

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saida



كلية العلوم

Faculté des Sciences

Mémoire pour l'obtention de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

Etude des effluents locaux comme source de nutriments pour la culture d'un consortium microbien utilisé comme biofertilisant du sol

Présenté par :

- Khodja Safaa
- Kessal Azza

Devant le jury compose :

Président

Dr . Kebir Tahar

Examineur

Dr . Bellil Yahia

Rapporteur

Dr . Ghellai lotfi

Année universitaire 2025/2026

Dédicace

À la mémoire de mon père bien-aimé,
que Dieu ait son âme en Sa sainte miséricorde.

Son soutien moral, ses conseils et ses valeurs resteront à jamais gravés dans mon cœur et
continueront à guider chacun de mes pas.

À ma chère mère,
symbole de patience, de force et de générosité,
pour ses sacrifices inestimables, son amour infini et son encouragement constant tout au long de mon
parcours universitaire.

À ma famille,
pour leur présence réconfortante, leur soutien indéfectible et la confiance qu'ils m'ont accordée.

À mes enseignants,
qui ont contribué à ma formation académique et scientifique,
et à toutes les personnes qui m'ont soutenue, conseillée ou aidée, de près ou de loin, à la réalisation
de ce mémoire.

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui ont cru en moi et m'ont encouragée à persévérer.

REMERCIEMENTS

Je remercie Allah le Tout-Puissant de m'avoir donné la force, la patience et la volonté pour mener à terme ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à mon encadrant(e) [Dr . Ghellai lotfi], pour son aide précieuse, ses conseils judicieux, sa disponibilité et son suivi tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants du département [nom du département], ainsi qu'à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, je remercie ma famille et mes proches pour leur soutien moral et leurs encouragements constants.

Résumé :

La fertilité des sols constitue un facteur déterminant pour la croissance et la productivité des plantes. Toutefois, l'utilisation excessive des engrais chimiques a entraîné une dégradation progressive des sols et des impacts négatifs sur l'environnement. Dans ce contexte, les biofertilisants apparaissent comme une alternative durable et respectueuse de l'environnement.

Le présent travail a pour objectif l'isolement de bactéries du genre *Bacillus* à partir d'un mélange de déchets de légumes et de sol, ainsi que l'évaluation de leur potentiel en tant que biofertilisants. Après une phase de fermentation, les bactéries ont été isolées par traitement thermique et mises en culture sur des milieux appropriés. Les souches sélectionnées ont ensuite été multipliées et appliquées sur des plantes tests afin d'évaluer leur effet sur la croissance végétale.

Les résultats obtenus ont montré que les souches de *Bacillus* isolées présentent un effet positif sur certains paramètres de croissance des plantes, tels que la longueur des tiges, le nombre de feuilles et la biomasse. Ces résultats confirment l'intérêt des bactéries du genre *Bacillus* comme biofertilisants potentiels et soulignent l'importance de la valorisation des déchets végétaux dans une agriculture durable.

Mots-clés : Biofertilisants ; *Bacillus* spp. ; Fertilité du sol ; Déchets végétaux ; Croissance des plantes

Abstract:

Soil fertility is a key factor influencing plant growth and agricultural productivity. However, the excessive use of chemical fertilizers has led to soil degradation and environmental problems. In this context, biofertilizers represent a sustainable and eco-friendly alternative.

The aim of this study was to isolate *Bacillus* bacteria from a mixture of vegetable wastes and soil and to evaluate their potential as biofertilizers. After a fermentation step, bacterial isolation was carried out using heat treatment and selective culture media. The selected strains were then multiplied and applied to test plants to assess their effects on plant growth.

The results showed that the isolated *Bacillus* strains had a positive effect on several plant growth parameters, including plant height, number of leaves, and biomass. These findings highlight the potential of *Bacillus* spp. as effective biofertilizers and emphasize the importance of recycling vegetable wastes for sustainable agriculture.

Keywords: Biofertilizers; *Bacillus* spp. Soil fertility; Vegetable wastes; Plant growth.

المخلص:

تُعد خصوبة التربة من العوامل الأساسية المؤثرة في نمو النباتات وإنتاجيتها الزراعية، إلا أن الاستعمال المفرط للأسمدة الكيميائية أدى إلى تدهور التربة وظهور آثار سلبية على البيئة. وفي هذا الإطار، تُعتبر الأسمدة الحيوية بديلاً مستداماً وصديقاً للبيئة

انطلاقاً من خليط مكوّن من نفايات الخضر والتربة، *Bacillus* يهدف هذا العمل إلى عزل بكتيريا من جنس وتقييم قدرتها على العمل كسماد حيوي. بعد مرحلة التخمير، تم عزل البكتيريا باستعمال المعالجة الحرارية وزراعتها على أوساط غذائية مناسبة. ثم جرى إكثار السلالات المنتقة وتطبيقها على نباتات اختبارية لدراسة تأثيرها على النمو النباتي

المعزولة كان لها تأثير إيجابي على بعض مؤشرات نمو النباتات، مثل *Bacillus* أظهرت النتائج أن سلالات كأسمدة حيوية محتملة *Bacillus* طول النبات، عدد الأوراق والكتلة الحيوية. وتؤكد هذه النتائج أهمية بكتيريا ودور تثمين نفايات الخضر في دعم الزراعة المستدامة

الكلمات المفتاحية:

. خصوبة التربة؛ نفايات الخضر؛ نمو النباتات *Bacillus* الأسمدة الحيوية؛ بكتيريا

Sommaire :

Résumé :.....	4
1 Introduction.....	9
Chapitre I : fertilité du sol et fertilisation.....	11
Introduction.....	12
1.1 La fertilité du sol.....	12
1.1.1 Définition de la Fertilité du Sol	12
1.1.2 Facteurs Influençant la Fertilité du Sol.....	12
1.1.3 Méthodes Améliorer la Fertilité.....	14
1.1.4 Types de Fertilité du Sol et leur Influence sur la Croissance des Plantes :14	
1.2 Les engrais chimiques : avantages et limites	16
1.3 Les biofertilisants.....	18
1.4 Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	18
Chapitre2 : Bacillus et dechets vegetaux	20
2 Introduction:.....	21
2.1 Genre Bacillus.....	21
2.1.1 Caractéristiques Générales du Genre Bacillus	21
2.1.2 Pourquoi Bacillus en Particulier	22
2.1.3 Rôle en Tant que Biofertilisant	22
2.1.4 Définition des Déchets Végétaux.....	22
2.1.5 Compostage et Fermentation	23
2.1.6 Rôle en Tant que Source Microbienne.....	24
Chapitre 3:.....	26
3 Matériel et Méthodes	27
3.1 Matériel biologique.....	27
3.2 Les Matériaux	27
3.3 Suivi de la fermentation	28
3.4 Analyses physicochimiques	28
3.4.1 Détermination de l'humidité	28
3.4.2 Matière sèche	29
3.4.3 Mesure du pH.....	29
3.5 Analyses microbiologiques :.....	29
3.5.1 Préparation des dilutions décimales.....	30
3.5.2 Dénombrement de la flore mésophile totale	30
3.5.2.1 Dénombrement (méthode d'incorporation).....	31
3.5.2.2 Dénombrement en surface (méthode d'étalement).....	31
3.5.3 Isolement du genre Bacillus.....	31
3.5.4 Coloration de Gram.....	32
3.5.5 coloration des spores.....	32
3.5.6 Test catalase.....	33
3.5.7 Recherche de pathogènes indicateurs	33

3.5.8	Test oxydase.....	34
3.6	Préparation de la suspension bactérienne	34
3.7	Application sur les plants de tomate	34
Chapitre 4: Résultats		37
4	Suivi de la fermentation :	38
5	Résultats physicochimiques	38
5.1	Humidité (%)	38
5.2	Matière sèche (%)	38
5.3	Moyenne de ph :.....	38
6	Dénombrement microbien :	39
7	Identification de Bacillus	39
8	Effet sur la tomate	40
8.1	Taux de germination :	40
8.2	Hauteur de la plante	40
8.3	Nombre de feuille	41
8.4	Longueur des racines	41
8.5	Masse fraîche	41
8.6	Masse sèche	41
9	Discussion :	42
9.1	Fermentation	42
9.2	Analyses physicochimiques	42
9.3	Activité microbiologique	43
9.4	Identification des souches de Bacillus	43
9.5	Recherche des microorganismes pathogènes.....	44
9.6	Effet de Bacillus sur la croissance des plants de tomate.....	44
Conclusion		46
10	Bibliographie.....	48

Liste de figure :

FIGURE 1:FERMENTAION SOL+DECHETS VEGETAUX	28
FIGURE 2: PH METRE	29
FIGURE 3 :PREPARATION DES DILITIONS DECIMALES	30
FIGURE 4 COLORATION DE GRAM.....	32
FIGURE 5: MISE EN EVIDENCE DES SPORES PAR COLORATION AU VERT MALACHITE	33
FIGURE 6:PREPARATION LE MILIEU	34
FIGURE 7 : APRE 7JOURES	35

Liste de tableau :

TABLEAU 1: PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES.....	38
TABLEAU 2: UFC/G.....	39
TABLEAU 3 : TESTS MICROBIOLOGIQUES.....	39

1 Introduction

Pour assurer un développement optimal des plantes et garantir une production agricole durable, il est essentiel que les nutriments nécessaires soient disponibles en quantités suffisantes et équilibrées (Chen, 2006). Cependant, dans de nombreuses régions du monde, notamment dans les pays en développement, la faible fertilité des sols constitue une limitation majeure pour le rendement des cultures. Cette situation réduit considérablement les avantages que les agriculteurs peuvent tirer de l'utilisation de variétés améliorées et de pratiques culturales modernes (Vlek & Vielhauer, 1994). De plus, l'utilisation excessive des engrais chimiques pour pallier l'infertilité des sols entraîne de graves effets environnementaux, tels que la dégradation de la structure du sol, la pollution des eaux, et la perturbation de la microflore bénéfique (FAO, 2017). Ainsi, la recherche de solutions durables pour améliorer la fertilité des sols est devenue une priorité pour l'agriculture moderne.

L'adoption de la gestion intégrée de la fertilité des sols (Integrated Soil Fertility Management, ISFM) représente une approche efficace pour restaurer et maintenir la productivité des sols. Cette stratégie combine la conservation des ressources naturelles, la fixation biologique de l'azote, l'amélioration de l'efficacité des intrants et la promotion de pratiques agricoles durables (Vlek & Vielhauer, 1994). Dans ce cadre, les biofertilisants (biofertilizers) jouent un rôle central. Ces préparations microbiologiques constituent une alternative écologique et économique aux engrais chimiques. Ils améliorent la croissance des plantes, augmentent la qualité biologique des sols et contribuent à la durabilité des systèmes agricoles (Vessey, 2003).

Les biofertilisants sont définis comme des préparations contenant des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont appliqués aux graines, aux plantes ou au sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur des plantes et convertissent les nutriments essentiels, tels que l'azote et le phosphore, de formes non disponibles à des formes assimilables par les plantes (Rokhzadi et al., 2008; El-yazeid et al., 2007). Ces microorganismes bénéfiques favorisent la croissance des plantes, augmentent leur résistance aux maladies et aux ravageurs, et améliorent la productivité globale des cultures (Lee & Pankhurst, 1992; Wani et al., 1995). Parmi ces microorganismes, le genre *Bacillus* est particulièrement important. Ces bactéries sont capables de produire des spores résistantes, de synthétiser des phytohormones végétales, de solubiliser le phosphore et de fixer l'azote, jouant ainsi un rôle essentiel dans la promotion de la croissance des plantes et dans la fertilité du sol (Kloepper et al., 2004; Lugtenberg & Kamilova, 2009). L'utilisation de déchets organiques végétaux, tels que les résidus de légumes et de fruits, comme source de nutriments pour ces microorganismes constitue une approche écologique et rentable. Ces déchets favorisent le développement de bactéries bénéfiques comme *Bacillus*, permettant la production de biofertilisants à faible coût et réduisant le gaspillage agricole (Bernal et al., 2009). Plusieurs études ont

montré que l'utilisation de ces biofertilisants issus de déchets végétaux améliore non seulement la croissance des plantes, mais augmente également la teneur en nutriments du sol et sa structure (Rokhzadi et al., 2008; El-yazeid et al., 2007).

L'histoire de l'utilisation des inoculants microbiens dans l'agriculture remonte à plusieurs siècles. Les premières pratiques consistaient en la production artisanale de compost, qui a démontré la capacité des biofertilisants à accélérer la décomposition des résidus organiques et à améliorer les récoltes (Abdul Halim, 2009). À l'échelle industrielle, le développement de ces inoculants a débuté dès les années 1940, notamment pour les légumineuses, avec des recherches menées par le Malaysian Rubber Board et l'Université Putra Malaysia sur les mycorhizes et d'autres microorganismes bénéfiques. Ces travaux ont montré l'importance des microorganismes dans l'amélioration de la productivité des cultures et la durabilité des sols (Abdul Halim, 2009; Vessey, 2003).

Dans ce cadre, le présent travail vise à isoler des bactéries du genre *Bacillus* à partir d'un mélange de déchets de légumes et de sol, puis à évaluer leur potentiel comme biofertilisants sur des plantes tests. L'objectif est de démontrer l'efficacité de ces souches dans la promotion de la croissance des plantes, d'améliorer la fertilité du sol de manière écologique et durable, et de proposer une alternative aux engrais chimiques pour une agriculture respectueuse de l'environnement

Chapitre I : fertilité du sol et fertilisation

Introduction

Le sol est un composant crucial pour le développement et la croissance des végétaux, car il constitue la principale source d'eau et de nutriments. Par conséquent, sa fertilité est un facteur clé influençant la productivité agricole.

La fertilité du sol est tributaire de divers éléments physiques, chimiques et biologiques, qui impactent directement la disponibilité des nutriments pour les plantes. Pour améliorer la fertilité, plusieurs méthodes de fertilisation sont employées, y compris les engrais chimiques ainsi que les biofertilisants.

Néanmoins, un usage excessif des engrais chimiques peut engendrer des impacts néfastes sur l'environnement et la santé des sols. Cela a suscité un intérêt croissant pour des solutions plus durables.

, ce chapitre vise à explorer la notion de fertilité des sols, les divers types de fertilisation, et l'importance des biofertilisants dans une agriculture respectueuse de l'environnement (Brady & Weil, 2016).

1.1 La fertilité du sol

1.1.1 Définition de la Fertilité du Sol

La fertilité du sol correspond à l'aptitude du sol à assurer une croissance normale des plantes en leur fournissant les éléments nutritifs indispensables, tels que l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium et le magnésium, tout en offrant des conditions physiques et biologiques favorables à leur développement (Brady & Weil, 2017). Elle est étroitement liée à plusieurs paramètres, notamment la richesse du sol en matière organique, son organisation structurale, son pH, sa capacité à retenir l'eau ainsi que l'activité des micro-organismes bénéfiques, lesquels jouent un rôle essentiel dans la mise à disposition des nutriments (FAO, 2015 ; Paul, 2015). Ainsi, un sol bien équilibré sur le plan de la fertilité permet d'atteindre une productivité agricole élevée, tandis qu'un sol pauvre ou dégradé peut fortement limiter les rendements (Brady & Weil, 2017).

1.1.2 Facteurs Influençant la Fertilité du Sol

La fertilité du sol est influencée par plusieurs facteurs interdépendants :

La fertilité du sol est influencée par plusieurs facteurs interdépendants :

Matière organique : La matière organique constitue un élément fondamental de la fertilité du sol. Elle contribue à l'amélioration de la structure du sol, favorise la rétention de l'eau et augmente la disponibilité des éléments nutritifs en stimulant l'activité biologique du sol (Stevenson, 1994 ; Brady & Weil, 2017). Les sols riches en humus, issu de la décomposition des résidus végétaux et animaux, présentent généralement une fertilité plus élevée (Brady & Weil, 2017).

pH du sol : Le pH du sol joue un rôle déterminant dans la disponibilité des nutriments pour les plantes. Un pH proche de la neutralité, situé entre 6 et 7, permet une absorption optimale des éléments nutritifs, alors qu'un pH trop acide ou trop alcalin peut entraîner des déséquilibres nutritionnels et limiter la croissance végétale (Havlin et al., 2014 ; Marschner, 2012).

Texture et structure : La texture et la structure du sol conditionnent sa capacité à retenir l'eau et les nutriments ainsi que son aération. Les sols argileux possèdent une bonne capacité de rétention, mais peuvent devenir compacts et peu perméables à l'air, tandis que les sols sableux sont bien drainés mais pauvres en éléments nutritifs (Brady & Weil, 2017 ; Havlin et al., 2014).

Micro-organismes : Les micro-organismes du sol, tels que les bactéries et les champignons, jouent un rôle clé dans la décomposition de la matière organique et la minéralisation des nutriments. Leur activité assure le bon fonctionnement des cycles biogéochimiques et contribue directement au maintien de la fertilité du sol (Paul, 2015).

Pratiques agricoles : Les pratiques culturales, notamment la rotation des cultures, l'apport d'engrais organiques ou minéraux et la gestion de l'irrigation, influencent durablement les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol, et par conséquent sa fertilité (FAO, 2017).

Par ailleurs, la dégradation des sols résultant de l'érosion, de la monoculture intensive et de la pollution constitue une menace majeure pour la fertilité des sols à l'échelle mondiale, touchant environ 33 % des terres agricoles (FAO, 2021).

1.1.3 Méthodes Améliorer la Fertilité

Amendements organiques : L'incorporation de compost, de fumier ou de résidus de culture permet d'enrichir le sol en matière organique, d'améliorer sa structure et de renforcer l'activité microbienne, contribuant ainsi à une meilleure fertilité (Stevenson, 1994 ; Brady & Weil, 2017).

Engrais équilibrés : L'utilisation raisonnée d'engrais minéraux de type NPK, basée sur des analyses de sol, permet de corriger les carences nutritionnelles tout en évitant les excès susceptibles d'altérer l'équilibre du sol (Havlin et al., 2014).

Techniques durables : L'adoption de pratiques agricoles durables, telles que l'agroforesterie, la couverture végétale et l'agriculture de conservation, contribue à limiter l'érosion, à améliorer la structure du sol et à restaurer la biodiversité microbienne (Lal, 2015).

Surveillance : Un suivi régulier de l'état du sol à travers des analyses physico-chimiques et biologiques permet d'ajuster les pratiques agricoles et d'assurer le maintien de la fertilité du sol à long terme (FAO, 2017).

1.1.4 Types de Fertilité du Sol et leur Influence sur la Croissance des Plantes :

La fertilité du sol regroupe l'ensemble des caractéristiques qui permettent au sol de soutenir efficacement la croissance des plantes. Elle peut être distinguée en trois formes principales : la fertilité chimique, la fertilité physique et la fertilité biologique. Chacune de ces formes intervient de manière spécifique dans le développement des plantes, notamment à travers l'absorption des éléments nutritifs, l'enracinement et la capacité des plantes à faire face aux contraintes environnementales. Ces types de fertilité sont étroitement liés, et un bon équilibre entre eux est indispensable pour garantir une croissance harmonieuse et des rendements satisfaisants, alors qu'un déséquilibre peut rapidement devenir un facteur limitant de la production agricole (Brady & Weil, 2017 ; Havlin et al., 2014).

La fertilité chimique du sol est principalement liée à la disponibilité des éléments nutritifs essentiels, tels que l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium et le magnésium, ainsi qu'au pH du sol. Un sol présentant une fertilité chimique adéquate possède généralement un pH compris entre 6 et 7, condition favorisant la mise à disposition des nutriments sous des formes directement assimilables par les plantes (Havlin et al., 2014 ; Marschner, 2012). Ces nutriments sont absorbés par le système racinaire et

interviennent dans des processus physiologiques fondamentaux, comme la photosynthèse, la synthèse des protéines et la formation des tissus végétaux. Ainsi, l'azote stimule la croissance végétative, le phosphore favorise le développement des racines et la floraison, tandis que le potassium contribue au renforcement de la résistance des plantes face aux maladies et aux stress abiotiques (Havlin et al., 2014). À l'inverse, une insuffisance en éléments nutritifs peut se traduire par des symptômes visibles, tels que la chlorose, un ralentissement de la croissance ou une faible production, notamment en cas de carence en fer ou en azote (Taiz et al., 2015).

La fertilité physique du sol concerne l'ensemble de ses propriétés liées à sa constitution et à son fonctionnement hydrique et mécanique. Elle dépend notamment de la texture du sol, définie par les proportions relatives de sable, de limon et d'argile, de sa structure, ainsi que de paramètres tels que la porosité, le drainage et la capacité de rétention de l'eau (Brady & Weil, 2017). Une bonne fertilité physique permet une aération suffisante du sol, indispensable à la respiration des racines, tout en assurant un drainage efficace afin d'éviter l'asphyxie racinaire (Hillel, 2004). Les sols argileux, grâce à leur capacité à retenir l'eau et les nutriments, offrent des conditions relativement stables pour la croissance des plantes, tandis que les sols sableux, bien drainés, sont souvent pauvres en éléments nutritifs et nécessitent une gestion plus rigoureuse de l'eau et de la fertilisation (Brady & Weil, 2017 ; Havlin et al., 2014). Toutefois, lorsque la structure du sol est altérée, notamment par le compactage, l'expansion du système racinaire est freinée, ce qui limite l'absorption de l'eau et des nutriments et peut conduire à un stress hydrique et à une croissance végétale réduite (Lal, 2015).

La fertilité biologique du sol repose sur la présence de matière organique et sur l'activité des organismes vivants qui peuplent le sol, notamment les bactéries, les champignons, les actinomycètes et la macrofaune telle que les vers de terre (Paul, 2015). Ces organismes assurent la décomposition de la matière organique et le recyclage des nutriments, contribuant ainsi à leur disponibilité pour les plantes (Stevenson, 1994). Certains micro-organismes jouent un rôle particulièrement important, comme les bactéries rhizobiennes capables de fixer l'azote atmosphérique en association symbiotique avec les légumineuses (Sylvia et al., 2005). Une fertilité biologique élevée améliore également la structure du sol, stimule le développement racinaire et renforce la capacité des plantes à résister aux agents pathogènes. De plus, l'activité des vers de terre favorise l'infiltration de l'eau et accroît la disponibilité de certains nutriments, notamment le phosphore, contribuant ainsi à une meilleure vigueur des plantes (FAO, 2021).

Ces différentes formes de fertilité interagissent de manière étroite et dynamique. La fertilité chimique dépend largement de la fertilité biologique, qui assure la minéralisation de la matière organique, ainsi que de la fertilité physique, qui conditionne la rétention et la circulation de l'eau et des nutriments dans le sol (Brady & Weil, 2017 ; Paul, 2015). Un sol riche en activité biologique tend à présenter une

meilleure structure physique, ce qui facilite l'absorption des éléments nutritifs par les plantes. Lorsque cet équilibre est maintenu, la fertilité globale du sol favorise une germination rapide, une photosynthèse efficace et une production accrue de biomasse (Taiz et al., 2015).

Cependant, la fertilité des sols est aujourd'hui fortement menacée par des phénomènes de dégradation liés à l'érosion, à la pollution et à l'intensification des pratiques agricoles. Selon la FAO, environ 33 % des sols à l'échelle mondiale sont dégradés, entraînant une diminution des rendements agricoles pouvant atteindre 10 à 20 % (FAO, 2021). Des travaux ont montré que l'adoption de pratiques agricoles durables, telles que la rotation des cultures, permet de restaurer progressivement les différentes composantes de la fertilité du sol et d'améliorer la croissance des plantes de 20 à 50 % (Lal, 2015). Ainsi, une gestion intégrée et raisonnée de la fertilité du sol constitue un enjeu majeur pour assurer une agriculture durable et une productivité à long terme.

1.2 Les engrais chimiques : avantages et limites

Les engrais chimiques constituent un levier important pour améliorer rapidement la fertilité des sols et augmenter la productivité agricole, car ils fournissent aux plantes des nutriments essentiels de manière directe et ciblée. Leur efficacité se traduit par une hausse rapide des rendements, notamment des cultures céréalières, dont l'augmentation est estimée entre 20 et 30 % à l'échelle mondiale depuis les années 1960, grâce à une absorption efficace par les plantes (FAO, 2020). Ils permettent également une gestion précise des apports nutritionnels, en corrigeant des carences spécifiques du sol telles que celles en azote, phosphore ou potassium, ce qui optimise la croissance végétale et la performance agronomique (USDA, 2019). Par ailleurs, leur disponibilité sur le marché et leur coût initial relativement accessible en font une solution pratique pour de nombreux agriculteurs, bien que leur production reste fortement dépendante des ressources fossiles (IFPRI, 2022).

Cependant, malgré ces avantages immédiats, l'utilisation prolongée et intensive des engrais chimiques présente des limites importantes pour la durabilité des sols. Une fertilisation excessive peut entraîner une dépendance chimique en appauvrissant progressivement la matière organique du sol, ce qui réduit sa fertilité naturelle et impose des apports répétés pour maintenir les rendements. Des études ont montré que les sols soumis à une sur-fertilisation peuvent perdre jusqu'à 50 % de leur capacité de rétention d'eau, affectant ainsi leur structure et leur fonctionnement biologique (USDA, 2018). À cela s'ajoutent les contraintes économiques liées à l'augmentation des coûts de production et à la volatilité des prix des engrais, directement influencées par les fluctuations des marchés énergétiques mondiaux (Banque mondiale, 2023). De plus, un apport excessif peut provoquer des brûlures foliaires ou une toxicité pour les plantes, réduisant l'efficacité agronomique attendue (Université Cornell, 2021).

Sur le plan environnemental, l'usage intensif des engrais chimiques engendre des impacts majeurs, notamment par la pollution des sols et des eaux. Le lessivage de l'azote et du phosphore vers les milieux aquatiques favorise l'eutrophisation, entraînant des proliférations algales toxiques et la formation de zones mortes, comme celle observée dans le Golfe du Mexique, qui couvre environ 20 000 km² (NOAA, 2023). En outre, la production et l'utilisation des engrais azotés contribuent aux émissions de protoxyde d'azote (N₂O), un gaz à effet de serre dont le pouvoir réchauffant est environ 300 fois supérieur à celui du CO₂, l'agriculture étant responsable d'environ 60 % des émissions anthropiques de ce gaz (IPCC, 2022). Ces pratiques participent également à la dégradation de la biodiversité des sols en provoquant leur acidification et en réduisant la diversité microbienne, avec une diminution estimée entre 20 et 30 % dans les zones soumises à une fertilisation intensive (Université de Wageningen, 2019). Par ailleurs, la volatilisation de l'ammoniac contribue à la pollution atmosphérique en favorisant la formation de particules fines nocives pour la santé humaine (EEA, 2021).

Les effets des engrais chimiques ne se limitent pas aux sols et aux écosystèmes, mais concernent également la santé humaine. Les nitrates issus de la fertilisation peuvent s'accumuler dans les denrées alimentaires et contaminer les eaux souterraines, dépassant fréquemment la limite recommandée de 50 mg/L pour l'eau potable et favorisant la formation de nitrosamines cancérigènes (OMS, 2020). Une exposition chronique à ces composés est associée à une augmentation du risque de cancer colorectal, comme le soulignent plusieurs études épidémiologiques et méta-analyses (IARC, 2010, mise à jour 2022). De plus, les travailleurs agricoles sont exposés à des risques professionnels, notamment des irritations cutanées et respiratoires lors de la manipulation des engrais, avec des cas d'intoxications aiguës rapportés dans plusieurs pays en développement.

Ainsi, l'analyse des avantages et des limites des engrais chimiques met en évidence la nécessité d'intégrer ces intrants dans une stratégie de gestion raisonnée de la fertilité des sols. L'association de la fertilisation chimique avec des pratiques agricoles durables, telles que l'apport de matière organique, la rotation des cultures et les approches agroécologiques, apparaît comme une option pertinente pour maintenir la productivité agricole tout en préservant la qualité des sols, l'environnement et la santé humaine.

1.3 Les biofertilisants

Face aux limites des engrais chimiques et à leurs impacts négatifs sur la qualité des sols et l'environnement, l'utilisation des biofertilisants apparaît comme une alternative durable en agriculture moderne. Les biofertilisants reposent sur l'utilisation de microorganismes capables d'améliorer la fertilité du sol en favorisant la disponibilité des nutriments essentiels et en stimulant l'activité biologique du sol. Ces microorganismes contribuent également à l'amélioration de la structure du sol et à l'augmentation de la résistance des plantes face aux stress biotiques et abiotiques.

Plusieurs travaux scientifiques ont mis en évidence le rôle des biofertilisants dans l'amélioration de la croissance et du rendement des plantes, tout en réduisant la dépendance aux intrants chimiques. En particulier, les approches basées sur l'utilisation de microorganismes photosynthétiques, tels que les microalgues, ont démontré leur capacité à enrichir les sols en matière organique et à favoriser l'absorption des nutriments par les plantes. Ces stratégies s'inscrivent pleinement dans une démarche d'agriculture durable visant à concilier productivité agricole et préservation de l'environnement (Gonçalves et al., 2023).

1.4 Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) sont des microorganismes bénéfiques présents dans la rhizosphère, c'est-à-dire la zone immédiatement entourant les racines des plantes (Kloepper et al., 1980). Elles stimulent la croissance végétale par plusieurs mécanismes complémentaires, notamment en améliorant l'absorption des nutriments, en produisant des phytohormones et en protégeant la plante contre certains pathogènes (Glick, 1995). Ces bactéries sont classées en PGPR intracellulaires, qui vivent à l'intérieur des tissus végétaux, et extracellulaires, qui colonisent la rhizosphère (Bhattacharyya & Jha, 2012). Parmi les genres les plus étudiés figurent *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium*, reconnus pour leur efficacité à stimuler la croissance des cultures (Compant et al., 2005).

L'acide indole-3-acétique (IAA) est une phytohormone de type auxine produite par certaines PGPR via la voie tryptophane-dépendante (Patten & Glick, 2002). L'IAA favorise l'élongation cellulaire, le développement des racines principales et la formation de racines latérales, ce qui augmente la capacité de la plante à absorber l'eau et les nutriments (Spaepen et al., 2007). Les PGPR synthétisent cette hormone pour stimuler indirectement la croissance végétale, mais un excès d'IAA peut au contraire inhiber le développement racinaire (Glick, 2012).

Les PGPR contribuent également à la nutrition phosphorée des plantes grâce à des mécanismes de solubilisation du phosphore, convertissant les formes insolubles (comme les phosphates minéraux) en formes biodisponibles (Rodríguez & Fraga, 1999). Les principaux mécanismes impliquent la production d'acides organiques tels que l'acétique et le lactique, qui abaissent le pH local et solubilisent le phosphore (Chen et al., 2006), l'excrétion d'enzymes comme les phosphatases et les phytases qui dégradent les phosphates organiques (Kpombrekou & Tabatabai, 1994), et la chélation, où des ions métalliques tels que le fer ou l'aluminium forment des complexes solubles (Vassilev et al., 2006). Ces processus assurent un apport en phosphore essentiel pour la photosynthèse, la production d'ATP et le développement végétal global (Marschner, 2012).

Parmi les PGPR les plus utilisés en agriculture et en biofertilisation :

Pseudomonas fluorescens : produit de l'IAA et solubilise le phosphore ; employé en agriculture biologique pour la protection contre les maladies fongiques (Weller, 2007).

Bacillus subtilis : synthétise des antibiotiques et des phytohormones ; largement utilisé dans les formulations de biofertilisants (Kloepper et al., 2004).

Azospirillum brasilense : capable de fixer l'azote atmosphérique et de produire de l'IAA ; stimule la croissance de céréales telles que le maïs (Bashan & de-Bashan, 2010).

Rhizobium leguminosarum : symbiotique avec les légumineuses, fixe l'azote et contribue à la solubilisation du phosphore, améliorant ainsi la nutrition minérale (Oldroyd et al., 2011)

Chapitre2 :

Bacillus et dechets vegetaux

2 Introduction:

Ce chapitre contient des informations sur les des micro-organismes ayant un intérêt agronomique, principalement les bactéries du groupe *Bacillus*, ainsi que leur interaction avec les résidus végétaux.

Les biofertilisants se profilent aujourd'hui comme une option significative face aux engrais chimiques, car ils contribuent à la fertilité des sols et favorisent naturellement la croissance des plantes (Vessey, 2003). Au sein de ces micro-organismes, les bactéries du groupe *Bacillus* se distinguent par leur remarquable aptitude à s'adapter à divers environnements et leur forte résistance.

Effectivement, ces bactéries se retrouvent en abondance dans le sol et les matières organiques, notamment dans les déchets végétaux. Ceux-ci offrent une source riche en micro-organismes bénéfiques, qui peuvent être exploités par des méthodes telles que le compostage pour générer des biofertilisants performants.

Ainsi, le but de ce chapitre est de décrire les particularités du groupe *Bacillus* et d'illustrer son importance dans l'amélioration de la croissance des plantes.

2.1 Genre *Bacillus*

2.1.1 Caractéristiques Générales du Genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries Gram-positives, de forme bacillaire, connues pour leur aptitude à former des endospores très résistantes, capables de supporter des conditions environnementales sévères telles que la chaleur, la dessiccation et l'action des désinfectants. (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2009)

Ces micro-organismes sont majoritairement aérobies ou anaérobies facultatifs. Ils sont largement distribués dans la nature, notamment dans le sol, l'eau et l'air, où ils participent activement aux processus écologiques, en particulier à la dégradation de la matière organique. (Madigan et al 2018)

Les espèces du genre *Bacillus* se distinguent également par leur capacité à sécréter diverses enzymes extracellulaires, telles que les amylases, les protéases et les lipases, largement exploitées dans les domaines industriel et agricole. (Priest, F.G. (1993)..)

2.1.2 Pourquoi Bacillus en Particulier

Le choix du genre *Bacillus* repose principalement sur la forte résistance de ses endospores, qui lui confère une grande capacité de survie dans des environnements défavorables, faisant de ce genre un excellent candidat pour des applications agricoles et industrielles à long terme. (Nicholson, W.L. et al. (2000.)

Comparé à d'autres genres bactériens, *Bacillus* présente une remarquable diversité métabolique, incluant des fonctions telles que la fixation de l'azote et la production de substances antimicrobiennes, ce qui renforce son intérêt dans des applications bénéfiques, notamment comme biofertilisant. (Seldin, L. et al. (1998.)

De plus, sa capacité à coloniser efficacement la rhizosphère des plantes sans provoquer de pathogénicité en fait un micro-organisme sûr et particulièrement adapté aux applications environnementales. (Kloepper, J.W. et al. (2004)

2.1.3 Rôle en Tant que Biofertilisant

En tant que biofertilisant, *Bacillus* contribue à l'amélioration de la nutrition azotée des plantes par la fixation de l'azote atmosphérique, favorisant ainsi le développement racinaire et l'augmentation des rendements agricoles. (Vessey, J.K. (2003)

Il intervient également dans la stimulation de la croissance végétale par la production de phytohormones, notamment l'auxine et la cytokinine, qui influencent positivement la germination des graines et le développement global des plantes. (Arkhipova, T.N. et al. (2005.)

Certaines espèces appartenant au genre *Bacillus* possèdent la capacité de solubiliser le phosphore sous forme insoluble dans le sol, améliorant ainsi sa disponibilité pour les plantes et contribuant à une réduction de l'utilisation des engrais chimiques. (Rodríguez, H. et al. (2006) Les déchets végétaux comme source de microorganismes

2.1.4 Définition des Déchets Végétaux

Les déchets végétaux correspondent à des résidus organiques biodégradables d'origine végétale. Ils incluent notamment les feuilles, branches, résidus de tonte, épluchures de légumes et restes de fruits. Ces déchets proviennent principalement des activités agricoles (résidus de récolte), domestiques (déchets de cuisine) et industrielles (sous-produits de la transformation agroalimentaire). Ils se caractérisent par un rapport carbone/azote (C/N) généralement élevé, compris entre 20 et 50:1, une richesse en lignine et en cellulose, ainsi qu'un taux d'humidité variant de 60 à 80 %, ce qui favorise fortement leur biodégradation par les microorganismes.

(ADEME, 2020).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les déchets végétaux représentent environ 25 % des déchets solides municipaux à l'échelle mondiale, avec une production annuelle estimée à 1,3 milliard de tonnes. Cette proportion est particulièrement élevée dans les pays en développement, où ils constituent entre 50 et 70 % des déchets ménagers. Leur composition moyenne comprend 40 à 60 % de carbone organique, 1 à 3 % d'azote, ainsi que des éléments minéraux essentiels tels que le potassium et le phosphore.(OMS 2015)

2.1.5 Compostage et Fermentation

Le compostage est un procédé biologique aérobie contrôlé, au cours duquel différents microorganismes, notamment des bactéries thermophiles telles que *Bacillus subtilis*, des champignons comme *Aspergillus niger* et des actinomycètes, assurent la dégradation progressive des déchets végétaux. Ce processus se déroule en trois phases successives : une phase mésophile (20–40 °C) correspondant à l'hydrolyse initiale, une phase thermophile (50–70 °C) marquée par une activité microbienne intense, puis une phase de maturation durant laquelle la température redescend à 30–40 °C et la matière organique se stabilise. Le compost obtenu contient généralement 20 à 30 % de matière organique stable et une charge microbienne résiduelle comprise entre 10^8 et 10^{10} UFC/g.

(De Bertoldi, M 2010).

La fermentation anaérobie repose sur l'action successive de bactéries hydrolytiques, telles que *Clostridium thermocellum* pour la dégradation de la cellulose, de bactéries acidogènes comme *Lactobacillus* produisant des acides organiques, puis de microorganismes méthanogènes du genre *Methanobacterium*, responsables de la production de méthane. Ce processus génère du biogaz composé de 60 à 70 % de CH_4 et de 30 à 40 % de CO_2 , ainsi qu'un digestat riche en éléments nutritifs. Le rendement énergétique varie entre 0,3 et 0,5 m³ de biogaz par kilogramme de matière sèche et dépend fortement du maintien d'un rapport C/N optimal (25–30:1) et d'une température comprise entre 35 et 55 °C.

(Mata-Alvarez, 2003).

Ces deux procédés nécessitent une gestion rigoureuse des paramètres physiques : une aération suffisante pour le compostage et une agitation contrôlée pour la fermentation, afin de limiter les odeurs et d'optimiser la croissance microbienne. La durée du compostage est généralement de 2 à 6 semaines, tandis que la fermentation anaérobie s'étend sur 20 à 40 jours.

(Commission Européenne 2018).

2.1.6 Rôle en Tant que Source Microbienne

Les déchets végétaux constituent un substrat particulièrement riche en nutriments, favorisant le développement d'une grande diversité microbienne. On y retrouve des densités de 10^6 à 10^9 bactéries par gramme, notamment des genres tels que *Pseudomonas* et *Bacillus*, ainsi que des champignons filamenteux (*Trichoderma*, *Penicillium*) et des protozoaires. Ces microorganismes participent activement à la minéralisation du carbone, avec une dégradation pouvant atteindre 50 à 80 % de la matière organique, et au recyclage de l'azote par des processus tels que la nitrification. Ils favorisent également les symbioses mycorhiziennes, améliorant ainsi la biodisponibilité du phosphore dans les sols.

(Insam, H. & Franke 2014).

En tant que réservoir microbien, les déchets végétaux jouent un rôle clé dans les cycles biogéochimiques, notamment par la fixation de l'azote atmosphérique via *Azotobacter*, la dégradation de la lignine par des enzymes fongiques spécifiques et la production d'antibiotiques naturels par des genres comme *Streptomyces*. Leur contribution écologique se traduit également par la limitation de l'érosion des sols et l'enrichissement en humus, ce qui améliore la capacité de rétention d'eau de 20 à 50 %.

(Ryckeboer, J. et al 2003).

Dans le domaine des biotechnologies, ces déchets sont largement utilisés pour l'isolement de souches microbiennes d'intérêt industriel, telles que les *Bacillus* producteurs d'enzymes amylolytiques destinées à l'industrie alimentaire.

(EPA 2021)

Chapitre3 : Matériel et Méthodes

Chapitre 3:

Ce chapitre porte sur l'approche pratique suivie dans cette étude. L'objectif de cette étude est de rechercher les bactéries du genre *Bacillus* de type PGPR dans des déchets végétaux origine urbaine et de tester leur pouvoir biofertilisant, les déchets végétaux collectés ont été fermentés dans du sol. Les analyses physicochimiques ont été effectuées tels que le PH et humidité. Les analyses microbiologiques ont porté sur les bactéries mésophiles les bactéries du genre *Bacillus* et les bactéries pathogènes. Enfin les bactéries du genre *Bacillus* sélectionnées dans cette études ont été appliquées sur des plants de tomate (*Solanum lycopersicum*) pour tester leur efficacité sur la croissance de ces plantes. Les protocoles suivis dans cette étude sont été inspirées des normes ISO et AFNOR.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Matériel biologique

Pour cette étude, nous avons utilisé :

- Un mélange fermenté de déchets végétaux et de terre agricole, servant de source microbienne.
- Des souches bactériennes isolées du genre *Bacillus* sp.
- Des graines de tomate (*Solanum lycopersicum*) pour l'évaluation biologique.

3.2 Les Matériaux

- Pour la préparation d'un milieu P. C. A: Balance analytique ,Spatule Bécher 1L,Eau distillé
Plaque chauffante Autoclavage 23,5 g de poudre de P. C. A.
- Pour la préparation la solution mère: 10g échantillon 90ml eau distillé ,Balance analytique,
Tube à essai stériles ,Vortex,Marqueur.
- Pour ensemencement: boîtes de pétrie stériles ,P. C. A bondu et maintenu à 45-50 ,Suspension on
microbienne dilution 10-5,Micropipette,Pipette pasteur ,Bec benzen,Incubateur
- Pour la préparation les milieux MACKONKEY et SS agar: Balance analytique,Spatule,Bécher
Eau distillé ,Plaque echauffaute,Autoclave,Boîtes de pétrie stériles ,Suspension microbienne dilution
10-4,Bec benzen ,Incubateur
- Pour isolement bactéries *Bacillus*: bain-marie réglé à 80 ,Boîtes de pétrie stériles ,Milieu PCA,
Micropipette /étaleur stériles ,Bec benzen /Incubateur
- Pour la coloration de Gram: lame propre ,Anse stériles ,Bec benzen ,Eau distillé ,Collorants de
Gramm (crystal violet, lugol, Alcool, safranin) huile à immersion ,les testes oxydase, catalase,
sporulation: Catalase: lame propre ,Anse stériles ,Culture jeune de *Bacillus* ,L'eau oxygény
(H₂O₂), l'oxydase: Anse,Colonie bactérienne ,Réactif oxydase ,Lame propre
- Sporulation: lame avec frottis fixé,Petit morceau de papier filtre,Vert de malachite,Safranine
- Matériel conservation par repiquage:

Souche bactérienne pure (isolée sur PCA par exemple),Gélose nutritive (Nutrient Agar),Tubes à
essai stériles,Autoclave,Bec Bunsen,Anse de platine stérile,Incubateur (37°C ou 30°C selon souche),
Réfrigérateur (4°C),Marqueur indélébile,Portoir à tubes.

- Matériel pour API 20:Souche pure récente (18–24h),Galerie API 20^E,Solution saline stérile
,(NaCl 0,85%),Pipette stérile,Huile minérale stérile,Boîte d'incubation,Incubateur 37°C

Réactifs:

Kovacs (Indole),VP1 + VP2,FeCl₃ (TDA)

3.3 Suivi de la fermentation

Le mélange organique composé de sol et des déchets végétaux d'origine urbain a été incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 à 30 jours. La fermentation a été suivie pendant toute cette période en observant certains paramètres : le changement de l'aspect du mélange, apparition des gaz, l'odeur, et la variation de la température



Figure 1:fermentaion sol+dechets vegetaux

3.4 Analyses physicochimiques

Après 20 à 30 jours de la fermentation du mélange précédemment cité (sol+déchets végétaux), les analyses suivantes ont été effectuées sur ce malange:

3.4.1 Détermination de l'humidité

10 g d'échantillon frais ont été pesés.

L'échantillon a été séché à 105°C pendant 24 h.

L'humidité a été calculée selon :

$(\text{Pois frais} - \text{pois sec} / \text{pois frais}) \times 100$

3.4.2 Matière sèche

$\text{MS} = 100 - \text{humidité}$

3.4.3 Mesure du pH

Une suspension (10 g d'échantillon + 100 mL d'eau distillée) a été agitée pendant 30 minutes puis mesurée à l'aide d'un pH-mètre calibré.

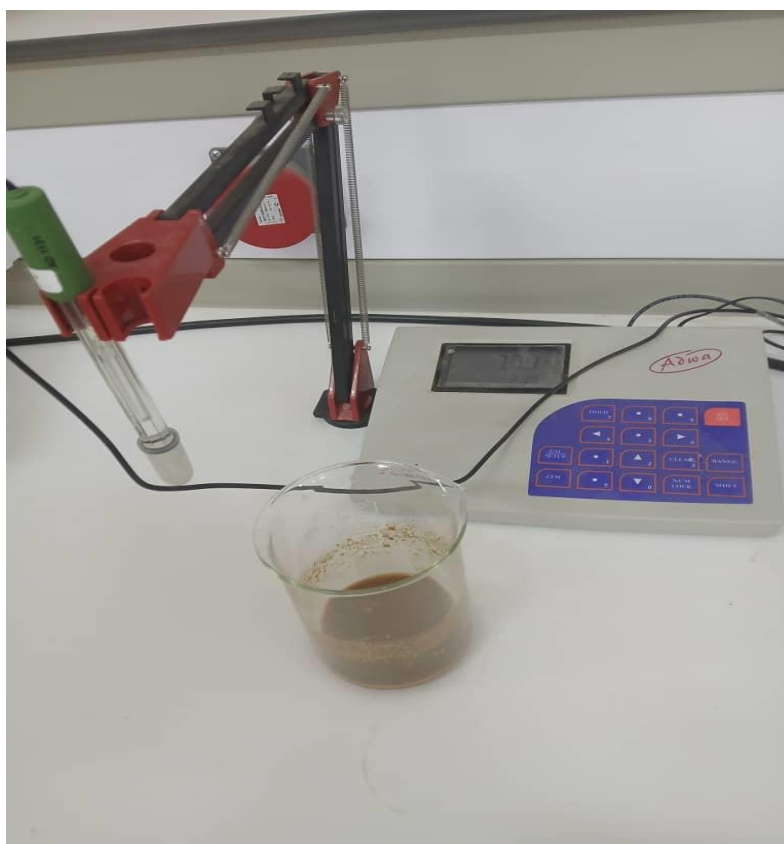


Figure 2: ph metre

3.5 Analyses microbiologiques :

Les analyses microbiologiques ont été réalisées afin d'évaluer la présence et l'activité des microorganismes dans les échantillons étudiés. Ces analyses permettent de déterminer la qualité microbiologique ainsi que d'isoler et d'identifier certaines bactéries d'intérêt, notamment les

bactéries du genre *Bacillus*. Les différentes manipulations ont été effectuées dans des conditions aseptiques en utilisant du matériel stérile afin d'éviter toute contamination.

3.5.1 Préparation des dilutions décimales

10 g d'échantillon ont été introduits dans 90 mL d'eau physiologique stérile. Des dilutions successives jusqu'à 10^{-6} ont été réalisées.



Figure 3 :preparation des dilutions decimales

3.5.2 Dénombrement de la flore mésophile totale

Pour le dénombrement de la flore mésophile totale les milieux suivants ont été utilisés :

Plate Count Agar (PCA)

Gélose Nutritive (GN)

Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24–48 h.

Le nombre d'unités formant colonies (UFC/g) a été calculé selon :

$$\text{UFC/g} = N \cdot F / V$$

3.5.2.1 Dénombrement (méthode d'incorporation)

Principe

Le dénombrement par ensemencement en masse consiste à incorporer l'inoculum microbien directement dans le milieu de culture en surfusion (45-50°C) fondu avant sa solidification. Les microorganismes se développent alors à la fois à l'intérieur et à la surface du milieu gélifié.

Procédure expérimentale

Préparer une série de dilutions décimales de l'échantillon.

Prélever 1 mL de la dilution appropriée.

Introduire le volume dans une boîte de Pétri stérile.

Ajouter 15 à 20 mL de milieu Plate Count Agar (PCA) fondu et maintenu à 45°C.

Homogénéiser délicatement par mouvements circulaires.

Laisser solidifier le milieu à température ambiante.

Incuber les boîtes retournées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Procéder au comptage des colonies développées.

3.5.2.2 Dénombrement en surface (méthode d'étalement)

Principe

Le dénombrement en surface consiste à déposer la suspension microbienne à la surface d'un milieu solide. Les colonies se développent uniquement en surface, facilitant leur observation et leur comptage.

Procédure expérimentale

Réaliser les dilutions décimales successives.

Déposer 0,1 mL de la dilution sélectionnée sur la surface d'une gélose PCA solidifiée.

Étaler l'inoculum à l'aide d'une spatule de Drigalski stérile ou d'un étaleur stérile.

Laisser absorber l'inoculum pendant quelques minutes.

Incuber les boîtes inversées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Compter les colonies apparues à la surface.

3.5.3 Isolement du genre Bacillus

Afin de sélectionner les bactéries du genre Bacillus, les suspensions bactériennes ont été chauffées avant le repiquage pour éliminer les formes non sporulées.

Les ensemencements ont été faits sur les milieux suivants :

- Gélose nutritive (GN)

- Plate Count Agar PCA
- Incuber 37°C / 24 h.
- Sélection colonies typiques.

3.5.4 Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée afin de déterminer la nature des bactéries isolées. Un frottis bactérien a été préparé sur une lame propre puis fixé par chauffage. La lame a été successivement colorée au violet de cristal (1 min), traitée au Lugol (1 min), décolorée à l'alcool pendant 10–20 secondes puis contre-colorée à la safranine (30 s). Après séchage, l'observation a été effectuée au microscope optique à l'objectif $\times 100$ avec huile à immersion.



Figure 4 coloration de gram

3.5.5 coloration des spores

- Préparer une lame avec un frottis bactérien fixé.
- Déposer un petit morceau de papier filtre sur le frottis.
- Recouvrir avec le vert de malachite.
- Chauffer doucement pendant quelques minutes pour faciliter la pénétration du colorant.

- Retirer le papier filtre puis rincer à l'eau.
- Contre-colorer avec la safranine pendant 1 à 2 minutes.
- Rincer, sécher et observer au microscope.

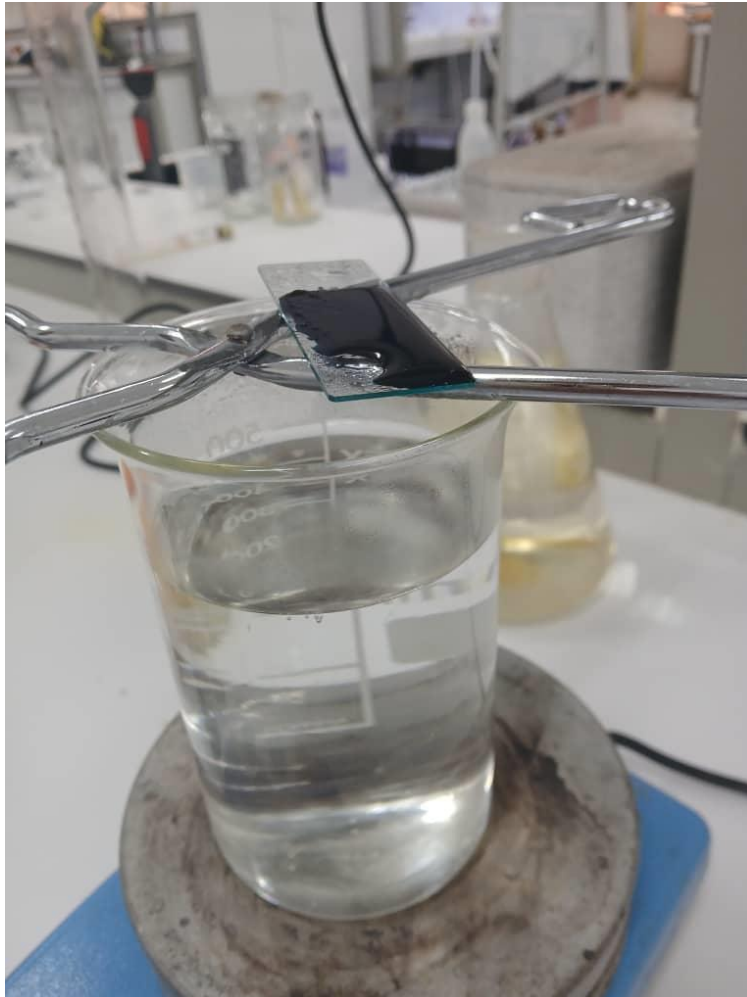


Figure 5: mise en evidence des spores par coloration au vert malachite

3.5.6 Test catalase

Sur une lame en verre stérile, suspendre une colonie bactérienne sur une goutte de la solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 3%, la réaction est instantanée, si la souche possède l'enzyme catalase elle est dite « catalase positive », le peroxyde d'hydrogène se transforme en eau et en Oxygène s'il y a une effervescence (apparition de bulles) ceci signifie que la souche testée est catalase positive.

3.5.7 Recherche de pathogènes indicateurs

Escherichia coli

Milieu sélectif approprié.

Incubation 37°C / 24 h.

Salmonella sp.

Culture sur milieu sélectif spécifique



Figure 6:preparation le milieu

3.5.8 Test oxydase

Le test oxydase a été réalisé afin de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase. Une colonie bactérienne fraîche a été déposée sur un papier filtre imprégné du réactif oxydase (tétraméthyl-p-phénylènediamine). L'apparition d'une coloration violette dans un délai inférieur à 10 secondes a été considérée comme un résultat positif.

3.6 Préparation de la suspension bactérienne

Prélever colonie de Bacillus.

Inoculer dans Bouillon nutritif. 10ml

Incuber 37°C / 24 h.

3.7 Application sur les plants de tomate

Désinfecter graines.

Germination en pots stériles.



Figure 7 : apres 7jours

Période	Témoin (sans <i>Bacillus</i>)		Plante traitée avec <i>Bacillus</i>		Observations
Première semaine		Germination lente et hétérogène		Germination rapide et homogène	Stimulation remarquable de la germination
Deuxième semaine		Faible croissance de la tige et des feuilles		Augmentation de la hauteur de la tige et du nombre de feuilles	Début de l'effet positif des bactéries
Troisième semaine		Feuilles petites et vert clair		Feuilles plus grandes et vert foncé	Amélioration de l'activité biologique de la plante
Quatrième semaine		Racines faibles et peu développées		Racines longues et denses	Meilleure absorption de l'eau et des éléments minéraux
Cinquième semaine		Croissance moyenne		Augmentation importante de la biomasse végétale	Stimulation de la croissance végétative

Figure8 : arroser racines avec suspension bactérienne.

Après 7–10 jours :

Témoins :

plante sans bactérie.

Paramètres mesurés :

hauteur plante,

nombre feuilles,

développement racinaire.

Chapitre 4: Résultats

4 Suivi de la fermentation :

Résultats

Au cours de la fermentation du mélange (sol + déchets végétaux), plusieurs changements ont été observés :

apparition de bulles (dégagement de gaz),

augmentation de la température,

odeur caractéristique de fermentation,

transformation progressive de la texture du substrat.

5 Résultats physicochimiques

Paramètre	Valeur		
Humidité (%)	13.13		
Matière sèche (%)	86.87%		
pH	Echantillon1	Echantillon2	Echantillon3
	7.5	7.9	7.8

Tableau 1: Paramètres physicochimiques
Paramètr

5.1 Humidité (%)

$(\text{Pois frais} - \text{pois sec} / \text{pois frais}) * 100$

$(11.57 - 10.05 / 11.57) * 100 = 13.13\%$

5.2 Matière sèche (%)

$MS = 100 - \text{humidite}$

$MS = 100 - 13.13 = 86.87\%$

5.3 Moyenne de ph :

$M = E1 + E2 + E3 / 3$

$7.5 + 7.9 + 7.8 / 3 = 7.7 \text{ ph/matre}$

6 Dénombrement microbien :

En masse :

Dilution	Colonies			UFC/g
10^{-4}	7	1	1	3×10^4
10^{-5}	7	1	0	2.67×10^5

En Surface :

Dilution	Colonies			UFC/g
10^{-4}	5	3	45	1.77×10^6
10^{-5}	5	2	40	1.57×10^7

Tableau 2: UFC/g

Résultat:

Une forte densité microbienne a été observée dans le produit fermenté.

7 Identification de Bacillus

Test	Résultat
Gram	+
Catalase	+
Oxydase	-
Spore	Présente

Tableau 3 : Tests microbiologiques

Résultat:

Les souches isolées présentent les caractéristiques du genre *Bacillus*.

8 Effet sur la tomate

Parametres de croissance	Temoin	Traitement avec bacillus
Taux de germination	65	92
Hauteur de la plante	12cm	21cm
Longueur des racines	6cm	12cm
Masse fraiche	8g	16 g
Masse seche	2g	5g
Nombre de feuille	5	10

Tableau 4;mesures finales de croissance de la tomate

8.1 Taux de germination :

Temoin $13/20=65$

Bacillus $18/20=92$

N de graines germees/nombre total de graines

8.2 Hauteur de la plante

Temoin $10+12+13+14+11/5=12\text{cm}$

Bacillus $19+21+20+22+23/5=21\text{cm}$

8.3 Nombre de feuille

Temoin $4+5+5+6+5/5=5$

Bacillus $9+10+11+10+10/5=10$

8.4 Longueur des racines

Temoin $6+5+7+6+6/5=6\text{cm}$

Bacillus $11+12+13+12+12/5=12\text{cm}$

8.5 Masse fraiche

Temoin $7+8+9+8+8/5=8\text{g}$

Bacillus $15+16+17+16+16/5=16\text{g}$

8.6 Masse seche

- Sechage des plants a 70C
- Duree : 48a72 heures
- Elimination totale de leau

Temoin $2+2+2+2+2/5=2\text{g}$

Bacillus $4+5+6+5+5/5=5\text{g}$

9 Discussion :

9.1 Fermentation

Les observations réalisées au cours de la fermentation ont révélé la présence de bulles ainsi qu'une modification progressive de l'aspect du mélange. Ces changements témoignent d'une activité microbienne importante responsable de la dégradation de la matière organique contenue dans les déchets végétaux. La production de gaz observée est liée au métabolisme des microorganismes qui utilisent les composés organiques comme source d'énergie et de nutriments.

La fermentation favorise ainsi la transformation des matières organiques complexes en composés plus simples et plus assimilables. Ce processus contribue également à l'enrichissement du milieu en éléments nutritifs indispensables au développement des plantes. Ces observations concordent avec les travaux d'Abdul Halim (2009), qui ont montré que la fermentation permet la valorisation des déchets organiques en produits à forte valeur agronomique.

9.2 Analyses physicochimiques

Les analyses physicochimiques réalisées sur le produit fermenté ont permis d'évaluer sa qualité et son potentiel fertilisant. Le pH enregistré se situe dans une gamme favorable au développement de la majorité des microorganismes bénéfiques du sol. Cette caractéristique est essentielle car elle favorise les activités biologiques impliquées dans la décomposition de la matière organique et le recyclage des nutriments.

La conductivité électrique observée traduit la présence de sels minéraux issus de la dégradation des matières organiques durant la fermentation. Ces éléments minéraux représentent une source nutritive importante pour les plantes.

Par ailleurs, la teneur élevée en matière organique constitue un indicateur de fertilité. En effet, la matière organique améliore la structure du sol, augmente sa capacité de rétention en eau et favorise l'activité microbienne. Ces résultats sont en accord avec Brady et Weil (2017), qui soulignent l'importance de la matière organique dans le maintien de la fertilité des sols agricoles.

9.3 *Activité microbiologique*

Le dénombrement de la flore mésophile totale a révélé une population microbienne importante dans le produit fermenté. Cette abondance témoigne d'une activité biologique intense au sein du substrat.

Les microorganismes présents jouent un rôle fondamental dans la décomposition de la matière organique et la libération progressive des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes. Ils participent également à l'amélioration des propriétés biologiques du sol et au maintien de son équilibre écologique.

Une forte densité microbienne est généralement considérée comme un indicateur de qualité pour les biofertilisants, car elle reflète leur capacité à stimuler l'activité biologique du sol après leur application.

9.4 *Identification des souches de *Bacillus**

Les résultats des analyses microbiologiques ont montré que les souches isolées présentent les caractéristiques typiques du genre *Bacillus*. Elles sont apparues Gram positif, catalase positive et capables de former des spores, ce qui confirme leur appartenance à ce genre bactérien.

Les bactéries du genre *Bacillus* sont largement reconnues pour leurs propriétés bénéfiques en agriculture. Elles sont capables de produire diverses substances biologiquement actives, notamment des phytohormones telles que les auxines, qui stimulent la croissance des racines et favorisent le développement végétal.

De plus, certaines espèces de *Bacillus* possèdent la capacité de solubiliser le phosphore présent dans le sol, rendant cet élément plus accessible aux plantes. Elles peuvent également produire des substances antimicrobiennes qui limitent le développement de certains agents pathogènes. Ces observations sont conformes aux travaux de Vessey (2003) et de Lugtenberg et Kamilova (2009), qui ont démontré le potentiel des *Bacillus* comme bactéries promotrices de la croissance végétale.

9.5 Recherche des microorganismes pathogènes

Les analyses microbiologiques réalisées pour la recherche des microorganismes pathogènes n'ont révélé ni la présence d'*Escherichia coli* ni celle de *Salmonella*. Cette absence constitue un indicateur important de la qualité sanitaire du produit obtenu.

La sécurité microbiologique est un critère essentiel pour l'utilisation des biofertilisants, car la présence de microorganismes pathogènes pourrait représenter un risque pour les cultures, l'environnement et la santé humaine. Les résultats obtenus montrent donc que le produit fermenté peut être utilisé dans des conditions satisfaisantes de sécurité sanitaire.

9.6 Effet de *Bacillus* sur la croissance des plants de tomate

Les résultats obtenus lors de l'expérimentation sur les plants de tomate ont montré une amélioration significative de plusieurs paramètres de croissance chez les plantes traitées par *Bacillus* comparativement au témoin. Une augmentation de la hauteur des plants, du nombre de feuilles ainsi qu'une meilleure vigueur générale ont été observées.

Cette amélioration peut être expliquée par plusieurs mécanismes. Les bactéries du genre *Bacillus* favorisent le développement du système racinaire, ce qui améliore l'absorption de l'eau et des éléments nutritifs. Elles contribuent également à la disponibilité de certains nutriments dans le sol grâce à leurs activités biologiques.

Par ailleurs, l'augmentation de l'activité microbienne dans la rhizosphère améliore les interactions entre le sol et la plante, favorisant ainsi une croissance plus rapide et plus homogène. Ces résultats confirment l'efficacité des bactéries du genre *Bacillus* comme biofertilisants et rejoignent les conclusions de nombreuses études mettant en évidence leur rôle positif dans l'amélioration de la croissance et de la productivité des cultures.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus démontrent que le produit fermenté enrichi en *Bacillus* possède des caractéristiques physicochimiques et microbiologiques favorables, tout en exerçant un effet positif

sur la croissance des plants de tomate. Ces observations confirment le potentiel de ce biofertilisant comme alternative écologique aux fertilisants chimiques conventionnels.

Conclusion

Au terme de cette étude, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'importance des bactéries du genre *Bacillus* dans le domaine de la fertilisation biologique et de l'amélioration de la croissance végétale. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer le potentiel d'un produit fermenté enrichi en bactéries bénéfiques et son effet sur le développement des plants de tomate.

Les observations réalisées au cours de la fermentation ont confirmé l'existence d'une activité microbienne importante responsable de la dégradation de la matière organique et de la transformation des déchets végétaux en un substrat riche en éléments nutritifs. Les analyses physicochimiques ont montré que le produit obtenu possède des caractéristiques favorables à son utilisation comme biofertilisant, notamment grâce à une teneur appréciable en matière organique et à des paramètres compatibles avec le développement des microorganismes bénéfiques.

Les analyses microbiologiques ont révélé une forte densité de flore mésophile totale, traduisant une activité biologique intense au sein du produit fermenté. L'identification des souches isolées a confirmé leur appartenance au genre *Bacillus* à travers les différents tests microbiologiques réalisés. Ces bactéries sont reconnues pour leurs capacités à stimuler la croissance des plantes, à améliorer la disponibilité des nutriments dans le sol et à favoriser le développement racinaire.

Par ailleurs, l'absence de microorganismes pathogènes tels que *Escherichia coli* et *Salmonella* constitue un indicateur important de la qualité sanitaire du produit obtenu et confirme son innocuité pour une utilisation agricole.

L'évaluation de l'effet de *Bacillus* sur les plants de tomate a mis en évidence une amélioration notable de plusieurs paramètres de croissance par rapport au témoin. Les plants traités ont présenté une meilleure vigueur, une hauteur plus importante ainsi qu'un nombre de feuilles plus élevé. Ces résultats démontrent l'efficacité des bactéries du genre *Bacillus* dans la promotion de la croissance végétale et confirment leur rôle en tant que biofertilisants.

En conclusion, cette étude montre que l'utilisation des bactéries du genre *Bacillus* représente une alternative prometteuse aux fertilisants chimiques conventionnels. Leur capacité à améliorer la fertilité

du sol, à stimuler la croissance des plantes et à contribuer à une agriculture plus respectueuse de l'environnement en fait une solution durable pour répondre aux défis actuels de la production agricole.

Cependant, il serait intéressant de poursuivre les recherches par des essais en conditions de plein champ, sur différentes cultures et dans divers types de sols, afin de mieux évaluer l'efficacité de ces bactéries à grande échelle et de confirmer leur potentiel pour une application agricole durable.

10 Bibliographie

- Abdul Halim, R. (2009). History and development of microbial inoculants in agriculture. *Malaysian Journal of Soil Science*, 13, 45–55.
- ADEME (Agence de la transition écologique). (2020). *Guide des déchets verts : définition et caractérisation*. ADEME, France.
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Role of rhizobacteria in plant growth and disease suppression. *Phytopathology*, 95(11), 1271–1279.
- Bernal, M. P., Albuquerque, J. A., & Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444–5453.
- Bergey, D. H., De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 3). Springer.
- Brady, N. C., & Weil, R. R. (2017). *The nature and properties of soils* (15th ed.). Pearson Education.
- Chen, Y. (2006). Plant nutrient management and sustainable agriculture. *Journal of Agricultural Science*, 144(2), 123–135.
- Commission Européenne. (2018). *Composting and anaerobic digestion of organic waste*. European Commission.
- De Bertoldi, M., Sequi, P., Lemmes, B., & Papi, T. (2010). *The science of composting*. Springer.
- El-Yazeid, A. A., Abou-Aly, H. E., & Mady, M. A. (2007). Microbial inoculants and plant growth promotion. *Journal of Plant Nutrition*, 30(5), 763–775.
- FAO. (2017). *Soil and sustainable agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. (2021). *The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture*. FAO.
- Glick, B. R. (2012). *Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications*. Springer.
- Gonçalves, J., Freitas, J., Fernandes, I., & Silva, P. (2023). Microalgae as biofertilizers: A sustainable way to improve soil fertility and plant growth. *Sustainability*, 15(16), 12413.

- Insam, H., & Franke-Whittle, I. H. (2014). *Microbiology of composting*. Springer.
- Khan, A. L., et al. (2014). Plant growth promotion by phosphate-solubilizing bacteria. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 1–14.
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259–1266.
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1–25). Springer.
- Lal, R. (2015). Restoring soil quality to mitigate soil degradation. *Sustainability*, 7(5), 5875–5895.
- Lee, K. E., & Pankhurst, C. E. (1992). Soil microorganisms and sustainable agriculture. *Soil Biology & Biochemistry*, 24(6), 705–712.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson Education.
- Mata-Alvarez, J. (2003). *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid waste*. IWA Publishing.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572.
- Organisation mondiale de la santé (OMS). (2015). *Waste and human health: Evidence and needs*. World Health Organization.
- Pii, Y., et al. (2015). Microorganisms for green revolution: An eco-friendly approach. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–15.
- Priest, F. G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria* (pp. 3–16). ASM Press.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (2006). Phosphorus solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 24(5), 484–499.
- Rokhzadi, A., et al. (2008). Role of biofertilizers in nutrient availability for plants. *Bioresource Technology*, 99(17), 8319–8325.
- Seldin, L., Van Elsas, J. D., & Penido, E. G. C. (1998). *Bacillus* diversity and ecology. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria* (pp. 17–34). ASM Press.

- Vessey, J. K. (2003). Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571–586.
- Vlek, P. L. G., & Vielhauer, K. (1994). Integrated soil fertility management for tropical agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 40(1), 1–11.
- Wani, P. A., et al. (1995). Beneficial effects of rhizosphere microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(1), 1–8.

