Fur [103].

Il a été démontré que, chez *Bacillus anthracis*, l'anthracheline (codé par *asbAB*) est requise pour la croissance dans un milieu pauvre en fer tandis que l'anthrobactine (codé par *bacACBEF*) est produite en milieu faible en fer, mais n'est pas requise pour la croissance [109].

1.2.4.3 Méthode pour tester la production de sidérophore

Schwyn et Neilands ont développé un milieu permettant de tester la production de sidérophore par les bactéries. Ce milieu constitue une méthode ultrasensible pour la détection de la production de sidérophore due à la présence d'une solution colorante formée de fer et de chrome azurol S [110].

La disponibilité du fer par la production de sidérophores implique l'interaction de ceux-ci avec les différentes sources disponibles dans l'environnement ainsi qu'entre les chélateurs eux-mêmes pouvant dépouiller le fer d'autres sidérophores par un échange de ligand [93]. La capacité de produire des sidérophores est une propriété PGPR et est aussi considérée comme une propriété de biocontrôle, car la chélation du fer permet de restreindre la quantité disponible aux pathogènes.

1.3 Les plantes utilisées

1.3.1 Tomates

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) fait partie de la famille des *Solanaceae*. Selon la classification traditionnelle, la tomate fait partie de la famille des *Solanceae*, de la sous-famille des *Solanoideae* (possède 12 chromosomes) et de la tribu des *Solaneae* [111].

Cette plante provient de l'Amérique du Sud (Pérou, Équateur, Chili, Bolivie, Colombie) et a été mentionnée pour la première fois en dehors de l'Amérique en Italie en 1544 comme plante ornementale ou de curiosité. Cette plante herbacée annuelle possède une grande variété de plant disponible sur le marché. La tomate représente un des fruits les plus consommés et une bonne source de nutriments [111].

La tomate est utilisée comme organisme modèle, car il est possible de faire croître la tomate dans différentes conditions, son cycle de vie est relativement court, son insensibilité à la photopériode (capacité de fleurir à n'importe quel moment de la journée), de la haute autofertilité de la majorité de ses cultivars et son homozygotie, sa pollinisation facilement contrôlée et hybridation ainsi que son génome relativement petit [112].

La tomate est une plante d'une grande importance économique. Au Canada, la tomate est cultivée en serre et est principalement cultivée dans les provinces suivantes : Ontario, Colombie-Britannique, Québec et Alberta [113]. La culture de la tomate était la 17^e en importance au Canada en 2012 [114]. En 2011, le Canada occupait le 6^e rang pour l'importation de tomates fraîches [115].

Plusieurs facteurs abiotiques limitent la croissance de la tomate tels que la température, le niveau d'humidité, les nutriments, etc. et les facteurs biotiques impliquent des bactéries, des fungi, des insectes, des rongeurs, etc. La tomate peut être infectée par différents micro-organismes tel que *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium spp.*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Botrytis cinerea*, etc. [113].

Des recherches utilisant la tomate et des bactéries ont déjà été faites soit pour l'utilisation de bactéries comme biocontrôle pour différentes maladies ou l'utilisation de bactérie comme fertilisant. Une étude a démontré que l'utilisation de *B. licheniformis* permettait de réduire l'infection par *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise [116]. Une étude impliquant un mélange de *Bacillus* a démontré l'efficacité de celui-ci

afin de réduire les flétrissures causées par *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* [117]. Une autre étude avec *Pseudomonas fluorescens* démontrait la capacité de cette bactérie à réduire le virus de la tomate tachetée et augmentait la croissance de la tomate [118]. Ainsi, l'utilisation de PGPR peut s'avérer une alternative aux produits chimiques comme l'ont démontré certaines études.

1.3.2 Poivrons

Les poivrons (*Capsicum annuum*) font partie de la famille de *Solanaceae*. Le genre *Capsicum* représente vingt-sept espèces dont cinq utilisées comme épice et fruit frais donc fait partie les poivrons [119]. *Capsicum annuum* représente l'espèce la plus commune du genre *Capsicum* qui comprend *Capsicum frutescens*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* comme espèces [120].

Cette plante provient d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud et encore aujourd'hui elle est très répandue au Mexique et en Amérique centrale [121]. Elle s'est répandue en Europe à la fin du 16^e et début du 17^e siècle [121]. Il existe une grande variété de poivrons cultivable ainsi que des variations considérables pour la grosseur, la forme et la couleur du fruit [121]. Les poivrons représentent une bonne source de vitamine A, B, C et E [121]. Le goût piquant du poivron provient de composés nommés capsaïcinoïdes principalement la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine [122] et leur contenu varie à l'intérieur des différentes espèces [123].

La culture de poivrons au Canada se fait en serre dans les régions où les températures sont clémentes afin de réduire les coûts en énergie. L'Ontario, la Colombie-Britannique et l'Alberta représentaient les principales régions productrices en 2011 [124]. En 2011, le Canada occupait le 12^e et 6^e rang pour l'importation de piment doux et épicé ainsi que pour l'importation de piment fort et doux frais respectivement [125].

Les poivrons peuvent être infectés par les micro-organismes suivants : *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Leveillula taurica*, le virus de la mosaïque du tabac, etc. [124]. Une étude a démontré que l'utilisation de PGPR (seul ou en mélange) conférait une résistance systémique induite contre la maladie de la tache bactérienne aux poivrons ainsi qu'une augmentation des poids frais et sec [126]. Une étude avec *Bacillus pumilus* INR7 a démontré que cette souche bactérienne permettait de lever l'inhibition de croissance causée par l'application de benzothiadiole (BTH) et permettait aussi de susciter une réponse de résistance systémique induite contre *X. axanopodis* pv. *vesicatoria* qui cause la tache bactérienne [127]. L'utilisation de PGPR peut s'avérer bénéfique pour les poivrons comme certaines études l'ont démontré.

1.4 Objectifs de l'étude

La surexploitation des fertilisants chimiques provoque différentes conséquences nocives pour l'environnement c'est-à-dire pollution de l'eau souterraine, ruissellement et lessivage des éléments nutritifs, etc. Le but de cette étude est donc d'isoler et de caractériser différentes souches bactériennes provenant de la rhizosphère et éventuellement en faire un consortium bactérien pouvant être utilisé comme biofertilisant car un consortium bactérien ne présente pas d'effets toxiques pour le sol et pourrait permet une augmentation de la qualité du sol (solubilisation de phosphate, fixation d'azote atmosphérique, etc.) étant composé d'organismes vivants.

Notre première hypothèse est qu'il existe dans la rhizosphère des souches de *Bacillus* bénéfiques pour les plantes. La première étape pour démontrer cette hypothèse est l'isolation de souches bactériennes à partir d'échantillons de la rhizosphère. Cette étape nous permettra de sélectionner des souches appartenant au genre *Bacillus*, plus spécifiquement du groupe *Bacillus subtilis*. L'isolement des souches se fera par des dilutions en série et la sélection pour l'appartenance au genre *Bacillus* se fera en se basant sur une des caractéristiques définissant le genre soit la production d'endospores en condition aérobie. Pour l'appartenance des souches au groupe *B. subtilis* plus spécifiquement, la sélection se fera selon leur capacité à dégrader le mannitol. La

deuxième étape pour démontrer cette hypothèse est la caractérisation des différentes souches. La caractérisation permettra de sélectionner des bactéries possédant le meilleur potentiel PGPR selon différentes caractéristiques choisies pour les tests. Pour la caractérisation des souches bactériennes, nous effectuerons différents tests, soit des tests pour la solubilisation de phosphate, la fixation d'azote, la production de sidérophore, la production de phytohormones ainsi que la capacité antifongique des souches.

Notre deuxième hypothèse est qu'il est possible d'utiliser les différentes souches isolées comme bio-fertilisant pour différentes plantes. Pour vérifier cette hypothèse, nous testerons les différentes souches sélectionnées selon leur rendement aux différents tests PGPR lors des essais de croissance qui seront effectués avec des plants de tomate et de poivrons en présence des souches bactériennes sélectionnées afin d'observer les effets sur le système racinaire, le rendement en fruit, etc.

L'originalité de ce projet de recherche réside dans la création bio-fertilisant donc un fertilisant qui ne présente pas d'effets toxiques pour le sol et qui permet une augmentation de la qualité du sol (solubilisation de phosphate, fixation d'azote atmosphérique, etc.) étant composé de bactéries. L'utilisation de bactéries en provenance du sol afin d'arriver à la création d'un consortium bactérien qui pourra être utilisé éventuellement comme bio-fertilisant représente un avantage étant donné que nous isolons des bactéries qui colonisent le sol ce qui représente un avantage pour leur survie.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Contrôles

Les contrôles suivants ont été utilisés pour les différents tests : *Bacillus subtilis* GB03 pour les tests d'IAA; *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, *Enterobacter sp.* EB13 pour les sidérophores; *Escherichia coli* pour la solubilisation du phosphate et *Paenibacillus zanthoxily* pour la fixation d'azote.

2.2 Isolement de bactéries provenant de différentes rhizosphères

Un gramme d'échantillon de sol était suspendu dans 10 ml de solution de saline 0,85 % stérile. Après avoir été bien vortexés, les échantillons étaient laissés à 4°C pour 1 heure durant l'attente les échantillons étaient vortexés 3 à 4 fois; ensuite 1 ml d'échantillon était prélevé puis mis dans un tube Eppendorf (1,5 ml) et ensuite chauffé à 65°C pour 30 minutes. Lorsque les dilutions appropriées étaient faites (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}), 100 μ l était utilisés pour ensemercer des géloses CSA. Les souches capables de dégrader le mannitol (passage de rouge au jaune sur la gélose) étaient sélectionnées pour poursuivre les tests de caractérisation. Les souches étaient maintenues de façon routinière sur gélose R2A (Difco).

2.3 Test de caractérisation PGPR

2.3.1 Production d'IAA

Milieu

- 10 g tryptone
- 1 g de NaCl
- 1 g tryptophane

Réactif de Salkowski

- 35 % HClO_4
- 2 % 0.5M FeCl_3

Une éprouvette contenant 10 ml de milieu stérile étaitensemencée avec 10 μl de pré-culture (culture d'environ 16-18 h) et incubée trois jours à 30°C sans agitation. Les tubes étaient vortexés légèrement, ensuite 1 ml était prélevé et centrifugé 10 minutes à 13 000 RPM. Le surnageant était transféré dans un nouveau tube et 2 ml de réactif de Salkowski était ajouté. Une fois le réactif ajouté, les tubes étaient placés dans le noir à température pièce pendant 15 minutes pour permettre le développement d'une couleur rosée si l'échantillon était positif.

2.3.2 Production de sidérophore

Milieu

- M9 minimal salts

Couche supérieure colorante

Solution colorante

- 90,75 mg Chrome azurol S dans 50 ml H_2O distillée
- 109,35 mg de HDTMA dans 40 ml H_2O distillée
- 10 ml de 1 mM FeCl_3 dans 10 mM HCl

Mélanger solution de Chrome azurol S et de FeCl_3 et ensuite ajouter solution de HDTMA.

Solution PIPES et agarose

- 30,24 g de PIPES dans 900 ml H_2O distillée, ajuster le pH à 6.8 avec du KOH 50 %
- 1 % agarose

La solution colorante et la solution de PIPES étaient mélangées puis autoclavées.

Les souches étaient ensemencées sur milieu M9 minimal salts et incubées pour 3 jours à 30°C . La couche supérieure colorante était préparée le matin de l'expérience. Après avoir été autoclavé, la couche supérieure colorante était laissée à refroidir jusqu'à 50°C et 10 ml étaient coulés sur la gélose avec les souches et laisser à température pièce. Un changement de couleur de la couche supérieure colorante (bleu vers orangé) était observé chez les souches positives. Un changement de couleur pouvait prendre jusqu'à 4 jours pour apparaître après avoir coulé l'overlay.

2.3.3 Solubilisation de phosphate

Milieu NBRIP [128]

Par litre

- 10 g de glucose
- 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,2 g KCl
- 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Réactif

- 10 % (p/v) TCA et;

1:1:1:2 ratio de :

- 3M H₂SO₄
- 2.5 % (p/v) sulfate d'ammonium
- 10 % (p/v) acide ascorbique
- H₂O distillé

Les tests de solubilisation de phosphate pouvaient être faits sur gélose et en bouillon. Lorsqu'ensemencer sur gélose, un halo clair apparaissait autour des souches positives après 5 jours d'incubation à 30°C. Pour ce qui est du test en bouillon, il s'agit d'ensemencer le milieu NBRIP (25 ml de milieu dans un erlenmeyer de 250 ml) avec 25 µl de pré-culture et mettre en agitation (100 RPM) à 30°C pendant 5 jours. Après l'incubation de 5 jours, les souches étaient centrifugées 15 minutes à 6000 RPM. Le surnageant était ensuite récolté et une dilution de 1/10 était ensuite faite. Une fois l'échantillon prêt, celui était transféré dans une éprouvette dans laquelle on ajoute 500 µl 10 % (w/v) TCA et 4ml de réactif pour 1 ml de surnageant. L'apparition d'une couleur bleue indiquait un résultat positif et plus le bleu était foncé plus il y avait de phosphate solubilisé.

2.3.4 Fixation d'azote

Azote Free medium (AFM) /1L

- 20 g de sucrose
- 0,1 g K₂HPO₄
- 0,4 g KH₂PO₄
- 0,2 g MgSO₄ 7H₂O
- 0,1 g NaCl
- 0,01 g FeCl₃
- 0,002 g Na₂MoO₄

Les souches étaient ensemencées dans le milieu à AFM et incubées à 30°C pendant 7 jours. Les souches ayant une densité optique (OD₆₀₀) supérieure à 0,050

étaient considérées comme fixatrices d'azote. Les souches qui avaient une densité optique inférieure à 0,010 étaient traitées comme négative pour la fixation d'azote et celles qui avaient une OD₆₀₀ entre 0,010 et 0,050 étaient considérées comme plus ou moins fixatrices d'azote.

2.4 Test antifongique

Au centre d'une gélose PDA était ensemencée la souche phytopathogène à tester et les souches à tester étaient placées à 2 cm du centre. Les pétris étaient incubés à température pièce et dans le noir pendant 1 semaine.

2.5 PCR conventionnelle

L'extraction d'ADN a été effectuée en utilisant l'ensemble QIAamp DNA blood mini kit de QIAGEN. Des PCR 16S, *gyrA* et *rpoB* ont été utilisés pour déterminer quelles souches bactériennes ont été sélectionnées pour les tests de caractérisation. Une PCR *nifH* a aussi été faite pour vérifier si les souches sélectionnées possédaient le gène *nifH* codant pour la nitrogénase.

Les amorces utilisées pour le PCR16S étaient pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et pH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'). Les amorces *gyrA*, BsseqgyrA-F (5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3') et *gyrAR* 948-967 (5'-GTH GCC ATW CCD ACH GCA AT-3') ont été utilisées. Les amorces *rpoB* utilisées étaient *rpoB*-1698F (5'-AAC ATC GGT TTG ATC ACC-3') et *rpoB*-2014R (5'-CGT TGC ATG TTG GTA CCC AT-3'). Les amorces *nifH* utilisées étaient *nifH*-F (5'-GGC TGC GAT CCV AAG GCC AYT CVA CCC G-3') et *nifH*-R (5'-CTG VGC CTT GTT YTC GCG GAT SGG CAT GGC-3').

Les cycles utilisés sont retrouvés dans le tableau 2.1, chaque PCR avait une première dénaturation de 5 minutes à 94°C et une synthèse finale de 10 minutes à 72°C.

Tableau 2.1
Liste des cycles utilisés pour les différentes PCR

PCR	Dénaturation	Appariement des amorces	Synthèse	Nombre de répétitions
16S	94°C/45 sec	45°C/30 sec	72°C/1 min	25
<i>gyrA</i>	94°C/45 sec	50°C/30sec	72°C/1 min	30
<i>rpoB</i>	94°C/45 sec	50°C/30sec	72°C/1 min	30
<i>nifH</i>	94°C/45 sec	50°C/30sec	72°C/45 sec	30

La purification PCR était effectuée avec l'ensemble MinElute PCR purification kit de QIAGEN. Le séquençage des souches était effectué par Institut de biologie intégrative et des systèmes (Plateforme d'analyse génomique) de l'Université Laval, Québec.

2.6 Test de germination

Les graines étaient trempées dans 1 ml de pré-culture de la souche à tester pendant 1 h 30 puis les graines étaient transférées entre deux feuilles de papier essuie-tout humide et enveloppées dans du papier d'aluminium. De l'eau distillée était utilisée comme contrôle. Les graines étaient laissées à température pièce durant 5 jours. Le nombre de graines ayant germé et la longueur de la germination étaient ensuite comptabilisés.

2.7 Test sur différentes plantes avec souches bactériennes sélectionnées

Les graines de tomates utilisées étaient des graines de tomate Roma chez Mr. Fothergill's et les graines de poivrons étaient de graines de poivrons Merveille de Californie de chez McKenzie. Les graines étaient plantées dans Agromix PV20-Culture substrat haute performance de Fafard et Frères ltée (Québec, Canada). Le temps de luminosité pour les plants était de 18 heures d'ensoleillement pour 6 heures de noirceur. La température était maintenue autour de 25°C. Après 2 semaines, les plants étaient

transplantés dans de plus gros pots (21 cm de diamètre). La figure 2.1 montre la configuration des plants durant l'expérience.



Figure 2.1 Configuration des plants de tomates et de poivrons lors des essais de croissance.

Lors d'un traitement, tous les plants recevaient 150 ml d'eau du robinet avec 1×10^6 spores/ml de la souche sélectionnée. Les plants étaient arrosés au besoin avec de l'eau du robinet entre les traitements. Les plants étaient mesurés au départ, pendant et après de 4 mois de traitement. Deux semaines après le dernier traitement, les racines étaient lavées et séchées pour être ensuite pesées.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Plus d'une centaine de souches ont été isolées de différents échantillons de rhizosphère. De toutes les souches isolées des différents sols, 34 ont été choisies pour des tests supplémentaires sur la base de leur réaction positive pour la dégradation du mannitol sur géloses CSA et de ces 34 souches sélectionnées, cinq ont été retenues pour des tests de germination et biofertilisation.

Le tableau suivant résume les différents résultats obtenus lors du criblage des souches dégradant le mannitol pour les différentes caractéristiques PGPR des 34 souches sélectionnées. Les cinq premières souches du tableau ont été choisies pour d'autres tests afin de vérifier leur capacité PGPR.

Tableau 3.1
Criblage des 34 souches capables de dégrader le mannitol
pour différentes caractéristiques PGPR

Souches	Action fongicide	Fixation N ₂ / PCR nif	PO ₄	IAA	Sidérophore	Séquençage 16S
Sol 2-8-2	+/-	-/-	+	+++	+++	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Sol 4-1bB	+	-/+	-	-	+/-	<i>Paenibacillus sp.</i>
Sol 4-1D	+	-/-	-	++	+	<i>B. licheniformis</i>
Sol 26-8-1	+	-/+	-	++	+/-	<i>Paenibacillus sp</i>
Sol 37-5-1	+	-/+	+	-	+	<i>Paenibacillus sp</i>
Sol 4-3	-	+/-	-	-	+++	<i>Paenibacillus sp.</i>
Sol 6-1	-	-	-	-	++	<i>Brevibacillus sp.</i>
Sol 6-3	+	+/-/+	-	+	++	<i>B. megaterium</i>
Sol 7-4	-	++/+	-	++	++	<i>Bacillus sp.</i>
Sol 9-1	-	+/-	-	+/-	+++	<i>Bacillus sp.</i>
Sol 9-4	-	-	-	+	+	<i>Paenibacillus sp</i>
Sol 10-4	+/-	+/+	-	-	+/-	<i>B. licheniformis</i>
Sol 10-6	-	+/-	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
Sol 12-3	-	+/-	+	+/-	++	<i>B. megaterium</i>
Sol 14-3	-	+/-	+	+/-	+	<i>P. alginolytivus</i>
Sol 15-3	-	-	-	+/-	+	<i>B. subtilis</i>

Souches	Action fongicide	Fixation N ₂ /PCR nif	PO ₄	IAA	Sidérophore	Séquençage 16S
Sol 19-1	-	+/-	+/-	+/-	-	<i>B. licheniformis</i>
Sol 19-2	+	-	-	+/-	+++	<i>B. subtilis</i>
Sol 20-3	-	+/-	-	+	+++	<i>B. subtilis</i>
Sol 4-2	-	+/-	-	+/-	-	<i>B. megaterium</i>
Sol 4-4	+	+/-	-	+	-	<i>B. subtilis</i>
Sol 5-4	-	-	-	+	-	<i>B. megaterium</i>
Sol 8-1	-	+/-	+	+	-	<i>B. megaterium</i>
Sol 11-1	-	+/-	-	-	-	<i>B. ginsengihumi</i>
Sol 11-2	+	+/-	+	+	-	<i>B. megaterium</i>
Sol 12-1	+	+/-	+	+	ND	<i>Paenibacillus sp.</i>
Sol 12-2	-	-	-	+/-	-	<i>Paenibacillus sp.</i>
Sol 13-1	-	-	-	+/-	-	<i>Paenibacillus sp.</i>
Sol 14-1	-	-	+	+/-	ND	<i>Bacillus sp.</i>
Sol 17-1	-	+/-/+	-	-	+++	<i>B. subtilis</i>
Sol 17-2	+	+	-	+/-	-	<i>B. megaterium</i>
Sol 18-3	-	+/-	-	+/-	++	<i>Paenibacillus sp.</i>
Sol 19-3	-	+/-	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
Sol 20-1	-	+/-	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>

Les souches ont été testées pour l'inhibition de croissance sur gélose du phytopathogène *Fusarium solani*. Parmi les 34 souches dégradant le mannitol, seulement 12 inhibaient la croissance de *F. solani*. Des 12 souches inhibant la croissance de *F. solani*, les souches Sol 2-8-2, Sol 4-1bB, Sol 4-1D, Sol 26-8-1 et Sol 37-5-1 présentaient les meilleurs résultats aux différents tests de caractérisation PGPR. Les résultats présentés appartiennent aux 5 souches sélectionnées.



Figure 3.1 Tests antifongiques pour *Fusarium solani* avec les cinq souches sélectionnées.

Aucune croissance n'a été observée chez les cinq souches sélectionnées lorsque testées pour la fixation d'azote en bouillon. Cependant, une croissance pouvait être observée chez certaines des 34 souches sélectionnées pour la dégradation positive du mannitol lorsque les tests étaient fait sur gélose. Une PCR *nifH* a été faite afin de confirmer s'il y avait présence du gène *nifH* chez les souches. Seulement trois des cinq souches ont été positives pour la présence du gène *nifH*. Lors des PCR *nifH*, l'ADN de la souche *Paenibacillus zanthoxily* était utilisée comme contrôle positif.



Figure 3.2 PCR *nifH* chez les cinq souches Sol sélectionnées.

La production d'IAA a été retrouvée chez vingt-quatre des trente-quatre souches sélectionnées selon différents niveaux de production (variation de l'apparition d'une couleur rosée suite à l'ajout du réactif de Salkowski). Des cinq souches sélectionnées, Sol 2-8-2 était le plus grand producteur d'IAA tandis que Sol 37-5-1 en produisait le moins (Figure 3.3).



Figure 3.3 Tests IAA. A : production d'IAA chez les cinq souches sélectionnées, B : meilleur producteur d'IAA, C moins bon producteur d'IAA.

La solubilisation de phosphate a été testée sur gélose et en bouillon. Sur gélose, seulement neuf souches ont obtenu un résultat positif. Chez les cinq souches sélectionnées seulement Sol 2-8-2 et Sol 37-5-1 avaient des halos clairs autour des colonies. De plus, certaines souches ont été testées pour la solubilisation de phosphate en bouillon. Le même milieu et temps d'incubation ont été utilisés. Suite à l'ajout du réactif, une couleur bleue apparaissait dans le tube avec différentes intensités selon la quantité de phosphate relâché dans le surnageant.

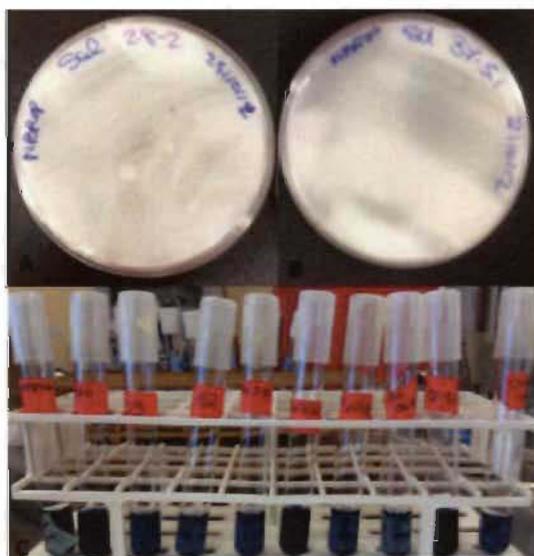


Figure 3.4 Solubilisation du phosphate. A : Réaction positive de la souche Sol 2-8-2, B : Réaction positive de la souche Sol 37-5-1, C : Résultats en bouillon de la solubilisation du phosphate.

Les souches ont ensuite été testées pour la production de sidérophore selon la méthode décrite par Pérez-Miranda *et al.* [129]. Les souches étaient ensemencées sur un milieu minimal afin qu'il n'y ait pas de source de fer possible et après une incubation de trois jours à 30°C recevait la couche supérieure colorante. L'apparition d'une couleur jaune signifiait que la souche produisait des sidérophores et l'apparition de cette couleur pouvait prendre jusqu'à quatre jours. Toutes les souches sélectionnées produisaient des sidérophores. La meilleure productrice de sidérophore était la souche Sol 2-8-2 et les moins bonnes Sol 4-1bB et Sol 26-8-1.



Figure 3.5 Production de sidérophore après incubation durant 4 jours.

Des réactions PCR 16S, *gyrA* et *rpoB* ont été faites pour identifier les souches. Les souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D appartiennent au genre *Bacillus* tandis que les souches Sol 4-1bB, Sol 26-8-1 et Sol 37-5-1 appartiennent au genre *Paenibacillus*. Le tableau suivant résume les résultats obtenus après le séquençage des PCRs.

Tableau 3.2
Identification par PCR des souches Sol sélectionnées

Souche	16S	<i>gyrA</i>	<i>rpoB</i>
Sol 2-8-2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Sol 4-1bB	<i>Paenibacillus sp.</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
Sol 4-1D	<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Sol 26-8-1	<i>Paenibacillus sp.</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	ND
Sol 37-5-1	<i>Paenibacillus sp.</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>

Après les tests de caractérisation des différents traits PGPR, des tests de germination ont été faits avec des graines de radis et de tomates. Les souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D présentaient le meilleur taux de germination tandis que la souche Sol 37-5-1 inhibait la croissance des graines de radis (Figures 3.6 et 3.7).

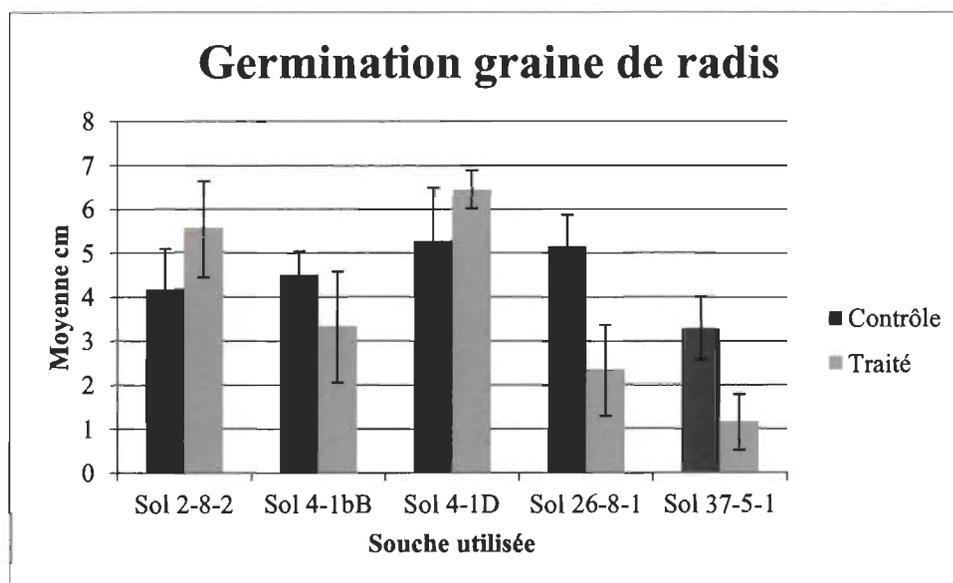


Figure 3.6 Croissance moyenne des graines de radis lors des tests de germination.

Les graines traitées avec les souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D avaient une longueur moyenne de 32 % et 22.5 % respectivement plus élevée que le contrôle. Tandis que les graines traitées par les souches Sol 4-1bB, Sol 26-8-1 et Sol 37-5-1 étaient 26 %, 55 % et 65 % respectivement plus petites que le contrôle.

Tableau 3.3
Longueur moyenne (cm) de la germination des graines de tomates
selon le traitement reçu

Sol 2-8-2		Sol 4-1bB		Sol 4-1D		Sol 26-8-1		Sol 37-5-1	
Contrôle	Traité	Contrôle	Traité	Contrôle	Traité	Contrôle	Traité	Contrôle	Traité
4,19	5,5	4,51	3,33	5,28	6,46	5,15	2,33	3,29	1,16
± 0,92	± 1,10	± 0,53	± 1,26	± 1,21	± 0,43	± 0,73	± 1,03	± 0,73	± 0,64



Figure 3.7 Germination des graines de radis; contrôle : eau distillée, traitée : bouillon bactérien.

Chez les graines de tomates, seule la souche Sol 2-8-2 avait un effet positif sur la germination de celles-ci et la souche Sol 37-5-1 n'avait pas d'effet sur la germination des graines de tomates (Figures 3.8 et 3.9). La longueur de la germination des graines traitées avec les souches Sol 4-1bB, Sol 4-1D et Sol 26-8-1 étaient toutes plus petites que le contrôle.

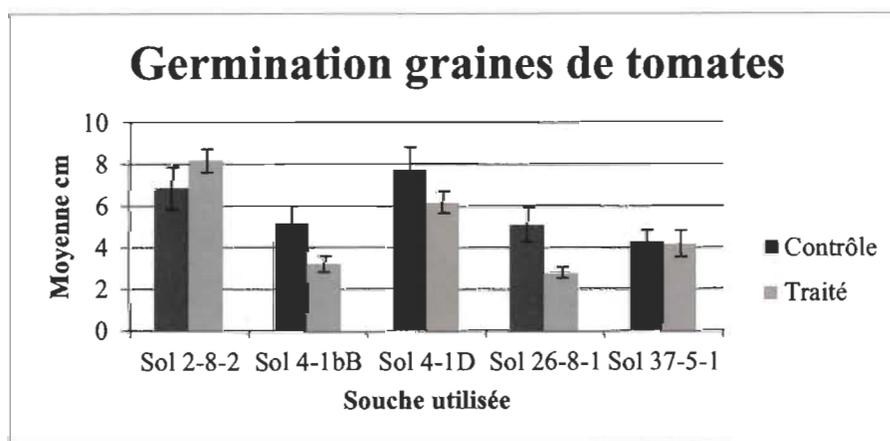


Figure 3.8 Croissance moyenne des graines de tomate lors des tests de germination.

La germination des graines traitées avec la souche Sol 2-8-2 était 19 % plus longue que le contrôle. La souche Sol 37-5-1 avec seulement 2 % d'écart avec le contrôle tandis que les graines traitées souches Sol 4-1bB, Sol 4-1D et Sol 26-8-1 étaient 38 %, 20 % et 46 % plus petites que le contrôle. Les longueurs moyennes sont résumées dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4
Longueur moyenne (cm) de la germination des graines de tomates
selon le traitement reçu

Sol 2-8-2		Sol 4-1bB		Sol 4-1D		Sol 26-8-1		Sol 37-5-1	
Contrôle	Traité	Contrôle	Traité	Contrôle	Traité	Contrôle	Traité	Contrôle	Traité
6,91	8,17	5,18	3,2	7,72	6,17	5,11	2,78	4,26	4,17
± 1,01	± 0,56	± 0,83	± 0,38	± 1,09	± 0,52	± 0,81	± 0,27	± 0,56	± 0,64



Figure 3.9 Test germination sur graine de tomate; contrôle : eau distillée, traitée : bouillon bactérien.

Les souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D ont été testées comme fertilisant avec des plants de tomates et de poivrons.

Les plants ont été mesurés au début du traitement, pendant et à la fin du traitement. Les plants de tomates du groupe contrôle GB03 étaient les plantes les plus petites en moyenne tandis que le groupe traité avec Sol 2-8-2 était le plus grand (Figure 3.11).

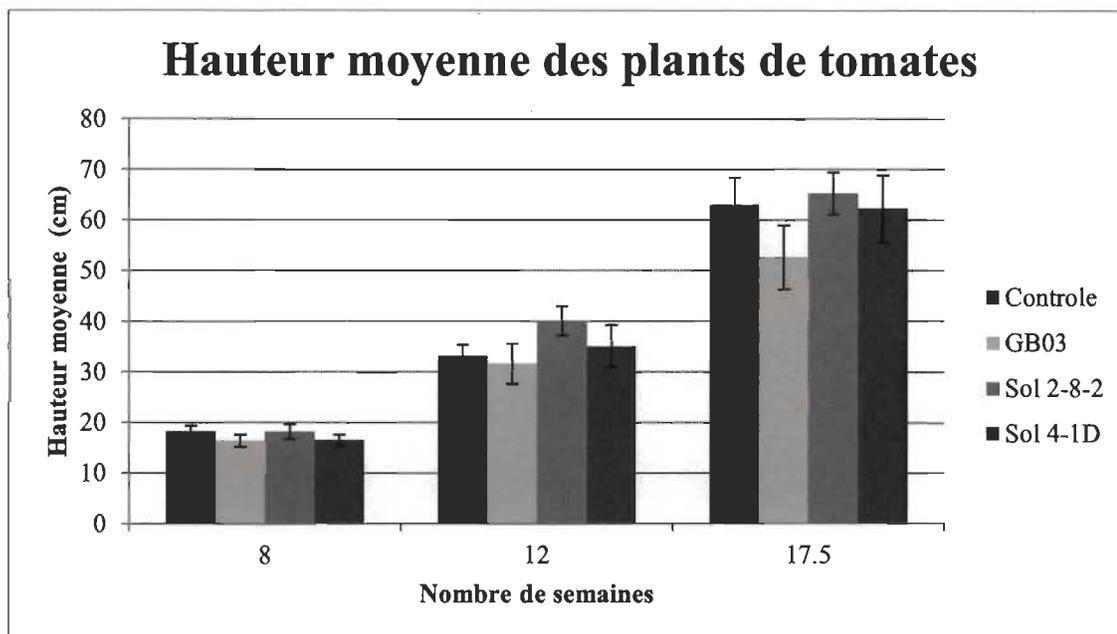


Figure 3.10 Mesures des plants de tomates durant l'expérience.

Après quatre traitements, les souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D démontraient une bonne croissance comparativement aux deux contrôles (eau distillée seulement et souche GB03) qui avaient une croissance semblable (Figure 3.12). À la fin du traitement, les plus grands plants étaient ceux traités avec la souche Sol 2-8-2.



Figure 3.11 Plants de tomates après 4 traitements. De gauche à droite : Contrôle négatif, GB03, Sol 2-8-2 et Sol 4-1D.

Après le dernier traitement, les racines des plantes ont été lavées et laissées à sécher pour pouvoir obtenir leur poids sec.

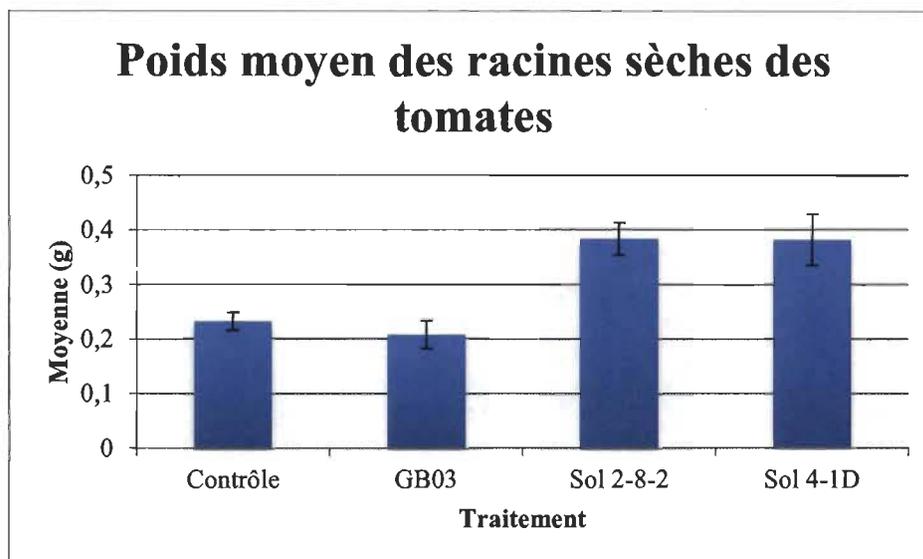


Figure 3.12 Poids moyen des racines de plants de tomates après 8 traitements.

Le tableau suivant résume la moyenne des mesures prises (hauteur des plants et poids de racines sèches) durant le test utilisant des différentes souches comme fertilisant.

Tableau 3.5

Résumé des mesures moyennes prises durant les tests sur les plants de tomates, soit pour la hauteur des plants à différents moments et le poids des racines sèches à la fin des traitements

Traitement	Hauteur (cm) 22/8/13	Hauteur (cm) 19/9/13	Hauteur (cm) 22/10/13	Poids racine sèche (g)
Contrôle négatif	18,18 ± 1,18	33,23 ± 2,16	63,08 ± 5,35	0,232 ± 0,02
GB03	16,33 ± 1,21	31,58 ± 3,99	52,62 ± 6,33	0,208 ± 0,03
Sol 2-8-2	18,12 ± 1,45	40,11 ± 2,85	65,22 ± 4,16	0,385 ± 0,03
Sol 4-1D	16,45 ± 1,11	35,07 ± 4,18	62,22 ± 6,64	0,382 ± 0,05

Durant la même période, des tests ont été faits avec les mêmes souches sur des poivrons. Les plantes de poivrons du groupe contrôle, qui recevait seulement de l'eau, étaient les plantes les plus petites en moyenne tandis que le groupe traité avec Sol 4-1D était le plus grand groupe (Figure 3.13).

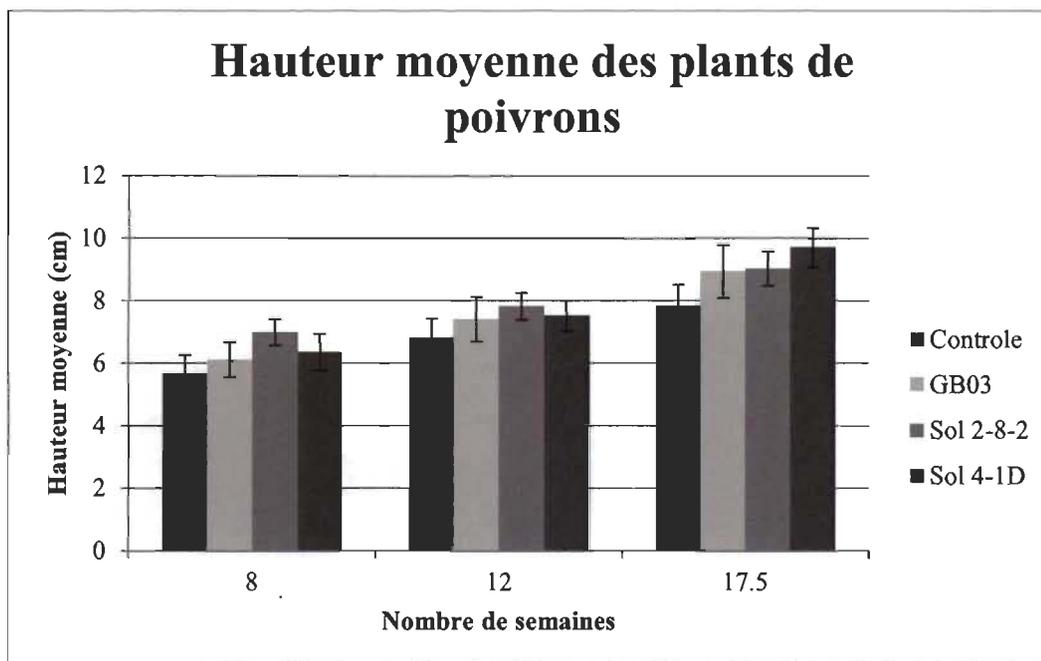


Figure 3.13 Mesures des plants de poivrons durant l'expérience.

Le groupe de poivrons traité avec la souche GB03 avait la meilleure croissance après quatre traitements tandis que le groupe traité avec Sol 2-8-2 avait la plus faible croissance.



Figure 3.14 Plants de poivrons après 4 traitements. De gauche à droite : Contrôle négatif, GB03, Sol 2-8-2 et Sol 4-1D.

Après le dernier traitement, les racines des plantes ont été lavées et laissées à sécher pour pouvoir obtenir leur poids sec.

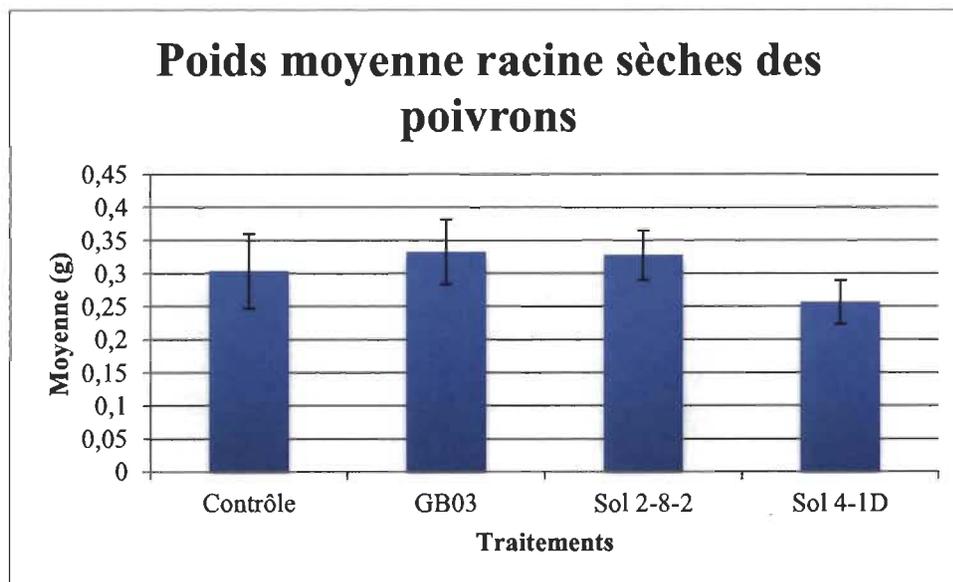


Figure 3.15 Poids moyen des racines séchées de plants de poivrons après 8 traitements.

Le tableau suivant résume la moyenne des mesures prises au début, durant et à la fin du traitement ainsi que le poids moyen des racines sèches.

Tableau 3.6

Résumé des mesures prises durant l'expérience avec les poivrons, soit la hauteur (cm) des plants à différent temps et le poids des racines sèches

Traitement	Hauteur (cm) 22/8/13	Hauteur (cm) 19/9/13	Hauteur (cm) 22/10/13	Poids racine sèche (g)
Contrôle négatif	5,67 ± 0,61	6,81 ± 0,62	7,85 ± 0,70	0,303 ± 0,06
GB03	5,11 ± 0,60	7,41 ± 0,74	8,93 ± 0,83	0,333 ± 0,05
Sol 2-8-2	6,98 ± 0,42	7,82 ± 0,44	9,02 ± 0,55	0,328 ± 0,04
Sol 4-1D	6,35 ± 0,58	7,52 ± 0,49	9,69 ± 0,63	0,280 ± 0,03

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Avec la surexploitation des différents fertilisants et pesticides chimiques, le besoin de trouver des alternatives moins dommageables pour l'environnement est grandissant. Le besoin d'alternatives respectueuses de l'environnement provient des conséquences qu'engendre l'utilisation de produits chimiques tant au niveau des coûts de production et la rentabilité [1] qu'à la pollution causée par l'utilisation de pesticides et d'engrais chimiques dû au ruissellement d'azote et de phosphate [130]. Pour ce projet, nous voulions isoler différentes bactéries appartenant au genre *Bacillus* et caractériser leur potentiel PGPR pour en faire un consortium bactérien pouvant être utilisé comme biofertilisant, donc une alternative aux fertilisants chimiques. Nous voulions des souches du genre *Bacillus* appartenant au groupe *B. subtilis*, car celles-ci sont considérées comme généralement sûres et parce que le groupe *B. cereus* regroupe les différentes souches pathogènes soit *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Étant donné que la formulation des fertilisants traditionnels utilise un ratio N-P-K, nous avons ciblé certains traits PGPR (fixation d'azote, solubilisation de phosphate, production d'IAA et de sidérophore) qui permettent de jouer le même rôle que les fertilisants traditionnels. Ainsi la plupart des souches que nous avons isolées présentaient au moins une caractéristique PGPR positive selon les différents tests et nous avons pu démontrer la possibilité d'utiliser certaines d'entre elles comme fertilisant.

Lors de l'isolement par dilution en série des souches, provenant de différentes rhizosphères, nous avons chauffé les échantillons à 65°C afin de sélectionner les bactéries capables de sporuler. La sporulation représentait le premier critère de sélection suivi de la capacité à dégrader le mannitol afin de poursuivre avec les différents tests de caractérisation PGPR. La sporulation nous permettait de sélectionner les bactéries appartenant au genre *Bacillus* puisqu'une de leurs caractéristiques principales est leur

capacité à sporuler en condition aérobie. La sporulation en condition aérobie est définie comme étant la capacité des bactéries de sporuler en présence d'oxygène. Cette caractéristique nous permet d'éliminer les bactéries du genre *Clostridium* qui sporulent seulement en l'absence d'oxygène donc en condition anaérobie. La sélection par la dégradation du mannitol nous permettait d'éliminer les souches du groupe *B. cereus* (potentiellement pathogènes), car celles-ci ne sont pas capables de dégrader le mannitol.

Les 34 souches choisies après l'isolement et selon leur capacité à dégrader le mannitol appartenaient au groupe des *Bacillus*, mais quelques-unes appartenaient au genre *Paenibacillus*. L'isolation a été faite de la façon suivante : les échantillons ont été chauffés afin de favoriser les bactéries capable des sporuler et par la suite leur capacité à dégrader le mannitol a déterminé préliminairement leur groupe d'appartenance soit dans le groupe *cereus* ou dans le groupe *subtilis* et autres. Suivant les différentes étapes d'isolations des bactéries, leur appartenance au genre *Bacillus* et *Paenibacillus* a été déterminée à l'aide d'une PCR pour l'ARN ribosomique de la sous-unité 16S. Le genre *Paenibacillus*, signifiant presque *Bacillus*, a été créé au début des années 1990, car les bactéries appartenant à ce genre découlent du genre *Bacillus*, mais sont phylogénétiquement distinctes [131]. Une PCR *gyrA* (gène de la sous-unité A de l'ADN gyrase) a été faite pour les cinq souches qui ont été choisies afin de préciser l'espèce bactérienne. La PCR *gyrA* permet de distinguer les différentes espèces de *Bacillus*, qui sont étroitement liées entre elles, notamment celles du groupe *subtilis* [132]. Une PCR *rpoB* a aussi été faite afin d'avoir une autre PCR pour confirmer l'appartenance des souches. La PCR *rpoB* (sous-unité β de l'ARN polymérase) permet de distinguer les *Bacillus* entre eux [133]. Le tableau 3.2 résume les résultats obtenus pour les PCR 16S, *gyrA* et *rpoB*.

Le biocontrôle de pathogènes par les bactéries pourrait permettre la diminution de l'utilisation de pesticides chimiques afin de contrôler les phytopathogènes. Ainsi les différentes souches, isolées sur gélose CSA, ont été testées pour l'inhibition de croissance du pathogène *Fusarium solani* (Figure 3.1). *F. solani* est un phytopathogène pour plusieurs espèces de plantes telles que les tomates et les poivrons. L'inhibition de

croissance de *F. solani* n'était pas une caractéristique commune puisque seulement douze des souches sélectionnées étaient capables de le faire. Il est toutefois possible que nos souches soient capables d'inhiber la croissance d'autres phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporum*, *Rhizotonia solani*, *Botrytis cinerea*, etc.

Étant donné que la capacité de fixer l'azote n'est pas un trait caractéristique des *Bacillus* [54], il est normal que très peu de nos souches démontrent la capacité de fixer l'azote. Les tests de fixation d'azote ont été faits sur gélose en premier lieu (résultats non présentés) cependant, lorsque les tests ont été faits sur gélose, il était possible d'obtenir de la croissance (différents niveaux allant de faible à une très bonne croissance) pour la plupart des souches. Cette croissance obtenue pouvait être diminuée en lavant l'agar c'est-à-dire en faisant des passages d'agar dans de l'eau distillée avant la stérilisation afin de réduire les contaminants possibles. Ces lavages permettaient de réduire les contaminants possibles dans le milieu qui pouvaient fournir des traces d'azote aux bactéries durant leur croissance. Cependant lorsque le milieu utilisé pour la fixation d'azote était en bouillon les niveaux de croissance observés n'était pas les mêmes que sur pétri et la plupart des souches ne présentaient pas de croissance (voir section Résultats). Ainsi, les résultats des tests de fixation d'azote sur pétri et ceux en bouillon ont été comparés afin de choisir la méthode la plus fiable. C'est pourquoi les tests en bouillon étaient plus fiables au niveau des résultats, car l'absence d'agar éliminait la possibilité d'avoir des traces d'azote.

Une PCR a aussi été faite pour voir si les cinq souches sélectionnées possédaient le gène *nifH* (gène codant pour la sous-unité réductase (Fe-protéine) de la nitrogénase). Des cinq souches, seulement celles appartenant au genre *Paenibacillus* possédaient le gène *nifH*. Il est bien de se rappeler que la présence d'un gène n'implique pas nécessairement l'utilisation de son produit par la bactérie, mais bien la possibilité de son utilisation comme le démontre nos résultats pour la fixation d'azote, car aucun de nos isolats n'était capable de fixer l'azote même si trois souches possédaient le gène *nifH*. Il est possible que les souches possèdent les gènes codant pour les nitrogénases non

conventionnelles (par exemple *anfH* ou *vnfH*) ou que les amorces utilisées n'étaient pas assez spécifiques pour nos souches.

La production d'IAA, par les bactéries, est une caractéristique intéressante étant donné que l'IAA est une phytohormone impliquée dans plusieurs aspects de la croissance de la plante. Les résultats obtenus pour la production de l'auxine IAA (Figure 3.3) ne sont pas surprenants étant donné qu'il a été démontré qu'environ 80 % des bactéries de la rhizosphère sont capables de produire de l'IAA [66]. Les meilleurs producteurs d'IAA parmi nos souches appartiennent à l'espèce *Bacillus subtilis* soit les isolats Sol 2-8-2 et Sol 4-1D. Il serait bien de déterminer la quantité d'IAA que les différentes souches sont capables de produire, car l'IAA lorsque présente en trop grande quantité peut s'avérer nocive pour la plante [62]. Étant donné que le réactif de Salkowski n'est pas spécifique seulement à l'IAA, mais qu'il réagit aussi avec l'indole-acide pyruvique (IPyA) et l'indole-acétamide (IAM) [70], deux intermédiaires des voies de synthèse de l'IAA, il serait suggéré de faire un test de HPLC. Un test de HPLC, nous permettrait de déterminer si les souches produisent de l'IAA ou bien si l'on retrouve les intermédiaires des voies de synthèses ou encore un mélange. Cette méthode permet de séparer les composantes d'un mélange, de les identifier et de les quantifier.

Très peu de souches étaient capables de solubiliser le phosphate sur gélose, seulement les souches Sol 2-8-2 et Sol 37-5-1 étaient positives (Figure 3.4). Lorsque la solubilisation de phosphate a été testée en bouillon, nous obtenions de meilleurs résultats. Ces meilleurs résultats peuvent être expliqués par le fait que la solubilisation de phosphate était déterminée par la quantité de phosphate soluble présente dans le surnageant avec l'ajout d'un réactif qui donnait une coloration bleue (plus la quantité de phosphate soluble dans le surnageant était élevée plus la couleur bleue était foncée). Étant donnée le faible nombre de souches positives sur gélose, nous avons essayé d'incorporer les bactéries à l'intérieur du milieu refroidi (entre 50°C et 55°C, résultats non présentés). Les résultats étaient plus facilement observables, car la croissance se faisait à l'intérieur de la gélose et non en surface : ainsi le halo entourait la colonie de façon plus claire que lorsque les bactéries étaient ensemencées à la surface de la gélose.

Il est possible que le faible nombre de souches capable de solubiliser le phosphate soit dû au fait que les souches testées n'étaient pas capables d'utiliser ou utilisaient faiblement la source de phosphate insoluble (du phosphate de calcium dans notre cas) fourni dans le milieu. Les différentes souches pourraient être capables d'utiliser d'autres sources de phosphate telles que le phosphate d'aluminium, le phosphate de fer, le phytate ou encore le phosphonate.

La production de sidérophore représente une caractéristique importante, car cela permet aux bactéries de chélater le fer disponible dans l'environnement et ainsi le rendre indisponible pour les pathogènes. Les souches sélectionnées produisaient des sidérophores selon différents niveaux d'intensité de couleur apparue. La meilleure souche productrice de sidérophore était Sol 2-8-2 et les moins bonnes étaient Sol 4-1bB et Sol 26-8-1 (Figure 3.5). Les souches Sol 4-1bB et Sol 26-8-1 développaient un changement de couleur dans l'overlay après quelques jours. Il est possible que cette apparition de couleur lente comparativement aux autres souches soit due à une production de sidérophores plus lente ou plus faible pour ces deux souches ou encore que c'est deux souches sécrètent un chélateur métabolique tel que l'acide citrique, qui possède une faible affinité pour le fer [110]. Cette caractéristique a été testée avec l'aide d'un overlay, car nous n'obtenions aucune croissance sur gélose lorsque nous utilisons la méthode traditionnelle développée par Schwyn et Neilands [110]. L'absence de croissance est probablement due à la présence de HDTMA (un détergent cationique qui stabilise le complexe Fer-Chrome azurol S [134] et qui permet au CAS d'être compétitif pour le fer [110]) dans le milieu.

Il pourrait être avantageux de tester les souches pour d'autres caractéristiques PGPR telles que la solubilisation de potassium, la production d'ACC déaminase (enzyme diminuant les niveaux d'éthylène, hormone inhibant la croissance des plants dépendant de ses niveaux, en dégradant le précurseur de celle-ci), la production de phytohormones telles que les gibbérellines, les cytokinines, etc., la production de chitinases et chitosanases (enzymes dégradant la chitine et le chitosan respectivement, deux composantes de la paroi des champignons) ou encore vérifier la sécrétion

d'antibiotiques. Il serait aussi bien de vérifier par PCR, la présence des différents gènes impliqués chez les différentes caractéristiques testées. Ainsi vérifier la présence de l'opéron *phoR-phoP* pour la solubilisation de phosphate ou la présence des gènes *phy* codant pour les phytases, la présence de l'opéron *dhb* pour la production de sidérophore, la présence des gènes impliqués dans les différentes voies de synthèse de l'IAA telle que le gène *ipdC*, le gène *dhaS*, le gène *yhcX* pour n'en nommer que quelques-uns et de tester différentes amorces pour les gènes *nif* pour la fixation de l'azote.

Lors des tests de germination et des tests utilisant les souches comme fertilisant pour les plantes, le contrôle principal utilisé était l'eau. L'utilisation de l'eau comme contrôle nous permettait ainsi d'évaluer la capacité PGPR de souches bactériennes testées sans l'interférence d'une source extérieure de nutriments.

Avant d'effectuer les tests de germination avec les 5 souches sélectionnées, des tests préliminaires ont été faits avec la souche *Bacillus subtilis* GB03 sur des graines de concombre, de radis, de tomates, de chou et d'*Arabidopsis thaliana*. La souche *Bacillus subtilis* GB03 est une souche déjà connue pour ses propriétés PGPR et commercialisée par Bayer Crop Science. La souche GB03 augmentait la longueur moyenne de germination chez les graines de concombre, de radis et de tomates. La souche GB03 ne semblait pas avoir d'effet chez les graines de chou et aucune germination n'a été constatée pour les graines d'*Arabidopsis thaliana* tant chez le contrôle que chez les graines traitées. Des tests de germination ont été faits pour évaluer la capacité des souches à augmenter le taux de germination chez les graines de radis et tomates (Figures 3.6 et 3.8). Il est à noter que les graines de radis ont germé plus rapidement que les graines de tomate. La souche Sol 2-8-2 représentait la meilleure aide pour la germination des deux sortes de graines utilisées tandis que Sol 37-5-1 n'aidait pas ou aidait peu la germination dans les deux cas.

Pour les tests de germination sur graines de radis, une inhibition de croissance était constatée lorsque les graines étaient trempées dans un bouillon de culture O/N de la souche Sol 37-5-1. Les souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D augmentaient le taux de

germination des graines de radis. Il est possible que la souche Sol 37-5-1 produise des métabolites qui inhibent la germination de graines de radis tandis que les souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D en produisent qui favorise la germination des graines de radis. La germination des graines de tomates était favorisée lorsque les graines avaient été trempées dans du bouillon de la souche Sol 2-8-2. La souche Sol 37-5-1 ne démontrait aucun effet sur le taux de germination des graines de tomates.

Il serait intéressant de vérifier si les 5 souches peuvent augmenter la germination de différentes graines et de regarder si la germination est diminuée ou augmentée lorsque les souches sont utilisées en combinaison par exemple est-ce que le fait de tremper les graines de radis dans un bouillon contenant les souches Sol 2-8-2 et Sol 37-5-1 permet d'augmenter la germination de celles-ci sachant que la souche Sol 37-5-1 a un effet négatif sur leur germination.

Les tests effectués avec les différentes souches comme fertilisant ont été faits avec des plants de tomates et de poivrons (Figures 3.10 et 3.13). L'utilisation de bactérie comme fertilisant augmentait la croissance des plantes dans les deux cas comparativement au contrôle qui lui recevait seulement de l'eau comme traitement. Les plants de poivrons semblaient mieux répondre à l'ajout de bactéries dans l'eau comme fertilisant que les plants de tomates en général, car la différence, entre le contrôle et les souches bactériennes, était plus marquée chez les poivrons que chez les tomates à la fin des traitements. Néanmoins, les plants de tomates démontraient une amélioration de croissance lorsque des bactéries étaient ajoutées à l'eau. Il est à mentionner que des tests préliminaires ont été faits avec des plants de tomates et de poivrons traités avec la souche 03. Ces tests préliminaires nous ont permis de déterminer la grosseur de pot à utiliser ainsi que la quantité de bactéries à utiliser pour les traitements. Nous avons remarqué que plus le pot était grand plus les plants de tomate étaient grands et le contraire était aussi vrai les plus petits pots avaient les plus petits plants.

Il est important de mentionner que tous les plants ont reçu après 14 semaines, une dose d'engrais 20-20-20 tout usage. Cette dose correspondait à 25 % de la quantité

recommandée par le fabricant. Il a dû être nécessaire de donner de l'engrais après un certain temps, car l'apparence des plantes changeait cependant nous n'avons pas investigué la cause du changement d'apparence. Il pourrait s'agir d'une perte de nutriments pouvant être attribuée à la croissance de la plante ainsi qu'à l'eau reçue qui crée un effet de lavement. La quantité d'engrais donnée n'était pas assez élevée pour affecter les résultats, mais assez efficace pour redonner des nutriments à la terre.

Le meilleur traitement pour augmenter la croissance de la tomate était la souche Sol 2-8-2 et le moins bon traitement la souche GB03. Les deux souches bactériennes que nous avons isolées et caractérisées présentaient une meilleure croissance au niveau des plants lorsqu'utilisées comme fertilisant comparativement à l'eau cependant l'augmentation de croissance n'était pas énorme. La croissance des plants de tomates, traitées avec les bactéries, est plus marquée durant les quatre premiers traitements que ceux recevant de l'eau. Les plants recevant seulement de l'eau ont eu une plus grande croissance (presque doublée au niveau de la hauteur) entre la 2^e mesure et la fin du traitement comparativement aux plants recevant les différentes souches bactériennes. Cette augmentation peut être expliquée par le fait que les plants ont reçu du fertilisant après 14 semaines soit entre la 2^e mesure des plants et la fin des traitements ce qui redonnait des nutriments à la terre.

Le poids moyen des racines sèches des plants de tomates suivait la logique voulant que plus les plants soient grands plus ils avaient de racines donc un poids racinaire plus élevé que les plus petits plants. Ainsi les plants de tomates traitées avec la souche 03 (groupe ayant la plus petite hauteur moyenne à la fin des traitements) avaient le plus petit poids moyen pour les racines sèches. Les plants traités avec les deux souches Sol 2-8-2 et Sol 4-1D avaient le même poids moyen pour leurs racines sèches.

Tous les plants traités avec les bactéries (bactéries + eau) avec une hauteur moyenne plus élevée que chez les plants recevant seulement de l'eau. L'exposition à la souche Sol 2-8-2 permettait d'obtenir des plants plus grands que le contrôle malgré une croissance moindre pendant les 17,5 semaines. Il est possible que puisque les plants

étaient un peu plus grands au départ que les autres plants, leur croissance soit ralentie durant les traitements ou que les effets des bactéries soient moins visibles. Il est à noter que l'ajout de fertilisant ne semble pas avoir affecté la croissance des plants recevant seulement de l'eau, car la croissance moyenne entre le début des traitements et la mesure prise suite à quatre traitements est sensiblement la même que celle entre la 2^e mesure et la fin des traitements. Dans le cas des tests avec les poivrons, les plus petits plants appartenaient au groupe recevant seulement de l'eau.

Le poids moyen des racines sèches des poivrons ne variait pas énormément entre les différents traitements, mais ne suivait pas la logique voulant que les plus petits plants aient le plus petit poids moyen. Malgré le fait que les poivrons traités avec Sol 4-1D aient la meilleure croissance à la fin des traitements, le poids moyen des racines sèches était le plus faible. Il est probable que ce faible poids soit dû à la perte de racines lors du lavage de celles-ci malgré un lavage soigneux. Il pourrait être intéressant d'essayer des tests hydroponiques afin d'éviter l'étape de lavage des racines et donc la possible perte ou cassure de celles-ci.

Il est important de mentionner que des tests ont aussi été faits sur des plants de concombres en même temps que les tests avec les plants de tomates et poivrons. Cependant, les résultats ne sont pas mentionnés, car les conditions de croissance n'étaient pas idéales pour la croissance de concombre. Durant les tests, il est arrivé à plusieurs reprises que certains plants meurent ou perdent une partie de leur tige, car celle-ci avait séché. Cette mortalité ou perte de tige causaient une hauteur moyenne faussée à la deuxième et la troisième mesure étant donné que certains plants pouvaient perdre parfois près de la moitié de leur hauteur. Il a été observé que les plants traités avec les bactéries avaient un meilleur taux de survie que le groupe contrôle. Cependant il est à noter que l'ajout de bactéries ne prévenait pas les cassures de tige.

Il serait intéressant d'effectuer d'autres tests sur les plants de tomates et de poivrons avec les autres souches isolées (Sol 4-1bB, Sol 26-8-1 et Sol 37-5-1) et avec des combinaisons des souches isolées. De plus, il serait avantageux de tester les

différentes souches soient seules ou en combinaison avec d'autres plantes afin de vérifier l'efficacité et la possibilité d'utiliser les souches comme biofertilisant pour plusieurs espèces de plante.

Avec ce projet, nous avons démontré qu'il est possible d'isoler et caractériser des bactéries du genre *Bacillus* provenant de la rhizosphère pour leur potentiel PGPR et de les utiliser comme fertilisant pour différentes plantes.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Pour ce projet, nous voulions isoler différentes bactéries appartenant au genre *Bacillus* et caractériser leur potentiel PGPR pour en faire un consortium bactérien pouvant être utilisé comme biofertilisant. Nous ne recherchions pas nécessairement la meilleure souche c'est-à-dire la souche qui obtenait les meilleurs résultats aux différents tests de caractérisation, mais bien différentes souches se présentant avec un bon potentiel PGPR. Nous avons réussi à isoler des souches du genre *Bacillus* cependant certaines de nos souches isolées appartenaient au genre *Paenibacillus*. Les souches appartenant au genre *Bacillus* et *Paenibacillus* que nous avons isolées possédaient plusieurs caractéristiques PGPR. Ces caractéristiques et leur capacité à sporuler les rendent intéressantes à utiliser comme biofertilisant. La sporulation des souches jouera un rôle important dans leur formulation, car la stabilité des produits représente un critère important pour la mise en marché.

De plus, ce projet nous a permis la mise au point des différents tests de caractérisation PGPR pour les souches de *Bacillus*. Tous les tests ont été optimisés afin qu'ils soient le plus simple à faire et facile à répéter.

Chez les cinq souches sélectionnées, Sol 2-8-2 était la souche qui obtenait de très bons résultats aux différents tests de caractérisation PGPR donc représente la souche la plus performante que nous avons isolée. Pour ce qui est des différents tests, la fixation d'azote et la solubilisation de phosphate n'étaient pas des caractéristiques communes chez nos isolats. La production d'IAA et de sidérophores était retrouvée chez la plupart des isolats donc représentaient des caractéristiques plus communes.

Parmi les souches isolées de différentes rhizosphères, certaines permettaient l'augmentation du taux de germination des graines de tomates et de radis tandis que certaines possédaient peu ou pas d'effets sur la germination. De plus, lorsque certaines souches ont été testées comme fertilisant pour des plants de tomates et de poivrons, il était possible de voir une augmentation de croissance chez les plants recevant les bactéries.

Il serait bien de vérifier si la capacité de promouvoir la croissance des plantes est plus grande lorsque les bactéries sont employées seules ou en consortium. De plus il serait bien de faire différents tests de formulations (solution aqueuse, enrobage des graines, etc.) afin de déterminer le meilleur moyen d'utiliser les souches comme biofertilisant. Ainsi lorsque la meilleure formulation pour fertiliser les plantes sera déterminée, il serait intéressant de vérifier la capacité des isolats dans différentes conditions de culture tel que la culture en serre, la culture hydroponique ou encore la culture en champs. Il serait bien de déterminer la dose à utiliser selon les conditions et une fois cela déterminé regarder la possibilité de commercialiser le produit. Ceci représente les prochaines étapes à faire pour une possible commercialisation du fertilisant à base des souches du genre *Bacillus* isolées dans le cadre de ce projet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Adesemoye A.O., Kloepper J.W. (2009) Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1-12.
- [2] Barak, P., Jobe, B. O., Krueger, A. R., Petersen, L.A., Laird, D.A. (1997) Effects of long-term soil acidification due to nitrogen fertilizer inputs in Wisconsin. *Plant Soil* 197: 61-69.
- [3] Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163: 173-181.
- [4] Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P. (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15: 327-33.
- [5] Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60: 579-598.
- [6] Dutta S., Podile A.R. (2010) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Crit. Rev. Microbiol.* 36: 232-244.
- [7] 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: 227-242.
- [8] Vessey J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571-586.
- [9] Martinez-Viveros O., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G., Mora M.L. (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293-319.
- [10] J.S. Singh, D.P. Singh Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): microbes in sustainable agriculture in M. Abdul, G. Elisabeth, A. Madalena (Eds.), *Management of microbial resources in the environment*, Springer, Heidelberg (2013), pp. 361-385.

- [11] Parvatha Reddy, P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in Parvatha Reddy, P. Recent advances in crop protection, Springer India (2013), pp. 131-158.
- [12] Hartmann A., Baldani J.I. (2006) The genus *Azospirillum*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The prokaryotes, vol 5: Proteobacteria: alpha and beta subclasses (chap. 3.1.5). Springer, New York, pp 115-140.
- [13] Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb. Eco.* 58: 921-92.
- [14] Leungvutiviroj, C., Ruangphisarn, P., Hansanimitkul, P., Shinkawa, H., Sasaki, K. (2010) Development of a New Biofertilizer with high Capacity for N₂-fixation, Phosphate and Potassium Solubilization and Auxin Production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1098-1101.
- [15] Raupach, G. S., and J. W. Kloepper. (1998) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88: 1158-1164.
- [16] Schleifer K.H. (2009) Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: Vos P, Garrity G, Jones D et al (eds) *Bergey's Manual® of systematic bacteriology*. Springer, New York, pp 19-1317.
- [17] Slepecky R. and Hemphill E. (2006) The genus *Bacillus*. Nonmedical. *The Prokaryotes*, vol. 4 (DworkinM, FalkowS, RosenbergE, SchleiferK-H & StackebrandtE, eds), pp. 530-562. Springer, New York.
- [18] Hamdache A., Azaker R., Lamarti A., Aleu J. and Collado, I.G. (2013) Comparative genome analysis of *Bacillus spp.* and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. *Phytochem Rev* 12: 685-716.
- [19] Alcaraz L.D., Moreno-Hagelsieb G., Eguiarte L.E., Souza V., Herrera-Estrella L. and Olmedo G. (2010) Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* 11: 332-348.
- [20] Pérez-García, A., Romero, D., Zeriuoh, H. and de Vicente, A. (2011) Biological control of phytopathogenic fungi by aerobic endospore-formers. In *Aerobic, Endospore-forming Soil Bacteria* ed. Logan, N.A. and De Vos, P. pp. 157-180 Berlin: Springer-Verlag.

- [21] Fritze D. (2002) *Bacillus* identification - Traditional approaches. Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives (BerkeleyR, HeyndrickxM, LoganN & De VosP, eds), pp. 100-122. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- [22] Chun, J. and Bae, K. S. (2000) Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 123-127.
- [23] Nakamura, L. K. (2000) Phylogeny of *Bacillus sphaericus*-like organisms. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1715-1722.
- [24] Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N.B. and Bhatnagar R. (2002) Bacterial Insecticidal Toxins. *Crit. Rev Microbiol.* 30: 33-54.
- [25] Joung, K.-B. and Côté, J.-C. (2002) Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *J. Appl. Microbiol.* 92: 97-108.
- [26] Logan, N.A. and Halket, G. (2011) Developments in the taxonomy of the aerobic, endospore-forming bacteria. In *Aerobic, Endospore-forming Soil Bacteria* ed. Logan, N.A. and De Vos, P. pp. 1-29 Berlin: Springer-Verlag.
- [27] Fritze D. (2004) Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology* 94, 1245-1248.
- [28] Schallmeyer, M., Singh, A. and O. P. Ward. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1-17.
- [29] Registre publique des pesticides, Santé Canada
<http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/pi-ip/result-fra.php?1=0&2=501&3=act&4=a&5=1&6=ASC&7=B&8=F> (consulté le 19 mars 2014).
- [30] McSpadden Gardener B.B. (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94: 1252-1258.
- [31] Borriss R. (2011) Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents, p 41-76. In Maheshwari DK (ed), *Bacteria in agrobiology: plant growth responses*. Springer Heidelberg, Heidelberg, Germany.

- [32] Burgmann H., Widmer F., Von Sigler W. and Zeyer J. (2004) New molecular screening tools for analysis of free living diazotrophs in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 240-247.
- [33] Mantelin S and Touraine B. (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55: 27-34.
- [34] Ding, Y., Wang, J., Liu, Y. and Chen, S. (2005) Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. Appl. Microbiol.* 99 :1271-1281.
- [35] Zehr, J. P., Jenkins B. D., Short, S. M. and Steward G. F. (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539-554.
- [36] Seefeldt L. C., Hoffman B. M. and Dean D. R. (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 701-722.
- [37] Igarashi, R. Y. and Seefeldt, L. C. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 351-384.
- [38] Ribbe M., Gadkari D. and Meyer O. (1997) N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272: 26627-26633.
- [39] Rubio, L. M. and Ludden, P. W. (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 93-111.
- [40] Rees D.C., Tezcan F.A., Haynes C.A., Walton M.Y., Andrade, S., Einsle, O. and Howard, J.B. (2005) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 363: 971-84.
- [41] Jin, H.J., Tu, R. Xu, F. Chen, S.F. (2011) Identification of Nitrogen_Fixing *Paenibacillus* from Different Plant Rhizospheres and a Novel *nifH* Gene detected in the *P. stellifer*. *Microbiology* 80: 117-124.
- [42] Dance, I. (2013) Nitrogenase: a general hydrogenator of small molecules. *Chem. Commun.* 49, 10893-10907.

- [43] Xie, G. H., Z. Cui, J. Yu, W. Hai, and J. Steinberger. (2006) Identification of *nif* genes in N₂-fixing bacterial strains isolated from rice fields along the Yangtze River plain. *J. Basic Microbiol.* 46: 56-63.
- [44] Pelmont, J. (2005) Chapitre 5 : Azote et Anaérobiose dans Biodégradations et métabolismes : les bactéries pour les technologies de l'environnement Les Ullis, France ECP Science p. 245-283.
- [45] Andrews, M., Lea, P.J., Raven, J.A., and Azevedo, R.A. (2009) Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation. Genes and costs. *Ann. Appl. Biol.* 155: 1-13.
- [46] Zhao, H., Xie, B. and Chen, S. (2006) Cloning and sequencing of *nifBHDKENX* genes of *Paenibacillus massiliensis* T7 and its *nif* promoter analysis. *Sci. China C Life Sci.* 49: 115-122.
- [47] Doroshchuk, N.A., Gelfand, M.S. and Rodionov, D.A. (2006) Regulation of nitrogen metabolism in Gram-positive bacteria. *Mol. Biol.* 40: 919-926.
- [48] Merrick, M. J. (2004) Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. p. 197-223. In W. Klipp, B. Masepohl, J. R. Gallon, and W. E. Newton (ed.), *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria.*
- [49] Wray, L. V., Zalieckas, J. M. and Fisher, S. H. (2000) Purification and in vitro activities of the *Bacillus subtilis* TnrA transcription factor. *J. Mol. Biol.* 300:29-40.
- [50] Groot Kormelink, T., Koenders, E., Hagemeyer, Y., Overmars, L., Siezen R.J., de Vos, W.M. and Franck, C. (2012) Comparative genome analysis of central nitrogen metabolism and its control by GlnR in the class *Bacilli*. *BMC Genomics* 13: 191.
- [51] Fisher, S. H. (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference *Mol. Microbiol.* 32:223-232.
- [52] Schöllhorn, R., and Burris, R. H. (1967) Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 213-216.
- [53] Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson, and Burns, R. C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.

- [54] Addison, S.L., McDonald, I.R. and Lloyd-Jones, G. (2010) Identifying diazotrophs by incorporation of nitrogen from $^{15}\text{N}_2$ into RNA Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 2313-2322.
- [55] Kochar, M., Upadhyay, A., and Srivastava, S. (2011) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. Res. Microbiol. 162: 426-35.
- [56] Srivastava, L.M. (2002) Chapter 6: Auxin in *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. CA: Academic Press.
- [57] Shahab, S. and Ahmed, N. (2011) Growth Promotion Of Chick Pea By Native Phosphate Solubilizing And Auxin Producing Bacteria. The Internet Journal of Microbiology Volume 9 Number 1.
- [58] Yuan, C.-L., Mou, C.-X., Wu, W.-L. and Guo, Y.-B. (2011) Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. J Soils Sediments 11: 322-329.
- [59] Mano, Y. and Nemoto, K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. J. Exp. Bot. 63: 2853-2872.
- [60] Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. 31: 425-448.
- [61] Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira, R.S. and Constantin, J. (2011) Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans J Appl Microbiol, 110: 118-127.
- [62] Patten, C.L. and Glick, B.R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol 42: 207-220.
- [63] Patten, C.L., Blakney, A.J.C. and Coulson, T.J.D. (2012) Activity, distribution, and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 10: 1-21.
- [64] Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y. and Hashidoko, Y. (2010) Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72: 2202-2208.

- [65] Sarwar, M., Arshad, M., Martens, D.A. and Frankenberger, W.T. Jr. (1992) Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant Soil* 147: 207-215.
- [66] Idris, S.E., Iglesias, D.J., Talon, M. and Borriss, R. (2007) Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 6, 619-626.
- [67] Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 3, no. 4.
- [68] Repar, J., Šučurović, S., Zahradka, K., Zahradka, D. and Čurković-Perica, M. (2013) Stress resistance of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* is modulated by auxins. *Can J microbiol* 59: 766-770.
- [69] Kamnev, A.A., Shchelochkov, A.G., Perfiliev, Y.D., Tarantilis, P.A., and Polissiou, M.G. (2001) Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction of iron (III) *J. Mol. Struct.*, 563–564: 565-572.
- [70] Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793-796.
- [71] Singh, B. and Satyanarayana, T. (2011) Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 17: 93-103.
- [72] Zaidi, A., Khan, M.S., Ahmad, M., Oves, M. and Wani, P.A. (2009) Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J. (eds) *Microbial strategies for crop improvement*. Springer, Berlin, pp 23-50.
- [73] Gunes A, Ataoglu N, Turan M, Esitken A, Ketterings QM (2009) Effects of phosphate-solubilizing microorganisms on strawberry yield and nutrient concentrations. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 385-392.
- [74] Rossolini, G.M., Shipa, S., Riccio, M.L., Berlutti, F., Macaskie, L.E. and Thaller, M.C. (1998) Bacterial non-specific acid phosphohydrolases: physiology, evolution, and use as tools in microbial biotechnology. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 833-850.
- [75] Rodriguez, H. and Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.

- [76] Mehta, P., Walia, A., Chauhan, A., Kulshrestha, S. and Shirkot, C.K. (2013) Phosphate solubilisation and plant growth promoting potential by stress tolerant *Bacillus* sp. isolated from rhizosphere of apple orchards in *trans* Himalayan region of Himachal Pradesh. *Ann. Appl. Biol.* 163: 430-443.
- [77] Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L.J. and Poole, P.S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245: 83-93.
- [78] Patel, S. and Rajkumar, S. (2009) Genetics of phosphate solubilization. *Icfai Univ, J. Biotechnology* 3: 7-19.
- [79] Sashidhar, B. and Podile, A.R. (2010) Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J Appl. Microbiol.* 109: 1-12.
- [80] Ohtake, H., Wu, H., Imazu, K., Ambe, Y., Kato, J. and Kuroda, A. (1996) Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *Res Conserv Recycl* 18: 125-134.
- [81] Kononova, S.V., and Nesmeyanova, M.A. (2002) Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 67: 184-195.
- [82] Lei, X., Porres, J.M., Mullaney, E.J. and Pedersen, H. (2007) Phytase: source, structure and application, p. 505-529. In J. Polaina and A. P. MacCabe (ed.), *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- [83] Kerovuori, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. and Apajalahti, J. (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2079-2085.
- [84] Tye, A.J., Siu, F.K., Leung, T.Y. and Lim, B.L. (2002) Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *Bacillus subtilis* 168 and *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 190-197.
- [85] Vershinina, O.A. and Znamenskaia, L.V. (2002) The Pho regulons of bacteria. *Microbiology* 71: 497-511.
- [86] Qi, Y., Kobayashi, Y. and Hulet, F.M. (1997) The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the Pho regulon. *J Bacteriol.* 179: 2534-2539.

- [87] Ramesh, A., Sharma, S.K., Joshi, O.P., and Khan, I.R. (2011) Phytase, phosphatase activity and P-nutrition of soybean as influenced by inoculation by *Bacillus*. *Indian J. Microbiol.* 51: 94-99.
- [88] Iddris, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borris, R. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097-2109.
- [89] Hu, X., Roberts, D.P., Xie, L., Maul, J.E, Yu, C., Li, Y., Zhang, S. and Liao, X. (2013) Development of a biologically based fertilizer, incorporating *Bacillus megaterium* A6, for improved phosphorus nutrition of oilseed rape *Can. J. Microbiol.* 59: 231-236.
- [90] Wani, P.A., Khan, M.S. and Zaidi, A. (2007) Co-inoculation of N-fixing and P-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agronomica Hung.*, 55: 315-323.
- [91] Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- [92] Neilands, J. B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726.
- [93] Crowley, D.E. (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: Barton, L.L. and Abadía, J. (Eds) *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Springer, Dordrecht, pp 169-198.
- [94] Van der Helm, D. and Chakraborty, R. (2001) Structures of siderophore receptors. In: G. Winkelmann (Ed.), *Microbial Transport Systems*, Weinheim. Wiley-VCH pp. 261-287.
- [95] Bsat, N. and Helmann, J.D. (1999) Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* 181: 4299-4307.
- [96] Desai, A. and Archana, G. (2011) Role of siderophores in crop improvement In: D.K. Maheshwari (Ed.) *Bacteria in agrobiolgy: Plant nutrient management*. Springer pp.109-139.
- [97] Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 611-647.

- [98] Patel, A.K., Deshattiwar, M.K, Chaudhari, B.L. and Chincholkar (2009) Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus spp.* Bioresour. Technol., 100: 368–373.
- [99] Ollinger, J., Song, K.B., Antelmann, H., Hecker, M., and Helmann, J.D. (2006) Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 188: 3664-3673.
- [100] Bsat, N. and Helmann, J.D. (1999) Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. J. Bacteriol. 181: 4299-4307.
- [101] Miethke, M. and Marahiel, M.A. (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71: 413-451.
- [102] Moore, C.M. and Helmann, J.D. (2005) Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. Curr. Opin. Microbiol. 8: 188-195.
- [103] Gaballa, A., Antelmann, H., Aguilar, C., Khakh, S.K., Song, K.-B., Smaldone, G.T. and Helmann, J.D. (2008) The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 11927-11932.
- [104] Rowland, B.M., Grossman, T.H., Osborne, M.S. and Taber, H.W. (1996) Sequence and genetic organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding 2,3-dihydroxybenzoate biosynthetic enzymes. Gene 178: 119-123.
- [105] Rowland, B.M. and Taber, H.W. (1996) Duplicate isochorismate synthase genes of *Bacillus subtilis*: regulation and involvement in the biosyntheses of menaquinone and 2,3-dihydroxybenzoate. J. Bacteriol. 178: 854-861.
- [106] Hoffmann, T., Schutz, A., Brosius, M., Volker, A., Volker, U. and Bremer, E. (2002) High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 184: 718-727.
- [107] Raza, W., Wu ,H. and Shen, Q. (2012) Production, regulation and transportation of bacillibactin in *Bacillus subtilis*. J. Chem. Soc. Pak. 34: 996-1002.
- [108] Miethke, M., Klotz,O., Linne, U., May, J.J., Beckering, C.I. and Marahiel, M.A. (2006) Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 61: 1413-1427.

- [109] Cendrowski, S., MacArthur, W. and Hanna, P. (2004) *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* 51: 407-417.
- [110] Schwyn B. and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.
- [111] Razdan, M.K. and Mattoo, A.K. (Eds.), *Genetic Improvement of Solanaceous Crops: Tomato*, 2Science Publishers, Inc., Enfield, NH (2007).
- [112] Bergougnoux, V. (2014) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol. Adv.* 32: 170-189.
- [113] Profil de la culture du la tomate de serre au Canada
http://publications.gc.ca/collections/collection_2013/aac-aafc/A118-10-24-2013-fra.pdf (consulté le 27 mars 2014).
- [114] Profil de la culture de la tomate dans le monde, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (consulté le 27 mars 2014)
- [115] Profil de la culture dans le monde, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
<http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx> (consulté le 27 mars 2014)
- [116] Lee, J.P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jung, S.J. and Moon, B.J. (2006) Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 37: 329-337.
- [117] Veerubommu, S. and Kanoujia, N. (2011) Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture *Biol. Control* 57: 85-93.
- [118] Kandan, A., Ramiah, M., Vasanthi, V.J., Radjacommar, R., Nandakumar, R., Ramanathan, A. and Samiyappan, R. (2005) Use of *Pseudomonas fluorescens*-based formulations for management of tomato spotted wilt virus (TSWV) and enhanced yield in tomato. *Biocontrol Sci. Technol.*, 15: 553-569.
- [119] Ibiza, V.P., Blanca, J., Canizares, J. and Nuez, F. (2012) Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 1077-1088.

- [120] Fett, D. (2003) *Capsicum* peppers. *Cutis*, 72: 21-23.
- [121] Govindarajan, V.S. (1985) *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. Part I: History, botany, cultivation, and primary processing. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 22: 109-176.
- [122] De A.K. (2003). *Capsicum: The genus Capsicum*. London and New York: Taylor and Francis
- [123] Zewdie Y. and Bosland, P.W. (2001) Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for *Capsicum* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 161-169.
- [124] Profil de la culture du poivron en serre, Gouvernement du Canada http://publications.gc.ca/collections/collection_2013/aac-aafc/A118-10-21-2013-fra.pdf (consulté le 26 mars 2014)
- [125] Profil de la culture dans le monde, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx> (consulté le 26 mars 2014)
- [126] Lee, J.P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim H.J., Jung S.J. and Moon, B.J. (2006) Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 37: 329-337.
- [127] Yi, H.S., Yang, J.W. and Ryu, C.M. (2013) ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. *Front. Plant Sci.* 4: 122.
- [128] Nautiyal, C.S. (1997) A method for selection and characterization of rhizosphere-competent bacteria of chickpea. *Curr. Microbiol.* 34: 12-17.
- [129] Perez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Tellez, R., Zamudio-Rivera, L.S. and Fernandez, F.J. (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods* 70: 127-131.
- [130] Singh, J.S., Pandey, V.C. and Singh, D.P. (2011) Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agri. Ecosyst. Environ.* 140: 339-353.

- [131] Ash, C., Priest, F.G. and Collins, M.D. (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test: proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 64:253-260.
- [132] Borshchevskaya, L.N., Kalinina, A.N. and Sineokii, S.P. (2013) Design of a PCR test based on the *gyrA* gene sequence for the identification of closely related species of the *Bacillus subtilis* group. *Appl. Biochem. Microbiol.* 49: 646-655.
- [133] Blackwood K.S., Turenne C.Y., Harmsen, D. and Kabani, A.M. (2004) Reassessment of sequence-based targets for identification of bacillus species. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1626-1630.
- [134] Alexander D.B. and Zuberer, D.A. (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12: 39-45.