



**Faculté des sciences de la Nature et de la vie**

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Option: interactions microorganismes, hôtes et environnements

**THESE**

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME DE  
DOCTORAT 3<sup>ème</sup> cycle LMD

Par

**CHIBANI Hiba Rahman**

**Sélection et caractérisation des bactéries solubilisant le phosphate  
isolées du sol salin dans l'ouest algérien: effet sur la promotion de la  
croissance du blé (*Triticum sp.*).**

Soutenu publiquement le : 02/11/2017

**Membres de jury**

<b>CHADLI Rabah</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Président</b>
<b>BELLAHCENE Miloud</b>	<b>Professeur</b>	<b>C.U. Ain-Temouchent</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>DJIBAOUI Rachid</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Co-Directeur de thèse</b>
<b>BAHRI Fouad</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Examineur</b>
<b>SETTI Benali</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Chlef</b>	<b>Examineur</b>
<b>REGUIEG YSSAAD Houcine Abdelhakim</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Examineur</b>

**Laboratoire de microbiologie et biologie végétale**

*Année universitaire 2016/2017*

## ***Avant-propos***

*Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au laboratoire de microbiologie et biologie végétale (LMBV), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid iben badis, Mostaganem. Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire, enseignants, doctorants avec j'ai eu souvent des moments très agréables.*

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mr. BELLAHCENE Miloud, et co-encadré par Mr. DJIBAOUI Rachid. Je tiens vivement à leur exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour leur disponibilité, leur patience, leur compréhension, et leurs intérêts portés à ce sujet de recherche.*

*Mes remerciements les plus chaleureux au président du jury, Mr. Chadli Rabah Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université de Mostaganem d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail.*

*Je tiens à remercier également Mr. BAHRI Fouad, Mr. SETTI Benali et Mr. REGUIEG YSSAAD Houcine Abdelhakim, d'avoir accepté, malgré leurs préoccupations et leurs tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*J'adresse aussi mes remerciements plus vifs à Mr. BOUZNAD Ahcene et Mr. CHIBANI Abdelwaheb pour leur soutien, leur patience, leur orientation toute au long de ce travail.*



# **Sommaire**

# Sommaire

Résumé.....	I
Liste des abréviations.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	IV
Introduction.....	1

## Chapitre I

### Revue bibliographique

1. Le phosphore dans l'environnement .....	4
1.1. Le phosphore dans le sol .....	4
1.2. Les formes du phosphore.....	5
2. Diversité microbienne du sol.....	6
2.1. La rhizosphère .....	6
2.2. Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes : (PGPR) .....	7
2.3. Diversité taxonomique des PGPR .....	7
2.3.1. Proteobacteria.....	7
2.3.2. Actinobacteria .....	9
2.3.3. Firmicutes.....	9
3. Microorganismes solubilisant le phosphate.....	9
3.1. Mécanisme de solubilisation du phosphate par les MSP.....	10
3.1.1. Solubilisation du phosphore organique (minéralisation).....	10
3.1.2. Solubilisation du phosphore inorganique .....	11
3.2. Activités PGP des bactéries solubilisant le phosphate .....	14
3.2.1. Fixation de l'azote .....	14
3.2.2. Production d'hormones de croissance .....	14
3.2.2.1. Production de l'AIA .....	15
3.2.3. Activité de biocontrôle .....	15
3.2.3.1. Compétition pour l'espace et les nutriments .....	16
3.2.3.2. Production des sidérophores.....	16
3.2.3.3. Production des enzymes lytiques.....	17
3.2.3.4. Antibiose .....	17
3.3. Effet des BSP sur la production végétale (cas des céréales) .....	18
3.3.1. Les céréales .....	19
3.3.2. Production du blé en Algérie.....	20

3.3.3. Application des BSP sur les cultures de blé .....	21
3.3.4. Commercialisation des BSP .....	22
4. Stress salin.....	22
4.1. Effet de stress salin sur les plantes .....	23
4.2. Effet de la salinité du sol sur la diversité microbienne rhizosphérique .....	24
4.3. Atténuation du stress salin dans les plantes par les PGPR .....	25
4.3.1. Synthèse des auxines et de composés similaires .....	25
4.3.2. Sécrétion des Exopolysaccharides (EPS) .....	26
4.3.3. Accumulation des osmolytes .....	26
4.3.4. Modulation de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase .....	27
4.3.5. Enzymes antioxydantes .....	27
4.3.6. Tolérance systémique induite .....	28

## **Chapitre II**

### **Matériel et méthodes**

1. Echantillonnage du sol salin.....	29
1.1. Localisation des sites de prélèvement .....	29
1.2. Prélèvement des échantillons .....	30
1.3. Analyses physico-chimiques du sol.....	30
2. Isolement des bactéries solubilisant le phosphate (BSP).....	30
2.1. Purification des rhizobactéries isolées.....	31
2.2. Solubilisation du phosphate.....	31
2.2.1. Test de solubilisation sur milieu solide .....	31
2.2.2. Test de solubilisation en milieu liquide.....	31
3. Identification phénotypique des isolats bactériens .....	33
4. Evaluation des activités PGP des isolats bactériens .....	33
4.1. Production de l'acide indole acétique (AIA).....	33
4.2. Fixation d'azote.....	34
4.3. Production de sidérophores .....	34
4.4. Production d'acide cyanhydrique (HCN).....	35
4.5. Production de l'ammoniac.....	35
5. Caractérisation des isolats sélectionnés.....	35
5.1. Sélection des isolats par analyse en composante principales (ACP).....	35
5.2. Caractérisation génotypique des isolats bactériens .....	35
5.2.1. Extraction de l'ADN.....	36

5.2.2. Dosage de l'ADN .....	36
5.2.3. Amplification du gène de l'ARNr 16S (PCR).....	36
5.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	37
5.2.5. Séquençage .....	37
5.3. Analyse chromatographique des acides organiques produits par les BSP .....	38
5.4. Mesure de l'activité de réduction d'acétylène par les isolats bactériens (test ARA) .....	38
5.5. Effet de stress salin sur les isolats bactériens .....	39
5.5.1. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne.....	39
5.5.2. Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate en milieu liquide .....	39
6. Effet de l'inoculation sur la croissance des plants de blé dur.....	39
6.1. Matériel végétal.....	39
6.2. Préparation de l'inoculum bactérien.....	40
6.3. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination des grains de blé.....	40
6.4. Expérimentation .....	40
6.5. Irrigation.....	41
6.6. Détermination des paramètres morpho-biochimiques des plants de blé .....	41
6.6.1. Paramètres morphologiques .....	41
6.6.2. Paramètres biochimiques.....	41
6.6.2.1. Dosage de la chlorophylle .....	41
6.6.2.2. Contenu en P, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> des feuilles .....	41
7. Analyses statistiques.....	43

## **Chapitre III**

### **Résultats**

1. Echantillonnage du sol salin.....	44
1.1. Analyses physico-chimiques des sols.....	44
2. Isolement des bactéries solubilisant le phosphate (BSP).....	44
2.1. Solubilisation du phosphate.....	45
2.1.1. Test de solubilisation sur milieu solide .....	45
2.1.2. Test de solubilisation en milieu liquide.....	46
3. Identification phénotypique des isolats bactériens .....	47
4. Evaluation des activités PGP des isolats bactériens .....	55
4.1. Production de l'acide indole acétique (AIA).....	56
4.2. Fixation de l'azote .....	57
4.3. Production de sidérophores .....	57

4.4. Production d'acide cyanhydrique (HCN) .....	57
4.5. Production de l'ammoniac.....	57
5. Caractérisation des isolats sélectionnés.....	60
5.1. Sélection des isolats par Analyse en composante principales (ACP).....	60
5.2. Caractérisation génotypique des isolats bactériens .....	62
5.3. Analyse chromatographique des acides organiques produits par les BSP .....	65
5.4. Mesure de l'activité de réduction d'acétylène par les isolats bactériens (test ARA) .....	65
5.5. Effet de stress salin sur les isolats bactériens .....	69
5.5.1. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne .....	69
5.5.2. Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate en milieu liquide .....	70
6. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de blé dur .....	72
6.1. Effet sur la germination des grains de blé .....	72
6.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres de croissance morphologiques du blé....	74
6.3. Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres de croissance biochimiques du blé .....	77

## **Chapitre IV**

### **Dicussion**

1. Isolement et identification des bactéries solubilisant le phosphate .....	80
2. Caractérisation physiologique des isolats bactériens (activités PGP) .....	82
3. Effet de stress salin sur les isolats bactériens .....	87
4. Effet de l'inoculation sur la croissance de blé dur.....	89
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	94
<b>Références bibliographiques</b> .....	96

### **Annexes**

#### **Publications**

## Résumé

Les bactéries solubilisant le phosphate jouent un rôle vital dans la fertilité du sol et par conséquent favorisent la croissance des plantes. L'objectif globale de cette étude consiste à isoler et identifier des bactéries solubilisant le phosphate et étudier leurs activités PGP afin d'évaluer leurs effets sur la croissance d'une variété de blé dur. 104 bactéries solubilisant le phosphate ont été isolées de la rhizosphère de blé cultivé dans des sols salins dans une région de l'Ouest Algérien. Selon leurs capacités à solubiliser le phosphate tricalcique, 41 isolats ont été sélectionnés et évalués pour leurs activités favorisant la croissance des plantes telles que la production de l'acide indole acétique (AIA), de l'acide cyanhydrique (HCN), des sidérophores et d'ammoniac et la capacité à fixer l'azote atmosphérique. Des quantités importantes de phosphore solubilisé par les isolats ont été enregistrées allant de 327,50 à 738,57 µg/ml de phosphore libre. La production d'AIA et d'ammoniac a été démontrée par tous les isolats bactériens. 29,26% produisaient de l'HCN, 87% sont producteur de sidérophores et 75,6% ont été capables de fixer l'azote. Ces bactéries solubilisant le phosphate ont été rapprochées phénotypiquement aux genres *Pseudomonas* (39,02%) suivie par *Bacillus* (19,51%), *Serratia* (14,63%) *Enterobacter* (12,19%) et en fin par *Aeromonas* et *Burkholderia* avec 7,31%. Cinq BSP les plus performantes ont été sélectionnées (selon leurs activités PGP) et identifiées par le séquençage de leurs gènes ARNr 16S comme *Enterobacter* sp. (PSB18, PSB45), *Serratia odorifera* (PSB41, PSB87) et *Bacillus cereus* (PSB91). Ces isolats ont montré une bonne tolérance au sel, ils ont été par la suite utilisés pour inoculer les grains de blé dur sous trois traitements (sans sel avec phosphore soluble, sans sel avec phosphate insoluble et avec 100 mM de NaCl plus phosphate insoluble). L'inoculation des grains de blé par ces isolats bactériens a donné lieu à des améliorations variables de la croissance des tiges et des racines de plants de blé sous les trois traitements. Les taux de phosphore absorbé par les plantes et les taux de chlorophylle foliaire ont été améliorés suite à cette inoculation dans tous les traitements. Une diminution des taux de Na<sup>+</sup> avec une augmentation des taux de K<sup>+</sup> dans les feuilles de blé ont été constatées sous stress salin chez les plantes inoculées. Les PSB isolées à partir du sol salin dans cette étude ont montré un fort potentiel de produire des substances impliquées dans la promotion de la croissance des plantes. Les cinq inoculas sélectionnés ont pu augmenter l'absorption de phosphore par les plantes et ont réduit l'effet du stress salin.

**Mots clés :** Activités PGP, Bactéries solubilisant le phosphate, Inoculation, Stress salin.

## Abstract

Phosphate solubilizing bacteria play a vital role in soil fertility and thus promote the growth of plants. The objective of his work is isolation, identification and selection of phosphate solubilizing bacteria according to their PGP activities and evaluation of their effect on a variety of durum wheat growth. 104 phosphate solubilizing bacteria were isolated from wheat rhizosphere, of saline soils in a western region of Algeria. Depending on their ability to solubilize tricalcium phosphate, 41 isolates were selected and evaluated for their plant growth promoting activities such as the production of indole acetic acid (IAA), hydrocyanic acid (HCN), siderophores and ammonia and the ability to fix atmospheric nitrogen. Significant amounts of solubilized phosphorus by isolates were recorded ranging from 327,50 to 738,57 µg/ml of released phosphorus. IAA and ammoniac production was shown by almost all the bacterial isolates. 29,26% of the isolates were positive for HCN production, 87% were siderophore producers and 75,6% were able to fix nitrogen. Those phosphate solubilizing bacteria were identified biochemically as *Pseudomonas* (39,02%) followed by *Bacillus* (19,51%), *Serratia* (14,63%), *Enterobacter* (12,19%) and ultimately by *Aeromomas* and *Burkholderia* with 7,31%. Five of the most efficient PSB were selected and identified by sequencing their rRNA16S gene as *Enerobacter* sp. (PSB18, PSB45), *Serratia odorifera* (PSB41, PSB87) and *Bacillus cereus* (PSB91). Those isolates showed a good salt tolerance, they were used to inoculate the durum wheat grains with three treatments (without salt with soluble phosphorus, without salt and with insoluble phosphate, with 100 mM of NaCl and insoluble phosphate). Inoculation of wheat grains by these bacterial isolates improved the growth of shoots and roots of wheat plants with high percentages of improvement under the three treatments. The phosphorus levels absorbed by plants and foliar chlorophyll content were high following this inoculation in all treatments. A decrease in Na<sup>+</sup> levels with an increase in K<sup>+</sup> levels in wheat leaves were observed under salt stress in inoculated plants. PSB that have been isolated from saline soil in this study have shown a high potential to produce substances involved in plant growth promoting. Five selected inoculants have been able to increase phosphorus uptake by plants and reduce the effect of salt stress.

**Key words:** PGP activities, Phosphate solubilizing bacteria, Inoculation, Salt stress.

## الملخص

تلعب البكتيريا المذيبة للفوسفات دورا حيويا في خصوبة التربة وبالتالي تعزز نمو مجموعة كبيرة من النباتات. الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتشخيص البكتيريا المذيبة للفوسفات، دراسة أنشطتها PGP من اجل تقييم تأثيرها على نمو أحد أصناف القمح الصلب. تم عزل 104 عزلة بكتيريا مذيبة للفوسفات من منطقة الجذور لنبات القمح المزروع في تربة مالحة في منطقة من الغرب الجزائري. وفقا لقدرتها على اذابة الفوسفات غير قابل للدوبان تم اختيار 41 عزلة وتقييم نشاطها المتعلق بتعزيز نمو النباتات مثل إنتاج حامض الأندول الخليك (AIA)، سيانيد الهيدروجين (HCN)، السيدروفورات والأمونيا و قدرتها على تثبيت النيتروجين الجوي. سجلت كميات كبيرة من الفوسفور المذاب بالعزلات البكتيرية حيث تراوحت كميات الفوسفور المحررة من 327,50 إلى 738,57 مغ/ ملل. جميع العزلات كانت منتجة لحمض الأندول الخليك والأمونيا بينما 29,26٪ منها كانت منتجة لسيانيد الهيدروجين و 87٪ كانت منتجة للسيدروفورات و 75,6٪ كان لها القدرة على تثبيت النيتروجين الجوي. البكتيريا المذيبة للفوسفات التي تم تشخيصها كيميائيا تنتمي الى جنس *Pseudomonas* (39,02٪) يليها *Bacillus* (19,51٪)، *Serratia* (14,63٪) و *Enterobacter* (12,19٪) وفي الأخير *Aeromomas* و *Burkholderia* بنسبة 7,31٪. تم اختيار خمسة من البكتيريا المذيبة للفوسفات الأكثر فعالية و تشخيصها جزيئيا بطريقة تسلسل مورثة الحمض النووي rARN16S مما اظهر انتماءها ل *Enerobacter* sp. (PSB45,PSB18) *Serratia odorifera* (PSB87, PSB41) و *Bacillus cereus* (PSB91). أبدت هذه العزلات قدرة جيّدة على تحمّل الملوحة و قد تم استخدامها لتلقيح بذور القمح الصلب بواسطة ثلاثة علاجات (بدون ملح مع اضافة الفوسفور، بدون ملح مع اضافة الفوسفور غير قابل للدوبان، مع اضافة 100 ميلي مولر من الملح و الفوسفور غير قابل للدوبان). أدى تلقيح بذور القمح بواسطة هذه العزلات البكتيرية إلى تحسن نمو السيقان والجذور لنباتات القمح بنسب مختلفة باستخدام ثلاث علاجات سيما تحت الضغط الملحي. كميات الفوسفور التي امتصتها النباتات ومعدلات الكلوروفيل في الاوراق كانت مرتفعة عقب التلقيح في كل الحالات، كما سجل انخفاض ملحوظ في نسبة الصوديوم  $Na^+$  مع زيادة في نسبة البوتاسيوم  $K^+$  في أوراق القمح تحت الضغط الملحي لدى النباتات الملقحة. أظهرت البكتيريا المذيبة للفوسفات إمكانات عالية لإنتاج المواد المساهمة في تعزيز نمو النبات و الخمس لقاحات المستعملة كانت فعالة وتمكنت من زيادة امتصاص الفوسفور في النباتات وقللت من تأثير الضغط الملحي.

**الكلمات المفتاحية:** أنشطة PGP، البكتيريا المذيبة للفوسفات، تلقيح، الضغط الملحي.

## Liste des abréviations

**ACC:** 1-Amino Cyclopropane-1-Carboxylate.

**AIA:** Acide Indole-3-Acétique.

**ANOVA:** Analyse de la variance.

**ARA:** de l'anglais « Acetylene Reduction Assay ».

**BLAST:** de l'anglais « Basic Local Alignment Search Tool ».

**BSP:** Bactéries Solubilisant le Phosphate.

**C<sub>E</sub>:** Conductivité électrique.

**CPG:** Chromatographie en Phase Gazeuse.

**DO:** Densité optique.

**DRO:** Dérivés réactifs de l'oxygène.

**dS:** déci Siemens.

**EPS:** Exopolysaccharides.

**GPS:** de l'anglais « Global Positioning System ».

**Ha:** hectare.

**HCN:** de l'anglais « Hydro cyanidric acid ».

**HPLC:** de l'anglais « High Performance Liquid Chromatography ».

**mM:** milli Molaire.

**MSP:** Microorganismes Solubilisant le Phosphore.

**NBRIP:** de l'anglais « National botanical research institute of phosphate medium ».

**NCBI:** de l'anglais « National Center for Biotechnology Information ».

**nm:** nanomètre.

**PCR:** de l'anglais « Polymerase Chain Reaction ».

**PGP:** de l'anglais « Plant Growth Promote ».

**PGPB:** de l'anglais « Plant Growth Promoting bacteria ».

**PGPR:** de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria ».

**PGRs :** de l'anglais « Plant Growth Regulators ».

**PTC:** Phosphate tricalcique.

**PVK:** Pikovskaya.

**RSI:** Résistance Systémique Induite.

**tr/min:** tour par minute.

**TR:** Temps de rétention.

**TSI:** Tolérance Systémique Induite.

**UFC:** Unité Formant Colonie.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Mélange réactionnel de la PCR .....	<b>37</b>
<b>Tableau 2:</b> Analyses physico-chimiques du sol salin.....	<b>44</b>
<b>Tableau 3:</b> Corrélation entre les paramètres de solubilisation du phosphate .....	<b>47</b>
<b>Tableau 4:</b> Solubilisation du phosphate par les isolats bactériens.....	<b>49</b>
<b>Tableau 5:</b> Identification biochimique des bactéries sélectionnées bactériens .....	<b>51</b>
<b>Tableau 6:</b> Activités PGP des isolats bactériens .....	<b>59</b>
<b>Tableau 7:</b> Corrélation entre les variables de l'ACP (test de Pearson) .....	<b>61</b>
<b>Tableau 8:</b> Acides organiques produits par les isolats bactériens après solubilisation du phosphate.....	<b>68</b>
<b>Tableau 9:</b> Effet du stress salin sur la croissance bactérienne et la solubilisation du phosphate par les isolats bactériens.....	<b>73</b>
<b>Tableau 10:</b> Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur les paramètres morphologiques du blé sous les trois traitements .....	<b>77</b>
<b>Tableau 11:</b> Effet de l'inoculation par les bactéries sélectionnées sur les paramètres biochimiques du blé sous les trois traitements.....	<b>80</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Cycle du phosphore dans le sol..	5
<b>Figure 2:</b> Représentation schématique des mécanismes de solubilisation/minéralisation et immobilisation du phosphate dans le sol par les MSP.	13
<b>Figure 3:</b> Augmentation de la tolérance et la survie des plantes induite par les rhizobactéries en milieu salin..	28
<b>Figure 4:</b> Grands périmètres d'irrigation de la Mina.	29
<b>Figure 5:</b> Courbe standard de phosphore.	32
<b>Figure 6:</b> Courbe d'étalonnage de l'AIA.	34
<b>Figure 7:</b> Courbe d'étalonnage du phosphore.	42
<b>Figure 8:</b> Solubilisation du phosphate par l'isolat PSB11 sur milieu PVK.	45
<b>Figure 9:</b> Efficacité de la solubilisation du phosphate des isolats bactériens	46
<b>Figure 10:</b> Taux de phosphore libre et pH final de la solubilisation par les isolats bactériens...	48
<b>Figure 11:</b> Répartition de différents genres identifiés dans l'ensemble de bactéries isolées.	50
<b>Figure 12:</b> Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB13 ( <i>P. fluorescens</i> )	53
<b>Figure 13:</b> Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB91 ( <i>Bacillus</i> sp.)	53
<b>Figure 14:</b> Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB87 ( <i>Serratia</i> sp.)	53
<b>Figure 15:</b> Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB18 ( <i>Enterobacter</i> sp.)	54
<b>Figure 16:</b> Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB99 ( <i>A. hydrophila</i> )	54
<b>Figure 17:</b> Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB74 ( <i>B. cepacia</i> )	54
<b>Figure 18:</b> Fréquence des activités PGP de différents genres identifiés.	55
<b>Figure 19:</b> Production de l'AIA par les isolats bactériens	56
<b>Figure 20:</b> Taux de l'AIA produit par les isolats bactériens	56
<b>Figure 21:</b> Activités PGP des isolats bactériens	58
<b>Figure 22:</b> ACP des activités PGP générées par les isolats bactériens.	61

<b>Figure 23:</b> Electrophorèse sur gel d'agarose pour l'amplification de l'ADNr 16S des isolats bactériens .....	<b>62</b>
<b>Figure 24:</b> Arbres phylogénétiques basés sur une comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des souches et de certaines souches phylogénétiquement proches .....	<b>64</b>
<b>Figure 25:</b> Chromatogramme d'HPLC des acides organiques produits par les isolats sélectionnés.....	<b>66</b>
<b>Figure 26:</b> Chromatogramme de test de réduction de l'acétylène par les isolats bactériens sélectionnés.....	<b>67</b>
<b>Figure 27:</b> Activité de réduction de l'acétylène par les isolats sélectionné .....	<b>68</b>
<b>Figure 28:</b> Effet du NaCl sur la croissance des isolats bactériens sélectionnés.....	<b>70</b>
<b>Figure 29:</b> Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate par les isolats bactériens sélectionnés.....	<b>71</b>
<b>Figure 30:</b> Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur la germination des grains de blé.....	<b>72</b>
<b>Figure 31:</b> Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur le taux de germination des grains de blé.....	<b>74</b>
<b>Figure 32:</b> Effet de l'inoculation par les cinq bactéries sélectionnées sur la croissance des grains de blé .....	<b>76</b>
<b>Figure 33:</b> Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur les paramètres de croissance morphologiques sous les trois traitements .....	<b>76</b>
<b>Figure 34:</b> Effet de l'inoculation par les bactéries sélectionnées sur les paramètres de croissance biochimiques dans les feuilles du blé sous les trois traitements .....	<b>79</b>



# **Introduction**

# Introduction

Le phosphore est considéré comme l'élément le plus important dans la nutrition des plantes après l'azote. Il s'agit d'un composant essentiel dans toutes les principales procédures métaboliques dans les plantes, tels que le transfert d'énergie, la photosynthèse, la transduction du signal et la respiration (Khan *et al.*, 2010). Le phosphore inorganique se retrouve dans les sols, principalement dans des complexes minéraux insolubles tels que le phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), le phosphate de fer ( $\text{FePO}_4$ ) et le phosphate d'aluminium ( $\text{AlPO}_4$ ) (Khan *et al.*, 2014) qui apparaissent après des applications répétées d'engrais chimiques. Les plantes n'ont pas la capacité d'absorber ces formes insolubles, en plus seulement 0,1% du phosphore total se retrouve sous forme soluble et disponible pour la nutrition des plantes (Chen *et al.*, 2006). De ce fait, les niveaux de phosphore disponibles doivent être complétés dans la plupart des sols agricoles en ajoutant des engrais chimiques à base de phosphore. Les applications fréquentes et imprudentes des engrais chimiques de phosphore conduisent à une diminution de la fertilité du sol en perturbant la population microbienne et réduisent ainsi le rendement des cultures agricoles (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Parmi les stress abiotiques de l'environnement, la salinité du sol est le stress le plus important pour les plantes (Idikut *et al.*, 2012). Elle conduit à un stress osmotique et provoque la formation des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), perturbant ainsi les structures cellulaires qui, par conséquent, endommagent les mitochondries et les chloroplastes (Paul et Lade, 2014). La salinité du sol réduit considérablement l'absorption des nutriments minéraux, en particulier le phosphore, car les ions phosphate se précipitent avec des ions calcium dans le sol salin et deviennent inaccessibles aux plantes (Grattan et Grieve, 1999). L'utilisation des bactéries solubilisant le phosphate pour résoudre ce problème est une solution alternative du fait de leur capacité à solubiliser le phosphate dans les conditions normales et sous stress salin. Cette pratique est d'ailleurs soutenue par plusieurs chercheurs (Khan *et al.*, 2007). C'est une stratégie respectueuse de l'environnement et économiquement réalisables pour améliorer la production végétale et augmenter les rendements des cultures dans les sols pauvres en phosphore (Zaidi *et al.*, 2009b). Des mécanismes comme la production des acides organiques, la chélation et les réactions d'échange d'ions sont mis en œuvre par ces bactéries pour solubiliser les formes de phosphore inaccessibles et les rendre disponibles aux plantes (Vessey, 2003).

Les bactéries solubilisant le phosphate (BSP) font partie des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) et sont capables de solubiliser le phosphate inorganique à partir de différents composés, tels que le phosphate dicalcique, le phosphate tricalcique et le phosphate rocheux (Khan *et al.*, 2010). En effet, les microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) présentent des propriétés multifonctionnelles et peuvent également exhiber des caractères favorisant la croissance des plantes par exemple, ils sont connus pour la synthèse des sidérophores (Hamdali *et al.*, 2008), d'acide indole acétique (AIA) et d'acide gibbéréllique (Viruel *et al.*, 2011). Il existe de nombreuses bactéries solubilisant le phosphate possédant la capacité de synthétiser une enzyme clé, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase (Glick, 2014) et de fixer l'azote atmosphérique (Anand *et al.*, 2016). Les bactéries solubilisant le phosphate peuvent aussi sécréter des antibiotiques et fournir une protection pour les plantes contre les maladies d'origine tellurique (biocontrôle) (Singh *et al.*, 2010). D'autres activités physiologiques des MSP impliquent la libération de cyanure d'hydrogène, qui a un avantage sélectif aux souches productrices (Badawi *et al.*, 2011). En outre, la sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale.

Les souches appartenant aux genres bactériens *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* et *Enterobacter* ainsi que les champignons *Penicillium* et *Aspergillus* sont des microorganismes solubilisant le phosphate les plus puissants (Whitelaw, 1999). L'utilisation d'inoculas microbiens (biofertilisants) possédant des activités de solubilisation de phosphate dans les sols agricoles est considérée comme une alternative écologique à d'autres applications d'engrais chimique à base de phosphore (Sharma *et al.*, 2013). Ainsi, l'application des BSP et les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) associées pourraient réduire l'application d'engrais de phosphore de 50% sans aucune réduction significative du rendement des cultures (Yazdani *et al.*, 2009). Cette pratique consiste à appliquer les bactéries solubilisant le phosphate aux semences, surfaces végétales ou au sol de légumineuses et de céréales. Ces bactéries colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante (endophytes) et facilitent la croissance en fournissant le phosphore aux plantes en croissance (Khan *et al.*, 2014).

L'augmentation du rendement du blé a été attribuée au potentiel de solubilisation des phosphates des BSP appliquées comme il a été rapporté par plusieurs chercheurs (Ponmurugan et Gopi, 2006). Le blé est parmi les céréales le plus cultivé et consommé en Algérie avec une importance nutritionnelle et économique. Cependant, la production nationale ne répond pas au besoin de la population étant donné le faible rendement, ce qui classe

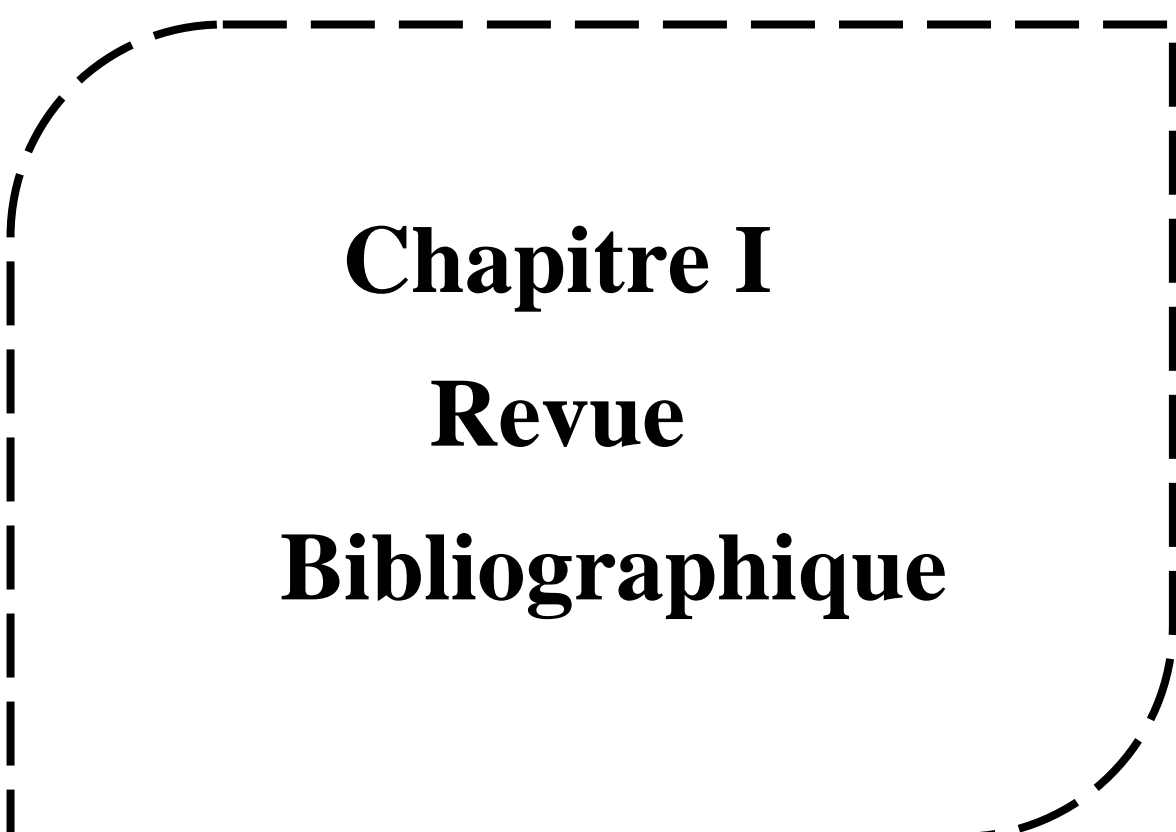
l'Algérie comme l'un des plus importants pays importateurs des céréales (Hales, 2015). Ceci est dû essentiellement à la dégradation du sol qui représente une menace pour la survie à long terme de la production agricole, d'où l'intérêt de l'utilisation de ces microorganismes principalement dans des programmes d'amélioration de la production de blé. Celle-ci peut être l'une des meilleures méthodes proposées permettant ainsi le développement du système racinaire et par conséquent l'augmentation de l'absorption des nutriments.

Un autre effet bénéfique de ces microorganismes rhizosphériques se présente dans l'atténuation du stress chez les plantes cultivées dans les sols salins en raison de leurs propriétés de tolérance aux conditions extrêmes (Ashraf *et al.*, 2008). En conséquence, la croissance des microorganismes halotolérants, associés aux racines des plantes peuvent conduire à une meilleure fertilité des sols salins (Nadeem *et al.*, 2014). L'utilisation de ces microorganismes dans les sols stressés peut atténuer ce stress chez les cultures végétales, ouvrant ainsi une stratégie potentielle et prometteuse en agriculture durable (Son *et al.*, 2006). Plusieurs études démontrent l'hypothèse que les PGPR permettent aux plantes agricoles de maintenir la productivité dans des conditions de stress par divers moyens et les résultats sont prometteurs (Paul et Lade, 2014).

L'omniprésence de ces microorganismes rhizosphériques dans la nature, et leur aptitude exceptionnelle à stimuler la croissance des plantes et à augmenter le rendement nous a conduits à entreprendre ce travail. Il s'agit principalement dans cette thématique d'évaluer les effets de l'inoculation par des bactéries solubilisant le phosphate sélectionnées sur la croissance des plants de blé dur.

Cette étude comprend les objectifs suivants :

- a) Isolement et sélection des bactéries solubilisant le phosphore les plus efficaces provenant du sol salin.
- b) Identification biochimique et moléculaire des bactéries sélectionnées.
- c) Caractérisation *in vitro* des isolats bactériens (activités PGP).
- d) Evaluation *in vivo* de l'effet de l'inoculation du blé par les isolats sélectionnés sous stress salin et/ou en absence de phosphore sur les paramètres morpho-biochimiques de la croissance de cette plante.



**Chapitre I**  
**Revue**  
**Bibliographique**

## 1. Le phosphore dans l'environnement

Le phosphore (P) est l'élément le plus important dans la nutrition des plantes, après l'azote (N). Pratiquement, il joue un rôle important dans tous les processus métaboliques, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse des macromolécules, la synthèse d'acides nucléiques et la respiration chez les plantes (Khan *et al.*, 2010). Il a aussi un rôle important dans la fixation de l'azote chez les légumineuses (Kouas *et al.*, 2005). Par conséquent, l'acquisition d'une concentration suffisante de phosphore augmente la croissance et le développement des plantes dans différents systèmes de production (Hayat *et al.*, 2010). Malgré son importance indéniable dans le cycle du vivant, l'approvisionnement en phosphore à partir du milieu reste toutefois une contrainte majeure pour de nombreux organismes vivants du sol, en particulier pour les plantes (Plassard *et al.*, 2015). Ceci est dû au fait que seulement 0,1% à 0,5% du phosphore totale du sol est assimilable par les plantes et le reste du phosphore est inaccessible aux plantes (Rodriguez et Fraga, 1999).

### 1.1. Le phosphore dans le sol

A l'inverse du carbone et de l'azote, qui peuvent être tirés directement de l'atmosphère, le phosphore ne peut provenir que de la désagrégation des roches qui contiennent du phosphate (Hinsinger, 2001). Dans le sol, le phosphore existe sous différentes formes qui interagissent via différents mécanismes physico-chimiques, biologiques et biochimiques impliquant des réactions d'adsorption et de désorption, de précipitation et de dissolution, de minéralisation et d'immobilisation (Figure 1). Le cycle biogéochimique du phosphore inclut aussi des flux de phosphore sous forme de prélèvements par les plantes, et des pertes par érosion, ruissellement de surface et de profondeur, lessivage et drainage (Haygarth *et al.*, 1998; Kleinman *et al.*, 2009).

En effet, le sol peut contenir de grandes quantités de phosphore mais, il est très rarement disponible pour les plantes, étant donné que ses deux formes organiques (phytates) et inorganiques (secondaires et primaires, par exemple l'apatite) sont des composés très insolubles (Bhattacharyya et Jha, 2012). La mise à disposition des ions phosphates aux plantes est régie par la désorption et la solubilisation de phosphate inorganique ainsi que par la minéralisation du phosphate organique (Richardson *et al.*, 2009). La biodisponibilité du phosphore dans le sol peut ainsi varier considérablement d'une espèce végétale à l'autre selon ses capacités à modifier elle-même la disponibilité de Pi (phosphore inorganique) ou *via* les organismes naturellement présents dans sa rhizosphère (Plassard *et al.*, 2015).

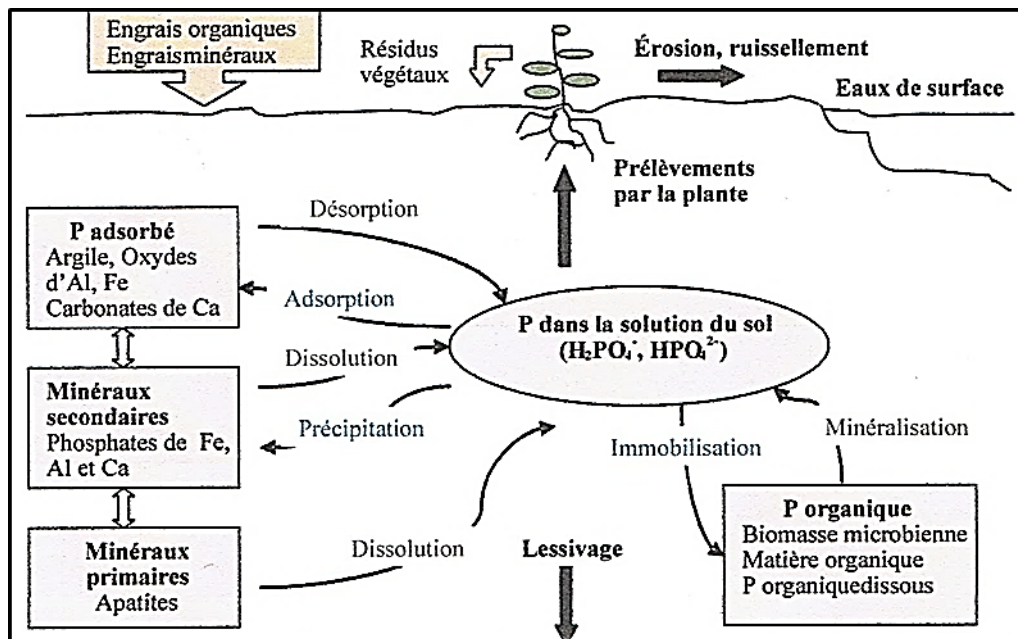


Figure 1: Cycle du phosphore dans le sol (Pierzynski et McDowell, 2005).

## 1.2. Les formes du phosphore

Les différentes formes de phosphore dans le sol sont classées selon différents critères: la nature des composés phosphorés, le fractionnement chimique et l'échange ionique. La nature des composés phosphorés permet de séparer le phosphore organique du phosphore inorganique (Pereda Campos, 2008). Les formes du phosphore les plus facilement accessibles par les plantes sont les ions orthophosphates ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) notés Pi (Marschner *et al.*, 2011), avec des concentrations très faibles (allant de 0,1 à 10  $\mu\text{M}$ ) (Hinsinger, 2001) dans une solution du sol. Cependant, la majorité de la fraction inorganique du phosphore présente dans le sol est liée au Fer et à l'Aluminium dans les sols acides et / ou Calcium dans les sols neutres et calcaires qui réduisent sa solubilité, conduisant aux phénomènes de précipitation et d'adsorption (Iguar *et al.*, 2001; Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Le phosphate organique est présent comme phosphates d'inositol, phospholipides, acides nucléiques et divers autres esters de phosphate qui sont issus de la dégradation de la matière organique. Il est présent sous une forme de phosphore soluble dans la solution du sol et sous forme de phosphore insoluble absorbé sur les particules du sol ou comme composant de la matière organique du sol (Marschner *et al.*, 2011). Bien que, sous toutes les conditions, les différents types de complexes de phosphore dans le sol sont déterminés principalement par le pH, la nature et la concentration des minéraux contenus dans ce sol (Richardson, 1994).

## 2. Diversité microbienne du sol

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité écologique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contient de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  de bactéries (Claire Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002). Ces microorganismes jouent un rôle clé dans un grand nombre de processus dans les différents écosystèmes incluant l'acquisition d'éléments nutritifs pour les plantes (Sprent, 2001 ; Smith et Read, 2010).

La microflore tellurique est naturellement constituée de procaryotes et d'eucaryotes (Cardon et Gage, 2006). Certains sont sans effets sur le développement des végétaux (microorganismes commensaux), d'autres encore sont favorables (mutualistes) alors que d'autres, ont des effets délétères (parasites et phytopathogènes) (Whipps, 2001). De ce fait, il a été suggéré que la plante favorise celles qui lui sont bénéfiques (Cook *et al.*, 1995; Lynch et Leij, 2012).

### 2.1. La rhizosphère

La rhizosphère est définie par Hiltner (1904) comme le volume du sol entourant la racine, influencé chimiquement, physiquement et biologiquement par la présence de racines végétales vivantes. C'est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micro et macronutriments du sol présent en quantités limitées affectant ainsi la croissance des plantes (Gholami *et al.*, 2012).

Plus précisément, la rhizosphère est divisée en trois grandes composantes qui interagissent ensemble : la rhizosphère sol, la rhizoplane et les racines (Barea *et al.*, 2005). La rhizosphère sol est la zone du sol influencée par les racines et la rhizoplane est la surface externe des racines.

La rhizosphère est également un environnement caractérisé par un volume très élevé de substances racinaires (appelé exsudats racinaires) tels que les acides organiques, les sucres et les acides aminés qui apportent de l'énergie et stimulent la croissance et les activités métaboliques des microbes dans le sol ce qui influence sur le cycle biogéochimique des nutriments dans les sols (Fontaine et Barot, 2005). L'extension de la zone rhizosphérique peut varier selon le type de sol, l'espèce végétale et son âge, et d'autres facteurs biotiques et abiotiques (Miethling *et al.*, 2000; Anand *et al.*, 2016).

## 2.2. Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes : (PGPR)

Les microorganismes colonisant les racines des plantes peuvent être libres, parasites ou bien saprophytes et leur diversité reste dynamique avec un changement fréquent de la structure de la communauté et de l'abondance des espèces (Kunc et Macura, 1988), cela est principalement dû à la quantité et à la composition des exsudats racinaires.

Un groupe important de communautés bactériennes qui exercent des effets bénéfiques sur la croissance des plantes lors de la colonisation des racines ont tout d'abord été définies par Kloepper et Schroth (1978) et quantifiées comme des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR). Ces bactéries vivant librement et colonisant les racines, lorsqu'elles sont appliquées à des graines ou à des racines, améliorent la croissance de la plante, réduisent les dommages causés par les phytopathogènes et confèrent une résistance contre le stress abiotique (Kloepper *et al.*, 1991).

Plusieurs études sur la relation PGPR-amélioration de l'absorption des nutriments ont conclu que l'application des inoculations bactériennes améliore considérablement l'absorption de N, P, et K (Amir *et al.*, 2005). Fondamentalement, les PGPR sont définies par trois caractéristiques intrinsèques (Barea *et al.*, 2005): (1) elles doivent pouvoir coloniser la racine; (2) elles doivent survivre et se multiplier dans les microhabitats associés à la surface des racines, en concurrence avec d'autres microbiotes; et (3) elles doivent favoriser la croissance des plantes (Niranjana et Hariprasad, 2014).

## 2.3. Diversité taxonomique des PGPR

Au cours de la dernière décennie, le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère. Elles présentent une diversité de genres et d'espèces. Elles appartiennent majoritairement aux quatre phylums suivants: Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002). De nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers (Kloepper, 1993).

### 2.3.1. Proteobacteria

Le phylum de proteobacteria comprend trois classes:

- **Alphaproteobacteria**

Les  $\alpha$ -protéobactéries rassemble la majorité des protéobactéries capables de se développer même si la quantité de nutriments disponibles est très faible. Les PGPR appartenant à cette

classe sont les *Rhizobia*, d'abord classés par leur capacité à fixer l'azote et à produire des nodules au niveau du système racinaire des plantes. Ces souches peuvent se comporter comme des PGPR quand elles colonisent les racines des plantes légumineuses dans une relation spécifique. En effet, le genre *Rhizobium* comprend également des souches PGPR, qui sont ensuite identifiées comme de nouveaux genres : *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* (Sawada *et al.*, 2003).

Le genre *Gluconacetobacter* de la famille des Acetobacteraceae composé de bactéries endophytes obligatoires colonisant les racines, les tiges et les feuilles de la canne à sucre (Tejera *et al.*, 2003). Les espèces du genre *Azospirillum* décrites dans la famille de Rhodospirillaceae sont considérées comme promoteurs de la croissance des plantes. Les souches appartenant à ce genre se produisent sous forme de cellules libres dans le sol ou associées aux racines, tiges, feuilles et graines des céréales et des graminées fourragères principalement (Baldani *et al.*, 2005).

- **Betaproteobacteria**

Cette classe comprenant la famille de Burkholderiaceae, où le genre *Burkholderia* forme un groupe monophylétique composé de diverses espèces ayant des propriétés physiologiques et écologiques variées. Elles sont isolées à partir des sols et des plantes. Quelques souches ont la capacité de fixer de façon asymbiotique l'azote. *Ralstonia* est un genre attribué également à la famille des Burkholderiaceae. Les genres précédemment cités sont omniprésents (Moulin *et al.*, 2001).

- **Gammaproteobacteria**

C'est la classe de bactéries la plus nombreuse, et comprennent des microorganismes très diversifiés sur le plan physiologique. La famille des Pseudomonadaceae comprend le genre *Azotobacter*. Ce genre est composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes à cause de sa capacité de fixer l'azote et ne produisant pas de nodules (Sturz et Christie, 2003). Cette famille comprend également le genre *Pseudomonas*. Ce dernier est l'un des microorganismes le plus présent et le plus abondant dans la rhizosphère, parmi les bactéries à coloration de Gram négatif du sol. L'activité PGP de certaines espèces appartenant à ce genre est connue depuis de nombreuses années. Cette activité a fait l'objet de nombreuses recherches et résulte d'une cascade de mécanismes. Les genres bactériens inclus dans la famille des Enterobacteriaceae et assurant la fonction de PGP sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* et *Serratia* (Garrity *et al.*, 2005).

### 2.3.2. Actinobacteria

Dans le phylum des Actinobacteria le genre *Frankia* est un microorganisme fixateur symbiotique d'azote. Cette capacité est une caractéristique de ce genre. Ces bactéries sont associées à des plantes actinorhiziennes pionnier de la colonisation des sols pauvres ou dégradés. D'autres Actinobacteria sont également des promoteurs de croissance des plantes mais ne participent pas à la symbiose. Ils appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Micrococcus* (Gray et Smith, 2005), *Curtobacterium* (Barriuso *et al.*, 2005) et *Streptomyces* (Siddiqui et Mahmood, 1999).

### 2.3.3. Firmicutes

Dans ce phylum, *Bacillus* est le genre le plus commun et le plus prédominant. Elles représentent environ 95% de la flore isolée. Ce sont des bactéries prépondérantes dans l'environnement. Ce sont des bacilles à coloration de Gram positif, isolés ou en chaînes, capables de sporuler, en général mobiles (quelques variantes sont immobiles ex. *Bacillus anthracis*) (Cherif, 2014). Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores. Depuis la découverte de la bactérie, en 1913, la possession d'une spore a été utilisée comme une clé dans la classification. Les caractéristiques distinctives entre les membres du genre *Bacillus* et les autres bacilles sporulant sont : la nature du type respiratoire, aérobie stricte ou facultative, la forme bacillaire et la production de la catalase. Le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables (Cherif, 2014).

## 3. Microorganismes solubilisant le phosphate

Pour satisfaire les besoins nutritionnels des cultures agricoles en phosphate, ce dernier est généralement ajouté au sol comme engrais chimique, mais la synthèse des engrais à base de phosphore est un processus à forte intensité d'énergie (Sharma *et al.*, 2007). Cette pratique a généralement un impact négatif à long terme sur l'environnement en termes d'eutrophisation, de réduction de la fertilité des sols et d'empreinte de carbone. En outre, les plantes peuvent utiliser seulement une petite quantité du phosphore alors que 75 à 90% de phosphore ajouté est précipité par des cations de complexes métalliques et devient rapidement fixé dans le sol. Ces préoccupations environnementales ont conduit les scientifiques à la recherche d'une alternative plus respectueuse de l'environnement et d'une manière durable pour la nutrition des cultures agricoles (Sharma *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, les microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) ont été considérés comme les meilleurs candidats écologiques pour la nutrition des plantes par le

phosphore (Sharma *et al.*, 2007). Ces organismes possèdent une capacité de solubilisation du phosphate et peuvent également convertir les composés phosphatés insolubles présent dans le sol à des formes solubles et les rendre disponibles pour les plantes (Pradhan et Sukla, 2006). Les bactéries solubilisant les phosphates (BSP) appartiennent au groupe hétérogène de PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria). Elles sont caractérisées par leur capacité à solubiliser facilement et efficacement des formes minérales de phosphore inorganique (Anand *et al.*, 2016).

Le rôle des organismes rhizosphériques dans la solubilisation du phosphate minéral était connu dès 1903 (Khan *et al.*, 2007). Depuis cette année, de nombreuses études ont été réalisées sur la solubilisation du phosphate minéral par les microorganismes naturellement abondant dans la rhizosphère. Un nombre important d'espèces microbiennes ayant la capacité de solubilisation du phosphate a été isolé et identifié ; celles-ci comprennent des bactéries, des champignons, des actinomycètes et même des algues microscopiques. En plus de *Pseudomonas* et de *Bacillus*, d'autres bactéries se sont identifiées comme solubilisant le phosphate, il s'agit de : *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium*, *Delftia* sp. (Wani *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006), *Azotobacter* (Kumar *et al.*, 2001), *Xanthomonas* (De Freitas *et al.*, 1997), *Enterobacter*, *Pantoea*, et *Klebsiella* (Chung *et al.*, 2005). Alors que la flore fongique solubilisant le phosphate, est représentée essentiellement par les genres, *Aspergillus* et *Penicillium* (Seshadri *et al.*, 2004).

### 3.1. Mécanisme de solubilisation du phosphate par les MSP

Les principaux mécanismes de solubilisation du phosphate employées par les microorganismes du sol comprennent: (1) la libération des complexants ou composés dissolvant les minéraux par exemple des anions d'acides organiques, des sidérophores, des protons, des ions hydroxyle et le CO<sub>2</sub>; (2) la libération d'enzymes extracellulaires (minéralisation biochimique du P) et (3) la libération de phosphore lors de la dégradation du substrat (minéralisation biologique du P) (McGill et Cole, 1981).

#### 3.1.1. Solubilisation du phosphore organique (minéralisation)

La solubilisation du phosphore organique est également appelée la minéralisation du phosphore organique. La minéralisation du phosphore organique du sol (Po) joue un rôle essentiel dans le cycle du phosphore dans un système d'exploitation agricole et il peut constituer de 4 à 90% du phosphore total du sol (Khan *et al.*, 2009). Ce phosphore peut être

libéré à partir de composés organiques dans le sol par des enzymes de phosphatases suivantes:

**(i)- Phosphatases acides non spécifiques (NSAP)**, qui déphosphorylent les liaisons phospho-ester ou phosphoanhydride de la matière organique (Sharma *et al.*, 2013).

Parmi la variété de classes d'enzymes de phosphatase libérées par MSP, les phosphomonoesterases (souvent appelées phosphatases). Elles sont les plus abondantes et les mieux étudiées (Nannipieri *et al.*, 2011). En fonction de leur pH optimal, ces enzymes sont divisées en phosphomonoesterases acides et alcalines et les deux peuvent être produites par le MSP en fonction des conditions extérieures (Jorquera *et al.*, 2008). Certains éléments de preuve indiquent que les phosphatases d'origine microbienne possèdent une plus grande affinité pour les composés de phosphore organique que ceux qui sont dérivés à partir de racines de plantes (Tarafdar *et al.*, 2001).

**(ii)- Phytases**, qui provoquent spécifiquement la libération de phosphore de la dégradation des phytates. Dans sa forme de base, la phytate est la principale source de l'inositol et la principale forme de phosphore stockée dans les graines et le pollen de plantes, et elle est une composante majeure de phosphore organique dans le sol (Richardson, 1994). Par conséquent, les microorganismes sont en fait un facteur clé dans la régulation de la minéralisation des phytates dans le sol et leur présence dans la rhizosphère peut compenser une incapacité des plantes à acquérir autrement le phosphore directement à partir de phytate (Richardson et Simpson, 2011).

**(iii)- les phosphatases et les C-P-lyases**, qui clivent la liaison C-P organophosphorés (Rodriguez *et al.*, 2007).

### 3.1.2. Solubilisation du phosphore inorganique

La solubilisation du phosphore inorganique par des microorganismes se fait principalement par la production d'acides organiques, soit par: (i) l'abaissement du pH, ou (ii) en augmentant la chélation des cations liés au phosphore (iii) en concurrence avec le phosphore pour les sites d'adsorption sur le sol (iv) en formant des complexes solubles avec les ions métalliques associés aux phosphore insolubles (Ca, Al, Fe) et donc le phosphore est libéré (Sharma *et al.*, 2013).

- **Production des acides organiques**

L'abaissement du pH du milieu suggère la libération des acides organiques par les microorganismes solubilisant le phosphate (Maliha *et al.*, 2004) par l'intermédiaire de la voie

d'oxydation directe qui se produit sur la face externe de la membrane cytoplasmique (Zaidi *et al.*, 2009a). Ces acides sont le produit du métabolisme microbien, principalement par la respiration oxydative ou par fermentation de sources de carbone organique (par exemple, le glucose) (Trolove *et al.*, 2003). Ces acides organiques peuvent directement dissoudre le phosphore minéral comme résultat d'un échange d'anions de phosphate par un anion de l'acide soit par chélation les ions de Fe, Al et Ca associés avec le P (Omar, 1998).

Différents acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide 2-cétogluconique, l'acide lactique, l'acide isovalérique, l'acide isobutyrique, l'acide acétique, l'acide oxalique, et l'acide citrique ont été rapportés être produits par des rhizobactéries (Omar, 1998; Rodriguez et Fraga, 1999) et connus pour leur activité de solubilisation des phosphates insolubles.

- **Autres mécanismes de solubilisation**

Cependant, l'acidification ne semble pas être le seul mécanisme de solubilisation, car il s'est avéré que la capacité à réduire le pH dans certains cas, n'est pas corrélée avec l'aptitude à solubiliser les phosphores minéraux (Subba Rao, 1982). D'autres mécanismes de solubilisation de phosphore ont été suggérés comme l'emploi des acides inorganiques (par exemple l'HCl), bien que l'HCl a été capable de solubiliser une faible quantité de phosphore à partir de l'hydroxyapatite comparativement à l'acide citrique ou l'acide oxalique au même pH (Kim *et al.*, 1997).

D'après la théorie de l'évier, les organismes solubilisant le phosphore assimilent le phosphore à partir du liquide et par conséquent activent la dissolution indirecte des composés de phosphate de calcium par élimination constante de phosphore à partir du milieu de culture liquide. Un autre mécanisme est la production d'H<sub>2</sub>S, qui réagit avec le phosphate de fer pour produire du sulfate ferreux avec libération concomitante de phosphate (Swaby et Sperber, 1958).

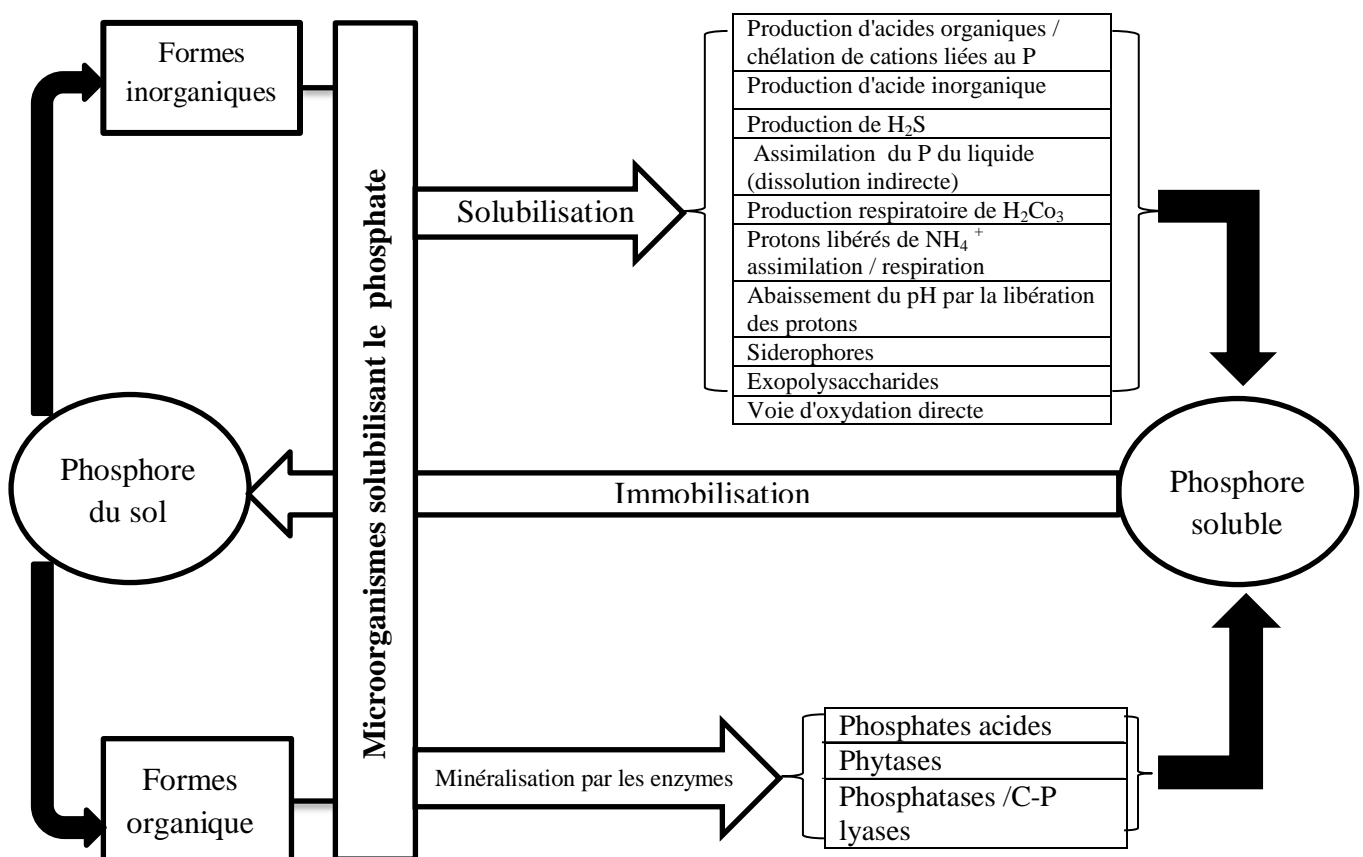
Il a été suggéré que l'activité de solubilisation du phosphate par les microorganismes se produit en conséquence de l'oxydation microbienne du soufre, la production de nitrate et de la formation de CO<sub>2</sub>. Ces processus conduisent à la formation d'acides inorganiques tels que l'acide sulfurique (Sperber, 1958). Toutefois, leur efficacité a été moins acceptée que le concept d'implication des acides organiques dans la solubilisation (Kim *et al.*, 1997).

L'excrétion de H<sup>+</sup> provenant de l'assimilation de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> proposée par Parks *et al.*, (1990) pourraient être les mécanismes alternatifs de solubilisation du phosphore. Krishnaraj *et al.*, (1998) ont proposé un modèle mettant en évidence l'importance des protons qui sont

pompés hors de la cellule d'être le principal facteur responsable de la solubilisation du phosphate et pour certains microorganismes, les protons libérés de  $\text{NH}_4^+$  semble être le seul mécanisme pour promouvoir la solubilisation du phosphate.

Goldstein (1995) et Song *et al.*, (2008) ont suggéré que l'oxydation extracellulaire par voie d'oxydation directe peut jouer un rôle essentiel dans les sols où les phosphates de calcium fournissent une source importante de phosphore minéral indisponible.

Des études ont rapporté la production des sidérophores et les exopolysaccharides (EPS) par les MSP (Vassilev *et al.*, 2006; Caballero-Mellado *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2008), cependant, cette production n'a pas été largement impliquée dans le mécanisme de solubilisation de phosphate (Parker *et al.*, 2005) (Figure 2).



**Figure 2:** Représentation schématique des mécanismes de solubilisation/minéralisation et immobilisation du phosphate dans le sol par les MSP (Sharma *et al.*, 2013).

### 3.2. Activités PGP des bactéries solubilisant le phosphate

Les microorganismes solubilisant le phosphate augmentent la performance des plantes en fournissant principalement le phosphore soluble aux plantes dans différents systèmes de production.

Cependant, ils bénéficient également les plantes par d'autres mécanismes. En effet les MSP présentent des propriétés multifonctionnelles (Vassileva *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2013).

Ces mécanismes sont divers tels que la fixation de l'azote, la production de métabolites végétaux bénéfiques tels que les phytohormones (AIA et gibbérelline), et la libération des substances jouant le rôle des agents de biocontrôle comme les antibiotiques ou les sidérophores (Pandey et Maheshwari, 2007).

#### 3.2.1. Fixation de l'azote

L'azote est considéré comme un élément nutritif clé dans la production de cultures agricoles et l'un des principaux constituants des protéines, des acides nucléiques et des autres composants cellulaires essentiels (Martínez-Viveros *et al.*, 2010). Malgré son importance il ne peut être assimilé par les plantes que s'il est réduit à l'ammoniac par des microorganismes diazotrophes. Il est rapporté que les souches de PGPR fixent le N<sub>2</sub> atmosphérique dans le sol (Riggs *et al.*, 2001). Et en outre, il peut être fourni à la plante hôte associée (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). Le procédé implique l'enzymes de nitrogénase qui réduisent l'azote gazeux en ammoniac (Chatterjee *et al.*, 1997). Les PGPR peuvent fixer le N<sub>2</sub> atmosphérique de manière symbiotique en produisant les nodules ou non-symbiotique par des diazotrophes libres. Les bactéries diazotrophiques libre ou associatives sont considérées comme les plus importants inoculants des plantes par apport d'azote aux plantes, en particulier pour les céréales (Zandi et Basu, 2016).

#### 3.2.2. Production d'hormones de croissance

Les régulateurs de la croissance des plantes (PGRs) sont les substances qui influencent les processus physiologiques des plantes à des concentrations très faibles (Sané *et al.*, 2012). Ces composés produits par la plante ou par les PGPR sont appelés hormones végétales (Karadeniz *et al.*, 2006). D'une façon générale, sur la base de leurs structures chimiques et leurs effets subséquents sur les plantes, les substances de régulation de la croissance végétale ont été divisés en cinq groupes : (1) les auxines, (2) les gibbérellines, (3) les cytokinines, (4) l'éthylène et (5) un groupe appelé inhibiteurs, qui comprend l'acide abscissique (ABA), des composés phénoliques et des alcaloïdes (Ferguson et Lessenger, 2006).

La production des auxines (Glick, 1995) par les MSP est considéré comme une activité microbiologique commune, tandis que la synthèse de cytokines par les bactéries, est moins fréquente (Timmusk *et al.*, 1999).

### 3.2.2.1. Production de l'AIA

Généralement, la majorité (> 80%) des bactéries du sol sont capables de sécréter les auxines surtout l'acide indole acétique, l'acide indole butyrique ou d'autres composés similaires via le métabolisme du tryptophane (Ramos-Solano *et al.*, 2010). La synthèse de l'AIA par des microbes implique une de ces trois voies : (1) la formation d'acide indole acétique par l'intermédiaire de l'acide indole-3-pyruvique et de l'acide-3-indole-acétaldéhyde a été rencontrée chez la majorité des bactéries comme *Erwinia herbicola*, les espèces saprophytes du genre *Agrobacterium* et *Pseudomonas*; et certains représentants de *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella* et *Enterobacter*. (2) La conversion du tryptophane en l'acide-3-indole-acétaldéhyde peut constituer une voie alternative dans laquelle la tryptamine est formée. Cette voie est censée fonctionner chez *Pseudomonas* et *Azospirilla* (Khan *et al.*, 2014).

(3) La biosynthèse de l'AIA par la formation de l'indole-3-acétamide est signalée chez certaines bactéries phytopathogènes comme *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* et *Erwinia herbicola* et des *Pseudomonas* saprophytes telles que *Pseudomonas putida* et *P. fluorescens* (Khan *et al.*, 2014). Parmi les phytohormones, les auxines sont les principaux régulateurs de la croissance des plantes produites par MSP et présentent de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'élongation des racines primaires, l'extension et la division cellulaire, la différenciation des tissus, la formation des pigments, la stimulation de la fixation de l'azote et la résistance aux différents facteurs de stress (Ahmad *et al.*, 2008b; Oves *et al.*, 2013).

### 3.2.3. Activité de biocontrôle

Depuis 1945 jusqu'à nos jours, l'essor de l'utilisation des produits phytosanitaires pour la protection des cultures a permis d'obtenir des rendements très importants. Cet essor a donné naissance à des problèmes de plus en plus fréquents de résistance des pathogènes à ces molécules actives, et d'augmentation de risques écologiques par l'utilisation massive et intempestive de celles-ci.

Le contrôle biologique peut être une solution alternative pour résoudre certains des problèmes de pollution chimique. Ce moyen de biocontrôle se propose de prendre en

compte le rôle des PGPR. Ce groupe de microorganismes a été retenu comme le meilleur modèle utilisable. Parmi les mécanismes d'action des PGPR : (1) La compétition pour l'espace et les nutriments, (2) la production de sidérophores et de composés allelochimiques inhibiteurs et (3) l'induction de la résistance systémique (RSI) dans les plantes hôtes à un large spectre d'agents pathogènes (Ryu *et al.*, 2004; Haas et Défago, 2005).

### 3.2.3.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Les rhizobactéries peuvent coloniser la rhizosphère uniformément ou leur distribution peut être limitée à certaines régions de la racine. Les PGPR doivent être présents sur les racines en nombre important pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Cette colonisation réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance et dans certains cas conduit à une réduction des maladies de plantes (Reyes *et al.*, 2004).

Globalement, la compétition entre les PGPR et d'autres microorganismes dans la rhizosphère peut être tout simplement répartie en deux phénomènes :

Un premier phénomène, appelé mécanisme indirect implique l'occupation de l'espace dans la rhizosphère avec certains outils spéciales tels que la formation de biofilm, l'utilisation efficace des nutriments disponibles (production de sidérophores pour l'absorption du fer), et la dégradation des nutriments de formes complexes à des formes simples et leur absorption (solubilisation du phosphate). Alors que le second, est un mécanisme direct et qui comprend la suppression de la croissance et la multiplication des autres microbes par la production des antibiotiques et des enzymes lytiques, etc... (Radjacomare *et al.*, 2004; Ramos-Solano *et al.*, 2010). Certaines bactéries solubilisant le phosphate protégeaient également les plantes de l'infection par des espèces de *Fusarium* (Hariprasad et Niranjana, 2009).

### 3.2.3.2. Production des sidérophores

Le fer est un élément essentiel pour presque tous les organismes vivants pour les processus tels que la respiration et la synthèse de l'ADN. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) insoluble (Compant *et al.*, 2005), ce qui le rend souvent un facteur limitant pour la croissance des bactéries et des plantes. La plupart des microorganismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores. Les sidérophores sont des substances de faible poids moléculaire (chélateurs) servant de transporteur de l'ion ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  à l'intérieur de la

cellule microbienne (Jacques *et al.*, 1993). Il y a environ 500 sidérophores connus, dont de nombreuses bactéries et champignons sont capables d'en produire plus d'un type ou avoir plus d'un système d'absorption de fer pour capter le fer insoluble (Neilands, 1981; Crowley, 2006).

Le mécanisme de biocontrôle à médiation par sidérophores est considéré comme extrêmement efficace parce que les sidérophères produits par les BSP et les PGPR ont une affinité beaucoup plus grande pour le fer que les pathogènes fongiques (Schippers *et al.*, 1987). Marschner et Römheld (1994) ont rapporté que les plantes peuvent utiliser les sidérophores synthétisés par des microorganismes qui colonisent la rhizosphère ; qui peut être une source de fer soluble pour la plante hôte. Ils jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels le Zn et le Pb (Dimkpa *et al.*, 2009). De nombreuses études ont rapporté la production des sidérophores par les MSP (Vassilev *et al.*, 2006; Caballero-Mellado *et al.*, 2007).

### 3.2.3.3. Production des enzymes lytiques

Les enzymes lytiques telles que les chitinases, les pectinases et les cellulases sécrétées par une variété de microorganismes regroupant des organismes solubilisant le phosphate perturbent la fonctionnalité des agents pathogènes en hydrolysant la chitine, la pectine et la cellulose respectivement et jouent ainsi un rôle pivot dans la suppression directe des agents phytopathogènes (Ovadis *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008). Khan *et al.*, (2014) signalent au sujet de la protéase que, les souches bactériennes solubilisant le phosphate et produisant cette enzyme présentent une activité antifongique.

### 3.2.3.4. Antibiose

Depuis plusieurs décennies, diverses espèces bactériennes colonisant les racines de plantes se sont révélées être de puissants agents de lutte biologique contre divers agents phytopathogènes en produisant un ensemble de composés chimiques hétérogènes de faible poids moléculaire (Thomashow *et al.*, 1997; Duffy *et al.*, 2003). La production des antibiotiques par les microbes est le mécanisme clé de protection contre les maladies méditées par les bactéries solubilisant le phosphate chez les plantes et en particulier celles transmises par le sol et les semences (Glick *et al.*, 2007a; Mazurier *et al.*, 2009).

Les bactéries solubilisant le phosphate telles que les bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* et *Chromobacterium violaceum* sécrètent également des antibiotiques (Taurian *et al.*, 2010) et assurent la protection des plantes contre les

pathogènes transmis par le sol (Vassilev *et al.*, 2006). Les antibiotiques sont aussi connus pour leurs activités antivirales, antimicrobiennes, antiappétantes contre les insectes et les mammifères (Niranjana et Hariprasad, 2014).

Bien que l'HCN soit un agent phytotoxique capable de perturber l'activité enzymatique impliquée dans les processus métaboliques majeurs, son rôle en tant que substance de biocontrôle est important. L'HCN est hautement toxique pour tous les microorganismes aérobies à des concentrations de picomolaires ; il peut bloquer la voie de la cytochrome oxydase (Voisard *et al.*, 1989; Devi *et al.*, 2007).

### 3.2.3.5. La résistance systémique induite

La résistance induite est le phénomène par lequel une plante présente un niveau accru de résistance à l'infection par un agent pathogène après une stimulation appropriée. La résistance élevée résultante due à un agent inducteur contre l'infection par un agent pathogène est appelée résistance systémique induite (RSI) (Dalisay et Kuć, 1995). La médiation de la résistance systémique induite par les PGPR appréhendant les bactéries solubilisant le phosphate a été démontrée dans de nombreuses espèces végétales contre divers agents phytopathogènes (Khan *et al.*, 2014).

Les bactéries favorisant la croissance et la bioprotection des plantes déclenchent la RSI par différents mécanismes, comme l'épaississement de la paroi cellulaire, la tubérisation, et la formation de papilles en raison du dépôt de lignine et de callose (M'Piga *et al.*, 1997; Raj *et al.*, 2012). Elles modifient la physiologie et les réponses métaboliques de plantes, conduisant à une synthèse accrue des produits chimiques de défense comme réponse à des agents pathogènes et / ou des facteurs de stress abiotiques.

### 3.3. Effet des BSP sur la production végétale (cas des céréales)

Les phosphates minéraux des roches sont souvent trop insolubles pour fournir une quantité suffisante de phosphore pour l'absorption des cultures végétales. L'utilisation des MSP comme biofertilisant peut augmenter les rendements jusqu'à 70 pour cent (Verma, 1993). Les biofertilisants peuvent être définis comme des produits qui contiennent des microorganismes vivants lorsqu'ils sont appliqués aux semences ou à la surface des plantes ou le sol, ils colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante capables de promouvoir la croissance des plantes en augmentant l'offre ou la disponibilité des éléments nutritifs primaires à la plante hôte (Vessey, 2003). Goenadi et Sugiarto (2000), dans leur modèle expérimental, ont réalisé une inoculation combinée de mycorhizes arbusculaires et de BSP et ont permis de constater

une meilleure absorption du phosphore indigène du sol et de phosphore provenant de la roche phosphatée dans des plantes de riz. Ainsi, des rendements très élevés de culture de blé proviennent de la solubilisation des phosphates fixés dans le sol par l'application des BSP fournissant le phosphore soluble (Zaidi et Khan, 2006).

Les microorganismes avec un potentiel de solubilisation des phosphates, accroissent la disponibilité de phosphore soluble et augmentent la croissance de la plante en améliorant la fixation biologique de l'azote (Kucey et al., 1989). Son et al., (2006) ont montré que *Pseudomonas* spp. a amélioré considérablement le nombre et le poids sec des nodules, le rendement en grains et la disponibilité et l'absorption des nutriments dans les cultures du soja. Les bactéries solubilisant le phosphate ont également amélioré la longueur des plantes de *Cicer arietinum* (Sharma et al., 2007) tandis que la co-inoculation de MSP et PGPR a réduit l'application de phosphore de 50% sans affecter le rendement du maïs (Yazdani et al., 2009).

Selon les travaux de Sundara et al., (2002), l'inoculation avec les BSP a augmenté le rendement de la canne à sucre de 12,6%. Alors que des essais réalisés en présence de *Mycorrhiza* et *Pseudomonas putida* ont augmenté significativement la teneur en chlorophylle foliaire de l'orge (Mehrvarz et al., 2008). D'ailleurs, le rendement en graines de blé a été amélioré de 24%, suite à une triple inoculation : *Bradyrhizobium* + *Glomus fasciculatum* + *Bacillus subtilis* (Zaidi et Khan, 2006). De même, la croissance et la teneur en phosphore de de l'espèce de *Carex alpin* ont été augmenté par inoculation avec *Pseudomonas fortinii* (Bartholdy et al., 2001). Les microorganismes rhizosphériques peuvent interagir positivement et cette complémentarité favorise la croissance des plantes, ainsi que l'absorption de l'azote et de phosphore.

### 3.3.1. Les céréales

Les céréales sont cultivées en grande partie pour les composants comestibles de son grain qui contient l'endosperme, le germe et le son. Les céréales sont cultivés dans de nombreuses régions du monde, ce sont les sources les plus importantes de nourriture et sont donc appelées cultures de base (Khan et al., 2014). Les aliments à base de céréales sont une source majeure d'énergie, de protéines, de vitamines B et de minéraux pour la population mondiale. La plupart des céréales appartiennent à la famille des Graminées (ou Poacées). Ce sont: le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le maïs, le riz, le millet et le sorgho. Les unes appartiennent à la sous-famille des Festucoïdées : blé, orge, avoine, seigle ; les autres à la sous-famille des Panicoïdées : maïs, riz, sorgho, millet. Actuellement, le blé, le riz et le maïs occupent les premiers rangs parmi les céréales consommées et deviennent ainsi les trois

grandes céréales cultivées dans le monde (Moule, 1971). Les céréales, socle historique de la diète méditerranéenne, occupent encore aujourd'hui une place prépondérante à la fois dans la production agricole et agroalimentaire en Algérie et dans l'économie nationale (Rastoin et Benabderrazik, 2014).

### 3.3.2. Production du blé en Algérie

Le blé est la culture céréalière la plus importante dans de nombreuses régions du monde. Il appartient à la famille des Poacées et au genre *Triticum*, dont il existe plusieurs milliers d'espèces (Kent, 1994). L'augmentation de la consommation de blé est aussi due à l'apport que contient ce produit. En effet, le blé est la principale ressource alimentaire de l'homme, pour ses apports en glucides constituant environ 75% des calories consommées (Hales, 2015). L'Algérie se situe ainsi au premier rang mondial pour la consommation de blé (Kellou, 2008). Les blés cultivés en Algérie se rapportent à deux espèces principales : blé dur (*Triticum durum* Desf.), qui sert à la fabrication des semoules, du couscous et des pâtes alimentaires, et le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) dont le grain est utilisé pour la fabrication de la farine et du pain (Rastoin et Benabderrazik, 2014). Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est la première céréale cultivée en Algérie avec 46% suivi par le blé tendre (25%) et par l'orge (25%) (Hamadache, 2015). Elle occupe environ 2 millions d'hectares, cependant cette production est loin de satisfaire les besoins nationaux. De 1995 à 2005, le marché Algérien a absorbé, en moyenne annuelle, 4 244 903 tonnes de blés dont 70,44% de blé dur, soit 2 990 265 tonnes représentant une valeur de 858 millions de dollars et 29,36% de blé tendre, soit 578 millions (Chehat, 2007). En 2015, l'Algérie a importé 6,7 millions de tonnes de blé.

Les importations algériennes ont considérablement augmenté depuis 1991. Le rendement de blé algérien est parmi les plus faibles au monde et cette faiblesse relative des niveaux de rendement, trouve son explication dans deux raisons principales: l'une climatique, caractérisée par une longue période de sécheresse et l'irrégularité pluviométrique (la température, la pluviométrie, le vent, l'humidité) et l'autre agronomique caractérisée par une mauvaise préparation du sol avec des outils inadaptés qui ont pour effet de diminuer la matière organique et les éléments minéraux (Bencharif, 1996). Un autre problème qui est aussi important que les premiers est la pauvreté du sol (Carence en azote N, en phosphore P et en potassium K), ce qui nécessite l'utilisation des engrais. Cette situation a obligé l'Algérie à se tourner vers les importations afin de combler la faible production.

Parmi les solutions proposées, l'utilisation des PGPR semble être une approche alternative aux méthodes classiques. En effet, l'établissement d'une agriculture moderne qui

fait face à l'insécurité alimentaire est inconditionnellement lié à l'intégration des outils de la biotechnologie aux pratiques culturelles conventionnelles (Haggag, 2008).

### 3.3.3. Application des BSP sur les cultures de blé

Malgré les rapports contradictoires sur la performance des BSP dans l'agroécosystème variable contre une multitude de cultures (Yarzabal, 2010), y compris les céréales (Yazdani *et al.*, 2009 ; Nico *et al.*, 2012), elle sont depuis été appliquées et ont montré des résultats prometteurs dans certaines régions du monde (Chesti et Ali 2007; Baig *et al.*, 2012). D'ailleurs, les travaux de Saxena et Jha (2014) ont démontré l'effet synergique d'un champignon *Glomus etunicatum* et d'une souche BSP indigène, *Burkholderia cepacia* BAM-6. Ce test a été effectué sur des plants de blé cultivés dans des pots contenant du sol avec des quantités faibles de phosphore disponible afin d'évaluer leur potentiel d'utilisation comme bioinoculants dans les régions semi-arides. A travers ce test, le rendement en graines et la concentration en azote ont été remarquablement améliorés de plus de 50 et 90%, respectivement après cette double inoculation.

De même, une bactérie solubilisant le phosphate, *Serratia marcescens* isolée d'une région à basse température, capable de synthétiser l'AIA, le HCN et les sidérophores a fortement amélioré la biomasse végétale et l'absorption des nutriments par le blé cultivé dans un environnement froid (Selvakumar *et al.*, 2008).

L'inoculation des plants de blé avec *P. fluorescens* 153, *P. fluorescens* 169, *P. putida* 4 et *P. putida* 108 présentaient une croissance, un rendement et une efficacité d'utilisation des nutriments plus élevés par rapport au témoin. Cette augmentation de la production céréalière a été attribuée à la fois à la capacité de ces BSP à solubiliser le phosphate et à leur capacité à synthétiser des substances favorisant la croissance telles que l'ACC désaminase et les produits analogues à l'AIA dans l'écosystème des sols naturels (Zabihi *et al.*, 2011). Il est intéressant de souligner que le *P. putida* 108 est parmi les rhizobactéries qui a permis une augmentation d'absorption de phosphore de 96 et 80% et du rendement en grain de 58 et 37% chez les plantes de blé cultivées dans des conditions contrôlées (sous serre) et en plein champs respectivement. De même, Kumar *et al.*, (2009) suggère que l'application de PGPR même avec de faibles taux d'engrais pourrait être une option plus viable pour obtenir des bénéfices optimaux tout en réduisant la dépendance à l'égard des intrants chimiques.

### 3.3.4. Commercialisation des BSP

Le succès et la commercialisation des souches rhizobactériennes favorisant la croissance des plantes et des bactéries solubilisant le phosphate dépendent des liens entre les organisations scientifiques et les industries (Gupta *et al.*, 2015). De nombreux travaux ont montré les différentes étapes du processus de commercialisation, y compris l'isolement des souches antagonistes, le dépistage, les méthodes de fermentation, la production de masse, la viabilité de la formulation, la toxicologie, les liens industriels, le contrôle de la qualité et l'efficacité du champ (Nandakumar *et al.*, 2001). En effet la commercialisation d'un produit biologique présente des défis difficiles et cette difficulté est plus importante quand il s'agit d'un produit qui vise à améliorer la nutrition du phosphore. L'inoculant au phosphate a été homologué pour le blé en 1990 et est maintenant inscrit sur la plupart des grandes cultures dans l'Ouest canadien. D'un petit nombre d'hectares inoculés en première année, à 1,9 million d'hectares qui ont été inoculés en 2003 (Leggett *et al.*, 2007).

Les progrès récents de la biologie moléculaire et de la biotechnologie dans la compréhension des interactions rhizobactériennes avec les nodules des plantes cultivées encourageront une zone de recherche appropriée dans les mécanismes PGPR relatifs à la colonisation des rhizosphères (Bhattacharyya et Jha, 2012). 60-75% de coton, de cacahuètes, de soja, de maïs, de légumes cultivées aux États-Unis sont maintenant traités avec un produit commercial de *Bacillus subtilis*, qui entrent en vigueur contre les agents pathogènes du sol (Nakkeeran *et al.*, 2005). En outre, *Bacillus* spp., Certaines autres souches de PGPR appartenant aux genres tels que *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* sont également utilisées pour la production de plusieurs produits commerciaux qui sont généralement appliquées contre plusieurs agents pathogènes cibles (Nakkeeran *et al.*, 2005). Le développement d'un inoculant commercial de phosphate ou de PGPR a été un processus stimulant et satisfaisant pour l'agriculture. Les défis ne se terminent pas avec le processus de commercialisation, mais continuent à apparaître au fur et à mesure que l'amélioration des produits et des processus, en suivant les nouveaux développements dans l'agriculture en élargissant le marché mondiale (Leggett *et al.*, 2007).

## 4. Stress salin

On appelle stress toute pression dominante exercée par un paramètre, perturbant le fonctionnement habituel de la plante (Hopkins, 2003). Le stress chez les plantes est principalement mesuré en fonction de la survie, de la croissance, du rendement des cultures,

de la biomasse et des processus d'assimilation primaire associés à la croissance (Oliveira *et al.*, 2013).

Les plantes sont généralement soumises à deux types de stress : les stress biotiques (dus à une agression par un autre organisme vivant) et les stress abiotiques (qui sont dus principalement à des facteurs environnementaux). Les stress abiotiques incluent le stress hydrique (diminution de la disponibilité en eau pour les plantes), le stress salin (augmentation des sels dans la solution du sol), le stress des métaux lourds (métaux toxiques excessifs dans le sol), le stress nutritif (nutriments insuffisants dans le sol) et le stress thermique (des températures extrêmes à la fois élevée et de congélation). Parmi ceux-ci, le stress hydrique est l'un des stress les plus importants suivis par le stress de salinité (Kinje, 2006; Carmen et Roberto, 2011).

La salinité du sol est un problème important qui affecte l'agriculture dans le monde et devrait devenir un problème très important et sérieux au cours des prochaines décennies. La salinisation des sols diminue de 1 à 2% par an la superficie agricole mondiale (Paul et Lade, 2014).

Les régions arides et semi-arides sont les plus durement touchées (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), 2002). Les causes de la salinisation des sols proviennent de deux origines, une, d'origine naturelle et affecte 80 % des terres salinisées, dites salinisation primaire. La seconde est provoquée par des interventions humaines, liée fréquemment à des pratiques agricoles inappropriées, elle est appelée salinisation secondaire. Sur le plan agricole, la salinité peut être définie comme un niveau de sel supérieur aux besoins de la plante (Yadav *et al.*, 2011). Elle peut également être défini en termes de concentration de sel minéral dissous, c'est-à-dire d'électrolytes de cations et d'anions où des cations majeurs comprennent  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{K}^+$  et les anions comprennent  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{NO}_3^-$ . Selon le laboratoire de la salinité USDA, le sol salin est défini comme un sol ayant une conductivité électrique de  $4 \text{ dS m}^{-1}$  ou plus (Seidahmed *et al.*, 2013). Les concentrations excessives de sel modifient les propriétés physico-chimiques du sol et affectent l'absorption des nutriments ce qui les rend les inaccessibles aux plantes.

#### 4.1. Effet de stress salin sur les plantes

Le stress salin affecte certaines activités des plantes à savoir la croissance, la teneur en azote, la capacité photosynthétique et les processus métaboliques, y compris le métabolisme des protéines et des lipides (Upadhyay *et al.*, 2011). Il a été signalé que le stress salin affectait

de façon drastique la croissance et le rendement de plusieurs cultures agricoles (Parida et Das, 2005; Ondrasek *et al.*, 2011). Le stress salin affecte en grande partie la croissance des tiges par rapport à la croissance des racines et influence donc à la fois les stades végétatifs et reproducteurs des plantes. Les stress osmotiques et ioniques sont créés en raison de la teneur en eau et de la concentration en sel, respectivement. Les ions de sel ( $\text{Na}^+$ ) interviennent dans les transporteurs de la membrane plasmique des racines et entravent la croissance des racines, empêchant ainsi l'absorption des éléments nutritifs par les plantes (Yadav *et al.*, 2011).

Le stress salin provoque un déficit hydrique, qui provoque par la suite un stress oxydatif dû à la formation des DRO (Les dérivés réactifs de l'oxygène) provoquant un dysfonctionnement de la membrane et la mort cellulaire (Parida et Das, 2005). Ces effets conduisent en outre à une diminution de la croissance des plantes et du taux de photosynthèse. La teneur en chlorophylle et en caroténoïdes des feuilles diminue également sous le stress salin.

Le stress salin affecte aussi les différents processus physiologiques tels que la cessation de l'assimilation du carbone dans les feuilles, la réduction de la perméabilité due à la déshydratation, la fermeture des stomates affectant l'activité chloroplastique, la sénescence, la fuite ionique dans le cytosol. Ces effets conduisent à l'inactivation du transport d'électrons photosynthétiques et respiratoires (Allakhverdiev *et al.*, 2000; Parvaiz et Satyawati, 2008) entraînant ainsi une altération de l'activité enzymatique.

#### **4.2. Effet de la salinité du sol sur la diversité microbienne rhizosphérique**

Comme la disponibilité des nutriments pour les plantes est régulée par l'activité microbienne rhizosphérique, tout facteur affectant cette communauté et ses fonctions influence la disponibilité des nutriments et la croissance des plantes. Du fait que la matière organique du sol et par conséquent la biomasse et l'activité microbienne sont généralement plus pertinentes dans les premiers centimètres à la surface du sol, la salinisation proche de la surface peut affecter significativement une série de processus microbiologiquement médités (Rietz et Haynes, 2003). La salinité a un impact négatif sur l'abondance, la diversité, la composition et les fonctions de la population microbienne dans le sol (Borneman *et al.*, 1996).

Omar *et al.*, (1994) ont montré qu'avec une augmentation du niveau de salinité à plus de 5% du NaCl, le nombre total de bactéries et d'actinobactéries a été considérablement réduit. Une observation similaire a été rapportée par Li *et al.*, (2006), qui ont observé des corrélations négatives significatives entre la conductivité électrique du sol et les émissions

totales de CO<sub>2</sub> ou la biomasse microbienne du carbone, ce qui suggère que la salinité a un effet néfaste sur la biomasse et l'activité microbienne.

Nelson et Mele (2007) ont signalé que le chlorure de sodium est plus susceptible d'affecter indirectement la structure de la communauté microbienne de la rhizosphère par la quantité et / ou la qualité des exsudats radicaux que directement par la toxicité microbienne. Ces mêmes auteurs ont conclu que la santé des plantes est un déterminant majeur de la structure microbienne de la rhizosphère. Pour les microorganismes, la vie à des concentrations élevées de sel est bioénergétique parce qu'ils doivent maintenir un équilibre osmotique entre leur cytoplasme et le milieu environnant tout en excluant les ions sodium de l'intérieur de la cellule, et par conséquent, une énergie suffisante est nécessaire pour l'osmoadaptation (Jiang *et al.*, 2007).

Ibekwe *et al.*, (2010) ont suggéré que les changements dans la diversité microbienne est un premier indicateur de stress dans les sols affectés par la salinité. Par conséquent, si le stress peut être détecté suffisamment tôt dans les sols affectés par la salinité, il est possible que des mesures correctives soient possibles pour améliorer la qualité du sol et les performances des cultures.

### **4.3. Atténuation du stress salin dans les plantes par les PGPR**

Différentes études ont suggéré que les rhizobactéries peuvent également développer un certain degré de tolérance chez les plantes donnant ainsi une résistance à ces dernières. La tolérance peut être définie comme la propriété intrinsèque du microbe de combattre des conditions stressantes, alors que la résistance est la capacité du microorganisme à résister à des conditions stressantes par certains mécanismes. Des données expérimentales indiquent que les microorganismes avec des capacités de tolérance/ résistance peuvent aider les plantes à s'adapter avec succès à différentes situations stressantes (Khan *et al.*, 2010; Milosevic *et al.*, 2012). Certains mécanismes par lesquels les PGPR améliorent les situations de stress sont présentés dans la section ci-dessous.

#### **4.3.1. Synthèse des auxines et de composés similaires**

Les auxines microbiennes peuvent affecter celles de la plante gouvernant un processus de développement tels que le développement des racines, y compris la longueur, la superficie et le nombre de pointes de ces racines. Ce développement racinaire permet en outre l'absorption des nutriments par les plantes, améliorant ainsi leur santé en présence de composés inhibiteurs dans des conditions de stress (Egamberdieva et Kucharova, 2009). La production d'acide indole-acétique est un trait relativement commun de PGPR, et de telles

bactéries sont censées d'atténuer le stress salin dans les plantes. Dans la même optique, Sadeghi *et al.*, (2012) ont démontré qu'un isolat de *Streptomyces* a augmenté la croissance de la plante du blé en produisant de l'acide indole acétique en présence de sel.

#### 4.3.2. Sécrétion des Exopolysaccharides (EPS)

Les microorganismes appartenant à différents groupes fonctionnels, par exemple les rhizobactéries, sécrètent des exopolysaccharides (EPS), qui fournissent une résistance aux cellules contre différents facteurs de stress et protègent ainsi le microorganisme du stress. Les EPS améliorent également la structure du sol en formant des macroagrégats avec le sol, ce qui augmente encore la capacité de rétention d'eau du sol (Alami *et al.*, 2000). Les macroagrégats maintiennent l'équilibre dans les conditions aérobies et anaérobies dans le sol et déterminent également l'absorption progressive des nutriments du sol. En cas de stress salin, ces agrégats aident à lier des cations ( $\text{Na}^+$ ) en les rendant inaccessibles aux plantes (Ashraf *et al.*, 2004). Les rhizobactéries ont la capacité de former des biofilms en sécrétant des polysaccharides et des protéines, la matrice ainsi formée limite la diffusion de composés tels que les hormones de croissance végétale et les nutriments du voisinage de la plante, favorisant ainsi la croissance des plantes en atténuant les conditions de stress (Timmusk *et al.*, 2013).

#### 4.3.3. Accumulation des osmolytes

L'une des réponses de stress les plus courantes dans les plantes est la surproduction de différents types de solutés organiques compatibles tels que la proline, la glycine bêtaïne et le glutamate (Serraj et Sinclair, 2002). L'accumulation de la proline est un indice physiologique sensible de la réponse des plantes au sel et aux autres stress pour maintenir un potentiel hydrique plus élevé pendant le stress (Peng *et al.*, 2008).

Il a été démontré que les PGPR améliorent la tolérance au stress des plantes en contribuant à l'accumulation d'osmolyte dans les plantes. Zarea *et al.*, (2012) ont également signalé une augmentation de l'accumulation de proline dans le blé lors de la colonisation des racines avec les PGPR. La proline aide également la cellule végétale en stabilisant les structures subcellulaires telles que les membranes et les protéines, en éliminant les radicaux libres et en tamponnant le potentiel oxydatif cellulaire sous stress salin pour atténuer ce stress (Ashraf et Foolad, 2007; Kohler *et al.*, 2009). Selon Upadhyay *et al.*, (2012), une augmentation de la proline et du sucre soluble total dans les plants de blé traités par les PGPR ont contribué de façon significative à leur osmotolérance. De même, le métabolisme du tréhalose chez les espèces de *Rhizobium* semble également être important pour améliorer la croissance et l'adaptation au stress abiotique des légumineuses (Suarez *et al.*, 2008).

#### 4.3.4. Modulation de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase

Certains travaux ont démontré que chez les plantes cultivées dans les sols sous stress salin, les concentrations en 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) augmentent, ce qui entraîne une forte concentration en éthylène et augmente les dommages causés aux plantes (Botella *et al.*, 2000). Les rhizobactéries ont été largement signalées pour leur hydrolyse de l'ACC (Saleem *et al.*, 2007) en ammoniac et en  $\alpha$ -cétobutyrate en abaissant ainsi le taux d'éthylène dans les plantes stressées.

En présence de bactéries productrices de l'ACC désaminase, l'ACC végétal est séquestré et dégradé par des cellules bactériennes pour fournir de l'azote et de l'énergie (Mayak *et al.*, 2004), facilitant la croissance des plantes sous le stress salin (Nadeem *et al.*, 2010). En outre, en éliminant l'ACC, la bactérie réduit l'effet délétère de l'éthylène, diminue le stress des plantes et favorise la croissance des plantes (Glick *et al.*, 2007b).

L'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase a été mise en évidence dans une large gamme de rhizobactéries et en particulier les genres : *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Variovorax* (Esquivel-Cote *et al.*, 2010).

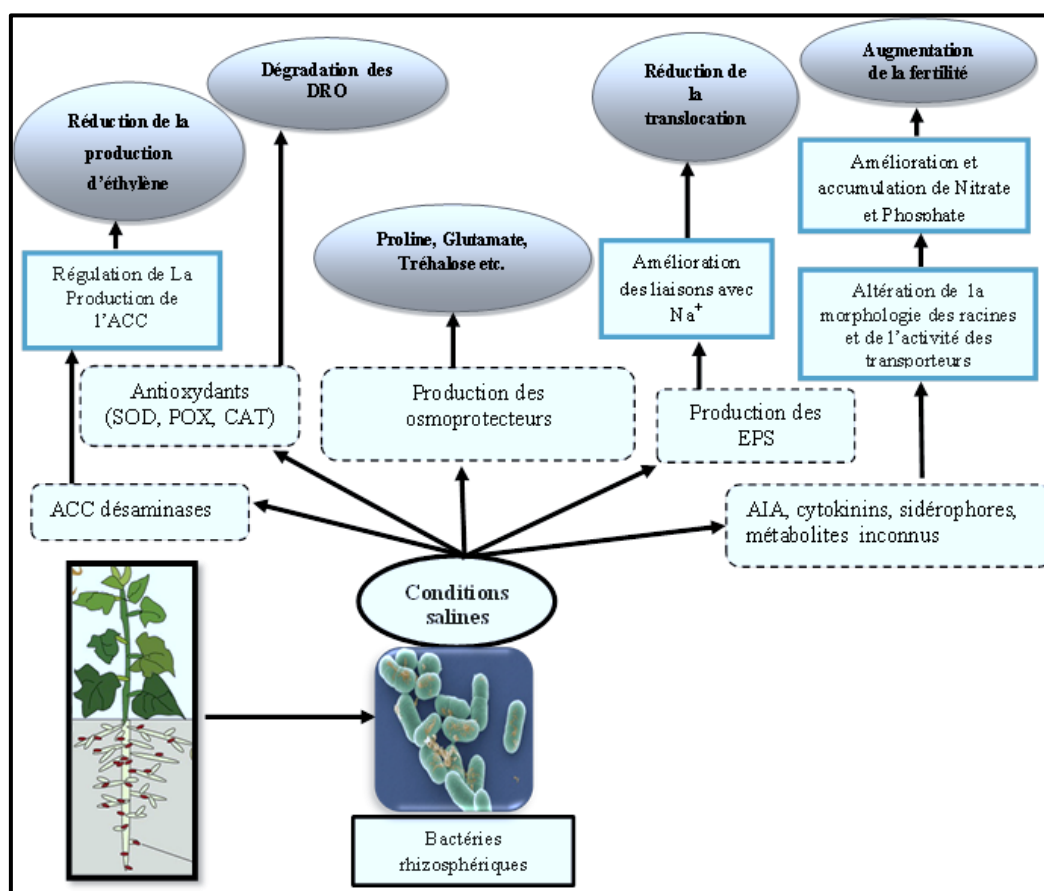
#### 4.3.5. Enzymes antioxydantes

La formation des dérivés réactifs de l'oxygène suite à un stress salin dans les plantes entraîne des dommages aux lipides, aux protéines et aux acides nucléiques. La production des dérivés réactifs de l'oxygène est favorisée par la réduction excessive de la chaîne d'électrons photosynthétiques par la limitation de la photosynthèse sous salinité (Johnson *et al.*, 2003). Les activités des enzymes antioxydantes telles que la catalase (CAT), la peroxydase (POX) et la superoxydedismutase (SOD) augmentent dans les plantes sous stress salin et une corrélation existe entre ces niveaux enzymatiques et la tolérance au sel (Mittova *et al.*, 2002 et 2003).

Des recherches sur l'application des PGPR chez les plantes ont montré une augmentation significative de plusieurs enzymes liées à la défense végétale comme la superoxyde dismutase, la peroxydase, la catalase, la polyphénol oxydase, la phénylalanine ammonia-lyase, la lipoxigénase et les composés phénoliques (Nautiyal *et al.*, 2008; Chakraborty *et al.*, 2013). Ces enzymes antioxydantes induites par les PGPR contribuent à la tolérance au stress salin dans les plantes aussi en éliminant le peroxyde d'hydrogène des racines ciblées par le sel (Kim *et al.*, 2005). Certains mécanismes par lesquels les PGPR améliorent l'adaptation des plantes au stress salin sont illustrés dans la Figure 3.

### 4.3.6. Tolérance systémique induite

A l'inverse de la résistance systémique induite impliquée pour les facteurs biotiques, un autre terme de tolérance systémique induite (TSI) avait été proposé pour définir l'atténuation des stress abiotiques par les PGPR. TSI est défini comme étant des changements physiques et chimiques provoqués par les PGPR en réponse aux stress abiotiques tels que le stress salin, le stress dû à la sécheresse, le stress thermique, le stress aux métaux lourds, ou d'une déficience nutritionnelle (Yang *et al.*, 2009). Ces communautés microbiennes suivent différents mécanismes, tels que la production de : (i) molécules volatiles pour moduler l'homéostasie de  $\text{Na}^+$  sous stress salin (Farag *et al.*, 2013), (ii) production de l'acide abscissique, provoquant la fermeture des stomates, ce qui permis d'empêcher la perte d'eau dans le stress hydrique, (iii) production des enzymes comme la superoxyde dismutase et la catalase, qui dégradent les dérivés réactives de l'oxygène pour atténuer les dommages cellulaires (Selvakumar *et al.*, 2012). Certaines bactéries appartenant au groupe des PGPR ont été signalé au sujet de la TSI, il s'agit des genres : *B. cereus*, *B. subtilis*, *Serratia* sp. (Wang *et al.*, 2012), *Paenibacillus polymyxa* (Timmusk et Wagner, 1999), *Achromobacter piechaudii* (Mayak *et al.*, 2004), etc.



**Figure 3:** Augmentation de la tolérance et la survie des plantes induite par les rhizobactéries en milieu salin (Ashraf *et al.*, 2008).



**Chapitre II**  
**Matériel et**  
**Méthodes**

## 1. Echantillonnage du sol salin

### 1.1. Localisation des sites de prélèvement

Le sol étudié a été prélevé en Avril 2014 et en Janvier 2015 à partir d'une zone saline nommée la Mina situé dans la wilaya de Relizane à l'ouest de l'Algérie. Ce site de prélèvement a été choisi grâce à sa grande surface et à son importance parmi les zones salines situées dans l'ouest Algérien et vu le manque des études microbiologiques sur ce site. La zone d'étude est située dans la vallée du plus grand affluent du Chélif (Oued Mina). La partie centrale du périmètre se trouve dans le nord de Oued Mina qui coule vers le Nord et se jette dans l'Oued Chélif. La partie Ouest du périmètre s'étend à gauche et à droite de la route menant à la ville d'Oran et comprend le voisinage immédiat de la ville d'El Matmar. La partie Est s'étend à gauche et à droite de la route menant vers la ville de Chlef et comprend les environs de la localité du village de Oued Djemaa. La parcelle se situe entre les longitudes  $0^{\circ}29'35''$  et  $0^{\circ}29'46''$  et entre les latitudes  $35^{\circ}43'56''$  et  $35^{\circ}44'9''$  (Figure 4) (Gacem *et al.*, 2009).

Du point de vue pédologique, la plaine de la Mina est constituée d'apports alluviaux caractérisés par des terres à structure fine (argile–limon), potentiellement salinisables, avec la présence d'un taux de calcaire appréciable. Cependant l'agriculture dans le périmètre est très diversifiée. En effet les cultures pratiquées sont les céréales, les fourrages, le maraîchage et l'arboriculture. Les sols affectés par la salinité dans cette étendus occupent une superficie relativement importante dont 23 % des sols sont non salés, 50 % moyennement salés et 25% sont salés à fortement salés (Gacem *et al.*, 2009).



Figure 4: Grants périmètres d'irrigation de la Mina (Gacem *et al.*, 2009).

## 1.2. Prélèvement des échantillons

Douze échantillons du sol ont été prélevés aléatoirement de la rhizosphère des plantes de blé cultivées dans des endroits différents ayant différents taux de salinité selon la carte de la salinité de la zone d'étude (Annexe 1) et le GPS (Global Positioning System). Ces échantillons ont été prélevés dans des conditions aseptiques à une profondeur variant de 0 à 15 cm. Les échantillons recueillis dans des récipients stériles, ont été tamisés pour éliminer les cailloux et les gros débris de matière organique puis transportés au laboratoire pour faire l'objet de différentes analyses par la suite.

## 1.3. Analyses physico-chimiques du sol

Les analyses physico-chimiques du sol ont été réalisées au laboratoire de recherche de microbiologie et biologie végétale à l'université de Mostaganem (ex INES). La qualité physico-chimique du sol est importante à connaître car elle conditionne la diversité de la microflore tellurique.

### 1.3.1. Humidité

Au moment de chaque prélèvement, l'humidité du sol a été déterminée. 20 g de chaque échantillon du sol prélevé ont été séchés dans un four Pasteur pendant 72 h à 70 °C jusqu'à un poids constant. Le poids frais et le poids sec des échantillons ont été déterminés et l'humidité est ensuite calculée selon la formule suivante (Pauwels *et al.*, 1992):

$$\text{Humidité \%} = \frac{\text{poids sec} - \text{poids humide}}{\text{poids humide}} \times 100$$

### 1.3.2. pH et conductivité électrique (C<sub>E</sub>)

Pour la détermination du pH et de la conductivité électrique (C<sub>E</sub>) du sol, 20 g du sol frais ont été tamisés ensuite 40 ml d'eau distillée ont été ajoutés sous agitation vigoureuse à l'aide d'un agitateur pendant 30 min (Pauwels *et al.*, 1992). Le pH et la C<sub>E</sub> ont été déterminés à l'aide d'un pH mètre (Adwa AD1030) et d'un conductimètre (Hanna EC214) respectivement.

## 2. Isolement des bactéries solubilisant le phosphate (BSP)

L'isolement des bactéries solubilisant le phosphore a été effectué selon la méthode de suspensions-dilutions. 10 g de sol de chaque échantillon ont été mélangés avec 90 ml de PBS (Annexe 4), le mélange est ensuite agité pendant 30 min. 1 ml de la solution mère a été introduite dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une

dilution de  $10^{-1}$ . Une série de dilution a été préparé jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-5}$ . 0,1 ml de cette suspension ( $10^{-5}$ ) a été étalé sur des boites de Pétri contenant le milieu Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) (Annexe 2) contenant 5 g de phosphate tricalcique  $(Ca_3PO_4)_2$  comme seule source de phosphore. Le pH a été ajusté à 7,0 avant autoclavage. L'apparition d'un halo transparent autour de la colonie bactérienne après incubation à  $28 \pm 2^\circ C$  pendant 10 jours indique une solubilisation positive de phosphate (Edi-Premono *et al.*, 1996).

### 2.1. Purification des rhizobactéries isolées

Les colonies entourées de zones claires (halo de solubilisation) ont été prélevées puis purifiées par épuisement sur milieu gélosé de Pikovskaya. Cette technique consiste à repiquer 3 à 4 fois les colonies sur le milieu PVK jusqu'à l'obtention de colonies pures. Les isolats bactériens obtenus ont été conservés au réfrigérateur ( $4^\circ C$ ), dans des tubes à essai contenant le milieu gélose nutritive (GN) inclinés (Annexe 2). Ces isolats serviront pour la suite du travail et sont réservés pour les tests suivants.

### 2.2. Solubilisation du phosphate

#### 2.2.1. Test de solubilisation sur milieu solide

Des cultures pures de bactéries solubilisant le phosphate ont été ensemencées par touches sur milieu PVK solide contenant le  $(Ca_3PO_4)_2$  comme seule source de phosphate à raison de 3 à 4 souches par boîte de Pétri. Les boites ont été incubées à  $28 \pm 2^\circ C$  pendant 7 jours. Après incubation, le diamètre de l'halo ainsi que de la colonie bactérienne ont été mesurés. L'efficacité de la solubilisation (ES) des microorganismes a été calculée selon la formule suivante:

$$ES = \frac{\text{le diamètre de l'halo de la solubilisation}}{\text{le diamètre de la colonie}} \times 100 \text{ (Nguyen } et al., 1992)$$

#### 2.2.2. Test de solubilisation en milieu liquide

Les isolats bactériens présentant un halo transparent sur milieu solide ont été testés avec un test quantitatif de solubilisation du phosphate en milieu liquide. La capacité de solubilisation du phosphate de chaque isolat bactérien a été déterminée en milieu NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium; Nautiyaul, 1999) contenant 0,5% de  $(Ca_3PO_4)_2$  comme seule source de phosphate (Annexe 2). Des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu NBRIP ont été inoculés par 1 ml de suspension bactérienne (DO=0,8) (Kumar, 2010) puis incubés à  $28 \pm 2^\circ C$  sous agitation à 180 tr/min pendant 7 jours.

Après incubation, le contenu de chaque erlenmeyer a été centrifugé à 6000 tr/min (centrifugeuse Rodofix 32A) pendant 30 min. Le phosphore du surnageant a été estimé par la méthode colorimétrique de jaune de vanado-molybdate (Jackson, 1958). 1 ml de surnageant a été ajouté à 2,5 ml de réactif de Barton (Annexe 3), le volume a été complété à 50 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance de la couleur résultante a été lue après 10 min à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (JENWAY 7305). La quantité de phosphore total soluble a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage. Les valeurs de phosphate soluble libéré ont été exprimées en  $\mu\text{g/ml}$ . Le pH de surnageants des cultures bactériennes a été également mesuré en utilisant un pH mètre.

### 2.2.3. Courbe d'étalonnage

Pour la préparation de la solution standard, 0,2195 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ont été dissoutes dans un litre d'eau distillée. Cette solution contient 50 ppm (partie par million) de phosphore (Kumar, 2010). La préparation de la courbe d'étalonnage a été réalisée par l'ajout de 2,5 ml de réactif de Barton aux différents volumes: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 et 20 ml de la solution standard ensuite les volumes ont été complétés à 50 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance de la couleur résultante a été lue après 10 min à 430 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (Figure 5).

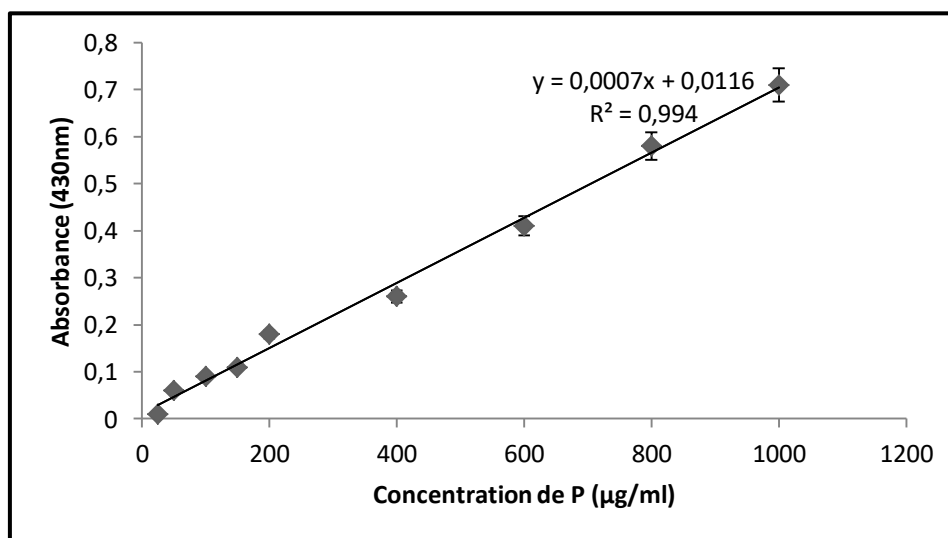


Figure 5: Courbe standard de phosphore.

### 3. Identification phénotypique des isolats bactériens

Quarante un isolats bactériens ont été sélectionnés et identifiés selon l'aspect macroscopique (l'aspect, la pigmentation et la consistance de la colonie sur milieu solide) suivi par une coloration de Gram et des tests de recherche de catalase, d'oxydase et d'hydrolyse de l'amidon. Ces tests ont été complétés par une identification biochimique en utilisant les galeries API 20NE et API 20E (BioMérieux, France). Les résultats ont été interprétés par API Web TM software (version 7.0).

### 4. Evaluation des activités PGP des isolats bactériens

#### 4.1. Production de l'acide indole acétique (AIA)

La capacité de différentes bactéries étudiées à produire l'auxine AIA a été testée en milieu LB (Luria Bertani) (Annexe 2). 50 ml de milieu LB contenant 0,01% de D-tryptophane ont été inoculés par 1ml de suspension bactérienne (DO=0,8) (Kumar, 2010) puis incubés pendant 4 jours à  $28 \pm 2$  °C et à l'obscurité sous agitation à 180 tr/min. Les cultures bactériennes ont été ensuite centrifugées à 6000 tr/min pendant 30 min. L'estimation de l'acide indole acétique (AIA) dans le surnageant a été réalisée par la méthode colorimétrique décrite par Brick *et al.*, (1991). 1 ml de surnageant a été ajouté à 2 ml de réactif de Salkowski (1 ml de  $\text{FeCl}_3$  à 0,5 M et 50 ml de  $\text{HClO}_4$  à 35%), ils ont été mis à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de la couleur rose résultante qui indique la production de l'AIA a été lue à 535 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible. Les taux de l'AIA libérés ont été calculés à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage et exprimés en  $\mu\text{g/ml}$ .

##### 4.1.1. Courbe d'étalonnage

Une solution standard d'AIA (100  $\mu\text{g/ml}$ ) a été préparée. La courbe d'étalonnage a été préparée par l'ajout de 2 ml de réactif de Salkowski à des volumes de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 et 1,0 ml de la solution standard dans des tubes à essai. L'absorbance de ces solutions a été lue à 535 nm après 30 min d'incubation avec un spectrophotomètre UV-Visible (Kumar, 2010) (Figure 6).

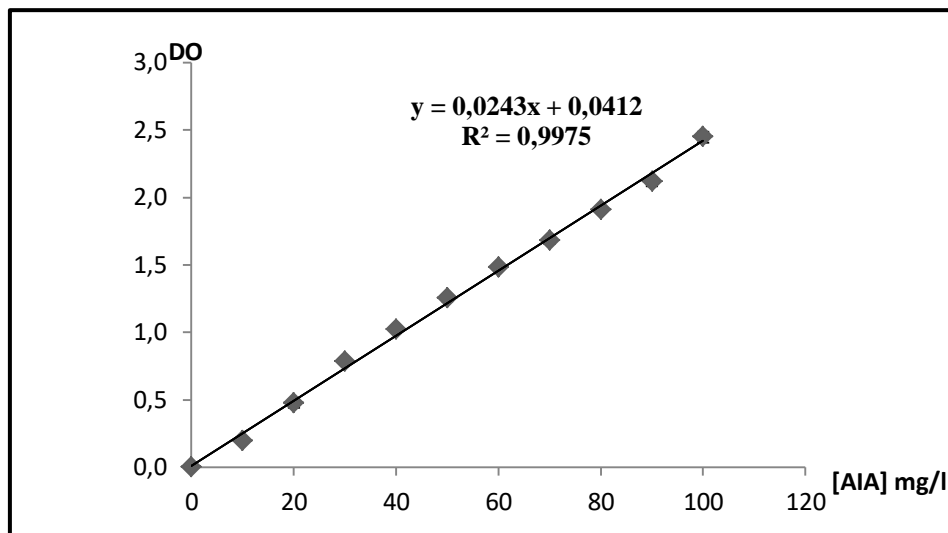


Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'AIA.

#### 4.2. Fixation d'azote

La détection visuelle de la fixation d'azote chez les isolats bactériens a été réalisée en utilisant le milieu exempt d'azote NF-MM (Nitrogen-Free Malate-mannitol Medium) contenant le bleu de bromothymol (BTB) comme indicateur (Herman *et al.*, 1994) (Annexe 2). Le milieu solide a étéensemencé par les isolats bactériens (après incubation pendant 24h) par touches à raison de 4 isolats par boîte de Pétri puis incubé à  $28 \pm 2$  °C pendant 24 h. Le virage de la couleur verte du milieu de culture vers la couleur bleue indique une fixation d'azote positif. La zone colorée a été calculée en soustrayant le diamètre des colonies à partir du diamètre de la zone bleue (Dobereiner et Day, 1976).

#### 4.3. Production de sidérophores

La production des sidérophores par les isolats bactériens a été détectée selon la méthode décrite par Schwyn et Neilands (1987). Ce test a été réalisé en utilisant le milieu chrome azurol S (CAS) (Annexe 5) qui contient le complexe ternary CAS/Fe+3/hexadecyltrimethyl-ammonium bromide comme un indicateur. L'inoculum bactérien de 24h a été placé sur le milieu CAS solide par pique à raison de 3 à 4 isolats par boîte de pétri. Les boîtes ont été incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 5 jours à l'obscurité. Le virage de la couleur bleue du milieu vers la couleur orange entourant la colonie bactérienne indique une production positive de sidérophores. Les diamètres des halos ont été pris comme estimations de l'intensité de la production de sidérophores.

#### **4.4. Production d'acide cyanhydrique (HCN)**

La capacité à produire l'acide cyanhydrique par les bactéries isolées a été vérifiée selon la méthode de Bakker et Schippers (1987). Chaque isolat âgé de 24h a été ensemencé à l'aide d'une anse stérile sur gélose nutritive additionnée de glycine (4,4 g/l). Un papier Whatman No. 1 imprégné d'une solution de couleur jaune (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium) a été déposé sur le couvercle de chaque boîte de Pétri en position inversée. Celles-ci ont été scellées avec du Parafilm et incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 4 jours. Elles ont été vérifiées quotidiennement afin d'identifier les isolats producteurs de l'HCN capables de virer la couleur du papier du jaune à l'orange.

#### **4.5. Production de l'ammoniac**

Tous les isolats bactériens ont été testés pour la production de l'ammoniac par la méthode décrite par Cappuccino et Sherman (1992). Des cultures bactériennes de 18 h ont été inoculées dans 10 ml d'eau peptonée (Annexe 2) et incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 48 h sous agitation. Après incubation, 0,5 ml de réactif de Nessler a été ajouté aux cultures bactériennes. Le développement de la couleur jaune vers la couleur marron foncé indique la production de l'ammoniac.

### **5. Caractérisation des isolats sélectionnés**

#### **5.1. Sélection des isolats par analyse en composante principale (ACP)**

L'analyse en composantes principales (ACP) est une analyse multivariée permettant d'établir une relation entre plusieurs variables et définir le comportement d'individus vis-à-vis ces variables. Cette méthode est réalisée dans le but de mettre en évidence les isolats bactériens les plus actifs et de procéder au choix des isolats les plus performants en se basant sur la mesure de leurs capacités PGP. L'ACP a été réalisée par le logiciel « StatBox » version 6.4. Les composantes retenues sont la solubilisation des phosphates, la production d'acide indole acétique et des sidérophores et la fixation de l'azote.

#### **5.2. Caractérisation génotypique des isolats bactériens**

Les cinq meilleures bactéries solubilisant le phosphate ont été sélectionnées selon l'analyse des composantes principales (ACP) pour poursuivre des tests plus approfondis à savoir, l'identification moléculaire qui est un outil fiable et précis, développé pour la classification et l'identification des bactéries. Après avoir étudié les caractères de morphologie et de physiologie des isolats, une identification moléculaire a été effectuée (pour

de meilleures données taxonomiques). L'identification moléculaire des bactéries a été réalisée au laboratoire de contrôle génétique de la symbiose (<http://www.ips2.u-psud.fr/spip.php?article46>) à l'institut des sciences des plantes (IPS2), Université de Paris Sud, France. Cette identification comporte plusieurs étapes:

### 5.2.1. Extraction de l'ADN

L'ADN des cultures bactériennes de 18 h dans un bouillon nutritif (BN) (Annexe 2) a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin® Microbial ADN (Macherey Nagel GmbH & Co.KG. Neumann-Neander-Str.6-8. 52355 Düren.Germany, <http://www.mn-net.com/>) suivant le protocole fourni (Annexe 6).

### 5.2.2. Dosage de l'ADN

La concentration et la pureté de l'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop Labtech ND-1000). La pureté de l'ADN a été évaluée par le rapport des densités optiques DO 260/280 nm. Un extrait d'ADN de bonne qualité donne un rapport compris entre 1,8 et 2. La quantité d'ADN doit être au minimum 300 ng/μl.

### 5.2.3. Amplification du gène de l'ARNr 16S (PCR)

L'amplification par PCR (Polymérase Chaîne Réaction) permet d'amplifier les séquences du gène ARNr 16S qui sont des séquences très conservées chez les procaryotes par lequel les petites différences entre les espèces microbiennes peuvent être mesurées et même utilisées pour identifier les microorganismes.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) consiste à multiplier la séquence de l'ADNr 16S en utilisant les deux oligo universelles (amorces) (1390 et PA2) encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500 pb à l'aide d'un thermocycleur (Applied Biosystem 2720).

Oligo	Séquence 5'→3'
<b>1390</b>	5' _-AACGGGCGGTGTGTRCAA-3'
<b>PA2</b>	5' _- AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

Le mélange de la réaction est présenté dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1** : Mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs	Quantité en $\mu$ l
ADN	2
oligo1390	2
oligo PA2	2
dNTPs mixte	1
tampon (MgCl <sub>2</sub> )	2
Taq-polymérase	0.5
Eau ultra pure stérile	16

L'amplification de l'ADN comprend plusieurs étapes à savoir : une étape de dénaturation initiale pendant 5 min à 94°C, une dénaturation pendant 1 min à 94 °C, une hybridation pendant 1 min à 52 °C, une étape d'élongation pendant 1 min 30 s à 72 °C, avec 36 cycles et enfin une incubation pendant 7 min à 72°C (Zheng *et al.*, 1996).

#### 5.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de l'amplification sont ensuite analysés. 20  $\mu$ l de chaque échantillon ont été déposés sur gel d'agarose à 1 % contenant le bromure d'éthidium (BET). Un marqueur moléculaire de taille de 1Kb a été utilisé comme échelle pour estimer la taille des gènes. La migration a été faite pendant 20 min à 100 Volts. Les bandes ont été ensuite photographiées avec un système de capture digital (Bio Imaging System).

#### 5.2.5. Séquençage

Le séquençage des amplicons a été réalisé par la société d'Eurofin (GMBH). Les séquences sont comparées aux séquences homologues contenues dans les banques de données de séquences à travers le portail NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.gov/Blast.cgi>) en utilisant le programme Blast (Basic Local Alignment Search Tools). Le dendrogramme phylogénétique est réalisé par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

### 5. 3. Analyse chromatographique des acides organiques produits par les BSP

Une Chromatographie en phase liquide (HPLC) a été utilisée pour l'analyse d'acides organiques produits par les bactéries solubilisant le phosphate dans le milieu NBRIP liquide. Le surnageant a été prélevé des cultures bactériennes qui ont été centrifugées à 10, 000 tr/min pendant 15 minutes après 6 jours d'incubation à  $28 \pm 2$  °C. Les échantillons ont été filtrés à travers un filtre millipore de 0,2  $\mu\text{m}$  et ont été placés dans le chromatographe (SHIMADZU, LC Systems, Nexera-i, Japon) équipé d'un détecteur UV-210 nm. La séparation de l'acide organique a été effectuée sur une colonne Ascens C18 (150x 4,6 mm Sigma-Aldrich). Les conditions opératoires sont constituées de 5 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en tant que phase mobile à un débit constant (isocratique) de 2 ml/min et la colonne est mise en œuvre à 35 °C. Le temps de rétention (TR) de chaque signal a été enregistré à une longueur d'onde de 210 nm (Kelebek *et al.*, 2009). Le logiciel utilisé pour les analyses par HPLC était le Millennium 32, et les acides organiques détectés ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention et les zones de pic de leurs chromatogrammes avec ceux des standards.

### 5.4. Mesure de l'activité de réduction d'acétylène par les isolats bactériens (test ARA)

La mesure quantitative du taux de l'azote atmosphérique fixé par les cinq isolats bactériens sélectionnés a été effectuée par la mesure de l'activité de réduction de l'acétylène (test ARA) selon Berrabah *et al.*, (2014). 12 ml de milieu NF semi solide exempt de l'azote (Dobereiner et Day, 1976) ont été versés dans des vials de 20 ml ensuite, environ 20  $\mu\text{l}$  de l'inoculum bactérien ( $\text{DO}=0,8$ ) ont été transférés dans ces deniers. Après 3 jours d'incubation à  $28 \pm 2$  °C sans agitation, 500  $\mu\text{l}$  du gaz acétylène pur (99,8 %) ont été ajoutés à l'aide d'une seringue étanche aux gaz. Les cultures bactériennes ont été laissées agir pendant 14 h et 1 ml de l'échantillon d'air a été récupéré puis injecté dans un chromatographe en phase gazeuse 7820A de Agilent Technologies (Santa Clara, USA) équipé d'un détecteur d'ionisation à flamme et d'une colonne GS-Alumina (50 m x 0,53 mm) avec l'hydrogène comme gaz vecteur. La température de la colonne et le débit de gaz sont : 120 °C et de 7,5 ml/min respectivement. La concentration d'éthylène produite a été calculée sur la base du graphe standard d'éthylène à un Temps de rétention (TR) de 2,1 min.

## 5.5. Effet de stress salin sur les isolats bactériens

### 5.5.1. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Un test de tolérance au sel a été réalisé sur les cinq isolats bactériens sélectionnés. La croissance bactérienne a été estimée par la mesure de la densité optique après incubation. Dans des erlenmeyers de 250 ml, un volume de 50 ml de bouillon nutritif BN (Annexe 2) additionnés de concentrations croissantes de NaCl allant de 0, 100, 200 jusqu'à 900 mM a été inoculé avec 1ml de suspensions bactériennes issues de pré culture fraîche diluée avec de l'eau physiologique stérile ( $DO_{600} = 0,4$ ). Les cultures bactériennes ont été incubées à  $28 \pm 2$  °C sous agitation pendant 48 h (Rojas-Tapias *et al.*, 2012). Après incubation, la densité optique des cultures bactériennes a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 600 nm.

### 5.5.2. Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate en milieu liquide

La capacité des cinq isolats bactériens à dissoudre le phosphate tricalcique  $Ca_3(PO_4)_2$  a été testée sous stress salin. Dans des erlenmeyer de 250 ml, 50 ml de milieu NBRIP additionnés de concentrations croissantes de NaCl allant de 0, 100, 200 jusqu'à 900 mM ont été inoculés avec 1ml de suspensions bactériennes issues de pré culture fraîche diluée avec de l'eau physiologique stérile ( $DO=0,8$ ) (Kumar, 2010). Les milieux de cultures inoculés ont été incubés à  $28 \pm 2$ °C pendant 6 jours sous agitation à 180 tr/min. Après incubation la quantité de phosphore libéré a été estimée selon la méthode de jaune de vanado-molybdate.

## 6. Effet de l'inoculation sur la croissance des plants de blé dur

En vue de déterminer leurs effets de promotion de la croissance du blé dur en absence de phosphore soluble et/ou sous stress salin, les rhizobactéries sélectionnées ont été testées *in vivo* dans des pots contenant du sable inoculé ou non par les isolats bactériens.

### 6.1. Matériel végétal

La plante utilisée pour tester l'effet promoteur de sa croissance par les isolats bactériens est le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Les graines de la variété Chen's ont été fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) de Sidi Bel-Abbes (Algérie). Il s'agit d'une variété à paille courte avec un cycle végétatif précoce adaptée aux régions arides et semi arides.

## 6.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Les cinq isolats bactériens sélectionnés (PSB18, PSB41, PSB45, PSB87, PSB91) ont été inoculés en milieu LB liquide (Annexe 2) pendant 48 h sous agitation (180 tr/min). L'inoculation des graines a été effectuée avec les suspensions bactériennes où la densité optique a été ajustée pour atteindre environ 0,8 (Hussain *et al.*, 2013).

## 6.3. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination des grains de blé

Afin de calculer l'indice de germination, des graines de blé dur ont été désinfectées en surface par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl) pendant 5 min, suivie d'un rinçage à l'eau distillée stérile (Aly *et al.*, 2012). Les graines désinfectées ont été immergées séparément dans un milieu de culture inoculé par les isolats bactériens et dans l'eau distillée stérile (pour le témoin) et incubées à 25 °C à l'obscurité pendant 10 jours. On considère qu'une graine de blé est germée lorsque la radicule perse l'enveloppe séminale (Walker-Simmons et Sesing 1990).

Le nombre de graines germées a été compté quotidiennement pendant dix jours et le l'indice de germination a été déterminé selon la formule suivante : (Walker-Simmons et Sesing 1990).

$$\text{Indice de germination} = \frac{(10 \times n1 + 9 \times n2 + \dots \dots \dots + 1 \times n10)}{\text{Jours entier} \times \text{nbr de graines totales}}$$

Où n1,... à n10 sont le nombre de graines ayant germé du premier jour jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour respectivement. Les chiffres 10, 9, 8 sont les coefficients donnés aux graines germées en premier, deuxième et ainsi de suite. La valeur maximale de l'indice de germination est de 1 et la valeur minimale est de 0.

## 6.4. Expérimentation

L'expérience a été réalisée pendant le mois d'Octobre 2015 dans une serre et sous des conditions semi-contrôlées. Le sable a été utilisé comme un support stérile inerte pour la germination des graines. Ce dernier a été lavé plusieurs fois avec de l'eau de robinet puis séché à l'air libre et stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min durant 3 jours.

Le dispositif expérimental a été arrangé en bloc randomisé avec trois répétitions, en bifactoriel et décrit comme suit:

- Le premier facteur comprend les traitements utilisés pour les grains de blé, il contient trois traitements différents:

**Traitement 1:** contenant le phosphore soluble sans addition de phosphate tricalcique et sans stress salin.

**Traitement 2:** contenant 0,2 % de phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) comme seule source de phosphore ajouté au sable (Rivas *et al.*, 2007) et sans stress salin.

**Traitement 3:** contenant 0,2 % de phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) comme seule source de phosphore ajouté au sable (Rivas *et al.*, 2007) avec addition de 100 mM de NaCl.

- Le deuxième facteur comprend l'inoculation bactérienne des grains de blé, avec les cinq isolats bactériens (PSB18, PSB41, PSB45, PSB87, PSB91) et un témoin sans inoculation.

Chaque pot a été rempli avec 4 kg de sable stérile. Les graines désinfectées ont été semées à une profondeur de 2 cm dans le sable avec trois pots par traitement et trois graines par pot. Ensuite, 15 ml de la suspension bactérienne de chaque isolat a été utilisé pour inoculer les graines (Aly *et al.*, 2012).

## 6.5. Irrigation

Les plants du traitement 1 ont été irrigués par la solution Hoagland (Hoagland et Arnon, 1950) (Annexe 4). Une solution Hoagland modifiée (sans phosphore soluble) a été utilisée pour irriguer les plants des traitements 2 et 3, chaque pot reçoit 200 ml deux fois par semaine. L'addition du NaCl pour le traitement salin a été commencée 7 jours après plantation. Les plants de blé ont été arrosés par l'eau distillée stérile en cas de besoin (Aly *et al.*, 2012).

## 6.6. Détermination des paramètres morpho-biochimiques des plants de blé

### 6.6.1. Paramètres morphologiques

Après 60 jours de plantation, les plants ont été récoltés et lavés avec de l'eau distillée. Les racines et les tiges ont été séparées, leurs tailles et leurs poids frais et sec (72 h à 70 °C) ont été ensuite déterminées.

### 6.6.2. Paramètres biochimiques

#### 6.6.2.1. Dosage de la chlorophylle

Le contenu en chlorophylle a été déterminé selon la méthode d'Arnon (1949). Cette méthode consiste à peser 0,25 g de feuilles de chaque échantillon. Elles sont ensuite découpées en petits morceaux de 0,5 cm puis broyées à l'aide d'un mortier dans 5 ml

d'acétone à 80%, en ajoutant quelques milligrammes de carbonates de calcium. Après le broyage total de la matière végétale, les solutions obtenues ont été filtrées et leur densité optique a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à deux longueurs d'ondes : 645 nm et 663 nm.

Les concentrations en chlorophylle a et b sont déterminées selon la formule ci-dessous :

$$\text{Chlorophylle (a+b)} = 8.02 \times \text{DO } 663 + 20.2 \times \text{DO } 645.$$

Où DO représente la densité optique.

### 6.6.2.2. Contenu en P, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> des feuilles

#### 6.6.2.2.1. Digestion acide

Pour une digestion acide-humide des différents échantillons de feuilles, 5 ml de HNO<sub>3</sub> à 70% et 1,5 ml de HClO<sub>4</sub> à 60% ont été ajoutés à 0,5 g de matière sèche de chaque échantillon, puis les solutions ont été chauffées jusqu'à la disparition du fumé marron. Ensuite, les solutions ont été refroidies, 5 ml d'HCl dilué à 50% ont été ajoutés aux solutions et le volume a été ajusté à 25 ml avec de l'eau distillée (Pequerul *et al.*, 1993).

#### 6.6.2.1.2. Contenu en P des feuilles

L'extrait de plante (obtenu après digestion acide) de chaque échantillon (2,5 ml) a été ajouté à 2,5 ml de réactif de Barton puis dilués dans 12 ml d'eau distillée. Après 10 min, la densité optique des solutions a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à 430 nm (Jackson, 1958). Le même mode opératoire a été suivi pour la préparation de la courbe d'étalonnage (Figure 7).

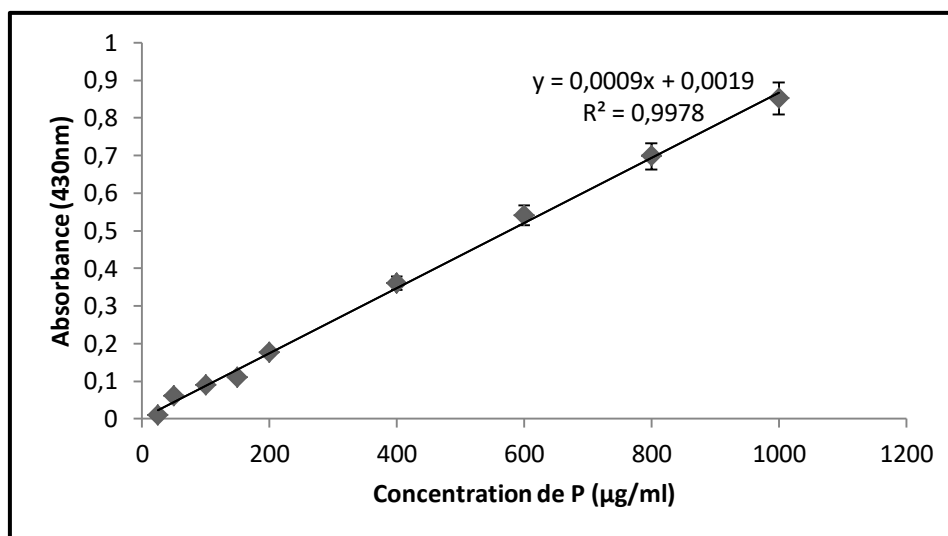


Figure 7: Courbe d'étalonnage du phosphore.

### 6.6.2.1.3. Contenu en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> des feuilles

Les taux des minéraux Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> foliaires ont été déterminés par spectrophotomètre à flamme (NeoTch BMB) après digestion acide et dilution des extraits de feuilles (Pauwels *et al.*, 1992). Le contenu foliaire en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> a été exprimé en mg/g de matière fraîche.

## 7. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicate. Les résultats de différents paramètres ont été traités par analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel « StatBox » version 6.4, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls à  $p \leq 0,05$ .



**Chapitre III**  
**Résultats**

## 1. Echantillonnage du sol salin

### 1.1. Analyses physico-chimiques des sols

Les analyses physico-chimiques des échantillons du sol sont consignées dans le tableau 2. Le taux d'humidité du sol estimé varie de 10,52 à 18,60 %, les échantillons prélevés en moi de Janvier ont été plus humide que ceux prélevés en moi d'Avril. Les valeurs de pH déterminées pour tous les échantillons du sol salin varient de 7,82 à 8,51 ce qui signifie que les sols analysés sont légèrement alcalin. Les valeurs de la conductivité électrique varient entre 6,34 et 15,04 ds/m, qui sont des valeurs plus ou moins élevées. Cela confirme la nature saline des sols prélevés dans cette étude comme il a été déjà décrit par Gacem *et al.*, (2009).

**Tableau 2:** Analyses physico-chimiques du sol salin.

Echantillon	pH	Humidité (%)	C <sub>E</sub> (ds/m)
1	7,82±0,21	11,11±2,03	6,34±1,33
2	8,01±0,09	11,45±1,37	7,23±1,42
3	8,28±0,15	10,62±1,88	6,57±1,67
4	8,37±0,22	10,52±1,23	8,98±2,09
5	8,09±0,18	10,67±1,97	9,35±1,22
6	8,05±0,12	12,51±2,66	15,04±2,02
7	8,46±0,16	12,08±1,17	11,45±2,11
8	8,37±0,23	10,92±2,2	10,78±2,14
9	8,08±0,26	12,40±1,46	9,66±1,45
10	8,43±0,2	16,62±2,53	13,43±2,1
11	8,51±0,22	17,48±3,26	13,86±1,56
12	8,16±0,18	18,6±2,78	12,22±1,14

Valeurs: moyenne± écart type, C<sub>E</sub>: conductivité électrique.

## 2. Isolement des bactéries solubilisant le phosphate (BSP)

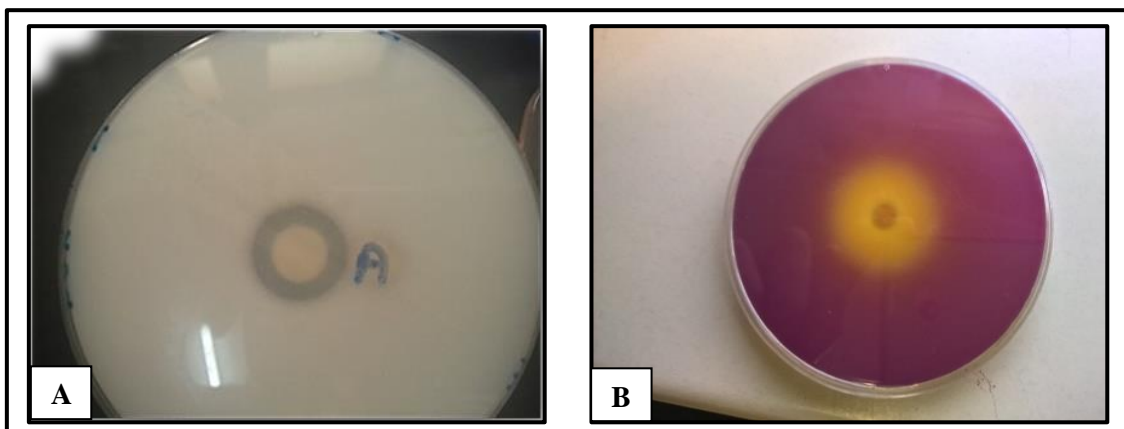
L'isolement des bactéries solubilisant le phosphate du sol salin de différents endroits a permis d'isoler un nombre de 104 isolats bactériens. Cette population microbienne présente différents aspects mais ayant tous, un caractère commun de solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu solide. Ces isolats bactériens ont été capables de former une zone claire autour de leurs colonies sur le milieu PVK, ce qui indique une solubilisation positive du phosphate tricalcique (Figure 8.A). Les bactéries isolées et purifiées ont été ensuite testées en milieu liquide avec un dosage précis de quantités de phosphores solubles libérés afin de confirmer cette activité et sélectionner ensuite les isolats les plus performants.

## 2.1. Solubilisation du phosphate

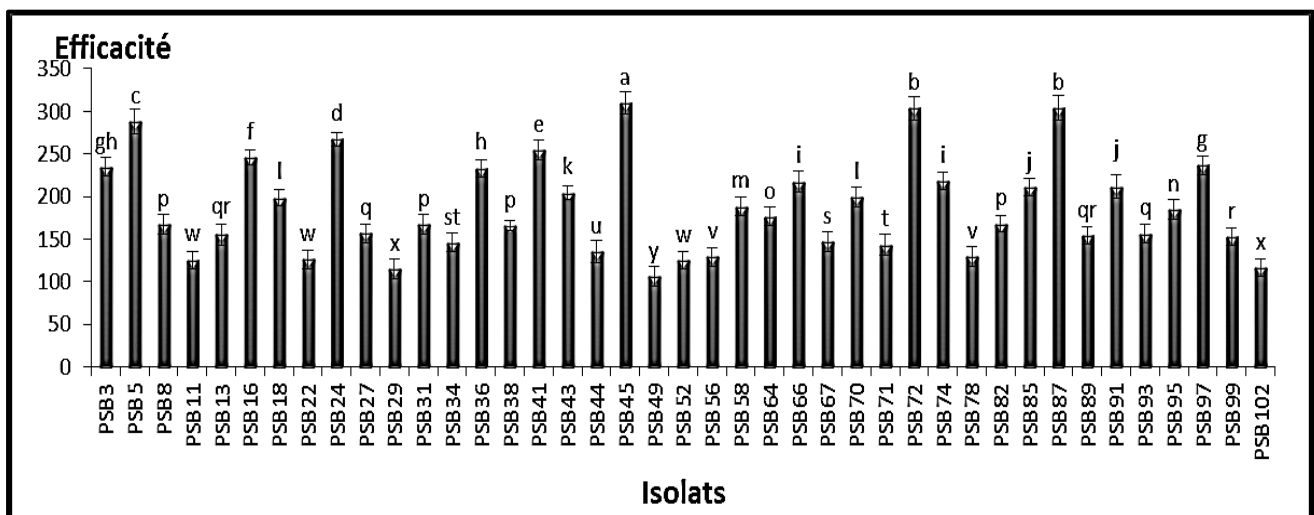
L'étude de la capacité des isolats bactériens à libérer le phosphate minérale a été réalisée avec un test qualitatif sur milieu solide et un test quantitatif en milieu liquide pour confirmer leur capacité à solubiliser le phosphate.

### 2.1.1. Test de solubilisation sur milieu solide

La capacité des différentes bactéries isolées (104 isolats) à solubiliser le phosphate inorganique a été étudiée sur milieu PVK solide en calculant l'efficacité de cette solubilisation par mesure de différent diamètre des halos transparents autour des colonies. Différentes valeurs de l'efficacité de solubilisation du phosphate tricalcique ont été enregistrées (Annexe 7). Ainsi, en utilisant le milieu PVK solide additionné de bleu de bromophénol (BBP) comme un indicateur coloré de pH, un virage de la couleur du violet au jaune a été observé après ensemencement par les BSP (bactérie solubilisant le phosphate), cela indique une production importante des acides dans le milieu (Figure 8.B). Chez les 41 isolats bactériens sélectionnés, des valeurs très variables ont été enregistrées, montrant une remarquable efficacité de solubilisation (Figure 9). Ces valeurs varient de 105,64 à 310,30%. La valeur la plus élevée a été observée chez l'isolat PSB45 (Tableau 4).



**Figure 8:** Solubilisation du phosphate par l'isolat PSB11 sur milieu PVK  
A : Sur milieu PVK, B : Sur milieu PVK additionné de BBP.



**Figure 9:** Efficacité de la solubilisation du phosphate des isolats bactériens.

### 2.1.2. Test de solubilisation en milieu liquide

Le dosage de phosphore total soluble libéré par chaque isolat bactérien a été réalisé en milieu NBRIP liquide. L'intensité de la couleur jaune indique la concentration de phosphore libéré par les isolats bactériens après addition de réactif de Barton aux surnageants. La quantité de phosphore libéré a été mesurée en utilisant la courbe d'étalonnage préparée avec des concentrations connues de phosphore soluble.

Les résultats obtenus ont montré que la capacité des isolats à solubiliser le phosphate est très variable. Globalement, elle varie de 24,29 à 738,57  $\mu\text{g/ml}$  de phosphore libre en utilisant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore (Annexe 7). Les bactéries ayant les plus fortes capacités à solubiliser le phosphate insolubles ont été sélectionnées, leur nombre étaient 41 bactéries. Ces dernières ont permis de libérer des quantités importantes de phosphore, allant de 327,50 à 738,57  $\mu\text{g/ml}$ . Parmi ces quarante un isolats, seize avaient une production entre 327,50 et 487,71  $\mu\text{g/ml}$  de phosphore libre. Le reste avait des quantités beaucoup plus élevées, variant entre 502,25 et 738,57  $\mu\text{g/ml}$ . L'isolat PSB91 s'est révélé le plus efficace en libérant 738,56  $\mu\text{g/ml}$  de phosphate dans le milieu suivi par l'isolat PSB8 et PSB18, avec une production de 652,83 et 642,49  $\mu\text{g/ml}$  de phosphore libre respectivement (Figure 10, Tableau 4).

La solubilisation du phosphate est souvent accompagnée d'une baisse de pH du milieu de culture. Des valeurs relativement basses du pH final des cultures bactériennes ont été enregistrées par rapport au pH initial (7,0). Ces valeurs de pH varient de 3,9 à 4,61. La valeur la plus basse (acide) a été observée chez l'isolat le plus efficace dans le test de solubilisation à savoir l'isolat PSB91.

Une corrélation négative hautement significative ( $r = -0,88$ ) a été observée entre la quantité de phosphore libéré et le pH final de la solubilisation du phosphate par les isolats bactériens étudiés.

L'étude de la corrélation entre la solubilisation du phosphate sur milieu PVK solide et en milieu NBRIP liquide est non significative ( $r = -0,19$ ). D'ailleurs, des isolats bactériens avaient une faible efficacité de solubilisation sur milieu solide alors qu'ils étaient plus performants en milieu liquide (Tableau 3).

**Tableau 3:** Corrélation entre les paramètres de solubilisation du phosphate.

Correlation	Coefficient de corrélation (r)
ES x P liquide	0,19 ns
Solubilisation du P x pH	-0,88**

ES: efficacité, ns: non significatif, \*\*: hautement significatif.

### 3. Identification phénotypique des isolats bactériens

Au total 104 bactéries solubilisant le phosphate ont été isolées du sol salin, présentant une diversité de taille de forme et de couleur des colonies sur la gélose nutritive. Parmi ces bactéries, la majorité (77,88%) s'est révélé des bactéries à coloration de Gram négatif alors que seulement 22,11% se sont montrés des bactéries à coloration positive, de formes bacilles coccobacilles et cocci (Annexe 7). Un criblage de ces isolats bactériens a été réalisé suivant leur activité de solubilisation du phosphate en milieu liquide et qui a abouti à une sélection de 41 bactéries qui ont été ensuite soumises à des examens macroscopiques et microscopiques et des tests biochimiques afin de compléter leur identification.

L'examen macroscopique des colonies sur la gélose nutritive a révélé une panoplie de caractéristiques à savoir, la couleur, la forme et le contour de ces colonies bactériennes. L'examen microscopique a permis de déterminer que les bactéries sont des bacilles (fins ou gros) et parfois des coccobacilles. La plupart des bactéries étudiées appartiennent au groupe des Gram négatif par contre, un nombre réduit appartient au groupe des bactéries à coloration de Gram positif. L'identification biochimique à l'aide des galeries API système a permis de ressortir six genres bactériens différents.

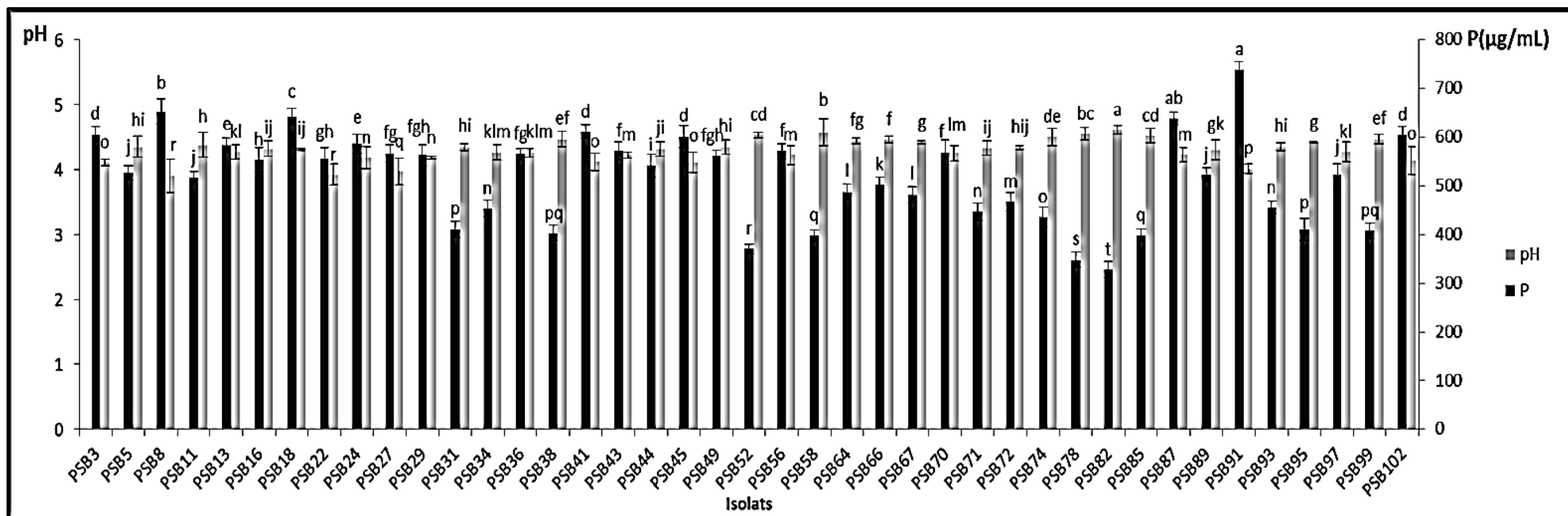


Figure 10: Taux de phosphore libre et pH final de la solubilisation par les isolats bactériens.

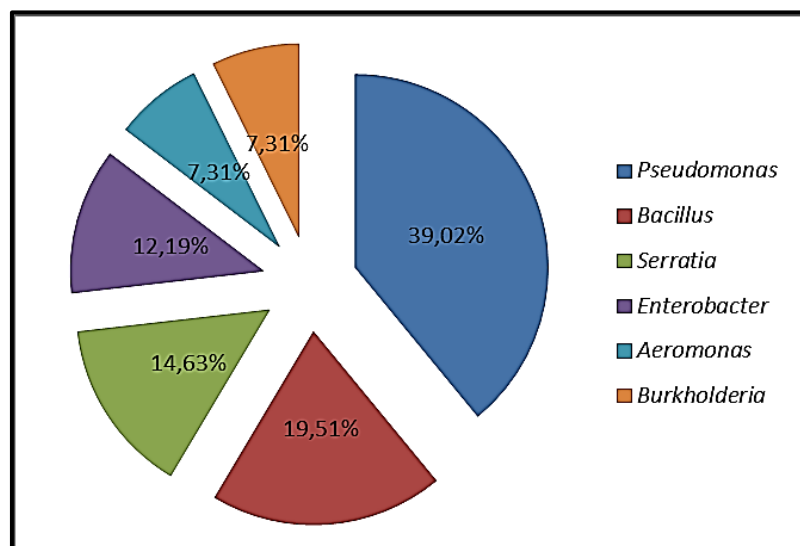
Tableau 4: Solubilisation du phosphate par les isolats bactériens.

Isolat	Efficacité de la solubilisation	Concentration de phosphore ( $\mu\text{g/ml}$ )	pH final de solubilisation
PSB3	234,50 $\pm$ 11,01 <sup>gh</sup>	605,34 $\pm$ 15,91 <sup>d</sup>	4,11 $\pm$ 0,05 <sup>o</sup>
PSB5	288,37 $\pm$ 14,76 <sup>c</sup>	525,60 $\pm$ 14,73 <sup>j</sup>	4,35 $\pm$ 0,16 <sup>hi</sup>
PSB8	167,32 $\pm$ 11,08 <sup>p</sup>	652,83 $\pm$ 25,28 <sup>b</sup>	3,90 $\pm$ 0,26 <sup>r</sup>
PSB11	125,63 $\pm$ 10,06 <sup>w</sup>	515,90 $\pm$ 12,78 <sup>j</sup>	4,38 $\pm$ 0,19 <sup>h</sup>
PSB13	155,07 $\pm$ 12,52 <sup>qr</sup>	584,17 $\pm$ 13,78 <sup>e</sup>	4,27 $\pm$ 0,11 <sup>kl</sup>
PSB16	246,00 $\pm$ 9,11 <sup>f</sup>	553,62 $\pm$ 24,17 <sup>h</sup>	4,32 $\pm$ 0,12 <sup>ij</sup>
PSB18	198,52 $\pm$ 10,07 <sup>l</sup>	642,49 $\pm$ 22,74 <sup>c</sup>	4,31 $\pm$ 0,01 <sup>ij</sup>
PSB22	126,18 $\pm$ 11,22 <sup>w</sup>	555,86 $\pm$ 16,60 <sup>gh</sup>	3,92 $\pm$ 0,16 <sup>r</sup>
PSB24	267,55 $\pm$ 8,06 <sup>d</sup>	587,05 $\pm$ 19,65 <sup>e</sup>	4,18 $\pm$ 0,17 <sup>n</sup>
PSB27	156,59 $\pm$ 11,11 <sup>q</sup>	566,17 $\pm$ 17,14 <sup>fg</sup>	3,97 $\pm$ 0,2 <sup>q</sup>
PSB29	115,13 $\pm$ 11,32 <sup>x</sup>	562,90 $\pm$ 21,92 <sup>fgh</sup>	4,18 $\pm$ 0,02 <sup>n</sup>
PSB31	167,21 $\pm$ 11,46 <sup>p</sup>	410,89 $\pm$ 16,62 <sup>p</sup>	4,35 $\pm$ 0,05 <sup>hi</sup>
PSB34	145,81 $\pm$ 10,88 <sup>st</sup>	453,28 $\pm$ 16,95 <sup>n</sup>	4,26 $\pm$ 0,12 <sup>klm</sup>
PSB36	233,27 $\pm$ 10,09 <sup>h</sup>	564,74 $\pm$ 11,5f <sup>g</sup>	4,26 $\pm$ 0,07 <sup>klm</sup>
PSB38	165,58 $\pm$ 5,6 <sup>p</sup>	402,58 $\pm$ 15,71 <sup>pq</sup>	4,47 $\pm$ 0,12 <sup>ef</sup>
PSB41	255,01 $\pm$ 11,48 <sup>e</sup>	610,96 $\pm$ 13,87 <sup>d</sup>	4,12 $\pm$ 0,13 <sup>o</sup>
PSB43	204,48 $\pm$ 8,06 <sup>k</sup>	571,22 $\pm$ 18,70 <sup>f</sup>	4,22 $\pm$ 0,04 <sup>m</sup>
PSB44	135,02 $\pm$ 12,7 <sup>u</sup>	541,59 $\pm$ 23,67 <sup>i</sup>	4,32 $\pm$ 0,11 <sup>ij</sup>
PSB45	310,30 $\pm$ 12,99 <sup>a</sup>	601,85 $\pm$ 22,60 <sup>d</sup>	4,11 $\pm$ 0,15 <sup>o</sup>
PSB49	105,64 $\pm$ 11,54 <sup>y</sup>	561,33 $\pm$ 12,03 <sup>fgh</sup>	4,35 $\pm$ 0,11 <sup>hi</sup>
PSB52	125,15 $\pm$ 10,35 <sup>w</sup>	370,04 $\pm$ 10,61 <sup>r</sup>	4,53 $\pm$ 0,05 <sup>cd</sup>
PSB56	128,96 $\pm$ 10,8 <sup>v</sup>	570,63 $\pm$ 16,51 <sup>f</sup>	4,22 $\pm$ 0,15 <sup>m</sup>
PSB58	188,32 $\pm$ 11,08 <sup>m</sup>	398,00 $\pm$ 11,76 <sup>q</sup>	4,57 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
PSB64	176,31 $\pm$ 10,98 <sup>o</sup>	487,71 $\pm$ 15,35 <sup>l</sup>	4,44 $\pm$ 0,04 <sup>fg</sup>
PSB66	217,48 $\pm$ 12,14 <sup>i</sup>	502,25 $\pm$ 14,83 <sup>k</sup>	4,46 $\pm$ 0,05 <sup>f</sup>
PSB67	146,92 $\pm$ 12,19 <sup>s</sup>	481,71 $\pm$ 16,49 <sup>l</sup>	4,42 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>
PSB70	199,33 $\pm$ 11,09 <sup>l</sup>	568,05 $\pm$ 25,89 <sup>f</sup>	4,25 $\pm$ 0,12 <sup>lm</sup>
PSB71	143,33 $\pm$ 11,88 <sup>t</sup>	447,20 $\pm$ 17,94 <sup>n</sup>	4,33 $\pm$ 0,13 <sup>ij</sup>
PSB72	303,73 $\pm$ 13,49 <sup>b</sup>	466,94 $\pm$ 18,60 <sup>m</sup>	4,34 $\pm$ 0,03 <sup>hij</sup>
PSB74	218,13 $\pm$ 10,49 <sup>i</sup>	435,52 $\pm$ 20,87 <sup>o</sup>	4,50 $\pm$ 0,13 <sup>de</sup>
PSB78	129,35 $\pm$ 11,07 <sup>v</sup>	348,05 $\pm$ 15,24 <sup>s</sup>	4,55 $\pm$ 0,09 <sup>bc</sup>
PSB82	167,75 $\pm$ 9,56 <sup>p</sup>	327,50 $\pm$ 16,50 <sup>t</sup>	4,61 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
PSB85	210,43 $\pm$ 10,09 <sup>j</sup>	398,70 $\pm$ 12,42 <sup>q</sup>	4,52 $\pm$ 0,11 <sup>cd</sup>
PSB87	303,74 $\pm$ 14,23 <sup>b</sup>	638,37 $\pm$ 12,70 <sup>ab</sup>	4,23 $\pm$ 0,11 <sup>lm</sup>
PSB89	154,28 $\pm$ 9,94 <sup>qr</sup>	521,9 $\pm$ 14,66 <sup>j</sup>	4,30 $\pm$ 0,15 <sup>jk</sup>
PSB91	211,74 $\pm$ 13,54 <sup>j</sup>	738,56 $\pm$ 16,07 <sup>a</sup>	4,01 $\pm$ 0,07 <sup>p</sup>
PSB93	156,26 $\pm$ 11,03 <sup>q</sup>	455,13 $\pm$ 13,18 <sup>n</sup>	4,35 $\pm$ 0,06 <sup>hi</sup>
PSB95	185,01 $\pm$ 11,88 <sup>n</sup>	410,35 $\pm$ 22,16 <sup>p</sup>	4,42 $\pm$ 0,01 <sup>g</sup>
PSB97	236,69 $\pm$ 10,61 <sup>g</sup>	521,77 $\pm$ 23,66 <sup>j</sup>	4,27 $\pm$ 0,16 <sup>kl</sup>
PSB99	152,71 $\pm$ 9,66 <sup>t</sup>	407,67 $\pm$ 15,57 <sup>pq</sup>	4,47 $\pm$ 0,07 <sup>ef</sup>
PSB102	116,52 $\pm$ 10,22 <sup>x</sup>	604,37 $\pm$ 17,85 <sup>d</sup>	4,14 $\pm$ 0,21 <sup>o</sup>

Valeurs: moyenne $\pm$  écart type, abc...: groupes homogènes indiquant des valeurs statistiquement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $p \leq 0,05$ .

La couleur des différentes colonies bactériennes varie entre le rouge, le jaune et le beige à blanchâtre tandis que leur forme était parfois ronde, ovale ou irrégulière avec un contour régulier ou irrégulier. La surface des colonies bactériennes était soit lisse, rugueuses ou mucoides.

Un total de quarante un (41) bactéries solubilisant le phosphate a été identifié par des tests biochimiques. Les bactéries les plus dominantes ont été identifiées comme appartenant au genre *Pseudomonas* avec 39,02% et qui sont réparties en deux espèces : *Pseudomonas luteola* et *Pseudomonas fluorescens*; suivie par des isolats à coloration de Gram positif sporulés identifiées comme *Bacillus* sp. (19,51%). D'autres isolats bactériens appartenant au groupe des entérobactéries sont répartis en deux genres *Serratia* sp. (14,63%) et *Enterobacter* sp. (12,19%). Enfin, un dernier groupe correspondant aux deux espèces : *Aeromonas hydrophila* et *Burkholderia cepacia* avec une fréquence de 7,31% (Figure 11, Tableau 5).



**Figure 11:** Répartition de différents genres identifiés dans l'ensemble de bactéries isolées.

Tableau 5: Identification phénotypique des bactéries sélectionnées.

Isolat	Gram	Forme	Mobilité	Catalase	Oxydase	Amylase	Identification (API)
PSB3	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB5	+	bacille	+	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB8	+	bacille	+	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB11	-	coccobacille	+	+	-	-	<i>P. luteola</i>
PSB13	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. fluorescens</i>
PSB16	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB18	-	bacille	+	+	-	-	<i>Enterobacter</i> sp.
PSB22	-	bacille	+	+	+	+	<i>B. cepacia</i>
PSB24	+	bacille	+	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB27	+	bacille	+	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB29	-	coccobacille	+	+	+	-	<i>Serratia</i> sp.
PSB31	+	bacille	+	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB34	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB36	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB38	+	bacille	+	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB41	-	bacille	+	+	+	+	<i>Serratia</i> sp.
PSB43	-	bacille	+	+	+	-	<i>Enterobacter</i> sp.
PSB44	-	coccobacille	+	+	+	-	<i>A. hydrophila</i>
PSB45	-	bacille	+	+	-	+	<i>Enterobacter</i> sp.
PSB49	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB52	-	bacille	+	+	+	+	<i>Serratia</i> sp.
PSB56	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB58	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB64	-	bacille	+	+	-	+	<i>B. cepacia</i>
PSB66	-	bacille	+	+	+	+	<i>P. fluorescens</i>
PSB67	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB70	+	bacille	+	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB71	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB72	-	coccobacille	+	+	+	-	<i>Serratia</i> sp.
PSB74	-	bacille	+	+	+	+	<i>B. cepacia</i>
PSB78	-	bacille	+	+	+	-	<i>Serratia</i> sp.
PSB82	-	bacille	+	+	+	-	<i>Enterobacter</i> sp.
PSB85	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB87	-	bacille	+	+	+	+	<i>Serratia</i> sp.
PSB89	-	coccobacille	+	+	+	-	<i>A. hydrophila</i>
PSB91	+	bacille	+	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
PSB93	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB95	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. fluorescens</i>
PSB97	-	bacille	+	+	+	-	<i>Enterobacter</i> sp.
PSB99	-	coccobacille	+	+	+	-	<i>A. hydrophila</i>
PSB102	-	bacille	+	+	-	+	<i>P. luteola</i>

+ : test positif , - : test négatif, *P* : *Pseudomonas*, *A* : *Aeromonas*, *B* : *Burkholderia*.

Les bactéries identifiées comme étant des espèces appartenant au genre *Pseudomonas* avoisinent le nombre 16 dont, 13 appartenant à l'espèce *P. luteola*, les 3 autres appartenant à *P. fluorescens*. Les colonies de ce genre bactérien sont de forme ronde avec une surface lisse et contour régulier (Figure 12), elles sont pigmentées en jaune et orange sur gélose nutritive et à pigment fluorescent sur milieu King B (Annexe 2) chez *P. fluorescens*. Ces bactéries sont des bâtonnets fins droits à coloration de Gram négative, très mobiles possédant la catalase et l'oxydase.

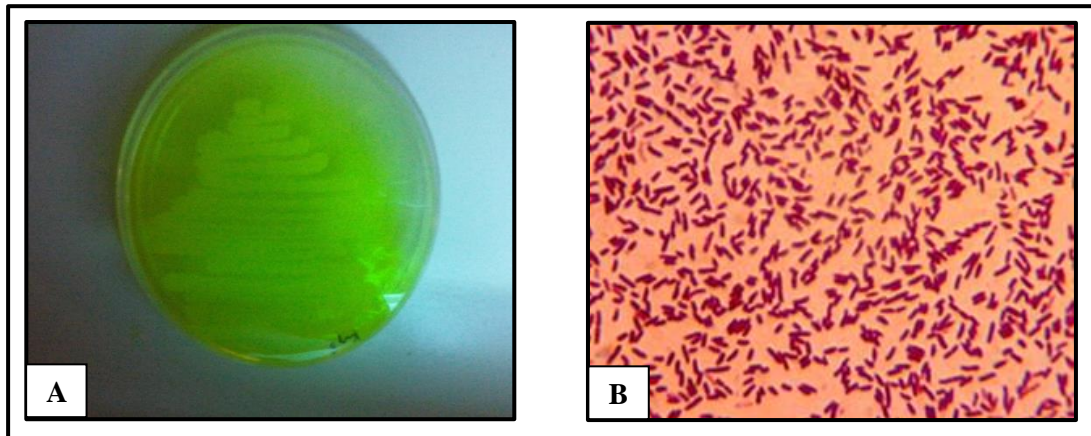
Sept bactéries solubilisant le phosphate ont été identifiées comme *Bacillus* sp. produisant des colonies blanches de formes ovales et parfois rondes avec une surface rugueuse et certaines sont lisses avec un contour irrégulier sur gélose nutritif. Ce sont de gros bacilles à bout arrondis sporulés à coloration de Gram positif et mobiles (Figure 13). Elles possèdent la catalase et l'oxydase.

Les bactéries appartenant au groupe des entérobactéries sont au nombre de dix, dont six ont été identifiées comme *Serratia* sp., le reste sont des *Enterobacter*. Les colonies bactériennes du genre *Serratia* sp. sont pigmentées en rouge (Figure 14) ou de couleur beige, de formes rondes ou irrégulières translucide et mucoides avec une surface lisse. Les bactéries identifiées comme *Serratia* sont des bâtonnets à coloration de Gram négatif, mobiles avec catalase positive et oxydase négatif.

Quatre entérobactéries isolées ont été identifiées comme *Enterobacter* présentant des colonies beige jaunâtres de formes rondes avec un contour régulier et une surface lisse et translucide sur milieu solide. Ces bactéries sont des batonnets à coloration de Gram négatif, mobiles, possédant une catalase et dépourvu d'oxydase (Figure 15).

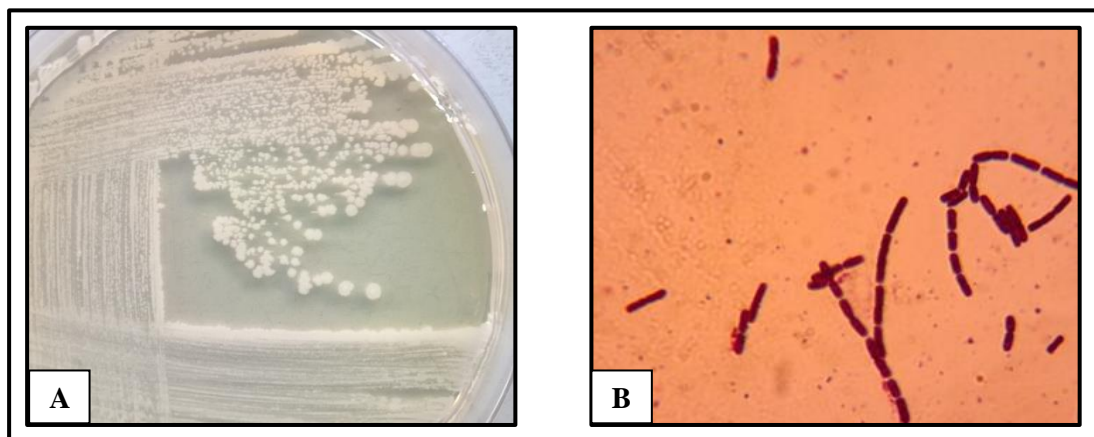
En revanche, seulement trois bactéries isolées du sol salin ont été identifiées comme *Aeromonas hydrophila*. Les colonies appartenant à ce genre sont de couleurs grisâtres, lisses, convexes et arrondies. Ce sont des bacilles et des coccobacilles droits apparaissant seules ou par paires à coloration de Gram négatif mobiles, avec catalase et oxydase positives (Figure 16).

Enfin, seulement trois bactéries ont été identifiées au cours de ce travail appartenant à l'espèce *Burkholderia cepacia*. Leurs colonies présentent une couleur beige, de formes rondes, lisses et un peu élevées. L'examen microscopique de ces bactéries a montré que ces dernières ont des formes bâtonnets, mobiles, à coloration de Gram négatif avec une catalase positive et une oxydase positive (Figure 17).



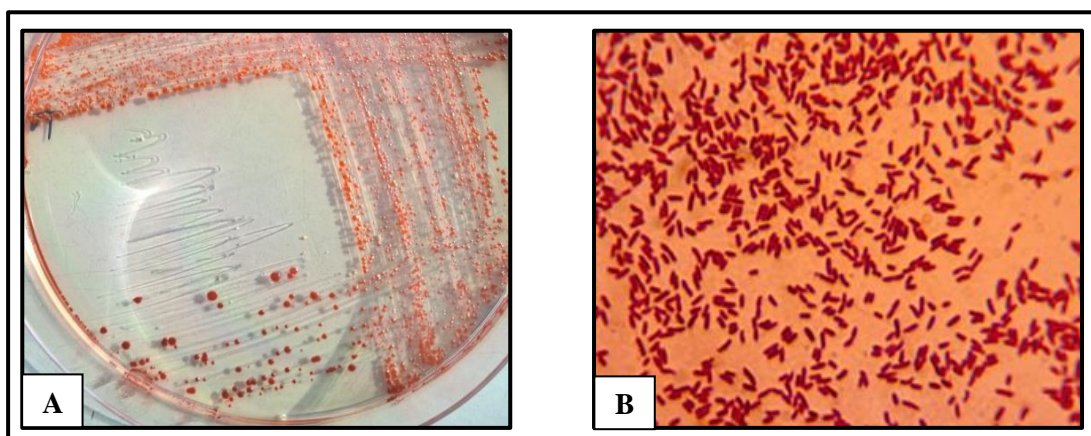
**Figure 12:** Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB13 (*P. fluorescens*).

**A:** Fluorescence sur milieu King B, **B:** Observation microscopique après coloration de Gram (G×1000).



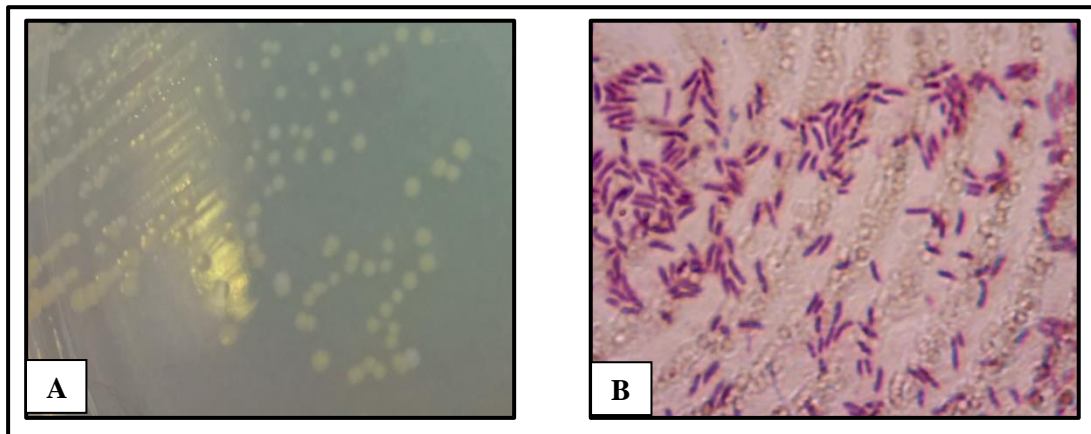
**Figure 13:** Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB91 (*Bacillus* sp.).

**A:** Examen macroscopique sur GN, **B :** Observation microscopique après coloration de Gram (G×1000).

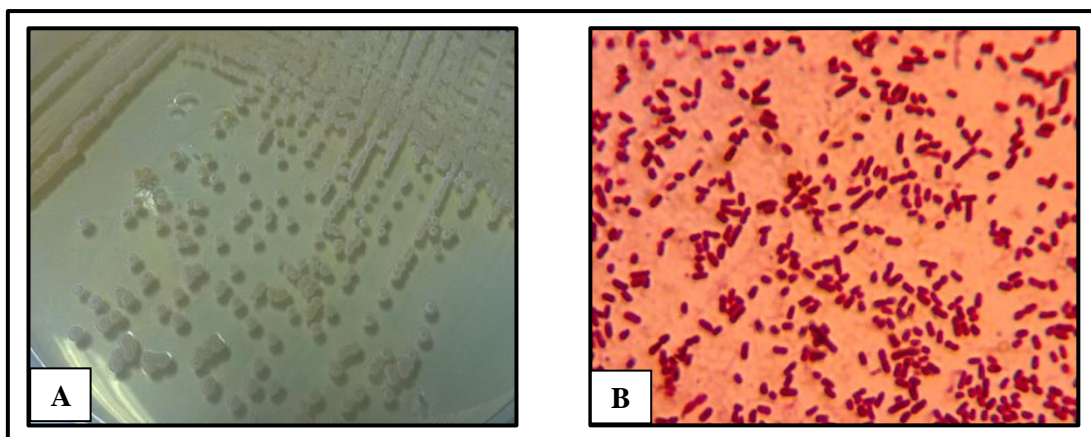


**Figure 14:** Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB87 (*Serratia* sp.).

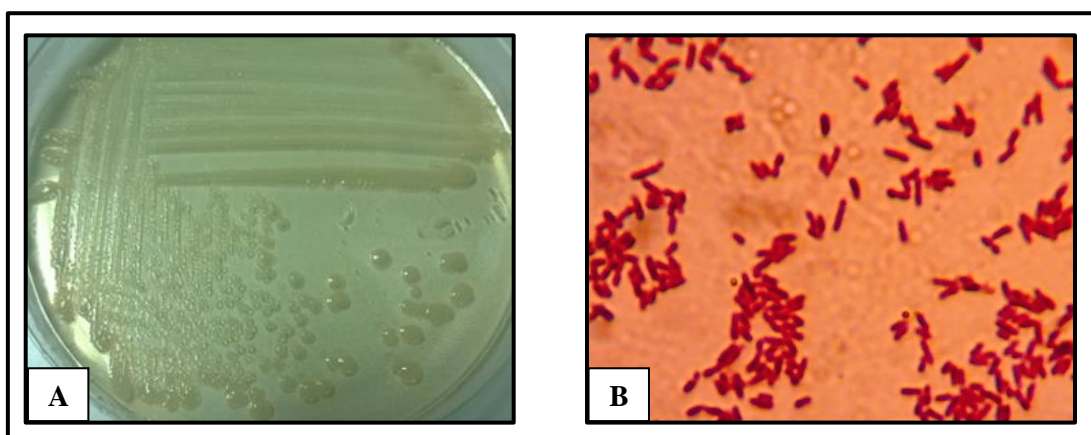
**A:** Examen macroscopique sur GN, **B :** Observation microscopique après coloration de Gram (G×1000).



**Figure 15:** Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB18 (*Enterobacter* sp.).  
**A:** Examen macroscopique sur GN, **B:** Observation microscopique après coloration de Gram (G×1000).



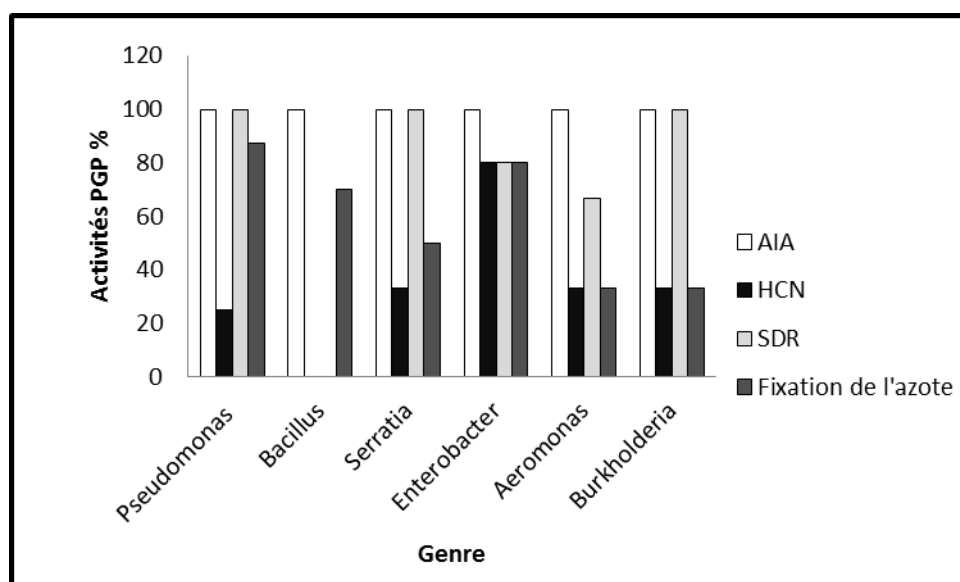
**Figure 16:** Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB99 (*A. hydrophila*).  
**A:** Examen macroscopique sur GN, **B:** Observation microscopique après coloration de Gram (G×1000).



**Figure 17:** Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat PSB74 (*B. cepacia*).  
**A:** Examen macroscopique sur GN, **B:** Observation microscopique après coloration de Gram (G×1000).

#### 4. Evaluation des activités PGP des isolats bactériens

Les bactéries solubilisant le phosphate sélectionnées ont été soumises à une caractérisation physiologique suivant les paramètres liés à la promotion de la croissance des plantes. Un effet significatif de l'inoculation par les isolats bactériens sur la production des activités PGP a été enregistré (Annexe 8). Les résultats présentés dans la figure 18 ont montré que tous les isolats bactériens appartenant aux différents genres avaient la capacité de produire l'auxine AIA. Concernant la production de l'HCN, les isolats appartenant au genre *Enterobacter* se sont montrés les meilleurs producteurs de cette substance avec 80% suivi par les genres *Serratia*, *Aeromonas* et *Burkholderia* (33%) et *Pseudomonas* avec 25% à l'exception du genre *Bacillus* qui n'a enregistré aucune production (0%). Par ailleurs, tous les isolats appartenant au genre *Pseudomonas*, *Burkholderia* et *Serratia* ont été capables de produire les sidérophores, les genres d'*Enterobacter* et d'*Aeromonas* ont produit les sidérophores avec des taux de 80% et 66,66 % respectivement. Par contre, les espèces du genre *Bacillus* n'avaient pas cette activité. Il est à signaler que la plupart des isolats appartenant au genre *Pseudomonas* et *Enterobacter* ont été capables de fixer l'azote atmosphérique avec 87,5% et 80% respectivement, suivi par *Bacillus* et *Serratia* avec 70% et 50% respectivement. Tandis que les genres *Aeromonas* et *Burkholderia* se sont montrés avec un pourcentage similaire avoisinant 33,33%.

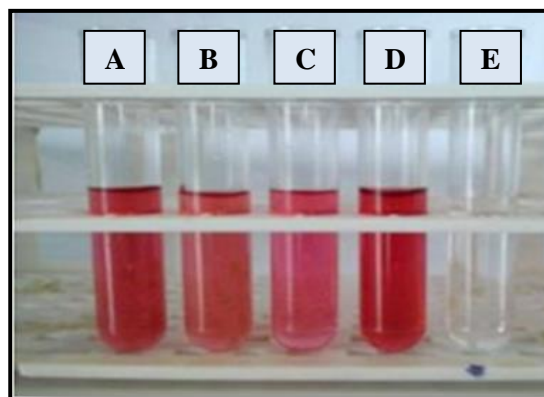


**Figure 18:** Fréquence des activités PGP de différents genres identifiés.

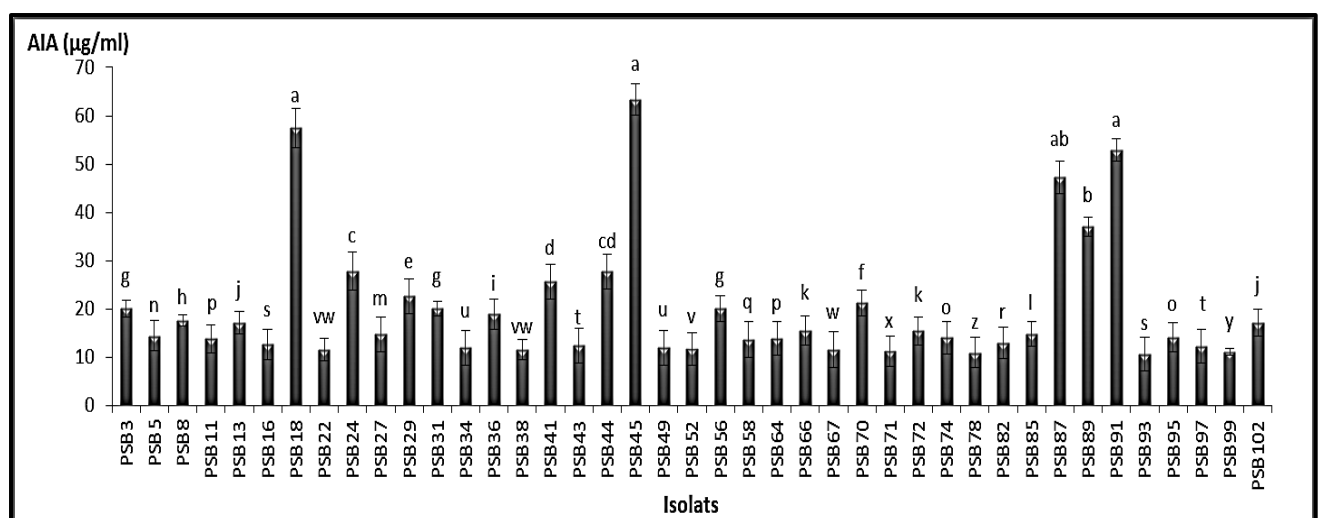
**AIA:** Acide indole acétique. **HCN:** Acide cyanhydrique. **SDR:** Sidérophores.

#### 4.1. Production de l'acide indole acétique (AIA)

Les isolats bactériens solubilisant le phosphate ont été testés pour leurs capacités à produire de l'AIA en présence de son précurseur le D-tryptophane. L'intensité de la couleur rose indique la concentration de l'AIA libéré par les isolats bactériens après addition de réactif de Salkowski aux surnageants (Figure 19). Les résultats obtenus ont montré que les quantités de l'AIA produites par les isolats bactériens sont très éloignées et varient de 10,77 à 63,35  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 20). Des quantités relativement élevées de l'AIA ont été enregistrées chez l'isolat PSB45, suivie par PSB18 et PSB91 avec une production de 63,35, 57,43 et 52,85  $\mu\text{g/ml}$  respectivement (Tableau 6).



**Figure 19:** Production de l'AIA par les isolats bactériens.  
A: PSB87, B: PSB24, C: PSB72, D: PSB91, E: Témoin.



**Figure 20:** Taux de l'AIA produit par les isolats bactériens.

#### 4.2. Fixation de l'azote

Les isolats solubilisant le phosphate ont été également testés pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en utilisant le milieu NF-MM solide contenant le BBT comme indicateur coloré pour montrer la présence de l'ammonium libéré dans le milieu de culture. Les résultats obtenus ont montré que parmi les 41 isolats bactériens testés, 31 étaient capables de fixer l'azote en changeant la couleur verte du milieu en bleue (Figure 21.C). Le diamètre de la zone bleue entourant les colonies bactériennes varie entre 7 et 26 mm (Tableau 6). La valeur du diamètre de la zone colorée la plus élevée a été observée en présence de l'isolat PSB41.

#### 4.3. Production de sidérophores

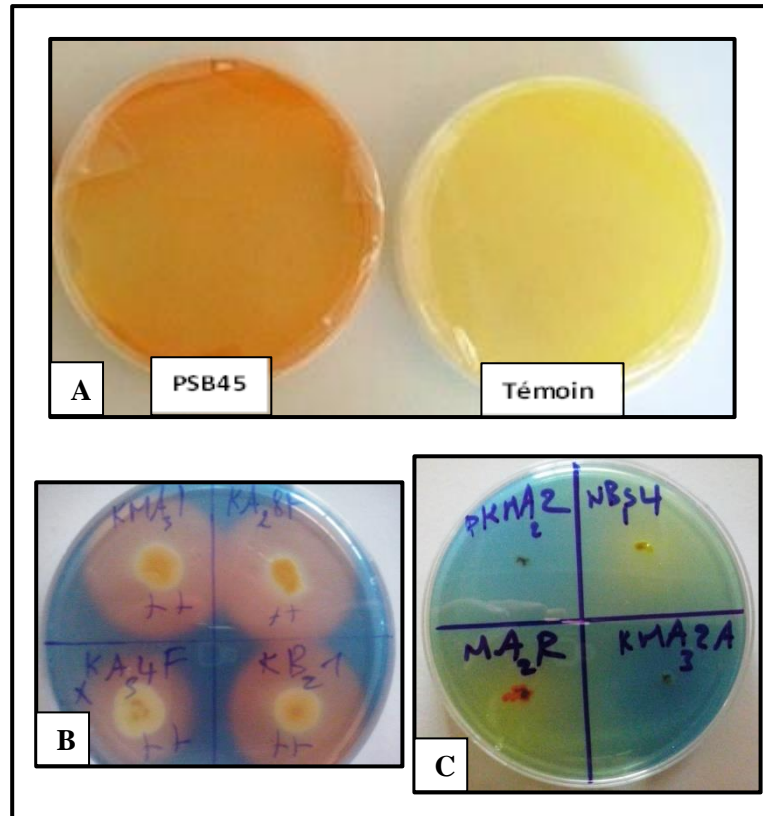
La capacité des isolats bactériens à produire les sidérophores a été testée sur milieu chrome azurol S (CAS) par le développement de la couleur bleu du milieu vers l'orange avec une production d'un halo autour des colonies bactériennes. Les résultats ont montré que parmi les 41 isolats testés, 32 bactéries ont été capables de produire les sidérophores. Cette capacité a été évaluée en fonction du diamètre de l'halo orange autour des colonies bactériennes (Figure 21.B). Selon Dimkpa *et al.*, (2008), la capacité de production des sidérophores est classée en trois catégories. La première catégorie décrite comme faible (diamètre : 4-10 mm), la deuxième comme modérée (11-20 mm) et la troisième comme forte (supérieur à 21 mm). Parmi les isolats producteurs de sidérophores, 18 isolats ont une faible production, 10 se sont révélés moyennement producteurs et 4 isolats ayant une forte production de sidérophores (Tableau 6).

#### 4.4. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La mise en évidence de la production de l'acide cyanhydrique a été testée sur les 41 isolats. Les résultats illustrés par la figure 21.A ont montré que seulement 12 isolats se sont révélés comme producteurs d'acide cyanhydrique par le changement de la couleur jaune vers la couleur orange (Tableau 6).

#### 4.5. Production de l'ammoniac

Les bactéries solubilisant le phosphate isolées du sol salin ont été testées pour la production de l'ammoniac par la méthode décrite par Cappuccino et Sherman (1992). Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats se sont révélés producteurs de l'ammoniac par le développement de la couleur marron (Tableau 6).



**Figure 21:** Activités PGP des isolats bactériens.

A: Production de l'HCN, B: Production des sidérophores, C: Fixation d'azote.

Tableau 6: Activités PGP des isolats bactériens.

Isolat	Concentration de l'AIA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Diamètre de fixation d'azote	SDR	HCN	Ammoniac
PSB3	20,05 $\pm$ 2,83 <sup>g</sup>	19	+++	+	+
PSB5	14,37 $\pm$ 3,15 <sup>n</sup>	16	+	-	+
PSB8	17,54 $\pm$ 2,10 <sup>h</sup>	21	++	-	+
PSB11	13,80 $\pm$ 1,63 <sup>p</sup>	11	+	-	+
PSB13	17,12 $\pm$ 3,03 <sup>j</sup>	13	++	-	+
PSB16	12,62 $\pm$ 3,16 <sup>s</sup>	13	+	-	+
PSB18	57,43 $\pm$ 2,57 <sup>a</sup>	15	++	-	+
PSB22	11,57 $\pm$ 2,36 <sup>vw</sup>	7	+	-	+
PSB24	27,81 $\pm$ 3,69 <sup>c</sup>	16	++	-	+
PSB27	14,74 $\pm$ 2,05 <sup>m</sup>	12	+	-	+
PSB29	22,60 $\pm$ 3,84 <sup>e</sup>	11	+++	+	+
PSB31	20,07 $\pm$ 1,45 <sup>g</sup>	0	-	-	+
PSB34	11,91 $\pm$ 3,65 <sup>u</sup>	10	-	-	+
PSB36	18,90 $\pm$ 3,05 <sup>i</sup>	22	+	+	+
PSB38	11,56 $\pm$ 3,57 <sup>vw</sup>	0	-	-	+
PSB41	25,67 $\pm$ 3,55 <sup>d</sup>	26	++	-	+
PSB43	12,36 $\pm$ 3,69 <sup>t</sup>	25	+++	+	+
PSB44	27,73 $\pm$ 3,54 <sup>cd</sup>	11	+	+	+
PSB45	63,35 $\pm$ 3,28 <sup>a</sup>	22	++	+	+
PSB49	11,95 $\pm$ 3,54 <sup>u</sup>	14	+	-	+
PSB52	11,66 $\pm$ 3,45 <sup>v</sup>	0	-	-	+
PSB56	20,05 $\pm$ 3,11 <sup>g</sup>	21	+	-	+
PSB58	13,60 $\pm$ 3,67 <sup>q</sup>	0	+	-	+
PSB64	13,84 $\pm$ 3,54 <sup>p</sup>	18	+	-	+
PSB66	15,49 $\pm$ 3,05 <sup>k</sup>	17	++	+	+
PSB67	11,48 $\pm$ 3,94 <sup>w</sup>	10	+	-	+
PSB70	21,21 $\pm$ 3,76 <sup>f</sup>	16	++	-	+
PSB71	11,22 $\pm$ 2,66 <sup>x</sup>	17	-	-	+
PSB72	15,45 $\pm$ 3,84 <sup>k</sup>	0	+	-	+
PSB74	14,02 $\pm$ 3,58 <sup>o</sup>	18	+	+	+
PSB78	10,90 $\pm$ 3,67 <sup>z</sup>	0	+	+	+
PSB82	12,95 $\pm$ 4,64 <sup>r</sup>	0	-	+	+
PSB85	14,84 $\pm$ 1,12 <sup>l</sup>	0	-	-	+
PSB87	47,26 $\pm$ 3,38 <sup>ab</sup>	18	+++	-	+
PSB89	37,10 $\pm$ 1,99 <sup>b</sup>	0	++	-	+
PSB91	52,85 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>	22	-	-	+
PSB93	12,64 $\pm$ 2,76 <sup>s</sup>	7	+	-	+
PSB95	14,09 $\pm$ 2,35 <sup>o</sup>	9	-	+	+
PSB97	12,31 $\pm$ 3,54 <sup>t</sup>	0	++	+	+
PSB99	11,05 $\pm$ 0,69 <sup>y</sup>	13	-	-	+
PSB102	17,08 $\pm$ 3,56 <sup>j</sup>	14	+	-	+

**Valeurs** : moyenne $\pm$  écart type, **abc...**: groupes homogènes indiquant des valeurs statistiquement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $p \leq 0,05$ , **SDR**: sidérophores, - : négatif, + : positif, ++ : moyennement positif, +++ : fortement positif.

## 5. Caractérisation des isolats sélectionnés

Les isolats bactériens les plus performants ayant un maximum de caractères PGP (Plant Growth Promotion) ont été sélectionnés pour une caractérisation plus précise. D'ailleurs, ces isolats vont servir pour constituer l'inoculum bactérien, qui sera ensuite inoculer à des grains de blé.

### 5.1. Sélection des isolats par Analyse en composante principales (ACP)

Les différents tests réalisés dans cette partie ont permis d'atteindre certains objectifs fixés et dans le but d'une sélection rigoureuse des isolats bactériens les plus performants, une analyse en composantes principales a été effectuée, pour comparer certaines activités PGP révélées par les différents isolats. L'ACP des 4 activités PGP (solubilisation du phosphate, production de l'AIA et sidérophores et fixation d'azote) exercées par les isolats formule plusieurs constatations :

- Selon la première composante principale (facteur 1), une variabilité de 61% a été enregistrée, dont les quatre paramètres: solubilisation du phosphate, production des sidérophores, fixation d'azote et production d'AIA sont bien représentés, avec des coordonnées dans le cercle de corrélation de 0,91, 0,78, 0,72 et 0,70 respectivement (Annexe 9).
- Selon la deuxième composante principale (facteur 2), une variabilité de 17% a été enregistrée, dans laquelle le seul paramètre AIA est représenté, avec la coordonnée dans le cercle de corrélation de 0,70 (Annexe 9).

L'étude des corrélations entre les paramètres par le test de Pearson a révélé une corrélation significative entre tous des paramètres étudiés (Tableau 7).

Concernant le comportement des isolats vis-à-vis les activités testées, 3 groupes majeurs distincts ressortent:

- Le premier groupe comporte les isolats ayant le maximum de différentes activités comparés, ce groupe comprend les isolats : PSB18, PSB45 et PSB91, ils sont bien représentés sur le premier et le deuxième facteur.
- Le second groupe comporte les isolats bactériens exclusivement produisant les sidérophores, solubilisant le phosphate et ayant une capacité à fixer l'azote, ils sont bien représentés sur le premier facteur. Ce groupe comporte les isolats : PSB41 et PSB81.

- Enfin, le dernier groupe, situé à l’opposé des axes des activités, comporte des bactéries ayant un profil variable majoritairement faible (Figure 22).

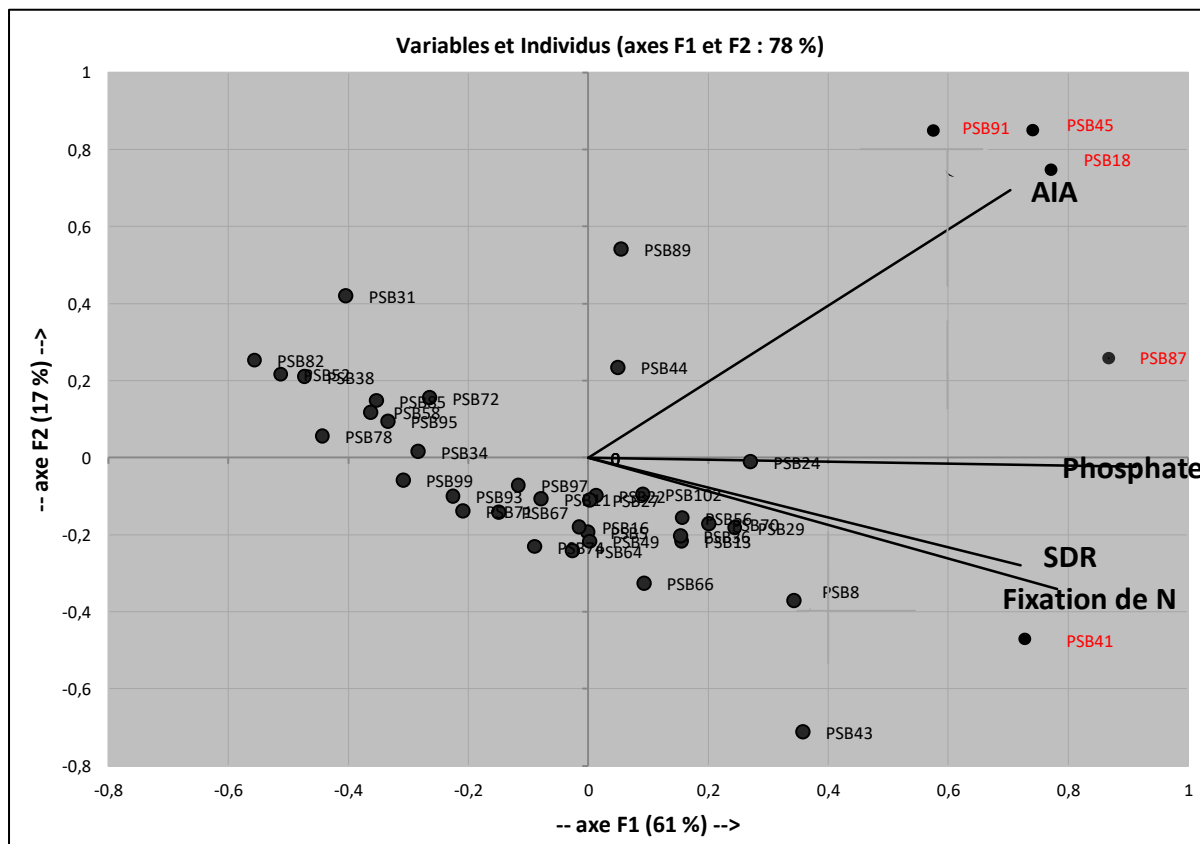
En conclusion les isolats bactériens ayant une performance pour la plupart des activités PGP qui font partie du premier et du deuxième groupe ont été sélectionnés (PSB18, PSB41, PSB45, PSB87, PB91).

**Tableau 7:** Corrélation entre les variables de l’ACP (test de Pearson).

	Solubilisation du phosphate	Fixation d’azote	SDR	AIA
Solubilisation du phosphate	1	0,68*	0,56*	0,57*
Fixation d’azote	0,68*	1	0,39*	0,34*
SDR	0,56*	0,39*	1	0,34*
AIA	0,57*	0,34*	0,34*	1

SDR: sidérophores.

\*: valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha=0,05 (test bilatéral).

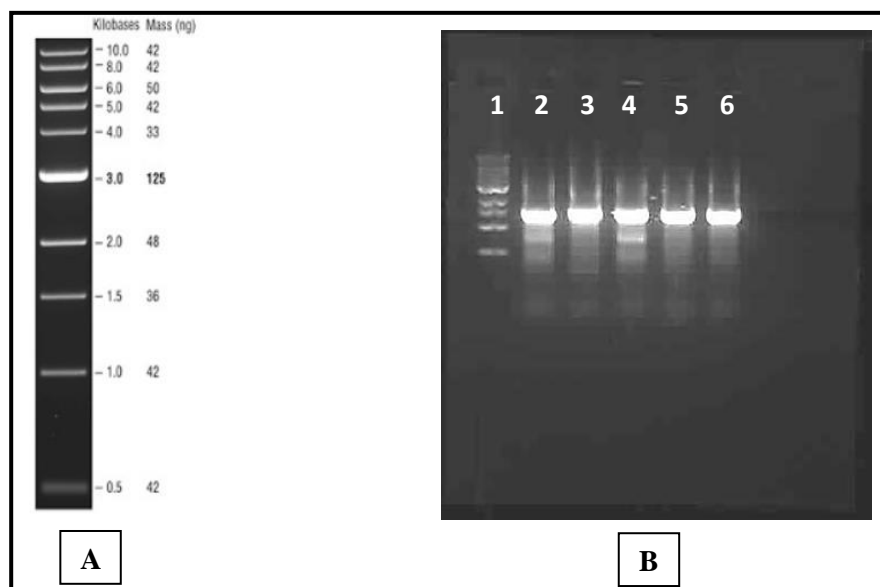


**Figure 22:** ACP des activités PGP générées par les isolats bactériens.

## 5.2. Caractérisation génotypique des isolats bactériens

Les tests d'identification classique basés sur la morphologie et sur des essais biochimiques et physiologiques ne donnent pas souvent de résultats précis et fiable pour la détermination précise des espèces bactériennes. Ces dernières années, plusieurs techniques moléculaires d'analyses de fragments d'ADN sont utilisées avec succès sur différents microorganismes.

Toutes ces techniques sont basées sur une amplification par PCR d'une région précise de l'ADN (par exemple les gènes du RNAr 16S) des microorganismes. Le mélange de fragments de produits PCR est ensuite séparés sur agarose par électrophorèse (Figure 23). Après séquençage les séquences de l'ADNr 16S obtenus sont comparées à celle de la banque de données de NCBI (National Center of Biotechnology and Information) grâce au programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) afin de déterminer les séquences connues les plus proches et leurs affiliation phylogénétique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité des bactéries à identifier avec les souches les plus proches. A l'aide de ces résultats, un arbre phylogénétique est conçu pour déterminer la position taxonomique de chaque isolat analysé.



**Figure 23:** Electrophorèse sur gel d'agarose pour l'amplification de l'ADNr 16S des isolats bactériens.

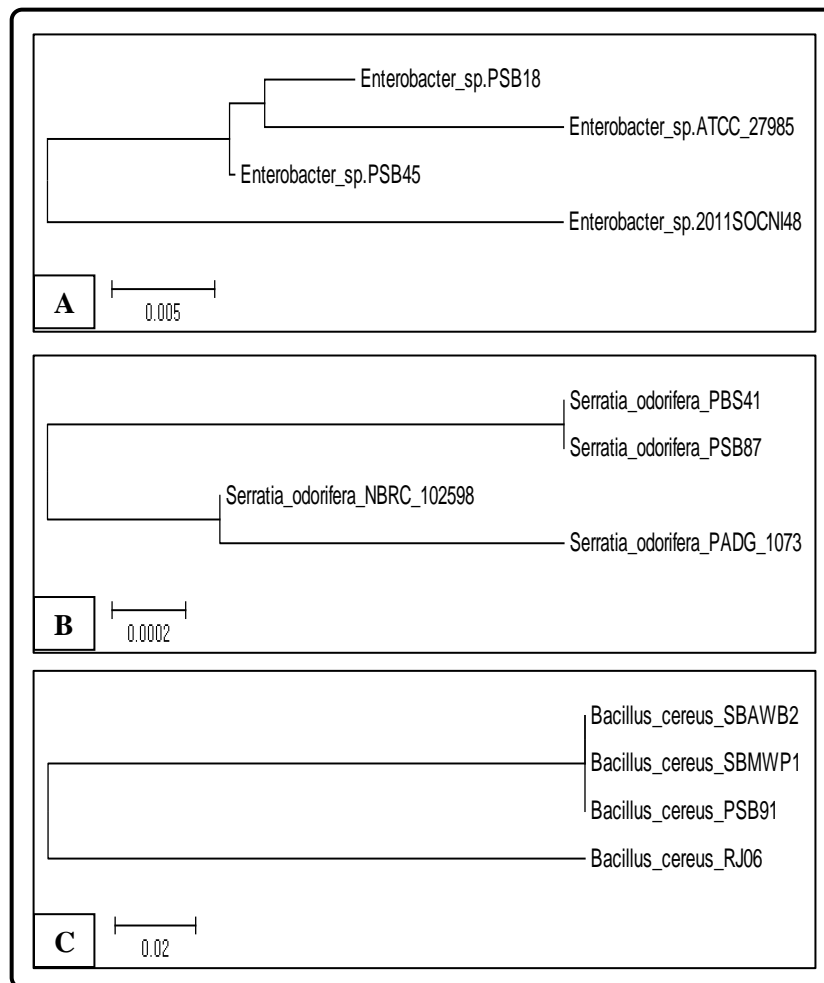
**A:** Référence Marqueur, **B:** Les fragments de l'ADNr 16S des isolats bactériens ; **1 :** Marqueur, **2:** L'isolat PSB18, **3:** L'isolat PSB41, **4:** L'isolat PSB45, **5:** L'isolat PSB87, **6:** L'isolat PSB91.

Cinq isolats de notre collection bactérienne ont fait l'objet de cette étude. Ces isolats ont été caractérisés après une extraction de l'ADN et une amplification du gène de l'ARNr 16S de chaque isolat. Les séquences ayant une taille comprise entre 1145 et 1256 paires de bases ont été soumissionnées à GenBank puis alignées et comparées avec les séquences des bactéries contenues dans les bases de données génomiques.

Les tests de "BLAST" ainsi obtenus peuvent être résumés comme suit :

- Le BLAST effectué pour les isolats PSB18 et PSB45 montre une similitude de 99% avec les souches *Enterobacter* sp. ATCC 27985 et *Enterobacter* sp. 2011SOCNI48 respectivement apparus comme étant les plus proches.
- Le BLAST effectué pour les isolats PSB41 et PSB87 montre une similitude de 99% avec les souches *Serratia odorifera* NBRC 102598 et *Serratia odorifera* PADG 1073 apparus comme étant les plus proches.
- Le BLAST effectué pour l'isolat PSB91 montre une similitude de 100% avec les souches *Bacillus cereus* SBAWB2 et *Bacillus cereus* SBMWP1 apparus comme étant les plus proches.

Les arbres phylogénétiques basés sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S des isolats bactériens avec les séquences de souches proches du Genbank sont présentées dans la figure 24.



**Figure 24:** Arbres phylogénétiques basés sur une comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des isolats bactériens et certaines souches phylogénétiquement proches réalisées par la méthode de neighbor-joining.

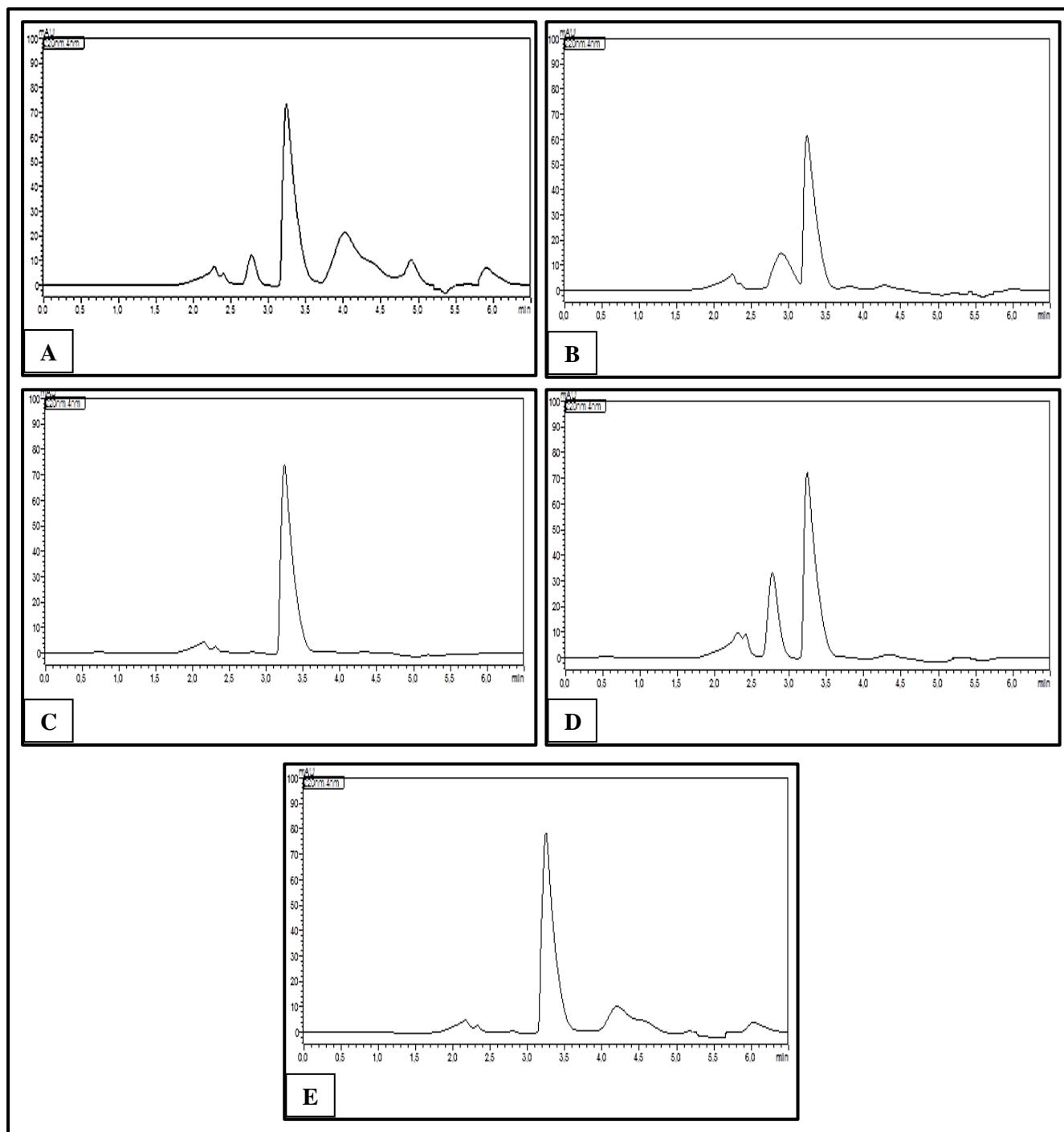
A: *Enterobacter* sp., B: *Serratia odorifera*, C: *Bacillus cereus*.

### 5.3. Analyse chromatographique des acides organiques produits par les BSP

La production des acides organiques par les cinq isolats a été étudiée dans le milieu NBRIP liquide. Des analyses par chromatographie à haute performance HPLC des filtrats de cultures bactériennes révèlent l'apparition de plusieurs pics bien séparés reflétant la présence de plusieurs acides organiques qui confèrent la capacité de solubilisation de PTC insoluble par ces isolats (Figure 25). Plusieurs acides organiques en été détectés par comparaison avec les étalons à savoir l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide succinique, l'acide oxalique et l'acide acétique. La concentration la plus élevée d'acides organiques totaux a été constatée chez l'isolat PSB18 avec 95,57 mM (composé principalement d'acide succinique (41,48 mM) d'acide gluconique (39,11 mM) et d'acide oxalique (4,18 mM)) suivi par l'isolat PSB87 avec 84,33 mM, l'isolat PSB41 (76,29 mM), l'isolat PSB91 (56,67 mM) en fin par l'isolat PSB45 (48,82 mM) (Tableau 8). Ces résultats indiquent que l'acide gluconique (AG) est quantitativement la plus importante chez toutes les bactéries testées sauf pour l'isolat PSB18 atteignant des concentrations de 55,39 mM chez l'isolat PSB87, 45,22 mM chez PSB41, 39,11 chez PSB18, 35,37 mM chez PSB91 et en fin 27,67 mM chez PSB45.

### 5.4. Mesure de l'activité de réduction d'acétylène par les isolats bactériens (test ARA)

Les cinq isolats retenus selon les tests précédemment cités ont été soumis à un test quantitatif de fixation de l'azote atmosphérique. Le principe de ce test consiste à évaluer la capacité des isolats sélectionnés à réduire l'acétylène. L'analyse de variance des résultats obtenus a révélé un effet significatif des isolats sur l'activité de fixation d'azote (Annexe 8). Les résultats obtenus dans ce test illustrés par la figure 26 ont montré une réduction importante d'acétylène par les bactéries testées. La quantité réduite est comprise entre 0,25 à 1,04 nmol de  $C_2H_4$ /h selon l'isolat bactérien (Figure 27). Il ressort à travers ce test que l'isolat PSB41 s'est montré le plus performant, suivie par l'isolat PSB87 et l'isolat PSB45 avec 1,04, 0,99, 0,96 nmol de  $C_2H_4$ /h respectivement.



**Figure 25:** Chromatogramme d'HPLC des acides organiques produits par les isolats sélectionnés

A: L'isolat PSB18, B: L'isolat PSB41, C: L'isolat PSB45, D: L'isolat PSB87, E: L'isolat PB91.

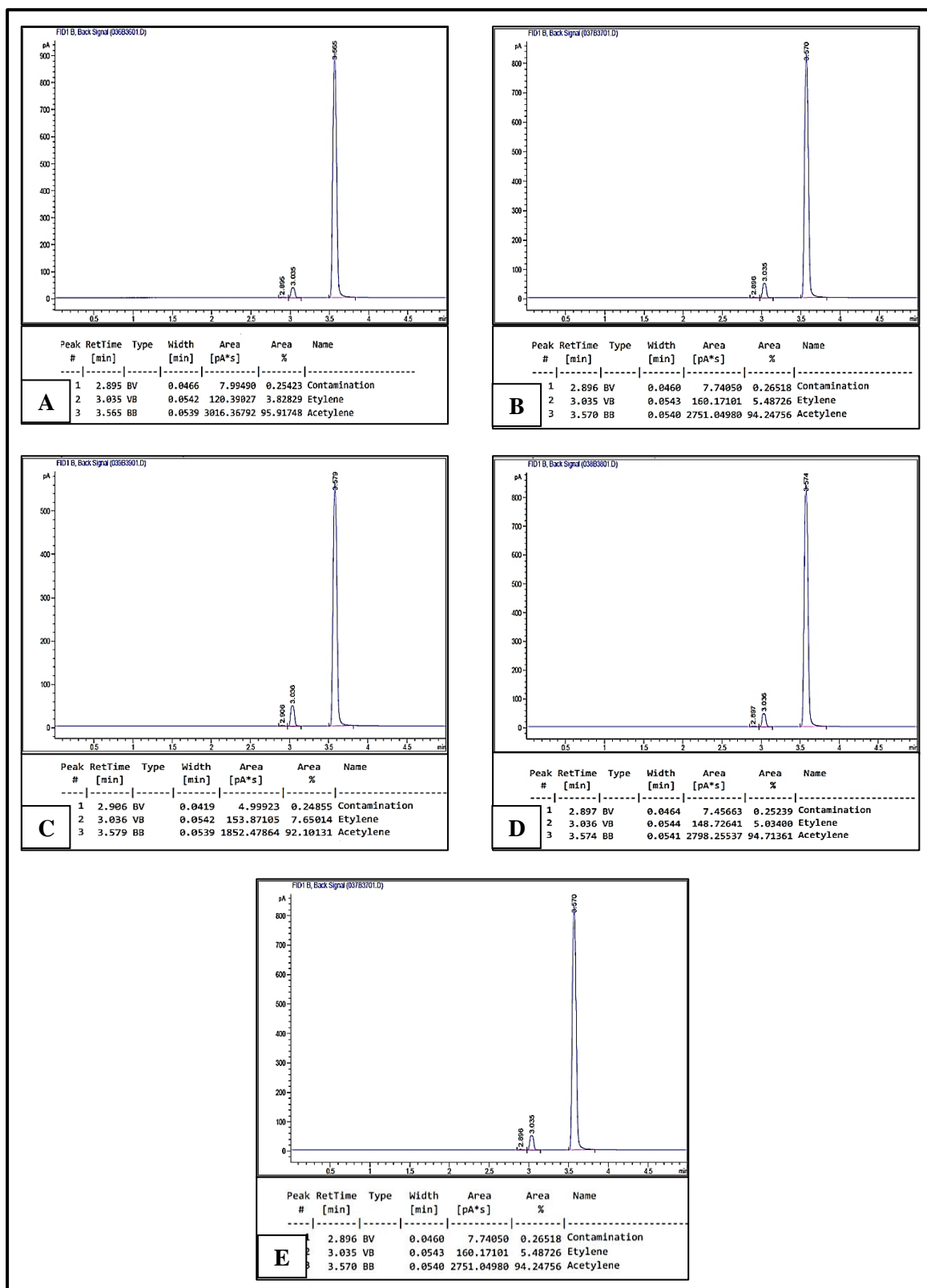
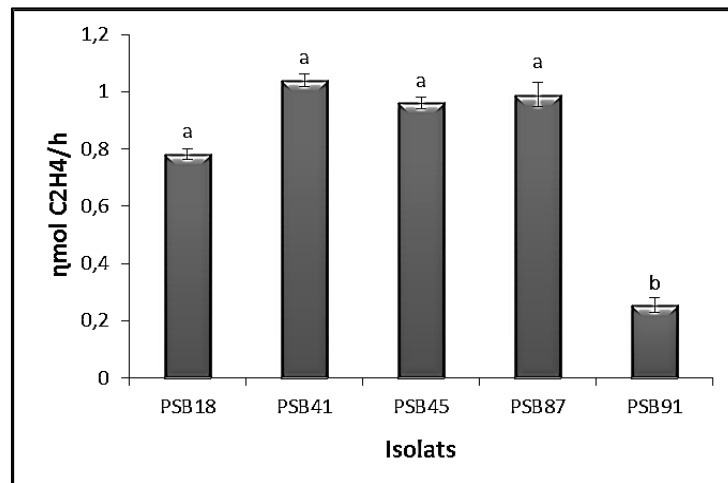


Figure 26: Chromatogramme de test de réduction de l'acétylène par les isolats sélectionnés. A: L'isolat PSB18, B: L'isolat PSB41, C: L'isolat PSB45, D: L'isolat PSB87, E: L'isolat PB91.



**Figure 27:** Activité de réduction de l'acétylène par les isolats sélectionnés.

**Tableau 8:** Acides organiques produits par les isolats bactériens après solubilisation du phosphate.

Isolat	[A.org]	A. gluconique	A. malique	A. citrique	A. lactique	A. succinique	A. oxalique	A. acétique	A. inconnus
PSB18	95,57	39,11±2,59	4,56±0,63	1,98±0,09	0,66±0,03	41,48±3,27	4,18±0,11	6,23±0,03	1,54±0,01
PSB41	76,29	45,22±3,39	2,84±0,29	ND	8,17±0,24	13,25±1,05	2,58±0,06	0,85±0,01	3,38±0,05
PSB45	48,82	27,67±1,16	0,59±0,06	6,47±0,28	ND	5,68±0,37	ND	5,67±0,66	2,77±0,02
PSB87	84,33	55,39±3,79	3,39±0,47	ND	6,17±0,17	12,72±0,45	2,64±0,04	1,28±0,07	2,74±0,02
PSB91	56,67	35,37±2,18	7,84±0,66	4,16±0,08	ND	8,38±0,09	ND	0,87±0,01	0,25±0,01

[A.org]: Concentration totale des acides organiques (mM), ND: non disponible

### 5.5. Effet de stress salin sur les isolats bactériens

La salinité affecte la plupart des microorganismes en limitant leur croissance. Au cours de ce travail, une étude consacrée sur l'évaluation de l'effet du stress salin sur la croissance des rhizobactéries et leur capacité à solubiliser le phosphate insoluble a été réalisée.

Différentes concentrations de NaCl ont été préparées. Les isolats bactériens tolérants à ce paramètre ont été conservés dans le but de les utiliser comme inoculum de plantules de blé sous stress salin pour les tests ultérieurs.

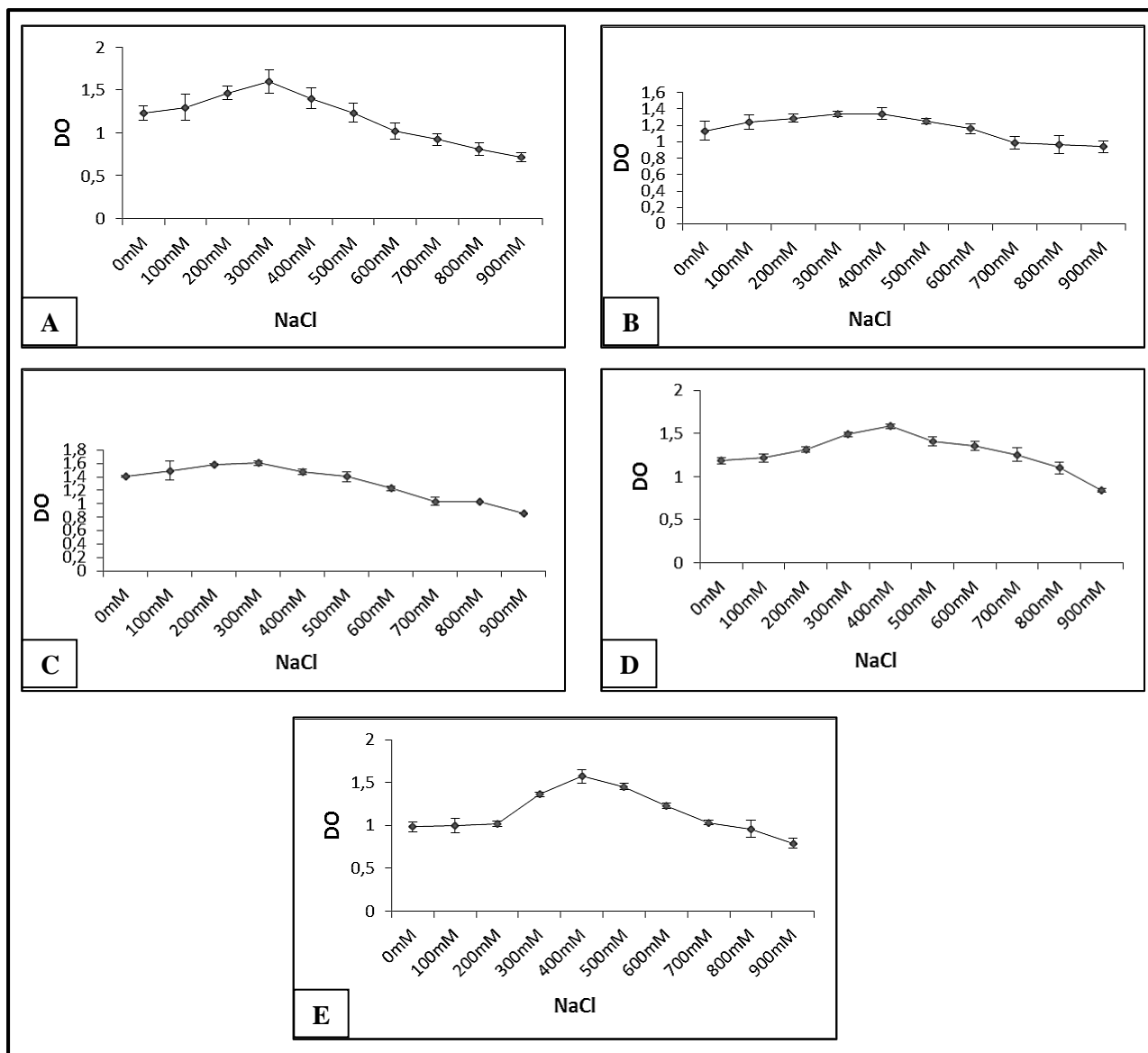
#### 5.5.1. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Le test de tolérance au sel des isolats bactériens (PSB18, PSB41, PSB45, PSB87, PSB91) a été réalisé en utilisant des concentrations croissantes de NaCl allant de 0, 100, 200, 300 ... à 900mM.

Les résultats obtenus ont montré des valeurs de la densité optique des cultures bactériennes variant entre 0,71 et 1,6. Une forte capacité de tolérance au sel a été observée chez tous les isolats bactériens avec un maximum de croissance à 400 mM de NaCl chez les isolats PSB41, PSB45, PSB87, PSB91, tandis que le maximum de croissance de l'isolat PSB18 a été obtenu à 300 mM. La valeur de la densité optique la plus élevée, correspondant à un maximum de croissance a été constatée chez l'isolat PSB87 (DO= 1,6) à une concentration de 400mM.

Cette étude a permis de ressortir la concentration de 400 mM de NaCl comme seuil de croissance maximale. En revanche, au-delà de cette concentration, une faible réduction de croissance bactérienne a été observée chez tous les isolats bactériens, avec une réduction très significative (remarquable) à 900 mM de NaCl (Figure 28, Tableau 9).

L'analyse statistique des résultats obtenus a indiqué un effet significatif de l'NaCl sur la croissance des isolats bactériens (Annexe 8).



**Figure 28:** Effet du NaCl sur la croissance des isolats bactériens sélectionnés.

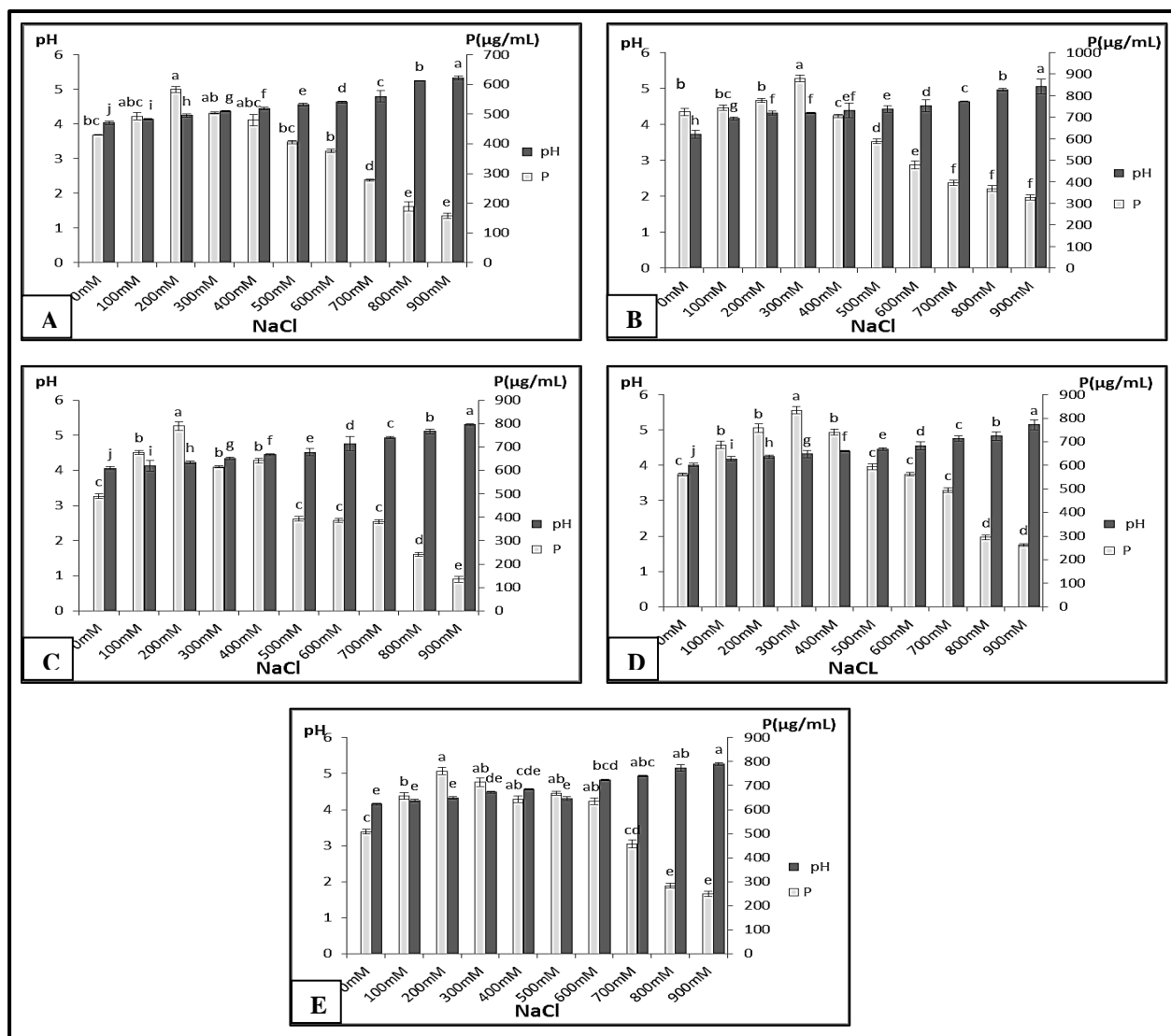
A : L'isolat PSB18, B : L'isolat PSB41, C : L'isolat PSB45, D : L'isolat PSB87, E : L'isolat PB91.

### 5.5.2. Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate en milieu liquide

La capacité de solubilisation du phosphate par les isolats bactériens a été testée en milieu liquide NBRIP contenant 0,5% de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphore sous stress salin avec des concentrations croissantes de NaCl (0, 100, 200, 300.....et 900 mM).

La quantité de phosphore libérée par les isolats bactériens varie entre 135,42 et 879,71  $\mu\text{g/ml}$  de phosphore soluble. Une augmentation du taux de solubilisation a été observée avec l'augmentation de la concentration de NaCl et cela pour l'ensemble des isolats bactériens.

Cette augmentation du taux de solubilisation atteint jusqu'à son seuil maximale entre 200 et 400mM de NaCl (Figure 29).



**Figure 29:** Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate par les isolats bactériens sélectionnés. A: L'isolat PSB18, B: L'isolat PSB41, C: L'isolat PSB45, D: L'isolat PSB87, E: L'isolat PB91.

Au-delà de 400 mM du NaCl, une faible diminution de la quantité de phosphore libéré a été observée chez tous les isolats bactériens. Le taux le plus élevé de solubilisation a été constaté chez l'isolat PSB41 suivie par l'isolat PSB87 avec une production de 879,714 et 834,476 µg/ml de phosphore libéré à des concentrations de 300 et 400 mM de NaCl respectivement (Tableau 9). L'analyse statistique des résultats obtenus a indiqué un effet

significatif de sel sur la solubilisation du phosphate insoluble par les bactéries sélectionnées (Annexe 8).

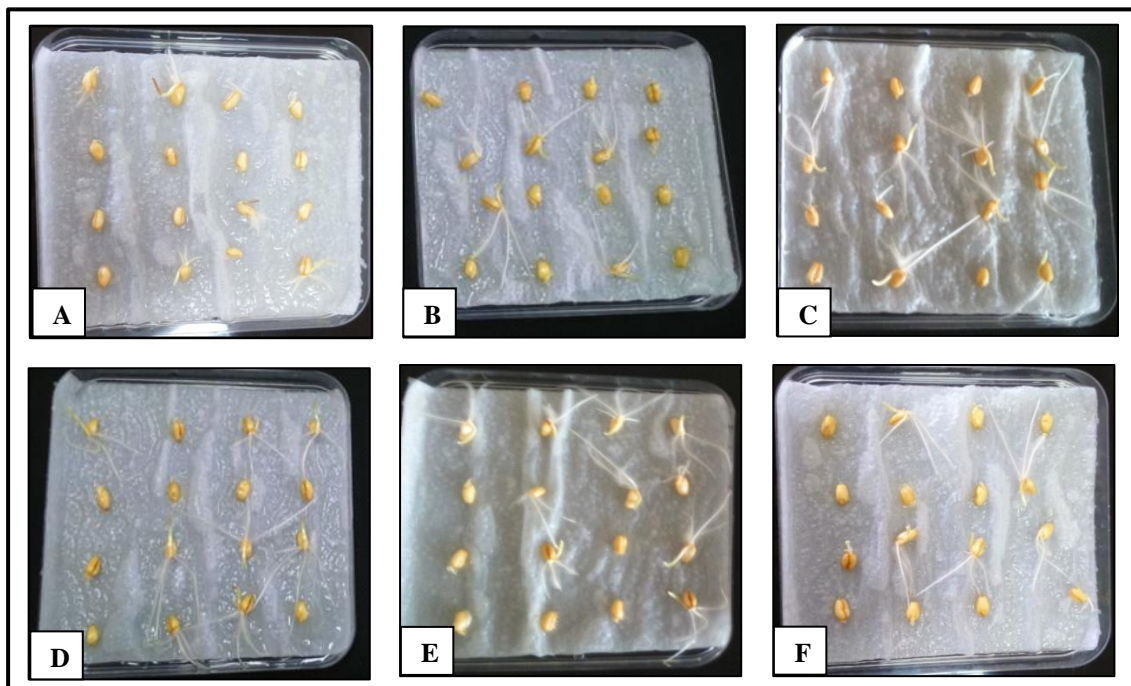
Le test de performance des isolats en condition de salinité nous a permis de classer les différents isolats, selon leur capacité à tolérer le NaCl comme des halotolérants.

## 6. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de blé dur

### 6.1. Effet sur la germination des grains de blé

La figure 30 ci-dessous, illustre la variation de l'indice de germination des grains de blé dur en fonction de l'inoculum des différents isolats sélectionnés.

Globalement, les résultats de l'analyse statistique ont montré que l'inoculation par les différents isolats retenus semble affecter significativement la germination des grains (Annexe 8). Les valeurs de l'indice de germination varient entre 0,51 enregistrée chez le témoin et 0,75 consignée pour l'isolat PSB87 (Figure 31).



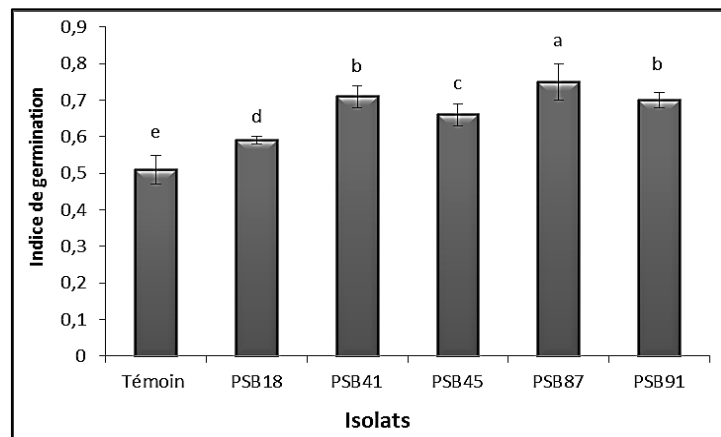
**Figure 30:** Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur la germination des grains de blé.

A: Témoin, B: L'isolat PSB18, C: L'isolat PSB41, D: L'isolat PSB45, E: L'isolat PSB87, F: L'isolat PB91.

**Tableau 9:** Effet du stress salin sur la croissance bactérienne et la solubilisation du phosphate par les isolats bactériens.

Isolat	NaCl (mM)	Croissance bactérienne (DO)	Solubilisation du phosphate ( $\mu\text{g/ml}$ )	pH final de solubilisation
PSB18	0	1,23 $\pm$ 0,18 <sup>abcd</sup>	429,71 $\pm$ 1,43 <sup>bc</sup>	4,03 $\pm$ 0,04 <sup>j</sup>
	100	1,29 $\pm$ 0,15 <sup>abcd</sup>	492,57 $\pm$ 13,09 <sup>abc</sup>	4,13 $\pm$ 0,01 <sup>i</sup>
	200	1,46 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	582,57 $\pm$ 10,26 <sup>a</sup>	4,24 $\pm$ 0,04 <sup>h</sup>
	300	1,6 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	504 $\pm$ 2,85 <sup>ab</sup>	4,37 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>
	400	1,4 $\pm$ 0,12 <sup>abc</sup>	480,19 $\pm$ 17,15 <sup>abc</sup>	4,44 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>
	500	1,23 $\pm$ 0,11 <sup>abcd</sup>	405,9 $\pm$ 5,74 <sup>bc</sup>	4,56 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>
	600	1,01 $\pm$ 0,09 <sup>bcde</sup>	375,43 $\pm$ 5,71 <sup>c</sup>	4,63 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>
	700	0,922 $\pm$ 0,07 <sup>cde</sup>	278,28 $\pm$ 3,78 <sup>d</sup>	4,8 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
	800	0,8 $\pm$ 0,07 <sup>de</sup>	188,76 $\pm$ 15,63 <sup>e</sup>	5,24 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	900	0,71 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	157,333 $\pm$ 9,106 <sup>e</sup>	5,33 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
PSB41	0	1,13 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	594,47 $\pm$ 12,32 <sup>d</sup>	3,72 $\pm$ 0,106 <sup>h</sup>
	100	1,241 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	730,19 $\pm$ 11,86 <sup>bc</sup>	4,15 $\pm$ 0,05 <sup>g</sup>
	200	1,23 $\pm$ 0,058 <sup>ab</sup>	776,86 $\pm$ 9,37 <sup>b</sup>	4,31 $\pm$ 0,05 <sup>f</sup>
	300	1,33 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	879,71 $\pm$ 7,72 <sup>a</sup>	4,31 $\pm$ 0,01 <sup>f</sup>
	400	1,34 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	705,42 $\pm$ 7,14 <sup>c</sup>	4,39 $\pm$ 0,01 <sup>ef</sup>
	500	1,25 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	587,33 $\pm$ 10,86 <sup>d</sup>	4,42 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>
	600	1,16 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	478,28 $\pm$ 15,19 <sup>e</sup>	4,52 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
	700	0,98 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	396,38 $\pm$ 12,134 <sup>f</sup>	4,63 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
	800	0,96 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	368,28 $\pm$ 14,236 <sup>f</sup>	4,96 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
	900	0,94 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>	328,76 $\pm$ 12,32 <sup>f</sup>	5,05 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
PSB45	0	1,18 $\pm$ 0,05 <sup>bc</sup>	389,71 $\pm$ 6,54 <sup>c</sup>	4,06 $\pm$ 0,01 <sup>j</sup>
	100	1,22 $\pm$ 0,07 <sup>def</sup>	576,86 $\pm$ 7,56 <sup>b</sup>	4,13 $\pm$ 0,02 <sup>i</sup>
	200	1,31 $\pm$ 0,09 <sup>cd</sup>	789,71 $\pm$ 2,85 <sup>a</sup>	4,23 $\pm$ 0,03 <sup>h</sup>
	300	1,49 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	615,9 $\pm$ 4,81 <sup>b</sup>	4,35 $\pm$ 0,03 <sup>g</sup>
	400	1,58 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	642,09 $\pm$ 9,23 <sup>b</sup>	4,45 $\pm$ 0,03 <sup>f</sup>
	500	1,41 $\pm$ 0,05 <sup>bc</sup>	598,28 $\pm$ 9,13 <sup>b</sup>	4,52 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>
	600	1,35 $\pm$ 0,05 <sup>cd</sup>	585,9 $\pm$ 8,61 <sup>b</sup>	4,77 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>
	700	1,25 $\pm$ 0,08 <sup>de</sup>	381,14 $\pm$ 9,64 <sup>c</sup>	4,93 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
	800	1,1 $\pm$ 0,7 <sup>f</sup>	241,14 $\pm$ 7,55 <sup>d</sup>	5,11 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	900	0,84 $\pm$ 0,07 <sup>g</sup>	135,42 $\pm$ 5,06 <sup>e</sup>	5,3 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
PSB87	0	1,4 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>	561,14 $\pm$ 5,4 <sup>c</sup>	4,01 $\pm$ 0,02 <sup>j</sup>
	100	1,47 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	686,86 $\pm$ 15,92 <sup>b</sup>	4,18 $\pm$ 0,02 <sup>i</sup>
	200	1,49 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	741,14 $\pm$ 9,13 <sup>b</sup>	4,25 $\pm$ 0,04 <sup>h</sup>
	300	1,58 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	758,76 $\pm$ 10,82 <sup>b</sup>	4,32 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>
	400	1,6 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	834,47 $\pm$ 5,74 <sup>a</sup>	4,40 $\pm$ 0,01 <sup>f</sup>
	500	1,4 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	594,47 $\pm$ 12,32 <sup>c</sup>	4,46 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>
	600	1,23 $\pm$ 0,05 <sup>bc</sup>	562,57 $\pm$ 7,14 <sup>c</sup>	4,56 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>
	700	1,03 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	494,95 $\pm$ 9,18 <sup>c</sup>	4,76 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
	800	1,02 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>	294,47 $\pm$ 9 <sup>d</sup>	4,83 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	900	0,86 $\pm$ 0,15 <sup>e</sup>	263,05 $\pm$ 5,74 <sup>d</sup>	5,15 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
PSB91	0	0,98 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	408,28 $\pm$ 6,23 <sup>d</sup>	4,15 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
	100	1 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	556,85 $\pm$ 8,28 <sup>bc</sup>	4,25 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
	200	1,02 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	760,66 $\pm$ 12,56 <sup>a</sup>	4,32 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
	300	1,36 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	714,47 $\pm$ 12,77 <sup>ab</sup>	4,48 $\pm$ 0,03 <sup>de</sup>
	400	1,57 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	643,52 $\pm$ 9,98 <sup>ab</sup>	4,57 $\pm$ 0,02 <sup>cde</sup>
	500	1,45 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	668,28 $\pm$ 6,22 <sup>ab</sup>	4,30 $\pm$ 0,08 <sup>e</sup>
	600	1,23 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	635,44 $\pm$ 13,09 <sup>ab</sup>	4,82 $\pm$ 0,02 <sup>bcd</sup>
	700	1,03 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	456,85 $\pm$ 14,38 <sup>cd</sup>	4,93 $\pm$ 0,02 <sup>abc</sup>
	800	0,96 $\pm$ 0,91 <sup>d</sup>	282,57 $\pm$ 8,69 <sup>e</sup>	5,16 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>
	900	0,79 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	248,76 $\pm$ 7,78 <sup>e</sup>	5,27 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

**Valeurs:** Moyenne $\pm$  écart type, **abc...**: groupes homogènes indiquant des valeurs statistiquement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $p \leq 0,05$ .



**Figure 31:** Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur le taux la germination des grains de blé.

## 6.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres de croissance morphologiques du blé

Les résultats obtenus montrent que les tests d'inoculation par les bactéries à activités PGP ont induit des effets significatifs sur le développement ainsi que les paramètres étudiés chez l'espèce végétale. Les résultats correspondants à l'analyse de différents paramètres de croissance morphologiques (tiges et racines) ont montré un effet significatif de l'inoculation bactérienne sur ces paramètres ( $P \leq 0,05$ ) par rapport aux témoins (Annexe 8). A travers ces résultats, on a constaté que la salinité et/ou l'absence de phosphore soluble ont un effet négatif sur les paramètres morphologiques de la croissance de blé dur.

### 6.2.1. Effet de l'inoculation bactérienne sur la longueur et le poids sec des tiges

L'ensemble des inoculas a permis d'améliorer significativement la partie aérienne de la plante par rapport aux témoins non inoculés (Figure 32). Les valeurs de la hauteur des tiges et leur poids frais ont également augmenté dans le cas d'inoculation bactérienne, avec une performance plus ou moins différente signalée pour chaque isolat pour tous les traitements.

Dans le cas du premier traitement, en absence d'un stress salin et en présence de phosphore soluble les meilleurs résultats ont été constatés chez l'isolat PSB18 avec un pourcentage d'amélioration avoisinant 23,58% pour la longueur des tiges et 98,40% pour leurs poids sec, suivi par l'isolat PSB87 avec 17,88% et 70,52% pour la longueur et le poids sec des tiges respectivement.

Cependant, dans le second traitement, en absence de stress salin et de phosphore soluble avec l'addition de phosphate tricalcique, l'isolat le plus performant est celui qui a

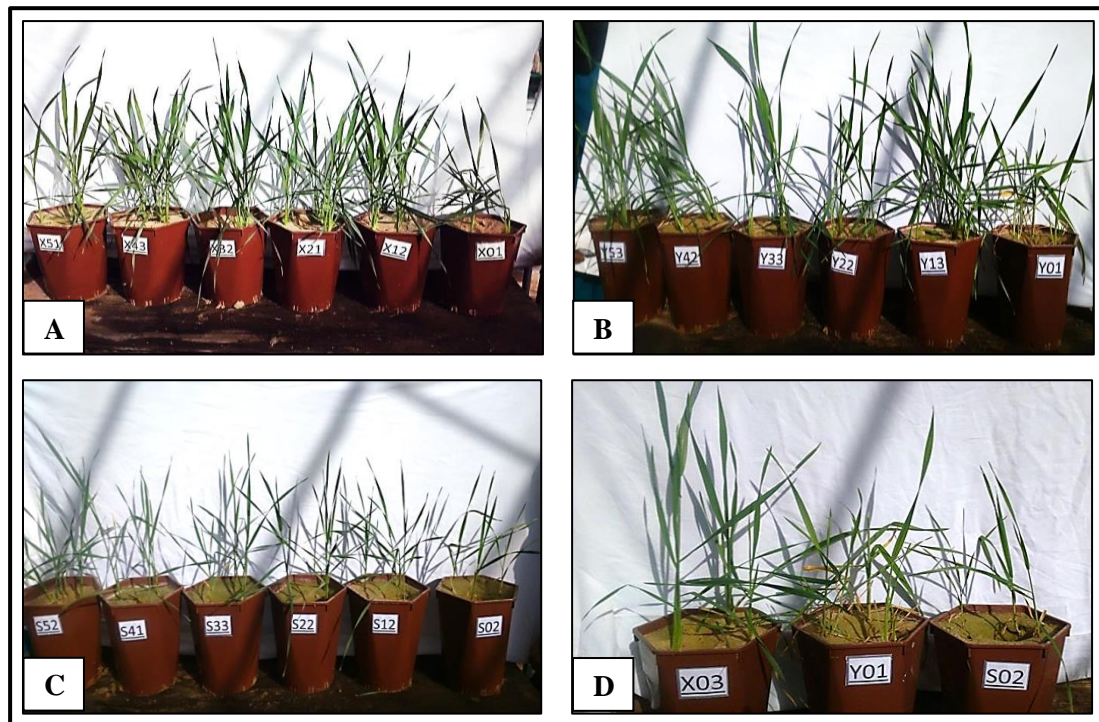
atteint une meilleure amélioration, il s'agit de l'isolat PSB41 avec 49,19% et 157,35% d'amélioration pour la longueur et le poids sec des tiges respectivement, suivi par celui de l'isolat PSB87 avec 48,81% d'amélioration de la longueur et 144,96% d'amélioration du poids sec des tiges.

Dans le cas du troisième traitement en présence de 100 mM de NaCl, une amélioration remarquable de la croissance chez l'espèce végétale a été enregistrée en présence de l'isolat PSB87, avec un pourcentage d'amélioration d'environ 70,52% pour la longueur des tiges et de 141,67% pour leur poids sec. L'isolat PSB41 étant en deuxième position avec un pourcentage d'amélioration de 50,93% et 124,60% pour la longueur et le poids sec des tiges respectivement (Figure 33, Tableau 10).

### **6.2.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la longueur et le poids sec des racines**

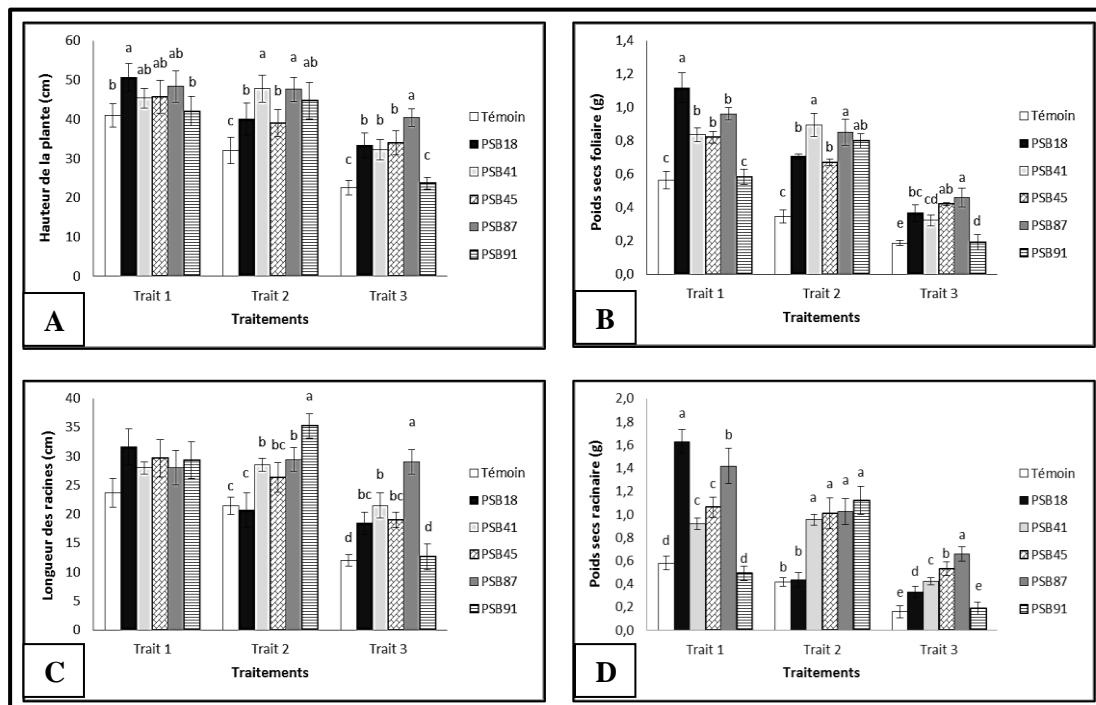
Le test de l'inoculation bactérienne a permis d'améliorer significativement le poids sec des racines. En effet, l'analyse de la variance a fait ressortir un effet significatif de l'inoculation sur la profondeur et le poids sec des racines de plants à l'exception du premier traitement qui semble avoir un effet non significatif sur la longueur des racines (Annexe 8) alors qu'une amélioration importante du poids des racines a été observée chez l'isolat PSB18 (181,98%), suivi par celui de l'isolat PSB87 (145,58%). En revanche, la bactérie PSB91 a induit une diminution de ce paramètre, avec un pourcentage d'amélioration de -15,08%. Dans le cas du second traitement un effet positif et visible de l'inoculation a été constaté avec une meilleure amélioration de 64,40% obtenu par l'isolat PSB91 pour la longueur des racines et 170,46% pour leur poids sec suivi par celui de l'isolat PSB87 avec un pourcentage d'amélioration de 37,23% et de 147,70% pour la longueur et le poids sec des racines respectivement.

Cependant, une amélioration importante a été constatée sous stress salin en présence de l'isolat PSB87, avec un pourcentage d'amélioration de 145,99% pour la longueur des racines et de 141,67% pour leurs poids sec, suivi par celui de la rhizobactérie PSB41, dont le pourcentage d'amélioration de la longueur des racine avoisine 79,06% et par l'isolat PSB45 avec un pourcentage d'amélioration du poids sec des plants atteignant 237,58% (Figure 33, Tableau 10).



**Figure 32:** Effet de l'inoculation par les cinq bactéries sélectionnées sur la croissance des grains de blé.

A: Traitement 1, B: Traitement 2, C: Traitement 3, D: Témoins sans inoculation pour les trois traitements.



**Figure 33:** Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur les paramètres de croissance morphologiques sous les trois traitements.

A: Effet sur la hauteur des tiges, B: Effet sur le poids sec foliaire, C: Effet sur la longueur des racines, D: Effet sur le poids sec racinaire.

**Tableau 10:** Effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur les paramètres de croissance morphologiques du blé sous les trois traitements.

Traitement	Inoculation	Tiges				Racines			
		LT (cm)	(%)	PST (g)	(%)	LR (cm)	(%)	PSR (g)	(%)
1 Sans NaCl +P soluble	Témoin	41,00 ±3 <sup>b</sup>	0,00	0,56 ±0,05 <sup>c</sup>	0,00	23,67 ±2,52	0,00	0,58±0,06 <sup>d</sup>	0,00
	PSB18	50,67 ±3,52 <sup>a</sup>	23,58	1,12 ±0,15 <sup>a</sup>	98,40	31,67 ±3,52	33,80	1,63±0,20 <sup>a</sup>	181,98
	PSB41	45,33 ±2,52 <sup>ab</sup>	10,57	0,84 ±0,04 <sup>b</sup>	48,67	28,00 ±2,08	18,31	0,92±0,03 <sup>c</sup>	58,93
	PSB45	45,66 ±4,16 <sup>ab</sup>	11,37	0,82 ±0,04 <sup>b</sup>	45,65	29,67 ±3,73	25,35	1,06±0,09 <sup>c</sup>	83,71
	PSB87	48,33 ±4,00 <sup>ab</sup>	17,88	0,96 ±0,04 <sup>b</sup>	70,52	28,00 ±3,00	18,31	1,42±0,15 <sup>b</sup>	145,58
	PSB91	42,00 ±3,73 <sup>b</sup>	2,44	0,58 ±0,05 <sup>c</sup>	3,55	29,33 ±3,15	23,94	0,49±0,02 <sup>d</sup>	-15,08
2 Sans NaCl +Ca3 (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Témoin	32,00 ±3,29 <sup>c</sup>	0,00	0,35±0,04 <sup>c</sup>	0,00	21,46 ±1,49 <sup>c</sup>	0,00	0,41±0,04 <sup>b</sup>	0,00
	PSB18	40,00 ±4,11 <sup>b</sup>	25,00	0,71±0,02 <sup>b</sup>	103,75	20,67 ±2,8 <sup>c</sup>	-3,70	0,43 ±0,06 <sup>b</sup>	4,84
	PSB41	47,74 ±3,48 <sup>a</sup>	49,19	0,89 ±0,11 <sup>a</sup>	157,35	28,56 ±3,66 <sup>b</sup>	33,10	0,95±0,03 <sup>a</sup>	130,75
	PSB45	38,97 ±3,49 <sup>b</sup>	21,78	0,67 ±0,04 <sup>b</sup>	93,08	26,33 ±2,51 <sup>bc</sup>	22,71	1,01±0,13 <sup>a</sup>	143,83
	PSB87	47,62 ±3,06 <sup>a</sup>	48,81	0,85 ±0,08 <sup>a</sup>	144,96	29,45 ±2,03 <sup>b</sup>	37,23	1,02±0,16 <sup>a</sup>	147,70
	PSB91	44,66 ±4,67 <sup>ab</sup>	39,56	0,80 ±0,04 <sup>ab</sup>	130,55	35,28 ±3,12 <sup>a</sup>	64,40	1,12 ±0,12 <sup>a</sup>	170,46
3 Avec 100Mm NaCl + Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Témoin	22,53 ±1,88 <sup>c</sup>	0,00	0,19 ±0,02 <sup>e</sup>	0,00	12,00 ±1 <sup>d</sup>	0,00	0,16 ±0,05 <sup>e</sup>	0,00
	PSB18	33,33 ±3,13 <sup>b</sup>	47,97	0,37±0,05 <sup>bc</sup>	96,26	18,46 ± 1,93 <sup>bc</sup>	53,80	0,33 ±0,05 <sup>d</sup>	108,28
	PSB41	32,22 ±2,57 <sup>b</sup>	43,03	0,32±0,03 <sup>cd</sup>	72,73	21,49 ±2,15 <sup>b</sup>	79,06	0,42 ±0,03 <sup>c</sup>	169,43
	PSB45	34,00 ±3,04 <sup>b</sup>	50,93	0,42±0,04 <sup>ab</sup>	124,6	19,00 ±1,29 <sup>bc</sup>	58,33	0,53 ±0,06 <sup>b</sup>	237,58
	PSB87	40,35 ±2,22 <sup>a</sup>	70,52	0,46 ±0,06 <sup>a</sup>	145,99	29,00 ±2,65 <sup>a</sup>	141,67	0,66 ±0,04 <sup>a</sup>	318,47
	PSB91	23,66 ±1,53 <sup>c</sup>	5,03	0,19 ±0,05 <sup>d</sup>	3,21	12,67 ±2,53 <sup>d</sup>	5,56	0,19 ±0,03 <sup>e</sup>	19,11

LT: longueur des tiges, LR: longueur des racines, PST: poids sec des tiges, PSR: poids sec des racines, (%): pourcentage d'amélioration, valeurs: moyenne ± écart type, abc....: groupes homogènes indiquant des valeurs statistiquement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $p \leq 0,05$ .

### 6.3. Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres de croissance biochimiques du blé

L'analyse statistique des résultats obtenus illustré par la figure 34 a indiqué un effet hautement significatif de l'inoculation par les PGPR sur les paramètres de croissance biochimiques des plantes de blé ( $P \leq 0,05$ ) par rapport aux témoins (Annexe 8). A travers ces résultats, on peut aussi relever que la salinité et/ou l'absence de phosphore soluble ont un effet négatif sur les paramètres de croissance biochimiques de la croissance de l'espèce végétale.

#### 6.3.1. Chlorophylle totale

Comparé au témoin, la teneur en chlorophylle diminue en présence de sel et en absence de phosphore soluble. Selon les résultats obtenus, le test d'inoculation par les BSP semble avoir un effet significatif sur la teneur des feuilles en chlorophylle avec l'ensemble des trois traitements appliqués. Concernant le premier traitement, considéré comme témoin positif sans sel et en présence de phosphore, la PGPR PSB18 s'est montrée la plus performante avec un pourcentage d'amélioration de la teneur en chlorophylle d'environ 89,13%, suivi par celui de l'isolat PSB87 avec un pourcentage de 84,65% (Figure 34). Pour celui du second traitement réalisé en présence du phosphate insoluble ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) comme

seule source de phosphore, une amélioration importante a été enregistrée chez l'isolat PSB41 (154,73%), suivi par l'isolat PSB87 et PSB91 avec un pourcentage d'amélioration de 152,08% et 147,73% respectivement. Cependant, l'analyse de la variance a révélé un effet hautement significatif de l'inoculation par les rhizobactéries sélectionnées sur la teneur en chlorophylle totale en traitement sous stress salin avec du phosphate tricalcique comme seule source de phosphore. L'isolat bactérien PSB87 a révélé une meilleure amélioration de la teneur en chlorophylle avec un pourcentage avoisinant 148,43% par contre, l'isolat PSB18 a induit une diminution de la teneur en chlorophylle dans les feuilles (-12,11%) (Tableau 11).

### 6.3.2. Contenu en phosphore

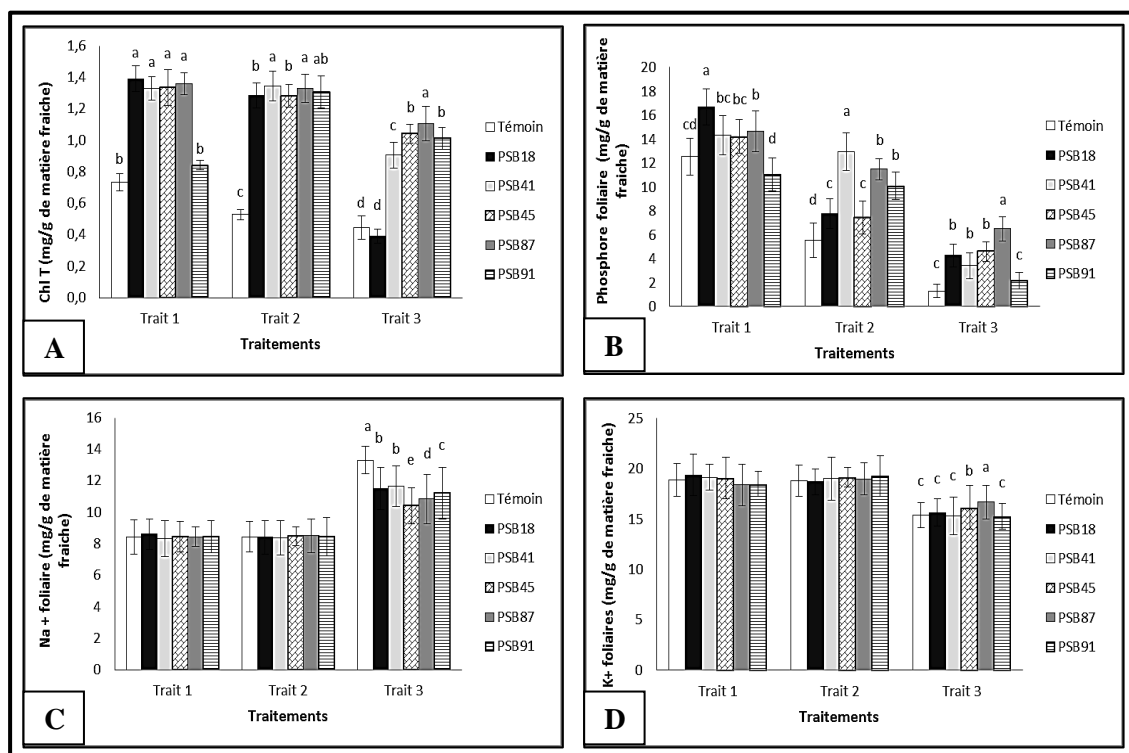
Le taux de phosphore contenu dans la partie aérienne de la plante est un paramètre de croissance principal. Une diminution importante du contenu de phosphore des feuilles a été constatée chez les plants de blé non inoculés dans les trois traitements en particulier dans le traitement salin. Les résultats obtenus montrent que l'inoculation bactérienne a montré un effet positif dans l'amélioration de l'absorption du phosphore par la plante étudiée. Dans le premier traitement, en présence de phosphore soluble une faible amélioration a été constatée par rapport aux autres traitements en particulier chez l'isolat PSB18 avec un pourcentage d'amélioration de 32,99%. En revanche, l'isolat PSB91 a induit une diminution de ce paramètre (-11,85%). Dans le traitement contenant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore une amélioration importante en teneurs de phosphore soluble dans la partie aérienne a été constatée avec un pourcentage d'amélioration de 134,09% et de 107,28% chez les isolats PSB41 et PSB87 respectivement, cela signifie que l'ensemble des isolats ont solubilisé le phosphate insoluble. Dans le cas de traitement additionné par le sel et contenant le phosphate tricalcique comme seule source de phosphore une amélioration très importante a été observée notamment chez la bactérie solubilisant le phosphate PSB87 avec un pourcentage très élevé avoisinant 401,63%. L'isolat PSB45 se classe en deuxième position et permet un pourcentage d'environ 254,07%. Ces résultats indiquent que les isolats bactériens testés ont une capacité de solubilisation du phosphate même en condition de stress salin (Figure 34, Tableau 11).

### 6.3.3. Contenu en $\text{Na}^+$ et $\text{K}^+$

L'estimation du contenu de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  foliaire des plants de blé non inoculés sous stress salin a montré une augmentation de la concentration des ions  $\text{Na}^+$  avec une diminution du contenu des ions  $\text{K}^+$ . L'analyse de la variance a montré que l'inoculation par les isolats

bactérien a un effet significatif sur le contenu de sodium et de potassium dans les feuilles de blé seulement pour le traitement additionné de sel. En revanche, cette accumulation en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> est non significatif pour les autres traitements. Le test de traitement en présence du sel a montré une corrélation négative entre la teneur en sodium et en potassium. Il est de même que ce test avec l'inoculation, la teneur en sodium dans les feuilles a diminué. Cette diminution est notée chez l'isolat PSB87 avec un pourcentage de 21,73%, suivie par l'isolat PSB45 avec 18,48%, à l'inverse, la teneur en potassium dans les feuilles a enregistré une augmentation suite cette inoculation et cela en présence de l'isolat PSB87. Le pourcentage d'amélioration de la teneur en potassium de ce dernier est de 8,21% suivie par l'isolat PSB45 avec 4,79% (Tableau 11).

A travers ces résultats, nous pouvons suggérer que les tests d'inoculation ont confirmé que nos isolats bactériens possèdent un potentiel élevé de promotion de la croissance des plantes et peuvent être utilisés comme des biofertilisants pour les plantes de blé en particulier.



**Figure 34:** Effet de l'inoculation par les bactéries sélectionnées sur les paramètres de croissance biochimiques dans les feuilles du blé sous les trois traitements.

A: Effet sur la teneur en chlorophylle, B: Effet sur la teneur en phosphore soluble, C: Effet sur la teneur en sodium, D: Effet sur la teneur en potassium.

**Tableau 11:** Effet de l'inoculation par les bactéries sélectionnées sur les paramètres de croissance biochimiques du blé sous les trois traitements.

Traitement	Inoculation	Chl T		P		Na <sup>+</sup>		k <sup>+</sup>	
		mg/g	(%)	mg/g	(%)	mg/g	(%)	mg/g	(%)
<b>1</b> <b>Sans</b> <b>NaCl +P</b> <b>soluble</b>	Témoin	0,74±0,06 <sup>p</sup>	0,00	12,51±2,95 <sup>cd</sup>	0,00	8,45±1,10	0,00	18,86±2,83	0,00
	PSB18	1,39±0,08 <sup>a</sup>	89,13	16,64±2,32 <sup>a</sup>	32,99	8,61±0,95	1,89	19,33±3,26	2,48
	PSB41	1,33±0,07 <sup>a</sup>	80,57	14,31±1,92 <sup>bc</sup>	14,38	8,34±1,34	-1,23	19,09±3,58	1,24
	PSB45	1,34±0,12 <sup>a</sup>	81,39	14,20±2,60 <sup>bc</sup>	13,54	8,46±1,67	0,19	19,04±4,04	0,97
	PSB87	1,36±0,07 <sup>a</sup>	84,65	14,62±3,72 <sup>b</sup>	16,92	8,45±0,91	0,04	18,34±3,78	-2,74
	PSB91	0,84±0,03 <sup>b</sup>	14,40	11,03±3,35 <sup>d</sup>	-11,85	8,45±2,01	0,07	18,43±3,23	-2,28
<b>2</b> <b>Sans</b> <b>NaCl+Ca<sub>3</sub></b> <b>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	Témoin	0,53±0,03 <sup>c</sup>	0,00	5,52±1,65 <sup>d</sup>	0,00	8,45±0,98	0,00	18,79±2,95	0,00
	PSB18	1,29±0,18 <sup>b</sup>	143,56	7,75±2,22 <sup>c</sup>	40,22	8,42±1,56	-0,36	18,65±2,26	-0,71
	PSB41	1,35±0,23 <sup>a</sup>	154,73	12,93±3,32 <sup>a</sup>	134,09	8,38±1,38	-0,83	18,97±3,44	1,72
	PSB45	1,28±0,21 <sup>b</sup>	143,18	7,43±1,60 <sup>c</sup>	34,49	8,45±1,29	0,36	19,14±3,16	0,88
	PSB87	1,33±0,14 <sup>a</sup>	152,08	11,45±3,45 <sup>b</sup>	107,28	8,51±2,26	0,75	18,94±2,88	-1,04
	PSB91	1,31±0,18 <sup>ab</sup>	147,73	10,07±2,65 <sup>b</sup>	82,37	8,46±2,04	0,12	19,24±4,13	1,58
<b>3</b> <b>Avec</b> <b>100mM</b> <b>NaCl +</b> <b>Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	Témoin	0,45±0,07 <sup>d</sup>	0,00	1,29±0,56 <sup>c</sup>	0,00	13,31±2,6 <sup>a</sup>	0,00	15,38±3,45 <sup>c</sup>	0,00
	PSB18	0,39±0,05 <sup>d</sup>	-12,11	4,25±0,95 <sup>b</sup>	229,51	11,51±2,33 <sup>b</sup>	-13,52	15,62±2,78 <sup>c</sup>	1,56
	PSB41	0,91±0,08 <sup>c</sup>	103,14	3,41±1,09 <sup>b</sup>	163,90	11,66±1,97 <sup>b</sup>	-12,42	15,27±2,89 <sup>c</sup>	-0,70
	PSB45	1,04±0,16 <sup>b</sup>	133,63	4,57±0,81 <sup>b</sup>	254,07	10,85±3,07 <sup>d</sup>	-18,48	16,11±3,57 <sup>b</sup>	4,79
	PSB87	1,11±0,09 <sup>a</sup>	148,43	6,48±1,23 <sup>a</sup>	401,63	10,42±1,66 <sup>c</sup>	-21,73	16,64±2,77 <sup>a</sup>	8,21
	PSB91	1,01±0,07 <sup>b</sup>	127,35	2,14±0,69 <sup>c</sup>	65,61	11,21±2,04 <sup>c</sup>	-15,82	15,21±3,28 <sup>c</sup>	-1,09

**ChlT**: chlorophylle total, (%): pourcentage d'amélioration, **Valeurs** : moyenne± écart type, **abc.....**: groupes homogènes indiquant des valeurs statistiquement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $p \leq 0,05$ .



**Chapitre IV**  
**Discussion**

## 1. Isolement et identification des bactéries solubilisant le phosphate

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont un groupe hétérogène de bactéries que l'on retrouve dans la rhizosphère, à la surface des racines et en association avec les racines, ce qui peut améliorer la croissance des plantes directement et/ou indirectement (Niranjana et Hariprasad, 2014). Ces bactéries colonisant les racines, lorsqu'elles sont appliquées sur les graines ou les racines, améliorent la croissance de la plante, réduisent les dommages causés par les phytopathogènes et apportent une résistance des plantes contre le stress abiotique (Khan *et al.*, 2010). La capacité de certains microorganismes à convertir le phosphore insoluble en une forme accessible, comme l'orthophosphate est une activité importante dans les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) (Chen *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2007).

Au cours de notre travail, 104 bactéries solubilisant le phosphate ont été isolées de la rhizosphère de plantes de blé cultivées dans des sols salins relativement sec, ayant un pH légèrement alcalin. Cependant, la composition et la structure de la population des microorganismes solubilisant le phosphate dans le sol sont très variables et influencées en grande partie par les caractéristiques physico-chimiques du sol (Khan *et al.*, 2007). Il a été suggéré par Shrivastava et Kumar (2015) que l'isolement et le criblage des microorganismes indigènes des sols salin sur la base de leurs caractères PGP et de leur tolérance au stress sont utiles dans la sélection rapide de souches efficaces qui pourraient être utilisées comme bioinoculants pour les cultures stressées par le sel.

Par ailleurs, les bactéries solubilisant le phosphate ont également été signalées dans des sols rhizosphériques de différentes cultures agricoles, y compris le blé (*Triticum aestivum*) (Rawat *et al.*, 2011; Babana *et al.*, 2013), le Maïs (*Zea mays*) (Ranjan *et al.*, 2013), le riz (*Oryza Sativa*) (Panhwar *et al.*, 2012). Il a été aussi rapporté que les bactéries sont plus efficaces dans la solubilisation du phosphore par rapport aux champignons microscopiques (Alam *et al.*, 2002). L'inoculation de semences ou de sol avec des bactéries solubilisant le phosphate est connue pour l'amélioration de la solubilisation des phosphates présents dans le sol. Cette opération favorise la croissance des plantes et contribue à un meilleur rendement (Yadav et Dadarwal, 1997). Cependant les performances de ces bactéries sont sévèrement affectées par les facteurs environnementaux, en particulier dans des conditions de stress (Ahemad et Khan, 2012). Il a été rapporté également que des concentrations plus élevées de bactéries solubilisant le phosphate se retrouvent couramment dans le sol rhizosphériques par rapport à un sol non rhizosphériques (Reyes *et al.*, 2007).

Pour l'isolement, et le criblage des bactéries solubilisant le phosphate (BSP) dans nos échantillons de sol, nous avons utilisé le milieu Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) additionné de phosphate tricalcique comme seule source de phosphore. Ce milieu est largement adopté par la majorité des chercheurs comme un support d'isolement de ce groupe de bactéries. D'ailleurs, plusieurs études ont montré la présence d'un grand nombre de bactéries très variées présentant différentes formes telles que la forme bâtonnet, la forme spirale et la forme Cocci (Khan *et al.*, 2010). Parmi celle-ci, les bacilles en forme de bâtonnet semblent être les plus abondants dans le sol et les plus performantes en terme de solubilisation de phosphate (Khan *et al.*, 2010).

La caractérisation des isolats a permis de constater que toutes les bactéries appartenant à notre collection sont des bacilles et que la plupart sont des bactéries à coloration de Gram négatif. L'identification phénotypique des bactéries isolées a montré leur appartenance aux six genres: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Aeromonas* et *Burkholderia*. Les bactéries à coloration de Gram négative, de forme bâtonnets, non sporulées appartenant au groupe de Proteobacteria sont généralement considérées comme des souches bactériennes les plus dominantes dans la rhizosphère (Atlas et Batrha, 1998) alors que les espèces de *Pseudomonas* sont généralement considérées comme les plus abondantes (Ahmad *et al.*, 2008b).

D'ailleurs, Srinivasan *et al.*, (2012) ont également isolés les genres de *Pseudomonas* et de *Bacillus* comme étant des bactéries solubilisant le phosphate à partir du sol salin. De plus, les travaux de Ashraf et Harris (2004) ont démontré la présence de deux espèces bactériennes, *Aeromonas hydrophila* et *Bacillus* sp. dans le sol rhizosphérique de plantes de blé cultivées dans un sol salin. De même, Upadhyay *et al.*, (2011) ont rapporté que les genres, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium* et *Paenibacillus* sont dominants dans la rhizosphère du blé cultivé dans des sols salins.

Cependant, Divers genres de bactéries comme *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Serratia* et *Azotobacter*, provoquent un effet prononcé sur la croissance des plantes, elles sont appelés rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Glick *et al.*, 2007a; Nadeem *et al.*, 2014).

L'identification bactérienne a été faite par des tests classiques pour la recherche des caractères phénotypiques des bactéries, toutefois certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement pour diverses raisons. En effet, certaines bactéries expriment peu de ces caractères. Pour d'autres espèces, une situation de stress peut les altérer. Une identification

basée exclusivement sur des caractères phénotypiques peut donc mener à un résultat erroné.

Enfin, pour certaines bactéries à croissance difficile, ces caractères sont difficiles à déceler, dans ce cas, la biologie moléculaire simplifie l'identification (Petti *et al.*, 2005). Dans ces situations, l'amplification et le séquençage du gène ARNr 16S suivi par la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données ont démontré leur efficacité pour l'identification bactérienne. Il s'agit d'une méthode universelle, précise et objective, dont la variabilité inter-opérateur est limitée par rapport aux techniques conventionnelles (Petti, 2007). Des travaux préliminaires ont pu montrer que le gène ARNr 16S code pour un ARN ribosomal de fonction constante dans l'évolution. Les séquences du gène ARNr 16S ont ainsi joué un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne (Janda et Abbott, 2007). Pour différencier certains genres ou pour décrire une espèce bactérienne, une amplification du gène ARNr 16S par PCR est nécessaire. L'amplification des gènes avec la PCR est une technique rapide avec une sensibilité et une spécificité élevée, elle est donc un outil majeur d'exploration de la diversité bactérienne (Joshi et Deshpande, 2011). Dans la présente étude l'identification moléculaire par le séquençage du gène l'ARNr16S a permis l'affiliation phylogénétique des isolats PSB18 et PSB45 à l'intérieur du genre *Enterobacter* par comparaison aux séquences des espèces les plus proches. Les séquences des isolats PSB45 et PSB87, après alignement avec des espèces proches, assigne une parenté de 99% avec l'espèce *Serratia odorifera* et le dernier isolat (PSB91) était identifié comme *Bacillus cereus* avec une similitude de 100% avec l'espèce la plus proche.

## 2. Caractérisation physiologique des isolats bactériens (activités PGP)

En raison de la variation des populations de bactéries solubilisant le phosphate dans différents habitats agro-écologiques et compte tenu de leur diversité fonctionnelle, il est devenu extrêmement important de rechercher des BSP avec des propriétés biologiques et chimiques variées.

La méthode d'observation de la zone de solubilisation du phosphate ne peut être utilisée que pour des tests qualitatifs. Alors une fois que les BSP performantes ont été sélectionnées, elles ont été testées pour leur capacité à solubiliser le phosphate insoluble dans un milieu de culture liquide.

A travers les tests d'estimation quantitative, les isolats bactériens appartenant aux différents genres identifiés ont montré divers niveaux d'activité de solubilisation du phosphate dans le milieu NBRIP liquide (Nautiyal, 1999). Nos résultats expérimentaux rejoignent ceux des travaux antérieurs mentionnant que le milieu NBRIP est le meilleur milieu liquide pour la

solubilisation du phosphate par la plupart des rhizobactéries (Johri *et al.*, 1999; Nautiyal *et al.*, 2000; Cherif-Silini *et al.*, 2013; Chibani *et al.*, 2017).

Des résultats similaires ont été rapportés par Goldstein (2000) en confirmant que les bactéries représentées par les genres *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* et *Serratia* sont très efficaces dans la solubilisation des formes complexes du phosphate insolubles à des formes accessibles aux plantes. La solubilisation du phosphate a été communément détectée chez les isolats de *Bacillus* (80%) suivie de *Pseudomonas* (55,56%) (Ahmad *et al.*, 2008a). Plusieurs études ont démontré que certaines souches de *Burkholderia* ont des propriétés de solubilisation du phosphate (Peix *et al.*, 2001; Caballero-Mellado *et al.*, 2007).

Le pH des cultures bactériennes a baissé significativement par rapport au témoin non inoculé, pour lequel le pH est resté presque constant à  $7,1 \pm 0,2$ . Des résultats similaires ont été observés par Khalil et Sultan (2000), Alam *et al.*, (2002) et Muleta *et al.*, (2013). Jeon *et al.*, (2003) ont également trouvé que les quantités de phosphates solubles produites à partir de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  par des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus megaterium* variaient de 427,7 à 489,4 mg/l et que les valeurs de pH des cultures ont été réduites d'un pH 7 à des valeurs comprises entre 4 et 4,4. Une corrélation négative hautement significative ( $r = -0,88$ ) a été observée entre les quantités de phosphate solubilisé et les valeurs de pH. De même, une corrélation négative avec une valeur très proche ( $r = -0,86$ ) a été rapportée par Xiao *et al.*, (2009). Le mode d'action des bactéries solubilisant le phosphate dans le sol est attribué à la sécrétion des acides organiques dans le milieu de culture (Khan *et al.*, 2014; Oteino *et al.*, 2015). Selon Ramos-Solano *et al.*, (2008) et Khan *et al.*, (2010), ce mode d'action est généralement beaucoup plus efficace dans les sols neutres et basiques, cela laisse suggérer que nos isolats bactériens ont utilisé ce même mécanisme d'action vu qu'un déclin dans les valeurs de pH des cultures bactériennes a été observé pour l'ensemble des milieux de culture inoculés.

L'activité de la solubilisation du phosphate est également déterminée par la capacité des isolats à libérer des métabolites tels que des acides organiques qui, par leurs groupes hydroxyle et carboxyle, chélatent le cation lié aux phosphates, ces derniers étant convertis en formes solubles (Sagoe *et al.*, 1998).

Divers groupes de bactéries composés essentiellement de genres, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Azotobacter* utilisent une variété de réactions de solubilisation, telles que l'acidification, la chélation, les réactions d'échange et la

production d'acide gluconique pour libérer du phosphore soluble à partir de phosphate insoluble (Pandey et Maheshwari, 2007). Dans notre cas l'analyse par HPLC des produits de la solubilisation du phosphate par les isolats sélectionnés a pu détecter plusieurs acides organiques à savoir l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide succinique, l'acide oxalique et l'acide acétique dont la concentration de l'acide gluconique est la plus importante. Des résultats similaires ont été rapportés par Mardad *et al.*, (2013) et de Abreu *et al.*, (2017) qui ont révélé la présence des acides comme l'acide citrique, l'acide malique, l'acide gluconique, l'acide lactique, l'acide succinique et l'acide acétique suite à une solubilisation du phosphate par les isolats *Enterobacter et Bacillus* avec une concentration élevée de l'acide gluconique. Dans d'autres études, les acides gluconique, 2-kétogluconique, oxalique, succinique, citrique et lactique ont été parmi les métabolites les plus fréquemment produits par les BSP (Roderíguez et Fraga, 1999; Khan *et al.*, 2010; Behera *et al.*, 2016). Il a été suggéré que le type d'acide produit par chaque espèce bactérienne dépend de paramètres complexes tels que le statut nutritionnel, la physiologie de la culture, la concentration et la composition des éléments nutritifs dans le milieu de culture (Chen *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

Les résultats de l'étude de la corrélation entre la solubilisation du phosphate sur milieu PVK solide et en milieu NBRIP liquide se sont avérés non significatives. Cette contradiction entre le taux de solubilisation sur milieu solide et en milieu liquide peut être attribuée vraisemblablement à la variation du taux de diffusion des différents acides organiques sécrétés par la bactérie. D'ailleurs, ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par El-Azeem *et al.*, (2007) et Baig *et al.*, (2010) qui ont rapportés que certains isolats produisant un halo clair de petit diamètre de solubilisation sur milieu solide ont été très efficaces dans la dissolution du phosphate insoluble en milieu liquide. En revanche, d'autres isolats bactériens ont produit un halo clair de grand diamètre sur milieu solide tandis qu'ils ont montrés un faible taux de solubilisation de phosphate en milieu liquide.

La production des phytohormones comme les auxines par les PGPR a été signalée par divers chercheurs au cours de ces dernières années (Giordano *et al.*, 1999; Rajkumar et Freitas, 2008; Ahemad et Khan, 2012). Parmi les hormones végétales, les auxines sont les principaux régulateurs de croissance des plantes produits par les microorganismes solubilisant le phosphate (Oves *et al.*, 2013) et présentent de nombreuses fonctions physiologiques pour les plantes. L'acide indole acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus courante chez les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, elle est la molécule résultante du

métabolisme du L-tryptophane chez les microorganismes. L'acide indole acétique est une phytohormone connue pour être impliquée dans l'initiation des racines, la division cellulaire et l'agrandissement cellulaire (Glick, 2007a). Il a été rapporté que la production de l'AIA par les PGPR peut varier selon les espèces bactériennes et que les conditions de culture, la phase de croissance de la bactérie et la disponibilité du substrat peut influencer sa production (Sajjed Mirza *et al.*, 2001).

Les résultats de notre étude ont démontré que tous les isolats bactériens testés appartenant aux différents genres avaient la capacité de produire de l'auxine AIA. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chaiharn et Lumyong (2011), qui ont constaté qu'environ 80% des bactéries de la rhizosphère peuvent sécréter de l'AIA, cela semble être dû à une forte quantité de matières organiques dérivées des racines des plantes et des exsudats radiculaires nécessaires à la croissance microbienne. El-Tarabilya et Sivasithamparamb (2006) et Tsavkelova *et al.*, (2006) ont trouvé que les microorganismes du sol ont la capacité de produire de l'AIA et de favoriser la croissance des plantes. Des niveaux élevés de production de l'AIA par des espèces de *Pseudomonas* ont été enregistrés dans les travaux de Ahmad *et al.*, (2008a), Kumar *et al.*, (2012) et Kaur et Sharma (2013). D'autres bactéries productrices de l'AIA appartenant aux genres *Aeromonas*, *Burkholderia* (Halda-Alija, 2003) et *Bacillus* (Swain *et al.*, 2007) ont été rapportées. Les travaux de Ogbo et Okonkwo (2012) ont montré que la bactérie *Enterobacter* sp. produit environ 20 µg/ml. Les mêmes propriétés ont été également signalées chez le même genre par les auteurs Kim *et al.*, (2014). Cette production d'AIA est aussi confirmée par Bose *et al.*, (2016) par l'espèce bactérienne *Enterobacter cloacae*. Cette même espèce a montré une bonne prolifération et une meilleure élongation des racines des plants de blé par rapport au témoin non inoculé. L'espèce *Serratia marcescens* isolée par Selvakumar *et al.*, (2008) s'est révélée également un bon candidat pour la production de l'AIA.

La présence de bactéries fixatrices d'azote dans le sol et leur isolement ainsi que la possibilité de leur conversion en biofertilisant est une stratégie importante et une solution alternative à l'utilisation des engrais chimiques coûteux et polluants en particulier dans les sols pauvres en nutriments. La fixation biologique d'azote constitue une source majeure de l'azote pour les plantes dans le cadre d'une pratique agricole respectueuse de l'environnement (Cakmakci *et al.*, 2006). Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que la majorité des isolats bactériens testés ont été capable de fixer l'azote atmosphérique. Actuellement, il est admis scientifiquement que les effets de stimulation des plantes par les PGPR sont liés

essentiellement à leur capacité à fixer l'azote. Parmi les genres bactériens couramment cités, *Azoarcus* sp., *Burkholderia* sp. et *Gluconacetobacter* (Vessey, 2003).

Selon la littérature, les souches bactériennes fixatrices d'azote telles que *Pseudomonas* et *Bacillus* présentent un grand intérêt dans le domaine de la fixation d'azote (Cakmakci *et al.*, 2007). Ainsi leurs formulations biologiques sont utilisées comme biofertilisants pour un meilleur rendement et une meilleure qualité de la culture du blé, du betterave sucrière et des épinards (Cakmakci *et al.*, 2006). Zhang *et al.*, (1996) ont rapporté que l'espèce *A. hydrophila* avait la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Les travaux de Lwin *et al.*, (2012) ont montré que des isolats rhizosphériques identifiés comme *Serratia* spp. et *Bacillus* spp. avaient une grande capacité à fixer l'azote sur milieu G-NFM solide avec le BBT comme indicateur coloré. Conformément à nos résultats, *Bacillus* spp. et *Burkholderia cepacia* ont également été rapportés pour fixer l'azote atmosphérique (Hongrattipun *et al.*, 2014; Habib *et al.*, 2016a).

Les siderophores sont des protéines chélateurs de fer à faibles poids moléculaire, ils sont considérés comme des agents importants dans l'amélioration de la croissance des plantes, soit directement, en fournissant du fer à la plante ou indirectement en influençant la croissance des plantes. D'ailleurs, les travaux de Sujatha et Ammani (2013) en appliquant ces sidérophores ont montré que les plants testés étaient capables de prendre le fer marqué par un grand nombre de rhizobactéries favorisant ainsi leur croissance. Il est à signaler aussi que, les sidérophores produites par les PGPR peut empêcher la prolifération de microorganismes pathogènes en séquestrant le  $Fe^{3+}$  dans la zone autour de la racine (Siddiqui, 2005). Nos résultats ont montré que les isolats bactériens appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* étaient les meilleurs producteurs de sidérophores, alors que les isolats appartenant au genre *Bacillus* sp. étaient incapables de les produire. Diverses études ont signalé que des espèces du genre *Pseudomonas* produisaient des sidérophores (Boopathi et Rao, 1999). Nos résultats sont appuyés par les conclusions de García-Gutiérrez *et al.*, (2012) qui ont rapporté que toutes les souches de *Pseudomonas* synthétisaient les sidérophores tandis qu'une seule souche de *Bacillus* parmi toutes les *Bacillus* isolées était capable de produire ces composés. Il est rapporté par certains chercheurs que l'isolat *Burkholderia cepacia* présente une forte capacité de production des sidérophores (Bevivino *et al.*, 1998; Luvizotto *et al.*, 2010).

L'acide cyanhydrique (HCN) est un métabolite secondaire volatil qui inhibe la croissance et le développement des microorganismes. Cet acide (HCN) produit par les bactéries provenant de la rhizosphère joue un rôle primordial et important dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes (Siddiqui *et al.*, 2006). A ce jour, de nombreux genres de bactéries rhizosphériques ont montré une capacité de production de l'acide cyanhydrique, y compris des espèces d'*Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* et *Rhizobium* (Devi *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008a). La production de l'HCN est une propriété commune chez le groupe des *Pseudomonas* présents dans la rhizosphère. Des travaux antérieurs ont montré qu'environ 50% des *Pseudomonas* isolés à partir de la rhizosphère de pomme de terre et de blé étaient capables de produire de l'HCN *in vitro* (Bakker et Schippers, 1987). Selon Selvakumar *et al.*, (2008) et Singh et Jha (2016), l'espèce bactérienne, *Serratia* spp. avait une grande capacité de production d'HCN et de sidérophores. Une meilleure production d'HCN et de sidérophores a été également détectée chez la souche *Enterobacter* sp. isolée de la rhizosphère de blé (Kumar *et al.*, 2014).

La production d'ammoniac est une caractéristique importante des PGPR. Cette propriété influence indirectement la croissance des plantes (Yadav *et al.*, 2010). Les PGPR favorisent la croissance des plantes et contrôlent les agents phytopathogènes par divers mécanismes tels que la production et la libération de l'HCN, de l'ammoniac et des antibiotiques (Berg, 2009). Notre étude a montré que tous les isolats bactériens étaient capables de produire de l'ammoniac. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Ahmad *et al.*, (2008a). Ces derniers ont révélé que la production d'ammoniac est communément détectée chez tous les isolats de *Pseudomonas*, de *Bacillus* et d'*Azotobacter*. De même et selon Yadav *et al.*, (2010), tous les *Bacillus* et les *Pseudomonas* isolés de la rhizosphère de la culture de pois chiche en Inde ont produit de l'ammoniac. Ainsi il a été rapporté qu'une PGPR identifiée comme *Serratia marcescens* avait la capacité à produire l'ammoniac (Singh et Jha, 2016).

### 3. Effet de stress salin sur les isolats bactériens

A travers les différents tests de sélection, nous avons ainsi retenu 5 isolats bactériens. Ces derniers ont montré des activités PGP très importantes. L'identification de ces isolats performants ayant un maximum d'activités PGP a révélé que les 2 premiers isolats (PSB18, PSB45) appartiennent aux genres *Enterobacter* sp. alors que les deux autres isolats (PSB41, PSB87) sont identifiés comme *Serratia odorifera*. Le dernier isolat semble appartenir à l'espèce *Bacillus cereus* (PSB91). Ces isolats bactériens ont été testés pour leur tolérance au

sel et leur capacité à solubiliser le phosphate sous stress salin. Les résultats ainsi obtenus ont montré une forte tolérance au sel à des concentrations comprises entre 100 et 400 mM de NaCl chez tous les isolats bactériens testés. Des résultats similaires ont été obtenus par Silini-Cherif *et al.*, (2012) qui ont démontré que la croissance de la rhizobactérie isolée du sol salin *Pantoea agglomerans* lma2 augmente à des concentrations de NaCl comprises entre 100 et 400 mM. Ces travaux attestent que ces bactéries semblent avoir une forte tolérance au sel.

Plusieurs travaux ont signalés que les bactéries isolées des environnements arides ou salins sont capables de survivre à des concentrations salines inhibitrices par rapport à celles isolées d'habitats non salins (Hayat *et al.*, 2013). Ainsi, les travaux de Habib *et al.*, (2016 a, b) sur des rhizobactéries isolées du sol salin ont révélé que ces bactéries sélectionnées pour leurs activités PGP ont montré des propriétés importantes de tolérance au sel. Ces bactéries ont été identifiées comme *Enterobacter* sp. et *Bacillus cerus*. Quelques études ont également montré que des souches bactériennes isolées du sol alcalin peuvent solubiliser les phosphates à des concentrations élevées de sel et des pH et des températures élevées (Nautiyal, 1999; Rodriguez et Fraga, 1999).

La capacité des BSP de résister aux conditions environnementales défavorables telles que la salinité élevée, le pH élevé / bas et la température élevée est non seulement importante pour la survie des rhizobactéries dans les sols agricoles, mais peut aussi être considéré comme un critère de sélection pour un biofertilisant (Johri *et al.*, 1999). D'ailleurs, la solubilisation du phosphate chez les rhizobactéries induite par un stress a été étudiée par plusieurs chercheurs (Gaind et Gaur, 1991; Johri *et al.*, 1999; Nautiyal *et al.*, 2000; Son *et al.*, 2006). Une augmentation du taux de solubilisation a été observée avec l'augmentation de la concentration de NaCl pour l'ensemble des isolats bactériens à des concentrations comprise entre 200 et 400 mM. Les résultats de notre étude sont en accord aux résultats rapportés par Cherif-Silini *et al.*, (2013) chez la rhizobactérie du genre *Bacillus*.

Globalement, il apparaît donc que dans le bouillon nutritif, les isolats les plus tolérants aux sels sont les plus efficaces dans le test de la solubilisation des phosphates dans le milieu NBRIP même à des concentrations élevées de NaCl. Parmi l'isolat ayant montré une bonne tolérance au NaCl, l'isolat PSB87. Ce dernier a montré une grande capacité à solubiliser le phosphate même à des taux élevés de NaCl. Ces résultats étaient globalement comparables à ceux rapportés par Son *et al.*, (2006), qui ont constaté que la souche *Pantoea agglomerans* isolée de sol salin avait une grande capacité à tolérer des concentration de NaCl allant de 1 à 5% de NaCl et à solubiliser le phosphate à des taux élevés de NaCl.

#### 4. Effet de l'inoculation sur la croissance de blé dur

Pour cette étude, seuls les isolats bactériens ayant montré une grande capacité à solubiliser le phosphate ont été retenus pour réaliser des inoculas. La performance de ces isolats a été testée dans des pots cultivés par la plante de blé (*Tritus*) qui est une culture d'importance économique en Algérie.

Il est connu depuis longtemps que l'inoculation des espèces végétales avec les PGPR peut augmenter la concentration en éléments nutritifs dans la plante hôte (Canbolat *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2008). Cette augmentation peut s'accroître surtout chez les sujets exposés au stress salin car la salinité du sol réduit significativement l'absorption des nutriments par les plantes, en particulier l'absorption du phosphate, qui se précipite avec les ions  $\text{Ca}^{+2}$  dans les sols salins (Grattan et Grieve, 1999). Selon les résultats, les BSP (Bactéries solubilisant le phosphate) peuvent être considérées comme un excellent outil pour l'augmentation de la disponibilité du phosphore chez les plantes par minéralisation du phosphore organique du sol et par solubilisation des précipités de phosphate (Kucey *et al.*, 1989; Pradhan et Sukla, 2006). D'ailleurs quelques études ont montré les potentialités d'utiliser les BSP pour augmenter les rendements des cultures jusqu'à 70% (Verma, 1993).

Les résultats de ce test ont montré que l'inoculation des plants de blé par les isolats les plus performants précédemment cités a permis une amélioration de la croissance avec une augmentation du taux de chlorophylle et du phosphore des plants de blé. Cette amélioration a été constatée même sous un traitement contenant le phosphore soluble et sans addition de sel par rapport aux témoins non inoculés.

En effet, plusieurs travaux ont montré que des graines de blé inoculées par la souche *Serratia marcescens* ont enregistré une amélioration dans la longueur et la biomasse des racines et des tiges par rapport au témoin non inoculé (Selvakumar *et al.*, 2008). Ainsi, une augmentation de l'absorption de l'azote, du phosphore et de potassium a été observée dans le traitement bactérien par rapport aux témoins non inoculés. Il a été suggéré que ce phénomène peut être attribué à la capacité de l'isolat à produire de l'AIA, car l'AIA influence positivement la croissance et le développement des racines, augmentant ainsi l'absorption des nutriments (Khalid *et al.*, 2004).

De même, la hauteur et le poids frais des plantes de blé ont été significativement plus élevés avec l'inoculation par *Enterobacter* sp. en comparaison avec le témoin dans notre travail. Dans une étude réalisée par Tahir *et al.*, (2013), il a été démontré que l'inoculation des plants de blé avec des souches bactériennes solubilisant le phosphate et productrices des

phytohormones telles que *Azospirillum*, *Bacillus* et *Enterobacter* a amélioré la croissance et le rendement des grains du blé.

En effet, la plupart des isolats de PGPR testés au cours de notre étude ont montré des caractères PGP positifs, par exemple la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA, de l'HCN, de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) et des sidérophores. Ces potentialités semblent jouer un rôle efficace pour la plante afin de l'aider à mieux absorber les nutriments. D'ailleurs, quelques études ont été menées par Banerjee *et al.*, (2010), Abbasi *et al.*, (2011) et Rana *et al.*, (2011) en inoculant de grains de blé avec différentes rhizobactéries et les résultats obtenus ont permis une meilleure croissance des plantes.

L'absence du phosphore dans le traitement de plants de blé a révélé une diminution de croissance dans les racines et les tiges avec une diminution des taux de chlorophylle et de phosphores absorbé par rapport au traitement contenant le phosphore soluble. Il est rapporté dans la littérature que, la carence en phosphore entraîne une diminution de la photosynthèse et une augmentation de la teneur en amidon des chloroplastes liée à la diminution du transfert de triose phosphate du chloroplaste vers le cytoplasme et se traduit le plus souvent par des retards de croissance : un moindre développement, des accidents végétatifs et, bien entendu, une production amoindrie (Rausch et Bucher, 2002).

Les résultats de notre étude a révélé un effet significativement positif de l'inoculation des plants de blé par les isolats bactériens choisis en absence de phosphore avec addition de phosphate tricalcique insoluble traduit par une amélioration de la croissance des plantes avec une augmentation du taux de chlorophylle et de phosphore foliaire. Ces résultats confirment que les isolats bactériens testés solubilisent le phosphate *in vivo*.

Un autre facteur contribuant à la disponibilité accrue de phosphore dans la région rhizosphérique, est la capacité des isolats à solubiliser le phosphate avec des quantités importantes de phosphore libres dans le test *in vitro*. Il est bien établi que l'amélioration de la nutrition du phosphore influence la croissance globale des plantes et le développement des racines (Jones et Darrah, 1994).

Rivas *et al.*, (2007) ont rapporté que la souche *Mesorhizobium tianshanense* a solubilisé le phosphate insoluble lorsqu'elle est inoculée dans des pots cultivés par des plants de pois chiche avec une teneur importante de phosphore absorbé. Ainsi, Babana et Antoun (2007) ont constaté une amélioration dans le rendement et le taux de phosphore chez les plantes de blé inoculées par *Pseudomonas* sp. avec une solubilisation du phosphate insoluble additionné au sol. Cependant, l'inoculation des plants de fraises avec l'isolat solubilisant le

phosphate P-SAPA2 identifié comme *Pseudomonas* en présence de phosphate tricalcique a amélioré la croissance de la plante et a augmenté l'absorption du phosphate en comparaison avec les plantes non inoculées (Martin *et al.*, 2007).

Le stress salin impose une menace environnementale majeure à l'agriculture surtout dans les zones arides et semi arides en limitant la croissance des plantes et en réduisant le rendement des cultures végétales, car il réduit la capacité des plantes à utiliser l'eau et entraîne une réduction du taux de croissance ainsi que des changements du métabolisme végétal (Paul et Lade, 2014). Les plantes qui se développent dans des conditions salines sont stressées essentiellement de trois manières à savoir, une réduction du potentiel hydrique dans la zone racinaire causant le déficit hydrique, une phytotoxicité des ions tels que  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  et un déséquilibre des nutriments par dépression dans l'absorption et/ou le transport de ceux-ci dans les tiges. Cela peut en partie être attribué au fait que  $\text{Na}^+$  rentre en concurrence avec  $\text{K}^+$  pour les sites de liaison essentiels pour les fonctions cellulaires (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester et Davenport, 2003).

L'effet de la salinité sur les plants de blé a été vérifié dans notre expérience, traduit par une diminution de la croissance des racines et des tiges avec une diminution de la teneur en chlorophylle et des taux de phosphore et de potassium et une augmentation des taux de sodium dans les feuilles, par rapport à ceux sans addition de sel. Cela peut être expliqué en partie par l'effet négatif du sel sur la photosynthèse qui, entraîne une réduction de la croissance des plantes et de la teneur en chlorophylle.

De nombreuses études ont montré l'influence négative de différentes concentrations de NaCl sur la croissance des tiges de plantes (Yilmaz et Kina, 2008; Manaf and Zayed, 2015).

En effet, plusieurs chercheurs ont démontré l'effet positif des rhizobactéries en termes d'atténuation de l'impact négatif de la salinité sur la croissance des cultures en laboratoire et sur le terrain (Jalili *et al.*, 2009; Alizadeh *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2014; Nadeem *et al.*, 2014). Selon les travaux de Bharti, *et al.*, (2016) une augmentation significative de la croissance des plantes de blé inoculées par une PGPR halotolérante identifiée comme *Dietzia natronolimnaea* STR1 a été observée par rapport aux plantes non inoculées (témoins) dans des conditions non salines et salines (avec 150 mM de NaCl). Nos résultats ont également confirmé que l'inoculation du sol avec *Enterobacter*, *Serratia* et *Bacillus* a amélioré la croissance des plantes dans des conditions salines. Ramadoss *et al.*, (2013) ont étudié l'effet de cinq bactéries halotolérantes favorisant la croissance des plantes de blé. Ces auteurs ont constaté que l'inoculation de ces souches bactériennes halotolérantes pour le stress salin (80,

160 et 320 mM) chez les plants de blé a conduit une augmentation de la longueur des racines de 71,7% par rapport aux témoins non inoculés. D'ailleurs, *Hallobacillus* sp. et *B. halodenitrificans* ont montré une augmentation de plus de 90% de l'allongement des racines et une augmentation de 17,4% de leurs poids sec par rapport aux plants de blé non inoculés à 320 mM de NaCl indiquant une réduction significative des effets délétères du NaCl.

Dans une étude similaire, Nadeem *et al.*, (2013) ont observé une augmentation significative du taux de germination, de la croissance, du rendement et de l'état nutritionnel des plants de blé inoculés avec *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* et *Serratia ficaria* lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions salines. En outre, la croissance des grains, la nodulation et l'absorption des nutriments ont été significativement améliorées suite à une inoculation avec un mélange de PGPR où il y avait une réduction de stress salin due à l'application microbienne (Ahmad *et al.*, 2012).

Summart *et al.*, (2010) ont signalé que, à un niveau élevé de sel, les cellules de riz ont accumulé un niveau élevé de  $\text{Na}^+$  alors que l'accumulation de  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}_2^+$  a été diminué. En effet, la majorité des bactéries du sol peuvent synthétiser des osmolytes organiques compatibles spécifiques, tels que la glutamine, la proline et la glycine bêtaïne contribuant à l'atténuation de l'effet de stress salin (Paul et Lade, 2014). Dans une autre étude réalisée par Egamberdieva *et al.*, (2008), huit souches bactériennes tolérantes au sel ont été isolées de la rhizosphère des cultures de blé. Ces souches ayant des activités potentiellement bénéfiques favorables à la croissance des plantes à savoir, la production d'auxine, la production d'HCN, de lipase ou de protéase, ont pu améliorer la croissance des plants de blé. Ashraf et Harris (2004) ont constaté une augmentation du poids sec des racines (149 à 522%) et des tiges (85 à 281%) en inoculant les plants de blé par des bactéries productrices de polysaccharides et ces derniers empêchent l'absorption de sodium par la racine de la plante. Plus récemment une application de *Serratia marcescens* CDP-13 a rétabli également l'intégrité de la membrane en minimisant les dommages oxydatifs et favorise la croissance des plants de blé sous divers niveaux de stress salin. La souche *Serratia marcescens* CDP-13 a pu induire efficacement les paramètres physiologiques et biochimiques dans les plants de blé, ce qui leur permet de faire face à la toxicité induite par la salinité et de maintenir leur capacité métabolique fondamentale sous le stress salin. L'isolat d'essai augmente le mécanisme de défense antioxydant sous divers niveaux de salinité, ce qui suggère l'induction d'une réponse systémique et fournit un aperçu précieux de la tolérance à la salinité améliorée par ce microorganisme (Singh et Jha, 2016). Les résultats obtenus par Orhan (2016) rapportent que

les isolats halotolérants et halophiles identifiés comme *Z. halotolérans*, *S. succinus*, *B. gibsonii*, *O. oncorhynchi*, *Halomonas* sp. et *Thalassobacillus* sp. ont augmenté significativement la croissance des plants de blé sous stress salin (200 mM de NaCl).

L'inoculation du sol par *Azotobacter* ou *Streptomyces*, ou par les deux, a significativement augmenté la profondeur de la racine, la hauteur des tiges, le poids frais et sec des racines et des tiges sous les conditions salines. Cette inoculation du sol a augmenté le taux de phosphore à 20, 40, 60 et 80 mM de NaCl avec une amélioration des concentrations de K et de Mg par rapport aux témoins dans des conditions normales et salines avec une diminution des concentration de Na<sup>+</sup> dans les plantes (Aly *et al.*, 2012). En revanche, Woitke *et al.*, (2004) ont montré que l'inoculation de graines de tomates avec *Bacillus subtilis*, n'a pas eu d'effet significatif sur le rendement de la tomate cultivée en conditions salines et le rendement a significativement diminué dans le traitement à haute salinité. Ces résultats étaient globalement comparables à nôtres résultats et qui ont révélés que l'inoculation avec *Bacillus* a un effet réduit par rapport aux autres bactéries.

Il a été suggéré que la tolérance de la salinité méditée par les PGPR halotolérantes est un phénomène complexe qui implique la modulation de la signalisation de l'acide abscissique, de la voie SOS (Salt Overly Sensitive), des transporteurs d'ions et de la machinerie antioxydante (Bharti, *et al.*, 2016). Bien que la production des phytohormones par les PGPR aient déjà été identifiées comme stratégie pour améliorer la croissance et le développement des plantes sous stress abiotiques (Iqbal et Ashraf, 2013; Kang *et al.*, 2014). Ceci est ainsi en corrélation avec nos résultats.

Ce travail a montré les potentialités d'utiliser de telles bactéries rhizosphériques comme bioinoculum efficaces, en outre ces expériences doivent être complété par des tests capables de préciser les processus et les conditions qui conduisent les souches de PGPR à être des candidats efficaces et performants dans l'amélioration de la croissance des plantes.

Ces résultats indiquent aussi que les bactéries halotolérantes isolées à partir d'environnements salins ont le potentiel d'améliorer la croissance des plantes sous le stress salin et /ou en absence de phosphore par des mécanismes directs ou indirects et seraient les plus appropriées comme bioinoculants dans de telles conditions.



**Conclusion et  
perspectives**

## Conclusion et perspectives

Les bactéries solubilisant le phosphate constituent un groupe de bactéries favorisant la croissance des plantes qui jouent un rôle majeur dans la nutrition des plantes en améliorant la disponibilité du phosphate par la solubilisation des formes inorganiques insolubles.

Ce travail se proposait d'étudier l'effet de l'inoculation d'une variété de blé par des bactéries solubilisant le phosphate isolées du sol salin et identifiées comme ayant une multitude d'activités favorisant la croissance des plantes.

Dans ce travail, nous avons réalisé plusieurs types d'approches qui nous ont permis d'isoler et de sélectionner des espèces bactériennes à partir de la rhizosphère du blé cultivé dans un sol salin. Au total, 104 espèces bactériennes solubilisant le phosphate ont été purifiées et retenues dont 41 ont été sélectionnées suivant leur activité de solubilisation du phosphate. Ces isolats ont solubilisé de grande quantités de phosphate allant jusqu'à 738,57 µg/ml de phosphore libéré.

La plupart des isolats bactériens étudiés ont montré un fort potentiel pour produire des substances impliquées dans la promotion de la croissance des plantes tel que l'acide indole acétique (AIA), l'ammoniac (NH<sub>3</sub>), les sidérophores et la fixation de l'azote. En revanche, seulement 29, 26% des isolats étaient capables de produire l'acide cyanhydrique (HCN). L'identification biochimique de ces isolats a révélé leur appartenance à six genres différents: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Aeromomas* et *Burkholderia*.

Parmi les 41 isolats bactériens, cinq isolats se sont révélés les plus performants suivant leurs caractères PGP et ont été sélectionnées (PSB18, PSB41, PSB45, PSB87 et PSB91). Ces derniers ont une forte tolérance au sel avec une capacité à solubiliser le phosphate sous stress salin (>300 mM). Plusieurs acides organiques ont été secrétés après solubilisation du phosphate et identifiés comme acide gluconique, acide malique, acide citrique, acide lactique, acide succinique, acide oxalique et acide acétique. Ces bactéries ont été caractérisées génétiquement par le séquençage de leurs gènes ARNr 16S et identifiées comme appartenant à *Enterobacter sp.* (PSB18, PSB45), à *Serratia odorifera* (PSB41, PSB87) et à *Bacillus cereus* (PSB91). Les cinq bactéries solubilisant le phosphate les plus performantes ont été utilisées pour inoculer les grains de blé dur sous trois traitements (sans sel avec phosphore soluble, sans sel avec phosphate insoluble, avec 100 mM de NaCl plus phosphate insolubles).

Les propriétés de ces isolats ont été confirmées par des tests au laboratoire. En effet, cette inoculation à action stimulatrice de la croissance des plantes, a permis d'améliorer significativement les paramètres morphologiques (taille et masse foliaire et racinaire) et biochimiques (synthèse de pigments chlorophylliens, contenu foliaire en P, Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>) de plantes de blé avec différents pourcentages d'amélioration sous les trois traitements où le traitement sous stress salin a montré l'amélioration la plus importante chez tous les isolats. A travers ces tests, nous avons montré que les espèces bactériennes étudiées avaient un spectre élargi de compétence en matière de promotion de la croissance des plantes. Ceci confirme que les bactéries solubilisant le phosphate, isolées à partir du sol salin ont un potentiel d'activité varié en produisant des substances chimiques impliquées dans la promotion de la croissance des plantes. En effet, l'ampleur des augmentations des différents paramètres de croissance provoqués par les inoculas fait que ces isolats peuvent être considérés comme des excellents candidats.

Les tests que nous avons développés peuvent servir de base à la mise en évidence d'une banque d'isolats bactériens solubilisant le phosphate et présentant une multitude d'activités promotrice des plantes cultivées.

La mise au point de d'autres tests à petite échelle permettra de révéler d'autres aspects de l'activité promotrice des isolats et de rechercher des espèces plus performantes afin de les utiliser dans la lutte contre les maladies d'origine tellurique.

Il serait également intéressant de poursuivre des études sur ces isolats en réalisant d'autres tests physiologiques et métaboliques afin d'étudier leur efficacité.

D'autres études supplémentaires, y compris le test d'efficacité des bactéries solubilisant le phosphate dans des conditions normales et stressantes à grande échelle, sont toutefois nécessaires pour consolider le rôle de ces bactéries comme biofertilisants compétents. Une fois les essais sur le terrain montrent des résultats prometteurs, cela pourrait permettre d'exploiter le potentiel des BSP en tant que bioinoculants bénéfiques à effets multiples à l'échelle commerciale pour accroître la croissance et la santé des plantes ce qui réduira probablement les problèmes liés à l'utilisation des engrais chimiques toxiques dans les pratiques agricoles.



**Références**  
**Bibliographiques**

## Références bibliographiques

- **Abbasi, M. K., Sharif, S., Kazmi, M., Sultan, T., Aslam, M. (2011).** Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. *Plant Biosystems*, 145(1), 159-168.
- **Ahemad, M., Khan, M. S. (2012).** Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere*, 86(9), 945-950.
- **Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. (2008a).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- **Ahmad, I., Pichtel, J., Hayat, S. (2008b).** Plant-bacteria Interactions: Strategies and techniques to promote plant growth. *John Wiley & Sons*, UK. p. 330.
- **Ahmad, M., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., Arshad, M. (2012).** The combined application of rhizobial strains and plant growth promoting rhizobacteria improves growth and productivity of mung bean (*Vigna radiata L.*) under salt-stressed conditions. *Annals of microbiology*, 62(3), 1321-1330.
- **Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., Rashid, M. (2002).** *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4, 454-458.
- **Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T. (2000).** Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. Strain isolated from sunflower roots. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3393-3398.
- **Alizadeh, O., Sharafzadeh, S., Firoozabadi, A. H. (2012).** The effect of plant growth promoting rhizobacteria in saline condition. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11(1), 1.
- **Allakhverdiev, S. I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Murata, N. (2000).** Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus*. Contribution of water channels. *Plant Physiology*, 122(4), 1201-1208.
- **Aly, M. M., El Sayed, H. E. A., Jastaniah, S. D. (2012).** Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. *Journal of American Science*, 8(5), 667-676.
- **Amir, H. G., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Marziah, M., Ramlan, M. F. (2005).** Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings

caused by PGPR under field nursery conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 36(15-16), 2059-2066.

- **Anand, K., Kumari, B., Mallick, M. A. (2016).** Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 37-40.
- **Arnon, D.I. (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1-15.
- **Ashraf, M., Athar, H. R., Harris, P. J. C., Kwon, T. R. (2008).** Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in agronomy*, 97, 45-110.
- **Ashraf, M., Foolad, M. (2007).** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.
- **Ashraf, M., Harris, P. J. C. (2004).** Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, 166(1), 3-16.
- **Atlas, R.M., Batrha, R. (1998).** Microbial Ecology: Fundamentals and Applications 4th ed. *Menlo Park CA Benjamin/Cummings*, Californie, USA. 694 p.
- **Babana, A. H., Antoun, H. (2007).** Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum L.*) in Mali. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 16-19 July, 2002, Spain. *Springer*, Netherlands. pp. 51-58.
- **Babana, A. H., Dicko, A. H., Maïga, K., Traoré, D. (2013).** Characterization of rock phosphate-solubilizing microorganisms isolated from wheat (*Triticum aestivum L.*) rhizosphere in Mali. *Journal of Microbiology and Microbial Research*, 1(1), 1-6.
- **Badawi, F. S. F., Biomy, A. M. M., Desoky, A. H. (2011).** Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(1), 17-25.
- **Baig, D. N., Bukhari, D. A., Shakoori, A. R. (2010).** Cry Genes profiling and the toxicity of isolates of *Bacillus thuringiensis* from soil samples against American bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of applied microbiology*, 109(6), 1967-1978.
- **Baig, K. S., Arshad, M., Shaharoon, B., Khalid, A., Ahmed, I. (2012).** Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Annals of microbiology*, 62(3), 1109-1119.
- **Bakker, A.W., Schippers, B. (1987).** Microbial cyanide production in the rhizosphere to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 451-457.

- **Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A., Döbereiner, J. (2005).** Genus *Azospirillum*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2<sup>nd</sup> edition. Whitman, w. B (ed.). Springer, New York, USA. pp. 7-26.
- **Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., Standing, D. (2010).** Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter sp.* and *Bacillus sp.* isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*, 4(6), 378-389.
- **Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. (2005).** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1761-1778.
- **Barriuso, J., Pereyra, M. T., García, J. L., Megías, M., Manero, F. G., Ramos, B. (2005).** Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus-Pinus sp.* *Microbial ecology*, 50(1), 82-89.
- **Bartholdy, B. A., Berreck, M., Haselwandter, K. (2001).** Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *BioMetals*, 14(1), 33-42.
- **Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., Thatoi, H. N. (2016).** Phosphate Solubilising Bacteria from Mangrove Soils of Mahanadi River Delta, Odisha, India. *World Journal of Agricultural Research*, 4(1), 18-23.
- **Bencharif, A. (1996).** La filière blé en Algérie: le blé, la semoule et le pain. *KARTHALA Editions*.
- **Berg, G. (2009).** Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.
- **Berrabah, F., Bourcy, M., Cayrel, A., Eschstruth, A., Mondy, S., Ratet, P., Gourion, B. (2014).** Growth conditions determine the DNF2 requirement for symbiosis. *PLoS one*, 9(3), e91866.
- **Bevivino, A., Sarrocco, S., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., Cantale, C., Chiarini, L. (1998).** Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(3), 225-237.
- **Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K., Kalra, A. (2016).** Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific Reports*, 6, 34768.
- **Bhattacharyya, P. N., Jha, D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.

- **Boopathi, E., Rao, K. S. (1999).** A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein structure and molecular enzymology*, 1435(1), 30-40.
- **Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., et al. (1996).** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 1935-1943.
- **Bose, A., Kher, M., Nataraj, M., Keharia, H. (2016).** Phytostimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L. f.) Spreng rhizosphere. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 128-137.
- **Botella, M., Del Amor, F., Amorós, A., Serrano, M., Martínez, V., Cerdá, A. (2000).** Polyamine, ethylene and other physico-chemical parameters in tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits as affected by salinity. *Physiologia Plantarum*, 109(4), 428-434.
- **Brick, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E. (1991).** Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 535-538.
- **Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P., Martínez-Aguilar, L. (2007).** The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5308-5319.
- **Cakmakci, R., Dönmez, F., Aydın, A., Şahin, F. (2006).** Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1482-1487.
- **Cakmakci, R., Dönmez, M. F., Erdoğan, Ü. (2007).** The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(3), 189-199.
- **Canbolat, M. Y., Bilen, S., Çakmakçı, R., Şahin, F., Aydın, A. (2006).** Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and fertility of soils*, 42(4), 350-357.
- **Cappuccino, J.G, Sherman, N. (1992).** Biochemical activities of microorganisms. In: Microbiology, A Laboratory Manual. *The Benjamin / Cummings Publishing Co.* California, USA.
- **Cardon, Z. G., Gage, D. J. (2006).** Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 37, 459-488.

- **Carmen, B., Roberto, D. (2011).** Soil bacteria support and protect plants against abiotic stresses. *In: Abiotic stress in plants mechanisms and adaptations.* Shanker, A., Venkateswarlu, B. (Eds.), *InTech.* pp. 143-170.
- **Chaiharn, M., Lumyong, S. (2011).** Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Current microbiology*, 62(1), 173-181.
- **Chakraborty, N., Ghosh, R., Ghosh, S., Narula, K., Tayal, R., Datta, A., Chakraborty, S. (2013).** Reduction of oxalate levels in tomato fruit and consequent metabolic remodeling following overexpression of a fungal oxalate decarboxylase. *Plant physiology*, 162(1), 364-378.
- **Chatterjee, R., Allen, R. M., Ludden, P. W., Shah, V. K. (1997).** *In Vitro* Synthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor and Maturation of the nif-encoded Apodinitrogenase effect of substitution of vnfh for nifh. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21604-21608.
- **Chehat, F. (2007).** Analyse macroéconomique des filières, la filière blés en Algérie. Projet PAMLIM « Perspectives agricoles et agroalimentaires Maghrébines Libéralisation et Mondialisation » Alger : 7-9 avril.
- **Chen, Y. P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W. A., Young, C.C. (2006).** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.
- **Cherif, H. (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus sp.* et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie. 162p.
- **Cherif-Silini, H., Silini, A., Ghouli, M., Yahiaoui, B., Arif, F. (2013).** Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *African Journal of Microbiology Research*, 7(37), 4562-4571.
- **Chesti, M. H., Ali, T. (2007).** Effect of integrated phosphorus management on yield, nutrient availability and phosphorus transformation in green gram. *Journal of Research*, 6, 243-248.
- **Chibani, H. R., Bellahcene, M., Djibaoui, R., Bouznad, A., Hamoum, H. (2017).** Optimization of inorganic phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus sp.* isolated from wheat rhizospheric soil. *International Journal of Biosciences*, 10(4), 142-150.
- **Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., Sa, T. (2005).** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1970-1974.

- **Claire Horner-Devine, M., Leibold, M. A., Smith, V. H., Bohannan, B. J. (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6(7), 613-622.
- **Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. A. (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959.
- **Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., Kim, D. S. (1995).** Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4197-4201.
- **Crowley, D. E. (2006).** Microbial siderophores in the plant rhizosphere. *In: Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.* Barton, L., Abadia, J. (Eds.), Springer, Netherlands. pp. 169-198.
- **Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W. (2002).** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10494-10499.
- **Dalisay, R. F., Kuć, J. A. (1995).** Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(5), 315-327.
- **de Abreu, C. S., Figueiredo, J. E., Oliveira, C. A., Dos Santos, V. L., Gomes, E. A., Ribeiro, V. P., et al. (2017).** Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and molecular research: GMR*, 16(1).
- **De Freitas, J. R., Banerjee, M. R., Germida, J. J. (1997).** Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus L.*). *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 358-364.
- **Devi, K. K., Seth, N., Kothamasi, S., Kothamasi, D. (2007).** Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (rambur) by cyanide poisoning under in vitro conditions. *Current microbiology*, 54(1), 74-78.
- **Dimkpa, C. O., Svatoš, A., Dabrowska, P., Schmidt, A., Boland, W., Kothe, E. (2008).** Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere*, 74(1), 19-25.
- **Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F. (2009).** Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment*, 32(12), 1682-1694.
- **Dobereiner, J. and Day, J. M. (1976).** Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. *In: Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation, (SNF' 75) Vol 2, Washington State University Press, Pullman, USA.* pp. 518-538.

- **Duffy, B., Schouten, A., Raaijmakers, J. M. (2003).** Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 501-538.
- **Edi-Premono, M., Moawad, M.A., Vleck, P.L.G. (1996).** Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11, 13-23.
- **Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., Lugtenberg, B. (2008).** High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, 10(1), 1-9.
- **Egamberdieva, D., Kucharova, Z. (2009).** Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biology and fertility of soils*, 45(6), 563-571.
- **El-Azeem, S. A. M. A., Mehana, T. A., Shabayek, A. A. (2007).** Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. *In: African Crop Science Conference Proceedings, Vol. 8. African Crop Science Society, Egypt.* pp. 1517-1525.
- **El-Tarabily, K. A., Sivasithamparam, K. (2006).** Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1505-1520.
- **Esquivel-Cote, R., Ramírez-Gama, R. M., Tsuzuki-Reyes, G., Orozco-Segovia, A., Huante, P. (2010).** *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant and soil*, 337(1-2), 65-75.
- **Farag, M. A., Zhang, H., Ryu, C. M. (2013).** Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 1007-1018.
- **Ferguson, L., Lessenger, J.E. (2006).** Plant growth regulators. *In: Agricultural medicine: Occupational and Environmental Health for the Health Professions.* Donham, K.J., Thelin, A. (Eds.), *Springer*, New York, USA. pp. 156–166.
- **Fontaine, S., Barot, S. (2005).** Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation. *Ecology Letters*, 8(10), 1075-1087.
- **Gacem, F., Gorine, M., Kradia, L. (2009).** Suivi des périmètres irrigués de l'Ouest Algérien (Cas du périmètre irrigué de la Mina). Institut National des Sols de l'Irrigation et du Drainage, Algérie.
- **Gaind, S., Gaur, A.C. (1991).** Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. *Plant and Soil*, 133(1), 141-149.

- **García-Gutiérrez, L., Romero, D., Zeriuoh, H., Cazorla, F. M., Torés, J. A., de Vicente, A., Pérez-García, A. (2012).** Isolation and selection of plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. *Plant and soil*, 358(1-2), 201-212.
- **Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. (2005).** Class I. Alphaproteobacteria class. nov. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition, Volume 2 (The Proteobacteria), Part C (The Alpha- Proteobacteria).* Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. (Eds.), *Springer*, New York, USA. pp. 1-574.
- **Gholami, A., Biyari, A., Gholipour, M., Asadi Rahmani, H. (2012).** Growth promotion of maize (*Zea mays L.*) by plant-growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 43(9), 1263-1272.
- **Giordano, W., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E., Domenech, C. E. (1999).** Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS microbiology letters*, 173(2), 389-393.
- **Glick, B. R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109-117.
- **Glick, B. R. (2014).** Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39.
- **Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J. (2007a).** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 329-339.
- **Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B. (2007b).** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5-6), 227-242.
- **Goenadi, D. H., Sugiarto, Y. (2000).** Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Science Society of America Journal*, 64(3), 927-932.
- **Goldstein, A. H. (1995).** Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture & Horticulture*, 12(2), 185-193.
- **Goldstein, A. H. (2000).** Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology. *In: Proceedings of the 4th International Fertilizer Association Technical Conference, October, IFA, Paris (Vol. 220).*
- **Grattan, S. R., Grieve, C. M. (1999).** Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. *Handbook of plant and crop stress*, 2, 203-229.

- **Gray, E.J., Smith, D.L. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412.
- **Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., Singh, V. (2015).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7(2), 096-102.
- **Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., Poole, P.S. (2002).** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *In: Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*. Adu-Gyamfi, J.J. (Ed.), *Springer*, Netherlands. pp. 133-143.
- **Haas, D., Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.
- **Habib, S. H., Saud, H. M., Ismail, M. R., Kausar, H. (2016a).** Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18(1), 184-191.
- **Habib, S.H., Kausar, H., Saud, H.M. (2016b).** Plant growth-promoting Rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed research international*, 2016.
- **Haggag, W.M. (2008).** Biotechnological aspects of plant resistant for fungal diseases management. *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2 (1), 1 – 18.
- **Halda-Alija, L. (2003).** Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus L.* *Canadian journal of microbiology*, 49(12), 781-787.
- **Hales, N. (2015).** Algeria Grain and Feed Annual. USDA Foreign Agricultural Service, report number AG1501.
- **Hamadache, H. (2015).** Réforme des subventions du marché du blé en Algérie: une analyse en équilibre général calculable. Thèse de doctorat, École Doctorale Économie et Gestion de Montpellier – ED 231, France.183p.
- **Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., Ouhdouch, Y. (2008).** Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2565-2575.
- **Hariprasad, P., Niranjana, S. R. (2009).** Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and soil*, 316(1-2), 13-24.

- **Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., Bohnert, H. J. (2000).** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 51(1), 463-499.
- **Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010).** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- **Hayat, R., Khalid, R., Ehsan, M., Ahmed, I., Yokota, A., Ali, S. (2013).** Molecular characterization of soil bacteria for improving crop yield in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 45(3), 1045-1055.
- **Haygarth, P. M., Hepworth, L., Jarvis, S. C. (1998).** Forms of phosphorus transfer in hydrological pathways from soil under grazed grassland. *European Journal of Soil Science*, 49(1), 65-72.
- **Herman, R. P., Provencio, K., Torrez, R., Seager, G. M. (1994).** Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen-efficient guild in adeseert bajada grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1160-1165.
- **Hiltner, L. T. (1904).** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59-78.
- **Hinsinger, P. (2001).** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237(2), 173-195.
- **Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950).** The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular, 347, 1-32.
- **Hongrattipun, P., Youpensuk, S., Rerkasem, B. (2014).** Screening of Nitrogen Fixing Endophytic Bacteria in *Oryza sativa* L. *Journal of Agricultural Science*, 6(6), 66.
- **Hopkins, W. G. (2003).** Physiologie végétale 2<sup>e</sup> édition. De Boeck Univesité, Bruxelles, Belgique. 495 p.
- **Hugenholtz, P. (2002).** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), reviews0003, 1-7.
- **Hussain, M. I., Asghar, H. N., Arshad, M., Shahbaz, M. (2013).** Screening of multi-traits rhizobacteria to improve maize growth under axenic conditions. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23, 514-520.
- **Ibekwe, A. M., Papiernik, S. K., Yang, C. H. (2010).** Influence of soil fumigation by methyl bromide and methyl iodide on rhizosphere and phyllosphere microbial community structure. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45(5), 427-436.
- **Idikut, L., Dumlupinar, Z. I. Y. A., Kara, S. N., Yururduramaz, C., Colkesen, M. (2012).** The effect of different temperatures and salt concentrations on some popcorn

landraces and hybrid corn genotype germinations. *Pakistan Journal of Botany*, 44(2), 579-587.

- **Igual, J., Valverde, A., Cervantes, E., Velázquez, E. (2001).** Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21(6-7), 561-568.
- **Iqbal, M., Ashraf, M. (2013).** Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. *Environmental and Experimental Botany*, 86, 76-85.
- **Jackson, M.L. (1958).** Soil chemical Analysis. *Prentice Hall of Englewood cliffs*, New Jersey, USA. 521 p.
- **Jacques, P., Delfosse, P., Ongena, M., Lepoivre, P., Cornélis, P., Koedam, N., et al. (1993).** Les mécanismes biochimiques développés par les " *Pseudomonas*" fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agricultures*, 2(5), 301-307.
- **Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Rahmani, H. A., Sadaghiani, H. R., Miransari, M. (2009).** Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus L.*) growth. *Journal of plant physiology*, 166(6), 667-674.
- **Janda, J. M., Abbott, S. L. (2007).** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- **Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., Song, H. G. (2003).** Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *Journal of Microbiology-Seoul-*, 41(4), 271-276.
- **Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Liu, X., Li, Y., Ji, S., Zhang, C. L. (2007).** Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2603-2621.
- **Johnson, H. E., Broadhurst, D., Goodacre, R., Smith, A. R. (2003).** Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry*, 62(6), 919-928.
- **Johri, J. K., Surange, S., Nautiyal, C. S. (1999).** Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39(2), 89-93.
- **Jones, D. L., Darrah, P. R. (1994).** Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and soil*, 166(2), 247-257.
- **Jorquera, M. A., Hernández, M. T., Rengel, Z., Marschner, P., de la Luz Mora, M. (2008).** Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of soils*, 44(8), 1025.

- **Joshi, M., Deshpande, J. D. (2011).** Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
- **Kang, S. M., Waqas, M., Khan, A. L., Lee, I. J. (2014).** Plant-growth-promoting rhizobacteria: potential candidates for gibberellins production and crop growth promotion. *In: Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume 1. Miransari, M. (Ed.), *Springer*, New York. pp. 1-19.
- **Karadeniz, A., Topcuoğlu, Ş. F., Inan, S. (2006).** Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), 1061-1064.
- **Kaur, N., Sharma, P. (2013).** Screening and characterization of native *Pseudomonas* sp. as plant growth promoting rhizobacteria in chickpea (*Cicer arietinum L.*) rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research*, 7(16), 1465-1474.
- **Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T. (2009).** HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187-192.
- **Kellou, R. (2008).** Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréaliers français dans le cadre du pole de compétitivité Quali-Méditerranée. Le cas des coopératives Sud Céréales, Groupe coopératif Occitan et Aude coop. Mémoire de Master de Science du CIHEAM – IAMM n° 93, Montpellier, France. 155p.
- **Kent, N. L. (1994).** Kent's Technology of Cereals 4<sup>th</sup> edition: An introduction for students of food science and agriculture, *Woodhead Publishing*, Oxford, UK. 352 p.
- **Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z. A. (2004).** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473-480.
- **Khalil, S., Sultan., T. (2000).** Phosphorus solubilizing microorganisms potential improve P availability from unavailable sources. *In: 8th Int Soil Sci Cong*, Islamabad.
- **Khan, M. S., Ahmad, E., Zaidi, A., Oves, M. (2013).** Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. *In: Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*, Maheshwari, D.K., Aeron, A., Saraf, M.(Eds.), *Springer Berlin Heidelberg*. pp. 237-263.
- **Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P. A. (2010).** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi–current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98.
- **Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmad, E. (2014).** Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. *In: Phosphate*

Solubilizing Microorganisms Khan, M. S., Zaidi, A. (Eds). *Springer International Publishing*, Switzerland. pp. 31-62.

- **Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. (2007).** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- **Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. (2009).** Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. *In: Sustainable agriculture.* Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C. (Eds.), *Springer*, Netherlands. pp. 551-570.
- **Kijne, J. W. (2006).** Abiotic stress and water scarcity: identifying and resolving conflicts from plant level to global level. *Field Crops Research*, 97(1), 3-18.
- **Kim, K. Y., McDonald, G. A., Jordan, D. (1997).** Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 347-352.
- **Kim, K., Jang, Y. J., Lee, S. M., Oh, B. T., Chae, J. C., Lee, K. J. (2014).** Alleviation of salt stress by *Enterobacter sp. EJ01* in tomato and Arabidopsis is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Molecules and cells*, 37(2), 109-117.
- **Kim, S. Y., Lim, J. H., Park, M. R., Kim, Y. J., Park, T. I., Seo, Y. W., et al. (2005).** Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *BMB Reports*, 38(2), 218-224.
- **Kim, Y. C., Jung, H., Kim, K. Y., Park, S. K. (2008).** An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 120(4), 373-382.
- **Kleinman, P. J., Sharpley, A. N., Saporito, L. S., Buda, A. R., Bryant, R. B. (2009).** Application of manure to no-till soils: phosphorus losses by sub-surface and surface pathways. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 84(3), 215-227.
- **Kloepper, J. W. (1993).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. *In: Soil microbial ecology.* Metting, B.F. (Eds.), *Hispanoamericana's*, New York, USA. pp. 255-274.
- **Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1978).** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*, Volume 2, August, *Station de pathologie végétale et phytobactériologie*, France. pp. 879-882.
- **Kloepper, J. W., Zablotowicz, R. M., Tipping, E. M., Lifshitz, R. (1991).** Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *In: The rhizosphere*

and plant growth. Keister, D.L., Cregan, B.P. (Eds.). *Springer*, Netherlands. pp. 315-326.

- **Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., Roldán, A. (2009).** Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 65(2), 245-252.
- **Kouas, S., Labidi, N., Debez, A., Abdelly, C. (2005).** Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for sustainable development*, 25(3), 389-393.
- **Krishnaraj, P. U., Khanuja, S. P. S., Sadashivam, K. V. (1998).** Mineral phosphate solubilization (MPS) and mps genes-components in eco-friendly P fertilization. *In: Indo US Workshop on Application of Biotechnology for Clean Environment and Energy*, National Institute of Advanced Studies, Vol. 27, 14-16 August, *Karnataka environment research foundation*, Bangalore, India.
- **Kucey, R. M. N., Janzen, H. H., Leggett, M. E. (1989).** Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy*, 42, 199-228.
- **Kumar, A. (2010).** Development of a liquid biofertilizer with indigenous microbial strains of Himachal Prache. Thèse de doctorat. Chaudhary Sarwan Kumar Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya University. India. 196 p.
- **Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C., Negi, S. (2012).** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*, 4(1), 1-5.
- **Kumar, A., Maurya, B. R., Raghuwanshi, R. (2014).** Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 121-128.
- **Kumar, K. V., Srivastava, S., Singh, N., Behl, H. M. (2009).** Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of Brassica juncea. *Journal of hazardous materials*, 170(1), 51-57.
- **Kumar, V., Behl, R. K., Narula, N. (2001).** Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological research*, 156(1), 87-93.
- **Kunc, F., Macura, J. (1988).** Mechanisms of adaptation and selection of microorganisms in the soil. *In: Soil microbial associations* Volume 17-1<sup>st</sup> edition.
- **Lai, W. A., Rekha, P. D., Arun, A. B., Young, C. C. (2008).** Effect of mineral fertilizer, pig manure, and *Azospirillum rugosum* on growth and nutrient contents of *Lactuca sativa L.* *Biology and fertility of soils*, 45(2), 155-164.

- **Leggett, M., Cross, J., Hnatowich, G., Holloway, G. (2007).** Challenges in commercializing a phosphate-solubilizing microorganism: *Penicillium bilaiae*, a case history. *In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization 16-19 July, 2002, Spain. Springer, Netherlands.* pp. 215-222.
- **Li, Y. Q., Zhao, H. L., Yi, X. Y., Zuo, X. A., Chen, Y. P. (2006).** Dynamics of carbon and nitrogen storages in plant-soil system during desertification process in Horqin sandy land. *Huan Jing Ke Xue*, 27(4), 635-640.
- **Luvizotto, D. M., Marcon, J., Andreote, F. D., Dini-Andreote, F., Neves, A. A., Araújo, W. L., Pizzirani-Kleiner, A. A. (2010).** Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia spp.* from sugarcane roots. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1829-1836.
- **Lwin, K. M., Myint, M. M., Tar, T., Aung, W. Z. M. (2012).** Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal*, 16(5), 137-144.
- **Lynch, J. M., Leij, F. (2012).** Rhizosphere. *John Wiley & Sons, eLs.UK.* 528 p.
- **Maliha, R., Samina, K., Najma, A., Sadia, A., Farooq, L. (2004).** Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 187-196.
- **Manaf, H. H., Zayed, M. S. (2015).** Productivity of cowpea as affected by salt stress in presence of endomycorrhizae and *Pseudomonas fluorescens*. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 219-226.
- **Mardad, I., Serrano, A., Soukri, A. (2013).** Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7(8), 626-635.
- **Marschner, H., Römheld, V. (1994).** Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and soil*, 165(2), 261-274.
- **Marschner, P., Crowley, D., Rengel, Z. (2011).** Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis—model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(5), 883-894.
- **Martin, L., Velázquez, E., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., Peix, A. (2007).** Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas fragi* in the growth and phosphorous content of strawberry plants. *In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization 16-19 July, 2002, Spain. Springer, Netherlands.* pp. 309-315.
- **Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. M. L. M., Mora, M. L. (2010).** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319.

- **Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B. R. (2004).** Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166(2), 525-530.
- **Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P., Raaijmakers, J. M. (2009).** Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *The ISME journal*, 3(8), 977-991.
- **McGill, W. B., Cole, C. V. (1981).** Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 26(4), 267-286.
- **Mehrvarz, S., Chaichi, M. R., Alikhani, H. A. (2008).** Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on forage and grain quality of barely (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agriculture and environmental Science*, 3(6), 855-860.
- **Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., Tebbe, C. C. (2000).** Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial ecology*, 40(1), 43-56.
- **Milosevic, N. A., Marinković, J. B., Tintor, B. B. (2012).** Mitigating abiotic stress in crop plants by microorganisms. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (123), 17-26.
- **Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M. (2002).** Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*, 115(3), 393-400.
- **Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M. (2003).** Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, cell & environment*, 26(6), 845-856.
- **Moule, C. (1971).** Céréales. *La Maison rustique*, Paris. 457 p.
- **Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001).** Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950.
- **M'piga, P., Belanger, R. R., Paulitz, T. C., Benhamou, N. (1997).** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* sp. radicle-lycopersiciin tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50(5), 301-320.
- **Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E., Granhall, U. (2013).** Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of south western Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(1), 73-84.

- **Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., Ashraf, M. (2014).** The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology advances*, 32(2), 429-448.
- **Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., Asghar, H. N., Arshad, M. (2010).** Rhizobacteria capable of producing ACC-deaminase may mitigate salt stress in wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 74(2), 533-542.
- **Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., Nawaz, S. (2013).** Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Annals of Microbiology*, 63(1), 225-232.
- **Nakkeeran, S., Fernando, W.G.D., Siddiqui, Z.A. (2005).** Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *In: PGPR: biocontrol and biofertilization*. Siddiqui ZA (Ed), Springer, Dordrecht. pp 257–296.
- **Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheela, J., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2001).** A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *Biocontrol*, 46(4), 493-510.
- **Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., Renella, G. (2011).** Role of phosphatase enzymes in soil. *In: Phosphorus in action* Bünemann, E. K., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Germany. pp. 215-243.
- **Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D. (2000).** Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182(2), 291-296.
- **Nautiyal, C. S., Govindarajan, R., Lavania, M., Pushpangadan, P. (2008).** Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting rhizobacteria NRRL B-30488. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4474-4481.
- **Nautiyal, C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 65-270.
- **Neilands, J. B. (1981).** Microbial iron compounds. *Annual review of biochemistry*, 50(1), 715-731.
- **Nelson, D. R., Mele, P. M. (2007).** Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 340-351.
- **Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F., Lapyire, F. (1992).** Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant Soil*, 143, 193-199.

- **Nico, M., Ribaudó, C. M., Gori, J. I., Cantore, M. L., Curá, J. A. (2012).** Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 61, 190-195.
- **Niranjana, S. R., Hariprasad, P. (2014).** Understanding the Mechanism Involved in PGPR-Mediated Growth Promotion and Suppression of Biotic and Abiotic Stress in Plants. In: Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens. Goyal, A., Manoharachary, C. (Eds), *Springer*, New York, USA. pp. 59-108.
- **Ogbo, F., Okonkwo, J. (2012).** Some characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter sp.* isolated from the roots of maize. *Advances in Microbiology*, 2(03), 368.
- **Oliveira, A. B., Moura, C. F., Gomes-Filho, E., Marco, C. A., Urban, L., Miranda, M. R. A. (2013).** The impact of organic farming on quality of tomatoes is associated to increased oxidative stress during fruit development. *PLoS One*, 8(2), e56354.
- **Omar, S. A. (1998).** The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 211-218.
- **Omar, S. A., Abdel-Sater, M. A., Khallil, A. M., Abd-Alla, M. H. (1994).** Growth and enzyme activities of fungi and bacteria in soil salinized with sodium chloride. *Folia Microbiologica*, 39(1), 23-28.
- **Ondrasek, G., Rengel, Z., Veres, S. (2011).** Soil Salinization and Salt Stress in Crop Production, Abiotic Stress in Plants Mechanisms and Adaptations. *Journal of Soil Science*, 978(2), 307-394.
- **Orhan, F. (2016).** Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian journal of microbiology*, 47(3), 621-627.
- **Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., Dowling, D. N. (2015).** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 745.
- **Ovadis, M., Liu, X., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I., Chernin, L. (2004).** The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. *Journal of bacteriology*, 186(15), 4986-4993.
- **Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A. (2013).** Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. *European journal of soil biology*, 56, 72-83.
- **Pandey, P., Maheshwari, D. K. (2007).** Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Current Science (00113891)*, 92.

- **Panhwar, Q. A., Othman, R., Rahman, Z. A., Meon, S., Ismail, M. R. (2012).** Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2711-2719.
- **Parida, A. K., Das, A. B. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- **Parker, D.R., Reichmann, S.M., Crowley, D.E. (2005).** Metal chelation in the rhizosphere. In: Roots and soil management: interactions between roots and the soil. Zobel RW (Ed.), *American Society of Agronomy, Madison, USA*. pp 57–93.
- **Parks, E. J., Olson, G. J., Brinckman, F. E., Baldi, F. (1990).** Characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron ore by a fungus. *Journal of industrial microbiology*, 5(2-3), 183-189.
- **Parvaiz, A., Satyawati, S. (2008).** Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant Soil and Environment*, 54(3), 89.
- **Paul, D., Lade, H. (2014).** Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for sustainable development*, 34(4), 737-752.
- **Pauwels, J. M., Van Ranst, E., Verloo, M., Mvondo Ze, A. (1992).** Manuel de laboratoire de pédologie: méthodes d'analyses de sols et de plantes, équipement, gestion de stocks de verrerie et de produits chimiques. Yaoundé : Centre universitaire de Dschang. Département des sciences du sol, Cameroun. 265 p.
- **Peix, A., Mateos, P. F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. (2001).** Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(14), 1927-1935.
- **Peng, Y. L., Gao, Z. W., Gao, Y., Liu, G. F., Sheng, L. X., Wang, D. L. (2008).** Eco-physiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. *Journal of integrative plant biology*, 50(1), 29-39.
- **Pequerul, A., Perez, C., Madero, P., Val, J., Monge, E. (1993).** A rapid wet digestion method for plant analysis. In: Optimization of Plant Nutrition. Fragoso, M.A.C., Van Beusichem, M. L., Houwers, A (Eds.), *Springer*, Netherlands. pp. 3-6.
- **Pereda Campos, M. V. (2008).** Contribution à l'étude des transporteurs de phosphate de la famille PHT1 chez le Peuplier (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) et le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton. Thèse de Doctorat, Université Nancy 1, France. 141p.
- **Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M. M., Yarzabal, L. A. (2007).** Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2905-2914.

- **Petti, C. A. (2007).** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases*, 44(8), 1108-1114.
- **Petti, C. A., Polage, C. R., Schreckenberger, P. (2005).** The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *Journal of clinical microbiology*, 43(12), 6123-6125.
- **Pierzynski, G. M., McDowell, R. W. (2005).** Chemistry, cycling, and potential movement of inorganic phosphorus in soils. *In: Phosphorus: agriculture and the environment.* Westermann, D.T. (Ed.), *Phosphorusagric.* pp. 53-86.
- **Pikovskaya, R.I. (1948).** Mobilization of P in soil in connection with vital activity by some microbial species. *Microbiologica*, 17, 362-37.
- **Plassard, C., Robin, A., Le Cadre, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L. et al., (2015).** Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol?. *Innovations Agronomiques*, 43, 115-138.
- **Ponmurugan, P., Gopi, C. (2006).** *In vitro* production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 348-350.
- **Pradhan, D., Pal, S., Das, T., Chaudhury, G. R., Sukla, L. B., Chug, O. P., et al. (2005).** Bioleaching of low-grade copper ore using indigenous microorganisms . *In: Emerging Trends in Mineral Processing and Extractive Metallurgy*, 13-14 June, India. pp. 166-171.
- **Pradhan, N., Sukla, L. B. (2006).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 850-854.
- **Radjacommare, R., Kandan, A., Nandakumar, R., Samiyappan, R. (2004).** Association of the hydrolytic enzyme chitinase against *Rhizoctonia solani* in rhizobacteria-treated rice plants. *Journal of Phytopathology*, 152(6), 365-370.
- **Raj, S. N., Lavanya, S. N., Amruthesh, K. N., Niranjana, S. R., Reddy, M. S., Shetty, H. S. (2012).** Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biological Control*, 60(2), 90-102.
- **Rajkumar, M., Freitas, H. (2008).** Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 71(5), 834-842.
- **Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., Annapurna, K. (2013).** Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Plus*, 2(1), 6-18.
- **Ramos-Solano, B., Barriuso Maicas, J., Pereyra De La Iglesia, M. T., Domenech, J., Gutiérrez Mañero, F. J. (2008).** Systemic disease protection elicited by plant

growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*, 98(4), 451-457.

- **Ramos-Solano, B., García, J. A. L., Garcia-Villaraco, A., Algar, E., Garcia-Cristobal, J., Mañero, F. J. G. (2010).** Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and soil*, 334(1-2), 189-197.
- **Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar, K., Nain, L. (2011).** Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of microbiology*, 61(4), 893-900.
- **Ranjan, A., Mahalakshmi, M. R., Sridevi, M. (2013).** Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacterial species from different crop fields of Salem, Tamil Nadu, India. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(1), 29-46.
- **Rastoin, J. L., Benabderrazik, E. H. (2014).** Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb. Institut de Productivité Economique du Monde Méditerranéen.
- **Rausch, C., Bucher, M. (2002).** Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216(1), 23-37.
- **Rawat, S., Izhari, A., Khan, A. (2011).** Bacterial diversity in wheat rhizosphere and their characterization. *Advances in Applied Science Research*, 2, 351-356.
- **Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998).** Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in microbiology*, 6(4), 139-144.
- **Reyes, I., Valery, A., Valduz, Z. (2007).** Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. In: First international meeting on microbial phosphate solubilisation, 16-19 July, 2002, Spain. *Springer*, Netherlands. pp. 69-75.
- **Reyes, M. E. Q., Rohrbach, K. G., Paull, R. E. (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest biology and technology*, 33(2), 193-203.
- **Richardson, A. E. (1994).** Soil microorganisms and phosphorus availability. *Soil Biota*, 50, 35-39.
- **Richardson, A. E., Simpson, R. J. (2011).** Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*, 156(3), 989-996.
- **Richardson, A.E., Barea, J. M., McNeill, A. M., Prigent-Combaret, C. (2009).** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 305-339.
- **Rietz, D. N., Haynes, R. J. (2003).** Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 845-854.

- **Riggs, P. J., Chelius, M. K., Iniguez, A. L., Kaeppler, S. M., Triplett, E. W. (2001).** Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*, 28(9), 829-836.
- **Rivas, R., Peix, A., Mateos, P. F., Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2007).** Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *In: First international meeting on microbial phosphate solubilisation*, 16-19 July, 2002, Spain, Springer, Netherlands. pp. 23-33.
- **Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y. (2007).** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *In: First international meeting on microbial phosphate solubilisation*, 16-19 July, 2002, Spain. Springer, Netherlands. pp. 15-21.
- **Rodríguez, H., Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4), 319-339.
- **Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., Bonilla, R. (2012).** Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264– 272.
- **Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Paré, P. W. (2004).** Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 134(3), 1017-1026.
- **Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., Askari, H. (2012).** Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of Streptomyces under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503-1509.
- **Sagoe, C. I., Ando, T., Kouno, K., Nagaoka, T. (1998).** Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil science and plant nutrition*, 44(4), 617-625.
- **Sajjad Mirza, M., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., & Malik, K. A. (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, 237(1), 47-54.
- **Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A. S. (2007).** Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(10), 635-648.
- **Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Diatta, L. I. D., Guèye, B., Daher, A., Sagna, M., et al. (2012).** Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo

development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. *The Scientific World Journal*, 2012.

- **Sawada, H., Kuykendall, L. D., Young, J. M. (2003).** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of general and applied microbiology*, 49(3), 155-179.
- **Saxena, J., Jha, A. (2014).** Impact of a phosphate solubilizing bacterium and an arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus etunicatum*) on growth, yield and P concentration in wheat plants. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 42(9), 1248-1252.
- **Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. (1987).** Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual review of phytopathology*, 25(1), 339-358.
- **Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- **Seidahmed, H. A., Ballal, M. E., Mahgoub, A. (2013).** Sodicity tolerance of *Moringa olifera*, Acacia Senegal and Acacia tortilis subspp raddiana seedlings. *J Nat Resour Environ Stud*, 1, 4-6.
- **Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S., Gupta, A. D., Joshi, P., Nazim, S., Gupta, H. S. (2008).** Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in applied microbiology*, 46(2), 171-175.
- **Selvakumar, G., Panneerselvam, P., Ganeshamurthy, A. N. (2012).** Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops. In: Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management Maheshwari, D.K. (Ed.), *Springer Berlin Heidelberg*, Germany. pp. 205-224.
- **Serraj, R., Sinclair, T. R. (2002).** Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant, cell & environment*, 25(2), 333-341.
- **Seshadri, S., Ignacimuthu, S., Lakshminarasimhan, C. (2004).** Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chemical Engineering Communications*, 191(8), 1043-1052.
- **Sharma, K., Dak, G., Agrawal, A., Bhatnagar, M., Sharma, R. (2007).** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seeds and seedling growth. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 1(1), 61-63.
- **Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., Gobi, T. A. (2013).** Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587-597.
- **Shrivastava, P., Kumar, R. (2015).** Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131.

- **Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Sheikh, I. H., Khan, A. (2006).** Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 641-650.
- **Siddiqui, Z. A. (2005).** PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. *In: PGPR: biocontrol and biofertilization* Siddiqui, Z.A. (Ed.), *Springer*, Netherlands. pp. 111-142.
- **Siddiqui, Z. A., Mahmood, I. (1999).** Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 69(2), 167-179.
- **Silini-Cherif, H., Silini, A., Ghouli, M., Yadav, S. (2012).** Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(6), 267.
- **Singh, R. P., Jha, P. N. (2016).** The Multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS one*, 11(6), e0155026.
- **Smith, S. E., Read, D. J. (2010).** Mycorrhizal symbiosis. *Academic press, Elsevier Ltd.* NewYork, USA, 508 p.
- **Son, T. T. N., Diep, C. N., Giang, T. T. M. (2006).** Effect of bradyrhizobia and phosphate solubilizing bacteria application on Soybean in rotational system in the Mekong delta. *Omonrice*, 14, 48-57.
- **Song, O.R., Lee, S.J., Lee, Y.S., Lee, S.C., Kim, K.K., Choi, Y.L. (2008).** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* Da23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39,151–156.
- **Sperber, J. I. (1958).** The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Crop and Pasture Science*, 9(6), 778-781.
- **Sprent, J. I. (2001).** Nodulation in legumes. *Royal Botanic Gardens Kew*, London, UK. p. 113.
- **Srinivasan, R., Yandigeri, M. S., Kashyap, S., Alagawadi, A. R. (2012).** Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. *Saudi journal of biological sciences*, 19(4), 427-434.
- **Sturz, A. V., Christie, B. R. (2003).** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and Tillage Research*, 72(2), 107-123.
- **Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M. D. C., Cevallos, M. A., et al. (2008).** Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 958-966.

- **Subba Rao, N. S. (1982).** Advances in agricultural microbiology. *Butterworth-Heinemann, Elsevier*. Germany. 726 p.
- **Sujatha, N., Ammani, K. (2013).** Siderophore production by the isolates of fluorescent Pseudomonads. *International Journal of Current Research and Review*, 5(20), 1.
- **Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P., McManus, M. T. (2010).** Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. *African Journal of Biotechnology*, 9(2).
- **Sundara, B., Natarajan, V., Hari, K. (2002).** Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field crops research*, 77(1), 43-49.
- **Swaby, R. J., Sperber, J. (1958).** Phosphate dissolving micro-organisms in the rhizosphere of legumes. *In: Nutrition of the legumes*. Hollworth, E.G. (ed.), *Academic Press*, NY, USA. pp. 289-294.
- **Swain, M. R., Naskar, S. K., Ray, R. C. (2007).** Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata L.*) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Polish Journal of Microbiology*, 56(2), 103-117.
- **Tahir, M., Mirza, M. S., Zaheer, A., Dimitrov, M. R., Smidt, H., Hameed, S. (2013).** Isolation and identification of phosphate solubilizer '*Azospirillum*' *Bacillus*' and '*Enterobacter*' strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Australian Journal of Crop Science*, 7(9), 1297-1284.
- **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., Kumar, S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- **Tarafdar, J. C., Yadav, R. S., Meena, S. C. (2001).** Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(3), 279-282.
- **Taurian, T., Anzuay, M. S., Angelini, J. G., Tonelli, M. L., Ludueña, L., Pena, D., et al. (2010).** Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*, 329(1-2), 421-431.
- **Tejera, N. A., Ortega, E., González-López, J., Lluch, C. (2003).** Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of applied microbiology*, 95(3), 528-535.
- **Tester, M., Davenport, R. (2003).** Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of botany*, 91(5), 503-527.

- **The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2002).** Crops and drops: making the best use of water for agriculture. *FAO*, Rome, Italy.
- **Thomashow, L. S., Bonsall, R. F., Weller, D. M. (1997).** Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Manual of environmental microbiology*, ASM Press, Washington, DC, USA. pp. 493-499.
- **Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U., Tillberg, E. (1999).** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(13), 1847-1852.
- **Timmusk, S., Timmusk, K., Behers, L. (2013).** Rhizobacterial plant drought stress tolerance enhancement: towards sustainable water resource management and food security. *Journal of Food Security*, 1(1), 6-9.
- **Timmusk, S., Wagner, E. G. H. (1999).** The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(11), 951-959.
- **Trolove, S. N., Hedley, M. J., Kirk, G. J. D., Bolan, N. S., Loganathan, P. (2003).** Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Soil Research*, 41(3), 471-499.
- **Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., Netrusov, A. I. (2006).** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126.
- **Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K., Singh, D. P. (2012).** Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- **Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Singh, D. P. (2011).** Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, 21(2), 214-222.
- **Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I. (2006).** Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(2), 137-144.
- **Vassileva, M., Serrano, M., Bravo, V., Jurado, E., Nikolaeva, I., Martos, V., Vassilev, N. (2010).** Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1287-1299.
- **Verma, L. N. (1993).** Biofertiliser in agriculture. *In: Organics in soil health and crop production*. Thampan, P.K (Ed.), *Peekay Tree Crops Development Foundation*, Cochin, India. pp. 152-183.
- **Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.

- **Viruel, E., Lucca, M. E., Siñeriz, F. (2011).** Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of microbiology*, 193(7), 489-496.
- **Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Dèfago, G. (1989).** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal*, 8(2), 351.
- **Walker-Simmons, M., Sesing, J. (1990).** Temperature effects on embryonic ABA levels during development of wheat grain dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9, 51-56.
- **Wang, C. J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D. D., Liu, H. X., et al. (2012).** Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS One*, 7(12), e52565.
- **Wani, P. A., Zaidi, A., Khan, A. A., Khan, M. S. (2005).** Effect of phorate on phosphate solubilization and indole acetic acid releasing potentials of rhizospheric microorganisms. *Annals of Plant Protection Sciences*, 13(1), 139-144.
- **Whipps, J. M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl 1), 487-511.
- **Whitelaw, M. A. (1999).** Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99-151.
- **Woitke, M., Junge, H., Schnitzler, W. H. (2004).** *Bacillus subtilis* as growth promotor in hydroponically grown tomatoes under saline conditions. In: VII International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition 65. pp. 363-369.
- **Xiao, C.Q., Chi, R. A., He, H., Zhang, W. X. (2009).** Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. *Journal of Central South University of Technology*, 16, 581-587.
- **Yadav, J., Verma, J. P., Tiwari, K.N. (2010).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and plant growth chickpea (*Cicer arietinum L.*) under in vitro conditions. *Biological Forum*, 2 (2), 15-18.
- **Yadav, K. S., Dadarwal, K. R. (1997).** Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. *Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production*, 4, 293-308.
- **Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., Hayat, S. (2011).** Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology*, 32(5), 667-683.
- **Yang, J., Kloepper, J. W., Ryu, C. M. (2009).** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, 14(1), 1-4.

- **Yarzabal, L. A. (2010).** Agricultural development in tropical acidic soils: potential and limits of phosphate-solubilizing bacteria. *In: Soil Biology and Agriculture in the Tropics* Dion, P. (Ed.), *Springer Berlin Heidelberg*, Germany. pp. 209-233.
- **Yazdani, M., Bahmanyar, M. A., Pirdashti, H., Esmaili, M. A. (2009).** Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays L.*). *Proc World Acad Sci Eng Technol*, 37, 90-92.
- **Yi, Y., Huang, W., Ge, Y. (2008).** Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 24(7), 1059-1065.
- **Yilmaz, H., Kina, A. (2008).** The influence of NaCl salinity on some vegetative and chemical changes of strawberries (*Fragaria xananssa L.*). *African Journal of Biotechnology*, 7(18).
- **Zabihi, H. R., Savaghebi, G. R., Khavazi, K., Ganjali, A., Miransari, M. (2011).** *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum L.*) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. *Acta physiologiae plantarum*, 33(1), 145-152.
- **Zaidi, A., Khan, M. S. (2006).** Co-inoculation effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on green gram-*Bradyrhizobium* symbiosis. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 30(3), 223-230.
- **Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P. A. (2009a).** Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. *In: Microbial strategies for crop improvement.* Khan, M.S., Zaidi, A. (Eds.), *Springer Berlin Heidelberg*, Germany. pp. 23-50.
- **Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., Oves, M. (2009b).** Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica and immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- **Zandi, P., Basu, S. K. (2016).** Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as BioFertilizers in Stabilizing Agricultural Ecosystems. *In: Organic Farming for Sustainable Agriculture.* Nandwani, D. (Ed), *Springer International Publishing*, Switzerland. pp. 71-87.
- **Zarea, M. J., Hajinia, S., Karimi, N., Goltapeh, E. M., Rejali, F., Varma, A. (2012).** Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. *Soil Biology and Biochemistry*, 45, 139-146.
- **Zhang, F., Dashti, N., Hynes, R. K., Smith, D.L. (1996).** Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max (L.) Merr.*] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Annals of Botany*, 77(5), 453-460.

- **Zheng, D., Alm, E.W., Stahl, D.A., Raskin, L. (1996).** Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4504-4513.



# **Annexes**



## Annexe 2

### Composition des Milieux de culture

#### **Gélose nutritive (GN) g /l:**

Peptone .....	10
Extrait de levure .....	3
Extrait de viande .....	3
Chlorure de sodium NaCl.....	5
Agar Agar .....	15
pH .....	7,2

#### **Bouillon nutritif (BN) g /l:**

Peptone.....	10
Extrait de viande.....	5
NaCl.....	5
pH .....	7,2

#### **Milieu Pikovskaya g /l:**

Glucose.....	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5
NaCl.....	0,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,1
KCl.....	0,2
Extrait de levure.....	0,5
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,002
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,002
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	5
Agar agar.....	15
pH.....	7,0

**Milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's phosphate medium) g /l:**

Glucose.....	10
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ).....	5
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,25
KCl.....	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,1
pH.....	7,0

**Milieu King B g/l:**

Peptone de caséine.....	10
Peptone de viande.....	10
Glycérol.....	10ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1,5
Agar agar.....	15
pH.....	7,2

**Milieu (NF-MM) g/l :**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.097
NaCl.....	0.1
CaCl <sub>2</sub> .....	0.0196
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0.017
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O.....	0.002
Extrait de levure.....	0.001
L- acide malic.....	3.58
Mannitol.....	5.0
Agar agar.....	15
pH.....	7.0

**Milieu Lurria-Bertani (LB) g/l:**

Tryptone.....	10
Extrait de levure.....	5
NaCl.....	10
pH.....	7,0

**Eau peptonée g/l:**

Peptone .....	10
NaCl.....	5
pH.....	7,2

Stérilisation des milieux de culture a été réalisée par autoclavage à 120°C/20 min.

### Annexe 3

#### Réactifs de Barton (Jaune de vanado-molybdate)

- **Solution A** : Ammonium molybdate

Dissoudre 12,5g d'ammonium molybdate  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , dans 200 ml d'eau distillée.

- **Solution B**: Ammonium Vanadate

Dissoudre 0,625g d'ammonium Vanadate  $(\text{NH}_4)\text{VO}_3$ , dans 150 ml d'eau distillée bouilli et laisse au froid pour ajout 125 ml d'acide nitrique ( $\rho_{20} = 1,39 \text{ g/l}$ ).

- **La réaction de Vanado-molybdate** :

La solution B est mise dans une fiole de 500 ml, puis la solution A est ajoutée et le volume est complété par l'eau distillée.

## Annexe 4

### Solutions nutritives et diluants

#### Solution nutritive Hoagland

Composant	Par litre de solution nutritive
<b>Macronutrients</b>	
1M KNO <sub>3</sub>	5ml
1M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5ml
1M MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2ml
Fe-EDTA	1-5 ml de 1000 mg/l
<b>Micronutrients</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.12 g
<b>Phosphate</b>	
1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH to 6.0)	1ml

#### Le tampon phosphate salin (PBS) g/l :

NaCl.....	8
KCl.....	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,24

## Annexe 5

### Préparation du milieu Chrom Azurol S

La gélose CAS a été préparée à partir de quatre solutions qui ont été stérilisées séparément avant mélange.

**Solution 1 :** solution d'indicateur de Fe-CAS a été préparée en mélangeant 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 1 mM dans 10 mM du HCl avec 50 ml d'une solution aqueuse de CAS (1,21 mg/ml). Le mélange violet foncé résultant a été ajouté lentement, sous agitation constante, à 40 ml d'une solution aqueuse de HDTMA (1,82 mg /ml). Une solution bleu foncé résultante qui a été autoclave, puis refroidi à 50°C.

**Solution 2 :** solution tampon a été préparée en dissolvant 30,24 g de PIPES dans 750 ml d'une solution saline contenant 0,3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de NaCl et 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Le pH a été ajusté à 6,8 avec du KOH à 50% et de l'eau a été ajoutée pour porter le volume à 800 ml. La solution a été autoclavée après addition de 15 g d'agar, puis refroidie à 50°C.

**Solution 3 :** Contenant les composant suivant (dans 70 ml d'eau) : 2 g de glucose, 2 g de mannitol, 493 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 11 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 1,17 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,04 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,2 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  et 1,0 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . La solution 3 a été autoclavée et refroidie à 50°C

**Solution 4 :** solution tampon contenant 30 ml de de casamino-acides à 10% (p: v) stérilisés par le microfiltre, et la solution 3 a été ajoutée à cette solution. La solution indicatrice a été ajoutée en dernier, avec agitation suffisante pour mélanger les ingrédients sans former de bulles.

## **Annexe 6**

### **Protocole d'exaction d'ADN génomique**

#### **1. Préparation de l'échantillon**

Récupérer les cellules des cultures par centrifugation dans un tube de microcentrifugeuse (On peut utiliser jusqu'à 40 mg de culot). Ajouter 100 µL de tampon d'éluion BE et remettre les cellules en suspension.

#### **2. La lyse de l'échantillon**

Transférer la suspension de cellules dans le tube de perles NucleoSpin® Type B. Ajouter 40 µL de tampon MG. Ensuite, ajoutez 10 µL de protéinase K liquide et fermez le tube. Agiter le tube de perles NucleoSpin® sur un moulin à billes ou un dispositif similaire. Centrifuger le tube de perles pendant 30 s à 11 000 x g pour nettoyer le couvercle.

#### **3. Ajustement des conditions de liaison de l'ADN**

Ajouter 600 µL de tampon MG et mélanger (vortexer pendant 3 s) et centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g.

#### **4. Liaison de l'ADN**

Transférer le surnageant (~ 500-600 µL) sur la colonne d'ADN microbien NucleoSpin® placé dans un tube de collection de 2 mL. Centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g. Jeter le tube de collection avec écoulement. Mettez la colonne dans un tube de collection de 2mL frais.

#### **5. Lavage de membrane de silice**

##### **1<sup>er</sup> lavage :**

Ajouter 500 µL de tampon BW. Centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g. Jeter le débit et remettre la colonne dans le tube de collection.

##### **2<sup>ème</sup> lavage :**

Ajouter 500 µL de tampon B5 à la colonne et centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g. Jeter le débit et remettre la colonne dans le tube de collection.

#### **6. Séchage de membrane de silice**

Centrifuger le contenu de la colonne pendant 30 s à 11 000 x g.

#### **7. Elution d'ADN très pur**

Placer la colonne d'ADN microbien NucleoSpin® dans un tube de 1,5 mL sans nuclease (et ajouter 100 µL de tampon BE sur la colonne. Incuber à température ambiante pendant 1 min. Centrifuger 30 s à 11 000 x g.

## Annexe 7

Tableau de l'identification biochimiques et solubilisation du phosphate des bactéries isolées.

Isolat	Gram	Forme	Mob	Cat	Ox	Identification	ES (%)	Concentration de P (µg/ml)
PSB1	-	cocci	-	+	-	ND	155,44±9,5	35,71±3,21
PSB2	-	cocci	-	+	-	ND	201,57±10,29	33,01±2,45
PSB3	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	234,50±11,01	605,34±15,91
PSB4	-	coccobacille	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	125,37±12,33	190,34±9,23
PSB5	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	288,37±14,76	525,60±14,73
PSB6	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	307,45±11,49	156,45±7,48
PSB7	-	bacille	+	+	-	ND	211,4±9,03	225,71±10,05
PSB8	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	167,32±11,08	652,83±25,28
PSB9	-	bacille	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	165,66±12,14	156,67±7,59
PSB10	-	cocci	-	+	-	ND	200,56±11,6	98,46±5,17
PSB11	-	coccobacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	125,63±10,06	515,90±12,78
PSB12	-	cocci	-	+	-	ND	224,47±10	267,34±9,77
PSB13	-	bacille	+	+	-	<i>P. fluorescens</i>	155,07±12,52	584,17±13,78
PSB14	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	149,07±7,11	243,19±10,44
PSB15	-	bacille	+	+	-	ND	231,27±12,56	152,68±8,37
PSB16	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	246,00±9,11	553,62±24,17
PSB17	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	301,34±11,99	301,47±12,69
PSB18	-	bacille	+	+	-	<i>Enterobacter</i> sp.	198,52±10,07	642,49±22,74
PSB19	-	cocci	-	+	-	ND	223,45±12,45	221,67±9,87
PSB20	-	cocci	-	-	+	ND	309,18±10,94	182,29±9,96
PSB21	-	coccobacille	+	-	-	ND	249,95±10,33	175,14±7,23
PSB22	-	bacille	+	+	+	<i>B. cepacia</i>	126,18 ±11,22	555,86±16,60
PSB23	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	237,28±9,5	200,66±12,1
PSB24	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	267,55±8,06	587,05±19,65
PSB25	-	bacille	+	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	122,52±10,18	139,27±8,36
PSB26	-	bacille	+	+	-	ND	205,49±11,73	48,95±3,58
PSB27	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	156,59±11,11	566,17±17,14
PSB28	-	coccobacille	+	+	+	ND	216,84±8,98	255,27±9,47
PSB29	-	coccobacille	+	+	+	<i>Serratia</i> sp.	115,13±11,32	562,90±21,92
PSB30	-	cocci	-	+	+	ND	233,32±10,23	117,15±7,28
PSB31	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	167,21±11,46	410,89±16,62
PSB32	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	300,87±10,83	146,23±8,05
PSB33	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	247,29±11,28	156,68±8,33
PSB34	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	145,81±10,88	453,28±16,95
PSB35	-	coccobacille	+	+	+	ND	128,64±9,27	311,22±11,01
PSB36	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	233,27±10,09	564,74±11,5
PSB37	-	coccobacille	+	-	-	ND	201,57±9,55	145,77±7,24
PSB38	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	165,58±5,6	402,58±15,71
PSB39	-	bacille	+	+	-	ND	268,67±11,01	310,00±10,68
PSB40	-	cocci	-	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	311,25±9,43	192,86±8,3
PSB41	-	bacille	+	+	-	<i>Serratia</i> sp.	255,01±11,48	610,96±13,87
PSB42	+	coccobacille	+	+	-	ND	211,48±9,42	164,45±10,34
PSB43	-	bacille	+	+	+	<i>Enterobacter</i> sp.	204,48±8,06	571,22±18,70
PSB44	-	coccobacille	+	+	+	<i>A. hydrophila</i>	135,02±12,7	541,59±23,67
PSB45	-	bacille	+	+	-	<i>Enterobacter</i> sp.	310,30±12,99	601,85±22,60
PSB46	+	bacille	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	304,30±11,68	167,14±9,69
PSB47	-	bacille	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	176,6±10,27	315,71±11,5
PSB48	-	bacille	+	+	-	ND	256,67±11,7	152,86±8,26
PSB49	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	105,64±11,54	561,33±12,03
PSB50	-	coccobacille	+	+	-	ND	197,37±9,56	144,29±7,39
PSB51	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	125,15±10,35	130,00±6,94
PSB52	-	bacille	+	+	-	<i>Serratia</i> sp.	188,32 ±11,08	370,04±10,61
PSB53	+	bacille	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.	245,67±10,54	67,14±3,57
PSB54	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	305,55±10,67	44,29±2,48

PSB55	-	cocci	-	-	-	ND	264,3±11,6	167,14±8,44
PSB56	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	320,62±10,19	570,63±16,51
PSB57	-	cocci	-	+	+	ND	177,29±11,1	111,77±7,32
PSB58	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	249,18±8,35	398,00±11,76
PSB59	-	coccobacille	+	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	137,44±9,55	204,29±10,18
PSB60	-	cocci	-	+	-	ND	177,57±11,48	78,57±4,26
PSB61	-	bacille	+	+	-	ND	129,77±8,36	24,29±2,17
PSB62	-	coccobacille	+	+	+	ND	304,55±12,38	175,71±7,47
PSB63	-	cocci	-	+	-	ND	204,48±8,06	76,58±4,35
PSB64	-	bacille	+	+	-	<i>B. cepacia</i>	176,31±10,98	487,71±15,35
PSB65	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	306,58±10,56	49,19±3,79
PSB66	-	bacille	+	+	+	<i>P. fluorescens</i>	217,48±12,14	502,25±14,83
PSB67	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	146,92±12,19	481,71±16,49
PSB68	-	bacille	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	310,58±11,76	145,69±9,23
PSB69	-	coccobacille	-	-	-	ND	225,29±5,11	236,27±9,85
PSB70	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	199,33±11,09	568,05±25,89
PSB71	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	143,33±11,88	447,20±17,94
PSB72	-	coccobacille	+	+	+	<i>Serratia</i> sp.	303,73±13,49	466,94±18,60
PSB73	-	cocci	-	-	-	ND	247,68±11,45	59,47±5,24
PSB74	-	bacille	+	+	+	<i>B. cepacia</i>	218,13±10,49	435,52±20,87
PSB75	-	coccobacille	-	+	-	ND	302,50±11,58	204,29±8,49
PSB76	-	bacille	+	+	+	ND	215,88±10,34	215,49±7,27
PSB77	-	coccobacille	+	+	-	ND	226,45±10,67	133,23±7,55
PSB78	-	bacille	+	+	+	<i>Serratia</i> sp.	129,35±11,07	348,05±15,24
PSB79	-	cocci	-	-	-	ND	209,55±12,44	87,55±4,68
PSB80	-	bacille	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	134,66 ± 12,27	178,38±9,49
PSB81	-	bacille	-	-	-	ND	243,5±10,35	213,25±10,48
PSB82	-	bacille	+	+	+	<i>Enterobacter</i> sp.	167,75±9,56	327,50±16,50
PSB83	+	bacille	-	-	-	<i>Bacillus</i> sp.	268,44±11,68	177,57±9,60
PSB84	-	coccobacille	-	-	-	ND	247,58±11,7	158,14±7,71
PSB85	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	210,43±10,09	398,70±12,42
PSB86	-	bacille	-	-	+	ND	275,66±12,56	84,93±4,26
PSB87	-	bacille	+	+	-	<i>Serratia</i> sp.	303,74±14,23	638,37±12,70
PSB88	-	bacille	-	-	-	ND	236,49±11,46	216,27±8,51
PSB89	-	coccobacille	+	+	+	<i>A. hydrophila</i>	154,28±9,94	521,9±14,66
PSB90	-	cocci	-	-	-	ND	254,37±8,68	65,39±3,12
PSB91	+	bacille	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.	211,74±13,54	738,56±16,07
PSB92	-	bacille	-	-	+	ND	311,37±11,29	156,01±8,45
PSB93	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	156,26±11,03	455,13±13,18
PSB94	+	bacille	+	-	-	<i>Bacillus</i> sp.	295,40±10,94	77,82±3,27
PSB95	-	bacille	+	+	-	<i>P. fluorescens</i>	185,01±11,88	410,35±22,16
PSB96	-	bacille	+	-	+	ND	224,47±12,05	105,78±6,46
PSB97	-	bacille	+	+	+	<i>Enterobacter</i> sp.	236,69±10,61	521,77±23,66
PSB98	-	cocci	-	-	-	ND	196,88±11,06	155,67±12,67
PSB99	-	coccobacille	+	+	+	<i>A. hydrophila</i>	152,71±9,66	407,67±15,57
PSB100	-	coccobacille	+	-	-	ND	268,30±9,69	111,45±11,45
PSB101	+	bacille	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.	303,57±10,78	38,22±2,24
PSB102	-	bacille	+	+	-	<i>P. luteola</i>	116,52±10,22	604,37±17,85
PSB103	-	bacille	+	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	251,58±10,6	62,17±3,34
PSB104	-	cocci	-	-	+	ND	138,59±9,26	114,28±8,29

+ : Positif. - : Négatif. Mob : Mobilité, Cat : Catalase, Ox : Oxydase. Valeurs : moyenne± écart type.

## Annexe 8

### Tableaux d'analyse de la variance (ANOVA)

**Tableau 1:** Analyse de la variance des carrés moyens des activités PGP des isolats bactériens.

Source de variation	ddl	Efficacité de solubilisation	Solubilisation en milieu liquide	pH final de solubilisation	AIA
Isolats	40	9551,695**	24834,34**	0,163**	273,208**
Erreur	82	1,991	21,026	0	0,004

**Tableau 2:** Analyse de variance de l'activité de réduction de l'acétylène (ARA) par les isolats bactériens.

Source de variation	Somme des carrés moyens	ddl	carrés moyen	Test de Fisher
Isolats	0,054	4	0,012	68,236**
Erreur	0,001	5	0	

**Tableau 3:** Analyse de la variance des moyens carrés de l'effet de sel sur la croissance et la solubilisation du phosphate par les isolats bactériens.

Source de variation	ddl	Croissance bactérienne sous stress salin	Solubilisation du P sous stress salin	pH finale de solubilisation
PSB18	9	0,163**	59295,1**	0,578**
PSB41	9	0,112**	106310,2**	0,442**
PSB45	9	0,107**	122174,5**	0,543**
PSB87	9	0,136**	108059,2**	0,348**
PSB91	9	0,188**	96997,46**	0,469**

**Tableau 4:** Analyse de variance de l'effet de l'inoculation sur la germination des grains de blé.

Source de variation	Somme des carrés moyens	ddl	carrés moyen	Test de Fisher
Isolats	0,079	5	0,016	78,526**
Erreur	0,001	6	0	

**Tableau 5:** Analyse de la variance des carrés moyens des paramètres morphologiques de plantes

Source de variation	ddl	Longueur des tiges	Poids sec des tiges	Longueur des racines	Poids sec des racines
Traitement 1	5	31,867*	0,101**	21,522ns	0,414**
Traitement 2	5	111,689**	0,117**	95,256**	0,188**
Traitement 3	5	100,722**	0,031**	105,156**	0,115**
Inoculation	5	181,544**	0,179**	97,541**	0,495**
Interaction	10	31,36**	0,035**	62,196**	0,111**

**Tableau 6:** Analyse de la variance des carrés moyen des paramètres biochimiques de plantes.

Source de variation	ddl	Chlorophylle totale	Phosphore	Sodium	Potassium
Traitement 1	5	0,191**	11,072**	0,021ns	0,054ns
Traitement 2	5	0,308**	23,108**	0,006ns	0,141ns
Traitement 3	5	0,202**	10,262**	2,991**	0,954**
Inoculation	5	0,318**	18,623**	81,37**	0,375**
Interaction	10	0,191**	12,918**	87,528**	0,587**

**ddl** : Degré de liberté. \* : Significatif à  $p < 0,05$ . \*\* : Hautement Significatif à  $p < 0,05$ . ns : Non significatif.

## Annexe 9

Tableau des coordonnées des paramètres dans le cercle de corrélation des facteurs obtenus de l'ACP.

	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>
<b>Solubilisation du phosphate</b>	0,91	-0,02	-0,11	0,39
<b>Fixation de l'azote</b>	0,78	-0,34	-0,47	-0,24
<b>SDR</b>	0,72	-0,28	0,63	-0,10
<b>AIA</b>	0,70	0,70	0,02	-0,14

**SDR:** sidérophores



**Publication**



## Screening and characterization of plant growth promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from wheat rhizosphere of Algerian saline soil

Chibani Hiba Rahman<sup>1\*</sup>, Bouznad Ahcene<sup>1</sup>, Bellahcene Miloud<sup>2</sup>, Djibaoui Rachid<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Mostaganem, Algeria.

<sup>2</sup>University Center of Ain Temouchent, Algeria.

Email: [hiba.chibani@univ-mosta.dz](mailto:hiba.chibani@univ-mosta.dz)

Received 16 August 2016; Received in revised form 10 September 2016; Accepted 7 November 2016

### ABSTRACT

**Aims:** The capacity of some soil microorganisms to solubilize in soil is an important activity exhibited by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to increase plant performance. This study aimed at isolation and selection of phosphate solubilizing bacteria from saline soil and *in vitro* evaluation of their plant growth promoting traits.

**Methodology and results:** Phosphate solubilizing bacteria isolated from wheat rhizosphere, of saline soil in western region of Algeria were tested for their plant growth promoting traits such as indole acetic acid (IAA), hydrogen cyanide (HCN), siderophore and ammonia production and their ability to fix nitrogen. Among 104 bacterial isolates, 41 were selected for their phosphate solubilizing activity using tricalcium phosphate (TCP) as a sole phosphorus source. IAA production was shown by almost all the bacterial isolates. Twelve isolates were recorded positive for HCN production, 32 produced siderophore and 31 were able to fix nitrogen. The most dominant phosphate solubilizing bacteria found were identified as *Pseudomonas* followed by *Aeromonas hydrophila* *Bacillus* sp. and *Burkholderia cepacia*.

**Conclusion:** Phosphate solubilizing bacteria that were isolated from saline soil showed a high potential in to producing growth promoting traits and can be used as inoculants to increase the phosphorus uptake by plants.

**Key words:** Phosphate solubilising bacteria, saline soil, tricalcium phosphate, plant growth promoting traits

### INTRODUCTION

Phosphorus is considered to be the most important element in plant nutrition of, after nitrogen. It is an essential component in all main metabolic procedures in plants for example energy transfer, photosynthesis, signal transduction and respiration (Khan *et al.*, 2010). Inorganic phosphorus is found in soils, mostly in insoluble mineral complexes such as tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , iron phosphate  $\text{FePO}_4$  and aluminium phosphate  $\text{AlPO}_4$  (Barber, 1995), which appear after repeated applications of chemical fertilizers. Plants have not the capacity to absorb these insoluble forms besides only 0.1% of total phosphorus is in soluble form and it is available for plant nutrition (Zhou *et al.*, 1992).

It is for this reason that the available phosphorus levels have to be supplemented in most agricultural soil by adding chemical phosphorus fertilizers. The frequent and imprudent applications of chemical phosphorus fertilizers lead to the decrease of soil fertility by perturbing microbial population—thus reduce crops yield (Gyaneshwar and Naresh, 2002).

Among chemical environmental stress soil salinity is the most important stress factor for plants (Idikut *et al.*, 2012). Salinity leads to osmotic stress and causes the

formation of reactive oxygen species (ROS) thus disturbs cellular structures which and consequently damage mitochondria and chloroplast (Mittler, 2002). Soil salinity considerably reduces absorption of mineral nutrients, particularly phosphorus for the reason that phosphate ions precipitate with calcium ions in saline soil and become inaccessible to plants (Grattan and Grieve, 1999). Utilization of phosphate solubilizing bacteria to solve this problem for reason of their ability to solubilize phosphate in soil is supported by many researchers (Khan *et al.*, 2007). Mechanisms like organic acid production, chelation, and ion exchange reactions are implemented by these bacteria to solubilize inaccessible phosphorus forms and make them available to plants (Vessey, 2003). Phosphate solubilizing bacteria (PSB) are part of plant growth promoting rhizobacterias (PGPRs) and are capable of solubilizing inorganic phosphate from different compounds, such as dicalcium phosphate, tricalcium phosphate and rock phosphate. Moreover, PSMs may also showed plant growth promoting traits such as indole acetic acid (IAA), cytokinins, gibberellic acid and ethylene production, hydrogen cyanide (HCN) and siderophore

\*Corresponding author

production, nitrogen fixation and resistance to soil pathogens etc (Cattelan *et al.*, 1999).

The main objectives of this study were the isolation and screening of phosphate solubilizing bacteria from wheat rhizosphere of salt affected soil and *in vitro* assessment of their plant growth promoting activities.

## MATERIALS AND METHODS

### Soil sampling

Saline soil samples were collected randomly from the rhizosphere regions of wheat plants growing at different sites at Relizane (western Algeria). All samples were kept in plastic bags and transported to the laboratory and stored at 4 °C. Total of fifteen soil samples were air-dried, ground and passed through 2 mm sieve before chemical analyses pH, soil moisture and conductivity of the soil samples were measured.

### Isolation of total phosphate solubilizing bacteria

Isolation of PBS bacteria was carried out by serial dilution method. Ten grams of rhizosphere soil was dissolved in 90 mL of saline phosphate buffer, then shook for 30 min. One mL of rhizosphere soil suspension was added to 9 mL of sterile saline water to obtain a suspension with a  $10^{-2}$  dilution. Subsequently 0.1 mL of the suspension diluted to  $10^{-5}$  was grown on Pikovskaya (Pikovskaya 1948) PVK agar supplemented by 5 g of tricalcium phosphate (TCP) as a sole phosphorus source. Inoculated plates were incubated for 7 days at  $28 \pm 2$  °C. Appearance of clear halo zone on Pikovskaya's agar plates indicates positive phosphate solubilization ability. Bacterial colonies surrounded by a transparent halo on PVK agar were picked off, checked for purity and classified as putative P-solubilizers.

### Quantitative Estimation of Phosphate Solubilization in Culture Broth

The isolated bacteria presenting halo zones on solid PVK medium were used to measure phosphate solubilization in liquid medium. The *in vitro* phosphate solubilizing capacity of each strain was determined on National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP) (Nautiyal, 1999) supplemented by 5 g of TCP as sole phosphorus source. The flasks containing 50 mL of NBRIP medium was inoculated with 1 mL of bacterial suspension ( $2 \times 10^9$  cfu/mL) in triplicates and incubated at  $28 \pm 2$  °C on a rotary shaker 180 rpm for 7 days. The cultures were harvested by centrifugation at 6000 rpm for 30 min. The phosphorus in supernatant was estimated by vanado-molybdate-yellow colour method (Jackson, 1973). The total soluble phosphorus was calculated from the regression equation of standard curve. The values of soluble phosphate liberated were expressed as  $\mu\text{g ml}^{-1}$  over control. The pH of culture supernatants were also measured using a pH Meter.

### Production of indole acetic acid (IAA)

Production of auxin indole-3-acetic acid (IAA) by bacteria was tested using Lauria Bertani (LB) and Salkowski reagent. Fifty milliliter of Lauria Bertani (LB) containing (0.1g/L of L-tryptophan was inoculated with 1 mL of bacterial suspension (approximately  $10^9$  cfu/mL) in triplicates and incubated in incubator Shaker at  $28 \pm 2$  °C and 180 rpm for 4 days in dark. The bacterial cultures were centrifuged at 6,000 rpm for 30 min. Estimation of indole-3-acetic acid (IAA) in the supernatants was done using colorimetric assay (Brick *et al.*, 1991). From a standard curve prepared with known concentration of IAA, the quantity in the culture was determined and expressed as  $\mu\text{g/mL}$ .

### Hydrogen cyanide production

Screening of bacterial isolates for hydrogen cyanide (HCN) production was carried out following the method described by Bakker and Schippers (1987). Bacterial cultures were streaked on nutrient agar medium containing 4.4 g/L of glycine. A Whatman filter paper No. 1 soaked in 0.5% picric acid solution (in 2% sodium carbonate) was placed inside the plate lid. Plates were sealed with parafilm and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 4 days. HCN production was evaluated according to the colour change, ranging from yellow to orange.

### Siderophore production

Siderophore production by rhizobacterial isolates was detected according to Schwyn and Neilands (1987). Autoclaved CAS agar medium was poured in each Petri dish. The bacterial inoculum was placed in the centre of a Petri dish. The plates were incubated in the dark at  $28 \pm 2$  °C for 5 days. The change of CAS agar colour from blue to orange around bacterial colony was considered as positive production of siderophore.

### Nitrogen fixing activity

The visual detection of nitrogen-fixing activities of the selected isolates were observed by using nitrogen-free malate-mannitol medium (NF-MM) (Herman *et al.*, 1994), containing bromothymol blue (BTB) as an indicator. The medium was inoculated by the bacterial isolates and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 24 h. The blue coloured zone producing isolates were marked as nitrogen fixers in the solid culture conditions. The colouring zone was calculated by deducting the colony diameter from the colouring zone diameter (Dobereiner and Day, 1976).

### Ammonia production

All the bacterial isolates were tested for the production of ammonia as described by Cappuccino and Sherman (1992). Overnight grown bacterial cultures were inoculated in 10 mL of peptone broth and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 48 h on a shaker. After incubation 0.5 mL of

Nessler's reagent was added. The development of faint yellow to dark brown colour indicated the production of ammonia.

**Biochemical identification of bacterial isolates**

The bacterial isolates were further characterized by Gram staining, catalase, oxidase, starch hydrolysis activity and motility followed by biochemical identification using API 20NE kit (BioMérieux, France). API 20 NE is a standardized system for the identification of non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods combining 8 conventional tests, 12 assimilation tests. The results were interpreted with the API Web™ software (version 7.0).

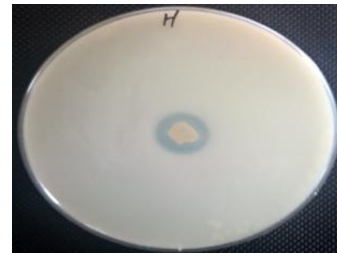
**Statistical analysis**

The data obtained in this study was subjected to analysis of variance (ANOVA) and comparisons of means were performed by Newman and Keuls test at  $p \leq 0.05$  using statbox. The correlation between phosphate solubilization and pH was explored by Excel.

**RESULTS**

The pH of soil samples ranged from 7.82 to 8.46, moisture content from 10.52 to 18.6% and electrical conductivity from 6.1 to 13.3 ds/m. A total of 104 phosphate solubilizing isolates were obtained from different saline soil sites at Relizane (western Algeria). Out of these isolates 41 were selected for their phosphate solubilizing activity. These were screened for their plant growth promoting activities such as indole acetic acid (IAA), Siderophore production, HCN production, nitrogen fixing ability and ammonia production.

Phosphate solubilization ability is marked by the formation of transparent halos around bacterial colony on solid Pikovskaya medium supplemented with tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) as a only source of phosphorus (Figure 1). All the 104 isolates were able to produce transparent halo around the colony with different diameter which indicates a positive phosphate solubilisation ability and they were also capable to solubilize inorganic phosphorus ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) in liquid medium. The results showed that the phosphate solubilizing ability in NBRIP liquid medium of test isolates varied from 24.29 to 738.57  $\mu\text{g}/\text{mL}$  using TCP as a source of insoluble P (data of all PSB are not given). The PSB showing the highest amount of solubilized phosphorus are chosen to be tested for their plant growth promoting traits (41 isolates). The isolate that showed the best capability in solubilizing phosphate was PSB91 (738.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). pH values of the bacterial cultures decreased from initial value of 7.0 to values ranged from 3.9 to 4.61. A highly significant negative ( $r = -0.86$ ) correlation was observed between the amounts of solubilized P and pH values (Table 1).



**Figure 1:** Phosphate solubilisation by bacterial isolate.

**Table 1:** Phosphate solubilization by selected bacterial isolates.

Isolate	Concentration of phosphate ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Final pH of P solubilization
PSB3	605.34±15.91 <sup>d</sup>	4.11±0.15
PSB5	525.60±14.73 <sup>j</sup>	4.35±0.26
PSB8	652.83±25.28 <sup>b</sup>	3.90±0.56
PSB11	515.90±12.78 <sup>l</sup>	4.38±0.89
PSB13	584.17±13.78 <sup>e</sup>	4.27±0.21
PSB16	553.62±24.17 <sup>h</sup>	4.32±0.72
PSB18	555.86±16.60 <sup>gh</sup>	4.31±0.41
PSB22	642.49±22.74 <sup>c</sup>	3.92±0.46
PSB24	587.05±19.65 <sup>e</sup>	4.18±0.27
PSB27	566.17±17.14 <sup>fg</sup>	3.97±0.82
PSB29	562.90±21.92 <sup>gh</sup>	4.18±0.63
PSB31	410.89±16.62 <sup>p</sup>	4.35±0.51
PSB34	453.28±16.95 <sup>n</sup>	4.26±0.32
PSB36	564.74±11.5f <sup>g</sup>	4.26±0.65
PSB38	402.58±15.71 <sup>pq</sup>	4.47±0.12
PSB41	610.96±13.87 <sup>d</sup>	4.12±0.43
PSB43	571.22±18.70 <sup>i</sup>	4.22±0.74
PSB44	541.59±23.67 <sup>l</sup>	4.32±0.75
PSB45	601.85±22.60 <sup>d</sup>	4.11±0.95
PSB49	561.33±12.03 <sup>gh</sup>	4.35±0.31
PSB52	370.04±10.61 <sup>r</sup>	4.53±0.45
PSB56	570.63±16.51 <sup>i</sup>	4.22±0.15
PSB58	398.00±11.76 <sup>q</sup>	4.57±0.61
PSB64	487.71±15.35 <sup>l</sup>	4.44±0.34
PSB66	502.25±14.83 <sup>k</sup>	4.46±0.85
PSB67	481.71±16.49 <sup>l</sup>	4.42±0.22
PSB70	568.05±25.89 <sup>t</sup>	4.25±0.12
PSB71	447.20±17.94 <sup>n</sup>	4.33±0.41
PSB72	466.94±18.60 <sup>mn</sup>	4.34±0.33
PSB74	435.52±20.87 <sup>o</sup>	4.50±0.23
PSB78	348.05±15.24 <sup>s</sup>	4.55±0.29
PSB82	327.50±16.50 <sup>t</sup>	4.61±0.57
PSB85	398.70±12.42 <sup>q</sup>	4.52±0.45
PSB87	538.37±12.70 <sup>i</sup>	4.23±0.11
PSB89	521.9±14.66 <sup>l</sup>	4.30±0.15
PSB91	738.56±16.07 <sup>a</sup>	4.01±0.77
PSB93	455.13±13.18 <sup>n</sup>	4.35±0.67
PSB95	410.35±22.16 <sup>p</sup>	4.42±0.81
PSB97	521.77±23.66 <sup>j</sup>	4.27±0.36
PSB99	407.67±15.57 <sup>pq</sup>	4.47±0.37
PSB102	604.37±17.85 <sup>d</sup>	4.14±0.41
r	-0.86	

Phosphate solubilizing bacteria were assayed for their capacity to produce IAA in LB medium supplemented with L-tryptophan as precursor (1%) by the appearance of pink colour after addition of Salkowski reagent to the culture (Figure 2). IAA production was revealed by almost all the bacterial isolates and IAA quantities of estimated ranged from 10.90 to 63.35 µg/mL as shown in Table 2. A relatively higher content of IAA was found in the culture of bacterial isolate PSB45 followed by PSB85 and PSB91 with 37.43 and 32.85 µg/mL respectively compared to other isolates.



Figure 2: IAA production by bacterial isolates.

Among the 41 isolates, only twelve between them were recorded positive for HCN production by changing filter paper from yellow to orange (Table 2, Figure 3). The ability of the tested bacterial isolates to produce siderophores *in vitro* was assessed qualitatively using the CAS-agar plate assay. Of the 41 bacterial isolates tested, 32 strains produced siderophores. Siderophore production capacity of the isolates was evaluated according to the diameter of the orange halo around bacterial colonies as shown in Figure 5, as weak (4-10 mm), moderate (11- 20 mm) and strong (higher than 21mm). Amongst the siderophore producing isolates, 18 were weak siderophore producers, 10 isolates were moderate siderophore producers while 7 isolates were strong siderophore producers (Table 2).

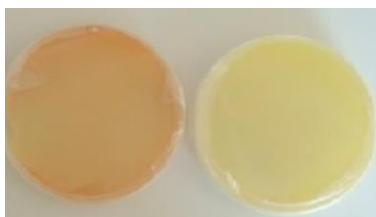


Figure 3: HCN production by isolate.

Phosphate solubilizing bacteria were also tested for their ability to fix nitrogen on nitrogen free medium (NF-MM) supplemented by BTB used as colour indicator to detect the release of ammonium in the culture as shown in Figure 5. Among the 41 bacterial isolates 31 were able to fix nitrogen by changing medium colour from green to blue colour. The diameter of coloration zone ranged from 7 to 26 mm. The highest value of diameter of coloration zone was obtained with the isolate PSB41 (Table 2). All our

selected isolates were capable to produce ammonia (Table 2).

Table 2: Characterization of bacterial isolates for multiple plant growth promoting traits.

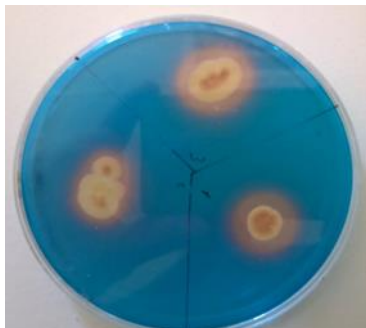
Isolate	Concentration of IAA (µg/ml)	HCN production	SDR production	Zone diameter of N fixation	Ammonia production
PSB3	13.80±2.63 <sup>p</sup>	+	+++	17	+
PSB5	14.37±3.15 <sup>n</sup>	-	-	14	+
PSB8	14.84±1.12 <sup>l</sup>	-	-	16	+
PSB11	18.05±3.83 <sup>g</sup>	-	+	11	+
PSB13	11.59±4.35 <sup>vw</sup>	-	+	09	+
PSB16	12.62±3.16 <sup>s</sup>	-	+	13	+
PSB18	17.54±5.10 <sup>h</sup>	-	++	12	+
PSB22	11.57±2.36 <sup>w</sup>	-	+	-	+
PSB24	11.48±1.94 <sup>w</sup>	-	-	07	+
PSB27	11.56±3.57 <sup>w</sup>	-	-	12	+
PSB29	10.90±4.67 <sup>z</sup>	+	+++	11	+
PSB31	10.77±2.45 <sup>z</sup>	-	-	11	+
PSB34	11.91±3.65 <sup>u</sup>	-	+	10	+
PSB36	16.90±3.05 <sup>t</sup>	+	+	-	+
PSB38	14.74±2.05 <sup>m</sup>	-	-	-	+
PSB41	22.67±3.55 <sup>d</sup>	-	+	26	+
PSB43	12.36±3.69 <sup>i</sup>	+	+++	25	+
PSB44	22.73±2.54 <sup>cd</sup>	+	+	11	+
PSB45	63.35±5.28 <sup>a</sup>	+	++	07	+
PSB49	11.95±3.54 <sup>u</sup>	-	+	12	+
PSB52	11.66±3.45 <sup>y</sup>	-	+	-	+
PSB56	11.22±2.66 <sup>x</sup>	-	+	-	+
PSB58	13.60±3.67 <sup>q</sup>	-	+	21	+
PSB64	13.84±3.54 <sup>p</sup>	-	+	18	+
PSB66	15.49±3.05 <sup>k</sup>	+	++	17	+
PSB67	22.81±7.69 <sup>c</sup>	-	+	10	+
PSB70	20.21±6.76 <sup>f</sup>	-	-	16	+
PSB71	18.05±4.11 <sup>g</sup>	-	++	17	+
PSB72	15.45±3.84 <sup>k</sup>	-	+	-	+
PSB74	14.02±3.58 <sup>o</sup>	+	++	18	+
PSB78	20.60±5.84 <sup>e</sup>	+	++	13	+
PSB82	12.95±4.64 <sup>f</sup>	+	+++	22	+
PSB85	37.43±2.57 <sup>a</sup>	-	+	14	+
PSB87	27.26±3.38 <sup>ab</sup>	-	+	11	+
PSB89	27.10±1.99 <sup>b</sup>	-	-	-	+
PSB91	32.85±2.32 <sup>a</sup>	-	-	-	+
PSB93	16.08±4.56 <sup>j</sup>	-	++	07	+
PSB95	16.12±4.03 <sup>l</sup>	+	++	09	+
PSB97	12.31±5.54 <sup>l</sup>	+	++	-	+
PSB99	11.05±2.69 <sup>y</sup>	-	++	13	+
PSB102	12.64±2.76 <sup>s</sup>	-	+	-	+

+, positive; ++, moderately positive; +++, strongly positive; -, negative

A total of forty one isolates of rhizobacteria obtained were biochemically identified by several tests. 20 bacterial isolates were identified as genus *Pseudomonas* which is the most dominant isolate found including Gram-negative, rod shaped *Pseudomonas luteola* and *Pseudomonas fluorescens*, followed by *Aeromonas hydrophila* (10 isolates). Some of these are Gram-positive spore forming bacteria identified as *Bacillus* sp. (8 isolates). Only 3 isolates were Gram-negative and rod shaped identified as *B. cepacia* (Table 3).

**Table 3:** Identification of selected bacterial isolates.

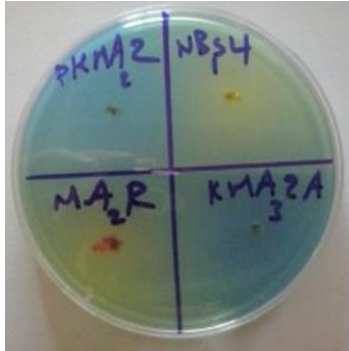
Isolate	Gram's staining	Shape	Catalase	Oxydase	Amylase	Motility	ID
PSB3	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB5	+	rod	+	-	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB8	+	rod	+	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB11	-	coccibacilli	+	-	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB13	-	rod	+	-	+	+	<i>P. fluorescens</i>
PSB16	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB18	-	rod	+	-	-	+	<i>P. luteola</i>
PSB22	-	rod	+	+	+	+	<i>B. cepacia</i>
PSB24	+	rod	+	-	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB27	+	rod	+	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB29	-	coccibacilli	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB31	+	rod	+	-	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB34	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB36	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB38	+	rod	+	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB41	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB43	-	coccibacilli	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB44	-	coccibacilli	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB45	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB49	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB52	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB56	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB58	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB64	-	rod	+	-	+	+	<i>B. cepacia</i>
PSB66	-	rod	+	+	+	+	<i>P. fluorescens</i>
PSB67	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB70	+	rod	+	-	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB71	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB72	-	coccibacilli	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB74	-	Rod	+	+	+	+	<i>B. cepacia</i>
PSB78	-	coccibacilli	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB82	-	rod	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB85	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB87	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB89	-	coccibacilli	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB91	+	Rod	+	-	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
PSB93	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>
PSB95	-	rod	+	-	+	+	<i>P. fluorescens</i>
PSB97	-	coccibacilli	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB99	-	rod	+	+	-	+	<i>A. hydrophila</i>
PSB102	-	rod	+	-	+	+	<i>P. luteola</i>



**Figure 4:** Siderophore production by bacteria.

In this study the highest amounts of released phosphorus were solubilized by *Pseudomonas* with 24.39% followed by *Bacillus sp.* (12.19%), *Aeromonas* (9.75%) and finally *Burkholderia* with 0.41%. Bacteria producing the highest concentration of IAA were isolates belonging to the genus *Pseudomonas* (24.39%) followed by *Aeromonas* (9.75%), *Bacillus* (8.33%) and *Burkholderia* with 0.41%. For HCN production *Aeromonas* was the higher producer (14.63%) followed by *Pseudomonas* (12.19%) *Burkholderia* (0.41%), and finally *Bacillus* with 0%. Isolates belonging to *Pseudomonas* were able to produce siderophore with 48.78% followed by *Aeromonas* (14.63%), *Burkholderia* (7.31%) and *Bacillus* with 0%. The majority of isolates belonging to genus *Pseudomonas* were able to fix nitrogen with

19.51% followed by *Aeromonas* and *Bacillus* (19.51% and 12.19% respectively) and finally *Burkholderia* with 4.87%



**Figure 5:** Nitrogen fixation by bacterial isolates.

## DISCUSSION

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are a group containing a large number of bacteria number found in the rhizosphere, at root exteriors and in association with them, which can enhance directly and/or indirectly yield and growth of agricultural crops. The capability of some rhizospheric microorganisms to solubilize soil phosphate and make it available for plants by converting it into accessible forms like orthophosphate, is an important activity in a PGPB for improving plant growth (Chen *et al.*, 2006). In our study 104 phosphate solubilizing bacterial isolates were isolated from wheat plant rhizosphere of salt affected soil; these bacteria are more effective in phosphorus solubilization than fungi as reported by Alam *et al.* (2002). Our rhizobacterial isolates were biochemically identified as *Pseudomonas*, *A. hydrophila*, *Bacillus* sp. and *B. cepacia*. Srinivasan *et al.* (2012) also isolated *Pseudomonas* and *Bacillus* as phosphate solubilizers from salt affected soil. Moreover *A. hydrophila* and *Bacillus* sp. were isolated from the rhizospheric soil of wheat grown in saline soil by Ashraf *et al.* (2004). In quantitative estimation, all isolates showed diverse levels of phosphate solubilizing activity. The higher concentration of released phosphorus in cultures was exhibited by genus *Pseudomonas* followed by *Bacillus*. The same results were described by Ahmad *et al.* (2008) who reported that solubilization of phosphate was commonly detected in the isolates of *Bacillus* and *Pseudomonas*. Prior reports defined some *Burkholderia* strains as competent phosphate solubilizers (Peix *et al.*, 2001; Caballero-Mellado *et al.*, 2007). pH of bacterial cultures dropped significantly compared to the control. Similar results were observed by Mardad *et al.* (2013) and Alam *et al.* (2002). A negative correlation ( $r = -0.86$ ) was detected between the amounts of solubilized phosphorus of bacterial cultures and their pH values. The same negative correlation was reported by Xiao *et al.* (2009). Mainly, the mode of action of phosphate solubilising bacteria in soil is by the secreting of acids into the medium (Khan *et al.*, 2014; Oteino *et al.*, 2015). Hence,

various genus of bacteria including *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, and *Azotobacter* sp. employ many solubilization reactions, such as acidification, exchange reactions, chelation and production of acids to release phosphorus from mineral complexes (Pandey and Maheshwari, 2007).

Recently many researchers have studied production of phytohormones by PGPR (Rajkumar and Freitas, 2008; Ahmad and Khan, 2012). The most important plant growth regulators produced by phosphate solubilizing microorganisms are auxins (Oves *et al.*, 2013). 75% of bacteria isolated from saline soil have the capacity to produce IAA which concluded that saline soil is a rich source of IAA producing bacteria. A high level of IAA production by *Pseudomonas* was noted in our study and by other researchers (Ahmad *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012). Other IAA producing bacteria belongs to *Aeromonas* (Halda-Alija, 2003) and *Bacillus* (Swain *et al.*, 2007) were also reported.

HCN is a volatile, secondary metabolite that suppresses the development of microorganisms. An important role of HCN produced by bacteria from rhizosphere in biological control of pathogens has been described (Siddiqui *et al.*, 2006). In the current study isolates belonging to genus of *Aeromonas*, *Burkholderia* and *Pseudomonas* were able to produce HCN. To date various bacterial genera are able to produce HCN, including *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* and *Rhizobium* (Devi *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008).

Siderophores produced by PGPR can promote plant growth either directly or indirectly, using radiolabeled ferric siderophores (Sujatha and Ammani, 2013). Our results showed that isolates belonging to genus *Pseudomonas* and *Burkholderia* were the best siderophore producers but isolates belonging to *Bacillus* sp. were unable to produce them. Also García-Gutiérrez *et al.* (2012) found that all *Pseudomonas* strains isolated from soil were able to produce siderophore, while only one strain among *Bacillus* was able to produce such compounds. Luvizotto *et al.* (2010) reported that *B. cepacia* exhibit a high levels of siderophore production.

The presence of nitrogen-fixing bacteria in soil along with its isolation and conversion into PGPR biofertilizer is an important strategy reducing the use of expensive chemical fertilizers especially in nutrient poor and degraded soils (Cakmakci *et al.*, 2006). The majority of our rhizobacterial isolates have the ability to fix nitrogen. Currently there are evidences that plant stimulation effect by PGPR such as *Azoarcus* sp., *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter* is related to their ability to fix nitrogen (Vessey, 2003). In the study of Cakmakci *et al.* (2006), the quality and yield of wheat, spinach and sugar beet was improved using nitrogen fixing bacterial isolates *Pseudomonas* RC06 and *Bacillus* OSU-142 as biofertilizers. Zhang *et al.* (1996) reported that *A. hydrophila* have the ability to fix atmospheric nitrogen.

Ammonia production is an essential trait exhibited by PGPR, which can effect indirectly plants growth (Yadav *et al.*, 2010). All our isolates were able to produce ammonia. These results are similar with those of Ahmed *et al.* (2008)

who revealed the production of ammonia commonly detected in all the isolates of *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Azotobacter*. Similarly, all bacteria identified as *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated by Yadav *et al.* (2010) from chickpea rhizosphere in India have the ability to produce ammonia.

## CONCLUSION

Phosphate solubilizing bacteria isolated from wheat rhizosphere from saline soil located in western region of Algeria showed a high potential to produce growth promoting traits. Isolates belonging to the *Bacillus* and *Pseudomonas* showed a high phosphate solubilisation. *Pseudomonas* sp. was the highest producer of IAA and siderophore and had the capacity to fix nitrogen. *A. hydrophila* and *B. cepacia* showed high potential produce HCN and other PGP traits also. Those bacterial isolates can be used as inoculants to enhance the phosphorus uptake by plants and reduce the utilization of phosphorus fertilizers and increase yield of crop production.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was funded by the Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Mostaganem, Algeria.

The authors wish to thank Dr. CHIBANI Abdelwaheb for his help in the finalization of the English version of this paper.

## REFERENCES

- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizobacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* **163**, 173-181.
- Ahmad, M. and Khan, M. S. (2012). Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere* **86**, 945-950.
- Alam, S. S., Khalil, N., Ayub, B. and Rashid, M. (2002). *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agricultural Biology* **4**, 454-458.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O. and Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils* **40**, 157-162.
- Bakker, A. W. and Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biology and Biochemistry* **19**, 451-457.
- Barber, S. A. (1995). Soil nutrient bioavailability: A mechanistic approach, 2nd Edition. John Wiley. New York, USA. pp. 245-248.
- Brick, J. M., Bostock, R. M. and Silverstone, S. E. (1991). Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 535-538.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-de Los Santos, P. and Martínez-Aguilar, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5308-5319.
- Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A. and Sahin, F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 1482-1487.
- Cappuccino, J. G., and Sherman, N. (1992). Biochemical activities of microorganisms. In: Microbiology, A Laboratory Manual 3rd ed. Cappuccino, J. G. and Sherman, N. (eds.). Benjamin / Cummings Publishing Co. California, USA. pp.188-247.
- Cattelan, A. J., Hartel, P. G. and Fuhrmann, J. J. (1999). Screening of plant-growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal* **63**, 1670-1680.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A. and Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* **34**, 33-41.
- Devi, K. K., Seth, N., Kothamasi, S. and Kothamasi, D. (2007). Hydrogen cyanide producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermesobesus*(Rambur) by cyanide poisoning under *in vitro* conditions. *Current Microbiology* **54**, 74-78.
- Dobereiner, J. and Day, J. M. (1976). Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Newton, W.E. and Nyman, C.J. (eds.). Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation, (SNF' 75) Vol2. Washington State University Press, Pullman. USA. pp. 518-538.
- García-Gutiérrez, L., Romero, D., Zerrouh, H., Cazorla, F. M., Torés, J. A., Vicente, A. and Pérez-García, A. (2012). Isolation and selection of plant growth promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. *Plant and Soil* **358**, 201-212.
- Grattan, S. R. and Grieve, C. M. (1999). Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* **78**, 127-157.
- Gyaneshwar, P. and Naresh, K. G. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* **245**, 83-93.
- Halda-Alija, L. (2003). Identification of indole-3- acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Canadian Journal of Microbiology* **49**, 781-787.
- Herman, R. P., Provencio, K., Torrez, T. and Seager, G. M. (1994). Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen efficient guild in a desert

- bajada grassland. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1160-1165.
- Idikut, L. Z., Dumlupinar, S. N., Kara, C., Yururdurmaz, A. and Çolkese, M. (2012).** The effect of different temperatures and salt concentrations on some popcorn landraces and hybrid corn genotype germinations. *Pakistan Journal of Botany* **44**, 579-587.
- Jackson, M. L. (1973).** Soil chemical Analysis. Prentice Hall of Englewood cliffs. New Jersey, USA. pp. 378-398.
- Khan, M. S., Zaidi, A. and Ahmad, E. (2014).** Mechanism of phosphate solubilisation and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. *In: Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Khan, M.S., Zaidi, A. and Mussarrat, J. (eds.). Springer International Publishing, Switzerland. pp. 34-45.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmed, M., Oves, M. and Wani, P. M. (2010).** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current respective. *Archives of Agronomy and Soil Science* **56**, 73-98.
- Khan, M. S., Zaidi, A. and Wani, P. A. (2007).** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agronomy for Sustainable Development* **27**, 29-43.
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C. and Negi, S. (2012).** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: An *in vitro* study. *Recent Research in Science and Technology* **4**, 01-05.
- Luvizotto, D. M., Marcon, J., Andreote, F. D., Neves, A. A. C., Araujo, W. L. and Pizzirani-Kleiner, A. A. (2010).** Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**, 1829-1836.
- Mardad, I., Serrano, A. and Soukri, A. (2013).** Solubilisation of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research* **7**, 626-635.
- Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sciences* **7**, 405-410.
- Nautiyal, C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 265-270.
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S. K, Lloyd, A., Rayan, D., Germaine, K. J. and Dowling, D. N. (2015).** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology* **6**, 745-755.
- Oves, M., Khan, M. S. and Zaidi, A. (2013).** Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. *European Journal of Soil Biology* **56**, 72-83.
- Pandey, P. and Maheshwari, D. K. (2007).** Two species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus* Cajan. *Current Science* **8**, 92-25.
- Peix, A., Mateos, P. F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E. and Velazquez, E. (2001).** Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1927-1935.
- Pikovskaya, R. I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil inconection with vital activity of some microbial species. *Microbiologia* **17**, 362-370.
- Rajkumar, M. and Freitas, H. (2008).** Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* **71**, 834-842.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987).** Universal assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* **160**, 47-56.
- Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S, Hussain Sheikh, I. and Khan, A. (2006).** Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**, 641-650.
- Srinivasan, R., Yendigeri, M. S., Kashyap, S. and Alagawadi, A. R. (2012).** Effect of salt on survival and P solubilization potential on phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. *Saudi Journal of Biological Sciences* **19**, 427-434.
- Sujatha, N. and Ammani, K. (2013).** Siderophore production by the isolates of fluorescent *Pseudomonads*. *International Journal of Current Research and Academic Review* **5**, 1-7.
- Swain, M. R., Naskar, S. K. and Ray, R. C. (2007).** Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisets by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Polish Journal of Microbiology* **56**, 103-110.
- Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**, 571-586.
- Xiao, C., Chi, R., Huan, H. E. and Zhang, W. (2009).** Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. *Journal of Central South University of Technology* **16**, 0581-0587.
- Yadav, J., Verma, J. P. and Tiwari, K. N. (2010).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and plant growth chickpea (*Cicerarietinum* L.) under *in vitro* conditions. *Biological Forum An International Journal* **2(2)**, 15-18.
- Zhang, F., Dashti, N., Hynes, R. K. and Smith, D. L. (1996).** Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Annals of Botany* **77**, 453-459.