



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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie appliquée**

**Option: interaction microorganismes, hôtes et environnement**

# **THÈSE**

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

**Par**

**HAMOUM Hakim**

**THÈME**

**Screening des diazotrophes non symbiotiques associés aux plantes  
des zones salines de l'ouest algérien : effet phyto-stimulateur sur la  
croissance du blé dur**

Soutenu publiquement le : 21/05/2017

**Membres de jury**

<b>DJIBAOUI Rachid</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Président</b>
<b>MEKHALDI Abdelkader</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>BOUZNAD Ahcene</b>	<b>Maitre de conférence B</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Co-Directeur de thèse</b>
<b>BELKHODJA Moulay</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université d'Oran 1</b>	<b>Examineur</b>
<b>BELLAHCENE Miloud</b>	<b>Professeur</b>	<b>C.U. Ain-Temouchent</b>	<b>Examineur</b>

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ  
بِأَنَّكَ مَا أَتَى مَا لَمْ يَكُنْ لَكَ

﴿ قُلْ إِلهٌ صَلَّيْتَنِي وَتُسَلِّمِي وَمَحْيَايَ وَمَمَاتِي لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ ، لِلَّهِ يَرْجِعُ

لَهُ وَيُنزِلُ لِمَنْ أُمِرَتْ وَأَنَا أَوَّلُ الْمُسْلِمِينَ ﴾ [الأنعام: 162، 163].

## **AVANT-PROPOS**

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale (LMBV) à l'université de Mostaganem. Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire, enseignants, doctorants et personnel de soutien avec j'ai eu souvent des moments très agréables.

Mes plus vifs remerciements vont Mr RATET Pascal, directeur de recherche au laboratoire de contrôle génétique de la symbiose à l'institut des sciences des plantes (IPS2), Université de Paris Sud, France. Pour son accueil et son aide ainsi que sa disponibilité durant ma visite à son laboratoire.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mr. MEKHALDI Abdelkader ainsi que par Mr. BOUZNAD Ahcene. Je voudrais leur exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir encadré, pour leur compréhension, leur intérêt porté pour notre sujet de recherche leur patience, leurs corrections, leurs conseils constructifs et surtout leur confiance tout au long de parcours de ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux au président du jury Mr. DJIABOUI Rachid d'avoir eu l'amabilité d'accepter de critiquer et de juger ce travail, je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury.

Je tiens à remercier également Mr BELKHODJA Moulay et Mr BELLAHCENE Miloud d'avoir ménagé leurs temps pour juger et critiquer ce travail.

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents...*

# Sommaire

Avant-propos

Sommaire

Liste des abréviations

Index des figures

Index des tableaux

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction ..... 1

## Chapitre I. Revue bibliographique

<b>I.1. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes</b> .....	4
I.1.1. La rhizosphère.....	4
I.1.2. L'activité microbologique de la rhizosphère .....	5
I.1.3. Taxonomie des PGPR .....	6
<b>I.2. Les bactéries diazotrophiques</b> .....	8
I.2.1. Les systèmes diazotrophiques .....	8
I.2.1.1. Le système libre : .....	8
I.2.1.2. Les système associatif .....	8
I.2.1.2.1. Le système associatif exophyte (épiphytes) .....	8
I.2.1.2.2. Le système associatif endophyte .....	9
I.2.1.3. Le système symbiotique .....	9
I.2.2. Importance des différents systèmes fixateurs de l'azote.....	9
I.2.3. Mécanisme de la fixation biologique de l'azote atmosphérique .....	10
I.2.4. Génétique de la fixation d'azote : .....	11
I.2.5. Méthodes de mesure de l'activité fixatrice de l'azote .....	11
I.2.5.1. La culture sur milieu exempt d'azote .....	11
I.2.5.2. La technique de kjeldahl .....	11
I.2.5.3. La méthode isotopique : .....	12
I.2.5.4. Le test de réduction de l'acétylène .....	12
<b>I. 3. Mode d'action des PGPR</b> .....	12
I.3.1. Effets directs .....	12
I.3.1.1. La fixation de l'azote atmosphérique .....	12
I.3.1.2. La solubilisation des phosphates .....	13
I.3.1.3. La production des sidérophores et la compétition pour le fer .....	13
I.3.1.4. Les régulateurs de la croissance végétale.....	14

I.3.1.4.1. La production des phytohormones .....	14
I.3.1.5. La production de l'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase.....	15
I.3.2. Effets indirects .....	16
I.3.2.1. La compétition pour l'espace et les nutriments.....	16
I.3.2.2. L'antibiose .....	16
I.3.2.3. Résistance Systémique Induite (ISR).....	16
<b>I.4. Effet des PGPR sur la tolérance des plantes au stress salin.....</b>	<b>17</b>
I.4.1. Qu'est-ce que la salinité ?.....	17
I.4.2. Effets de la salinité du sol sur la croissance et la physiologie des plantes .....	18
I.4.3. Adaptations des rhizobactéries au stress abiotiques.....	19
I.4.4. Atténuation du stress abiotique chez les plantes par les rhizobactéries .....	20
I.4.4.1. L'absorption des éléments nutritifs.....	20
I.4.4.2. La teneur en pigments photosynthétiques .....	21
I.4.4.3. La modulation du niveau d'éthylène par l'activité ACC-désaminase .....	21
I.4.4.4. La production des phytohormones .....	21
I.4.4.5. L'accumulation du proline et d'autres osmolytes .....	22
<b>I.5. L'utilisation des PGPR dans la production agricole.....</b>	<b>22</b>
I.5.1. Les céréales .....	23
I.5.1.1. le blé.....	23
I.5.2. Amélioration des cultures des céréales .....	23
I.5.3. Commercialisation des PGPR.....	24
I.5.4. Perspectives d'avenir des PGPR.....	25

## **Chapitre II. Matériel et méthodes**

<b>II.1. Localisation de la zone d'étude et caractéristiques physico-chimiques des sols prélevés .....</b>	<b>26</b>
II.1.1. Délimitation de la zone d'étude .....	26
II.1.2. Prélèvement des échantillons de sol .....	27
II.1.3. Caractères physicochimiques du sol.....	27
<b>II.2. Isolement et caractérisation des bactéries diazotrophes libres .....</b>	<b>28</b>
II.2.1. Isolement des bactéries diazotrophes.....	28
II.2.1.1 Isolement des bactéries diazotrophes sur Milieu NF .....	28
II.2.1.2. Isolement des bactéries diazotrophes sur Milieu Ashby .....	28
II.2.1.3. Isolement des bactéries diazotrophes sur Milieu Beurk.....	28
II.2.2. Caractérisation morphologique et phénotypique des isolats.....	29
II.2.3. Caractérisation génotypique des isolats.....	29
II.2.3.1. Extraction de l'ADN.....	29
II.2.3.2. Dosage de l'ADN.....	29

II.2.3.3. Amplification du gène ARNr 16S par PCR.....	30
II.2.3.4. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	30
II.2.3.5. Séquençage de l'ADNr 16S.....	30
<b>II.3. Caractérisation in vitro des isolats pour la promotion de la croissance des plantes .....</b>	<b>31</b>
II.3.1. Mesure de l'activité de la nitrogénase .....	31
II.3.2. Production de l'acide indole acétique (AIA) .....	31
II.3.3. Solubilisation du phosphate .....	32
II.3.3.1. Evaluation qualitative sur milieu gélosé .....	32
II.3.3.2. Evaluation quantitative en milieu liquide .....	32
II.3.4. Production de l'ACC désaminase .....	33
II.3.5. Production des sidérophores .....	34
II.3.6. Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) .....	34
II.3.7. Production d'acide cyanhydrique (HCN) .....	34
<b>II.4. Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination et la croissance du blé dur sous stress salin .....</b>	<b>35</b>
II.4.1. Matériel végétal .....	35
II.4.2. Souches bactériennes .....	35
II.4.2.1. Survie et croissance des isolats sélectionnés en présence du NaCl .....	35
II.4.2.2. Effets du NaCl sur les différentes activités PGP des isolats sélectionnés.....	35
II.4.3. Préparation de l'inoculum.....	36
II.4.4. Désinfection des graines .....	36
II.4.5. Effet de l'inoculation sur le taux de germination et l'index de vigueur .....	36
II.4.6. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantules de blé .....	37
II.4.6.1. Dispositif expérimental et conditions de croissance .....	37
II.4.6.2. Irrigation et suivi de la croissance des plantes.....	37
II.4.6.3. Détermination des paramètres de croissance .....	38
II.4.6.3.1 Détermination des paramètres morphologiques.....	38
II.4.6.3.2. Détermination des paramètres biochimiques .....	38
II.4.6.3.2.1. Teneur en chlorophylle .....	38
II.4.6.3.2.2. Contenu en ions Na <sup>+</sup> et K <sup>+</sup> de la partie aérienne et racinaire .....	38
II.4.6.3.2.3. Teneur en proline .....	38
<b>II.5. Traitement statistique .....</b>	<b>39</b>

## **Chapitre III. Résultats et discussion**

<b>III. 1. Isolement et identification des bactéries diazotrophiques.....</b>	<b>40</b>
III.1.1. Caractérisation physicochimique des sols .....	40
III.1.2. Caractérisation morphologique et génotypique des isolats bactériens .....	41

III.1.2.1. Identification des isolats sélectionnés.....	41
III.1.3. Discussion .....	49
<b>III.2. Caractérisation physiologique des isolats par l'évaluation de leurs activités PGP.....</b>	<b>52</b>
III.2.1. Fixation de l'azote atmosphérique.....	53
III.2.2. Production de l'acide indole acétique (AIA).....	55
III.2.3. Solubilisation du phosphate.....	56
III.2.3.1. Evaluation qualitative sur gélose.....	56
III.2.3.2. Evaluation quantitative .....	58
III.2.4. Production de l'ACC désaminase.....	60
III.2.5. Production des sidérophores.....	60
III.2.6. Production de l'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) et de l'acide cyanhydrique (HCN).....	61
III.2.7. Sélection des isolats pour le test in planta et analyse en composantes principales (ACP)...	63
III.2.8. Discussion .....	65
<b>III.3. Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination et la croissance du blé dur sous stress salin .....</b>	<b>71</b>
III.3.1. Effet du stress salin sur la survie et la croissance des isolats sélectionnés.....	71
III.3.2. Effet du stress salin sur l'expression des activités liées à la promotion de la croissance des plantes (PGP).....	72
III.3.2.1. Effet du stress salin sur la capacité de fixation de l'azote .....	72
III.3.2.2. Effet du stress salin sur la production de l'acide indole acétique (AIA) .....	72
III.3.2.3. Effet du stress salin sur la solubilisation du phosphate .....	72
III.3.3. Effet de l'inoculation bactérienne sur le taux de germination des graines de blé .....	76
III.3.4. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé sous stress salin.....	77
III.3.4.1. Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance morphologiques du blé .....	77
III.3.4.1.1. Effet de l'inoculation sur la hauteur et le poids sec de la partie aérienne.....	77
III.3.4.1.2. Effet de l'inoculation sur la profondeur et le poids sec de la partie racinaire .....	78
III.3.4.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres biochimiques .....	82
III.3.4.2.1. Teneur en chlorophylle total.....	82
III.3.4.2.2. Teneur en proline.....	82
III.3.4.2.3. Teneur en Na <sup>+</sup> de la partie aérienne et racinaire.....	83
III.3.4.2.4. Teneur en K <sup>+</sup> de la partie aérienne et racinaire.....	83
III.3.5. Discussion .....	86
<b>Conclusion.....</b>	<b>90</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>92</b>
<b>Annexes</b>	

## Liste des principales abréviations

**ABA** : Acide Abscissique.

**ACC** : aminocyclopropane 1-carboxylique.

**AIA** : acide indole acétique.

**ANOVA** : analyse de la variance.

**APX**: Ascorbate peroxidase.

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

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

**BSP** : Bactéries solubilisant le phosphate.

**CAT**: Catalase.

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

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.

**DO** : densité optique.

**dS** : Déci Siemens.

**EPS** : Exopolysaccharide.

**FAO** : de l'anglais «Food and agriculture organisation».

**GPS** : de l'anglais «Global Position Système».

**GPX**: Glutathionne peroxydase.

**Ha** : Hectare.

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

**ISR** : de l'anglais «Induced systemic resistance».

**kDA** : kilo Dalton.

**mM**: milli Molaire.

**PBS** : de l'anglais «Phosphate Buffered Saline».

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

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

**PGPB** : de l'anglais «Plant growth promoting bacteria».

**PGPR** : de l'anglais «Plant growth promoting rhizobacteria».

**POD** : Peroxydase.

**PTC** : Phosphate tricalcique.

**PVK** : Pikovskaya.

**ROS** : de l'anglais «Reactive Oxygen Species».

**SOD**: Superoxide dismutase.

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

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

**LPS** : lipopolysaccharides

## Index des figures

<b>Figure I.1.</b> Modèle schématique du mécanisme d'action de l'ACC désaminase des PGPR pour abaisser la concentration de l'éthylène, empêchant ainsi l'inhibition de l'allongement racinaire causée par l'éthylène .....	15
<b>Figure I.2.</b> Représentation schématique des effets de la salinité sur les plantes. ....	19
<b>Figure II.1.</b> Délimitation géographique des zones de prélèvement des échantillons de sol .....	26
<b>Figure II.2.</b> Prélèvement des échantillons de sol .....	27
<b>Figure II.4.</b> Répartition des solutions dans la plaque de micro-titration de 96 puits pour le test de l'ACC désaminase .....	34
<b>Figure III.1.</b> Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) des isolats de <i>Bacillus</i>	43
<b>Figure III.2.</b> Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat BHA62 : <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	44
<b>Figure III.3.</b> Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat MHC54 : <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	44
<b>Figure III.4.</b> Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat MHB56 : <i>Raoultella planticola</i> .....	44
<b>Figure III.5.</b> Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat NHA23 : <i>Serratia odorifera</i> .....	45
<b>Figure III.6.</b> Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat NHB9 : <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	45
<b>Figure III.7.</b> Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat SHA21 : <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	45
<b>Figure III.8.</b> Electrophorèse sur gel d'agarose des résultats de l'amplification du gène ARNr 16S de différents isolats .....	46
<b>Figure III.9.</b> Relations phylogénétiques entre isolats du même genre et une séquence du Genbank basés sur la séquence de l'ADNr 16S .....	48
<b>Figure III.10.</b> Fréquence des activités PGP des isolats .....	53
<b>Figure III.11.</b> Chromatogramme de l'activité de réduction de l'acétylène généré par l'isolat NHA13 dont l'activité est maximale .....	54
<b>Figure III.12.</b> Chromatogramme de l'activité de réduction de l'acétylène généré par l'isolat NHA67 dont l'activité est nulle .....	54
<b>Figure III.13.</b> Capacité de fixation d'azote des isolats estimée par le test de réduction de l'acétylène .....	55
<b>Figure III.14.</b> Production de l'acide indole acétique par les isolats.....	56
<b>Figure III.15.</b> Taux de production de l'acide indole acétique par les isolats .....	56
<b>Figure III.16.</b> Solubilisation du phosphate tricalcique par l'isolat NMA27 sur milieu PVK .....	57

<b>Figure III.17.</b> Efficacité de solubilisation (ES) du phosphate tricalcique sur gélose Pikovskaya par les isolats bactériens.....	<b>57</b>
<b>Figure III.18.</b> Taux de solubilisation du phosphate tricalcique en milieu NBRIP par les isolats bactériens .....	<b>58</b>
<b>Figure III.19.</b> Métabolisme de l'ACC par les isolats bactériens .....	<b>60</b>
<b>Figure III.20.</b> Production des sidérophores et de l'acide cyanhydrique par les isolats bactériens .....	<b>61</b>
<b>Figure III.21.</b> Représentation des Coordonnées des paramètres PGP .....	<b>64</b>
<b>Figure III.22.</b> Représentation des Coordonnées des individus .....	<b>65</b>
<b>Figure III.23.</b> Effet du stress salin sur la croissance des isolats sélectionnés.....	<b>71</b>
<b>Figure III.24.</b> Effet du stress salin sur la réduction de l'acétylène par les isolats sélectionnés..	<b>73</b>
<b>Figure III.25.</b> Effet du stress salin sur la production de l'AIA par les isolats sélectionnés.....	<b>73</b>
<b>Figure III.26.</b> Effet du stress salin sur la solubilisation du phosphate par les isolats sélectionnés.....	<b>74</b>
<b>Figure III.27.</b> Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination des graines de blé .....	<b>76</b>
<b>Figure III.28.</b> Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantules de blé dur à différents niveau de NaCl .....	<b>80</b>
<b>Figure III.29.</b> Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques des plantules de blé dur à différents niveau de NaCl .....	<b>81</b>
<b>Figure III.30.</b> Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres biochimiques des plantules de blé dur à différents niveau de NaCl .....	<b>85</b>

## Index des tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Effet de différents niveaux de salinité sur la physiologie et le rendement des plantes cultivées .....	<b>18</b>
<b>Tableau II.1.</b> Croisement des facteurs de l'expérimentation.....	<b>37</b>
<b>Tableau III.1.</b> Quelques caractéristiques physico-chimiques des sols prélevés .....	<b>40</b>
<b>Tableau III.2.</b> Caractères biochimique, morphologique et génotypique des isolats.....	<b>47</b>
<b>Tableau III.3.</b> Taux de réduction de l'acétylène, production de l'AIA et solubilisation du phosphate par les isolats testés.....	<b>59</b>
<b>Tableau III.4.</b> Activités PGP des isolats testés .....	<b>62</b>
<b>Tableau III.5.</b> Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes activités PGP .....	<b>63</b>
<b>Tableau III.6.</b> Effet du stress salin sur la croissance et les activités PGP des isolats sélectionnés .....	<b>75</b>
<b>Tableau III.7.</b> Valeurs des index de vigueurs .....	<b>76</b>
<b>Tableau III.8.</b> Résultats des paramètres morphologiques des plantules de blé inoculées par des isolats PGPR cultivées sous stress salin .....	<b>79</b>
<b>Tableau III.9.</b> Résultats des paramètres biochimiques des plantules de blé inoculées par des isolats PGPR cultivées sous stress salin .....	<b>85</b>

## Résumé

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) représentent une partie des rhizobactéries qui ont la capacité de favoriser la croissance des plantes et peuvent améliorer la performance et la tolérance des plantes lors des stress environnementaux. Dans ce travail, nous avons étudié le potentiel des bactéries diazotrophes non symbiotique sur la croissance du blé dur cultivé sous stress salin. Un ensemble de 296 rhizobactéries ont été isolées à partir des rhizosphères du blé cultivé dans des sols salins (dans les périmètres de la Mina et du bas-Chélif, wilaya de Relizane à l'ouest d'Algérien). Tous les isolats ont été testés pour évaluer leur production d'acide indole acétique (IAA), la solubilisation du phosphate, la production des sidérophores, du cyanure d'hydrogène (HCN) et de l'ammoniac. Seulement 35 isolats ayant des multiples caractères PGP, ont été retenus et évalués pour la recherche de l'activité de l'ACC désaminase et l'activité de réduction de l'acétylène (ARA). L'analyse des séquences d'ADNr 16S de ces isolats a permis de les classer aux sept genres bactériens : *Bacillus*, *Sténotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas* et *Raoultella*. Sur la base des activités PGP, cinq isolats performants (NHA15, MHC54, NHA78, NMB8 et NMA27) ont été sélectionnés pour évaluer leur potentiel d'amélioration de la croissance des plants de blé dur cultivés dans des conditions salines. Leur croissance en bouillon nutritif à des concentrations de sel allant de 0 à 500 mM révèle une tolérance jusqu'à 500mM avec des taux de croissance élevés entre 200 et 300 mM du NaCl. Une diminution de la quantité de phosphate solubilisé a été enregistrée au-delà du 400mM et une diminution des quantités d'AIA ont été obtenus au-delà de 200mM. Les isolats ont été utilisés pour inoculer les plantules de blé cultivées dans des sols stérilisés dans les différentes conditions de salinité (0, 100 et 200 mM). Dans les expériences en pots, l'inoculation par les isolats a amélioré l'exclusion des ions  $\text{Na}^+$  et l'absorption des ions  $\text{K}^+$  dans le blé ainsi que le contenu en chlorophylle a été aussi amélioré. La concentration de proline dans les feuilles a été augmentée par la salinité mais diminuée après l'inoculation bactérienne. Les résultats obtenus montrent que les isolats sélectionnés ont relativement atténué le stress salin dans le blé, probablement grâce à l'intégration de plusieurs mécanismes. Par conséquent, l'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes, fixant l'azote et tolérant le sel peut présenter une approche biotechnologique importante pour diminuer l'impact de la salinité sur la croissance et le rendement des cultures.

**Mots clé** : AIA, ARA , diazotrophe, PGPR, sidérophores, Solubilisation du phosphate, stress salin.

## Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) represent a group of rhizobacteria having the ability to promote plant growth and to improve performance and tolerance of plants under environmental stress. In the presented work, we studied the potential of non-symbiotic diazotrophic bacteria on the growth of wheat grown in salt stressed soil. A total of 296 rhizobacteria were isolated from the rhizosphere of wheat grown in saline soils (in the plain of Mina and low-Chéiff, wilaya of Relizane in western Algeria). All isolates were tested to evaluate their production of indole acetic acid (IAA), phosphate solubilization, siderophore, hydrogen cyanide (HCN) and ammonia production. Only 35 isolates showing multiple PGP traits were retained and evaluated for ACC déaminase activity and acetylene reduction assay (ARA). 16S rDNA-based analysis resulted in the classification of isolates into seven bacterial genera: *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas* and *Raoultella*. Basis on their PGP traits, five high performing isolates (NHA15, MHC54, NHA78, NMB8 and NMA27) were selected to test their growth enhancement potential in wheat under saline conditions. Their growth in nutrient broth at salt concentrations ranging from 0 to 500 mM reveals a tolerance to up 500 mM with high growth levels between 200 and 300 mM of NaCl. Decrease in amounts of solubilized phosphate and AIA production was obtained beyond 400 mM and above 200 mM respectively. The isolates were used to inoculate wheat seedlings grown in sterilized soils under different salinity conditions (0, 100 and 200 mM). In pot experiments, inoculation by isolates improved Na<sup>+</sup> exclusion and K<sup>+</sup> uptake in wheat and chlorophyll content was also enhanced. The concentration of proline in the leaves was increased by salinity; however it was decreased by bacterial inoculation. The results show that the selected isolates relatively alleviated the saline stress in wheat, likely through the integration of several mechanisms that improve the plant response. Hence, the use of nitrogen-fixing plant growth-promoting bacteria and tolerating salt may represent an important biotechnological approach to decrease the impact of salinity on crop growth and yield.

**Key words:** IAA, ARA, diazotrophe, PGPR, siderophores, phosphate solubilisation, saline stress.

## الملخص

تمثل البكتيريا المحفزة لنمو النباتات (PGPR) جزءا من البكتيريا الجذرية التي لديها القدرة على تحسين نمو النبات و منحها كفاءة التحمل اللازمة عند تعرّضه لظروف الإجهاد البيئي. تناول هذا العمل دراسة مدى قدرة البكتيريا المثبتة للأزوت لا تكافليا على نمو القمح الصلب في ظروف الإجهاد الملحي. تمّ عزل ما مجموعه 296 عزلة من البكتيريا من المنطقة التي تحيط بجذور نبات القمح المزروع في تربة ملحية و ذلك على مستوى سهل مينا و الشلف الأدنى بولاية غليزان (غرب الجزائر). تم تقييم كل العزلات المستعملة من أجل إنتاج حمض الإندول الخليك (AIA)، و قدرتها على إذابة الفوسفات و كذا إنتاج كل من: Sidérophores و سيانيد الهيدروجين (HCN) و الأمونيا. اختيرت 35 من مجموع العزلات المدروسة و التي أظهرت صفات متعددة لتعزيز نمو النبات بحيث تمّ اختبار قدرتها على إنتاج إنزيم ACC désaminase و قوة اختزالها للأسيتيلين.

أدى استخدام التحليل التسلسلي للحمض النووي (ADN<sub>r</sub> 16S) إلى تصنيف السلالات المعزولة إلى الأجناس البكتيرية السبعة التالية : *Bacillus*, *Sténotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Raoultella* لقد تمّ اختيار خمسة عزلات (NHA15, MHC54, NHA78, NMB8, NMA27) من أجل اختبار قدرتها على تحفيز نمو نبات القمح الصلب المعرّض للظروف الملحية، كما أبدت هذه العزلات النامية في وسط من المرق المغذي المرؤد بتركيز ملحية تتراوح بين 0 إلى 500 ميلي مولر قدرة جيّدة على تحمّل الملوحة، اتضح ذلك من خلال زيادة النمو المسجلة عند التركيزين: 200 و 300 ميلي مولر مع انخفاض في كمية الفوسفات المنحلّة عند التراكيز الأكثر من 400 ميلي مولر و كذا نقص في كميات حمض أندول الخليك المنتجة عند التراكيز التي تفوق 200 ميلي مولر. تمّ استخدام العزلات البكتيرية التي اختيرت لأجل تلقيح نباتات القمح المزروعة في تربة بعد تعقيمها أضيف إليها ملح كلوريد الصوديوم بتركيز (0 ، 100 ، 200 ميلي مولر). في تجارب أجريت على نبات القمح المزروع في الأخص، و بعد التلقيح بالعزلات البكتيرية، اتضح أن هذه الأخيرة أمكنها المساهمة في إبعاد عنصر الصوديوم و امتصاص عنصر البوتاسيوم و زيادة محسوسة في محتوى الكلوروفيل أما عن محتوى البرولين في الأوراق، فإن مستوى الزيادة فيه كان واضحا تحت تأثيرات الملوحة، إلا أن التلقيح بالعزلات البكتيرية أدى إلى الانخفاض في محتوى البرولين. وأظهرت النتائج المتحصل عليها أن العزلات البكتيرية التي تم اختيارها ساهمت نسبيا في الحد من الآثار الناجمة عن الإجهاد الملحي على نبات القمح. و عليه، يمكن استخلاص أن استعمال البكتيريا المحسنة لنمو النبات و التي لها إمكانية تثبيت الأزوت و تحمل ظروف الملوحة يمكن أن تقدم لنا مقارنة تقنية حيوية مهمة و التي تتجلى في الحد من تأثيرات الملوحة على المحاصيل الزراعية.

**الكلمات المفتاحية:** ARA, حمض أندول الخليك, PGPR, sidérophores, diazotrophe, إذابة الفوسفات ، الأاجهاد الملحي.



# *Introducción*

### Introduction

La croissance actuelle de la population mondiale est estimée à environ 7 milliards de personnes et peut atteindre 10 milliards d'ici 50 ans. Ce chiffre génère plusieurs problèmes, y compris l'insécurité alimentaire et la famine pour une grande partie de cette population (Glick, 2014). Le monde aura donc besoin de doubler la production agricole afin de vaincre les risques de malnutrition et d'accroissement de la pauvreté par plus de valorisation de terres agricoles; plus de produits fertilisants, y compris les engrais, les pesticides et les herbicides; la mécanisation agricole; les cultures transgéniques et l'utilisation développée de microorganismes favorisant la croissance des plantes (Soulé *et al.*, 2008).

La salinité des sols représente un autre défi majeur dans l'accroissement de la superficie des terres agricoles, il est estimé que 33% de la superficie terrestre potentiellement cultivable du monde est affectée par la salinité (Nellemann *et al.*, 2008). En outre, la salinisation des sols augmente à raison de 10% par année pour diverses raisons, y compris les précipitations faibles, l'évaporation élevée dans des grandes surfaces, l'altération des roches indigènes, l'irrigation avec de l'eau salée et de mauvaises pratiques culturelles. Il est estimé que plus de 50% des terres arables seraient salinisées d'ici 2050 (Li *et al.*, 2003, Jamil *et al.*, 2011). En effet, la salinité élevée des sols affecte la productivité des cultures agricoles en limitant divers macro et micronutriments. Par conséquent, il est nécessaire de trouver des approches respectueuses de l'environnement et rentables pour faire face à la menace du stress salin pour l'agriculture (Nadeem *et al.*, 2013).

L'urgence d'alimenter une population mondiale croissante tout en luttant contre la pollution des sols, la salinisation et la désertification a donné une importance vitale à la productivité des plantes et des sols (Lugtenberg *et al.*, 2002). Dans de telles circonstances, il faut une biotechnologie appropriée non seulement pour l'amélioration de la productivité des cultures, mais aussi pour améliorer la santé des sols par des interactions entre les racines des plantes et les microorganismes du sol, car la nécessité progressive de protéger nos ressources naturelles, appel à une utilisation plus restrictive des engrais et des pesticides d'origine chimique. Ainsi, afin de réduire ou de changer les produits agrochimiques utilisés et de mettre en place une agriculture durable respectueuse de l'environnement, l'utilisation de ressources biologiques comme les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) attire de plus en plus l'attention des chercheurs (Noumavo *et al.*, 2016).

L'application des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) est l'une des approches les plus appropriées et durables pour lutter contre les effets néfastes de la

salinité et contre plusieurs autres facteurs de stress abiotiques, y compris la sécheresse, la carence en nutriments et la température (Shrivastava et Kumar, 2015). Ces PGPR évitent les effets délétères de plusieurs facteurs de stress environnementaux (Singh et Jha, 2016a).

Les microorganismes dans le sol, y compris les PGPR, sont essentiels pour le maintien et la durabilité des communautés végétales et animales en permettant la transformation des nutriments et en effectuant de nombreux processus biologiques importants. La matière organique libérée par les racines des plantes augmente l'activité microbienne autour des racines, où un grand nombre d'organismes microscopiques, comme les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues habitent (Hinsinger et Marschner 2006; Barriuso *et al.*, 2008; Ambrosini *et al.*, 2012). Leur activité stimulatrice de la croissance des plantes cultivées sous stress salin et hydrique ont été rapportées dans plusieurs études antérieures (Nadeem *et al.*, 2007; Dardanelli *et al.*, 2008). En outre, ces PGPR peuvent améliorer la résistance aux stress abiotiques et stimuler directement la croissance des plantes par la production de phytohormones, la capture du fer par les sidérophores bactériens et la solubilisation des phosphates ou indirectement par l'inhibition des organismes pathogènes (Shanmugam et Kanoujia, 2011). De plus, certains PGPR peuvent fixer l'azote atmosphérique appelés également « diazotrophes », cette fixation est un processus biologique respectueux de l'environnement qui a été efficacement exploité, ainsi que les associations de bactéries diazotrophes avec des plantes non légumineuses soient connues depuis des décennies (Sarathambal *et al.*, 2015).

Dans ces dernières années, l'utilisation de bioinoculants composés de bactéries diazotrophes comme alternative aux engrais azotés est apparue comme une approche prometteuse (Welbaum *et al.*, 2004). En outre, l'association de ces diazotrophes avec les céréales est une alternative qui a été stratégiquement pensée pour remplacer une partie de l'engrais azoté nécessaire pour les plantes, en plus, les diazotrophes aident indirectement les plantes à assimiler d'autres nutriments présents dans le sol. Plusieurs chercheurs ont signalé que les fixateurs d'azote libre sont considérés comme une source potentiellement importante de fixation de l'azote dans la rhizosphère des plantes et jouent un rôle important dans l'amélioration de la tolérance des plantes aux stress environnementaux (Muthukumarasamy *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2014).

Ces diazotrophes pourraient être très utiles dans la formulation de nouvel inoculum microbien et pourraient être appliqués de manière plus rentable aux cultures non légumineuses d'importance économique. Ainsi qu'ils peuvent devenir sélectivement enrichis pour favoriser la croissance des plantes en raison de leur avantage compétitif dans les

environnements riches en carbone et pauvres en azote (Cocking, 2005; Sarathambal *et al.*, 2015).

L'objectif de notre travail est d'essayer d'apporter une contribution dans le domaine de la biofertilisation par la mise en application de microorganismes capables de soutenir les plantes à atténuer le stress salin par la limitation de ses effets délétères. La stratégie suivie durant cette étude consiste à l'isolement des bactéries diazotrophes libres à partir de divers cultures de blé cultivé dans des zones salines situées dans le périmètre de la Mina et du bas-Chélif (dans l'ouest Algérien). Les isolats ont ensuite été identifiés et caractérisés par l'évaluation de leurs caractéristiques fonctionnelles associées à la promotion de la croissance des plantes, ensuite nos expérimentations ont été dirigées vers la sélection des isolats performants par rapport aux activités PGP, pour les utiliser comme inoculum dans la culture du blé dur sous stress salin dans des expériences en pots.



*CHAPITRE I:*  
*Revue*  
*bibliographique*

## I. Revue bibliographique

Il existe plusieurs microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère qui peuvent améliorer la qualité des sols, la production et la protection des cultures, préserver les ressources naturelles et par conséquent, la création d'une production agricole plus durable. Ces microorganismes sont appelées les PGPR, parmi elles, on trouve les diazotrophes, un groupe des rhizobactéries fixatrices de l'azote atmosphérique. Des techniques efficaces ont été développées pour isoler ces organismes de la rhizosphère des plantes cultivées et tester leur efficacité pour évaluer les effets bénéfiques sur le sol et sur les plantes.

La littérature relative à l'utilisation de ces microorganismes comme bioinoculants dans l'amélioration de la production végétale y compris l'atténuation des différents stress environnementaux, en incluant l'évaluation de manière critique les connaissances sur les mécanismes possibles de promotion de la croissance des plantes, ont été examinées dans ce chapitre.

### I.1. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

Il est reconnu que la croissance des plantes est influencée par son environnement. On y distingue : (i) La phyllosphère, constituée de la partie externe et interne des plantes qui est en contact avec l'air incluant la tige, les feuilles, les fruits et les fleurs. (ii) La rhizosphère qui constitue les microorganismes provenant du sol environnant et vivant à proximité des racines des plantes (Marschner *et al.*, 2001).

Certains microorganismes, principalement des bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance. Ces bactéries sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

Elles sont des bactéries du sol, de la rhizosphère, de la rhizoplane, ou de l'endosphère qui, sous certaines conditions, sont bénéfiques pour les plantes (Bashan et De-Bashan, 2005). Ils sont communément utilisés pour augmenter le rendement de diverses cultures (De-Bashan *et al.*, 2008), d'autres ont des effets néfastes, parasites et phytopathogènes (Whipps, 2001), d'autres encore sont sans effets sur le développement des plantes.

#### I.1.1. La rhizosphère

Le concept de « rhizosphère » a été introduit pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner (Hiltner, 1904), et ceci pour décrire la zone sous l'influence biologique et biochimique des racines (Curl et Truelove, 1986). La rhizosphère est la zone du sol située près des racines et caractérisée par une activité microbiologique intense. C'est un environnement écologique

dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micro et macronutriments du sol présent en quantité limitée (Gholami *et al.*, 2012). C'est également un environnement caractérisé par un volume très élevé de substances racinaires favorisant une grande population microbienne (Miransari, 2011). Plus précisément, on compartimente la rhizosphère 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 due à la libération de substrats qui influence l'activité microbiologique. Ainsi, durant leur croissance, les racines libèrent une gamme de composés organiques, surtout des hydrates de carbone tels que galactose, glucose, fructose, mannose, xylose et arabinose, des acides carboxyliques et des acides aminés (Barea *et al.*, 2005).

Deuxièmement, la rhizoplane est la surface des racines, incluant les particules du sol qui y adhèrent (Barea *et al.*, 2005). Plusieurs études ont démontré que les microorganismes du sol interagissent avec les racines des plantes et les constituants du sol à l'interface entre les racines et le sol (Bowen et Rovira, 1999; Kennedy *et al.*, 2004).

Finalement, les racines font partie du système dû au fait que certains microorganismes, appelés endophytes, sont capables de coloniser leurs tissus et influencer leur croissance (Bowen et Rovira, 1999).

### **I.1.2. L'activité microbiologique de la rhizosphère**

La microflore du sol est composée de différents types de microorganismes, bactéries, champignons..., ceux-ci peuvent jouer un rôle de stimulation de croissance par l'apport d'éléments nutritifs, et de protection des pathogènes environnants (Amarger, 2002). Les interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes dans la rhizosphère sont déterminantes pour la santé des plantes et la fertilité des sols (Gholami *et al.*, 2012). Il est reconnu que ces interactions sont dépendantes des racines vivantes ou du matériel végétal mort disponible (Barea *et al.*, 2005). Les microorganismes du sol ont une grande importance dans le cycle des nutriments et dans l'entretien de la santé et de la qualité du sol (Jeffries *et al.*, 2003). Elles sont impliqués dans les activités fondamentales qui assurent la stabilité et la productivité du système agricole et de l'écosystème naturel (Barea *et al.*, 2005).

Les microorganismes provenant de cette rhizosphère peuvent, lorsqu'ajoutés aux graines, à la surface des végétaux ou au sol, coloniser la plante et favoriser sa croissance en augmentant la disponibilité des nutriments (Vessey, 2003). Ainsi, ils agissent comme fertilisants biologiques, appelés biofertilisants. Lorsqu'ils sont d'origine bactérienne et ayant

un effet positif sur la plante, on peut aussi les caractériser en tant que « plant growth promoting Rhizobacteria » (PGPR) (Bashan et Holguin, 1998).

La structure des racines et la composition des exsudats racinaires changent durant le développement de la plante ainsi qu'en fonction de conditions environnementales telles que la disponibilité de l'eau et la température. Par conséquent, la dynamique de la population des microorganismes rhizosphériques peut aussi se changer (Bertrand *et al.*, 2000). En outre, la compétition entre les microorganismes pour les nutriments, la colonisation des sites et la production des antibiotiques et des bactériocines, contribuent à cette dynamique microbienne dans la rhizosphère (Hirsch *et al.*, 2003).

Les microorganismes rhizosphériques exercent sur les plantes divers effets bénéfiques *via* la fixation de l'azote moléculaire ( $N_2$ ), la dissolution ou la chélation de diverses substances nutritives minérales, la synthèse de substances de croissance et l'inhibition d'agents pathogènes. Par ailleurs, l'association des bactéries bénéfiques avec les racines a des influences importantes sur la santé de la plante, la productivité et la qualité du sol (Davet, 1996).

### I.1.3. Taxonomie des PGPR

Au cours de ces dernières années, le nombre des 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 et que les mécanismes d'action des PGPR ont été suffisamment étudiés. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux trois phylums suivants : Proteobacteries, Firmicutes et Actinobacteries, actuellement, de nombreux genres bactériens incluent les PGPR (Hugenholtz, 2002).

- Le phylum de proteobacteria comprend trois classes :

La première classe des  $\alpha$ -protéobactéries rassemble la majorité des protéobactéries capables de se développer même si la quantité de nutriments disponibles est très faible (Tortora *et al.*, 2003). Les PGPR appartenant à cette classe sont les *Rhizobia* d'abord classés par leur capacité à fixer l'azote et à noduler les plantes. En effet, le genre *Rhizobium* contient également des espèces PGPR qui ont plus tard été considérées comme de nouveaux genres : *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* (Sawada *et al.*, 2003). En outre, Les espèces du genre *Azospirillum* décrites dans la famille de *Rhodospirillaceae* sont considérées comme promoteurs de la croissance des plantes, en plus elles se reproduisent sous forme de

cellules libres dans le sol ou associées aux racines, tiges, feuilles et graines principalement des céréales et des graminées fourragères (Baldani *et al.*, 2005).

La deuxième classe des  $\beta$ -proteobacteria comprend la famille de Burkholderiaceae, où le genre *Burkholderia* forme un groupe qui contient diverses espèces ayant des propriétés physiologiques et écologiques variées, elles sont isolées à partir des sols et des plantes. *Ralstonia* est un autre genre également attribué à la famille des Burkholderiaceae (Moulin *et al.*, 2001).

La troisième classe des  $\gamma$ -proteobacteria constituent la classe de bactéries la plus nombreuse, et comprennent des microorganismes très diversifiés sur le plan physiologique (Tortora *et al.*, 2003). Dans la famille des *Pseudomonadaceae*, le genre *Azotobacter* est composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes principalement à cause de sa capacité de fixer l'azote et ne pas noduler les plantes. De plus, *Pseudomonas* est le genre le plus abondant dans la rhizosphère parmi les bactéries du sol à coloration de Gram négatif, et l'activité PGPR de certaines de ces espèces est connue depuis de nombreuses années, résultant d'une large connaissance des mécanismes impliqués (Sturz et Christie, 2003).

De plus, dans cette classe on trouve notamment l'ordre des Enterobacteriales, cet ordre comprend trois familles dont la première des Enterobacteriaceae, est la plus grande, englobe une large gamme de microorganismes dont 42 genres (Garrity *et al.*, 2005). Les genres au sein de la famille *Enterobacteriaceae* qui comportent des membres décrit comme des bactéries favorisant la croissance des plantes sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Serratia*..., bien que certains de ces genres contiennent également des espèces signalées comme agents pathogènes des plantes, par exemple *Erwinia carotovora*. (Jha *et al.*, 2011).

- Dans le phylum des Actinobacteria, le genre *Frankia* est un fixateur symbiotique d'azote, cette capacité est une caractéristique du genre. Les Actinobacteria sont également des promoteurs de croissance des plantes. Ils appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Curtobacterium* et *Streptomyces* (Siddiqui et Mahmood, 1999; Gray et Smith, 2005).

- Dans le phylum des Firmicutes, *Bacillus* est le genre le plus commun et le plus prédominant. Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores, le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables, il est composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes principalement à cause de ses capacités de fixation d'azote, solubilisation de phosphate etc ... (Cherif, 2014).

## I.2. Les bactéries diazotrophiques

Parmi les microorganismes bénéfiques, on trouve les diazotrophes, un groupe de rhizobactéries fixatrices de l'azote atmosphérique. Ils sont capables de fixer l'azote atmosphérique puisqu'ils réduisent l'azote moléculaire ( $N_2$ ) en ammonium ( $NH_4$ ) grâce à leur matériel enzymatique spécifique, la nitrogénase. Ils comportent diverses espèces bactériennes. (Hopkins, 2003).

### I.2.1. Les systèmes diazotrophiques

Les microorganismes fixateurs de l'azote adoptent des systèmes de fixation pour assurer les besoins énergétiques de leur nitrogénase. Il existe 3 systèmes de fixation biologique de l'azote : le système libre, associatif et symbiotique (Singleton et Dusart, 1999; Shenoy *et al.*, 2001; Hopkins, 2003; Perry *et al.*, 2004).

#### I.2.1.1. Le système libre :

Ce système est composé de bactéries fixatrices d'azote atmosphérique vivant à l'état libre dans le sol, sans être en contact avec une plante. La majorité des bactéries diazotrophes libres sont des cyanobactéries, des bactéries photosynthétiques ainsi que des bactéries hétérotrophes (Reddy et Ladha, 1995). Ces microorganismes fixateurs d'azote assurent la couverture de leurs besoins énergétiques à partir des carbohydrates du sol. En raison de la rareté de ces derniers et de la compétition des autres composantes de la microflore tellurique pour leur utilisation, le niveau de fixation de l'azote est faible (Raven *et al.*, 2000).

#### I.2.1.2. Le système associatif

Les microorganismes fixateurs colonisent la rhizosphère des plantes et profitent des exsudats racinaires pour assurer la couverture de leurs besoins énergétiques (Vilain, 1997). Il existe deux systèmes :

##### I.2.1.2.1. Le système associatif exophyte (épiphytes)

Les diazotrophes exophytes appartenant à ce système sont qualifiées de «épiphytes». Quand ces bactéries résident plus au niveau de la surface de feuilles (Phylloplane) ou au contact avec les racines (rhizoplane) d'une plante saine (Lindow et Brandl, 2003). Elles peuvent aussi coloniser d'autres types d'organe tels que les bourgeons et les fleurs (Andrews et Harris, 2000). En général, les feuilles constituent l'espace le mieux colonisé par les épiphytes dont le nombre peut atteindre  $10^6$  à  $10^8$  cellules/cm<sup>2</sup> de feuille. Elles sont très

variées et appartenant à divers genres bactériens tels *Beijerinckia*, *Derxia*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia* et autres (Hirano et Upper, 2000).

#### **I.2.1.2.2. Le système associatif endophyte**

Ces systèmes englobent toutes les bactéries diazotrophes vivant en étroite association avec la plante hôte en fixant directement l'azote dans les espaces intercellulaires, sans être transformées en nodule. Ils sont également qualifiés de fixateurs non symbiotiques (Shenoy *et al.*, 2001; Tilak *et al.*, 2005). La recherche sur les systèmes diazotrophiques endophytes a connu l'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries fixatrices d'azote et colonisatrices de l'espace intercellulaire des tissus végétaux, telles que *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1986) et *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante et Döbereiner, 1988).

#### **I.2.1.3. Le système symbiotique**

L'association entre la plante et les fixateurs d'azote est plus étroite et se traduit par la formation de dispositions anatomiques (poches, épiphylls) ou de structures plus élaborées qui sont de véritables organes (nodules, hétérocystes) dédiés à l'interaction entre les deux symbiontes. Les plus évoluées de ces interactions sont en fait des endo-symbioses en ce sens que les fixateurs se retrouvent hébergés dans un organe et de surcroît à l'intérieur des cellules de l'hôte comme c'est le cas de la symbiose rhizobia-légumineuses. La plante fournit les conditions et les éléments nutritifs nécessaires à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qu'intégreront les protéines végétales (Vanpeene-Bruhier, 2003; Tortora *et al.*, 2003).

Ce système est communément qualifié de symbiose fixatrice d'azote. Il est illustré par des associations symbiotiques et spécifiques établies entre les bactéries type *Rhizobia* et des plantes légumineuses et entre des actinomycètes du genre *Frankia* et des plantes actinorhiziennes telle *Casuarina*. Dans le cas des *Rhizobia*, le tissage de la symbiose a lieu à l'intérieur des cellules corticales des racines, donnant une structure nodulaire où les diazotrophes sont hébergés. A l'intérieur de ces structures, les bactéries sont différenciées en bactéroïdes (Hirsch *et al.*, 1997; Dakora, 2003).

### **I.2.2. Importance des différents systèmes fixateurs de l'azote**

Il existe différentes estimations de la fixation annuelle totale de l'azote, les statistiques varient largement selon les auteurs. Il est généralement admis que l'ensemble du processus de fixation biologique de l'azote, par les fixateurs libres, associatifs et symbiotique, peut s'élever entre 150 à 200 millions de tonnes par an à l'échelle de planète (Sprent, 2001). Par rapport à la

quantité totale d'azote fixé dans les écosystèmes terrestres, la contribution majeure provient des systèmes symbiotiques. La symbiose fixatrice d'azote la plus importante au niveau de la biosphère est celle qui concerne les légumineuses et les bactéries *Rhizobia* (près de la moitié de l'azote fixé annuellement) (Vanpeene-Bruhier, 2003).

### I.2.3. Mécanisme de la fixation biologique de l'azote atmosphérique

La réaction de fixation de l'azote est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase, qui est constitué de deux composantes :

#### a. La protéine molybdo-ferrique ou dinitrogénase :

Cette protéine est le site de réduction du  $N_2$ . C'est un tétramère de poids moléculaire 245 kD, composé de deux sous-unités  $\alpha$  (codées par le gène *nif D*) et deux sous-unités  $\beta$  (codées par le gène *nif K*) ; cette protéine est donc de type  $\alpha\alpha\beta\beta$ . Chaque tétramère de dinitrogénase est associé à deux unités Fe MO (cofacteurs appelés aussi FeMoco), qui jouent un rôle majeur dans le processus de réduction en activant la dinitrogénase (Werner, 1992).

#### b. La ferro-protéine ou dinitrogénase-réductase :

Cette deuxième protéine fournit les électrons à la dinitrogénase ; c'est un homodimère ( $\gamma\gamma$ ) de poids moléculaire de 64kD, les sous-unités  $\gamma$  étant codées par le gène *nif H*.

Les électrons nécessaires à la réaction sont fournis par un puissant donneur d'électrons (ferrédoxine ou flavodoxine). La dinitrogénase-réductase accepte un électron et se complexe avec deux molécules de Mg-ATP, puis s'associe avec la dinitrogénase pour former un complexe enzymatique actif. Il y a transfert d'un électron de la dinitrogénase-réductase à la dinitrogénase et, simultanément, il y a libération de deux molécules de Mg-ADP et de phosphate. Puis les deux composantes de la nitrogénase se séparent et la dinitrogénase réductase est prête à recommencer le transport d'un électron vers la dinitrogénase. Lorsque la molécule de dinitrogénase est suffisamment réduite, le substrat  $N_2$  est réduit en  $NH_3$  (Werner, 1992). La réduction de protons en  $H_2$  se produit en même temps que la réduction de  $N_2$ , et nécessite autant de protons qu'il y a d'électrons impliqués dans la réduction de  $N_2$ . L'azote ammoniacal formé est ensuite incorporé dans le glutamate, puis dans les voies métaboliques diverses (Werner, 1992).

Le processus de réduction de  $N_2$  est relativement lent à cause des nombreuses associations et dissociations. Pour maintenir une vitesse de fixation raisonnable, la lenteur du processus est compensée par une teneur élevée en nitrogénase des cellules bactériennes, allant jusqu'à 5-30 % des protéines cellulaires totales (Huss-Danell, 1990).

La nitrogénase est très sensible à l'O<sub>2</sub> et doit être protégée de l'inactivation par O<sub>2</sub> par plusieurs mécanismes comme l'élimination rapide d'O<sub>2</sub> suite à la respiration. Les bactéries fixatrices d'azote, aérobies et microaérophiles, ont recours à plusieurs stratégies pour protéger leurs nitrogénases, la production de mucus freinant la diffusion d'O<sub>2</sub> (Singleton, 2004), ou chez certaines cyanobactéries par la compartimentation de la nitrogénase dans des cellules spécialisées (les hétérocystes). Chez les fixateurs d'azote aérobies comme *Azotobacter*, la nitrogénase est protégée de l'inactivation causée par l'oxygène par une protéine spécifique ; cette protéine se nomme *protection conformation* (Madigan *et al.*, 2007).

#### **I.2.4. Génétique de la fixation d'azote :**

La nitrogénase est une protéine très conservée, et les gènes *nifHDK* qui codent ses composants ont été utilisés comme sondes moléculaires pour cribler l'ADN de nombreux procaryotes pour y rechercher des gènes homologues, indiquant la possibilité de fixer l'azote.

Chez tous les fixateurs d'azote examinés à ce jour, les gènes de type *nifHDK* sont présents. Les nitrogénases alternatives sont codées par leurs propres gènes, *vnfHDK* pour le système au vanadium, et *anfHDK* pour le système au fer, qui présentent une homologie de séquence de signification avec *nifHDK* (Madigan *et al.*, 2007).

#### **I.2.5. Méthodes de mesure de l'activité fixatrice de l'azote**

Il existe plusieurs procédés pour mettre en évidence la propriété fixatrice chez les microorganismes, ou pour évaluer l'importance de celle-ci.

##### **I.2.5.1. La culture sur milieu exempt d'azote**

C'est la méthode la plus simple et la plus ancienne, après culture sur un milieu totalement dépourvu d'azote, toute prolifération cellulaire indique que ce germe possède la propriété de fixer l'azote atmosphérique, mais cette méthode n'est plus utilisée que pour le screening, compte tenu du nombre élevé d'analyse projeté, l'application de cette technique pose le problème de la présence, toujours possible, de traces d'azote dans les milieux de culture préparés et surtout lorsque ceux-ci sont gélosés, ces traces étant suffisantes pour entretenir une croissance résiduelle de cellules non fixatrices (Unkovich *et al.*, 2008).

##### **I.2.5.2. La technique de Kjeldahl**

La méthode consiste à déterminer l'enrichissement en azote total de microorganisme proliférant sur un milieu exempt d'azote en utilisant la technique de Kjeldahl qui fournira un résultat quantitative (Unkovich *et al.*, 2008).

### I.2.5.3. La méthode isotopique

Cette technique offre une sensibilité supérieure, elle repose sur l'utilisation de l'isotope lourd  $^{15}\text{N}$  qui convient pour les estimations quantitatives des activités fixatrices, un inconvénient majeur limite l'application de cette technique : c'est le système de détection de l'isotope  $^{15}\text{N}$  qui nécessite un appareillage important « le spectromètre de masse » (Unkovich *et al.*, 2008).

### I.2.5.4. Le test de réduction de l'acétylène

C'est une méthode de loin, la plus utilisée, elle est récente puisque ses premières applications ont été publiées en 1966, son principe est très simple, elle utilise l'une des nombreuses réactions réductrices potentiels de la nitrogénase, celle qui conduit à la formation de l'éthylène  $\text{C}_2\text{H}_4$  à partir de l'acétylène  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,

La méthode consiste à introduire l'acétylène dans une enceinte étanche aux gaz qui contient le matériel à étudier, et après une période d'incubation dans des conditions définies, un échantillon de l'atmosphère de l'enceinte est prélevé pour être soumis à l'analyse chromatographique (Unkovich *et al.*, 2008).

## I. 3. Mode d'action des PGPR

Les PGPR sont divisées en deux groupes, pouvant améliorer la croissance de la plante de façon directe en stimulant sa croissance et/ou indirecte en la protégeant contre des infections causées par des agents phytopathogènes.

### I.3.1. Effets directs

Ce groupe influence directement le métabolisme de la plante en fournissant des substances qui sont habituellement en quantité limitée dans le sol. On y regroupe les bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique, de solubiliser les phosphates insolubles et d'augmenter la production des phytohormones ... (Amarger, 2002; De-Bashan *et al.*, 2008).

#### I.3.1.1. La fixation de l'azote atmosphérique

La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux ( $\text{N}_2$ ) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). Les PGPR qui ont la capacité de fixer l'azote peuvent, à l'aide de la nitrogénase, catalyser la réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en ammoniac (Pedraza, 2008). Cette fixation biologique, relève uniquement du domaine des procaryotes, offre une source non polluante d'azote et pourrait améliorer la production agricole tout en diminuant l'utilisation des fertilisants chimiques (Roesch *et al.*, 2008).

### I.3.1.2. La solubilisation des phosphates

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes, seulement les formes solubles mono et dibasiques ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) sont disponibles pour les plantes et elles sont capables de les absorber (Keneni *et al.*, 2010). Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes (Keneni *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 (Hayat *et al.*, 2010). 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 reste inaccessible (Rodriguez et Fraga, 1999). Les bactéries solubilisant le phosphate peuvent être le meilleur moyen pour le solubiliser et le rendre accessible aux plantes.

Les bactéries solubilisent le phosphate par deux méthodes, soit par la minéralisation des formes organiques existant dans le sol par l'excrétion des enzymes extracellulaires telles les phosphatases et les phytases (Weyens *et al.*, 2010), soit par la production des acides organiques telles l'acide gluconique, l'acide oxalique, l'acide succinique capables de solubiliser les formes inorganiques du phosphate (Khan *et al.*, 2009).

Plusieurs rhizobactéries promotrices de la croissance telles que les *Rhizobia*, les *Pseudomonas* et les *Bacillus*, ont été décrites comme étant des bactéries solubilisatrices du phosphate (BSP) (Igual *et al.*, 2001). Un grand nombre de bactéries solubilisant le phosphate (BSP) ont été isolées de la rhizosphère de plusieurs cultures. On a estimé que les BSP peuvent constituer 20 à 40 % de la population cultivable des microorganismes du sol (Chabot *et al.*, 1993).

### I.3.1.3. La production des sidérophores et la compétition pour le fer

Le fer est un élément aussi indispensable pour les bactéries, les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Compant *et al.*, 2005). Il est indisponible pour l'assimilation directe par les microorganismes car l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ), forme prédominante dans la nature, est peu soluble (Neilands *et al.*, 1987).

Pour assurer la croissance microbienne, les microorganismes du sol sécrètent des molécules de faible poids moléculaire (400 à 1000 Daltons) appelés sidérophores qui se lient avec le  $\text{Fe}^{+3}$  avec une très forte affinité (Castignetti et Smarrelli, 1986), et ensuite ils

transportent ces complexes vers la cellule microbienne où il est reconnu par des récepteurs membranaires situés sur la membrane externe de la bactérie qui seront utilisés durant la croissance microbienne (Neilands et Leong, 1986).

Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons phytopathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992). Un certain nombre de plantes ont des mécanismes pour lier le complexe fer-Sidérophore bactérien, le transporter à travers la plante puis le libérer sous sa forme réduite utilisable (Bar-Ness *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993).

#### **I.3.1.4. Les régulateurs de la croissance végétale**

Les régulateurs de la croissance des plantes sont des substances qui influent les processus physiologiques des plantes (à des concentrations très faibles) et modifient ou contrôlent un ou plusieurs processus métaboliques d'une plante. Ces composés sont produits par les plante ou par les PGPR (Gobat *et al.*, 2010).

##### **I.3.1.4.1. La production des phytohormones**

Il existe cinq catégories des hormones végétales: les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.*, 2003).

Les gibbérellines et les cytokinines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de développement de la partie aérienne (Van Loon, 2007). L'acide abscissique est synthétisé en réponse aux stress hydrique et salin, pour induire la fermeture des stomates et réduire la perte d'eau par transpiration, et par conséquent l'adaptation au stress salin (Finkelstein *et al.*, 2002).

L'acide indole-3-acétique est une auxine considérée comme la phytohormone la plus répandue, la plus produite par les PGPR. Il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007), C'est un acide faible formé d'un noyau indole et d'une courte chaîne latérale carbonée portant le groupement carboxyle. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009).

L'analyse du rôle de l'AIA montre que les bactéries utilisent cette phytohormone pour établir des interactions avec les plantes dans le cadre de leur stratégie de colonisation de ces dernières (Ryan *et al.*, 2008). Il est généralement produit par les PGPR en utilisant les exsudats racinaires libérés dans la rhizosphère sous forme de métabolites secondaires. Les PGPR sont connues exclusivement pour leur capacité de fixation d'azote mais elles sont

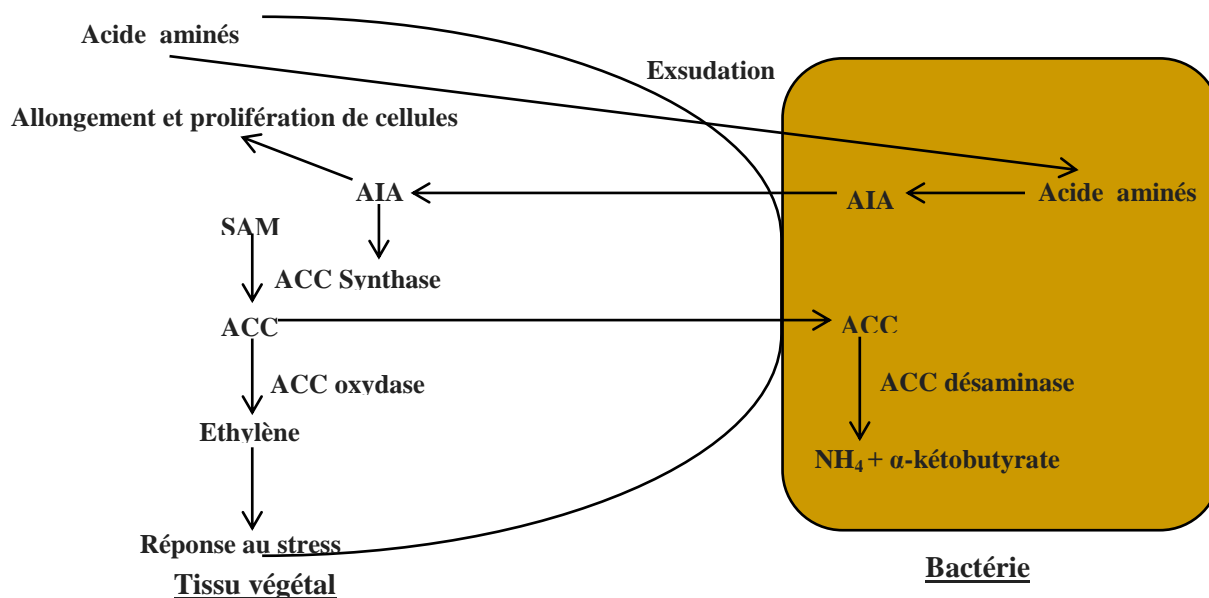
également signalées aussi pour produire des quantités importantes d'AIA (Ahmad *et al.*, 2008).

### I.3.1.5. La production de l'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase

Bien que l'éthylène soit une phytohormone essentielle pour la croissance et le développement cellulaire des végétaux, à des concentrations élevées, il peut être nocif, car la surproduction de cette molécule en réponse aux stress abiotiques et biotiques conduit à l'inhibition de l'élongation racinaire, de la croissance des racines latérales, et par conséquent, la croissance de la plante dans son ensemble (Mayak *et al.*, 2004).

Les PGPR possédant l'ACC désaminase régulent et abaissent les niveaux de l'éthylène en métabolisant l'ACC, un précurseur de l'éthylène (Figure I.1). L'ACC désaminase régule la production d'éthylène en réponse à une multitude de stress biotiques et abiotiques comme la salinité, la sécheresse et les variations de la température. Les bactéries possédant une ACC désaminase confèrent aux plantes une tolérance relative au sel (Glick, 2005).

L'absorption et l'hydrolyse de l'ACC par les microorganismes diminuent sa quantité en dehors la plante (Figure I.1). L'ACC produit par les plantes est repris à l'intérieur des cellules bactériennes et dégradé par l'enzyme ACC désaminase. Cet enzyme a été trouvée dans différents types de bactéries (Glick, 2005).



**Figure I.1.** Modèle schématique du mécanisme d'action de l'ACC désaminase des PGPR pour abaisser la concentration de l'éthylène, empêchant ainsi l'inhibition de l'allongement racinaire causée par l'éthylène (Glick *et al.*, 1999).

AIA : Acide indole acétique, ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, SAM : S-adenosyl méthionine

### **I.3.2. Effets indirects**

Les PGPR du deuxième groupe ont un effet de biocontrôle, où elles ne stimulent pas directement le métabolisme de la plante. Par contre, elles influencent indirectement la croissance de celle-ci par la prévention des effets causés par des phytopathogènes tels des bactéries, des mycètes, des nématodes et des virus (De-Bashan *et al.*, 2008), il comprend plusieurs stratégies.

#### **I.3.2.1. La compétition pour l'espace et les nutriments**

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes, et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997).

Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est, dans certains cas, pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale (Reyes *et al.*, 2004). L'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie fut beaucoup discutée. En outre, pour avoir un effet bénéfique, les PGPR doivent être présents sur les racines en nombre suffisant (Haas et Defago, 2005).

#### **I.3.2.2. L'antibiose**

L'antibiose est une activité antagoniste provoquée par des antibiotiques. Elle résulte de l'activité de composants toxiques pour le pathogène (tel les phénazines ou le 2,4-diacetylphloroglucinol) synthétisés par les populations microbiennes antagonistes. En outre, certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whipps, 2001). D'autre part, certains composés volatils (comme l'HCN) émis par les PGPR ont des effets antibiotiques et jouent un rôle dans la protection de la plante hôte (Voisard *et al.*, 1989).

#### **I.3.2.3. Résistance Systémique Induite (ISR)**

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (Van Loon, 2007). Cette immunisation de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (Jourdan *et al.*, 2008).

La résistance systémique induite est une forme de résistance stimulée, spécifiquement, par les PGPR, car elles puissent induire des effets indirects en sensibilisant la plante à se

défendre contre l'attaque microbienne. Ce concept de la résistance systémique induite (ISR) par les PGPR trouvait sa justification au travers de certaines études biochimiques indiquant que la protection des plantes traitées avec des PGPR était associée à des profonds changements métaboliques (Benhamou, 2009).

L'ISR peut être induite par des microorganismes variés qui peuvent être des bactéries à coloration de Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à coloration de Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (*P.fluorescens*, *P.putida*, *P.aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*S.marcesens*, *S.plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

#### **I.4. Effet des PGPR sur la tolérance des plantes au stress salin**

La croissance de la plante est influencée par une variété de stress dus à l'environnement du sol, ce qui est une limitation majeure pour la production agricole durable. Ces stress peuvent être classés en deux groupes, biotiques et abiotiques. Le stress biotique fait référence aux stress dus à des agents phytopathogènes parasites tels que les virus, les champignons, les bactéries, les nématodes, les insectes, etc..., tandis que le stress abiotique fait référence aux stress dus à la salinité, aux métaux lourds, à la sécheresse, à la carence en éléments nutritifs et à la température... (Vejan *et al.*, 2016).

##### **I.4.1. Qu'est-ce que la salinité ?**

Plusieurs auteurs ont défini la salinité des sols comme étant la présence de concentration excessive de sels solubles, ou lorsque les concentrations en Na, Ca, Mg sous formes de chlorures, carbonates, ou sulfates sont présentes en concentrations anormalement élevées. En effet, les sols salins représentent les sols ayant une conductivité électrique élevée ( $E_C \geq 4$  dS/m) (Asloum, 1990). En fonction de la concentration en sel, les sols peuvent être classés en cinq classes (Tableau I.1).

D'après Cherbuy (1991), la salinisation d'un milieu, implique la présence d'une source de sels qui peut être naturelle, dénommée primaire, et une salinisation anthropique, généralement liée à l'irrigation, que l'on appellera secondaire.

La salinité naturelle est le résultat d'une accumulation naturelle à long terme de sels dans le sol ou dans les eaux de surface. Par contre, la salinité secondaire résulte de l'irrigation ; cette dernière est largement responsable de l'augmentation de la concentration des sels dissous dans le sol qui affecte la croissance des plantes et qui entraînera l'abandon des terres agricoles (Egamberdiyeva *et al.*, 2007; Manchanda et Garg, 2008).

### I.4.2. Effets de la salinité du sol sur la croissance et la physiologie des plantes

Les plantes exposées à la salinité du sol sont affectées négativement par une réduction dans leur croissance et rendement (Ruiz-Lozano *et al.*, 2012). Le sel présent dans le sol salin sera accumulé dans les racines des plantes qui va par la suite endommager la culture et diminuer le rendement (Al-Karaki, 2000). La capacité des plantes à résister à la salinité et leur effet sur la croissance et le rendement diffèrent en fonction de la concentration de sel dans le sol. Les plantes cultivées dans des conditions salines sévères deviennent chlorotiques et meurent par la suite. Le tableau I.1 représente les réponses des plantes à différents niveaux de salinité avec des gammes de conductivité obtenu auprès de l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (Selvakumar *et al.*, 2014).

La salinité affecte également la plante en trois aspects différents. Tout d'abord, le faible potentiel osmotique du sol réduit la quantité de l'eau disponible dans le sol, entraînant un déficit hydrique physiologique dans les plantes. Pour convaincre cela, les plantes doivent éviter de perdre de l'eau de leurs racines vers le sol en maintenant un faible potentiel osmotique (Jahromi *et al.*, 2008).

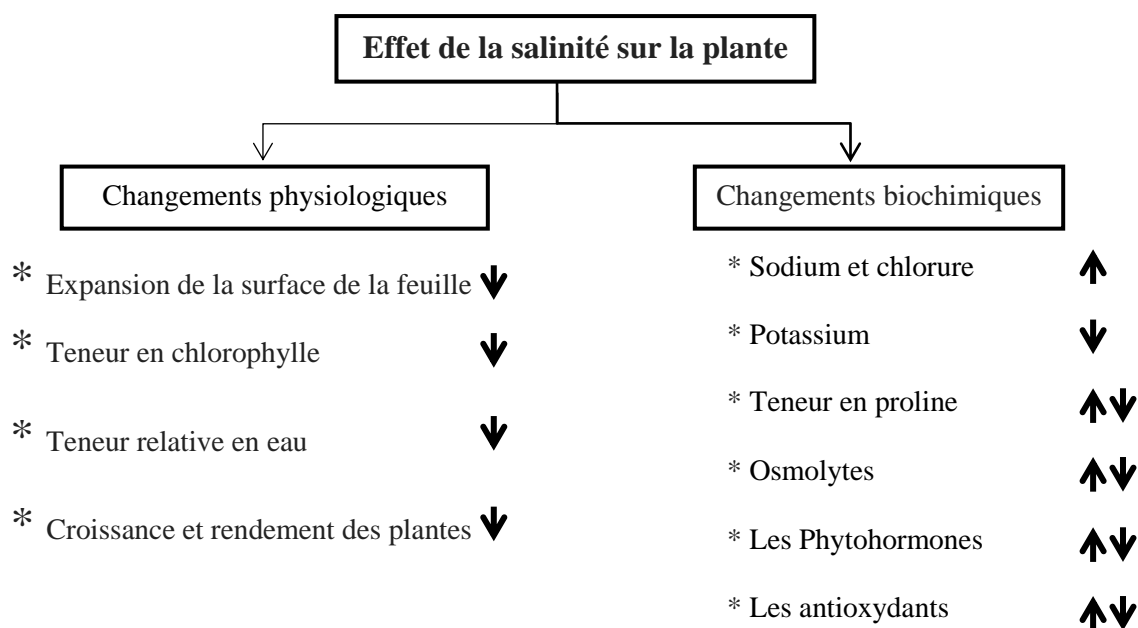
Deuxièmement, les effets toxiques excessifs des ions notamment le sodium et le chlorure conduisent à la rupture de la membrane plasmique, aux dommages des organites cellulaires et autres macromolécule, à la réduction de l'activité photosynthétique et de la respiration, à la perturbation de la synthèse des protéines et enfin à l'inhibition de diverses activités enzymatiques (Feng *et al.*, 2002).

Enfin, la salinité diminue l'absorption des nutriments entraînant ainsi un déséquilibre des nutriments dans la plante (Evelin *et al.*, 2009).

Les changements physiologiques et biochimiques dans les plantes exposées aux stress salin sont présentés dans la Figure I.2

**Tableau I.1** : Effet de différents niveaux de salinité sur la physiologie et le rendement des plantes cultivées (Selvakumar *et al.*, 2014).

Classe de salinité de sol	EC (dS/m)	Effet sur les plantes cultivées
Non salin	0 - 2	Effets de salinité négligeable
Légèrement salin	2 - 4	Les rendements des cultures sensibles peuvent être affectés
Moyen salin	4 - 8	Le rendement de nombreuses cultures est affecté
Fortement salin	8 - 16	Seules les cultures tolérantes donnent un rendement satisfaisant
Très fortement salin	> 16	Seulement quelques cultures très tolérantes donnent un rendement satisfaisant



**Figure I.2:** Représentation schématique des effets de la salinité sur les plantes.

Les flèches vers le bas indiquent une réduction de l'activité / contenu. Les flèches vers le haut indiquent une augmentation de l'activité / contenu (Selvakumar *et al.*, 2014).

### I.4.3. Adaptations des rhizobactéries au stress abiotiques

La colonisation des racines est l'un des caractères principaux des PGPR, mais afin de présenter son effet bénéfique sur la plante hôte, une PGPR efficace doit survivre pendant une période donnée dans la rhizosphère en s'adaptant aux divers stress biotiques et abiotiques.

L'adaptation des PGPR au stress est un processus réglementaire multi niveau complexe dans lequel de nombreuses enzymes, des protéines et des métabolites sont impliqués. Certaines espèces bactériennes peuvent vivre et s'adapter dans des conditions extrêmes (thermophiles et halophiles) en élevant l'activité métabolique optimale et la stabilité de la membrane (Madigan et Oren, 1999).

Certaines bactéries comme *Pseudomonas* et *Azospirillum* survivent dans des conditions de stress en produisant des exopolysaccharides (EPS), qui protègent les microorganismes contre le stress hydrique et les fluctuations du potentiel de l'eau en améliorant la rétention d'eau et la régulation de la diffusion des sources de carbone dans le milieu microbien (Sandhya *et al.*, 2009), et en réduisant la teneur en Na<sup>+</sup> disponible pour l'absorption par la plante (Upadhyay *et al.*, 2012).

Le stress salin peut également induire des modifications dans la composition de la membrane cellulaire de la rhizobactérie entraînant des changements dans les protéines périplasmiques, les LPS et la composition en acides gras (Piuri *et al.*, 2005). Il est suggéré que

la composition de la membrane cytoplasmique joue un rôle important dans l'osmo adaptation (Lopez *et al.*, 2000).

Lorsqu'elles sont soumises à des conditions de stress osmotique, les bactéries synthétisent un ou plusieurs osmolytes endogènes (osmoprotectants) (glutamate, tréhalose, proline, glycine, glycine bêtaïne ...) (Roessler et Müller, 2001). Les osmoprotecteurs sont des composés très solubles qui n'ont pas de charge au pH neutre et ne sont pas toxiques à des concentrations élevées. Ils augmentent la pression osmotique dans le cytoplasme et stabilisent les protéines et les membranes dans des conditions environnementales défavorables. La plupart des osmolytes sont impliqués dans l'entretien de la turgescence seulement, tandis que d'autres protègent les cellules et les macromolécules biologiques contre l'effet dénaturant, non seulement du stress hyperosmotique, mais aussi contre d'autres stress telles que la température élevé, la congélation et la dessiccation (Crowe, 2007; Paul et Nair, 2008).

#### **I.4.4. Atténuation du stress abiotique chez les plantes par les rhizobactéries**

Le stress salin affecte la physiologie et la biochimie de la plante, il déclenche la production de divers enzymes et hormones. Il affecte également les voies métaboliques en provoquant des dommages de la structure des protéines, des lésions de l'ADN et l'inhibition de l'activité enzymatique, qui ont finalement conduit à la suppression de la croissance ou la mort de la plante. Afin d'améliorer la résistance des plantes aux stress comme la salinité, les physiologistes ont essayé de trouver des solutions appropriées.

Dans le milieu naturel, les plantes peuvent être colonisés à la fois par des microorganismes externes et internes, certains champignons et bactéries qui peuvent améliorer les performances des plantes dans des environnements de stress (Evelin *et al.*, 2009). Les PGPR peuvent utiliser divers mécanismes pour stimuler la croissance des plantes, pour protéger les plantes contre les maladies, et améliorer la tolérance au stress. Ces mécanismes comprennent : la production de phytohormones, la production de métabolites antifongiques et/ou des enzymes lytiques, l'augmentation de la disponibilité des nutriments pour les plantes et la réduction de la production d'éthylène induite par le stress (Lugtenberg et Kamilova, 2009; Pliego *et al.*, 2011).

##### **I.4.4.1. L'absorption des éléments nutritifs**

Les bactéries qui ont été isolées à partir du sol salin ont augmenté la teneur en phosphate soluble du sol, par conséquent, l'utilisation de bactéries halotolérantes solubilisant le phosphate peut être une approche potentielle dans l'amélioration de la nutrition en phosphate sous stress salin (Patel *et al.*, 2012).

#### **I.4.4.2. La teneur en pigments photosynthétiques**

La photosynthèse est un processus clé dans la plante. Ainsi, les facteurs qui peuvent affecter l'appareil photosynthétique ou ses voies sont très importants. Des niveaux élevés de la salinité ont des effets néfastes sur la photosynthèse, Toutefois, plusieurs rapports d'inoculation bactérienne ont montré une influence positive sur les pigments photosynthétiques de diverses plantes sous stress salin (Mohamed et Gomaa, 2012).

#### **I.4.4.3. La modulation du niveau d'éthylène par l'activité ACC-désaminase**

La biosynthèse de l'éthylène est également augmenté par des conditions de stress comme la sécheresse, la salinité ou l'exposition à l'ozone (Ma *et al.*, 1998).

Glick *et al.*, (1998) ont décrit le rôle de l'ACC désaminase dans la suppression de stress abiotique par les PGPR. En bref, dans des conditions de stress afin de synthétiser l'éthylène, l'ACC est produit dans les racines des plantes, cependant une partie est exsudée dans la rhizosphère, les PGPR à proximité des racines peuvent prendre une partie de cette ACC et l'hydrolyser par l'activité ACC désaminase en ammoniac et  $\alpha$ -cétobutyrate. L'absorption et l'hydrolyse de l'ACC par les PGPR diminue son niveau à l'extérieur des racines. En outre, afin de maintenir l'équilibre entre les niveaux d'ACC internes et externes, la racine doit exsuder une grande quantité d'ACC dans la rhizosphère qui est utilisée par les PGPR. Ce procédé conduit à une réduction de la quantité de l'ACC disponible pour la synthèse de l'éthylène et par la suite, la réduction du niveau d'éthylène et son effet inhibiteur sur le développement des racines.

#### **I.4.4.4. La production des phytohormones**

Les phytohormones ont un rôle majeur dans le développement de la croissance des plantes et dans les réponses au stress (Shaterian *et al.*, 2005). Elles peuvent améliorer les différents systèmes de défense cellulaire pour la protection de la plante contre les conditions défavorables externes (Bianco et Defez, 2009). La salinité et la sécheresse inhibent la production des auxines et des gibbérellines dans les racines et les feuilles des plantes (Perez-Alfocea *et al.*, 2010), entraînant une réduction du pourcentage de germination ainsi que la croissance de plante (Shakirova *et al.*, 2003).

Les bactéries qui colonisent les racines et qui produisent les auxines dans des conditions salines, peuvent fournir des auxines supplémentaires dans la rhizosphère, ce qui pourrait aider à maintenir la croissance des racines sous stress, et peuvent également contribuer à maintenir la croissance des feuilles (Albacete *et al.*, 2008). Les PGPR peuvent avoir des impacts multiples sur l'état de phytohormones, ce qui peut améliorer la croissance,

le développement et les processus physiologiques des plantes sous stress salin (Dodd *et al.*, 2010).

#### **I.4.4.5. L'accumulation du proline et d'autres osmolytes**

Les plantes peuvent se protéger de la sécheresse et du stress salin en accumulant des solutés compatibles tels que les sucres et les acides aminés pour régler la pression osmotique (Evelin *et al.*, 2009). Parmi les solutés compatibles, la proline qui peut augmenter l'activité de diverses enzymes, la stabilisation du pH dans la cellule et le maintien de l'activité antioxydante par le piégeage des espèces réactives de l'oxygène. En outre, l'accumulation de proline est l'une des transformations les plus connues provoquées par le stress salin dans les plantes (Verbruggen et Hermans, 2008).

Plusieurs PGPR, telles que *Burkholderia* (Barka *et al.*, 2006), *Arthrobacter* et *Bacillus* (Sziderics *et al.*, 2007), améliorent la synthèse de proline dans les plantes stressées, ce qui contribue à maintenir l'état de l'eau cellulaire, aidant ainsi la plante à résister à la salinité.

### **I.5. L'utilisation des PGPR dans la production agricole**

Avec l'augmentation de la population mondiale, la demande de nourriture augmente également. L'utilisation des technologies modernes a amélioré les rendements des cultures par rapport aux anciennes approches conventionnelles (Nadeem *et al.*, 2015).

Cependant, cette augmentation du rendement des cultures est généralement due à l'utilisation d'une quantité excessive d'engrais, de pesticides et d'autres substances commerciales favorisant la croissance des plantes. En plus de l'augmentation du rendement des cultures, la plupart de ces substances ont aussi un impact négatif sur l'environnement. Les pertes excessives d'engrais chimiques, de pesticides et autres déchets causent des problèmes environnementaux et sociaux à travers le monde (Singh *et al.*, 2011). Bien que certaines méthodes physiques et chimiques soient adoptées pour résoudre ces problèmes, il a été observé qu'il ne peut pas être fait efficacement sans appliquer des méthodes et des techniques biologiques durables (Singh *et al.*, 2011).

Une des techniques respectueuses de l'environnement est l'utilisation de biofertilisants. Selon Vessey (2003), le biofertilisant est un produit microbien qui, une fois appliqué, colonise la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et améliore la croissance des plantes en augmentant la disponibilité ou l'apport en nutriments. Les mécanismes du biofertilisants pour améliorer la croissance des plantes ne sont pas encore clairement compris (Glick, 2012; Ahemad et Kibret, 2014). Les céréales sont considérées comme un exemple de l'effet des biofertilisants sur l'amélioration de la productivité des cultures.

### I.5.1. Les céréales

A l'échelle mondiale, Les céréales occupent une place primordiale dans les programmes de recherche agricole, elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (Slama *et al.*, 2005). En Algérie, la culture des céréales couvre avec la jachère chaque année plus de 6 millions d'hectares soit près de 82% de la totalité de la surface agricole utile du pays, les emblavures s'étendent chaque année sur 3 à 3,5 millions d'hectares. Ces chiffres montrent l'importance stratégique de cette culture, si elle tient de loin la première place quant à l'occupation des sols, c'est parce qu'elle sert de base à l'alimentation de la population (Abdelguerfi et Ramdane, 2003). Parmi ces céréales, Le blé occupe la première place dans la production mondiale. Il est aussi la deuxième source de nourriture après le riz (Bajji, 1999).

#### I.5.1.1. le blé

Le blé est une Monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des Gramineae, c'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscence, appelé caryopse, constitué d'une graine et de tégument. Les deux espèces les plus cultivés sont le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Il est considéré comme une céréale importante dans de nombreux pays du monde. Il sert principalement à la production de semoule, matière première des pâtes alimentaires (Feillet, 2000).

Avant le colonialisme, l'Algérie exporte son blé au monde entier. Actuellement elle se trouve dépendante du marché international. Par sa position de grand importateur de blé, l'Algérie achète annuellement plus de 5% de la production céréalière mondiale, cette situation risque de se prolonger à plusieurs années (Chellali, 2007).

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est la première céréale cultivée dans le pays. Elle occupe annuellement plus d'un million d'hectares. La production nationale en blé dur est encore faible, elle ne couvre que 20 à 25 % des besoins du pays, le reste étant importé (Mouellef, 2010). La cause principale de la faiblesse de la production du blé dur en Algérie est le faible niveau de productivité obtenu, soit 9 à 11 quintaux/hectare, cette faible productivité est elle-même due à des contraintes abiotiques (pluviométrie surtout), biotiques (adventices, surtout) et humaines (itinéraires techniques appliqués etc...) (Chellali, 2007).

### I.5.2. Amélioration des cultures des céréales

Les céréales comme le blé, le maïs et le riz sont les principaux aliments de base pour la grande partie de la population mondiale. En outre, ces cultures non légumineuses ne fixent pas l'azote et, par conséquent, l'application des engrais azotés à ces cultures est une entrée

coûteuse. Cependant, l'utilisation de PGPR peut améliorer l'absorption d'azote par les cultures non légumineuses (Nadeem *et al.*, 2015). De même, l'inoculation par des bactéries fixant l'azote et solubilisant le phosphate (BSP) en combinaison, s'est révélé plus efficace pour augmenter l'absorption de nutriments dans diverses cultures, y compris le sorgho, l'orge et le blé (Alagawadi et Gaur, 1992).

Wu *et al.*, (2005) ont comparé l'efficacité des biofertilisants avec les engrais chimiques et organiques. Les résultats ont montré que les biofertilisants contenant des champignons mycorrhiziens avec trois souches de rhizobactéries ont significativement amélioré la croissance du maïs. L'application de biofertilisant a non seulement amélioré la croissance de la plante, mais aussi causé un effet positif sur les propriétés du sol. La teneur en matière organique et en azote du sol a augmenté avec l'application des biofertilisants.

### **I.5.3. Commercialisation des PGPR**

Le succès et la commercialisation des souches de PGPR dépendent des liens entre les organisations scientifiques et les industries. Selon Nandakumar *et al.*, (2001), différentes étapes du processus de commercialisation incluent : l'isolement des souches, le criblage, les essais en pot, l'efficacité sur le terrain, la production de masse, les méthodes de fermentation, la viabilité, la toxicité, les liaisons industrielles et le contrôle de qualité. Ainsi, l'isolement d'une souche efficace est un critère primordial pour un meilleur développement agricole (Nakkeeran *et al.*, 2005).

La production de biomasse est effectuée par des techniques en milieu liquides (Manjula et Podile, 2001), semi-solides et solides (Lewis, 1991). De plus, le succès commercial des souches PGPR nécessite une demande économique sur le marché, la sécurité et la stabilité, une durée de conservation plus longue et des coûts d'investissement réduits (Bhattacharyya et Jha, 2012).

Des inventions de recherche de la Chine, de la Russie et de plusieurs autres pays occidentaux ont prouvé l'utilisation potentielle des PGPR pour la gestion des maladies des plantes. Le premier produit commercial de *Bacillus subtilis* a été mis au point en 1985 aux États-Unis. 60-75% de coton, d'arachide, de soja, de maïs, de légumes et de petites céréales cultivées aux États-Unis sont maintenant traités avec un produit commercial de *B. subtilis*, qui devient efficace contre les phytopathogènes tels que *Fusarium* et *Rhizoctonia*. En Chine, les PGPR ont été appliquées avec succès pendant deux décennies sur une superficie de 20 millions d'hectares de différentes plantes cultivées pour le développement commercial. De plus, en raison de la potentialité de *Bacillus* sp. Plus de 20 produits commerciaux différents

d'origine *Bacillus* sont vendus en Chine pour atténuer les maladies causées par les phytopathogènes (Bhattacharyya et Jha, 2012).

En outre, *Bacillus* sp. et certaines autres genres de PGPR tels que *Azospirillum*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* sont également utilisées pour la production de plusieurs produits commerciaux qui sont généralement appliqués contre plusieurs agents phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Mucor pyroformis*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium* sp (Nakkeeran *et al.*, 2005).

Puisque les PGPR ont leur propre potentiel dans le contrôle des maladies des plantes et de la lutte antiparasitaire, ces produits commerciaux tels que Diegall, Galltrol-A, Zea-Nit, Epic, Quantum 4000, Victus, Mycostop etc. ont été enregistrés pour l'usage pratique de la communauté agricole (Bhattacharyya et Jha, 2012).

#### **I.5.4. Perspectives d'avenir des PGPR**

Les PGPR peuvent adopter diverses interactions bénéfiques dans les plantes, ce qui conduit à des solutions prometteuses pour une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. Un effort d'application des PGPR génétiquement modifiés pour remédier des sols contaminés et augmenter la productivité des plantes cultivées en agriculture est une autre idée intéressante de la recherche au cours de la dernière décennie (Denton, 2007).

La communauté rhizobactérienne peut être spécialement conçue pour cibler divers polluants dans des sites contaminés afin de fournir un système de rhizo-remédiation personnalisé (Wu *et al.*, 2006). Les progrès récents de la biologie moléculaire et de la biotechnologie dans la compréhension des interactions rhizobactérienne avec les nodules des plantes cultivées encourageront un domaine de recherche approprié dans les mécanismes relatifs à la colonisation de la rhizosphère. Des rapports sont maintenant disponibles auprès des plantes génétiquement modifiées d'*Arabidopsis thaliana* pour éliminer les contaminants de plomb et de cadmium après inoculation avec une population de rhizobactéries. (Bhattacharyya et Jha, 2012).

Le succès futur des industries produisant des inoculants microbiens, en particulier les PGPR, dépendra de la gestion d'entreprise innovante, du marketing de produit, de l'éducation de vulgarisation et des recherches approfondies, une optimisation supplémentaire est nécessaire pour de meilleurs procédés de fermentation et de formulation de souches PGPR efficaces à introduire dans l'agriculture (Bhattacharyya et Jha, 2012).

***CHAPITRE II:***

*Matériels et  
méthodes*

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Localisation de la zone d'étude et caractéristiques physico-chimiques des sols prélevés

#### II.1.1. Délimitation de la zone d'étude

L'ensemble des prélèvements effectués tout au long de cette étude ont été réalisés à partir de la rhizosphère du blé cultivé dans des sols salins situés dans deux zones, la plaine de la Mina et la plaine du bas-Chélif (wilaya de Rélizane à l'ouest Algérien) (Figure II.1). Les prélèvements des échantillons ont été faits selon des cartes de salinité (Annexe I) par l'utilisation du GPS et du logiciel MapInfo<sup>®</sup> professionnel 7.5.

La plaine du bas-Chélif (avec une superficie de 40 000 Ha) et la plaine de la Mina (avec une superficie de 13 647 Ha) font partie du bassin du Chélif qui s'étend entre les méridiens 0° et 3° Est, et entre les latitudes 34° et 36° Nord (Douaoui *et al.*, 2006).

Du point de vue pédologique, les sols sont de texture fine à moyenne, argileux et souvent gorgés d'eau dans les dépressions. Ils présentent le plus souvent une faible teneur en matière organique qui décroît avec la profondeur pour devenir négligeable. Le pH est généralement voisin de la neutralité à légèrement alcalin. L'agriculture dans le périmètre est très diversifiée, les cultures pratiquées sont les céréales, les fourrages, le maraîchage et l'arboriculture (agrumes, olivier, grenadier et autres fruitiers) (Douaoui *et al.*, 2006; Gacem *et al.*, 2009). Durant les années marquées par un déficit hydrique important, seules les eaux souterraines sont utilisées dans l'irrigation. Ces dernières de qualité médiocre sont à l'origine de la salinisation des sols, 80 % des sols sont touchés par la salinité ( $C_E > 4$  dS/m) dont 36 % sont très salés ( $> 16$  dS/m) (Douaoui *et al.*, 2006; Gacem *et al.*, 2009).



**Figure II.1.** Délimitation géographique des zones de prélèvement des échantillons de sol. (Gacem *et al.*, 2009).

### II.1.2. Prélèvement des échantillons de sol

Après l'élimination de la partie superficielle du sol (10-15cm), un poids non déterminé du sol a été prélevé de manière aseptique (Figure II.2) (Aly *et al.*, 2012). Les prélèvements ont ensuite été conservés dans des récipients stériles puis ramenés au laboratoire pour l'analyse.



Figure II.2. Prélèvement des échantillons de sol.

### II.1.3. Caractères physicochimiques du sol

La diversité de la communauté microbienne du sol est fortement influencée par la structure et les caractères physico-chimiques de ce dernier. Dans cet objectif, il était important de déterminer les paramètres du sol de notre étude tel que le pH, l'humidité et la conductivité électrique ( $C_E$ ).

- **pH du sol**

Il est déterminé par la méthode potentiométrique à l'aide d'un pH mètre de type *ADWA AD 1030*. Pour la mesure, 25 g du sol ont été dissouts dans un Becher contenant 50 ml d'eau distillée. Le mélange est agité au vortex pendant quelques minutes et le pH de la suspension est ensuite déterminé par lecture à l'aide du pH mètre (Ilyas *et al.*, 2012).

- **Humidité du sol**

L'humidité des échantillons a été mesurée par la prise de 50 g du sol dans un Becher de 150 ml propre, le Becher a été taré avant la prise de l'échantillon du sol. L'ensemble a été ensuite étuvé à une température de 105 °C pendant 24 heures. Les échantillons ont été pesés pour déterminer la constance du poids de l'échantillon de sol. Le calcul de la teneur en humidité a été fait selon Ilyas *et al.*, (2012) suivant la formule suivante:

$$\text{Humidité du sol (\%)} = \frac{\text{Poids du sol humide (g)} - \text{Poids du sol sec (g)}}{\text{poids du sol humide (g)}} * 100$$

- **Conductivité électrique (taux de salinité)**

La mesure de la conductivité électrique ( $C_E$ ) permet d'estimer la salinité d'un sol. Chacun des échantillons a été mélangé avec l'eau distillée avec un rapport de 1:2, le mélange obtenu est agité en douceur à l'aide d'une baguette en verre et la conductivité de la suspension est mesurée par un conductimètre numérique de type *HANNA EC 214* (Filep, 1999).

## **II.2. Isolement et caractérisation des bactéries diazotrophes libres**

### **II.2.1. Isolement des bactéries diazotrophes**

Trois milieux de culture différents, exempt d'azote ont été utilisés pour l'isolement des bactéries diazotrophes (i) : NF (milieu Nitrogène Free) semi solide (Baldani *et al.*, 2014), (ii) : milieu Beurk (Martinez-Toledo *et al.*, 1985), (iii) : milieu Ashby (Atlas, 2005) (Annexe II).

#### **II.2.1.1 Isolement des bactéries diazotrophes sur Milieu NF**

Une solution mère a été préparée par la dissolution de 10 g de sol dans 90 ml de PBS. Par la suite une série de dilution décimale est préparée et une aliquote 0,1ml de trois dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) a été utilisé pour inoculer des tubes à essai contenant le milieu exempt d'azote (NF semi solide). Les tubes ont été incubés à  $28 \pm 2$  °C. Après 48 heures d'incubation, la culture bactérienne en voile obtenu est transférée sur un milieu NF solide puis incubée à nouveau pour 48 h à  $28 \pm 2$  °C (Baldani *et al.*, 2014).

#### **II.2.1.2. Isolement des bactéries diazotrophes sur Milieu Ashby**

0,1 ml de chacune des trois dilutions utilisées précédemment ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) a été utilisé pour ensemercer en surface des boites de pétri contenant le milieu Ashby, puis ont été incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 5 jours. Les colonies obtenues seront à nouveau repiquées sur le même milieu, l'opération a été réalisée trois fois (Luuml et Huang, 2010).

#### **II.2.1.3. Isolement des bactéries diazotrophes sur Milieu Beurk**

Dans ce cas, 2 g d'échantillons de sol ont été ajoutés à 18 ml au bouillon de Beurk dans un erlenmeyer de 250 ml. Les différents ensemencements seront incubés pendant 4 jours à  $28 \pm 2$  °C. Après culture, 0,1 ml de la suspension bactérienne du bouillon Beurk a été étalé sur le milieu gélose de Beurk et les boites ont été incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 3 jours. Les colonies bactériennes obtenues ont été repiquées trois fois sur le même milieu (Martinez-Toledo *et al.*, 1985).

### II.2.2. Caractérisation morphologique et phénotypique des isolats

Pour une orientation préliminaire de l'identification, les caractères morphologiques (forme de la colonie, taille, couleur et aspect) et microscopiques (coloration de Gram, taille et forme de cellules) et des tests biochimiques tels que la recherche du catalase, de l'oxydase et l'utilisation des différentes sources de carbone par différents isolats ont été réalisés par les méthodes classiques ou par l'utilisation des API system 20NE et 20E

### II.2.3. Caractérisation génotypique des isolats

L'identification génotypique des isolats 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.

Dans cette étude, l'identification des isolats s'est basée sur le séquençage partiel de l'ADNr 16S. L'ARN ribosomal (ARNr) 16S est le constituant ARN de la petite sous unité ribosomale 30S des procaryotes. Le gène codant pour cet ARNr est le gène ARNr 16S (Clarridge, 2004), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Petti, 2007). Il est composé d'environ 1500 nucléotides, et la séquence obtenue permet théoriquement la détection et l'identification de toute espèce bactérienne (Chakravorty *et al.*, 2007).

#### II.2.3.1. Extraction de l'ADN

Pour l'extraction de l'ADN total, le kit NucleoSpin® Microbial ADN (Macherey Nagel GmbH & Co.KG. Neumann-Neander-Str.6-8. 52355 Düren.Germany, <http://www.mn-net.com/>) a été utilisé suivant le Protocole fourni avec le kit (Annexe III).

#### II.2.3.2. Dosage de l'ADN

Le dosage de l'ADN est nécessaire pour déterminer la qualité et la pureté de l'ADN dans l'échantillon. Il est effectué à l'aide d'un Spectrophotomètre (*Thermo Scientific NanoDrop™ 1000*), 1 µl de chaque échantillon a été déposé dans la cellule de l'appareil, la lecture de la densité optique a été faite à 260 et à 280 nm.

Le rapport 260/280 est utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN, un rapport de ~ 1,8 indique que l'ADN extrait est pur, si le rapport est inférieur, il peut indiquer la présence de protéines, de phénol ou d'autres contaminants. Une valeur supérieure à 2 indique, en général, une présence importante d'ARN.

### II.2.3.3. Amplification du gène ARNr 16S par PCR

La PCR a été réalisée à l'aide d'un thermo cycleur (*Applied Biosystem 2720*) en utilisant les deux amorces universelles :

**1390:** 5'-AACGGGCGGTGTGTRCAA-3'.

**PA2:** 5'- AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'.

Le mélange de la réaction était comme suit :

- 2 µl de l'échantillon d'ADN.
- 2 µl de chaque amorce 1390 et PA2.
- 1 µl de dNTP mixte.
- 2 µl du tampon (MgCl<sub>2</sub>).
- 0,5 µl du Taq-polymérase.
- 16 µl H<sub>2</sub>O ultra pure stérile.

L'amplification de l'ADN s'est déroulé comme suit : dénaturation 1min à 94 °C, hybridation 1min à 52 °C, élongation 1min 30 sec à 72 °C, avec 36 cycles ([Zheng et al., 1996](#)).

### II.2.3.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Après la réaction du PCR, 20 µl de chaque échantillon ont été déposés sur gel d'agarose à 1%, coloré avec le Bromure d'Ethidium. Le marqueur 1Kb a été utilisé comme échelle pour estimer la taille du gène. La migration s'est déroulée à 100 V pendant 20 min. Ensuite les bandes ont été photographiées avec un système de capture digital (*Bio Imaging System*).

### II.2.3.5. Séquençage de l'ADNr 16S

Les produits de l'amplification du gène de l'ARNr 16S ont été envoyés à la société Eurofins Genomics GmbH (<http://www.eurofinsgenomics.eu/>) pour la purification et le séquençage, les deux amorces universelles 1390 et PA2 ont été utilisées pour l'amplification.

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences homologues d'espèces de référence répertoriées dans la banque génomique NCBI, en utilisant le programme BLASTn (NCBI Blast<sup>®</sup> page d'accueil: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les séquences des mêmes genres ont été ensuite alignées par ClustalW en utilisant le logiciel MEGA 6,0 ([Tamura et al., 2013](#)) et l'arbre phylogénique a été généré par l'algorithme Neighbor-Joining (NJ) ([Saitou et Nei, 1987](#) ; [Tamura et al., 2004](#)) en utilisant le même logiciel.

### II.3. Caractérisation *in vitro* des isolats pour la promotion de la croissance des plantes

Cette partie de notre étude est consacrée à la caractérisation des activités des rhizobactéries isolées liées à leur pouvoir promotionnel de la croissance des plantes. Tous les tests ont été effectués en trois répétitions.

#### II.3.1. Mesure de l'activité de la nitrogénase

L'activité de la nitrogénase a été déterminée par le test de réduction de l'acétylène au laboratoire de contrôle génétique de la symbiose à l'institut des sciences des plantes (IPS2), Université de Paris Sud, France.

Selon la méthode de Koch et Evans (1966) modifié par Berrabah *et al.*, (2014), chacun des isolats a été cultivé sur milieu semi solide exempt d'azote dans des viales stériles de 20 ml contenant 12 ml de milieu. Les cultures ont été incubées à  $28 \pm 2$  °C sans agitation pour permettre la formation des pellicules. Après 4 jours d'incubation, 500 µl d'acétylène ont été injectés et l'incubation a été poursuivie pendant 12 h dans les mêmes conditions. La présence de l'éthylène a été détectée en utilisant le 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.

#### II.3.2. Production de l'acide indole acétique (AIA)

L'analyse quantitative (dosage colorimétrique) de la production de l'acide indole acétique a été effectuée suivant la méthode décrite par Loper et Schroth (1986). Le milieu de culture correspondant additionné de 100 mg/l de tryptophane et 1 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a étéensemencé par 1 ml de la culture bactérienne ( $\text{DO}_{620} = 0,8$ ) de chaque isolat. Après incubation à  $28 \pm 2$  °C pendant 96 h dans l'obscurité dans une étuve agitée à 180 tr/min, 5ml de la culture ont été centrifugés à 6000 tr/min pendant 20 min, 1 ml du surnageant a été additionné de 2 gouttes d'acide ortho-phosphorique et 2 ml du réactif de Salkowski (50 ml d'acide perchlorique à 35 % + 1 ml de  $\text{FeCl}_3$  à 0.5 M).

Après 30 min d'incubation à température ambiante dans l'obscurité, le développement de la couleur rose indique la production de l'AIA. La densité optique a été mesurée à 530 nm (Spectrophotomètre *JENWAY 6715*), les concentrations de l'AIA ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle de 0 à 100 mg/l d'AIA (*Sigma-Aldrich*) (Annexe IV).

### II.3.3. Solubilisation du phosphate

Le test de solubilisation du phosphate nous a permis d'évaluer la capacité des différents isolats à solubiliser le phosphate inorganique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Ce test a été effectué qualitativement et quantitativement :

#### II.3.3.1. Evaluation qualitative sur milieu gélosé

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate a été évaluée qualitativement en utilisant le milieu gélosé de Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) (Annexe II). Des cultures pures de chaque isolat ont été ensemencées par piqure centrale à la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose Pikovskaya. Après incubation à  $28 \pm 2$  °C pendant 7 jours, l'apparition d'un halo transparent autour des colonies indique la capacité de solubilisation du phosphate par l'isolat bactérien. Les diamètres des colonies et des halos ont été mesurés, les résultats ont ensuite été exprimés en efficacité de solubilisation (ES) calculé selon Nguyen *et al.*, (1992) en utilisant la formule suivante :

$$ES = \frac{\text{diamètre de solubilisation} + \text{diamètre de croissance}}{\text{diamètre de croissance}} \times 100$$

#### II.3.3.2. Evaluation quantitative en milieu liquide

L'évaluation quantitative de la solubilisation du phosphate a été réalisée en utilisant le milieu liquide NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (Annexe II) (Nautiyal, 1999). 50 ml de milieu de culture NBRIP ont été inoculés par 1 ml de la suspension bactérienne ( $\text{DO}_{620} = 0,8$ ) préparée à partir de chaque isolat. Après une incubation de 7 jours à  $28 \pm 2$  °C dans une étuve agitée à 180 tr/min, 5 ml de chaque culture a été centrifugée à 6000 tr/min pendant 30 min, le contenu du phosphate soluble dans le surnageant est par la suite déterminé par la méthode Spectrophotométrique de jaune de vanado-molybdate (Jackson, 1958).

Selon cette méthode, 1ml du surnageant a été ajouté à 2,5 ml de réactif Barton (Annexe V) dans une fiole de 50 ml le volume a été ensuite complété jusqu'à 50 ml avec de l'eau distillée. Après 10 minutes, la lecture de la densité optique a été effectuée à 430 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6715). Le phosphore soluble a été calculé à partir de l'équation de régression d'après la courbe d'étalonnage (Annexe IV).

### II.3.4. Production de l'ACC désaminase

L'évaluation de l'activité de l'amino-cyclopropane carboxylate désaminase (ACC désaminase) chez les différents isolats est basée sur la capacité de ces microorganismes à utiliser l'amino-cyclopropane carboxylate (précurseur de l'éthylène) comme seule source d'azote. La méthode de [Jacobson et al., \(1994\)](#) a été choisie pour la réalisation de ce test.

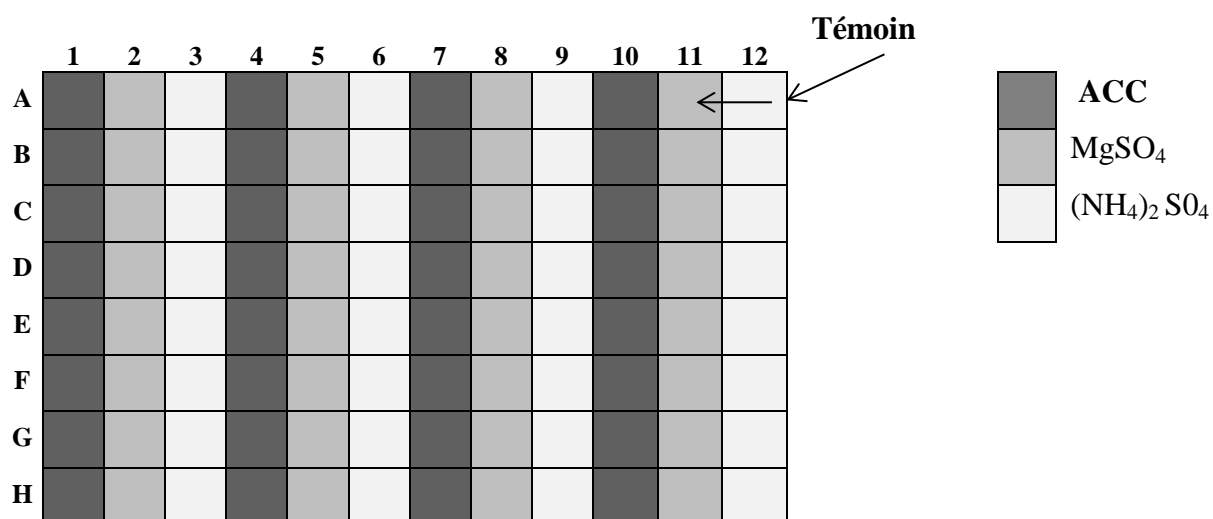
Cinq millilitres de bouillon tryptique de soja (TSB) (Annexe II) ont été inoculés par chacun des isolats. Les cultures ont été incubées pendant 48 h à  $28 \pm 2$  °C dans des conditions d'agitation (150 tr/min). Les cultures ont été diluées 10 fois dans une solution stérile de  $\text{MgSO}_4$  (1M).

Dans une plaque de micro-titration de 96 puits, des solutions ont été réparties comme suit :

- 150  $\mu\text{l}$  du milieu DF (Annexe II) sont déposés dans chacun des puits de la plaque,
- 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  (0,1 M) sont ajoutés aux lignes 3, 6, 9 et 12.
- 15  $\mu\text{l}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1 M) sont ajoutés aux lignes 2, 5, 8 et 11.
- 15  $\mu\text{l}$  d'ACC (3mM) stérilisé par filtration sont ajoutés aux lignes 1, 4, 7 et 10.
- 22  $\mu\text{l}$  de la culture bactérienne sont ajoutés dans tous les puits,
- 22  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  (1M) sont déposés dans les puits témoin à la place de la culture bactérienne (Figure II.3).

La densité optique a été mesurée à 620 nm après 24, 48, 72 et 96 h avec un spectrophotomètre *ELISA* automatisé (*LABSYSTEMS Multiskan Ex*). Les valeurs de la densité optique des puits remplis par  $\text{MgSO}_4$  et ACC ont été comparées avec celles remplis par  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pour déterminer la capacité des isolats à métaboliser l'ACC. Il est considéré comme résultat positif (présence d'activité ACC-désaminase), tout isolat microbien ayant présenté une densité optique en présence de l'ACC proche ou égale à celle de la culture contenant le sulfate d'ammonium et supérieure aux cultures contenant le sulfate de magnésium :

$$DO_{\text{MgSO}_4} < DO_{\text{ACC}} \approx DO_{\text{NH}_4\text{SO}_4} \rightarrow \text{Métabolisme de l'ACC}$$



**Figure II.3.** Répartition des solutions dans la plaque de micro-titration de 96 puits pour le test de l'ACC désaminase.

### II.3.5. Production des sidérophores

La capacité de l'ensemble des isolats à produire les sidérophores a été testée par leur culture sur le milieu Chrome Azurol S agar (CAS) (Schwyn et Neilands, 1987) (Annexe VI). Un prélèvement de chaque culture bactérienne a étéensemencé en surface des boîtes de Petri coulée préalablement par la gélose CAS. Après quatre jours d'incubation à  $28 \pm 2$  °C, le virement de la couleur bleue par le développement d'un halo jaune-orange autour des colonies indique la production des sidérophores. Les diamètres des halos ont été pris comme estimations de l'intensité de la production de sidérophores.

### II.3.6. Production d'ammoniac (NH<sub>3</sub>)

La mise en évidence de la production d'ammoniac par les différents isolats bactériens a été réalisée selon la méthode décrite par Cappuccino et Sherman (1992). Des cultures fraîchement cultivés ont été inoculées dans 10 ml d'eau peptonée et incubées pendant 48-72 h à  $28 \pm 2$  °C. 0,5 ml du réactif de Nessler a été ajouté dans chaque tube. Le développement de la couleur marron indique un résultat positif pour la production d'ammoniac.

### II.3.7. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La méthode de Soltani *et al.*, (2012) a été utilisée pour tester la production de l'acide cyanhydrique (HCN), chaque isolat a étéensemencé par étalement sur la surface de la gélose nutritif additionné de 4,4 g/l de glycine, un papier filtre wattman n°1 trempé dans une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2% dans l'acide picrique à 0,5% a été déposé sur le couvercle de la boîte, ensuite les boîtes ont été scellées avec du parafilm et incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 4 jours. Le développement de la couleur orange-marron indique la production de l'acide cyanhydrique.

## II.4. Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination et la croissance du blé dur sous stress salin

Dans cette partie, il est question d'apprécier les effets de l'inoculation des graines et des plantules de blé dur d'une variété locale (Waha) par cinq bactéries diazotrophes, préalablement sélectionnées pour leurs caractères promotionnels parmi la collection des isolats obtenue dans les parties précédentes.

### II.4.1. Matériel végétal

Des graines de blé dur (*Triticum durum* Desf.) d'une variété locale (Waha) ont été utilisées tout au long de cette expérimentation. Elles ont été obtenues auprès de l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) Sidi Bel Abbass (Algérie).

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) variété Waha est une variété local à cycle court, de type printemps, à paille courte et demi plaine, précoce, résistante aux maladies, mieux adaptée aux régions arides et semi-arides et de bonne productivité (Mekhlouf *et al.*, 2006; Bouthiba et Debaeke, 2009).

### II.4.2. Souches bactériennes

Les isolats utilisés font partie de la collection des isolats obtenus durant les premières parties de notre étude. Ils ont été sélectionnés sur la base de leurs différentes activités liées au pouvoir de promotion de la croissance des plantes. Cinq isolats sont ainsi sélectionnés : NHA15, NHA78, MHC54, NMB8 et NMA27.

#### II.4.2.1. Survie et croissance des isolats sélectionnés en présence du NaCl

La tolérance des isolats au sel (NaCl) a été évaluée en bouillon nutritif additionné de concentrations croissantes de NaCl (0, 100, 200, 300, 400, 500 mM). 1 ml de l'inoculum ( $DO_{620} = 0,5$ ) a été utilisé pour inoculer des flacons de 250 ml contenant 50 ml du bouillon nutritif puis incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 48h avec agitation à 180 tr/min. La croissance bactérienne a été estimée par la mesure de la densité optique à 620 nm (Rojas-Tapias *et al.*, 2012). Chaque expérience a été réalisée en trois répétitions.

#### II.4.2.2. Effets du NaCl sur les différentes activités PGP des isolats sélectionnés

L'effet du stress salin sur la capacité des cinq isolats sélectionnés à exprimer certains paramètres liés à la promotion des plantes (fixation d'azote, production de l'acide indole acétique (AIA) et solubilisation du phosphate) a été testé par la culture des cinq isolats sur les milieux spécifiques contenant des concentrations croissantes de NaCl (0, 100, 200, 300, 400,

500 mM). Après incubation pendant des durées variables selon le test, Chacun des paramètres est estimé selon les protocoles décrits auparavant.

#### II.4.3. Préparation de l'inoculum

Chacun des isolats bactériens (NMB8, NHA15, NHA79, MHC54 et NMA27) a été mis en culture dans du bouillon LB à  $28 \pm 2$  °C pendant 48 heures. La culture obtenue est centrifugée à 6000 tr/min pendant 5 min puis rincée deux fois dans une solution de PBS et la densité optique a ensuite été ajustée à une  $DO_{620} \approx 0,7$  (Nabti *et al.*, 2014).

#### II.4.4. Désinfection des graines

Les graines du blé ont été désinfectées par une solution d'éthanol à 70% pendant 2min puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 10 mn puis rincées dix fois avec l'eau distillée stérile (Gholami *et al.*, 2009).

#### II.4.5. Effet de l'inoculation sur le taux de germination et l'index de vigueur

Des graines de blé préalablement désinfectées ont été mises sur des papiers filtre placés au fond des boites de pétri (20 graines/boite). Six groupes de boites ont été ainsi préparées, chaque groupe de boite représente un type de traitement (témoin + 5 isolats bactériens). 10 ml de l'inoculum préparée à partir de chacun des isolats sont ajoutés dans chacune des boites à l'exception du témoin qui reçoit 10 ml d'eau distillée stérile.

Après incubation à 25 °C pendant 7 jours à l'obscurité, le comptage des graines germées a été réalisé. Il est considéré comme graine germé toute graine ayant donné naissance à une coléoptile de longueur égale ou supérieure à 3 mm (Al-Karaki, 2001). Les longueurs ont été mesurées pour calculer l'index de vigueur selon Abdul Baki et Anderson (1973) par la formule suivante :

$$\text{Index de vigueur} = (\text{LF} + \text{LR}) \times \% \text{ germination}$$

**LF** : longueur des feuilles.

**LT** : longueur des racines.

**% germination** : pourcentage de germination = graines germés / total des graines.

## II.4.6. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantules de blé

### II.4.6.1. Dispositif expérimental et conditions de croissance

L'expérience a été faite dans une serre en verre dans la ferme expérimentale de l'Université de Mostaganem, selon le dispositif expérimental bi-factoriel (Tableau II.1):

- Facteur 1 : inoculation bactérienne avec six niveaux (témoin sans inoculation et cinq isolats pour l'inoculation)
- Facteur 2 : stress salin avec trois niveaux (témoin avec 0 mM et deux concentrations de sel 100 et 200 mM)

**Tableau II.1.** Croisement des facteurs de l'expérimentation

<b>F1</b> \ <b>F2</b>	<b>0 Mm</b> F2.1	<b>100 mM</b> F1.2	<b>200 mM</b> F1.3
<b>Témoin</b> (F1.1)	F1.1 x F2.1	F1.1 x F2.1	F1.1 x F1.3
NHA15 (F1.2)	F1.2 x F2.1	F1.2 x F2.1	F1.2 x F1.3
MHC54 (F1.3)	F1.3 x F2.1	F1.3 x F2.1	F1.3 x F1.3
NHA78 (F1.4)	F1.4 x F2.1	F1.4 x F2.1	F1.4 x F1.3
NMB8 (F1.5)	F1.5 x F2.1	F1.5 x F2.1	F1.5 x F1.3
NMA27 (F1.6)	F1.6 x F2.1	F1.6 x F2.1	F1.6 x F1.3

**F1** : facteur 1 (inoculation bactérienne, **(F1.1)** : facteur 1 niveau 1

**F2** : facteur 2 (stress salin)

Des pots en plastique de 15cm de diamètre et de 20cm d'hauteur ont été utilisés pour l'expérimentation, ils ont été désinfectés avec l'hypochlorite de sodium à 1% puis lavés avec l'eau distillé stérile plusieurs fois (Nabti *et al.*, 2014), ensuite les pots ont été remplis par du sable inerte (ramené de la plage des sablettes –Mostaganem) préalablement lavé plusieurs fois avec l'eau de robinet et ensuite stérilisé à l'autoclave (120 °C, 1 bar / 20 min) pendant 3 jours successives (Rajput *et al.*, 2013).

### II.4.6.2. Irrigation et suivi de la croissance des plantes

Les graines de blé ont été semées à raison de trois graines par pot à une profondeur de 1cm de la surface. Elles ont ensuite été inoculées avec 15ml de la suspension bactérienne (les pots témoins ont été irrigués à l'eau distillé stérile), l'inoculation a été refaite après 15 jours pour confirmation. Les plantules ont été irriguées deux fois par semaine avec 200ml de la solution Hoagland (Hoagland et Arnon, 1950) (Annexe VII) et avec l'eau distillée en cas de nécessité. Le traitement salin a été commencé sept jours après semée par l'addition du NaCl à la solution Hoagland (Aly *et al.*, 2012), Après environ quarante jours, les plantules ont été récoltées.

### II.4.6.3. Détermination des paramètres de croissance

Après la récolte, le matériel végétal a été lavé à l'eau distillée puis transporté au laboratoire pour réaliser des tests morphologique et biochimiques.

#### II.4.6.3.1 Détermination des paramètres morphologiques

Les feuilles et les racines des plantules ont été séparées, leurs hauteur et leur profondeur ont été mesurées, la biomasse végétale a été calculée par la détermination du poids frais et sec des feuilles et des racines après séchage à 70 °C pendant 72 heures.

#### II.4.6.3.2. Détermination des paramètres biochimiques

##### II.4.6.3.2.1. Teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle a été déterminée par la méthode d'Arnon (1949) modifiée par Ferus et Arkosiova (2001). Elle consiste à découper 0,5 g de matière fraîche de chaque échantillon en petits segments et les homogénéiser dans 5 ml d'acétone à 80% et laisser au congélateur pendant une nuit. Après filtration, la densité optique a été mesurée à 663 et 645 nm. Les concentrations en chlorophylles a et b ont été déduites selon les formules suivante :

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/l)} = 12,7 \text{ DO}_{663} - 2,69 \text{ DO}_{645}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/l)} = 22,9 \text{ DO}_{645} - 4,68 \text{ DO}_{663}$$

$$\text{Chl}_{\text{total}} = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b$$

Chl<sub>a</sub> : concentration en chlorophylle a.

Chl<sub>b</sub> : concentration en chlorophylle b.

Chl<sub>total</sub> : concentration en chlorophylle totale

##### II.4.6.3.2.2. Contenu en ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> de la partie aérienne et racinaire

Les concentrations de Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> des feuilles et des racines ont été déterminées selon la méthode de Pequerul *et al.*, (1993). La méthode consiste à la digestion de la matière sèche (0,1g) dans 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 98% et 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% pendant 5 heures, les solutions ont été chauffées jusqu'à la disparition de la fumée marron, ensuite 5 ml d'HCl à 50% ont été ajouté et le volume a été ajusté à 25 ml avec l'eau distillé.

Les échantillons ont été analysés par spectrophotomètre de flamme (*Neo-Tech BMB Technologie*).

##### II.4.6.3.2.3. Teneur en proline

La teneur en proline a été déterminée par la méthode de Bogdanov *et al.*, (1999) modifié par (Nana *et al.*, 2009). Cinq solutions ont été utilisées : l'acide formique à 100%, une solution de Ninhydrine à 3% dans de l'éthylène glycol, une solution aqueuse de proline à

0,032 mg/ml, une solution aqueuse de 2-propanol 50% et les solutions aqueuses d'extrait de feuilles à 0,025 g/ml.

Le principe de la méthode consiste à l'utilisation de trois groupes de tube (i) : un essai blanc avec 0,5 ml d'eau distillé, (ii) : un essai standard avec 0,5 ml de la solution du proline dans trois tubes, (iii) : un essai de l'échantillon avec 0,5ml d'extrait de feuille.

Dans chaque tube, 1 ml d'acide formique et 1 ml de solution de Ninhydrine ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été soigneusement couverts et agités pendant 15 min à température ambiante, puis placés dans un bain marie bouillante pendant 15 min.

2,5 ml de 2-propanol 50% ont été ajoutés et les tubes sont mis dans un bain mari à 70 °C pendant 10 min. Les tubes ont été refroidis et les absorbances des mélanges ont été lues à 510 nm (Spectrophotomètre *JENWAY 6715*). La teneur en proline a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Proline (mg/g de feuille fraîche)} = [\text{Es}/\text{Ea} \times \text{E}_1/\text{E}_2 \times 80]/1000$$

**Es** : absorbance de la solution d'échantillon.

**Ea** : absorbance de la solution standard de proline (moyenne de 3 échantillons).

**E<sub>1</sub>** : mg de proline pris pour la solution standard.

**E<sub>2</sub>** : g de feuille fraîche séchée.

**80** : facteur de dilution.

### II.5. Traitement statistique

Les résultats de différents paramètres ont été réalisés en triplicata et traités par analyse de variance par l'utilisation de logiciel *Statbox 6.4*, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux par le test de *Newman & Keuls*.

L'analyse en composantes principales a été réalisée avec le même logiciel, elle a été faite pour établir une relation entre plusieurs variables et pour savoir le comportement des individus vis-à-vis les variables analysés.



*CHAPITRE III :*  
*Résultats et*  
*discussion*

### III. Résultats et discussion

#### III. 1. Isolement et identification des bactéries diazotrophiques

##### III.1.1. Caractérisation physicochimique des sols

Selon les zones de la salinité établies par des études antérieures (Douaoui *et al.*, 2006; Gacem *et al.*, 2009), quinze prélèvements ont été réalisés à partir de deux zones géographiques différentes (le périmètre de la Mina et du bas-Chélif). Les coordonnées cartographiques (selon GPS) ainsi que les dates de l'échantillonnage sont données dans le Tableau III.1. L'analyse des résultats obtenus montre que la salinité (conductivité électrique) des différents échantillons varie entre 6,10 et 13,30 dS/m et que leur pH est plutôt alcalin avec des valeurs variables entre 7,67 et 8,12. Des taux d'humidité très bas ont aussi été enregistrés dans la plupart des échantillons. Une valeur minimale d'humidité (11,33%) a été ainsi obtenue pour l'échantillon n°11. Les taux d'humidité les plus élevés ont été obtenus surtout pour les échantillons prélevés à partir de la plaine bas-Chélif (échantillons n°1, 2, 3 et 17)

**Tableau III.1.** Quelques caractéristiques physico-chimiques des sols prélevés.

Echant N°	Date d'échantillonnage	Coordonnées cartographique	Conductivité électrique dS/m	pH	Humidité (%)	Isolats bactérien obtenus
01	14/01/2015	0° 29' 24" E 35° 44' 23" N	9,60 ± 0,14	7,72 ± 0,04	15,88 ± 0,12	26
02	14/01/2015	0° 29' 32" E 35° 44' 14" N	9,10 ± 0,16	7,95 ± 0,07	15,86 ± 0,22	14
03	14/01/2015	0° 29' 15" E 35° 44' 09" N	9,90 ± 0,06	8,00 ± 0,03	17,4 ± 0,16	17
04	26/04/2014	0° 42' 10" E 35° 57' 15" N	9,60 ± 0,23	7,67 ± 0,06	14,44 ± 0,34	18
05	26/04/2014	0° 42' 32" E 35° 57' 09" N	8,00 ± 0,11	7,89 ± 0,09	13,39 ± 0,24	21
06	03/05/2014	0° 44' 34" E 35° 56' 48" N	12,50 ± 0,22	7,98 ± 0,04	12,34 ± 0,32	10
07	10/05/2014	0° 37' 16" E 35° 55' 19" N	13,30 ± 0,09	7,97 ± 0,08	13,66 ± 0,44	15
08	10/05/2014	0° 36' 59" E 35° 55' 24" N	8,40 ± 0,11	7,71 ± 0,08	13,03 ± 0,38	12
09	26/04/2014	0° 41' 02" E 35° 57' 30" N	7,30 ± 0,13	7,79 ± 0,02	12,35 ± 0,21	18
10	03/05/2014	0° 44' 45" E 35° 56' 00" N	6,40 ± 0,16	7,98 ± 0,06	11,92 ± 0,18	21
11	10/05/2014	0° 38' 20" E 35° 55' 23" N	6,30 ± 0,11	7,93 ± 0,04	11,33 ± 0,27	25
12	10/05/2014	0° 36' 50" E 35° 55' 00" N	8,80 ± 0,10	7,71 ± 0,01	11,39 ± 0,17	19
13	26/04/2014	0° 41' 01" E 35° 56' 33" N	6,90 ± 0,13	7,80 ± 0,02	13,79 ± 0,24	29
14	03/05/2014	0° 44' 42" E 35° 55' 43" N	8,00 ± 0,08	7,79 ± 0,04	13,92 ± 0,08	21
15	14/01/2015	0° 29' 17" E 35° 43' 54" N	6,10 ± 0,09	8,12 ± 0,05	17,84 ± 0,31	30

### III.1.2. Caractérisation morphologique et génotypique des isolats bactériens

Dans cette partie, les opérations d'isolement et de sélection des bactéries diazotrophes ont été réalisées par ensemencement d'un aliquote des différents échantillons du sol sur des milieux de culture sélectifs exempts d'azote. Ces manipulations sont basées sur l'hypothèse que sur un milieu totalement dépourvu de l'azote, toute prolifération bactérienne indique la capacité des cultures obtenues à fixer l'azote atmosphérique. En conséquence, nous avons sélectionné un total de 296 isolats capables de croître sur les trois milieux de culture exempts d'azote. Le tableau III.1 montre le nombre et la répartition géographique des isolats selon les zones de prélèvement.

Les études macroscopiques des isolats ont montré la présence de colonies de forme et de taille variables, transparentes, brillantes, de couleur blanche ou marron. L'examen microscopique des différents isolats a mis en évidence la présence de bactéries de forme bacillaire de grande ou de petite taille et parfois coccobacilles. Parmi ces isolats, 68% sont à coloration de Gram négatif, et 32% sont la coloration de Gram positif. L'étude de leurs caractères biochimiques différentiels par la galerie API a démontré une grande variabilité des isolats. Ces résultats nous ont permis de classer une partie des isolats dans trois genres différents : *Bacillus*, *Stenotrophomonas* et *Pseudomonas*, le reste des isolats est non identifié (Annexe IX).

Tous les isolats ont ensuite été criblés pour leurs différents caractères liés à la promotion de la croissance des plantes (PGP). Parmi les 296 isolats (Annexe IX), 35 isolats seulement ont été sélectionnés, cette sélection des isolats a été effectuée sur la base de leur capacité à montrer différents caractères liés à la promotion de la croissance des plantes (PGP), ils sont caractérisés génétiquement et décrits en détail ci-dessous.

#### III.1.2.1. Identification des isolats sélectionnés

Les 35 isolats sélectionnés ont été caractérisés génétiquement. Pour ce faire, les gènes ARNr 16S des isolats ont été séquencés. Des séquences de taille différentes (de 900 à 1300 pb) ont été obtenus (Figure III.8), elles ont été ensuite alignées avec les séquences de différents genres bactériens provenant de la base de données GenBank (Tableau III.2). L'analyse des séquences d'ADNr 16S permet de classer les isolats dans sept genres bactériens différents. Cette analyse montre que 20% des isolats testés appartiennent au genre *Klebsiella*, 15% au genre *Bacillus*, 20% au genre *Stenotrophomonas*, 14% au *Enterobacter*, *Serratia* et *Raoultella*, seulement 3% au genre *Pseudomonas*. La plupart d'entre eux (30) appartenant à la division gamma-protéobactéries. Les arbres phylogénétiques reflétant la relation entre chaque

genre et la souche similaire existant dans les banques de données ont été construits par l'algorithme Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 6 (Figure III.9).

Parmi les espèces identifiées, nous distinguons cinq isolats appartenant au genre *Bacillus* dont quatre *Bacillus megaterium* et un *Bacillus subtilis*. Les colonies de *Bacillus megaterium* sur gélose nutritive sont de couleur blanche devenant jaune avec le temps, rondes, lisses, brillantes et de taille moyenne. En outre, l'examen microscopique révèle des méga bacilles à coloration de Gram positif produisant des endospores (Figure III.1). Les colonies de *Bacillus subtilis* sont de couleur crème ou blanche de forme arrondi. Sous l'objectif X100, il apparaît des bacilles à coloration de Gram positif sporulés de taille variable. Le test catalase des espèces de *Bacillus* étudiées est positif, et oxydase négatif, ils sont tous mobiles.

Parmi les espèces identifiées appartenant au genre *Enterobacter*, quatre isolats ont été identifiés comme *Enterobacter aerogenes*, le cinquième (NHB19) n'a pas été identifié au niveau de l'espèce. Sur gélose nutritive, les colonies sont de taille moyennes brillantes, opaques (Figure III.2). Après observation microscopique, les bactéries apparaissent comme des bacilles à coloration de Gram négatif. Ils sont mobiles, avec un test de catalase positif et d'oxydase négatif.

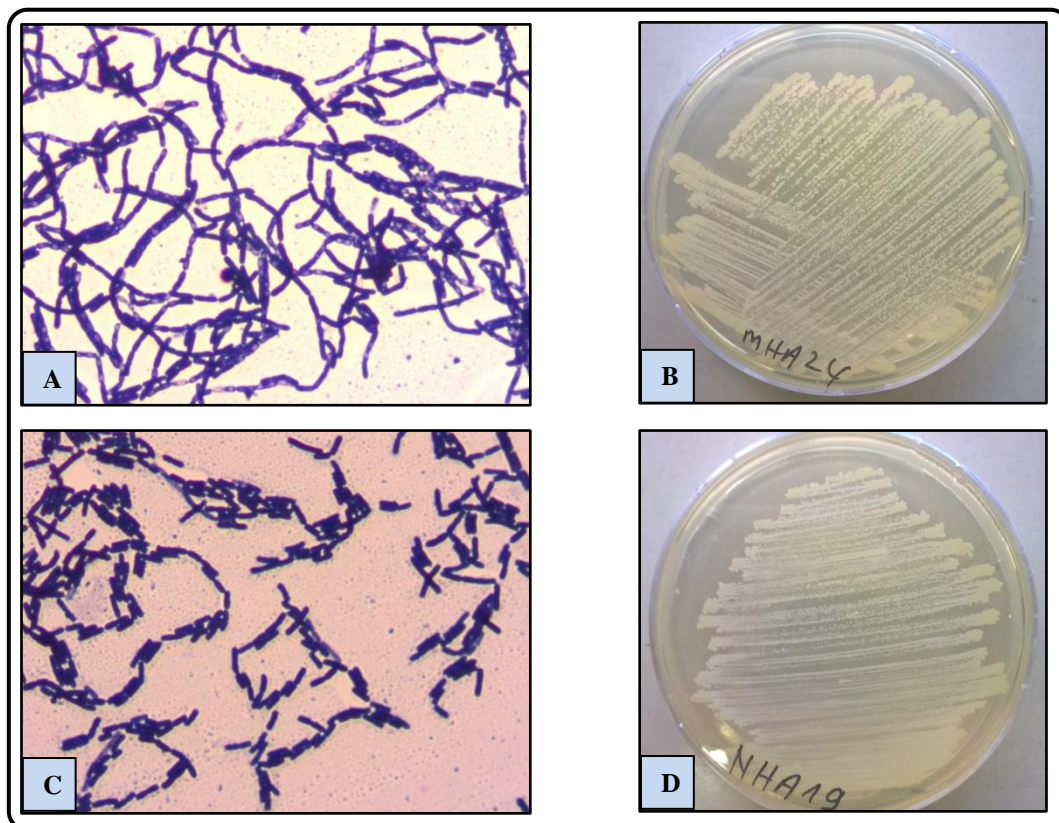
Le nombre des isolats appartenant au genre *Klebsiella* est de sept. Ils ont tous été identifiés comme faisant parti de la même espèce *Klebsiella oxytoca*. Leurs colonies s'avèrent de taille moyenne, épaisses, opaques, de consistance visqueuse (Figure III.3). L'examen microscopique après coloration de Gram montre des petits bacilles à coloration de Gram négatif, de groupement souvent en diplobacilles. Ils sont immobiles, avec une catalase positif et une oxydase négatif.

Cinq autres isolats ont été identifiés sous le genre *Raoultella*. Trois parmi eux (NHA15, MHA59, MHB56) ont été caractérisés comme des bactéries appartenant à l'espèce *Raoultella planticola*, les deux autres (SMA4 et MHA30), n'ont pas pu être identifiées au niveau d'espèce. Ces derniers présentent presque les mêmes caractères phénotypiques de *Klebsiella* (Figure III.4), sachant que l'espèce *Klebsiella planticola* a été reclassée récemment dans le nouveau genre *Raoultella* (Drancourt *et al.*, 2001).

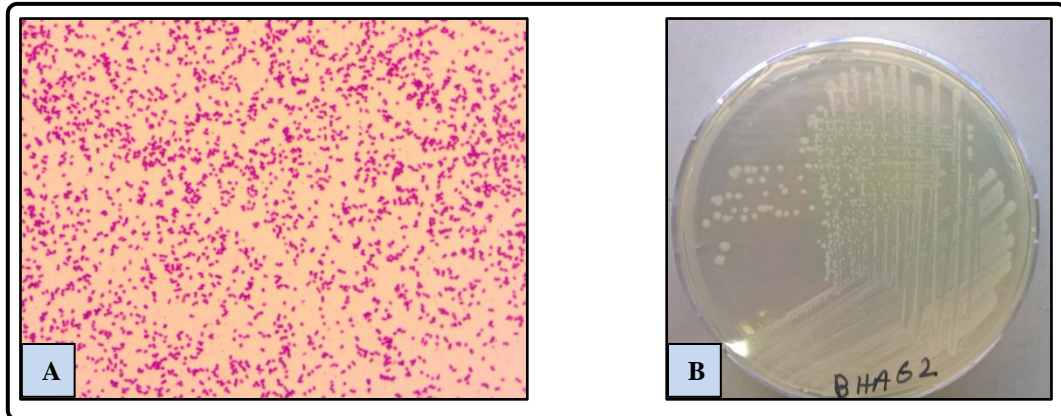
Les cinq isolats NHA21, NHC12, NHA23, SHB93 et MHB51, ont tous été identifiés comme appartenant à l'espèce *Serratia odorifera*. Les colonies de cette espèce sont de petite taille, opaque et crème (Figure III.5). Sous le microscope ils apparaissent sous forme des bacilles ou coccobacilles à coloration de Gram négatif. Tous sont mobiles et à catalase positif et oxydase négatif.

Sept autres isolats (NHA20A, NHA68, NHA78, NHA66, NHB9, NMA27 et NMA14) ont été classés dans le genre *Stenotrophomonas*. La totalité appartient à l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia*, anciennement *Pseudomonas maltophilia*. Ce genre a été proposé par [Palleroni et Bradbury \(1993\)](#). Sur gélose nutritive, les colonies de cette espèce apparaissent comme des colonies de grande taille et de couleur crème. En vieillissant, elles deviennent marrons avec brunissement du milieu de culture (Figure III.6). L'examen microscopique révèle des bacilles assez fins de longueur moyenne, à coloration de Gram négatif.

Le seul isolat identifié sous le genre *Pseudomonas* était l'isolat SHA21, il a été identifié comme *Pseudomonas fluorescens*. C'est un petit bacille à coloration de Gram négatif, de catalase positif et oxydase positif présentant une fluorescence sur milieu King B (Figure III.7).

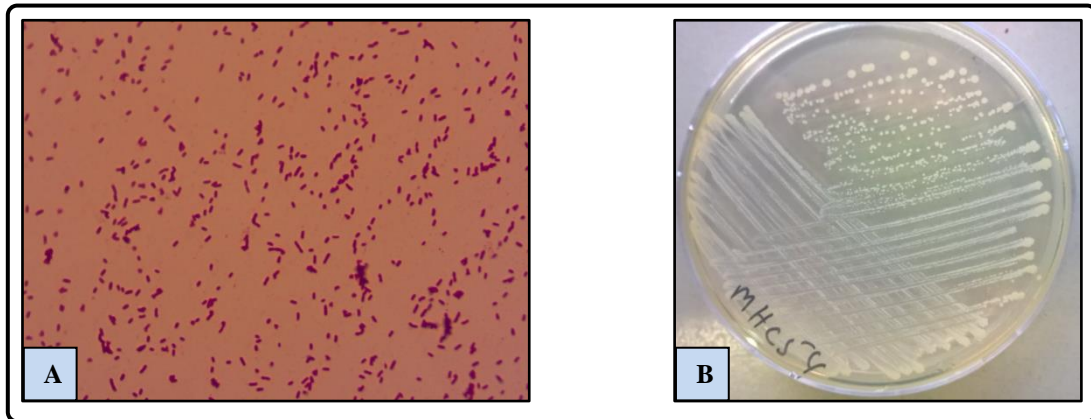


**Figure III.1.** Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) des isolats de *Bacillus*.  
A, B : MHA24 *Bacillus megaterium*, C, D : *Bacillus subtilis*.



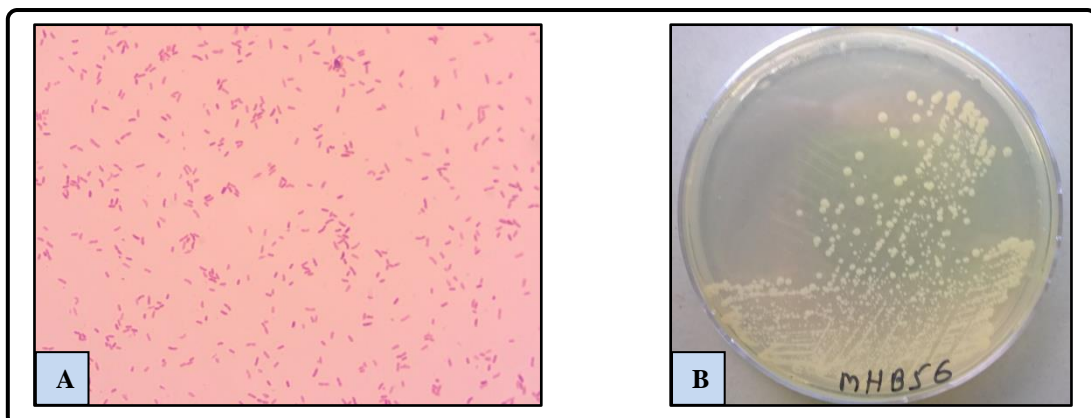
**Figure III.2.** Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat BHA62 : *Enterobacter aerogenes*.

A : examen microscopique B: examen macroscopique.



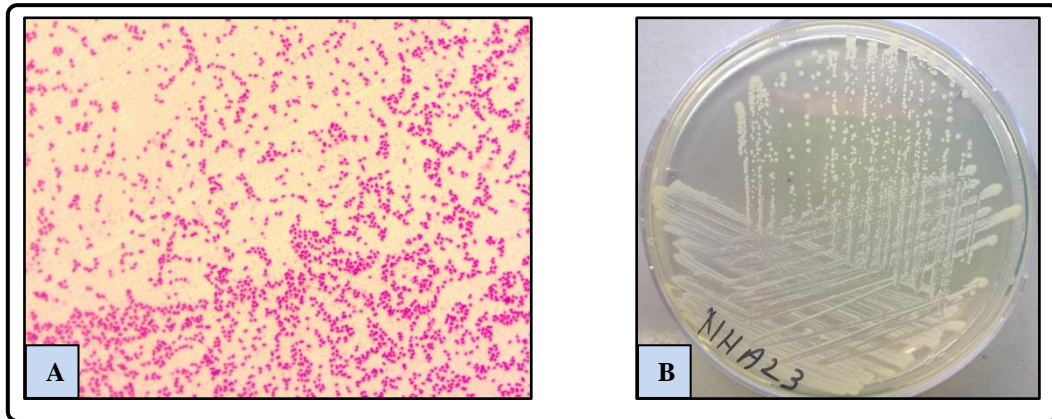
**Figure III.3.** Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat MHC54 : *Klebsiella oxytoca*.

A : examen microscopique B: examen macroscopique.

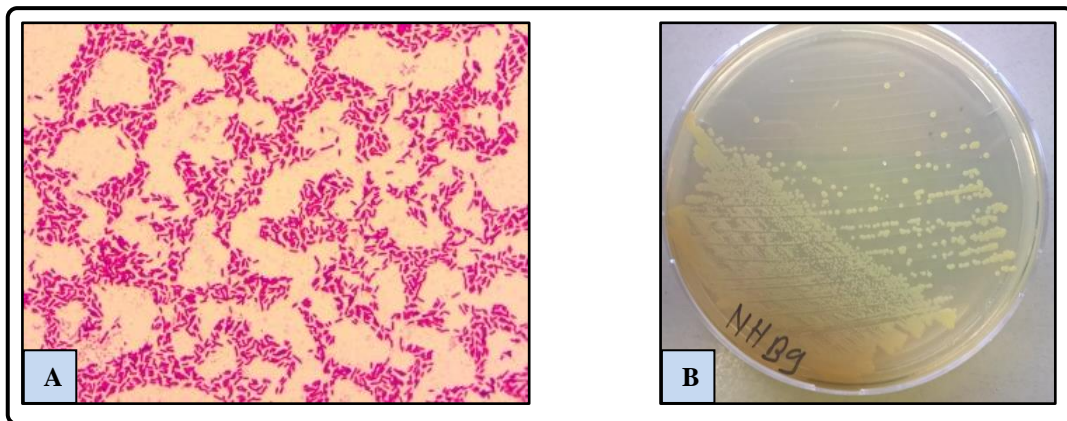


**Figure III.4.** Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat MHB56 : *Raoultella planticola*.

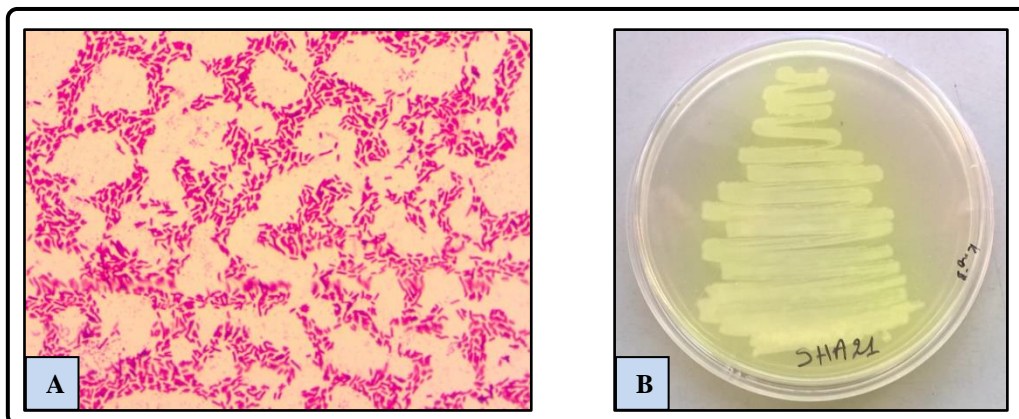
A : examen microscopique B: examen macroscopique.



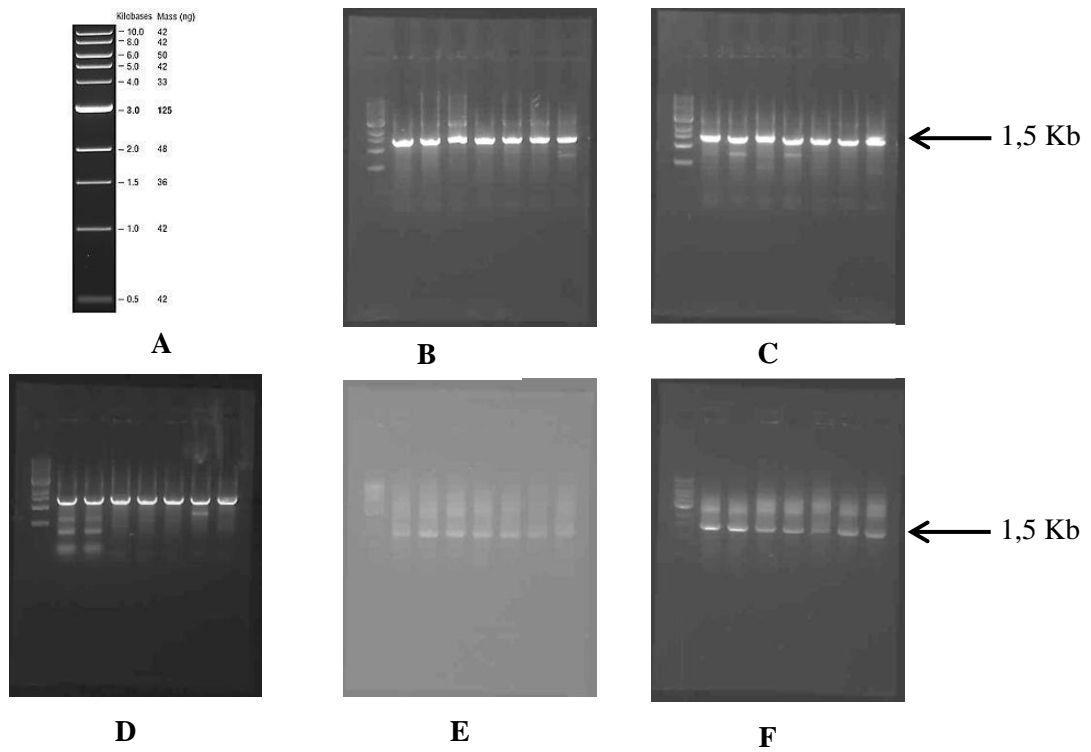
**Figure III.5.** Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat NHA23 : *Serratia odorifera*  
A : examen microscopique B: examen macroscopique



**Figure III.6.** Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat NHB9 : *Stenotrophomonas maltophilia*  
A : examen microscopique B: examen macroscopique



**Figure III.7.** Examen macroscopique et microscopique (objectif 100X) de l'isolat SHA21 : *Pseudomonas fluorescens*.  
A : examen microscopique B: fluorescence sur milieu King B.



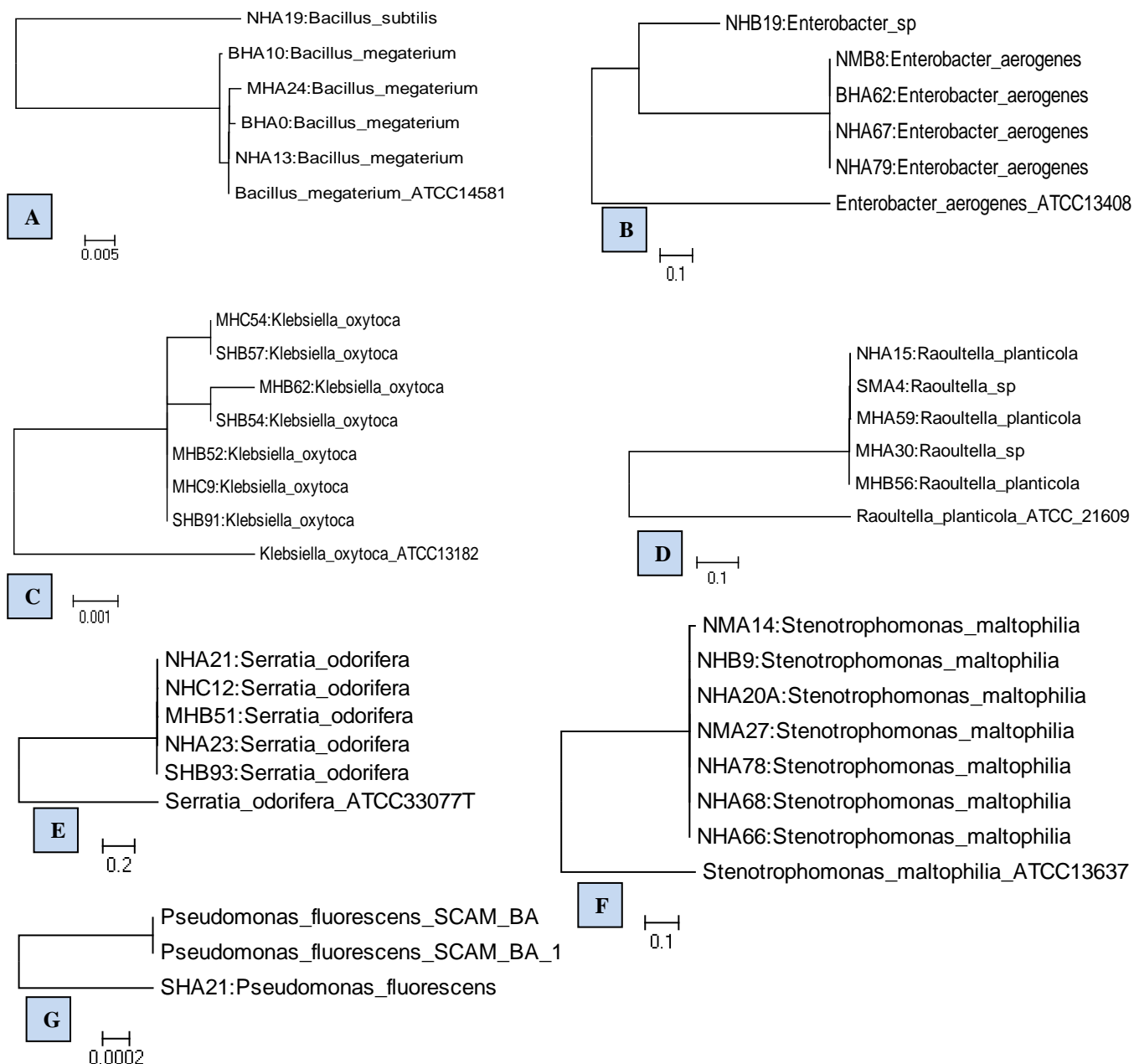
**Figure III.8.** Electrophorèse sur gel d'agarose des résultats de l'amplification du gène ARNr 16S de différents isolats.

**A** :Marqueur 1Kb, **B**: Isolates: 1-7, **C**: Isolates: 8-14, **D**: Isolates: 15-21, **E** : Isolates: 22-28, **F** : Isolates: 29 -35.

Tableau III.2. Caractères biochimique, morphologique et génotypique des isolats.

N°	Isolat	Coloration de gram	Forme	Ox	Mob	cata	Genre et espèce (séquence ADNr 16S)
1	NHA13	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus megathérium</i>
2	MHA24	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>
3	BHA10	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>
4	BHA0	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>
5	NHA19	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus subtilis</i>
6	NHA79	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
7	NMB8	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
8	NHA67	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
9	BHA62	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
10	SHB91	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
11	SHB54	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
12	MHB62	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
13	MHC9	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
14	MHC54	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
15	MHB52	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
16	SHB57	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
17	NHA21	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
18	SHA21	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
19	NHA15	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Raoultella planticola</i>
20	MHA59	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Raoultella planticola</i>
21	MHB56	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Raoultella planticola</i>
22	SMA4	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Raoultella</i> sp
23	MHA30	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	<i>Raoultella</i> sp
24	NHC12	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
25	NHA23	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
26	SHB93	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
27	MHB51	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
28	NHA20A	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
29	NHA68	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
30	NHA78	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
31	NHA66	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
32	NHB9	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
33	NMA27	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
34	NMA14	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
35	NHB19	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Enterobacter</i> sp

+ve: positive , -ve: negative , **cata**: test catalase, **ox**: test oxidase, **Mob**: mobilité



**Figure III.9.** Relations phylogénétiques entre isolats du même genre et une séquence du Genbank basés sur la séquence de l'ADNr 16S.

Les relations phylogénétiques entre les isolats du genre :

**A :** *Bacillus* et une séquence de la souche *Bacillus megaterium* ATCC14581 obtenu du Genbank.

**B :** *Enterobacter* et une séquence de la souche *Enterobacter aerogenes* ATCC13408 obtenu du Genbank.

**C :** *Klebsiella* et une séquence de la souche *Klebsiella oxytoca* ATCC13182 obtenu du Genbank.

**D :** *Raoultella* et une séquence de la souche *Raoultella planticola* ATCC\_21609 obtenu du Genbank.

**E :** *Serratia* et une séquence de la souche *Serratia odorifera* ATCC33077T obtenu du Genbank.

**F :** *Stenotrophomonas* et une séquence de la souche *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC13637 obtenu du Genbank.

**G :** *Pseudomonas* et deux séquences de deux souches *Pseudomonas fluorescens* SCAM BA 1 et *Pseudomonas fluorescens* SCAM BA obtenus du Genbank.

### III.1.3. Discussion

La salinité est l'un des graves problèmes environnementaux qui cause le stress osmotique, et en conséquence la réduction de la croissance des plantes et de la productivité des cultures dans les régions arides et semi arides (Cicek et Cakirlar, 2002). Le stress salin affecte de nombreux aspects du métabolisme des plantes et par conséquent, la croissance et le rendement sont réduits. Au cours des deux dernières décennies, l'utilisation de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) pour une agriculture durable s'est considérablement développée dans diverses régions du monde. Des augmentations significatives de la croissance et du rendement des cultures agricoles en réponse à l'inoculation avec les PGPR ont été rapportées par plusieurs chercheurs (Singh *et al.*, 2011).

Dans cette étude, le périmètre de la Mina et du bas-Chélif dans la wilaya de Rélizane (Algérie) ont été choisis comme lieux de prélèvement et d'isolement d'espèces microbiennes diazotrophiques libres. Le criblage de l'ensemble des isolats sur la base de leurs activités PGP, puis la réalisation d'essais d'inoculation *in vivo* des plantules de blé par les meilleurs isolats sélectionnés sont les principaux objectifs de ce travail.

Selon Asloum (1990) un sol est considéré comme salin si la  $C_E$  est supérieure à 4 dS/m. Douaoui *et al.*, (2006) et Gacem *et al.*, (2009) considèrent les sols de ces régions comme des sols salins. La mesure de la conductivité électrique des différents échantillons de sols prélevés à partir des deux régions a montré des valeurs allant de 6,10 à 13,30 dS/m confirmant la nature saline des sols prélevés.

D'après la carte de salinité réalisée par Douaoui *et al.*, (2006), les sols de la plaine du bas-Chélif sont caractérisés par plusieurs zones de salinité variable, de non salin jusqu'au très salin. En effet, les zones non salines et de salinité moyenne ne représentent qu'une faible partie de cette plaine. La plaine de la Mina de son côté est une zone se situant au sud de la zone du bas-Chélif qui caractérisée par des sols de salinité variable, de non salin jusqu'au extrêmement salin (Gacem *et al.*, 2009).

La présence de ces quantités élevées de sels dans la solution du sol abaisse le potentiel hydrique et réduit fortement la disponibilité en eau, car la concentration des sols en sel est inversement proportionnelle à leur taux d'humidité (Wadleigh et Fireman, 1949). Ceci explique probablement les faibles taux d'humidité enregistrés dans les différents échantillons du sol étudié (11,33 à 17,84%). La valorisation de ce type de sols passe inéluctablement par l'introduction d'êtres vivants capables de résister à ces conditions défavorables et capables d'enrichir la zone par des substances promotionnelles de la croissance des plantes.

La capacité de fixation d'azote atmosphérique comme moyens de fertilisation a été utilisée comme critère d'isolement et de sélection de la flore microbienne du sol de la région de la Mina et du bas-Chélif. Pour se faire, un screening par la culture sur trois milieux de cultures exempts d'azotes a été utilisé pour l'isolement et la sélection des bactéries diazotrophiques. Des recherches précédentes avaient prouvé la rapidité et la simplicité de ce procédé (Döbereiner et Day, 1976). Dans ce travail, cette méthode a effectivement abouti à l'isolement des rhizobactéries diazotrophiques de plusieurs genres bactériens. Les 296 isolats obtenus, tous étaient capables de croître sur les trois milieux de culture utilisés exempts d'azote.

Plusieurs travaux rapportent que les bactéries isolées d'un environnement salin sont plus susceptibles de survivre à des concentrations de sel inhibitrices que leurs homologues provenant d'habitats non salins (Douka *et al.*, 1978; Hua *et al.*, 1982). De même il a été signalé que le succès de l'exploitation d'une souche en contrôle biologique ou comme biofertilisant est le plus souvent dépendant de la source d'isolement et que son utilisation dans des conditions différentes peut ne pas affecter ses performances (Duffy *et al.*, 1997).

Les essais préliminaires de l'identification des isolats a permis de mettre en évidence la présence d'une grande diversité d'espèces microbiennes. Parmi ces isolats, 68% sont des bactéries à coloration de Gram négative, et 32% à coloration de Gram positive. Sept genres différents (*Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas* et *Raoultella*) ont été détectés. Parmi ceux-ci un seul genre est à coloration de Gram positive (*Bacillus*). Ces résultats sont en accord avec la plupart des études sur les bactéries de la rhizosphère qui rapportent que les souches à coloration de Gram négative sont plus nombreuses et que parfois la rhizosphère tend à sélectionner des bactéries à coloration de Gram négative par rapport à celles à coloration de Gram positive (Kloepper *et al.*, 1992; Gilbert *et al.*, 1993).

Plusieurs travaux visant l'isolement des bactéries fixatrices d'azote ont révélé une grande diversité de diazotrophes dans la rhizosphère de différentes cultures (Vessey, 2003). Les genres bactériens rencontrés durant notre étude sont comparables à ceux signalés par plusieurs travaux se rapportant aux bactéries associées à la rhizosphère de plusieurs plantes. Divers genres, y compris *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* et *Pseudomonas* ont été isolés de la rhizosphère des plantes de blé dans différentes parties du NHZ de l'Inde (Verma *et al.*, 2015), *Bacillus* et *Stenotrophomonas* ont déjà été isolés à partir de la rhizosphère de blé (Majeed *et al.*, 2015), l'isolement d'*Enterobacter*, *Azospirillum* et *Bacillus* de la rhizosphère du blé a été rapporté dans les mêmes champs de culture au Pakistan

par [Tahir et al., \(2013\)](#). *Serratia* et *Raoultella* avec d'autres genres ont également été trouvés dans la rhizosphère du blé dans le Rio Grande do Sul, (Brésil) par [Moreira et al., \(2016\)](#).

L'identification des isolats est basée sur le séquençage partiel de leurs ADNr 16S jouant un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne ([Olsen et Woese, 1993](#); [Janda et Abbott, 2007](#)). 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 ([Petti, 2007](#)).

Dans notre étude, la majorité des rhizobactéries isolées (63%) sont des entérobactéries. Ces derniers ont été trouvés en association avec un grand nombre d'espèces végétales, telles que le citron (*Citrus aurantium*) ([Araujo et al., 2001](#)), le maïs ([Hinton et Bacon, 1995](#)), le riz ([Rosenblueth et al., 2004](#); [Verma et al., 2004](#)), la patate douce (*Ipomoea batatas*) ([Reiter et al., 2003](#); [Asis et Adachi 2004](#)), le soja ([Kuklinsky-Sobral et al., 2004](#)) et le blé ([Iniguez et al., 2005](#)).

## III.2. Caractérisation physiologique des isolats par l'évaluation de leurs activités PGP

L'objectif de cette partie est de mettre en évidence la capacité des différents isolats à produire de substances reconnues comme des agents impliqués dans la promotion de la croissance des plantes. Différents test PGP ont été effectués à savoir : le pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique, la production des phytohormones (l'acide indole acétique), la solubilisation du phosphate, la production des sidérophores, la biosynthèse de l'ACC désaminase (considéré comme un indicateur important de la résistance aux stress abiotiques) et la production des composés volatiles tel que l'acide cyanhydrique et l'ammoniac.

Dans la première partie de cette étude, 296 isolats ont été obtenus, dans une première sélection, 35 isolats ont été retenus pour leurs caractères PGP, ces caractères sont présentés dans cette partie.

D'après les résultats obtenus, l'activité de production de l'acide indole acétique ainsi que la solubilisation du phosphate ont été observées chez l'ensemble des genres bactériens étudiés (100%), L'activité de réduction de l'acétylène était aussi présente chez l'ensemble des isolats testés sauf pour l'isolat NHA67 (*Enterobacter aerogenes*).

De plus, le même pourcentage (100%) a été enregistré pour l'activité de production des sidérophores sur le milieu CAS chez les genres de *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Bacillus* et d'*Enterobacter*. En outre, 80% des isolats appartenant au genre *Serratia*, 71% des isolats appartenant au genre *Klebsiella* ainsi que 71% des *Stenotrophomonas* se sont avérés des producteurs de sidérophores (Figure III.10).

Des taux variables de l'activité de l'ACC désaminase ont été observés chez les genres bactériens étudiés : 100% pour *Pseudomonas*, 60% pour *Enterobacter*, *Serratia* et *Bacillus*, 40% pour le genre *Raoultella* et 29% pour *Klebsiella* (Figure III.10).

Un taux très faible de production de l'acide cyanhydrique a été enregistré chez tous les genres étudiés excepté pour *Pseudomonas* (100%) et 20% parmi les isolats du genre *Raoultella* (Figure III.10).

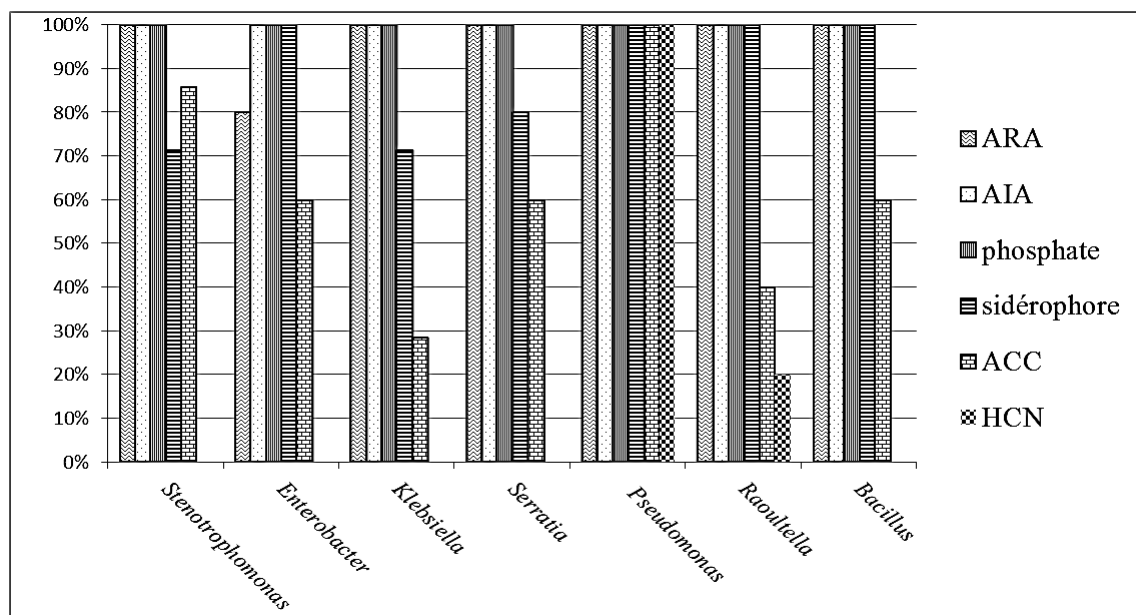


Figure III.10. Fréquence des activités PGP des isolats.

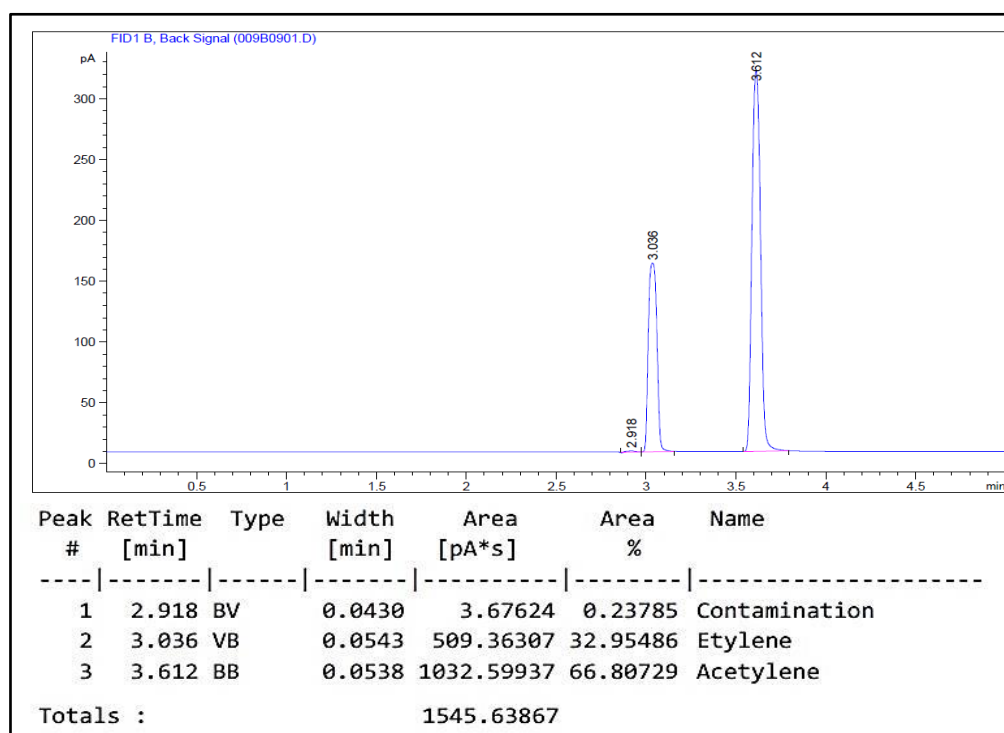
### III.2.1. Fixation de l'azote atmosphérique

La capacité des différents isolats microbiens à fixer l'azote atmosphérique a été évaluée quantitativement par la technique de réduction de l'acétylène selon la méthode décrite précédemment (matériel et méthodes).

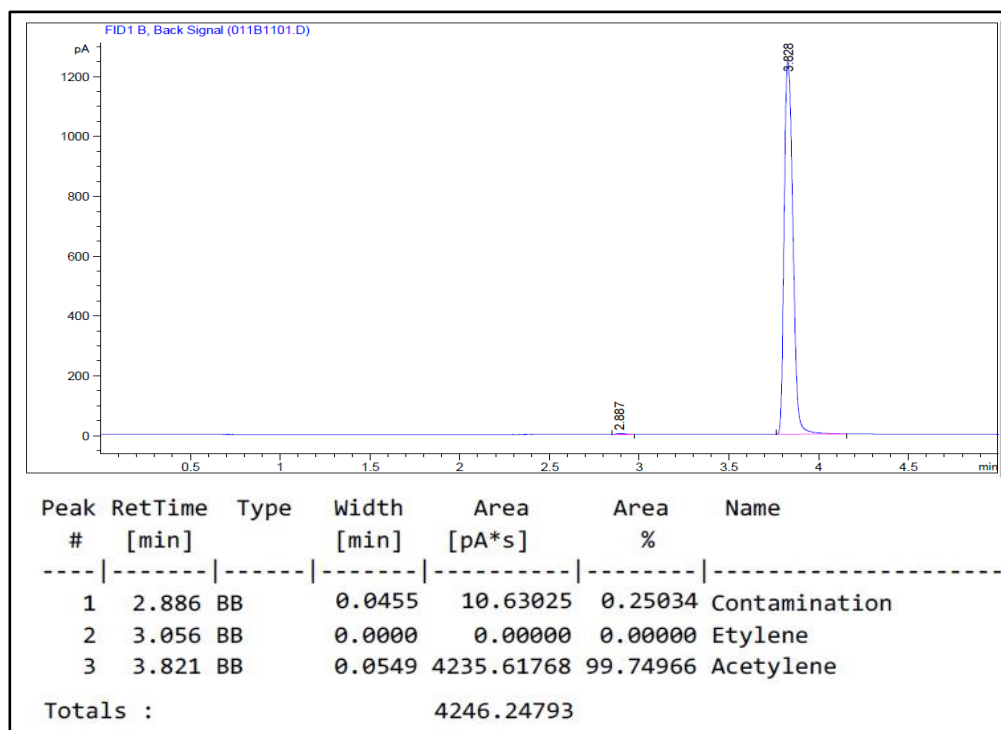
L'analyse des chromatogrammes des différents isolats testés nous a permis de calculer les quantités d'acétylène réduites par chaque isolat.

Selon les résultats obtenus et présentés dans la Figure III.13, nous avons pu distinguer six isolats (NHA13, NMB8, BHA62, MHC54, NHA78, NMA27) capables de démontrer une activité réductrice importante de l'acétylène allant de  $2,48 \pm 0,03$  à  $2,05 \pm 0,00$  nmol  $C_2H_4/h$ . (Figure III.13, Tableau III.3). Un taux maximal de réduction de l'acétylène a été obtenu par l'isolat NHA13 par la réduction de 2,48 nmol de  $C_2H_4/h$  (Figure III.11). Tandis que la majorité des isolats (22/35 isolats) ont présenté des activités variables entre 1 nmol de  $C_2H_4/h$  et 0,05 nmol  $C_2H_4/h$  (Figure III.13, Tableau III.3).

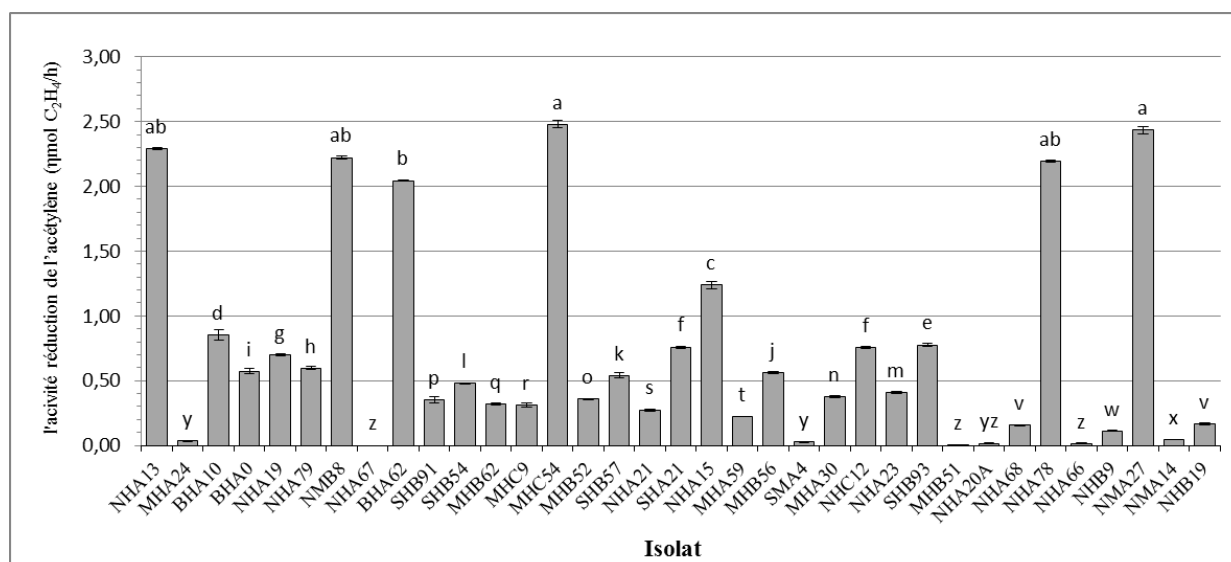
Les sept derniers isolats n'ont montré que de faibles activités ne dépassant pas le plus souvent les valeurs de 0,05 nmol de  $C_2H_4/h$  avec la présence d'un isolat (NHA67) totalement incapable de réduire l'acétylène (Figure III.12).



**Figure III.11.** Chromatogramme de l'activité de réduction de l'acétylène généré par l'isolat NHA13 dont l'activité est maximale.



**Figure III.12.** Chromatogramme de l'activité de réduction de l'acétylène généré par l'isolat NHA67 dont l'activité est nulle.

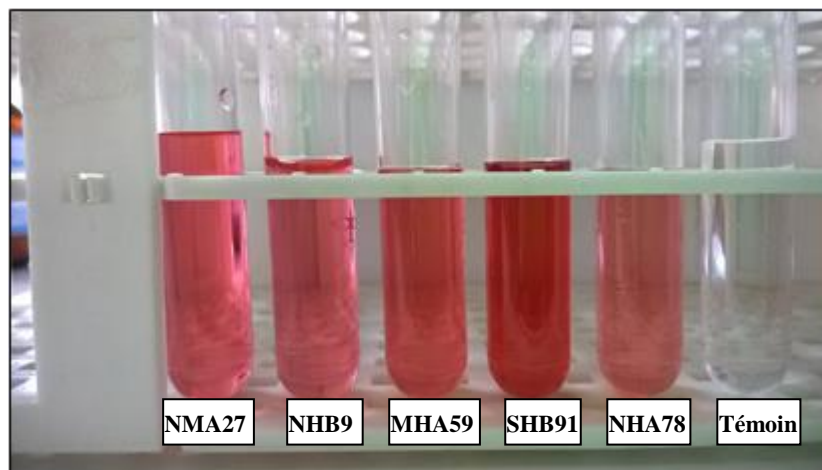


**Figure III.13.** Capacité de fixation d'azote des isolats estimée par le test de réduction de l'acétylène.

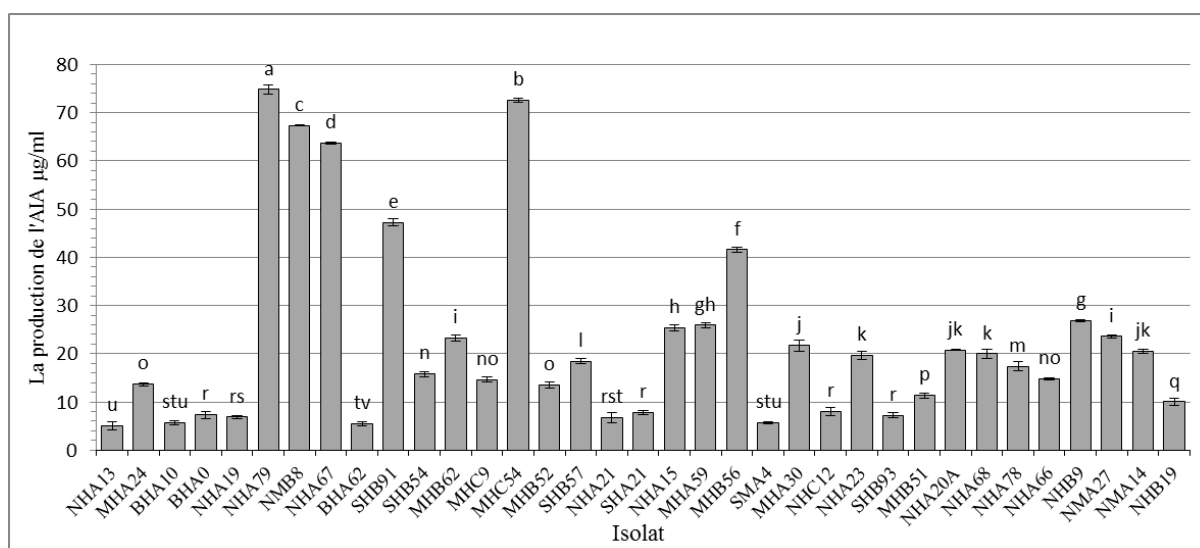
### III.2.2. Production de l'acide indole acétique (AIA)

La recherche de l'acide indole acétique chez l'ensemble des isolats a été réalisée après leur culture dans leurs milieux de culture spécifiques additionnés de tryptophane à raison de 100mg/l. Après 4 jours d'incubation agitée à 30°C, l'apparition de la couleur rose après addition du réactif Salkowski indique de production de l'AIA (Figure III.14). L'analyse de variance des résultats obtenus a révélé une différence significative de production entre les isolats testés (Annexe VIII).

Les taux de production observés vont de  $5,05 \pm 0,83$  jusqu'à  $74,81 \pm 0,94$   $\mu\text{g/ml}$  (Figure III.15, Tableau III.3). La comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman et Keuls montre que les cinq isolats NHA79, MHC54, NMB8, NHA67 et SHB91 ont présenté des taux de production d'AIA les plus élevés par rapport à la majorité des isolats testés, avec des valeurs d'AIA ( $\mu\text{g/ml}$ ) de :  $74,81 \pm 0,94$ ,  $72,62 \pm 0,48$ ,  $67,37 \pm 0,13$ ,  $63,76 \pm 0,21$  et  $47,23 \pm 0,74$  respectivement. Des valeurs minimales de production ont été observées chez quatre isolats : NHA13, BHA62, BHA10 et SMA4, avec des valeurs de ( $\mu\text{g/ml}$ ):  $5,05 \pm 0,83$ ,  $5,43 \pm 0,41$ ,  $5,62 \pm 0,47$  et  $5,69 \pm 0,14$  respectivement, tandis que la majorité des isolats ont produit des quantités d'AIA variables entre 10 et 30  $\mu\text{g/ml}$  (Figure III.15, Tableau III.3).



**Figure III.14.** Production de l'acide indole acétique par les isolats. La couleur rose indique la production de l'acide indole acétique.



**Figure III.15.** Taux de production de l'acide indole acétique par les isolats.

### III.2.3. Solubilisation du phosphate

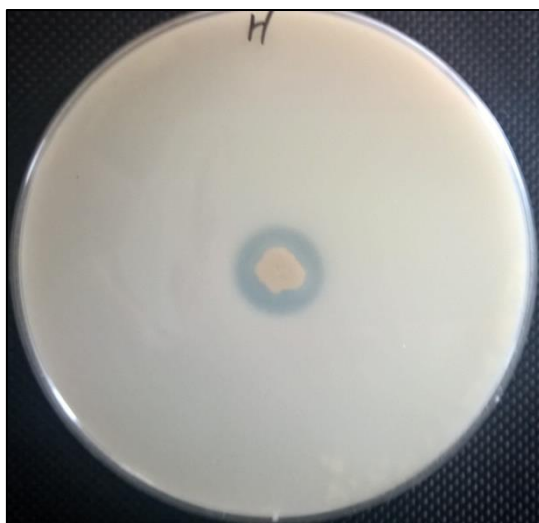
La capacité des isolats diazotrophes à solubiliser les phosphates inorganiques a été étudiée par un test qualitatif dans lequel le pouvoir de solubilisation a été évalué après croissance sur le milieu gélosé de Pikovskaya (PVK). Cette étape a été ensuite suivie par une évaluation quantitative par culture des différents isolats en milieu NBRIP liquide.

#### III.2.3.1. Evaluation qualitative sur gélose

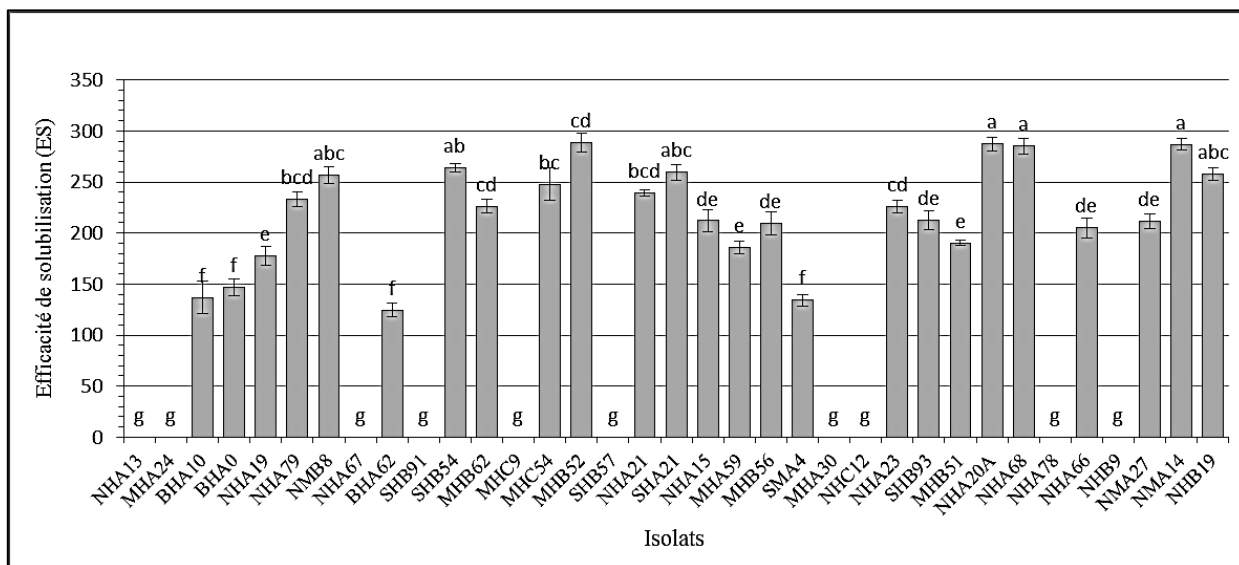
La culture pure de chacun des isolats sur le milieu gélosé de PVK a montré que la majorité est entourée par une zone claire (Figure III.16) traduisant leur capacité à solubiliser le phosphate tricalcique présent dans le milieu. L'importance de cette solubilisation, mesurée

par l'indice de l'efficacité de solubilisation, est variable d'un isolat à l'autre. L'analyse de variance des résultats obtenus montre une différence significative en fonction de la nature de l'isolat (Annexe VIII).

C'est ainsi que des valeurs d'efficacité de solubilisation (ES) du phosphate allant de 0 jusqu'à  $288,33 \pm 9,02$  ont été observés, la plupart des isolats ont montré des valeurs d'ES supérieurs à 200, une valeur maximale de  $288,33 \pm 9,02$  a été observé chez l'isolat MHB52. Au contraire douze isolats ont été incapables de solubiliser le phosphate (ES = 0) (Figure III.17, Tableau III.3)



**Figure III.16.** Solubilisation du phosphate tricalcique par l'isolat NMA27 sur milieu PVK. La zone claire autour de la colonie indique la solubilisation du phosphate

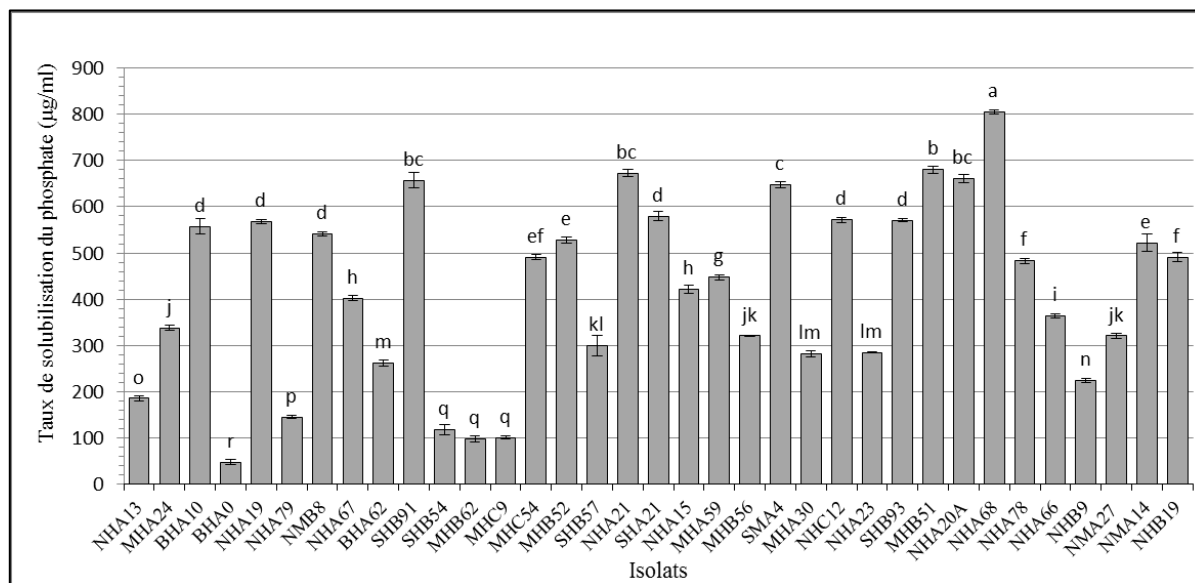


**Figure III.17.** Efficacité de solubilisation (ES) du phosphate tricalcique sur gélose Pikovskaya par les isolats bactériens.

### III.2.3.2. Evaluation quantitative

L'estimation des quantités de phosphates inorganiques libérés par les différents isolats dans le milieu a été réalisée par la méthode de jaune de vanado-molybdate après culture en bouillon NBRIP. Les concentrations déterminées varient de  $47,67 \pm 5,51$   $\mu\text{g/ml}$  à  $804,67 \pm 4,04$   $\mu\text{g/ml}$  (Figure III.18, Tableau III.3). L'analyse de la variance révèle une différence significative pour les différents isolats testés (Annexe VIII).

La comparaison des moyennes par le test Newman et Keuls a montré que cinq isolats NHA68, MHB51, NHA21, NHA20A et SHB91 ont montré des taux maximum de solubilisation du phosphate par rapport aux autres isolats testés, avec des valeurs de (en  $\mu\text{g/ml}$ )  $804,67 \pm 4,04$ ,  $679,86 \pm 8,37$ ,  $672,33 \pm 7,37$ ,  $660,62 \pm 8,18$  et  $656,81 \pm 16,71$  respectivement. De plus, la plupart des isolats (28 isolat) ont montré des valeurs supérieures à  $200$   $\mu\text{g/ml}$ . Tandis qu'une concentration minimale de phosphates libres de  $47,67 \pm 5,51$   $\mu\text{g/ml}$  a été obtenue par l'isolat BHA0 (Figure III.18, Tableau III.3).



**Figure III.18.** Taux de solubilisation du phosphate tricalcique en milieu NBRIP par les isolats bactériens.

**Tableau III.3.** Taux de réduction de l'acétylène, production de l'AIA et solubilisation du phosphate par les isolats testés.

Isolat		ARA (nmol de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h)	IAA (µg/ml)	ES	P (µg/ml)
1	NHA13	2,29±0,01 <sup>ab</sup>	5,05±0,83 <sup>u</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	185,91±5,72 <sup>o</sup>
2	MHA24	0,03±0,00 <sup>y</sup>	13,67±0,28 <sup>o</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	337,91±5,24 <sup>j</sup>
3	BHA10	0,85±0,04 <sup>d</sup>	5,62±0,47 <sup>stu</sup>	136,67±15,82 <sup>f</sup>	557,52±16,43 <sup>d</sup>
4	BHA0	0,57±0,02 <sup>i</sup>	7,35±0,76 <sup>f</sup>	146,67±8,62 <sup>f</sup>	47,67±5,51 <sup>r</sup>
5	NHA19	0,70±0,01 <sup>g</sup>	6,84±0,27 <sup>rs</sup>	177,33±9,07 <sup>e</sup>	568,19±4,97 <sup>d</sup>
6	NHA79	0,60±0,01 <sup>h</sup>	74,81±0,94 <sup>a</sup>	232,67±71,35 <sup>bcd</sup>	145,81±3,02 <sup>p</sup>
7	NMB8	2,22±0,01 <sup>ab</sup>	67,37±0,13 <sup>c</sup>	256,67±8,02 <sup>abc</sup>	183,71±3,74 <sup>o</sup>
8	NHA67	0,00±0,00 <sup>z</sup>	63,76±0,21 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	402,43±5,01 <sup>h</sup>
9	BHA62	2,05±0,00 <sup>b</sup>	5,43±0,41 <sup>tv</sup>	124,67±7,02 <sup>f</sup>	262,43±5,76 <sup>m</sup>
10	SHB91	0,35±0,03 <sup>p</sup>	47,23±0,74 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	656,81±16,72 <sup>bc</sup>
11	SHB54	0,48±0,01 <sup>l</sup>	15,78±0,57 <sup>n</sup>	263,67±4,16 <sup>ab</sup>	118,71±11,54 <sup>q</sup>
12	MHB62	0,32±0,01 <sup>q</sup>	23,25±0,58 <sup>i</sup>	226,33±6,66 <sup>cd</sup>	98,71±6,73 <sup>q</sup>
13	MHC9	0,31±0,02 <sup>f</sup>	14,66±0,57 <sup>no</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	101,10±2,86 <sup>q</sup>
14	MHC54	2,48±0,03 <sup>a</sup>	72,62±0,48 <sup>b</sup>	247,67±15,82 <sup>bc</sup>	291,29±5,91 <sup>l</sup>
15	MHB52	0,36±0,01 <sup>o</sup>	13,52±0,54 <sup>o</sup>	288,33±9,02 <sup>a</sup>	527,91±7,09 <sup>e</sup>
16	SHB57	0,54±0,02 <sup>k</sup>	18,48±0,56 <sup>l</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	299,00±22,26 <sup>kl</sup>
17	NHA21	0,27±0,01 <sup>s</sup>	6,69±1,04 <sup>rst</sup>	239,67±3,06 <sup>bcd</sup>	672,33±7,37 <sup>bc</sup>
18	SHA21	0,76±0,01 <sup>f</sup>	7,79±0,37 <sup>f</sup>	259,33±7,57 <sup>abc</sup>	579,57±9,50 <sup>d</sup>
19	NHA15	1,24±0,03 <sup>c</sup>	25,36±0,57 <sup>h</sup>	212,00±10,58 <sup>de</sup>	422,00±8,54 <sup>h</sup>
20	MHA59	0,22±0,00 <sup>t</sup>	25,90±0,44 <sup>gh</sup>	185,67±6,11 <sup>e</sup>	447,95±5,58 <sup>g</sup>
21	MHB56	0,56±0,01 <sup>j</sup>	41,59±0,52 <sup>f</sup>	209,33±11,02 <sup>de</sup>	320,91±1,15 <sup>jk</sup>
22	SMA4	0,03±0,00 <sup>y</sup>	5,69±0,14 <sup>stu</sup>	134,00±6,00 <sup>f</sup>	646,71±6,60 <sup>c</sup>
23	MHA30	0,38±0,01 <sup>n</sup>	21,73±1,19 <sup>j</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	281,29±6,71 <sup>lm</sup>
24	NHC12	0,75±0,01 <sup>f</sup>	8,01±0,91 <sup>r</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	572,05±5,56 <sup>d</sup>
25	NHA23	0,41±0,01 <sup>m</sup>	19,67±0,87 <sup>k</sup>	226,00±6,25 <sup>cd</sup>	285,00±1,73 <sup>lm</sup>
26	SHB93	0,78±0,01 <sup>e</sup>	7,21±0,53 <sup>f</sup>	212,67±9,07 <sup>de</sup>	570,63±2,66 <sup>d</sup>
27	MHB51	0,01±0,00 <sup>z</sup>	11,35±0,53 <sup>p</sup>	190,00±2,65 <sup>e</sup>	679,86±8,37 <sup>b</sup>
28	NHA20A	0,02±0,00 <sup>yz</sup>	20,75±0,07 <sup>jk</sup>	287,33±6,51 <sup>a</sup>	660,62±8,18 <sup>bc</sup>
29	NHA68	0,16±0,00 <sup>v</sup>	19,98±0,91 <sup>k</sup>	285,33±7,77 <sup>a</sup>	804,67±4,04 <sup>a</sup>
30	NHA78	2,19±0,01 <sup>ab</sup>	17,42±0,90 <sup>m</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	483,05±5,27 <sup>f</sup>
31	NHA66	0,01±0,00 <sup>z</sup>	14,80±0,25 <sup>no</sup>	205,00±9,54 <sup>de</sup>	364,47±4,08 <sup>i</sup>
32	NHB9	0,11±0,00 <sup>w</sup>	26,84±0,21 <sup>g</sup>	0,00±0,00 <sup>g</sup>	224,71±3,98 <sup>n</sup>
33	NMA27	2,43±0,03 <sup>a</sup>	23,57±0,27 <sup>i</sup>	211,67±7,10 <sup>de</sup>	320,95±4,65 <sup>jk</sup>
34	NMA14	0,05±0,00 <sup>x</sup>	20,59±0,41 <sup>jk</sup>	286,67±5,51 <sup>a</sup>	522,04±18,15 <sup>e</sup>
35	NHB19	0,17±0,01 <sup>v</sup>	10,10±0,76 <sup>q</sup>	257,67±6,11 <sup>abc</sup>	490,38±10,00 <sup>f</sup>

ARA : l'activité de réduction de l'acétylène, AIA : la production de l'acide indole acétique, ES : efficacité de solubilisation, P : la solubilisation du phosphate, a, b, c... : groupes homogènes

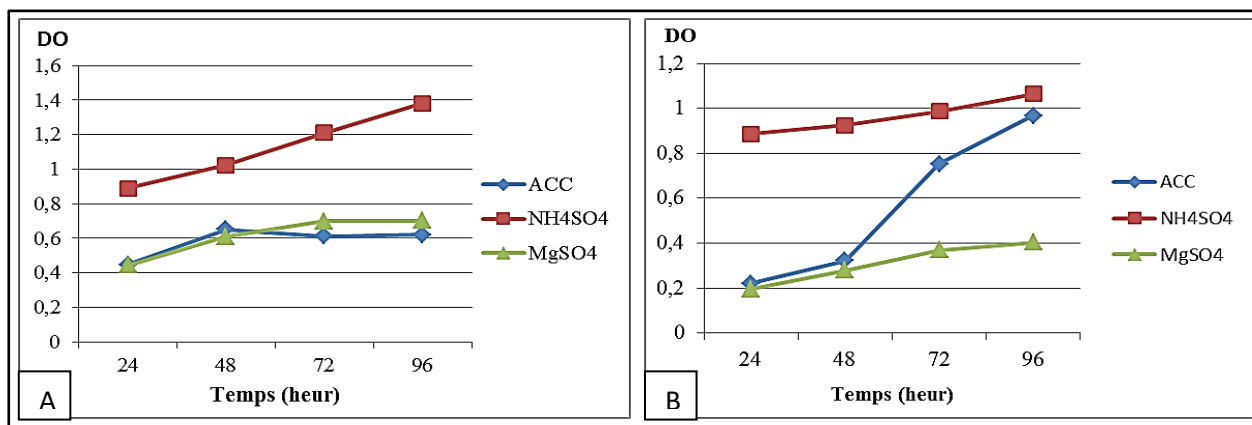
Dans la même colonne, les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Newman-Keuls.

### III.2.4. Production de l'ACC désaminase

La présence de l'activité amino-cyclopropane carboxylate désaminase a été recherchée par la mise en évidence de la capacité des isolats bactériens à croître sur des milieux contenant l'ACC comme seule source d'azote. Selon la méthode décrite par [Jacobson et al., \(1994\)](#), la croissance d'isolats microbiens ensemencés dans des milieux renfermant deux sources d'azote organiques : l'ACC et le sulfate d'ammonium et une source minérale le sulfate de magnésium a été estimée selon leur taux de croissance.

L'estimation de la croissance par la lecture de la densité optique pendant 96h d'incubation a montré que parmi les 35 isolats testés, 60 % ont la capacité de se développer sur le milieu DF additionné d'ACC ou le sulfate d'ammonium (Témoin positif) (Tableau III.4, Figure III.19). Le milieu minimal DF sans source d'azote a été utilisé comme témoin négatif.

La capacité de croissance des isolats sur ces milieux spécifiques traduit le plus souvent la présence chez ces microorganismes de l'enzyme ACC désaminase responsable de l'abaissement du niveau d'éthylène au niveau de la rhizosphère des plantes en métabolisant l'ACC, un précurseur de l'éthylène.



**Figure III.19.** Métabolisme de l'ACC par les isolats bactériens.

A: SMA4 (négatif), B: NMA14 (positif).

### III.2.5. Production des sidérophores

La production des sidérophores a été évaluée sur le milieu CAS après 4 jours d'incubation à 30°C, le virement de la couleur bleu vers l'orange autour des colonies indique la production des sidérophores (Figure III.20 A).

Les résultats obtenus montrent que 14% des isolats (MHC9, NHB9, SHB57, NHA23 et NMA14) n'étaient pas capables de produire les sidérophores sur le milieu CAS, le reste des isolats ont montré des activités variables traduites par des diamètres d'halos variables

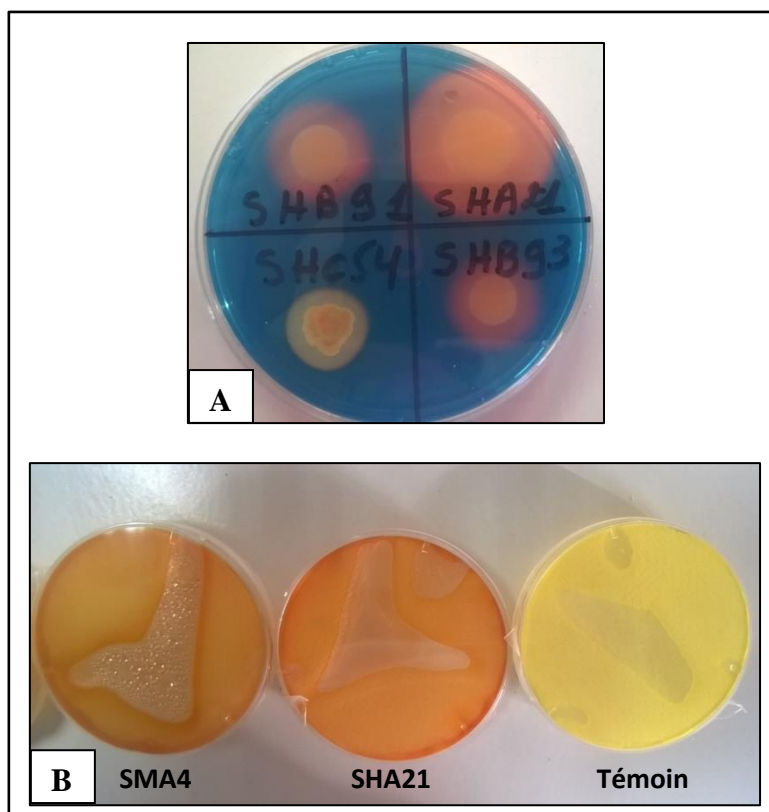
entourant les colonies des bactéries productrices (Tableau III.4). Selon Dimkpa *et al.*, (2008), Ces dernières ont été classées en trois groupes.

Le premier groupe est représenté par des isolats à faible production (+), où ils ont des halos dont le diamètre est inférieur à dix millimètres, ce groupe comprend 34% des isolats. Le deuxième groupe composé d'isolats (22%) ayant des diamètres des halos entre dix et vingt millimètres. Le dernier groupe est représenté par 28,5% des isolats ayant montré de diamètres d'halos supérieurs à vingt millimètres, et de ce fait considérés comme producteurs majeurs de siderophores.

### III.2.6. Production de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et de l'acide cyanhydrique (HCN)

Le virement de la couleur jaune vers la couleur marron sur l'eau peptonée exempte d'indole après l'ajout du réactif de Nessler a été observé chez la totalité des isolats traduisant la production de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) par l'ensemble des isolats testés (Tableau III.4).

Contrairement à cela l'acide cyanhydrique (HCN) n'a été détecté que chez un nombre réduit de bactéries testées (SMA4, SHA21) (Tableau III.4, Figure III.20.B).



**Figure III.20.** Production des siderophores et de l'acide cyanhydrique par les isolats bactériens.

**A** : la production des siderophores, **B** : la production de l'HCN.

Tableau III.4. Activités PGP des isolats testés.

	Isolat	Métabolisme de l'ACC	Production des sidérophores	Production de l'H <sub>2</sub> CN	Production de l'ammoniac
1	NHA13	+	+	-	+
2	MHA24	+	+++	-	+
3	BHA10	-	+	-	+
4	BHA0	-	+	-	+
5	NHA19	+	++	-	+
6	NHA79	+	+++	-	+
7	NMB8	+	+++	-	+
8	NHA67	-	+	-	+
9	BHA62	-	+	-	+
10	SHB91	-	++	-	+
11	SHB54	-	+	-	+
12	MHB62	+	+	-	+
13	MHC9	-	-	-	+
14	MHC54	+	+++	-	+
15	MHB52	+	+	-	+
16	SHB57	-	-	-	+
17	NHA21	+	+++	-	+
18	SHA21	+	+++	+	+
19	NHA15	+	+++	-	+
20	MHA59	-	+	-	+
21	MHB56	-	++	-	+
22	SMA4	-	+++	+	+
23	MHA30	+	+++	-	+
24	NHC12	+	+	-	+
25	NHA23	-	-	-	+
26	SHB93	+	++	-	+
27	MHB51	-	+	-	+
28	NHA20A	+	+	-	+
29	NHA68	-	++	-	+
30	NHA78	+	++	-	+
31	NHA66	+	++	-	+
32	NHB9	+	-	-	+
33	NMA27	+	+++	-	+
34	NMA14	+	-	-	+
35	NHB19	+	++	-	+

- :négatif, + :positif/ faible production, ++ :moyenne production, +++ :forte production

### III.2.7. Sélection des isolats pour le test *in planta* et analyse en composantes principales (ACP)

Pour la sélection des isolats performants parmi la totalité des diazotrophes isolés, une analyse en composantes principales a été faite pour mieux comparer entre les activités PGP, ainsi que le comportement de chacun des individus vis-à-vis les activités PGP.

L'ACP a été réalisée pour étudier les paramètres suivants : la fixation de l'azote (ARA), la production de l'acide indole acétique (AIA), la solubilisation du phosphate (P), le métabolisme de l'ACC (ACC) et la production des sidérophores (SDR).

Selon la matrice obtenue des variables (Figure III.21), plusieurs observations peuvent être relevées:

- Selon la première composante principale, une variabilité de 38% a été enregistrée où les trois paramètres suivants sont bien représentés : ARA, ACC et sidérophore avec des coordonnées dans le cercle de corrélation de 0,73 - 0,62 et 0,82 respectivement. En effet, les coordonnées dans le cercle de corrélation des paramètres AIA et phosphate sont 0,49 et 0,31 respectivement ce qui signifie qu'il existe une moyenne représentation sur le facteur 1 pour l'AIA et une faible représentation pour le paramètre phosphate.
- Il y a une variabilité de 24% selon la deuxième composante principale dans laquelle les deux paramètres AIA et phosphate sont bien représentés mais avec une corrélation négative entre eux.

L'étude des corrélations entre les différentes activités par le coefficient de corrélation de Pearson indique qu'il existe trois corrélations significatives faibles: entre IAA et ARA (0,34), entre ARA et sidérophores (0,40) et entre sidérophores et ACC (0,38). Pour les autres activités, les corrélations entre elles sont non significatives (Tableau III.5).

**Tableau III.5.** Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes activités PGP.

	IAA	ARA	Phosphate	ACC	sidérophores
IAA	1	<b>0,34</b>	-0,08	0,01	0,26
ARA	<b>0,34</b>	1	0,00	0,28	<b>0,40</b>
Phosphate	-0,08	0,00	1	0,13	0,29
ACC	0,01	0,28	0,13	1	<b>0,38</b>
sidérophores	0,26	<b>0,40</b>	0,29	<b>0,38</b>	1

*En gras, valeurs significatives au seuil alpha=0,05*

D'après la représentation des nuages des individus dans la figure III.22, il apparaît qu'il existe trois groupes des isolats ayant des comportements similaires.

Les individus du premier groupe possèdent le maximum de différentes activités comparés, ce groupe comprend les isolats : MHC54, NMB8, NMA27, NHA15, NHA78, et NHA79. Ils sont bien représentés sur le premier axe (facteur 1), par contre, ils sont moins représentés sur le deuxième axe sauf pour l'isolat NHA79 qui est bien représenté négativement sur ce dernier.

Le deuxième groupe comprend les isolats NHA21, SHA21, SHB93, NHA20A, SMA4, NHA68 et NHA19, les individus de ce groupe ont les meilleurs taux de solubilisation du phosphate. De plus, ils sont bien représentés sur le deuxième axe tandis qu'ils sont faiblement représentés sur le premier où ils ne sont pas représentés, comme les isolats NHA68, SMA4 et NHA20A.

Le troisième groupe comprend le reste des isolats, ces individus sont les moins actifs comme indiquent leurs positions sur la figure III.22 loin des axes des différents paramètres.

Par conséquent, les isolats qui ont été sélectionnés d'être utilisés dans la partie suivante de cette étude font partie des isolats du premier groupe (MHC54, NMB8, NMA27, NHA15 et NHA78). En outre, l'isolat NHA79 fait partie du premier groupe mais il n'a pas été sélectionné, car, à l'inverse des autres, il est bien représenté négativement sur le deuxième axe cela signifie qu'il a une très faible activité de solubilisation du phosphate.

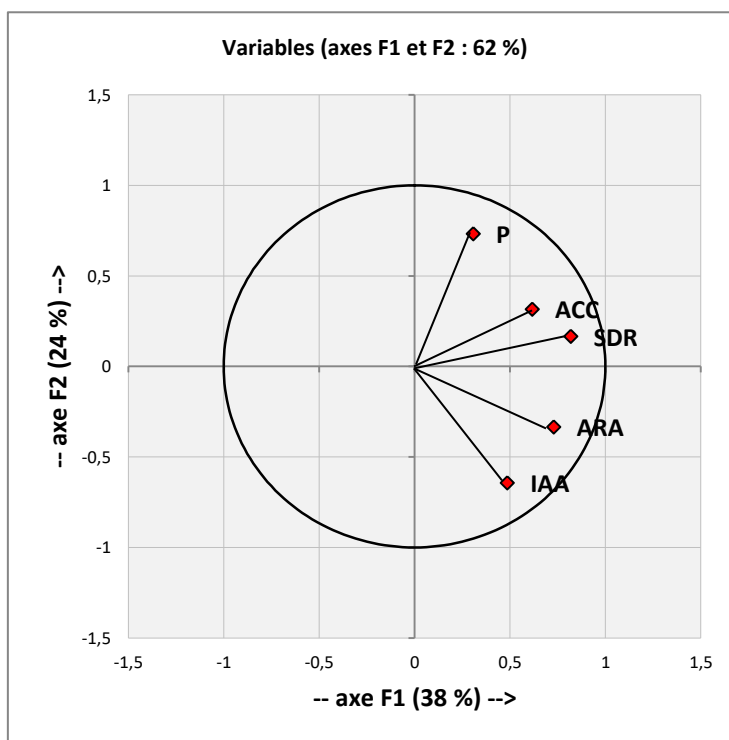
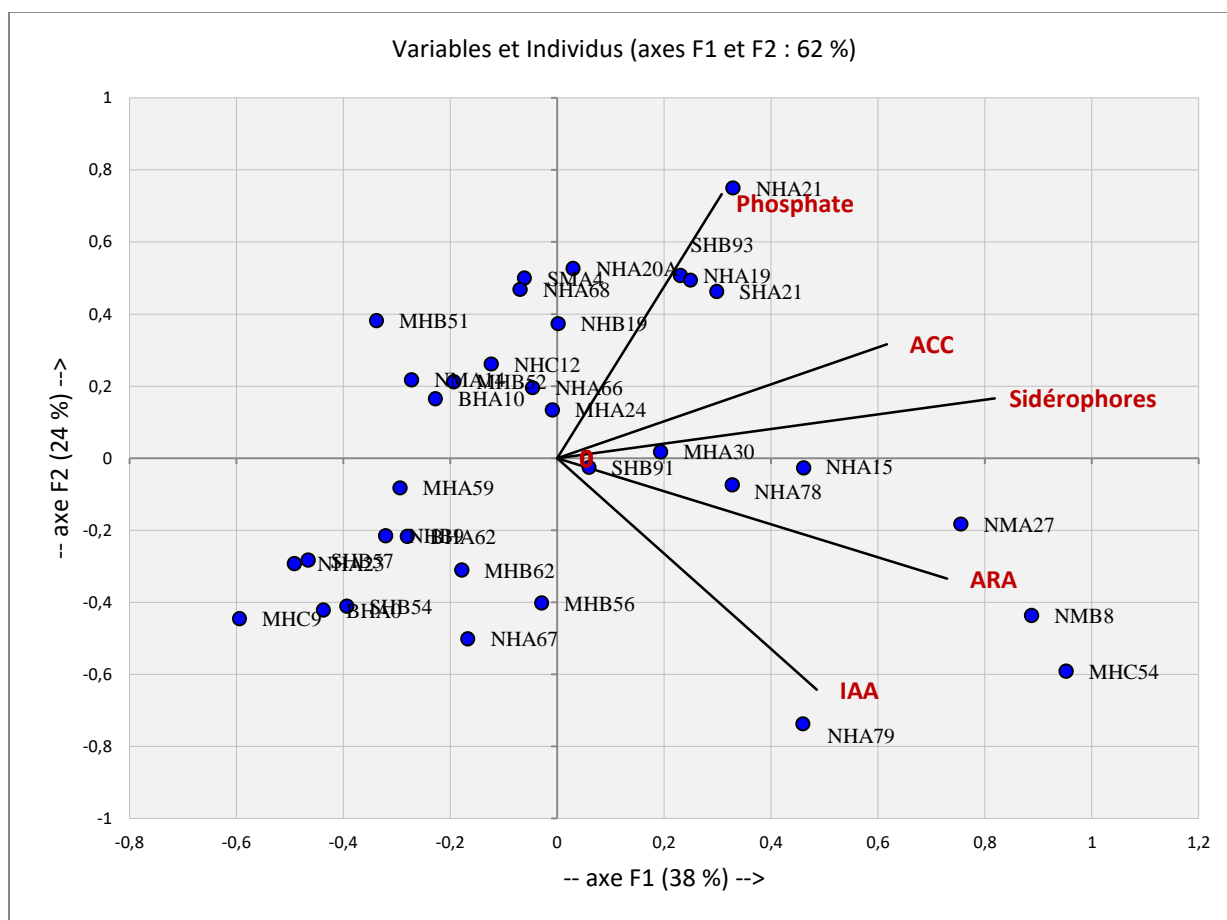


Figure III.21. Représentation des Coordonnées des paramètres PGP.



**Figure III.22.** Représentation des Coordonnées des individus (des isolats).

### III.2.8. Discussion

De nombreux chercheurs dans le monde ont rapporté différents mécanismes pour expliquer le pouvoir des PGPR à stimuler la croissance des plantes et pour les protéger contre les agents pathogènes en agriculture (Laslo *et al.*, 2012; Mavrodi *et al.*, 2012). La fixation d'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphate, la production des phytohormones (l'acide indole acétique) et la production des sidérophores sont autant de processus biochimiques les plus souvent cités comme les principaux mécanismes utilisés par les PGPR pour améliorer la production du rendement des cultures (Venieraki *et al.*, 2011).

Divers genres trouvés dans la rhizosphère de différentes plantes ont été étudiés tels que *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Rhodococcus* et *Xanthomonas*, (Beneduzi *et al.*, 2008; Hanna *et al.*, 2013).

La fixation d'azote est une propriété importante des PGPR qui influe considérablement la croissance des plantes. Elle est considérée comme l'un des principaux mécanismes directs par lequel la plante bénéficie de l'azote atmosphérique à travers l'association microbienne. L'un des avantages que fournissent les bactéries diazotrophes aux plantes est l'azote fixé en échange du carbone libéré sous forme d'exsudats racinaires. Cette activité est liée à l'existence du gène *nif H* présent chez l'ensemble des bactéries diazotrophes à Gram négatif (Döbereiner et Day, 1976).

L'isolement sur des milieux de culture sélectifs exempts d'azote et le test de réduction de l'acétylène ont été utilisés pour la mise en évidence de ce caractère chez les différents isolats diazotrophiques décrits dans la présente étude.

L'ensemble des bactéries étudiées ont été capable de croître sur l'un des trois milieux spécifiques utilisés ce qui démontre leur potentiel d'utilisation d'azote atmosphérique. Le test de réduction de l'acétylène (test ARA) est une méthode indirecte spécifique pour suivre l'activité de la nitrogénase fonctionnelle, et par conséquent représente un indicateur du potentiel de fixation de l'azote atmosphérique (Andrade *et al.*, 1997).

Nous avons pu démontrer un pouvoir de fixation d'azote variable chez la grande majorité des isolats. Parmi ceux-ci, six isolats (NHA13, NMB8, BHA62, MHC54, NHA78 et NMA27) ont démontré une activité réductrice importante de l'acétylène allant de  $2,05 \pm 0,03$  à  $2,48 \pm 0,00$  nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h. Diverses espèces microbiennes ont été ainsi identifiées telles que *Enterobacter aerogenes*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus megaterium*. Des résultats similaires sur l'efficacité de fixation d'azote chez les isolats appartenant aux genres, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* ont été rapportés par plusieurs auteurs (Fayez, 1990; Rosales *et al.*, 1993; McInroy et Kloepper, 1995; Park *et al.*, 2005).

Des bactéries qui sont négatives pour le test de réduction de l'acétylène et qu'elles avaient déjà poussé sur un milieu exempt d'azote, ont été trouvés dans l'étude de Ribbe *et al.*, (1997). Un résultat similaire a également été observé dans notre étude dans le cas de l'isolat NHA67. Apparemment, ces non-diazotrophes pourraient être capteurs d'azote ou oligotrophes, croissantes sur l'azote fixé et libéré par les autres diazotrophes au cours de leur croissance (Tripathi *et al.*, 2002). Dans les travaux de James (2000), environ 90% des bactéries isolées à partir des plants de riz en utilisant des milieux de culture exempt d'azote se sont révélés être des non-diazotrophes. Par contre dans notre étude, parmi les isolats testés par le test de réduction de l'acétylène seul un isolat s'est révélé non diazotrophe.

La production de l'ammoniac est considérée parfois comme une activité indicatrice de la capacité des bactéries à métaboliser les sources d'azote disponibles et de ce fait elle est recherchée chez les PGPR. Ce caractère a été détecté chez l'ensemble des isolats testés, ces résultats sont comparables à ceux rapportés par [Ahmad \*et al.\*, \(2008\)](#) et [Haruna \*et al.\*, \(2008\)](#).

Le phosphore est le deuxième nutriment le plus important pour les plantes après l'azote. Il représente environ 0,2% du poids sec des plantes, en outre il est considéré comme un constituant essentiel des acides nucléiques et des phospholipides ([Nisha \*et al.\*, 2014](#)). Il existe dans le sol sous forme de sels minéraux ou incorporé dans des composés organiques. Malgré le fait que ces composés de phosphore soient abondants dans les sols agricoles, la majorité d'entre eux sont présentes sous une forme insoluble. Plusieurs rapports ont indiqué que différentes espèces bactériennes, en particulier les bactéries colonisatrices de la rhizosphère, ont la capacité de libérer des phosphates organiques ou de solubiliser des composés phosphorés inorganiques insolubles tels que le phosphate tricalcique, le phosphate dicalcique, l'hydroxyapatite et le phosphate rocheux. Ces bactéries mettent à la disposition des plantes les phosphates solubles, et en retour, ces plantes libèrent des composés carbonés, principalement des sucres et des acides organiques, nécessaires à la croissance bactérienne ([El-Azeem \*et al.\*, 2007](#); [Khan \*et al.\*, 2009](#)).

Il est estimé que les bactéries solubilisant le phosphate représentent 20 à 40% des bactéries de la rhizosphère ([Gupta \*et al.\*, 1998](#)). Dans notre étude, la mise en évidence de la solubilisation du phosphate par la culture des 296 isolats sur le milieu PVK a pu démontrer la capacité de 51% des isolats à solubiliser le phosphate à des degrés variables. La richesse de la rhizosphère en bactéries solubilisant le phosphate est bien établie ([Beneduzi \*et al.\*, 2008](#); [Hameeda \*et al.\*, 2008](#)). Plusieurs genres bactériens : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Enterobacter*, ont été déjà rapportés comme agents de solubilisation du phosphate ([Frey-Klett \*et al.\*, 2005](#); [Hameeda \*et al.\*, 2008](#)). Des concentrations importantes (>400µg/ml) de phosphate soluble ont été libérées par la majorité des isolats testés. Cela traduit clairement la capacité potentielle de biofertilisation de ces isolats. Les résultats de l'activité de solubilisation du phosphate par les rhizobactéries sont parfois très difficiles à comparer suite à la différence des méthodes utilisées. Des bactéries parfois très actives en milieu solides peuvent montrer des activités négligeables en milieu liquide et vice versa, C'est par exemple le cas de l'isolat MHA24 qui n'a pas montré une zone claire autour de la colonie, mais qui a montré un taux de  $337,91 \pm 5,24$  µg/ml de phosphore soluble en le milieu NBRIP. Selon plusieurs auteurs cet état est probablement dû à la différence des taux de diffusion des

différents acides organiques impliqués dans la solubilisation du phosphate (Gupta *et al.*, 1998; Baig *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

Les phytohormones spécialement les auxines contrôlent plusieurs étapes du développement et de la croissance des plantes. L'acide Indole acétique (AIA) est une auxine membre de cette famille. En plus de sa production dans les tissus végétaux, sa synthèse est très répandue chez les microorganismes notamment les bactéries associées aux plantes (Patten et Glick, 2002). Il est supposé que 80% des bactéries rhizosphériques peut produire des substances favorisant la croissance des plantes (Patten et Glick, 1996). En outre, les sols salins sont également considérés comme une source riche de bactéries productrices de l'acide indole acétique puisque 75% parmi elles ont la capacité d'en produire (Johri *et al.*, 2003). Ces rapports sont en accord avec les résultats obtenus dans notre étude où 68,82% des 296 isolats étaient producteurs de l'AIA avec des concentrations variant de  $3,35 \pm 0,28$  à  $74,81 \pm 0,94$   $\mu\text{g/ml}$ . Cette production de l'AIA par les PGPR est considérée comme très suffisante pour les besoins de la croissance des plantes. Des isolats appartenant à des espèces telles que *Enterobacter aerogens*, *klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas fluorescens* ont été parmi les meilleurs producteurs de l'AIA dans notre étude. Cette variabilité dans la capacité de production a été déjà signalée par plusieurs études (Quadt-Hallmann et Kloepper, 1996; Abbasi *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2014).

Des travaux similaires ont rapporté que la production d'AIA est présente chez une grande majorité d'espèces microbiennes associées à la rhizosphère de plusieurs plantes. Les concentrations produites varient considérablement d'une espèce à l'autre et au sein de la même espèce. La production de l'AIA par des souches de *Bacillus* et *Enterobacter* a été rapporté précédemment par (Mehnaz *et al.*, 2001; Sajjad Mirza *et al.*, 2001; Vessey, 2003; Kumar *et al.*, 2011). Des taux moins élevés que les taux rapportés dans cette étude ont été obtenus par Malik *et al.*, (1997) et Suckstorff et Berg (2003).

Le fer est le quatrième élément le plus abondant sur terre. Malheureusement, cette quantité de fer est sous forme d'ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) très peu insolubles dans les pH neutre et alcalin et par conséquent non disponible pour les organismes vivants (bactéries, plantes, etc.). Pour contourner cette difficulté et fournir aux plantes du fer assimilables, les rhizobactéries ont développé diverses stratégies d'absorption du fer pour s'adapter et survivre à leur environnement par la production des sidérophores (Ammari et Mengel, 2006).

Les siderophores sont des molécules chélatrices 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. Parmi nos 296 isolats, 39,45% étaient producteurs des sidérophores. Les isolats producteurs appartiennent à diverse espèces microbiennes. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Haas et Defago (2005) et Thakur *et al.*, (2017), qui ont montré que les sidérophores sont largement répandus chez les rhizobactéries principalement les *Pseudomonas* fluorescents.

L'éthylène est une phytohormone produite naturellement par les plantes à partir de l'acide amino cyclopropane carboxylique (ACC), il est connu également sous le nom d'hormone de stress de la plante. En présence de concentrations élevées, il a un effet nuisible sur les plantes, où il provoque l'abscission des feuilles, la sénescence foliaire, la chlorose et le flétrissement des fleurs... etc. Plusieurs PGPR possèdent la capacité de produire l'enzyme ACC désaminase (EC 4.1.99.4) qui dégrade l'ACC empêchant ainsi sa conversion en éthylène (Arshad *et al.*, 2007).

La plante qui survit sous stress abiotique produit des volumes plus importants d'ACC qui est clivé en ammoniac et en  $\alpha$ -cétobutyrate par l'ACC désaminase bactérienne, ce qui limite la production de l'éthylène (Glick et Penrose, 1998; Arshad *et al.*, 2007). Parmi les 35 isolats sélectionnés et testés pour l'activité ACC désaminase, 45% ont montré la présence d'une activité ACC désaminase. Cette activité a été mise en évidence chez plusieurs genres différents notamment les isolats appartenant au genre *Stenotrophomonas* à l'exception de l'isolat NHA20A. Glick (2014) a mis en évidence le rôle joué par les PGPR productrices d'ACC désaminase dans la promotion de la croissance des plantes en constatant que leur présence dans la rhizosphère peut réduire les quantités d'éthylène ce qui permet à la plante de résister aux conditions de stress. Des résultats similaires ont été rapportés par Ali *et al.*, (2014) qui ont montré que les PGPR productrices de l'ACC désaminase exercent un effet de protection hautement significatif contre le stress généré chez les plantes par la température, la sécheresse, la salinité et les métaux lourds.

Plusieurs genres bactériens ont été rapportés comme des PGPR productrices d'ACC désaminase tels que *Pseudomonas* (Saravanakumar et Samiyappan, 2006), *Bacillus* (Bal *et al.*, 2013) et *Enterobacter* (Singh et Jha, 2016a), la production de l'ACC désaminase par l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia* est très peu rapportée.

La production de l'HCN peut jouer un rôle essentiel dans la lutte contre les maladies fongiques chez les semis de blé (Flaishman *et al.*, 1996). Dans la présente étude, la production de cette substance a été enregistrée chez seulement 5 % des isolats testés. Cette faible valeur est presque similaire à celle rapportée par Bouznad (2016) qui a enregistré la production d'acide cyanhydrique chez 15% des isolats testés, alors que d'autres recherches rapportent

une production d'HCN présente chez un grand nombre (>50%) de bactéries de la rhizosphère (Bakker et schippers, 1987; Verma *et al.*, 2016; Paramanandham *et al.*, 2017).

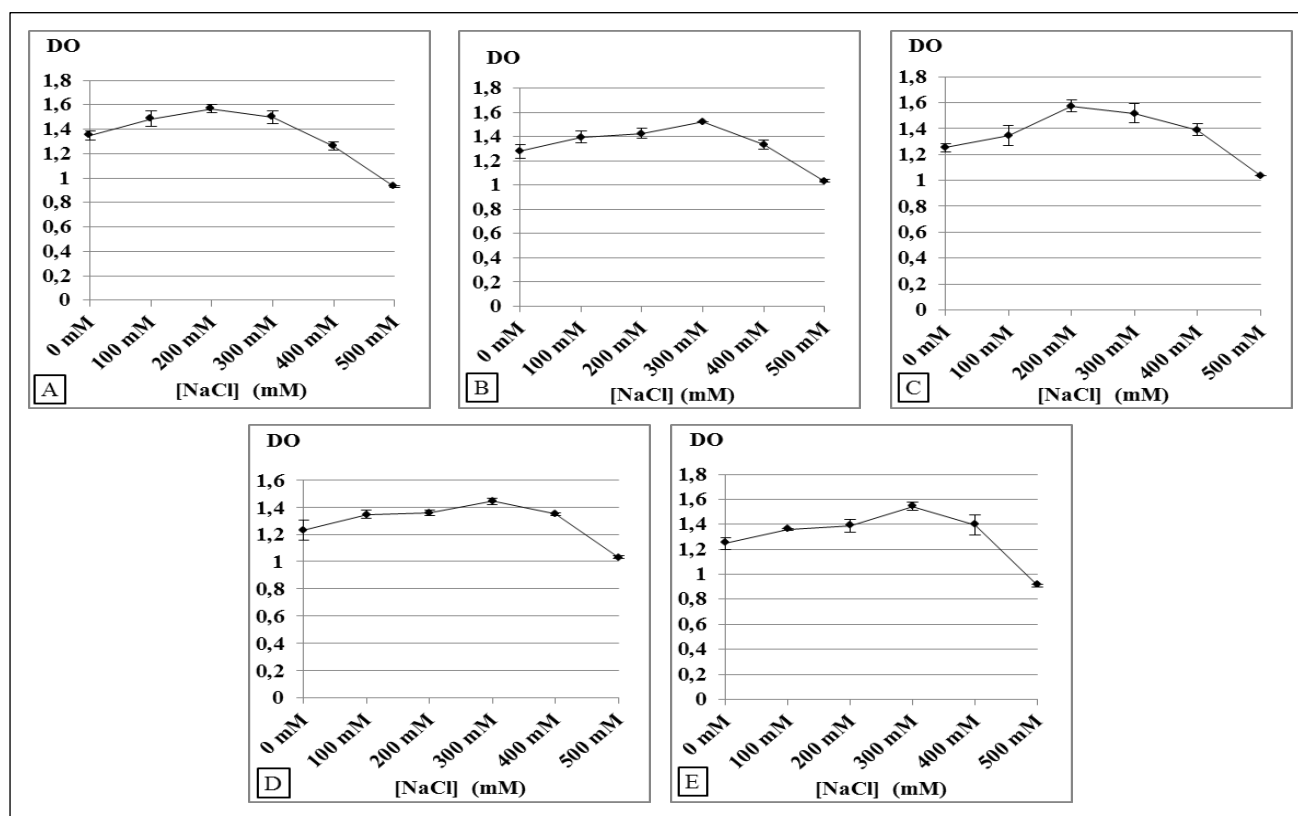
Les résultats expérimentaux présentés ici montrent la probabilité d'utilisation de ces PGPR pour l'amélioration de la croissance et le rendement du blé, qui est la plus importante culture de base du monde.

### III.3. Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination et la croissance du blé dur sous stress salin

#### III.3.1. Effet du stress salin sur la survie et la croissance des isolats sélectionnés

L'étude de la tolérance des isolats au sel ainsi que l'expression de quelques activités PGP sous stress salin a été réalisée par la croissance des isolats dans un bouillon nutritif additionné de concentrations croissantes de NaCl (0, 100, 200, 300, 400 et 500 mM). L'évaluation de la croissance bactérienne a été faite par la mesure de la densité optique à 620 nm après 48 heures d'incubation.

L'analyse statistique des résultats de la croissance bactérienne a révélé la présence d'un effet significatif de la variation des concentrations de sel dans le milieu (Annexe VIII). Il est de même enregistré une tolérance satisfaisante des isolats au sel même à des concentrations équivalentes à 500 mM. Les taux de croissance maximale ont été détectés avec des concentrations élevées entre 200 et 300 mM du NaCl (Figure III.23, Tableau III.6)



**Figure III.23.** Effet du stress salin sur la croissance des isolats sélectionnés.

A : l'isolat NHA15, B : l'isolat MHC54, C : l'isolat NHA78, D : l'isolat NMB8, E : l'isolat NMA27.

### **III.3.2. Effet du stress salin sur l'expression des activités liées à la promotion de la croissance des plantes (PGP)**

Compte tenu des conditions de stress salin utilisées au cours des expérimentations de culture de blé à la fin de notre expérimentation, il a été jugé nécessaire de tester le comportement des isolats sélectionnés vis-à-vis du stress salin en fonction de leur capacité à produire certains métabolites liés à leur pouvoir de promotion de la croissance des plantes. L'analyse des résultats obtenus, présentés dans les figures III.24, 25, 26 ainsi que le tableau III.6 montrent que tous les paramètres testés ont été influencés par la salinité avec un effet hautement significatif (Annexe VIII).

#### **III.3.2.1. Effet du stress salin sur la capacité de fixation de l'azote**

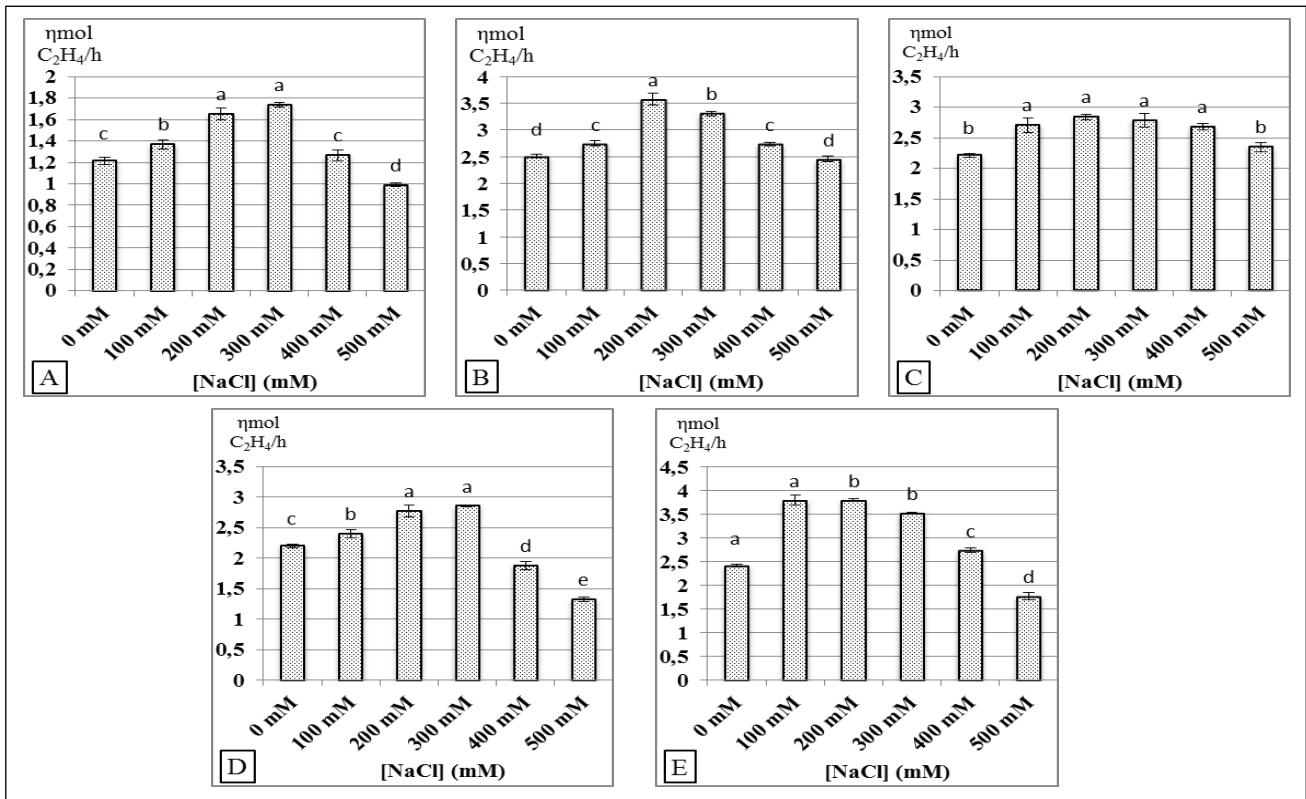
Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la concentration du sel entre 100 et 300 mM engendre une légère augmentation des quantités de l'azote fixées pour les cinq isolats (Figure III.24, Tableau III.6), au-delà de ces concentrations une diminution de l'activité fixatrice a été observée chez les cinq isolats sélectionnés. Les isolats NHA15 et NMB8 ont montré des valeurs maximales de fixation en présence des concentrations de sel équivalentes à 300 mM.

#### **III.3.2.2. Effet du stress salin sur la production de l'acide indole acétique (AIA)**

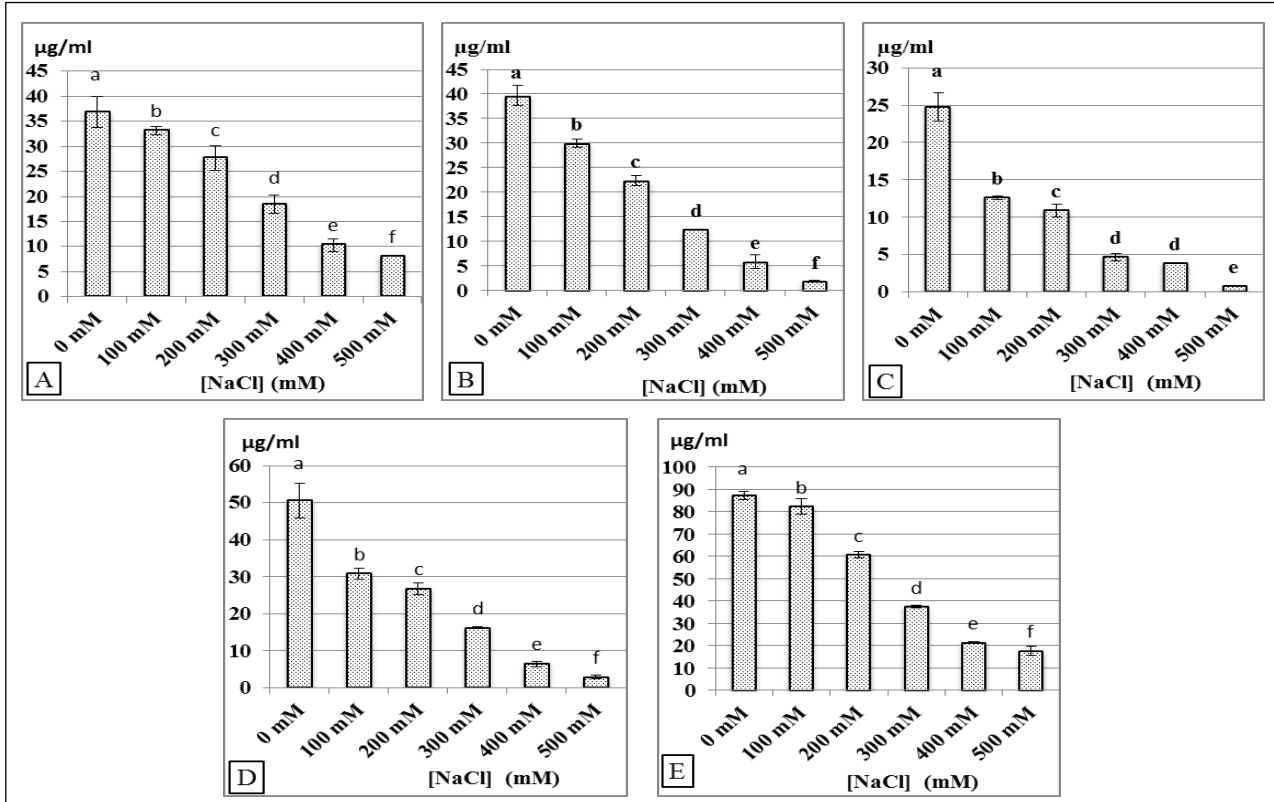
Des quantités variables d'AIA ont été produites par les isolats bactériens sous stress salin. Une diminution générale des taux de production de l'AIA produit par les isolats bactériens a été observée avec l'augmentation des concentrations du NaCl. Des quantités relativement appréciables d'AIA ont été obtenues en présence de concentrations de NaCl entre 100 et 200 mM (Figure III.25, Tableau III.6). L'augmentation de la concentration de NaCl à 300 mM provoque une diminution importante de la production pour tous les isolats bactériens.

#### **III.3.2.3. Effet du stress salin sur la solubilisation du phosphate**

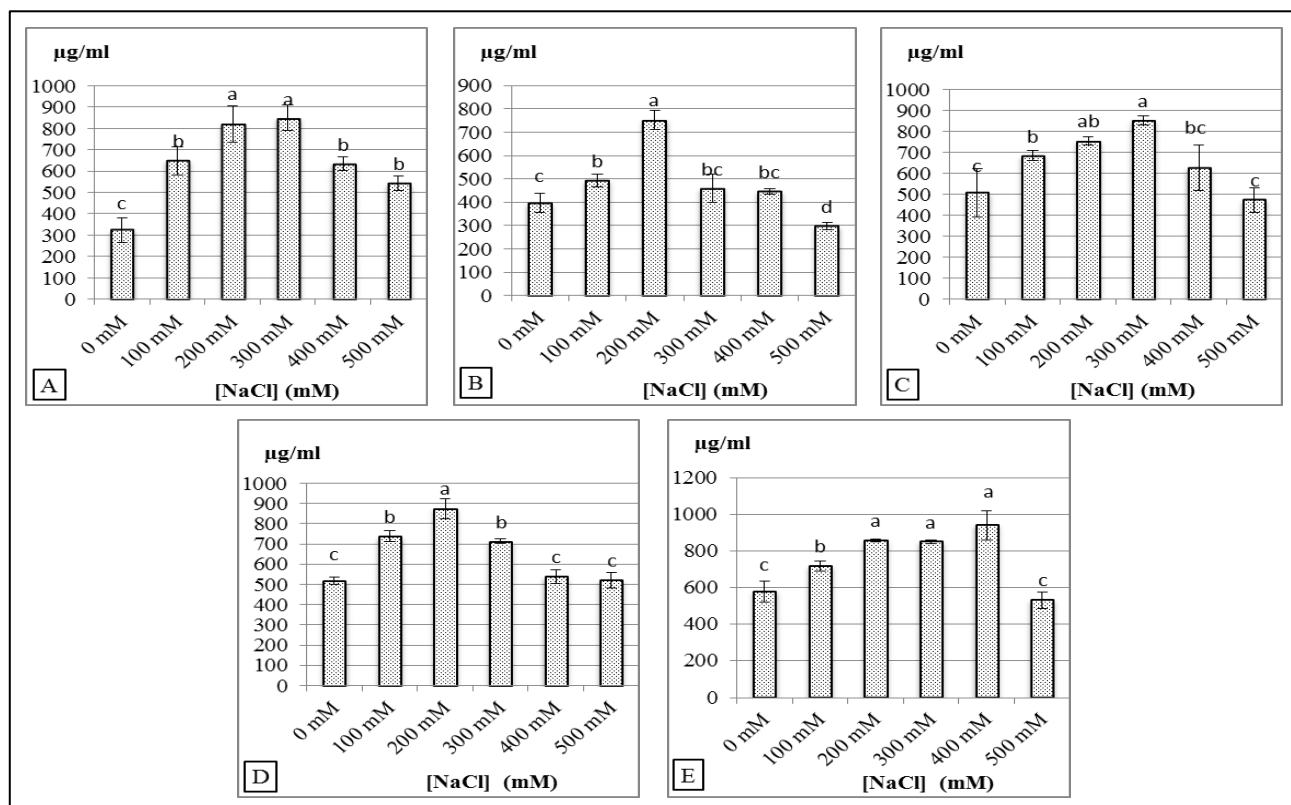
Les résultats de l'effet du stress salin sur la capacité des isolats à solubiliser le phosphate inorganique sont présentés dans la figure III.26. L'analyse statistique des résultats a montré la présence d'un effet significatif de la variation de la concentration du NaCl sur les quantités de phosphore libre dans le milieu. Les cinq isolats testés ont montré des activités maximales de solubilisation entre 100 mM et 300 mM à l'exception de l'isolat NMA27 qui a montré une activité maximale en présence d'une concentration de NaCl équivalente à 400 mM. Une faible diminution de taux de solubilisation a été enregistrée chez tous les isolats bactériens à une concentration de 500 mM du NaCl (Figure III.26, Tableau III.6).



**Figure III.24.** Effet du stress salin sur la réduction de l'acétylène par les isolats sélectionnés. A : l'isolat NHA15, B : l'isolat MHC54, C : l'isolat NHA78, D : l'isolat NMB8, E : l'isolat NMA27.



**Figure III.25.** Effet du stress salin sur la production de l'AIA par les isolats sélectionnés. A : l'isolat NHA15, B : l'isolat MHC54, C : l'isolat NHA78, D : l'isolat NMB8, E : l'isolat NMA27.



**Figure III.26.** Effet du stress salin sur la solubilisation du phosphate par les isolats sélectionnés.

**A :** l'isolat NHA15, **B :** l'isolat MHC54, **C :** l'isolat NHA78, **D :** l'isolat NMB8, **E :** l'isolat NMA27.

**Tableau III.6.** Effet du stress salin sur la croissance et les activités PGP des isolats sélectionnés.

Isolat	[NaCl]	Tolérance (DO <sub>620</sub> )	ARA (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h)	AIA (µg/ml)	Phosphate (µg/ml)
<b>NHA15</b>	0 mM	1,34±0,04 <sup>b</sup>	1,21±0,03 <sup>c</sup>	36,88±3,13 <sup>a</sup>	324,48±58,11 <sup>c</sup>
	100 mM	1,48±0,06 <sup>a</sup>	1,37±0,05 <sup>b</sup>	33,12±0,80 <sup>b</sup>	648,76±66,49 <sup>b</sup>
	200 mM	1,56±0,03 <sup>a</sup>	1,65±0,05 <sup>a</sup>	27,66±2,46 <sup>c</sup>	819,24±85,81 <sup>a</sup>
	300 mM	1,50±0,05 <sup>a</sup>	1,74±0,02 <sup>a</sup>	18,46±1,78 <sup>d</sup>	848,29±59,13 <sup>a</sup>
	400 mM	1,26±0,03 <sup>c</sup>	1,27±0,05 <sup>c</sup>	10,31±1,30 <sup>e</sup>	633,05±31,60 <sup>b</sup>
	500 mM	0,93±0,01 <sup>d</sup>	0,99±0,02 <sup>d</sup>	8,04±0,04 <sup>e</sup>	543,05±35,29 <sup>b</sup>
<b>MHC54</b>	0 mM	1,28±0,06 <sup>d</sup>	2,51±0,04 <sup>d</sup>	39,65±2,05 <sup>a</sup>	396,38±41,31 <sup>c</sup>
	100 mM	1,40±0,05 <sup>bc</sup>	2,75±0,05 <sup>c</sup>	29,98±0,88 <sup>b</sup>	493,52±27,64 <sup>b</sup>
	200 mM	1,43±0,04 <sup>b</sup>	3,58±0,11 <sup>a</sup>	22,40±1,01 <sup>c</sup>	752,57±42,86 <sup>a</sup>
	300 mM	1,52±0,00 <sup>a</sup>	3,31±0,04 <sup>b</sup>	12,38±0,08 <sup>d</sup>	459,24±62,14 <sup>bc</sup>
	400 mM	1,33±0,04 <sup>cd</sup>	2,73±0,03 <sup>c</sup>	5,79±1,39 <sup>e</sup>	445,57±10,64 <sup>bc</sup>
	500 mM	1,03±0,01 <sup>e</sup>	2,46±0,05 <sup>d</sup>	1,80±0,15 <sup>f</sup>	297,05±16,34 <sup>d</sup>
<b>NHA78</b>	0 mM	1,25±0,03 <sup>c</sup>	2,21±0,03 <sup>b</sup>	24,76±1,87 <sup>a</sup>	507,33±115,39 <sup>c</sup>
	100 mM	1,35±0,08 <sup>b</sup>	2,71±0,12 <sup>a</sup>	12,61±0,26 <sup>b</sup>	684,00±24,74 <sup>b</sup>
	200 mM	1,57±0,04 <sup>a</sup>	2,84±0,04 <sup>a</sup>	10,89±0,84 <sup>c</sup>	754,48±17,98 <sup>ab</sup>
	300 mM	1,52±0,07 <sup>a</sup>	2,79±0,11 <sup>a</sup>	4,64±0,47 <sup>d</sup>	853,43±21,18 <sup>a</sup>
	400 mM	1,39±0,04 <sup>b</sup>	2,69±0,05 <sup>a</sup>	3,80±0,02 <sup>d</sup>	625,91±107,69 <sup>bc</sup>
	500 mM	1,04±0,00 <sup>d</sup>	2,35±0,07 <sup>b</sup>	0,70±0,03 <sup>e</sup>	473,52±58,58 <sup>c</sup>
<b>NMB8</b>	0 mM	1,23±0,08 <sup>c</sup>	2,20±0,03 <sup>c</sup>	50,53±4,60 <sup>a</sup>	517,81±18,65 <sup>c</sup>
	100 mM	1,35±0,03 <sup>b</sup>	2,40±0,07 <sup>b</sup>	30,79±1,46 <sup>b</sup>	737,33±27,04 <sup>b</sup>
	200 mM	1,36±0,02 <sup>b</sup>	2,77±0,10 <sup>a</sup>	26,78±1,58 <sup>c</sup>	875,91±49,91 <sup>a</sup>
	300 mM	1,44±0,02 <sup>a</sup>	2,85±0,01 <sup>a</sup>	16,23±0,31 <sup>d</sup>	712,33±11,71 <sup>b</sup>
	400 mM	1,35±0,01 <sup>b</sup>	1,88±0,07 <sup>d</sup>	6,41±0,73 <sup>e</sup>	538,29±34,74 <sup>c</sup>
	500 mM	1,03±0,01 <sup>d</sup>	1,32±0,03 <sup>e</sup>	2,87±0,52 <sup>e</sup>	521,14±38,52 <sup>c</sup>
<b>NMA27</b>	0 mM	1,25±0,05 <sup>c</sup>	2,42±0,02 <sup>a</sup>	87,30±2,03 <sup>a</sup>	577,81±55,89 <sup>c</sup>
	100 mM	1,36±0,01 <sup>b</sup>	3,79±0,10 <sup>a</sup>	82,32±3,54 <sup>b</sup>	716,38±28,22 <sup>b</sup>
	200 mM	1,39±0,05 <sup>b</sup>	3,80±0,02 <sup>b</sup>	60,77±1,33 <sup>c</sup>	856,86±8,69 <sup>a</sup>
	300 mM	1,55±0,03 <sup>a</sup>	3,52±0,02 <sup>b</sup>	37,49±0,66 <sup>d</sup>	848,71±10,76 <sup>a</sup>
	400 mM	1,39±0,08 <sup>b</sup>	2,74±0,04 <sup>c</sup>	21,32±0,43 <sup>e</sup>	941,62±79,25 <sup>a</sup>
	500 mM	0,91±0,01 <sup>d</sup>	1,76±0,08 <sup>d</sup>	17,63±1,94 <sup>f</sup>	531,14±44,90 <sup>c</sup>

**ARA** : l'activité de réduction de l'acétylène, **AIA** : production de l'acide indole acétique, **P** : solubilisation du phosphate, **a, b, c...** : groupes homogènes

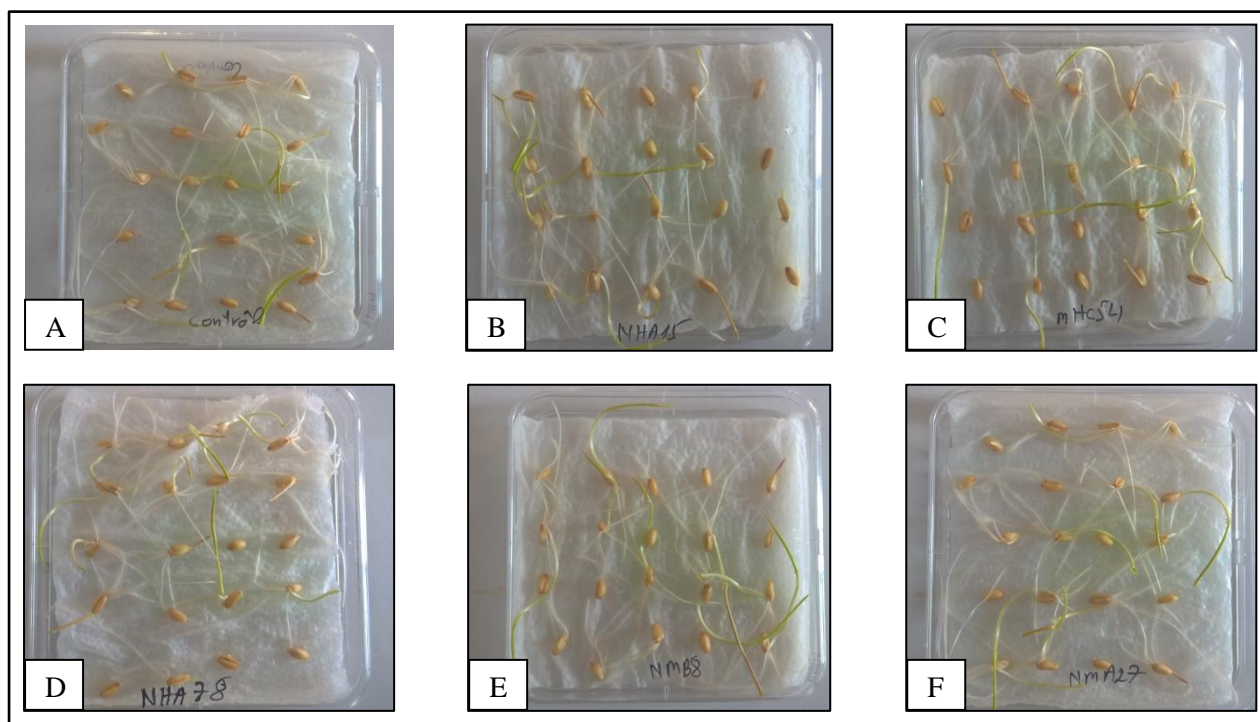
### III.3.3. Effet de l'inoculation bactérienne sur le taux de germination des graines de blé

Les résultats du calcul de l'index de vigueur des graines de blé inoculées par les différents isolats montrent des réponses variables d'un isolat à l'autre par rapport aux témoins.

Des valeurs allant de  $507,83 \pm 28,21$  à  $561,16 \pm 13,39$  ont été obtenus (Tableau III.7). L'analyse statistique de ces résultats par le test ANOVA montre un effet non significatif de l'inoculation bactérienne sur les index de vigueurs (Annexe VIII). La majorité des isolats n'ont montré aucune amélioration de l'index de vigueur par rapport au témoin (Figure III.27), seule l'isolat NHA15 a enregistré une nette amélioration de l'index de vigueur des graines après traitement par cet isolat (Tableau III.7).

**Tableau III.7.** Valeurs des index de vigueurs.

Traitement	Index de vigueur
Témoin	$529,51 \pm 33,22$
NHA15	$561,16 \pm 13,39$
MHC54	$524,66 \pm 24,66$
NHA78	$507,83 \pm 28,21$
NMB8	$524,66 \pm 10,79$
NMA27	$534,83 \pm 34,29$



**Figure III.27.** Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination des graines de blé.

A: Témoin, B: l'isolat NHA15, C: l'isolat MHC54, D: l'isolat NHA78, E: l'isolat NMB8, F: l'isolat NMA27.

### **III.3.4. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé sous stress salin**

Des plantules de blé dur variété Waha ont été cultivées sous stress salin après leur inoculation par différents isolats microbiens parmi les isolats caractérisés dans les parties précédentes de notre travail. L'analyse générale des résultats obtenus par les différents protocoles expérimentaux montre que l'inoculation des plantules de blé par les isolats à effet PGP exerce des effets significatifs variables sur les différents paramètres de croissances analysés (Annexe VIII).

#### **III.3.4.1. Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance morphologiques du blé**

L'analyse statistique des différents résultats de l'effet de l'inoculation sur les différents paramètres morphologiques par le test ANOVA a démontré que l'inoculation bactérienne a un effet bénéfique hautement significatif sur la croissance des plants en présence ou en absence d'un traitement salin (Annexe VIII). Contrairement aux résultats obtenus à partir des plantules non inoculées avec un traitement salin qui ont montré un effet négatif hautement significatif sur les paramètres morphologiques traduit en réduisant les valeurs de l'ensemble des paramètres étudiés.

##### **III.3.4.1.1. Effet de l'inoculation sur la hauteur et le poids sec de la partie aérienne**

Des améliorations importantes dans la partie aériennes ont été enregistrées chez les plantules inoculées par différents isolats bactériens par rapport aux lots témoins (Figure III.28, Figure III.29). En absence du sel, une amélioration maximale de la longueur de la partie aérienne des plantules de 69,9% a été obtenue par l'isolat NMA27, de même des améliorations dans le poids sec des mêmes parties ont été enregistrées principalement après traitement par l'isolat NMA27 pour lequel une amélioration de 118,47% a été enregistrée (Tableau III.8). En présence de concentrations variables de sel, il a été apparu que le traitement par les différents isolats microbiens diminue considérablement l'effet de stress salin sur la croissance de la partie aérienne. Cela est traduit par les nettes améliorations obtenues variant entre 24,72 et 119,23 % pour la hauteur de la tige et entre 103,82 et 874,63% pour le poids sec de la tige (Tableau III.7). Les valeurs maximales des améliorations ont été obtenues principalement en présence de fortes concentrations de sel (200mM) et en présence notamment de l'isolat NMA27 en provoquant une amélioration du poids sec de la tige de 874,63%.

#### III.3.4.1.2. Effet de l'inoculation sur la profondeur et le poids sec de la partie racinaire

Les résultats obtenus durant cette partie sont présentés dans le tableau III.8 et la figure III.29. Il ressort de ces résultats que la présence des bactéries à effet PGP affecte considérablement la croissance de la partie racinaire et cela en présence ou en absence d'un stress salin. En absence de tous stress salin (0 mM de NaCl) des améliorations importantes (>100%) dans le poids ont été observées chez la majorité des isolats, une valeur maximale de 194,38% a été obtenue après inoculation par l'isolat NMA27. Les améliorations dans la profondeur des racines sont moins importantes. Une amélioration maximale de 82,70% a été enregistrée pour des plantules inoculées par l'isolat NMA27 (Tableau III.8).

L'effet du traitement par les PGPR apparaît plus efficace en présence d'un stress salin sur les plantules (Figure III.29). Cela est démontré par les valeurs d'améliorations obtenues après traitements des plantules cultivées d'un sol contenant des concentrations élevées de NaCl par des suspensions bactériennes préparées à partir des différents isolats bactériens. Des taux d'améliorations variant de 56,96 à 179,16 % et de 40,19 et 921,21% ont été obtenus dans la profondeur et le poids des racines respectivement.

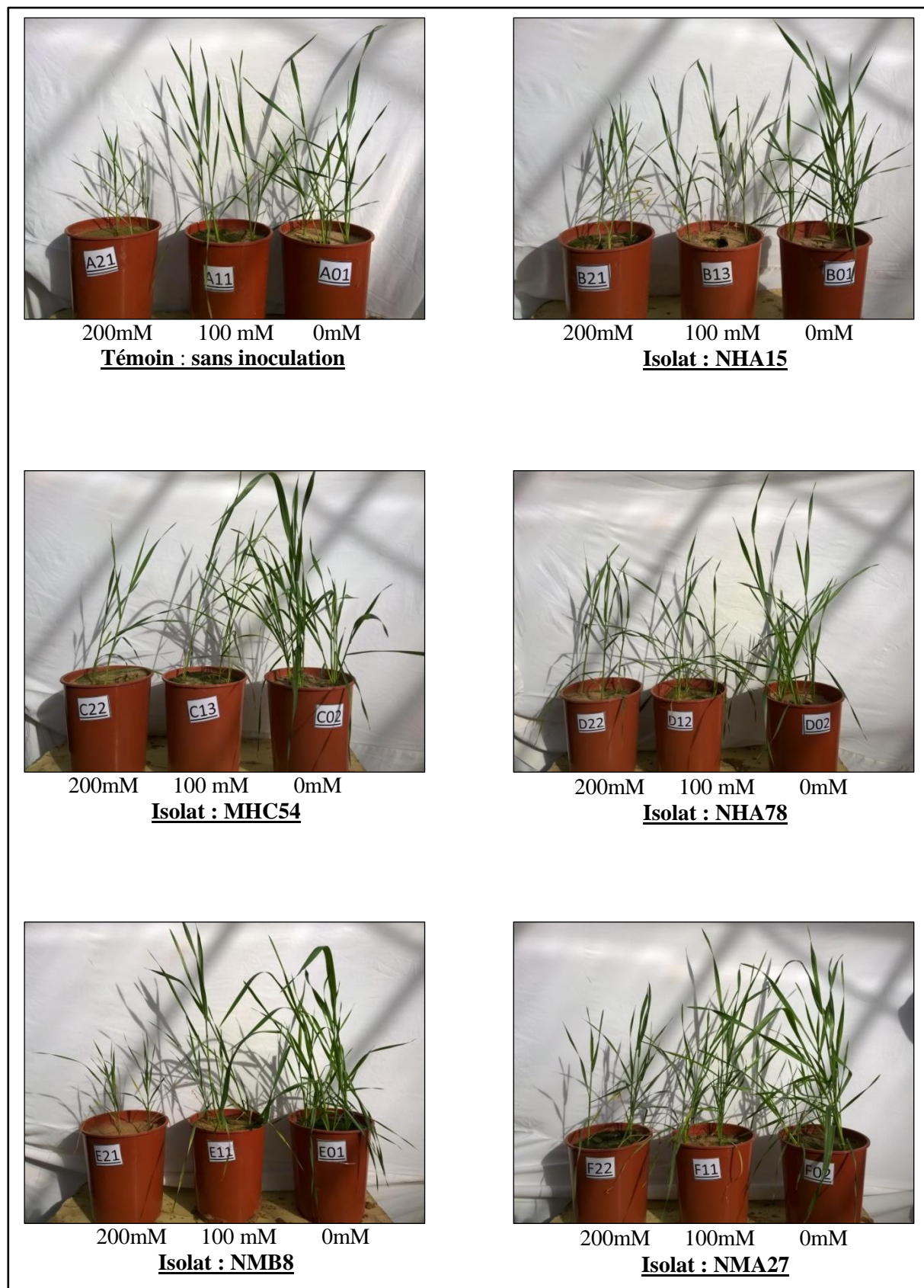
Il apparaît ainsi que l'augmentation de la concentration du sel dans le milieu affecte considérablement les paramètres de croissance de la plante et que l'inoculation d'agents anti-stress stimule des améliorations considérables dans la croissance végétale. Cela est constaté par les valeurs élevées des taux des améliorations obtenues dans le cas des plantules cultivées dans un sol contenant 200mM de NaCl (Tableau III.8).

**Tableau III.8.** Résultats des paramètres morphologiques des plantules de blé inoculées par des isolats PGPR cultivées sous stress salin.

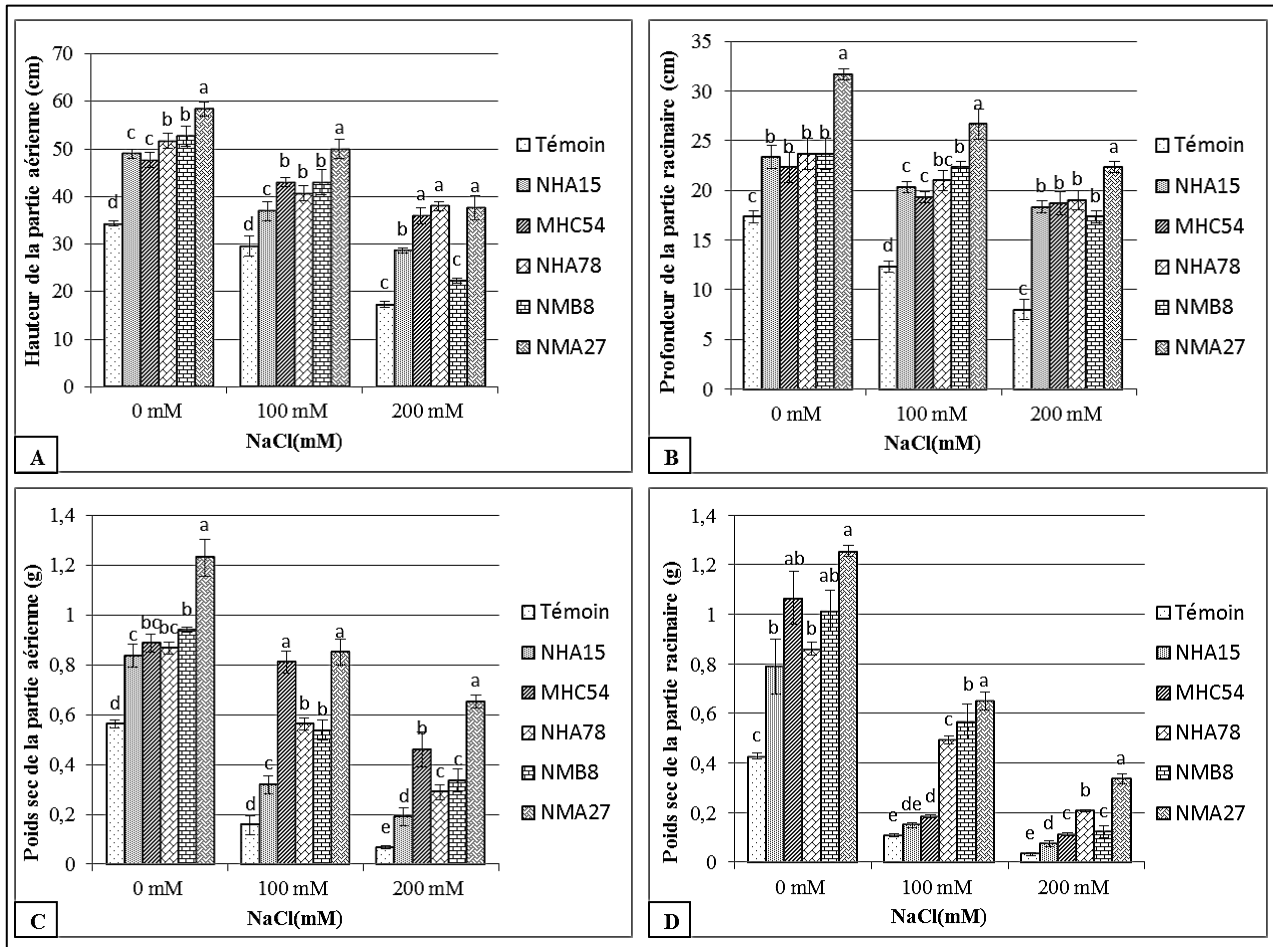
Salinité	Isolat	Hauteur des tiges		Profondeur des racines		PS de la partie aérienne		PS de la partie racinaire	
		Hauteur en cm	%	Profondeur en cm	%	PS en g	%	PS en g	%
0mM	Témoin	34,33±0,58 <sup>d</sup>	0,00	17,33±0,51 <sup>c</sup>	0,00	0,56±0,02 <sup>d</sup>	0,00	0,43±0,01 <sup>c</sup>	0,00
	NHA15	49,00±1,00 <sup>c</sup>	42,72	23,33±1,16 <sup>b</sup>	34,62	0,84±0,05 <sup>c</sup>	48,67	0,79±0,1 <sup>b</sup>	85,01
	MHC54	47,67±1,53 <sup>c</sup>	38,84	22,33±1,54 <sup>b</sup>	28,85	0,89±0,04 <sup>bc</sup>	57,55	1,07±0,11 <sup>ab</sup>	149,88
	NHA78	51,67±1,53 <sup>b</sup>	50,49	23,67±1,53 <sup>b</sup>	36,54	0,87±0,03 <sup>bc</sup>	54,00	0,86±0,03 <sup>b</sup>	101,41
	NMB8	52,67±2,08 <sup>b</sup>	53,40	23,67±1,29 <sup>b</sup>	36,54	0,94±0,01 <sup>b</sup>	66,96	1,01±0,08 <sup>ab</sup>	137,24
	NMA27	58,33±1,53 <sup>a</sup>	69,90	31,67±0,44 <sup>a</sup>	82,70	1,23±0,08 <sup>a</sup>	118,47	1,26±0,02 <sup>a</sup>	194,38
100mM	Témoin	29,67±2,08 <sup>d</sup>	0,00	12,33±0,38 <sup>d</sup>	0,00	0,16±0,04 <sup>d</sup>	0,00	0,11±0,0 <sup>e</sup>	0,00
	NHA15	37,00±2,00 <sup>c</sup>	24,72	20,33±0,28 <sup>c</sup>	64,87	0,32±0,04 <sup>c</sup>	103,82	0,15±0,01 <sup>de</sup>	40,19
	MHC54	43,00±1,00 <sup>b</sup>	44,94	19,33±0,81 <sup>c</sup>	56,76	0,81±0,04 <sup>a</sup>	415,92	0,18±0,01 <sup>d</sup>	71,03
	NHA78	40,67±1,53 <sup>b</sup>	37,08	21,00±1,43 <sup>bc</sup>	70,27	0,56±0,03 <sup>b</sup>	258,60	0,49±0,02 <sup>c</sup>	360,75
	NMB8	43,00±2,65 <sup>b</sup>	44,94	22,33±0,81 <sup>b</sup>	81,08	0,54±0,04 <sup>b</sup>	242,04	0,57±0,07 <sup>b</sup>	429,91
	NMA27	50,00±2,00 <sup>a</sup>	68,54	26,67±1,65 <sup>a</sup>	116,22	0,85±0,05 <sup>a</sup>	441,40	0,65±0,04 <sup>a</sup>	507,48
200mM	Témoin	17,33±0,58 <sup>c</sup>	0,00	8,00±1,05 <sup>c</sup>	0,00	0,07±0,01 <sup>e</sup>	0,00	0,03±0,0 <sup>e</sup>	0,00
	NHA15	28,67±0,58 <sup>b</sup>	65,39	18,33±0,59 <sup>b</sup>	129,16	0,19±0,04 <sup>d</sup>	183,58	0,07±0,01 <sup>d</sup>	121,21
	MHC54	36,00±1,73 <sup>a</sup>	107,70	18,67±1,14 <sup>b</sup>	133,34	0,46±0,07 <sup>b</sup>	586,57	0,11±0,01 <sup>c</sup>	242,42
	NHA78	38,00±1,00 <sup>a</sup>	119,23	19,00±1,76 <sup>b</sup>	137,50	0,29±0,03 <sup>c</sup>	332,84	0,21±0,01 <sup>b</sup>	527,27
	NMB8	22,33±0,58 <sup>b</sup>	57,69	17,33±0,48 <sup>b</sup>	116,66	0,34±0,05 <sup>c</sup>	402,99	0,12±0,02 <sup>c</sup>	272,73
	NMA27	37,67±2,52 <sup>a</sup>	117,31	22,33±0,78 <sup>a</sup>	179,16	0,65±0,03 <sup>a</sup>	874,63	0,34±0,02 <sup>a</sup>	921,21

PS : poids sec, % : pourcentage d'amélioration, a, b, c... : groupe homogène

Dans la même colonne, les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Newman-Keuls.



**Figure III.28.** Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantules de blé dur à différents niveau de NaCl.



**Figure III.29.** Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques des plantules de blé dur à différents niveau de NaCl.

**A :** hauteur de la partie aérienne, **B :** profondeur de la partie racinaire, **C :** poids sec de la partie aérienne, **D :** poids sec de la partie racinaire.

### III.3.4.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres biochimiques

De très nombreux composés organiques et minéraux interviennent dans l'ajustement osmotique, Nous nous sommes limités dans cette étude, à étudier l'évolution de la concentration de la proline libre, la teneur de la chlorophylle totale et des ions de sodium et de potassium chez les plantules de blé cultivées sous différentes conditions de stress salin en présence ou en absence de l'inoculation microbienne.

#### III.3.4.2.1. Teneur en chlorophylle total

Les résultats des teneurs en chlorophylle obtenus montrent que le traitement salin a un effet hautement significatif sur la teneur en chlorophylle totale synthétisé par les plantules de blé (Annexe VIII). En absence du traitement bactérien, une teneur maximale en chlorophylle de  $9,25 \pm 0,19$  mg/g de matière fraîche a été détectée en absence du sel, en outre une teneur minimale de  $2,75 \pm 0,20$  mg/g de matière fraîche a été détectée en présence du 200mM de NaCl pour le même échantillon (Tableau III.8). L'inoculation par les différents isolats apparaît comme un facteur important dans l'adaptation des plantules aux stress salins traduit dans notre étude par une bonne amélioration de production de chlorophylle totale après l'inoculation bactérienne (Figure III.30). En présence de 200 mM de sel, les isolats NHA78, NMB8 et NMA27 ont montré une bonne amélioration en les comparant aux autres isolats, et cela avec des pourcentages d'amélioration de 158,18%, 128,00% et 164,36% respectivement (Tableau III.9).

#### III.3.4.2.2. Teneur en proline

L'analyse de la variance des résultats du dosage de la proline contenue dans les différents échantillons de blé traité révèle que la teneur en proline est affectée significativement par l'accroissement du NaCl dans le milieu (Annexe VIII).

Les concentrations détectées varient proportionnellement avec la concentration du sel en absence d'inoculation par les isolats bactériens (Tableau III.9). Une concentration de proline équivalente à  $63,11 \pm 2,28$  mg/g de matière fraîche a été détectée chez des plantules cultivées dans un sol contenant 200mM de NaCl en comparaison avec des concentrations de  $5,76 \pm 0,32$  et  $34,80 \pm 1,79$  mg/g détectées dans des échantillons cultivés en absence du sel et avec 100 mM de NaCl respectivement. Le traitement des échantillons par des suspensions des isolats sélectionnés a provoqué une nette diminution de la concentration de l'acide aminé indépendamment de la nature de l'agent microbien. Des quantités de proline relativement plus faibles ont été détectées dans les différents échantillons traités aux PGPR par rapport aux lots témoins (non traité)(Tableau III.9, Figure III.30). Des valeurs importantes de réduction du taux de proline foliaire de 37,79% et 35,26% ont été enregistrées dans des lots inoculés par

l'isolat NMA27 et MHC54 respectivement en présence de 100 et 200 mM de NaCl respectivement.

#### III.3.4.2.3. Teneur en Na<sup>+</sup> de la partie aérienne et racinaire

Les résultats de dosage des ions Na<sup>+</sup> montrent une répartition spatiale hétérogène de l'accumulation des ions de sodium. L'augmentation de la concentration des ions Na<sup>+</sup> dans les deux parties des plantes étudiées est proportionnelle au stress salin. Des concentrations maximales d'ions de sodium équivalent à  $9,40 \pm 0,15$  et  $8,45 \pm 0,23$   $\mu\text{g/g}$  de matière sèche ont été enregistrées dans le cas des plantules cultivées en présence de 200mM de NaCl non traitées par les suspensions microbiennes dans la partie aérienne et racinaire respectivement (Tableau III.9, Figure III.30).

Une réduction relative des différentes concentrations, dans les parties aériennes comme dans les parties racinaires, a été obtenues après traitement des plantules stressées par inoculation bactérienne. En présence de 200mM de sel, des pourcentages de réduction relativement importants de 29,79% et 57,18 % ont été détectés dans la partie aérienne et racinaire respectivement d'un échantillon traité par l'isolat NMA27. Tandis que qu'en absence de stress salin l'inoculation par les isolats microbiens n'a pas permet de réduction significatives des taux d'accumulation des ions Na<sup>+</sup> (Annexe VIII).

#### III.3.4.2.4. Teneur en K<sup>+</sup> de la partie aérienne et racinaire

L'analyse de la variance des résultats révèle un effet hautement significatif de la salinité sur l'accumulation des ions K<sup>+</sup> dans les parties aérienne et racinaires de la plante (Annexe VIII). Il a été remarqué que l'augmentation du stress salin en absence de PGPR dans le sol fait diminuer relativement l'accumulation du potassium racinaire de  $8,24 \pm 0,19$   $\mu\text{g/g}$  à  $3,05 \pm 0,07$   $\mu\text{g/g}$  dans la partie racinaire, et de  $8,88 \pm 0,07$   $\mu\text{g/g}$  jusqu'à  $2,89 \pm 0,04$   $\mu\text{g/g}$  dans la partie aérienne. Le traitement des plantules par des bactéries à effet PGP a contribué légèrement à la modification des taux d'accumulations des ions dans la plante par limitation de la perte des ions par rapport aux plantules cultivées dans les mêmes conditions de stress et en absence d'agents microbiens.

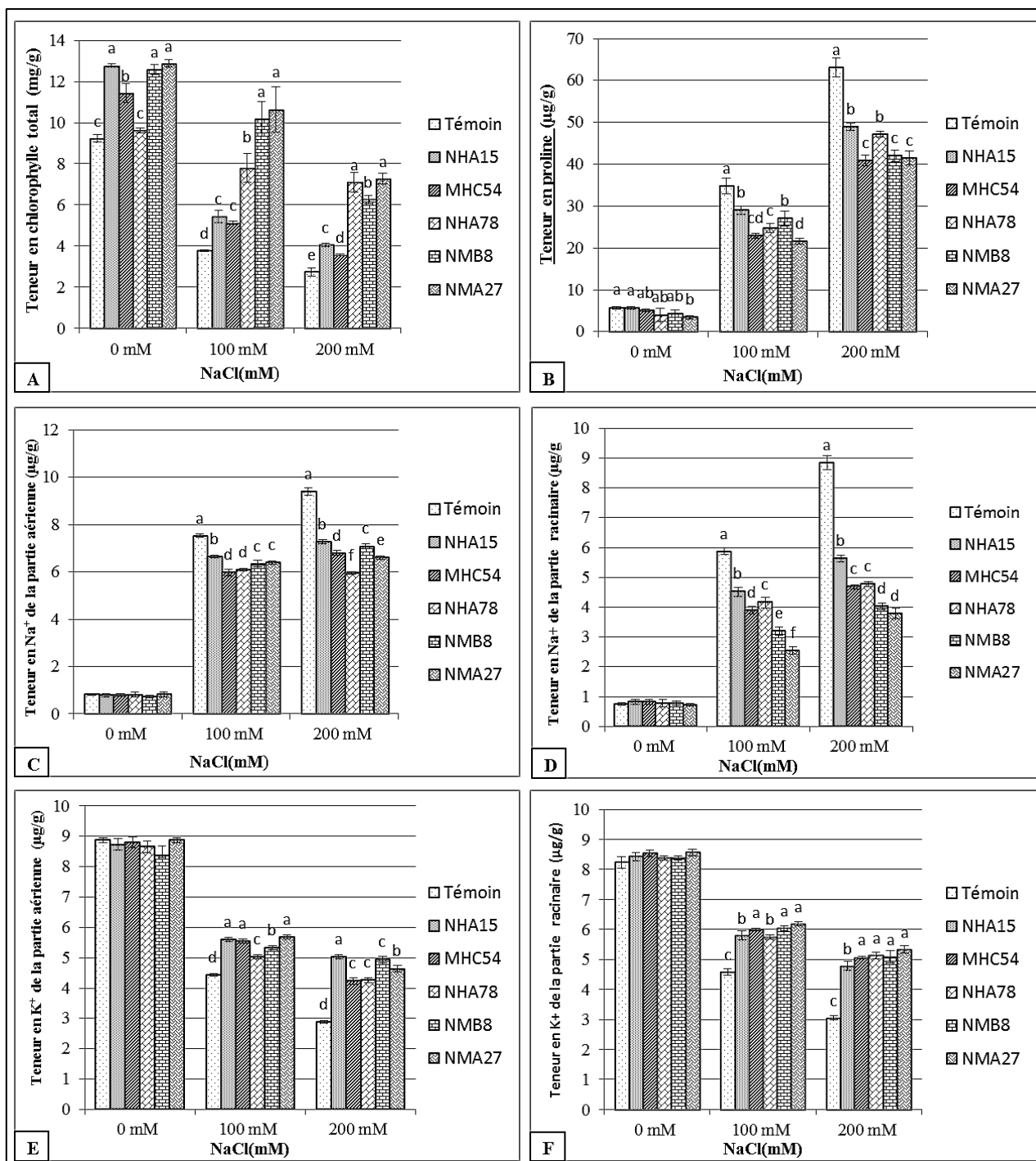
L'analyse de ces résultats par le test des comparaisons des moyennes (Tableau III.9) a mis en évidence la présence de plusieurs groupes homogènes traduisant les effets variables de l'action des isolats sur le taux d'accumulation des ions. Un taux d'amélioration maximale de ces ions de 74,39 % a été obtenu au niveau de la partie aérienne après traitement par l'isolat NHA15 et en présence de 200mM de NaCl. En outre, dans les mêmes conditions de stress dans la partie racinaire, un taux d'amélioration maximal de 74,75 % a été détecté dans les échantillons de blé traités par l'isolat NMA27 (Tableau III.9, Figure III.30).

Tableau III.9. Résultats des paramètres biochimiques des plantules de blé inoculées par des isolats PGPR cultivées sous stress salin.

Salinité	Isolat	Taux de chlorophylle total		Teneur en proline		Teneur en Na <sup>+</sup> de la partie aérienne		Teneur en Na <sup>+</sup> de la partie racinaire		Teneur en K <sup>+</sup> de la partie aérienne		Teneur en K <sup>+</sup> de la partie racinaire	
		mg/g de matière fraîche	%	mg/g de matière fraîche	%	µg/g de matière fraîche	%	µg/g de matière sèche	%	µg/g de matière sèche	%	µg/g de matière sèche	%
0mM	Témoin	9,25±0,19 <sup>c</sup>	0,00	5,76±0,32 <sup>a</sup>	0,00	0,83±0,04	0,00	0,76±0,04	0,00	8,88±0,07	0,00	8,24±0,19	0,00
	NHA15	12,77±0,08 <sup>a</sup>	38,05	5,69±0,38 <sup>a</sup>	-1,22	0,78±0,07	-6,02	0,83±0,08	9,21	8,73±0,19	-1,69	8,43±0,15	2,31
	MHC54	11,44±0,46 <sup>b</sup>	23,68	5,12±0,30 <sup>ab</sup>	-11,11	0,81±0,04	-2,41	0,83±0,08	9,21	8,80±0,19	-0,90	8,54±0,11	3,64
	NHA78	9,62±0,13 <sup>c</sup>	4,00	4,02±1,66 <sup>ab</sup>	-30,21	0,81±0,11	-2,41	0,78±0,12	2,63	8,66±0,19	-2,48	8,38±0,07	1,70
	NMB8	12,58±0,26 <sup>a</sup>	36,00	4,25±0,91 <sup>ab</sup>	-26,22	0,73±0,04	-12,05	0,78±0,07	2,63	8,38±0,31	-5,63	8,38±0,07	1,70
	NMA27	12,88±0,19 <sup>a</sup>	39,24	3,49±0,39 <sup>b</sup>	-39,41	0,83±0,11	0,00	0,73±0,04	-3,95	8,88±0,07	0,00	8,57±0,11	4,00
100mM	Témoin	3,78±0,05 <sup>d</sup>	0,00	34,80±1,79 <sup>a</sup>	0,00	7,53±0,07 <sup>a</sup>	0,00	5,87±0,11 <sup>a</sup>	0,00	4,43±0,04 <sup>d</sup>	0,00	4,59±0,11 <sup>c</sup>	0,00
	NHA15	5,45±0,30 <sup>c</sup>	44,18	29,05±0,95 <sup>b</sup>	-16,52	6,65±0,04 <sup>b</sup>	-11,69	4,52±0,15 <sup>b</sup>	-23,00	5,61±0,07 <sup>a</sup>	26,64	5,80±0,15 <sup>b</sup>	26,36
	MHC54	5,13±0,09 <sup>c</sup>	35,71	22,92±0,61 <sup>cd</sup>	-34,14	5,96±0,14 <sup>d</sup>	-20,85	3,91±0,12 <sup>d</sup>	-33,39	5,54±0,07 <sup>a</sup>	25,06	5,99±0,04 <sup>a</sup>	30,50
	NHA78	7,81±0,71 <sup>b</sup>	106,61	24,80±1,16 <sup>c</sup>	-28,74	6,08±0,04 <sup>d</sup>	-19,26	4,17±0,18 <sup>c</sup>	-28,96	5,04±0,07 <sup>c</sup>	13,77	5,75±0,07 <sup>b</sup>	25,27
	NMB8	10,18±0,82 <sup>a</sup>	169,31	27,07±1,81 <sup>b</sup>	-22,21	6,34±0,15 <sup>c</sup>	-15,80	3,20±0,14 <sup>c</sup>	-45,49	5,33±0,07 <sup>b</sup>	20,32	6,04±0,07 <sup>a</sup>	31,59
	NMA27	10,64±1,11 <sup>a</sup>	181,48	21,65±0,68 <sup>d</sup>	-37,79	6,39±0,07 <sup>c</sup>	-15,14	2,56±0,12 <sup>f</sup>	-56,39	5,68±0,07 <sup>a</sup>	28,22	6,18±0,07 <sup>a</sup>	34,64
200mM	Témoin	2,75±0,20 <sup>e</sup>	0,00	63,11±2,28 <sup>a</sup>	0,00	9,40±0,15 <sup>a</sup>	0,00	8,85±0,23 <sup>a</sup>	0,00	2,89±0,04 <sup>d</sup>	0,00	3,05±0,07 <sup>c</sup>	0,00
	NHA15	4,05±0,08 <sup>c</sup>	47,27	48,92±0,87 <sup>b</sup>	-22,48	7,27±0,08 <sup>b</sup>	-22,66	5,63±0,11 <sup>b</sup>	-36,38	5,04±0,07 <sup>a</sup>	74,39	4,78±0,15 <sup>b</sup>	56,72
	MHC54	3,57±0,05 <sup>d</sup>	29,82	40,86±1,23 <sup>c</sup>	-35,26	6,79±0,11 <sup>d</sup>	-27,77	4,69±0,07 <sup>c</sup>	-47,01	4,24±0,11 <sup>c</sup>	46,71	5,07±0,04 <sup>a</sup>	66,23
	NHA78	7,10±0,48 <sup>a</sup>	158,18	47,15±0,74 <sup>b</sup>	-25,29	5,95±0,04 <sup>f</sup>	-36,70	4,78±0,08 <sup>c</sup>	-45,99	4,26±0,07 <sup>c</sup>	47,40	5,14±0,11 <sup>a</sup>	68,52
	NMB8	6,27±0,21 <sup>b</sup>	128,00	42,00±1,42 <sup>c</sup>	-33,45	7,08±0,11 <sup>c</sup>	-24,68	4,02±0,11 <sup>d</sup>	-54,58	4,95±0,11 <sup>a</sup>	71,28	5,09±0,21 <sup>a</sup>	66,89
	NMA27	7,27±0,26 <sup>a</sup>	164,36	41,50±1,65 <sup>c</sup>	-34,24	6,60±0,07 <sup>e</sup>	-29,79	3,79±0,18 <sup>d</sup>	-57,18	4,64±0,11 <sup>b</sup>	60,55	5,33±0,12 <sup>a</sup>	74,75

% : pourcentage d'amélioration, **cm** : centimètre, **g** : gramme, **a, b, c...** : groupe homogène.

Dans la même colonne, les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Newman-Keuls.



**Figure III.30.** Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres biochimiques des plantules de blé dur à différents niveau de NaCl.

**A :** teneur en chlorophylle total, **B :** teneur en proline, **C :** teneur en Na<sup>+</sup> de la partie aérienne, **D :** teneur en Na<sup>+</sup> de la partie racinaire, **E :** teneur en K<sup>+</sup> de la partie aérienne, **F :** teneur en K<sup>+</sup> de la partie racinaire.

### III.3.5. Discussion

Pour la promotion de la croissance et l'induction de la résistance dans de nombreuses cultures, l'efficacité de PGPR a été bien documentée (Hafeez *et al.*, 2006; Inam-ul-Haq *et al.*, 2012). Malgré que les bactéries promotrices de la croissance des plantes puissent agir par plusieurs mécanismes (Glick, 2014), le pouvoir de ces agents à exprimer certains caractères est indispensable. Les résultats expérimentaux présentés dans cette étude montrent qu'une grande partie des isolats ont été caractérisés par leur capacité à exprimer différentes activités métaboliques les qualifiant ainsi comme des agents PGPR potentiels pour une éventuelle application dans le domaine de l'amélioration de la croissance des plantes.

L'effet des stress biotiques et abiotiques sur la capacité de la croissance végétale ainsi que les activités métaboliques est largement documenté. La salinité, comme facteur abiotique, affecte aussi bien la croissance des bactéries et leur rôle dans l'environnement (Egamberdieva et Lugtenberg, 2014), comme elle peut affecter la croissance des plantes (Shabala et Cuin, 2008). Les résultats de la tolérance des isolats sélectionnés vis-à-vis du stress salin ont montré que la majorité des isolats sont capables de se multiplier et même d'exprimer une activité métabolique variable en présence de concentration de sel plus ou moins élevée (de 200 à 300mM). Nous avons observé que les caractéristiques des isolats liés à la PGP n'étaient pas vraiment influencées négativement par la salinité. Ceci est certainement dû au pouvoir de ces bactéries à synthétiser des solutés compatibles (sucres, acides aminés ou dérivés) qui agissent comme des osmolytes et qui aident les bactéries à survivre en cas de stress osmotique (Bacilio *et al.*, 2004; Parida et Das, 2005).

L'étude de l'impact de l'inoculation des plantules de blé dans des conditions de stress salin a été réalisée par le choix de cinq isolats bactériens préalablement sélectionnés (NHA15, MHC54, NHA78, NMB8 et NMA27). La sélection des isolats a été basée sur un large éventail de propriétés selon une analyse en composante principale qui a pris en considération plusieurs paramètres testés, ce qui les rend adaptables le plus possible à divers environnements.

Les plantules inoculées par les différents isolats diazotrophiques ont présenté une amélioration significative de l'ensemble des paramètres morphologiques étudiés par rapport aux témoins (en présence de stress et sans inoculation). Des valeurs importantes d'amélioration dans la biomasse de la partie aérienne ont été obtenues, même en présence de concentrations de sel équivalentes à 200mM. L'inoculation notamment par l'isolat NMA27 a provoqué une amélioration du poids sec de la partie aérienne de 874,63%. Des résultats

similaires ont été enregistrés dans l'analyse de la profondeur et la biomasse de la partie racinaire. Des taux d'améliorations variant de 28,85 à 179,16 % et de 40,19 et 921,21% sont obtenus dans la profondeur et le poids des racines respectivement.

Plusieurs études ont tenté d'expliquer le rôle des PGPR dans la résistance des plantes aux effets du stress abiotique (Barnawal *et al.*, 2012; Bharti *et al.*, 2014), Malgré que la propriété de la tolérance à la salinité soit le résultat de plusieurs caractéristiques qui dépendent de différentes interactions physiologiques difficiles à déterminer (Qados, 2011), la capacité des PGPR à réduire l'effet de la salinité sur la croissance végétale et en même à promouvoir cette croissance est le plus souvent attribuée à la production de l'ACC désaminase responsable de la réduction des concentrations élevées de l'éthylène produit sous l'effet de la salinité (Kiani *et al.*, 2016). Selon Rajput *et al.*, (2013), les plantes inoculées avec des PGPR ayant une activité ACC désaminase sont relativement plus tolérantes au stress salin. Ces études pourraient expliquer les résultats obtenus après culture des plantules de blé sous stress salin en présence d'isolats capables de synthétiser l'ACC désaminase.

Des résultats similaires dans l'amélioration de la croissance de blé par des PGPR ont été également rapportés par plusieurs auteurs (Burd *et al.*, 2000; Akhtar *et al.*, 2013 ; George *et al.*, 2013). Le potentiel d'amélioration de la croissance des plantes par l'inoculation par des PGPR est signalé chez d'autres espèces végétales comme l'orge, le sorgho et la tomate (Baldani *et al.*, 1986), le Coton (Hafeez *et al.*, 2004; Yasmin *et al.*, 2013), le maïs (Naureen *et al.*, 2005) et le riz (Mehnaz *et al.*, 2001; Islam *et al.*, 2009).

La production de l'ACC désaminase par les différents isolats ne peut pas seule expliquer les performances des isolats dans les conditions de stress. Il a été suggéré que des mécanismes multiples, tels que la fixation de l'azote, la solubilisation des phosphates, ainsi que la biosynthèse de l'AIA, sont responsables de l'amélioration de la croissance des plantes et du rendement de leur culture (Bashan et Holguin, 1997). Les résultats obtenus indiquent aussi que les isolats sélectionnés possèdent de multiples propriétés favorisant la croissance des plantes et tout en étant producteurs de l'AIA et l'ACC désaminase. La production concomitante de l'AIA et l'ACC désaminase est considérée par la plupart des auteurs comme un caractère largement recherché chez les PGPR isolées ou inoculées dans des sols salin. Selon Glick (2014), avec des PGPR qui sécrètent l'AIA et synthétisent l'ACC désaminase, les niveaux d'éthylène produits par des plantes sont moins élevés que lorsque les plantes interagissent avec des PGPR qui sécrètent l'AIA mais ne synthétisent pas ACC désaminase.

Plusieurs paramètres biochimiques de la croissance et du développement des plantes peuvent être également affectés par la perturbation de l'homéostasie ionique, en particulier

ceux de la proline, du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$ . La concentration interne élevée de l'ion  $\text{Na}^+$  et la faible teneur en ion  $\text{K}^+$  sont corrélées à une inhibition de la croissance des plantes en réponse à l'augmentation de la salinité du sol (Zhang *et al.*, 2010). Par conséquent, les plantes tendent à maintenir un rapport  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  favorable dans le cytosol en régulant l'absorption de l'ion  $\text{K}^+$  et en réduisant l'absorption de l'ion  $\text{Na}^+$ . Ce niveau élevé de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  est un bon indicateur de la tolérance à la salinité (Hamdia *et al.*, 2004). Selon Singh et Jha (2016b), la présence de certains PGPR dans un environnement salin, peut contribuer dans la tolérance des plantes hôtes au stress à travers des mécanismes biochimiques tels que la régulation de l'absorption des nutriments, le maintien de l'équilibre ionique, la modulation des osmolytes et des phytohormones chez les plantes.

Les résultats de notre travail supportent fortement ces études montrant que l'inoculation des plantules par les cinq isolats choisis a contribué à la diminution de façon significative du contenu en ion  $\text{Na}^+$ , tout en augmentant l'accumulation du contenu en ion  $\text{K}^+$ .

Plusieurs auteurs ont rapporté cette stratégie. Par exemple, les plants de maïs inoculés par une souche d'*Azospirillum* ont montré une absorption plus élevée de l'ion  $\text{K}^+$  et une absorption réduite de l'ion  $\text{Na}^+$ , en maintenant les conditions nutritives sous des conditions salines (Hamdia *et al.*, 2004). De même, dans des conditions salines l'inoculation de graines de blé avec des souches de PGPR a amélioré le contenu en  $\text{K}^+$  et réduit le contenu en  $\text{Na}^+$  (Ashraf *et al.*, 2004). Upadhyay *et al.*, (2011) ont suggéré que l'augmentation de la teneur en  $\text{K}^+$  après l'inoculation par des PGPR (*Bacillus subtilis* SU47 et *Arthrobacter* sp. SU18), est impliqué dans l'atténuation du stress oxydatif induit par le sel dans des plantes de blé.

De plus, en réponse au stress salin les plantes synthétisent des quantités élevées de proline, qui fonctionne comme un osmorégulateur pour maintenir un potentiel osmotique optimal dans les cellules ou qui agit comme un stabilisateur pour les structures protéiques et les membranes cellulaires (Claussen, 2005; Kanwal *et al.*, 2016). Dans notre étude, une réduction significative des quantités de proline par rapport aux plantes non inoculées et sous stress salin a été enregistrée. Des taux de réduction équivalents à 35,26 % dans les quantités de proline ont été enregistrés après inoculation des plants de blé avec l'isolat MHC54 en présence de 200mM de NaCl. Le niveau faible de proline estimé dans ce cas indique probablement que les plantes sont moins affectées par la salinité (Palaniyandi *et al.*, 2014). Des résultats similaires ont été rapportés par Hamdia *et al.*, (2004) et Nadeem *et al.*, (2007) qui ont également observé une diminution de la teneur en proline dans les plants traités par PGPR exposés au stress salin.

L'effet de la salinité sur la synthèse des pigments photosynthétiques est variable en fonction de la concentration du NaCl. Néanmoins, des améliorations dans les teneurs des pigments chlorophylliens après inoculation avec les cinq isolats ont été enregistrées, démontrant ainsi un effet positif sur la croissance et le développement des plantes. Des études précédentes ont aussi montré que la synthèse et l'activité des pigments photosynthétiques pouvaient être réprimées par des concentrations excessives de NaCl (Parida *et al.*, 2004). En outre, selon Habib *et al.*, (2016), une augmentation des teneurs des pigments photosynthétiques peut être obtenue dans les plantes traitées par des bactéries promotrice de la croissance des plantes. Ceci est déjà montré par des études antérieures qui ont rapporté l'amélioration de l'activité photosynthétique dans les plantes hôtes en réponse à l'inoculation par les PGPR (Nadeem *et al.*, 2009).

D'une façon générale, les résultats de notre travail indiquent que l'inoculation du blé dur variété Waha avec des isolats bactériennes diazotrophes, productrices de l'ACC désaminase, solubilisant le phosphate et producteurs de l'AIA a amélioré la croissance des grains de blé cultivé dans des conditions de stress salin. L'étude phylogénétique a montré que les isolats appartenant à des espèces bactériennes diversifiées sont capables de croître dans des conditions de stress salin élevé. Une augmentation significative des divers paramètres de croissance morphologiques et biochimiques de la plante de blé cultivée sous conditions de stress salin a été observée après inoculation par les différents isolats bactériens sélectionnés.

Plusieurs études ont rapporté l'application des souches d'*Azospirillum*, *Bacillus* et *Enterobacter* dans l'amélioration des culture de blé cultivé dans des conditions salins (Moutia *et al.*, 2010). *Klebsiella oxytoca* (Rs-5) a été déclaré avoir la capacité de réduire le stress salin et peut promouvoir la croissance du coton dans les études de Yue *et al.*, (2007). Dans d'autres travaux, des isolats de *Stenotrophomonas* ont été signalés comme des bactéries fixatrices d'azote libres, et qui favorisent la croissance des plantes (Park *et al.*, 2005).

Les différentes activités PGP des isolats utilisés ainsi que leur capacité à résister et à exprimer quelques activités PGP à différentes concentrations de sel ont permis à ces isolats d'améliorer significativement la croissance des plantules de blé dur variété Waha avec une amélioration dans les divers paramètres morphologique et biochimiques.



*Conclusion et  
perspectives*

### Conclusion et perspectives

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) représentent une petite partie des rhizobactéries qui ont la capacité de favoriser la croissance des plantes.

L'objectif de ce travail de thèse s'est focalisé sur l'évaluation des possibilités d'utiliser des rhizobactéries diazotrophiques isolées à partir du sol salin, pour atténuer les effets néfastes de la salinité du sol sur les plantes de blé dur.

Un total de 296 rhizobactéries ont été isolées à partir de la rhizosphère de blé, elles ont été soumises à une identification préliminaires par des examens macroscopiques et microscopiques et quelques test biochimiques. Tous les isolats ont été ensuite évalués pour estimer leurs différentes activités PGP la production de l'acide indole acétique, la solubilisation du phosphate, la production des sidérophores et la production de l'HCN et l'ammoniac.

Parmi ces bactéries isolées, seulement 35 isolats ayant des multiples caractères de PGP, ont été retenus pour les identifier génétiquement et évalués pour la recherche de l'activité de l'ACC désaminase et l'activité de réduction de l'acétylène. L'analyse des séquences d'ADNr 16S de ces isolats a permet de les classer aux sept genres bactériens : *Bacillus*, *Sténotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas* et *Raoultella*. La majorité de ces isolats bactériens ont la capacité de produire l'AIA et de solubiliser le phosphate avec des taux variés, 82,21% étaient capable de produire les sidérophores. Tous les isolats (100%) étaient positif pour le test de l'ammoniac par contre seulement 4,35% des isolats étaient capable de produire l'HCN. Cependant la plupart de ceux-ci ont été capables de réduire l'acétylène traduisant leur capacité de fixer l'azote atmosphérique, par contre presque la moitié (45,65%) possèdent l'enzyme de l'ACC-désaminase.

Sur la base de ces derniers critères, l'étude s'est principalement focalisée sur la sélection des diazotrophes performants parmi l'ensemble des isolats, pour les utiliser comme inoculum dans les plantules de blé dur cultivées sous stress salin. Cette évaluation a conduit à la sélection de cinq isolats NHA15, MHC54, NHA78, NMB8 et NMA27 identifiés comme: *Raoultella planticola*, *Klebsiella oxytoca*, *Sténotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter aerogenes* et *Sténotrophomonas maltophilia* respectivement.

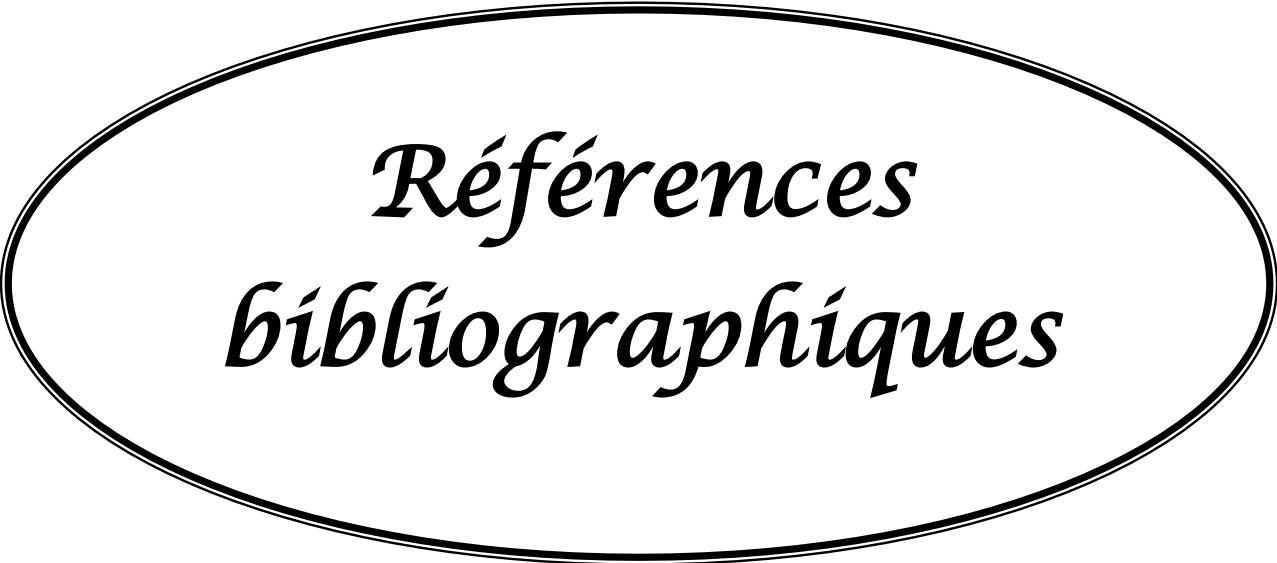
Les bactéries sélectionnées ont été testées pour leur tolérance au sel à savoir leur croissance et l'efficacité de certaines activités PGP (réduction de l'acétylène, production de l'AIA et solubilisation du phosphate) à des concentrations croissante de NaCl (0, 100, 200, 300, 400 et 500 mM). Les résultats obtenus dans ces tests montrent que les diazotrophes

utilisés ont toléré des taux élevés de sel et ont révélé une capacité à produire les activités PGP même à des concentrations élevées de NaCl (de 200 à 500 mM).

Les isolats ont été utilisés pour inoculer les plantules de blé cultivées dans des sols stérilisés dans différentes conditions de salinité (0, 100 et 200 mM). Les résultats expérimentaux montrent que l'effet de l'inoculation par ces isolats bactériens sur la germination des graines de blé dur n'a pas été assez important. Par contre, une amélioration importante apparaît sur les différents paramètres de croissance morphologiques avec ou sans stress salin tels que la hauteur et le poids sec de la partie aérienne avec un pourcentage d'amélioration de 119,23 % et 874,63% respectivement chez l'isolat NMA27 et la profondeur et le poids sec de la partie souterraine avec un pourcentage d'amélioration de 179,16% et 921,21% respectivement chez l'isolat NMA27. Ainsi une amélioration importante était constatée sur les autres paramètres biochimiques de croissance telle que la teneur en chlorophylle et le contenu foliaire et racinaire en  $K^+$  et en  $Na^+$ , cette amélioration a été observée en absence et en présence du stress salin. En outre, elle était relative par rapport à l'isolat utilisé où l'isolat NMA27 s'est avéré comme meilleure inoculum.

L'ensemble des caractères PGP des divers diazotrophes étudiés dans la présente expérience ainsi que les résultats expérimentaux de la culture du blé dur suggèrent que ces microorganismes particuliers peuvent favoriser la croissance des plantes par plus d'un mécanisme et que ces activités pourraient être mieux exploitées. Cependant, la conservation de leurs activités PGP représente un défi majeur pour ces isolats. En outre, les résultats de cette étude ont été obtenus dans des conditions contrôlées alors que la compétence et la capacité de survie dans différents écosystèmes doivent être plus étudiées par des expérimentations plus larges en plein champ dans des sols affectés par la salinité, car la réussite de leur utilisation dépend principalement sur la capacité de ces microorganismes à coloniser efficacement la rhizosphère ainsi que leur pouvoir à synthétiser des métabolites à effet direct ou indirect sur la croissance du végétal.

De plus, Il serait intéressant d'étudier l'effet combiné des isolats dans la promotion de la croissance du blé afin de proposer une formulation de bactéries qui peut engendrer un effet meilleur.



*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.
- Abdelguerfi, A., Ramdane, M. S. A. (2003).** Évaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. *Projet ALG/97 G. Algerie*.
- Abdul-Baki, A. A., Anderson, J. D. (1973).** Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop science*, 13(6), 630-633.
- Ahemad, M., Kibret, M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1), 1-20.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Akhtar, N., Arshad, I., Shakir, M. A., Qureshi, M. A., Sehrish, J., Ali, L. (2013).** Co-inoculation with Rhizobium and *Bacillus* sp. to improve the phosphorus availability and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(1), 190-197.
- Alagawadi, A. R., Gaur, A. C. (1992).** Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. *Tropical Agriculture*, 69(4), 347-350.
- Albacete, A., Ghanem, M. E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., et al., (2008).** Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4119-4131.
- Ali, S., Charles, T. C., Glick, B. R. (2014).** Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167.
- Al-Karaki, G. N. (2000).** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza*, 10(2), 51-54.
- Al-Karaki, G. N. (2001).** Germination, sodium, and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 24(3), 511-522.
- 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.

- Amarger, N. (2002).** Genetically modified bacteria in agriculture. *Biochimie*, 84(11), 1061-1072.
- Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F. G., Vargas, L. K., Passaglia, L. M. (2012).** Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and soil*, 356(1-2), 245-264.
- Ammari, T., Mengel, K. (2006).** Total soluble Fe in soil solutions of chemically different soils. *Geoderma*, 136(3), 876-885.
- Andrade, G., Esteban, E., Velasco, L., Lorite, M. J., Bedmar, E. J. (1997).** Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant and Soil*, 197(1), 19-23.
- Andrews, J. H., Harris, R. F. (2000).** The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual review of phytopathology*, 38(1), 145-180.
- Araujo, W. L., Maccheroni Jr, W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O., Azevedo, J. L. (2001).** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus root stocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(3), 229-236.
- Arnon, D. I. (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1-15.
- Arshad, M., Saleem, M., Hussain, S. (2007).** Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in biotechnology*, 25(8), 356-362.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., 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(3), 157-162.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, A., Islam, M. Z., Shahidullah, S. M., Meon, S. (2009).** Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), 1247-1252.
- Asis, C. A., Adachi, K. (2004).** Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology*, 38(1), 19-23.
- Asloum, H. (1990).** Elaboration d'un système de production maraichère (tomate, *lycopersicon esculentum* L.) en culture hors sol pour les régions sahariennes. Utilisation de substrats sableux et d'eaux saumâtres. Thèse de doctorat, université de Nice. France.
- Atlas, R. M. (2005).** Handbook of media for environmental microbiology. *CRC press*, Boca Raton, USA. 672p.

- Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J. P., Bashan, Y. (2004).** Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biology and Fertility of Soils*, 40(3), 188-193.
- Baig, D. N., Bukhari, D. A., Shakoory, 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
- Bajji, M. (1999).** Etude des mécanismes de résistance au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) caractérisation de cultivars différant par leurs niveaux de résistance á la sécheresse et de variants somaclonaux sélectionnés in vitro . Thèse de doctorat, Université catholique de Louvain, Belgique.
- Bakker, A. W., Schippers, B. (1987).** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(4), 451-457.
- Bal, H. B., Nayak, L., Das, S., Adhya, T. K. (2013).** Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*, 366(1-2), 93-105.
- Baldani, J. I., Baldani, V., Seldin, L., Döbereiner, J. (1986).** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(1), 86-93.
- Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A., Döbereiner, J. (2005).** Genus *Azospirillum*. In : Whitman, w. B (ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2<sup>nd</sup> edition. *Springer*, New York, USA. pp. 7-26.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., Baldani, V. L. D. (2014).** The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*, 384(1-2), 413-431.
- 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.
- Barka, E. A., Nowak, J., Clément, C. (2006).** Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7246-7252.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. S., Kalra, A. (2012).** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant physiology and biochemistry*, 58, 227-235.

- Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Römheld, V., Marschner, H. (1992).** Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. *Plant Physiology*, 100(1), 451-456.
- Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. A., Lobo, A. P., García-Villaraco, A., Mañero, F. J. G. (2008).** Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Plant nutrition*, 1-17.
- Bashan, Y., De-Bashan, L. E. (2005).** Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*, 1, 103-115.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997).** Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43(2), 103-121.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1998).** Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8), 1225-1228.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L. K., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia, L. M. P. (2008).** Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39(3), 311-320.
- Benhamou, N. (2009).** La résistance chez les plantes: principes de la stratégie défensive et applications agronomiques, 3 édition. *Tec & Doc*, Paris, France. 376p.
- 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.
- Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J. C. (2000).** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp). *Canadian Journal of Microbiology*, 46(3), 229-236.
- Bharti, N., Barnawal, D., Awasthi, A., Yadav, A., Kalra, A. (2014).** Plant growth promoting rhizobacteria alleviate salinity induced negative effects on growth, oil content and physiological status in *Mentha arvensis*. *Acta physiologiae plantarum*, 36(1), 45-60.
- 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.
- Bianco, C., Defez, R. (2009).** *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of experimental botany*, 60(11), 3097-3107.

- Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P. (1999).** Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 90(1), 108-125.
- Bouthiba, A., Debaeke, P. (2009).** Besoins en eau de différentes variétés de blé dur en conditions semi-arides. In : *Symposium international en Agriculture durable en région Méditerranéenne*, May 2009, (AGDUMED), Rabat, Maroc.
- Bouznad, A. (2016).** Isolement et caractérisation des rhizobactéries libres et endophytes (*Bacillus* sp et *Pseudomonas* sp): Etude de leur pouvoir protecteur vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* et leur caractères liés à la promotion de la croissance des plantes. Thèse de doctorat. Université de Mostaganem, Algérie. 174p.
- Bowen, G. D., Rovira, A. D. (1999).** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in agronomy*, 66, 1-102.
- Burd, G. I., Dixon, D. G., Glick, B. R. (2000).** Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian journal of microbiology*, 46(3), 237-245.
- Cappuccino, J.G, Sherman, N. (1992).** Biochemical activities of microorganisms. Microbiology, A Laboratory Manual. *Benjamin / Cummings Publishing Co*, California, USA. 462p.
- Castignetti, D., Smarrelli, J. (1986).** Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS letters*, 209(2), 147-151.
- Cavalcante, V. A., Dobereiner, J. (1988).** A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and soil*, 108(1), 23-31.
- Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M. P. (1993).** Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian journal of microbiology*, 39(10), 941-947.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. (2007).** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 330-339.
- Chellali, B. (2007).** Marché mondial des céréales: L'Algérie assure sa sécurité alimentaire. Algérie
- Cherbuy, B. (1991).** Les sols sales et leur rehabilitation: etude bibliographique. *CEMAGREF*. France.
- 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 .162p.

- Cicek, N., Cakirlar, H. (2002).** The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 28(1-2), 66-74.
- Clarridge, J. E. (2004).** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
- Claussen, W. (2005).** Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*, 168(1), 241-248.
- Cocking, E. C. (2005).** Intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(4), 369-373.
- 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.
- Crowe, J. H. (2007).** Trehalose as a chemical chaperone. *In* : Csermely, P., Vigh, L. (Eds.). *Molecular aspects of the stress response: Chaperones, membranes and networks* . Springer-Verlag, New York, USA. pp. 143-158.
- Curl, E. A., Truelove, B. (1986).** The rhizosphere : Advanced series in agriculture sciences. Springer-Verlag. USA. 298p.
- Dakora, F. D. (2003).** Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytologist*, 158(1), 39-49.
- Dardanelli, M. S., de Cordoba, F. J. F., Espuny, M. R., Carvajal, M. A. R., Díaz, M. E. S., Serrano, A. M. G., et al., (2008).** Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2713-2721.
- Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Collection Mieux Comprendre. Inra Edition, Paris, France. 383p.
- De-Bashan, L. E., Antoun, H., Bashan, Y. (2008).** Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *azospirillum* spp. *In* : promoting growth of *chlorella vulgaris*1. *Journal of Phycology*, 44(4), 938-947.
- Denton, B. P. (2007).** Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *Basic Biotechnology eJournal*, 3(1), 1-5.
- 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.
- Döbereiner, J., Day, J. M. (1976).** Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *In* : *Proceedings of the*

- 1st international symposium on nitrogen fixation* (Vol. 2, pp. 518-538). Washington State University Press Pullman, USA.
- Dodd, I. C., Zinovkina, N. Y., Safronova, V. I., Belimov, A. A. (2010).** Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, 157(3), 361-379.
- Douaoui, A. E. K., Nicolas, H., Walter, C. (2006).** Detecting salinity hazards within a semiarid context by means of combining soil and remote-sensing data. *Geoderma*, 134(1), 217-230.
- Douka, C. E., Apostolakis, C. G., Skarloy, V. D. (1978).** Studies of *Rhizobium meliloti* isolated from salt-affected soils. *Annals of Applied Biology*, 88(3), 457-460.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P. (2001).** Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 925-932.
- Duffy, B. K., Ownley, B. H., Weller, D. M. (1997).** Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology*, 87(11), 1118-1124.
- Egamberdieva, D., Lugtenberg, B. (2014).** Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants. In : Miransari, M. (ed.), Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1. *Springer*, New York, USA. pp. 73-96.
- Egamberdiyeva, D., Garfurova, I., ISLAM, K. (2007).** Salinity effects on irrigated soil chemical and biological properties in the Aral Sea basin of Uzbekistan. *Climate Change and Terrestrial Carbon Sequestration in Central Asia*, 147, 147-162.
- 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*, 8, 1517-1525.
- Evelin, H., Kapoor, R., Giri, B. (2009).** Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of botany*, 104(7), 1263-1280.
- Fayez, M. (1990).** Untraditional N<sub>2</sub>-fixing bacteria as biofertilizers for wheat and barley. *Folia Microbiologica*, 35(3), 218-226.
- Feillet, P. (2000).** Le grain de blé: composition et utilisation. *Quae*, Paris France. 308p.
- Feng, G., Zhang, F., Li, X., Tian, C., Tang, C., Rengel, Z. (2002).** Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*, 12(4), 185-190.
- Ferus, P., Arkosiova, M. (2001).** Variability of chlorophyll content under fluctuating environment. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 4(2), 123-125.

- Filep, G. Y., (1999).** Relationship between the chemical properties of salt-affected soils. *Agrokémia és Talajtan*, 43, 419–430.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., Rock, C. D. (2002).** Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S15-S45.
- Flaishman, M. A., Eyal, Z., Zilberstein, A., Voisard, C., Haas, D. (1996).** Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 9(7), 642-645.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M. L., Courrier, S., Roux, C. L., Raaijmakers, J., et al., (2005).** Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New phytologist*, 165(1), 317-328.
- 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
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. (2005).** Class I. Alphaproteobacteria class. nov. *In* : Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition, Volume 2 (The Proteobacteria), Part C (The Alpha-Proteobacteria)*. Springer, New York, USA. pp. 1-574.
- George, P., Gupta, A., Gopal, M., Thomas, L., Thomas, G. V. (2013).** Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 109-117.
- Gholami, A., Biyari, A., Gholipoor, 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.
- Gholami, A., Shahsavani, S., Nezarat, S. (2009).** The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Biological Sciences*, 1(1), 35-40.
- Gilbert, G. S., Parke, J. L., Clayton, M. K., Handelsman, J. (1993).** Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*, 74(3), 840-854
- Glick, B. R. (2005).** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbiology letters*, 251(1), 1-7.
- Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 1-15.
- 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., Patten, C. L., Holguin, G., Penrose, D. M. (1999).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *World Scientific*, London, UK. 267p.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., Li, J. (1998).** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63-68.
- Gobat, J. M., Aragno, M., Matthey, W. (2010).** Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols (Vol. 14), 3<sup>ème</sup> édition. *PPUR Presses polytechniques*. France. 817p.
- 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, A., Saxena, A. K., Gopal, M., Tilak, K. V. B. R. (1998).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on competitive ability of introduced *Bradyrhizobium* sp.(Vigna) for nodulation. *Microbiological research*, 153(2), 113-117.
- Haas, D., Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.
- Habib, N., Akram, M., Javed, M., Azeem, M., Ali, Q., Shaheen, H., & Ashraf, M. (2016).** Nitric oxide regulated improvement in growth and yield of rice plants grown under salinity stress: antioxidant defense system. *Applied ecology and environmental research*, 14(5), 91-105.
- Hafeez, F. Y., Safdar, M. E., Chaudhry, A. U., Malik, K. A. (2004).** Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Animal Production Science*, 44(6), 617-622.
- Hafeez, F. Y., Yasmin, S., Ariani, D., Zafar, Y., Malik, K. A. (2006).** Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for sustainable development*, 26(2), 143-150
- Hamdia, M. A. E. S., Shaddad, M. A. K., Doaa, M. M. (2004).** Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regulation*, 44(2), 165-174.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., Reddy, G. (2008).** Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological research*, 163(2), 234-242.
- Hanna, A. L., Youssef, H. H., Amer, W. M., Monib, M., Fayez, M., Hegazi, N. A. (2013).** Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts, Egypt. *Journal of advanced research*, 4(1), 13-26.

- Haruna Ahmed, O., Husin, A., Husni Mohd Hanif, A. (2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 58(2), 182-186.
- 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.
- Hiltner, L. (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., Marschner, P. (2006).** Rhizosphere--perspectives and Challenges--a Tribute to Lorenz Hiltner 12-17 September 2004--Munich, Germany. *Plant and Soil*, 283(1-2).
- Hinton, D. M., Bacon, C. W. (1995).** *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129(2), 117-125.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. (2000).** Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3), 624-653.
- Hirsch, A. M., Bauer, W. D., Bird, D. M., Cullimore, J., Tyler, B., Yoder, J. I. (2003).** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, 84(4), 858-868.
- Hirsch, A. M., Larue, T. A., Doyle, J. (1997).** Is the legume nodule a modified root or stem or an organ sui generis ?. *Critical reviews in plant sciences*, 16(4), 361-392.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950).** The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347,1-32.
- Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. *De Boeck université*, Paris, France. 514p.
- Hua, S. S. T., Tsai, V. Y., Lichens, G. M., Noma, A. T. (1982).** Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 135-140.
- Hugenholtz, P. (2002).** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), 1-8.
- Huss-Danell, K. (1990).** The physiology of actinorhizal nodules. *The biology of Frankia and actinorhizal plants*, 129-156.
- 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.
- Ilyas, N., Bano, A., Iqbal, S., Raja, N. I. (2012).** Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* spp. isolated from maize under water stress. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 71-80.

- Inam-ul-Haq, M., Mehmood, S., Rehman, H. M., Ali, Z. A. H. I. D., Tahir, M. I. (2012).** Incidence of root rot diseases of soybean in Multan, Pakistan and its management by the use of plant growth promoting rhizobacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 44(6), 2077-2080.
- Iniguez, A. L., Dong, Y., Carter, H. D., Ahmer, B. M., Stone, J. M., Triplett, E. W. (2005).** Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(2), 169-178.
- Islam, M. R., Madhaiyan, M., Deka, B. H., Yim, W., Lee, G., Saravanan, V. S., et al., (2009).** Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(10), 1213-1222.
- Jackson, M.L. (1958).** Soil Chemical Analysis. *Prentice Hall of Englewood cliffs*, New Jersey, USA. 500p.
- Jacobson, C. B., Pasternak, J. J., Glick, B. R. (1994).** Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(12), 1019-1025.
- Jahromi, F., Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J. M. (2008).** Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology*, 55(1), 45-53.
- James, E. K. (2000).** Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field crops research*, 65(2), 197-209.
- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., Foolad, M. R. (2011).** Gene expression profiling of plants under salt stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(5), 435-458.
- 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.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J. M. (2003).** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and fertility of soils*, 37(1), 1-16.
- Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., Saraf, M. (2011).** *Enterobacter*: role in plant growth promotion. In : Maheshwari, D. K (ed.). *Bacteria in agrobiology: Plant growth responses*. Springer Berlin Heidelberg, Germany. pp. 159-182.
- Ji, S. H., Gururani, M. A., Chun, S. C. (2014).** Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological research*, 169(1), 83-98.

- Johri, B., Sharma, A., Viridi, J. (2003).** Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Biotechnology in India I*, 49-89.
- Jourdan, E., Ongena, M., Thonart, P. (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12(4), 437-449.
- Kanwal, S., Ilyas, N., Ahmad, B., Batool, N., Arshad, M. (2016).** Alleviation of Drought Stress in Wheat by Comined Application of PGPR, Compost and Mineral Fertilizer Stress in Wheat. *Journal of Plant Nutrition*, (accepted).
- Keneni, A., Assefa, F., Prabu, P. C. (2010).** Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *faba bean* of Ethiopia and their abilities on solubilizing insoluble phosphates. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12, 79-89.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., Kecskés, M. L. (2004).** Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1229-1244.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., Ahemad, M., Oves, M. (2009).** Microbial Strategies for Crop Improvement. *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg, Germany. 371p.
- Kiani, M. Z., Sultan, T. A. R. I. Q., Ali, A., Rizvi, Z. F. (2016).** Application of acc-deaminase containing pgpr improves sunflower yield under natural salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*, 48(1), 53-56.
- Kloepper, J. W., McInroy, J. A., Bowen, K. L. (1992).** Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant and Soil*, 139(1), 85-90.
- Koch, B., Evans, H. J. (1966).** Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiology*, 41(10), 1748.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., Azevedo, J. L. (2004).** Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1244-1251.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B. N. (2011).** Bacillus as PGPR in crop ecosystem. In : Maheshwari, D. K. (Ed.). Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems. *Springer Berlin Heidelberg*, Germany. pp. 37-59.
- Laslo, É., György, É., Mara, G., Tamás, É., Ábrahám, B., Lányi, S. (2012).** Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection*, 40, 43-48.

- Lewis, J. A. (1991).** Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. In : Donald, L. Ke., Perry, B. C (eds.). The rhizosphere and plant growth. Springer, Netherlands. pp. 279-287.
- Li, F. H., Benhur, M., Keren, R. (2003).** Effect of marginal water irrigation on soil salinity, sodicity and crop yield. *Transactions of Chinese Society of Agricultural Engineering*, 19, 63-66.
- Lindow, S. E., Brandl, M. T. (2003).** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 1875-1883.
- Loper, J. E., Schroth, M. N. (1986).** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76(4), 386-389.
- Lopez, C. S., Heras, H., Garda, H., Ruzal, S., Sanchez-Rivas, C., Rivas, E. (2000).** Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *International journal of food microbiology*, 55(1), 137-142.
- Lugtenberg, B. J., Chin-A-Woeng, T. F., Bloemberg, G. V. (2002).** Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 373-383.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009).** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Luuml, C., Huang, B. (2010).** Isolation and characterization of Azotobacteria from pine rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research*, 4(12), 1299-1306.
- Ma, J. H., Yao, J. L., Cohen, D., Morris, B. (1998).** Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Reports*, 17(3), 211-214.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Brock, T. D., Brock, T. D. (2007).** Biologie des micro-organismes. Pearson Education, Paris. France. 1088p.
- Madigan, M. T., Orent, A. (1999).** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 265-269.
- Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A., Rahim, N. (2015).** Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in microbiology*, 6, 198.
- Malik, K. A., Bilal, R., Mehnaz, S., Rasul, G., Mirza, M. S., Ali, S. (1997).** Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant and Soil*, 194(1-2), 37-44.
- Manchanda, G., Garg, N. (2008).** Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 595-618.
- Manjula, K., Podile, A. R. (2001).** Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(7), 618-625.

- Marschner, P., Yang, C. H., Lieberei, R., Crowley, D. E. (2001).** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1437-1445.
- Martinez-Toledo, M. V., Gonzalez-Lopez, J., Rubia, T., Ramos-Cormenzana, A. (1985).** Isolation and characterization of *Azotobacter chroococcum* from the roots of *Zea mays*. *FEMS Microbiology Letters*, 31(4), 197-203.
- Mavrodi, O. V., Walter, N., Elateek, S., Taylor, C. G., Okubara, P. A. (2012).** Suppression of Rhizoctonia and Pythium root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological control*, 62(2), 93-102.
- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B. R. (2004).** Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-572.
- McInroy, J. A., Kloepper, J. W. (1995).** Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and soil*, 173(2), 337-342.
- Mehnaz, S., Mirza, M. S., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Bano, A., Malik, K. A. (2001).** Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian journal of microbiology*, 47(2), 110-117.
- Mekhlouf, A., Bouzerzour, H., Benmahammed, A., Sahraoui, A. H., Harkati, N. (2006).** Adaptation des variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) au climat semi-aride. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 17(4), 507-513.
- Miransari, M. (2011).** Soil microbes and plant fertilization. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(5), 875-885.
- Mohamed, H. I., Gomaa, E. Z. (2012).** Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica*, 50(2), 263-272.
- Moreira, F. D. S., Costa, P. B. D., Souza, R. D., Beneduzi, A., Lisboa, B. B., Vargas, L. K., Passaglia, L. M. (2016).** Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *Genetics and molecular biology*, 39(1), 111-121.
- Mouellef, A. (2010).** Caracteres physiologiques et biochimiques de tolérance du blé dur (*Triticum durum* Desf.) au stress hydrique. *Mémoire de magistère*, Université Mentouri, Constantine, Algérie.
- 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.

- Moutia, J. F. Y., Saumtally, S., Spaepen, S., Vanderleyden, J. (2010).** Plant growth promotion by *Azospirillum sp.* in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and soil*, 337(1-2), 233-242.
- Muthukumarasamy, R., Kang, U. G., Park, K. D., Jeon, W. T., Park, C. Y., Cho, Y. S., et al., (2007).** Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *Journal of applied microbiology*, 102(4), 981-991.
- Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., et al., (2014).** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium sp.* strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology*, 61, 20-26.
- Nadeem, S. M., Naveed, M., Ahmad, M., Zahir, Z. A. (2015).** Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects. In : Arora, N. K (ed.). *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer, India. pp. 1-36
- Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., Arshad, M. (2007).** Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(10), 1141-1149.
- Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., Arshad, M. (2009).** Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Canadian journal of microbiology*, 55(11), 1302-1309.
- 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. D., Siddiqui, Z. A. (2005).** Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In : Siddiqui, Z. A. (ed.). *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Springer, Netherlands. pp. 257-296.
- Nana, R., Tamini, Z., Sawadogo, M. (2009).** Effets d'un stress hydrique intervenu pendant le stade végétatif et la phase de floraison chez le gombo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(5), 1161-1170.
- 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.

- Naureen, Z., Yasmin, S., Hameed, S., Malik, K. A., Hafeez, F. Y. (2005).** Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of maize grown in Indonesian and Pakistani soils. *Journal of basic microbiology*, 45(6), 447-459.
- Nautiyal, C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Neilands, J. B., Konopka, K., Schwyn, B., Coy, M., Francis, R. T., Paw, B. H., Bagg, A. (1987).** Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. In : Winkelmann, G., Van der Helm, D., Neilands, J. B. (Eds.) Iron transport in microbes, plants, and animals. VCH, New York, USA. pp. 3-33.
- Neilands, J. B., Leong, S. A. (1986).** Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 187-208.
- Nellemann, C., Hain, S., Alder, J. (2008).** In dead water: emerging of climate change with pollution, over-harvest, and infestations in the world's fishing grounds. *UNEP/Earthprint*, Arendal, Norway. 64p.
- Nguyen, C., Yan, W., Tacon, F., Lapeyrie, F. (1992).** Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PD Orton. *Plant and Soil*, 143(2), 193-199.
- Nisha, K., Padma Devi, S. N., Vasandha, S. Sunitha kumari K (2014).** Role of Phosphorous Solubilizing Microorganisms to Eradicate P-Deficiency in Plants: A Review. *International Journal of Science and Research*, 4, 1-5.
- Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanohoun, A., Baba-Moussa, L. (2016).** Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 15(27), 1452-1463.
- O'sullivan, D. J., O'gara, F. (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews*, 56(4), 662-676.
- Olsen, G. J., Woese, C. R. (1993).** Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB journal*, 7(1), 113-123.
- Palaniyandi, S. A., Damodharan, K., Yang, S. H., Suh, J. W. (2014).** *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *Journal of applied microbiology*, 117(3), 766-773.
- Palleroni, N. J., Bradbury, J. F. (1993).** *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(3), 606-609.
- Paramanandham, P., Rajkumari, J., Pattnaik, S., Busi, S. (2017).** Biocontrol Potential Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* and Tomato Plant

- Growth Due to Plant Growth–Promoting Rhizobacteria. *International Journal of Vegetable Science*, 1-10.
- Parida, A. K., Das, A. B. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- Parida, A. K., Das, A. B., Mitra, B. (2004).** Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees*, 18(2), 167-174.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., Sa, T. (2005).** Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2), 127-133.
- Patel, D., Jha, C. K., Tank, N., Saraf, M. (2012).** Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of plant growth regulation*, 31(1), 53-62.
- Patten, C. L., Glick, B. R. (1996).** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 207-220.
- Patten, C. L., Glick, B. R. (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Paul, D., Nair, S. (2008).** Stress adaptations in a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *Journal of basic microbiology*, 48(5), 378-384.
- Pedraza, R. O. (2008).** Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 125(1), 25-35.
- 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.
- Perez-Alfocea, F., Albacete, A., Ghanem, M. E., Dodd, I. C. (2010).** Hormonal regulation of source–sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Functional Plant Biology*, 37(7), 592-603.
- Perry, J. J., Stanley, J. T., Lory, S., Grandadam, M. (2004).** Microbiologie: cours et questions de révision. *Dunod*, Paris, France. 891p.
- Petti, C. A. (2007).** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 44, 1108- 1114.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., Gullino, M. L. (1997).** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 131-140.

- Pikovskaya, R.I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species, *Microbiologiya*, 17, 362–370.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., Ruzal, S. M. (2005).** Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of applied microbiology*, 98(1), 84-95.
- Pliego, C., Kamilova, F., Lugtenberg, B. (2011).** Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. In : Maheshwari, D. K (eds.). *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems*. Springer Berlin Heidelberg, Germany. pp. 295-343.
- Pujic, P., Normand, P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*, (298), 26-29.
- Qados, A. M. A. (2011).** Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1), 7-15.
- Quadt-Hallmann, A., Kloepper, J. W. (1996).** Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(11), 1144-1154.
- Rajput, L., Imran, A., Mubeen, F., Hafeez, F. (2013).** Salt-tolerant PGPR strain *Planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil. *Pakistan Journal of Botany*, 45(6), 1955-1962.
- Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (2000).** *Biologie végétale. De Boeck Supérieur*. Paris, France. 968p.
- Reddy, P. M., Ladha, J. K. (1995).** Can Symbiotic Nitrogen Fixation be Extended to Rice. In : Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen fixation: fundamentals and applications, St. Petersburg, Russia, May 28–June 3, 1995. *Springer Netherlands*. pp. 629-633.
- Reiter, B., Bürgmann, H., Burg, K., Sessitsch, A. (2003).** Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. *Canadian journal of microbiology*, 49(9), 549-555.
- 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.
- Ribbe, M., Gadkari, D., Meyer, O. (1997).** N<sub>2</sub> Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase That Couple N<sub>2</sub> Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O<sub>2</sub> by a Molybdenum-CO Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26627-26633.
- Rodriguez, H., Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4), 319-339.

- Roesch, L. F. W., Camargo, F. A., Bento, F. M., Triplett, E. W. (2008).** Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant and Soil*, 302(1-2), 91-104.
- Roessler, M., Müller, V. (2001).** Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental microbiology*, 3(12), 743-754.
- 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.
- Rosales, A. M., Vantomme, R., Swings, J., Ley, J. D., Mew, T. W. (1993).** Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*, 138(3), 189-208.
- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., Martínez-Romero, E. (2004).** *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and applied microbiology*, 27(1), 27-35.
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6), 309-317.
- Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R., Azcón, C., Aroca, R. (2012).** Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 4033-4044.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., Dowling, D. N. (2008).** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- 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.
- Sandhya, V., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B. (2009).** Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and fertility of soils*, 46(1), 17-26.
- Sarathambal, C., Ilamurugu, K., Balachandar, D., Chinnadurai, C., Gharde, Y. (2015).** Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. *Applied Soil Ecology*, 87, 1-10.

- Saravanakumar, D., Samiyappan, R. (2007).** ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1283-1292.
- 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.
- Schwyn, B., Neilands, J. B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Selvakumar, G., Kim, K., Hu, S., Sa, T. (2014).** Effect of salinity on plants and the role of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria in alleviation of salt stress. In : Ahmad, P., Wani, M. R (eds.). *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*. Springer, New York, USA. pp115-144.
- Shabala, S., Cuin, T. A. (2008).** Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 651-669.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A., Fatkhutdinova, D. R. (2003).** Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*, 164(3), 317-322.
- Shanmugam, V., Kanoujia, N. (2011).** Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control*, 57(2), 85-93.
- Shaterian, J., Waterer, D., De Jong, H., Tanino, K. K. (2005).** Differential stress responses to NaCl salt application in early-and late-maturing diploid potato (*Solanum* sp.) clones. *Environmental and experimental botany*, 54(3), 202-212.
- Shenoy, V. V., Kalagudi, G. M., Gurudatta, B. V. (2001).** Towards nitrogen autotrophic rice. *Current science*, 81, 451-457.
- 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, Z. A., Mahmood, I. (1999).** Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 69(2), 167-179.
- Singh, J. S., Pandey, V. C., Singh, D. P. (2011).** Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, ecosystems & environment*, 140(3), 339-353.

- Singh, R. P., Jha, P. N. (2016a).** Mitigation of salt stress in wheat plant (*Triticum aestivum*) by ACC deaminase bacterium *Enterobacter* sp. SBP-6 isolated from Sorghum bicolor. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(5), 1-12.
- Singh, R. P., Jha, P. N. (2016b).** 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.
- Singleton, P. (2004).** Bacteria in biology, biotechnology and medicine (No. Ed. 6). *John Wiley & Sons*, UK, 559p.
- Singleton, P., Dusart, J. (1999).** Bactériologie, 4ème édition. *Dunod*, Paris, France. 542p.
- Slama, A., Salem, M. B., Zid, E. (2005).** Les céréales en Tunisie: production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 16(3), 225-229.
- Soltani, A. A., Khavazi, K., Asadi-Rahmani, H., Alikhani, H. A., Omidvari, M., Dahaji, P. A. (2012).** Evaluation of biological control traits in some isolates of *Fluorescent Pseudomonads* and *flavobacterium*. *Journal of Agricultural Science*, 4(1), 164-170.
- Soulé, B. G., Yérima, B., Soglo, A., Vidéglá, E. (2008).** Rapport diagnostic du secteur agricole du Bénin: Synthèse réalisée dans le cadre de la formulation du PNIA. *ECOWAP/PDDAA*. Bénin.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448.
- Sprent, J. I. (2001).** Nodulation in legumes. *Royal Botanic Gardens*.UK. 364p.
- 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.
- Suckstorff, I., Berg, G. (2003).** Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *Journal of applied microbiology*, 95(4), 656-663.
- Sziderics, A. H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., Wilhelm, E. (2007).** Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian journal of microbiology*, 53(11), 1195-1202.
- 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), 1284–1292.

- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004).** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(30), 11030-11035.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, *30*(12), 2725-2729.
- Thakur, D., Kaur, M., Mishra, A. (2017).** Isolation and screening of plant growth promoting *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. and their effect on growth, rhizospheric population and phosphorous concentration of *Aloe vera*. *Journal of Medicinal Plants*, *5*(1), 187-192.
- Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Nautiyal, C. S., et al. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current science*, *89*(1), 136-150.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2003).** Introduction à la microbiologie. *Saint-Laurent*, Québec, Canada. 920p.
- Tripathi, A. K., Nagarajan, T., Verma, S. C., Rudulier, D. L. (2002).** Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasilense* Sp7 under salinity stress. *Current microbiology*, *44*(5), 363-367.
- Unkovich, M., Herridge, D. A. V. I. D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., et al., (2008).** Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. *Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*. Canberra, Australia. 258p.
- Upadhyay, S. K., Maurya, S. K., Singh, D. P. (2012).** Salinity tolerance in free living plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Scientific Research*, *3*(2), **73-78**.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Singh, D. P. (2011).** Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, *21*(2), 214-222.
- Van Loon, L. C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, *119*(3), 243-254.
- Vanpeene-Bruhier, S. (2003).** Réaménagement forestier des carrières de granulats. *Quae*, Canada. 319p.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A. (2016).** Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in agricultural sustainability. *Molecules*, *21*(5), 573.
- Venieraki, A., Dimou, M., Pergalis, P., Kefalogianni, I., Chatzipavlidis, I., Katinakis, P. (2011).** The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial ecology*, *61*(2), 277-285.

- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008).** Proline accumulation in plants. *Amino acids*, 35(4), 753-759.
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., Jaiswal, D. K. (2014).** Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 33-37.
- Verma, P., Yadav, A. N., Khannam, K. S., Kumar, S., Saxena, A. K., Suman, A. (2016).** Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *Journal of basic microbiology*, 56(1), 44-58.
- Verma, P., Yadav, A. N., Khannam, K. S., Panjiar, N., Kumar, S., Saxena, A. K., Suman, A. (2015).** Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Annals of microbiology*, 65(4), 1885-1899.
- Verma, S. C., Singh, A., Chowdhury, S. P., Tripathi, A. K. (2004).** Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology letters*, 26(5), 425-429.
- Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Vilain, M. (1997).** Plant production. Volume 1: the components of production, 3<sup>ème</sup> édition. *Technique et Documentation Lavoisier*. Paris, France. 478p.
- 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), 351-358.
- Wadleigh, C. H., Fireman, M. (1949).** Salt distribution under furrow and basin irrigated cotton and its effect on water removal. *Soil Science Society of America Journal*, 13, 527-530.
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., Glass, A. D. (1993).** Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of  $^{13}\text{NH}_4^+$  influx across the plasmalemma). *Plant physiology*, 103(4), 1259-1267.
- Welbaum, G. E., Sturz, A. V., Dong, Z., Nowak, J. (2004).** Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2), 175-193.
- Werner, D. (1992).** Symbiosis of plants and microbes. *Chapman & Hall*. London. UK, 389p.
- Weyens, N., Croes, S., Dupae, J., Newman, L., van der Lelie, D., Carleer, R., Vangronsveld, J. (2010).** Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination. *Environmental Pollution*, 158(7), 2422-2427.

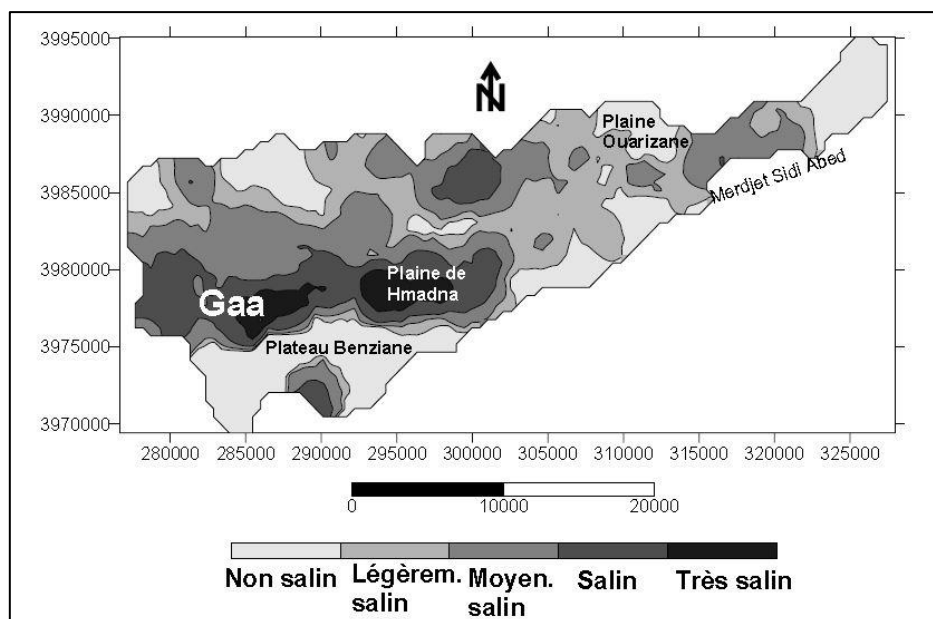
- Whipps, J. M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl 1), 487-511.
- Wu, C. H., Wood, T. K., Mulchandani, A., Chen, W. (2006).** Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1129-1134.
- Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., Wong, M. H. (2005).** Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1), 155-166.
- Yang, Y., Li, X. M., Sun, Z. H., Yang, T., Tan, Z. L., Wang, B. F et al., (2012).** The growth performance and meat quality of goats fed diets based on maize or wheat grain. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21(4), 587-598.
- Yasmin, S., Hafeez, F., Schmid, M., Hartmann, A. (2013).** Plant-beneficial rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizers. *Pakistan Journal of Botany*, 45(2), 655-662.
- Yue, H., Mo, W., Li, C., Zheng, Y., Li, H. (2007).** The salt stress relief and growth promotion effect of Rs-5 on cotton. *Plant and Soil*, 297(1-2), 139-145.
- Zahir, Z. A., Arshad, M., Frankenberger, W. T. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81, 97-168.
- Zhang, Z., Rosenhouse-Dantsker, A., Tang, Q. Y., Noskov, S., Logothetis, D. E. (2010).** The RCK2 domain uses a coordination site present in Kir channels to confer sodium sensitivity to Slo2. 2 channels. *The Journal of Neuroscience*, 30(22), 7554-7562.
- 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(12), 4504-4513.



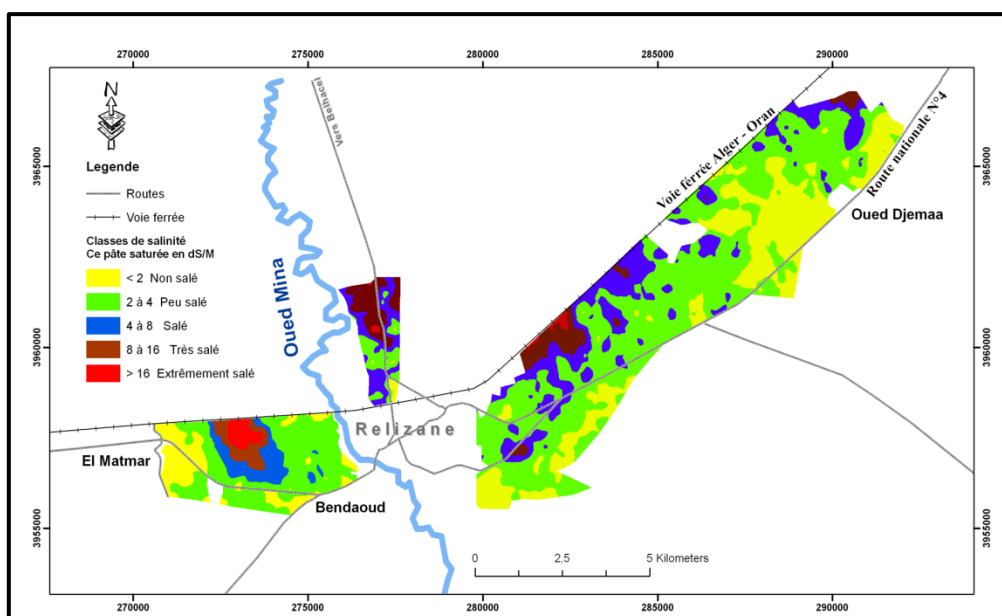
*Annexes*

## Annexe I : carte de salinité

### 1. Carte de salinité de la plaine du bas-Cheliff



### 2. Carte de salinité de la plaine de la mina



## Annexe II: composition des milieux de cultures

### 1. Milieu NF (par litre)

Acide malique .....	5g
KOH.....	4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,02g
NaCl .....	0,1g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5g
Bleu de bromothymol dans (solution KOH 2N) .....	2 ml
NaMoO <sub>4</sub> .....	2mg
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	10mg
pH= 6,8± 0,2.	

### 2. Gélose Ashby (par litre)

Mannitol .....	20g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.20g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.20g
NaCl .....	0.20g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.10g
CaCO <sub>3</sub> .....	5g
pH 7.2± 0,2.	

### 3. Gélose Beurk (par litre)

Glucose.....	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,64g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,16g
NaCl.....	0,2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,05g
CaSO <sub>4</sub> .....	0,05g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,01g
Fe SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,003g
PH = 7± 0,2.	

**4. Gélose nutritif (par litre)**

Peptone .....	10g
NaCl.....	5g
Extrait de levure.....	3g
Extrait de viande .....	3g
PH = 7± 0,2.	

**5. PBS(par litre)**

NaCl.....	8g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,24g
KCl.....	0,25g

**6. Bouillon NBRIP (par litre)**

Glucose.....	10g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.25g
KCl.....	0.2g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	5.0g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> .....	5.0g
PH = 7± 0,2.	

**7. Gélose PVK (par litre)**

Glucose .....	10g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O.....	5g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5g
KCl .....	0,2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,1g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0.004g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0.002g
NaCl .....	0,20g
Extrait de levure .....	0.5g
Pourpre de bromocrésol.....	0,1g
PH = 7± 0,2.	

**8. L'eau peptonée exempte d'indole (par litre)**

Tryptone.....	10,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
pH = 7,2 ± 0,2.	

**9. Milieu Minéral Minimum Dworkin-Foster(DF) (par litre)**

Glucose.....	2 g
Acide gluconique .....	2 g
Acide citrique.....	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.2 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	1 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	10 µg
MnSO <sub>4</sub> .....	10 µg
ZnSO <sub>4</sub> .....	70 µg
CuSO <sub>4</sub> .....	50 µg
MoO <sub>3</sub> .....	10 µg
PH = 7± 0,2.	

**10. Milieu King B**

Peptone de caséine .....	10,0 g
Peptone de viande.....	10,0 g
Glycérol.....	10,0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O .....	1,5 g
pH= 7± 0,2.	

### **Annexe III : Méthode d'extraction de l'ADN**

Le kit NucleoSpin® Microbial DNA a été utilisé pour l'isolement de l'ADN génomique à partir des échantillons microbiens

- **Composition du kit**

1. Tampon de lyse MG 38 mL
2. Tampon de lavage BW 30 mL
3. Tampon de lavage B5 (concentré) \* 6 mL
4. Tampon d'éluion BE \*\* 30 mL
5. Liquid Proteinase K 600 µL
6. Tubes de perles NucleoSpin® Type B50
7. NucleoSpin® Colonnes d'ADN microbien (Anneaux vert clair) 50
8. Tubes de collecte (2 ml) 100

- **Protocole :**

Récolter les cellules d'une culture par centrifugation dans un tube epindorf, jeter le surnageant puis ajouter 100 µL de tampon d'éluion BE et remettre les cellules en suspension.

- Transférer la suspension de cellules dans le tube de perles NucleoSpin® type B, et ajouter 40 µL de tampon MG. Ensuite, ajoutez 10 µL de liquide protéinase K et fermez le tube.
- Agiter les tubes de perle NucleoSpin® sur une fraise oscillante ou un dispositif similaire
- Centrifuger le tube de perles NucleoSpin® à 11000x g pendant 30s pour nettoyer le couvercle.
- Ajouter 600 µl de Buffer MG et mélanger (vortex pendant 3 s). Centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g.
- Transférer le surnageant (~500-600µL) sur la colonne d'ADN microbien NucleoSpin® déjà placé dans un tube de collecte de 2 mL
- Centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g. Jeter le tube de collecte avec écoulement.
- Mettez la colonne dans un tube de collecte frais
- Lavage des membranes de silice

- **1er lavage**

Ajouter 500 µL de tampon BW puis centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g. Jeter l'effluent et remettre la colonne dans le tube de collecte.

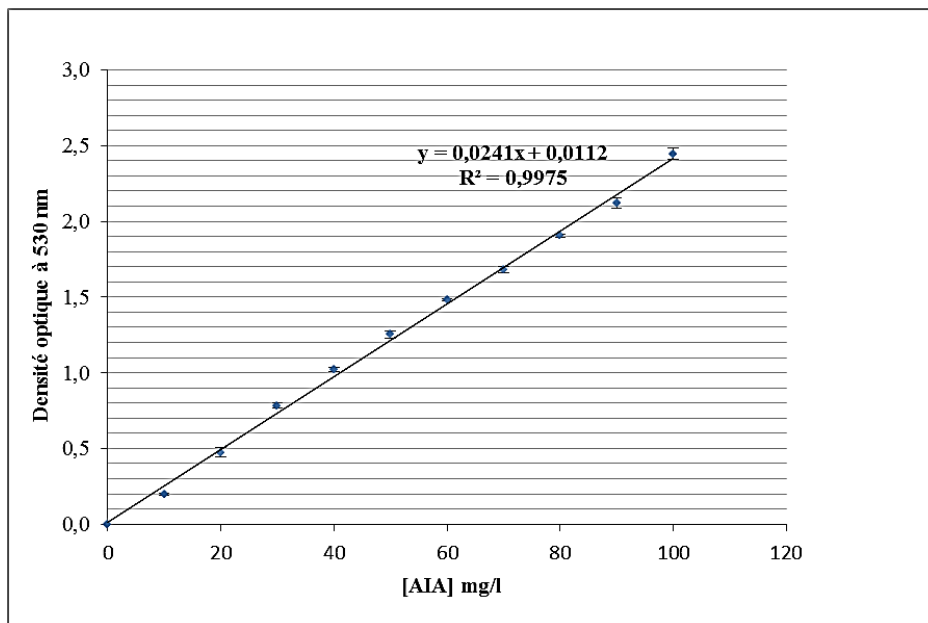
- **2e lavage**

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

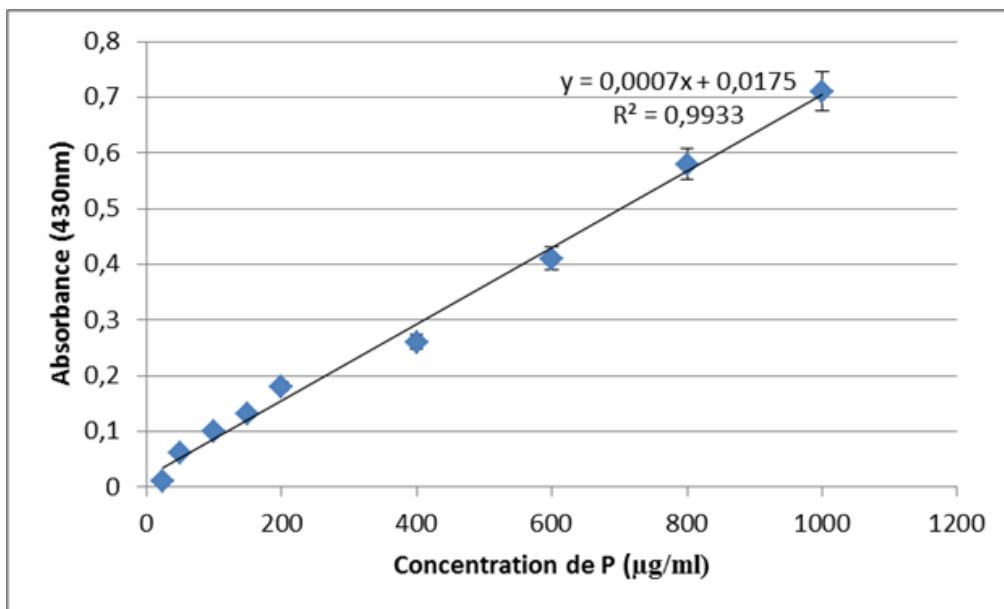
- Centrifuger les colonnes pendant 30 s à 11 000 x g pour sécher les membranes de silice.
- Pour l'éluion de l'ADN pur, placer la colonne d'ADN microbien NucleoSpin® dans un tube de 1,5 mL sans nuclease et ajouter 100 µL de tampon BE sur la colonne. Incuber à température ambiante pendant 1 min puis centrifuger à 11 000 x g pendant 30 s.

• **Annexe IV : courbes d'étalonnages**

1. Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA



2. Courbe étalon pour la détermination de la concentration du phosphate libre



**Annexe V: Réactifs de Barton**

**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 puis ajouter 125 ml d'acide nitrique à 60%.

**La réaction de Vanado-molybdate (Barton):**

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 VI : Préparation du milieu Chrom azurol S (CAS)**

La gélose CAS a été préparée à partir de quatre solutions qui ont été stérilisées séparément avant d'être mélangé.

- La solution d'indicateur de Fe-CAS (solution 1) a été préparée en mélangeant 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 1mM (dans l'HCl à 10 mM) avec 50 ml d'une solution aqueuse de CAS (1,21 mg/ml). Le mélange violet foncé obtenu a été ajouté lentement, sous agitation constante, à 40 ml d'une solution aqueuse de HDTMA (1,82 mg/ml). ensuite le mélange a été autoclavé, puis refroidie à 50°C.
- La solution tampon (solution 2) 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% ensuite le volume a été ajusté à 800 ml par l'eau distillé. La solution a été autoclavée après addition de 15 g d'agar, puis refroidie à 50°C
- La solution 3 contient (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, refroidie à 50°C puis ajoutée à la solution tampon avec 30 ml de tryptone à 10% (w: v) stérilisés par filtration.
- La solution d'indicateur de Fe-CAS a été ajoutée en dernier, avec agitation suffisante pour mélanger les ingrédients sans former de bulles.

**Annexe VII: Composition de la solution nutritive d'Hoagland**1. **Composition de la solution.**

	<b>par litre</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	5 ml d'une solution de 1 M
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> .4H<sub>2</sub>O</b>	5 ml d'une solution de 1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1 ml d'une solution de 1 M
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	2 ml d'une solution de 1 M
<b>microélément</b>	1 ml d'une solution de stock solution
<b>Fe-EDTA</b>	5 ml d'une solution de 1000 mg/l

2. **Composition du stock solution pour microélément.**

stock solution (microélément)	<b>par litre</b>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	2.86 g
<b>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	1.81 g
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.22 g
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0.08 g
<b>MoO<sub>3</sub></b>	0.02 g

**Annexe VIII : tableaux des analyses statistiques (ANOVA)****Tableau 1** : l'analyse de la variance des activités PGP des isolats

Variation	DDL	Carré moyen			
		ARA	IAA	P	ES
<b>Souche</b>	34	1,778**	1164,166**	120075,8**	35721,62**

\*\* : Significatif à  $p < 0,01$  , \* : Significatif à  $p < 0,05$  , ns : Non significatif, **DDL**: degré de liberté, **ARA** : l'activité de réduction de l'acétylène, **AIA** : la production de l'acide indole acétique, **P** : la solubilisation du phosphate, **ES** : efficacité de solubilisation

**Tableau 2** : l'analyse de la variance de la tolérance bactérienne et des activités PGP sous stress salin

Isolats	DDL	Carré moyen			
		La Tolérance bactérienne	La réduction de l'acétylène	La production de l'AIA	La solubilisation du Phosphate
<b>NHA15</b>	5	0,163**	0,188**	432,058**	110 700,1**
<b>MHC54</b>	5	0,085**	0,413**	643,08**	69 807,72**
<b>NHA78</b>	5	0,113 **	0,13**	226,794**	63 319,41**
<b>NMB8</b>	5	0,063 **	0,806**	933,704**	65 461,7**
<b>NMA27</b>	5	0,141 **	1,261**	2 742,139**	81 859,95**

\*\* : Significatif à  $p < 0,01$  , \* : Significatif à  $p < 0,05$  , ns : Non significatif, **DDL**: degré de liberté

**Tableau 3**: l'analyse de la variance des index de vigueur

Variation	DDL	Carré moyen
Inoculation	5	925,223 NS

**Tableau 4**: analyse de la variance des résultats des paramètres morphologique du test PGPR.

Variation	DDL	Carré moyen				
		LT	LR	PT	PR	
<b>traitement</b>	0 mM	5	194,722**	63,6**	0,239**	0,243**
	100 mM	5	139,422**	65,733**	0,219**	0,17**
	200 mM	5	194,367**	70,58**	0,127**	0,036**
<b>salinité</b>	2	1478,722**	183,796**	1,6**	2,728**	
<b>Traitement X salinité</b>	10	28,344**	5,485**	0,028**	0,057**	

\*\* : Significatif à  $p < 0,01$  , \* : Significatif à  $p < 0,05$  , ns : Non significatif, **DDL**: degré de liberté, **LT** : longueur des tiges, **LR** :longueurs des racines **PT** :poids sec des tiges, **PR** :poids sec des racines

## Annexes

**Tableau 5:** l'analyse de la variance des résultats des paramètres biochimiques du test PGPR.

Variation	DDL	Carré moyen						
		CHL <sub>t</sub>	PRL	Na T	Na R	K T	K R	
traitement	0 mM	5	7,971**	2,635*	0,004ns	0,004ns	0,105ns	0,105ns
	100 mM	5	24,089**	68,806**	0,944**	3,916**	0,674**	0,674**
	200 mM	5	11,423**	213,598**	6,14**	10,374**	1,845**	1,845**
salinité	2	183,76**	8145,116**	214,07**	97,419**	96,076**	96,076**	
Traitement X salinité	10	6,038**	49,915**	1,65**	2,761**	0,638**	0,638**	

\*\* : Significatif à  $p < 0,01$  , \* : Significatif à  $p < 0,05$  , ns : Non significatif, **DDL**: degré de liberté , **CHL<sub>t</sub>**: teneur en chlorophylle, **PRL** : proline, **Na T** : contenu des feuilles en ion  $\text{Na}^+$  , **Na R** : contenu racinaire en ion  $\text{Na}^+$ , **K T** : contenu des feuilles en ion  $\text{K}^+$  , **K R** : contenu racinaire en ion  $\text{K}^+$

**Annexe IX : caractères des isolats**

	Isolat	gram	forme	Oxydase	Mobilité	Catalase	Identification biochimique	AIA	Phosphate Solide	Phosphate Liquide	SDR
1	NHA13	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	5,05±0,83	0,00±0,00	185,91±5,72	+
2	MHA24	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>	13,67±0,28	0,00±0,00	337,91±5,24	+++
3	BHA10	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>	5,62±0,47	136,67±15,82	557,52±16,4	+
4	BHA0	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>	7,35±0,76	146,67±8,62	47,67±5,51'	+
5	NHA19	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,84±0,27	177,33±9,07	568,19±4,97	++
6	NHA79	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	74,81±0,94	232,67±71,35	145,81±3,02	+++
7	NMB8	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	67,37±0,13	256,67±8,02	183,71±3,74	+++
8	NHA67	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	63,76±0,21	0,00±0,00	402,43±5,01	+
9	BHA62	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	5,43±0,41	124,67±7,02	262,43±5,76	+
10	SHB91	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	47,23±0,74	0,00±0,00	656,81±16,7	++
11	SHB54	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	15,78±0,57	263,67±4,16	118,71±11,5	+
12	MHB62	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	23,25±0,58	226,33±6,66	98,71±6,73	+
13	MHC9	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	14,66±0,57	0,00±0,00	101,10±2,86	-
14	MHC54	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	72,62±0,48	247,67±15,82	291,29±5,91	+++
15	MHB52	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	13,52±0,54	288,33±9,02	527,91±7,09	+
16	SHB57	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	18,48±0,56	0,00±0,00	299,00±22,2	-
17	NHA21	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	6,69±1,04	239,67±3,06	672,33±7,37	+++
18	SHA21	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7,79±0,37	259,33±7,57	579,57±9,50	+++
19	NHA15	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	25,36±0,57	212,00±10,58	422,00±8,54	+++
20	MHA59	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	25,90±0,44	185,67±6,11	447,95±5,58	+
21	MHB56	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	41,59±0,52	209,33±11,02	320,91±1,15	++
22	SMA4	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	5,69±0,14	134,00±6,00	646,71±6,60	+++
23	MHA30	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	21,73±1,19	0,00±0,00	281,29±6,71	+++
24	NHC12	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,01±0,91	0,00±0,00	572,05±5,56	+
25	NHA23	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	19,67±0,87	226,00±6,25	285,00±1,73	-
26	SHB93	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	7,21±0,53	212,67±9,07	570,63±2,66	++
27	MHB51	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	11,35±0,53	190,00±2,65	679,86±8,37	+
28	NHA20A	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	20,75±0,07	287,33±6,51	660,62±8,18	+
29	NHA68	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	19,98±0,91	285,33±7,77	804,67±4,04	++
30	NHA78	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	17,42±0,90	0,00±0,00	483,05±5,27	++
31	NHA66	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	14,80±0,25	205,00±9,54	364,47±4,08	++
32	NHB9	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	26,84±0,21	0,00±0,00	224,71±3,98	-
33	NMA27	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	23,57±0,27	211,67±7,10	320,95±4,65	+++
34	NMA14	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	20,59±0,41	286,67±5,51	522,04±18,15	-
35	NHB19	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	10,10±0,76	257,67±6,11	490,38±10,0	++
36	BHA6	-ve	Bacille		-ve	+ve	N.D	10,57±0,23	124,54±5,67	136,76±5,65	+
37	BHB70	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-

## Annexes

38	BHB71	+ve	Bacille	-ve	+ve	-ve	<i>Bacillus megaterium</i>	6,27±0,22	0,00±0,00	137,91±5,24	+++
39	BHB73	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	178,44±18,09	208,19±4,97	++
40	BHB74	-ve	Bacille		-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
41	BHB75	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	9,32±0,63	213,84±25,67	248,55±2,87	-
42	BHC66	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	3,57±0,23	0,00±0,00	0,00±0,00	-
43	BHA60	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
44	BHA63	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
45	BHA67	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	148,15±11,47	-
46	BHB63	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	5,32±,73	231,90±19,90	194,56±12,31	+
47	BHB64	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,67±0,23	292,61±21,07	308,15±12,47	++
48	BHB65	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	3,35±0,28	149,02±23,58	214,42±15,27	-
49	BHB68	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	7,33±0,54	0,00±0,00	188,24±21,45	-
50	BHC61	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,98±0,6	0,00±0,00	0,00±0,00	-
51	BHC63	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	9,57±0,98	0,00±0,00	0,00±0,00	-
52	BHC65	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
53	BHC67	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
54	BHA11	-ve	Bacille	-ve		+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
55	BHA12	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	6,57±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	-
56	BHA23	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	15,77±0,45	0,00±0,00	0,00±0,00	-
57	BHA22	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,67±0,79	0,00±0,00	305,42±14,53	-
58	BHA31	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	6,56±0,39	201,34±21,98	248,27±21,54	-
59	BHC12	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	3,43±0,79	0,00±0,00	0,00±0,00	++
60	BHC18	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	5,26±0,38	0,00±0,00	0,00±0,00	-
61	BHC15	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	7,88±0,63	183,72±23,34	101,15±9,47	-
62	BHC31	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	4,51±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	+
63	BHC33	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,67±0,49	0,00±0,00	0,00±0,00	-
64	BHC35	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
65	BHC36	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
66	BHC39	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	268,21±28,89	234,45±22,44	-
67	MHA19	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	189,44±11,31	283,56±24,59	++
68	MHA22	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
69	MHA23	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	10,34±1,23	0,00±0,00	206,46±24,56	+
70	MHA25	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,54±2,36	261,04±21,67	165,35±13,52	-
71	MHA25	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	6,55±1,65	189,65±23,67	134,16±22,43	-
72	MHA26	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	12,43±1,54	311,92±18,67	227,54±27,76	+++
73	MHA27	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	4,55±1,14	0,00±0,00	0,00±0,00	++
74	MHA28	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	4,65±1,06	0,00±0,00	0,00±0,00	-
75	MHA29	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	6,55±0,89	0,00±0,00	0,00±0,00	-
76	MHA31	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	4,43±0,94	183,71±13,67	248,45±12,47	++
77	MHA33	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
78	MHA34	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
79	MHA35	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	17,43±1,21	0,00±0,00	0,00±0,00	-
80	MHA37	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	-ve	N.D	14,09±2,33	0,00±0,00	0,00±0,00	-
81	MHA4	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-

## Annexes

82	MHA5	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
83	MHA57	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
84	MHA55	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	208,24±27,67	209,51±13,56	-
85	MHA6	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	7,56±1,04	0,00±0,00	0,00±0,00	-
86	MHA7	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	7,44±0,54	254,81±22,67	221,14±11,44	-
87	MHA8	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	11,09±1,45	0,00±0,00	311,35±32,07	+
88	MHA82	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
89	MHA85	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
90	MHA86	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
91	MHA89	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	10,55±0,90	248,14±32,43	225,55±14,71	-
92	MHA90	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	297,26±14,51	268,35±22,67	+
93	MHA91		Bacille	-ve		+ve	N.D	14,98±1,78	154,25±31,93	303,86±31,54	-
94	MHA95	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,09±1,23	241,54±23,31	258,15±12,42	+
95	MHB101	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,22±0,49	178,82±21,54	408,14±32,57	++
96	MHB17	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
97	MHB4	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
98	MHB81	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	10,12±1,32	0,00±0,00	0,00±0,00	++
99	MHB83	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	13,34±1,54	0,00±0,00	0,00±0,00	-
100	MHB84	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	7,33±1,71	278,25±22,44	405,65±42,67	++
101	MHB87	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	17,54±1,73	0,00±0,00	0,00±0,00	-
102	MHB9	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	5,16±0,45	0,00±0,00	0,00±0,00	-
103	MHB90c	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	11,56±0,33	176,64±11,76	107,42±22,07	++
104	MHC1	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	208,62±13,67	328,07±32,44	+
105	MHC2	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
106	MHC3	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	12,92±1,88	0,00±0,00	0,00±0,00	-
107	MHC4	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	9,34±1,39	0,00±0,00	254,25±54,22	-
108	MHC41	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
109	MHC44	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	237,54±16,77	224,43±15,34	-
110	MHC45	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	9,66±1,45	0,00±0,00	0,00±0,00	+
111	MHC99	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
112	MHC47	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	109,32±19,29	331,15±32,41	++
113	MHC49	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
114	MHC71	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
115	MHC73	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	15,±1,34	0,00±0,00	0,00±0,00	-
116	MHC77	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	7,23±0,55	0,00±0,00	0,00±0,00	-
117	MHC80	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	9,54±1,65	0,00±0,00	0,00±0,00	++
118	MHC83	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	7,44±2,55	231,29±25,60	318,65±22,37	-
119	MHC87	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	8,76±0,78	438,76±32,17	211,23±24,22	++
120	MHC85	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	6,19±1,82	265,55±13,51	128,21±32,43	+
121	MHC90	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	11,85±1,76	0,00±0,00	401,45±12,47	++
122	MHC91	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
123	MHC92	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
124	MHC96	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
125	MHC101	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	12,54±1,33	198,77±22,38	154,22±22,56	-
126	MHC105	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	10,44±1,54	206,32±21,08	187,34±31,43	++
127	MHC108	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	12,76±0,74	0,00±0,00	239,42±09,32	++

## Annexes

128	MHC5	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+++
129	MHC50	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
130	MHC51	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
131	MHC52	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	148,43±32,99	128,23±25,65	++
132	MHC53	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	183,62±16,44	288,95±23,54	++
133	MHC57	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	5,58±1,34	0,00±0,00	0,00±0,00	-
134	MHC55	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	8,65±1,12	0,00±0,00	358,35±19,09	+
135	MHC58	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	10,33±0,89	0,00±0,00	0,00±0,00	-
136	MHC59	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	18,55±2,45	0,00±0,00	0,00±0,00	-
137	MHC6	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	17,43±1,22	189,34±27,50	128,42±31,54	++
138	MHC6	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
139	MHC61	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
140	MHC63	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	224,25±42,67	-
141	MHC64	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
142	MHC7	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	8,43±1,56	184,06±13,89	407,49±16,42	-
143	MHC11	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
144	MHA56	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	13,33±1,54	176,21±27,67	278,55±32,37	-
145	MHC62	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	12,55±1,26	197,03±27,67	330,04±22,51	++
146	NHA12	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	13,38±1,34	0,00±0,00	0,00±0,00	++
147	NHA18	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
148	NHA14	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	21,59±2,54	192,16±32,88	318,45±12,46	-
149	NHA17	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
150	NHA99	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	6,76±1,86	205,95±11,45	163,16±15,65	-
151	NHA22	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	13,84±1,28	221,28±13,01	134,54±19,34	+
152	NHA32	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	22,46±1,71	0,00±0,00	0,00±0,00	-
153	NHA33	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	14,55±1,74	0,00±0,00	0,00±0,00	-
154	NHA35	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	8,17±1,56	259,33±7,57	0,00±0,00	+++
155	NHA37	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	196,41±31,84	328,63±23,51	-
156	NHA38	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	139,11±22,78	405,09±37,94	-
157	NHA39	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	9,56±1,65	301,74±13,03	183,96±21,82	++
158	NHA41	-ve	Cocco bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	7,54±1,65	228,27±18,59	206,31±29,67	-
159	NHA4	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	13,66±2,46	0,00±0,00	0,00±0,00	-
160	NHA42	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	10,87±1,56	0,00±0,00	0,00±0,00	-
161	NHA43	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	25,37±1,44	0,00±0,00	0,00±0,00	++
162	NHA44	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	17,27±1,35	0,00±0,00	235,14±22,43	-
163	NHA5	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,40±1,37	0,00±0,00	0,00±0,00	-
164	NHA62	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	6,48±1,87	0,00±0,00	424,45±21,89	-
165	NHA64	-ve	Bacille	+ve	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	9,98±1,54	223,53±41,77	133,23±30,57	++
166	NHA61	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
167	NHA60	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,51±0,51	0,00±0,00	0,00±0,00	++
168	NHA63	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	9,44±1,65	221,21±13,44	328,35±23,42	-
169	NHA70	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	204,43±23,81	502,21±13,07	-
170	NHA75	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	294,19±19,54	++
171	NHA84	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	13,65±1,65	0,00±0,00	0,00±0,00	++
172	NHA89	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	18,56±3,87	190,66±12,45	345,46±09,45	-

## Annexes

173	NHB10	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	10,53±,48	174,91±19,27	278,34±12,78	-
174	NHB2	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	9,55±,34	0,00±0,00	0,00±0,00	-
175	NHB2	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	16,65±,33	0,00±0,00	0,00±0,00	-
176	NHB6	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	8,45±,19	0,00±0,00	0,00±0,00	+
177	NHB60	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
178	NHB61	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
179	NHB62	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	7,65±1,24	0,00±0,00	0,00±0,00	+++
180	NHB63	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
181	NHB64	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
182	NHB7	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	12,56±1,76	0,00±0,00	0,00±0,00	-
183	NHB70	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	7,15±0,82	132,07±13,78	213,45±13,47	-
184	NHB90	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	5,83±2,36	180,12±20,43	432,61±41,67	++
185	NHC10	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,87±1,68	165,53±21,26	603,78±32,39	-
186	NHC11	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
187	NHC2	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	144,87±14,78	238,55±22,41	-
188	NHC4	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	12,13±1,56	0,00±0,00	0,00±0,00	++
189	NHC6	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,65±0,76	0,00±0,00	0,00±0,00	-
190	NHC7	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	8,87±1,87	130,81±14,21	390,18±12,82	-
191	NHC9	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	9,47±1,53	109,21±17,71	138,15±16,37	+
192	NHA30	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	7,98±1,16	0,00±0,00	0,00±0,00	+
193	NHA60	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	7,64±1,68	0,00±0,00	0,00±0,00	-
194	NHA65	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
195	NHA69	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	154,32±13,89	128,19±09,27	+
196	NHA71	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	6,65±,12	0,00±0,00	0,00±0,00	-
197	NHA77	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	7,45±,58	177,33±9,07	0,00±0,00	-
198	NHA74	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	32,54±3,96	134,33±9,07	0,00±0,00	-
199	NHA80	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	16,63±,35	0,00±0,00	0,00±0,00	-
200	NHB67	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	9,54±2,29	0,00±0,00	0,00±0,00	-
201	NHB68	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	12,95±1,76	0,00±0,00	0,00±0,00	-
202	NHB69	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	13,54±2,38	0,00±0,00	0,00±0,00	+
203	NHC61	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	214,36±14,54	271,27±21,57	++
204	SHA100	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
205	SHA101	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
206	SHA102	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	12,32±2,47	331,54±16,78	431,45±22,43	-
207	SHA105	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	15,54±1,87	298,76±25,38	189,25±16,49	-
208	SHA106	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	187,23±21,04	128,15±12,47	-
209	SHA107	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
210	SHA108	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	10,61±1,95	0,00±0,00	0,00±0,00	++
211	SHA1	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	12,76±1,63	0,00±0,00	0,00±0,00	-
212	SHA109	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	231,72±13,09	518,25±12,07	-
213	SHA22	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	8,64±1,55	259,33±7,57	239,10±29,80	+++
214	SHA24	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	21,54±3,28	0,00±0,00	0,00±0,00	-
215	SHA25	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-

## Annexes

216	SHA3	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	217,54±13,67	438,32±12,27	-
217	SHA30	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	28,76±2,87	305,76±26,02	114,12±10,45	-
218	SHA34	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	11,54±1,93	0,00±0,00	0,00±0,00	-
219	SHA35	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,43±2,46	197,66±23,68	327,35±22,40	-
220	SHA36	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	12,49±1,54	204,31±26,92	178,24±12,37	++
221	SHA4	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	15,43±1,92	0,00±0,00	0,00±0,00	-
222	SHA5	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
223	SHA50	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
224	SHA50	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	113,54±21,54	242,15±22,49	-
225	SHA53	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	10,23±2,55	224,82±17,78	505,03±42,27	++
226	SHA55	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	19,43±2,38	0,00±0,00	0,00±0,00	-
227	SHA56	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,23±0,61	164,88±28,93	319,32±32,45	-
228	SHA58	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	168,98±16,98	321,42±22,60	-
229	SHA59	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
230	SHA6	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	5,98±1,41	0,00±0,00	0,00±0,00	-
231	SHA7	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	9,34±1,28	0,00±0,00	0,00±0,00	-
232	SHA79	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	12,26±2,40	0,00±0,00	0,00±0,00	-
233	SHA8	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	7,34±1,51	0,00±0,00	0,00±0,00	+
234	SHA83	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	14,43±1,48	0,00±0,00	0,00±0,00	-
235	SHA84	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	++
236	SHA86	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	152,76±13,45	418,71±22,05	-
237	SHA86	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
238	SHA87	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	4,34±0,93	0,00±0,00	0,00±0,00	-
239	SHA88	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	6,74±0,69	187,76±25,99	378,15±25,54	-
240	SHA90	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	5,44±1,36	193,07±22,56	195,02±22,91	++
241	SHA94	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	166,16±23,33	390,37±12,39	-
242	SHA96	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	205,52±17,91	504,91±36,47	-
243	SHA98	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	5,58±0,49	0,00±0,00	0,00±0,00	-
244	SHA99	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
245	SHB1	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	9,71±0,76	0,00±0,00	0,00±0,00	-
246	SHB3	-ve	Cocco bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	214,32±23,22	279,67±18,89	-
247	SHB5	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
248	SHB52	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
249	SHB53	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	8,65±0,45	114,31±21,21	156,15±14,88	+
250	SHB55	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	9,87±0,69	0,00±0,00	0,00±0,00	+
251	SHB59	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	14,65±0,74	0,00±0,00	0,00±0,00	-
252	SHB6	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	13,78±1,77	201,22±17,23	123,43±21,78	-
253	SHB61	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	9,98±1,96	0,00±0,00	0,00±0,00	-
254	SHB62	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	16,67±1,58	154,32±13,98	165,21±19,45	-

## Annexes

255	SHB7	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
256	SHB9	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
257	SHC50	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	8,61±0,65	0,00±0,00	0,00±0,00	-
258	SHC53	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	221,33±20,27	143,43±21,82	-
259	SHC54	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	314,66±13,94	218,12±16,09	-
260	SHC55	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	289,41±32,78	321,28±09,56	+
261	SHC6	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	12,45±1,66	0,00±0,00	0,00±0,00	-
262	SHC7	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	17,54±2,60	0,00±0,00	0,00±0,00	-
263	SHC9	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	6,34±1,74	0,00±0,00	0,00±0,00	-
264	SHB64	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	8,65±1,87	233,42±11,54	154,26±16,89	++
265	SHA41	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	7,93±1,92	0,00±0,00	0,00±0,00	++
266	SHA42	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	9,37±1,09	184,99±14,82	265,09±08,45	+
267	SHA46	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	12,59±1,51	228,05±13,04	213,65±17,29	+
268	SHA49	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	188,45±13,49	543,10±31,06	+
269	SHA61	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
270	SHA66	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	8,38±0,52	0,00±0,00	0,00±0,00	-
271	SMC1	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	+
272	SMC3	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
273	SMA1	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	14,±1,95	0,00±0,00	0,00±0,00	-
274	SMA 14	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	7,43±0,56	212,15±16,67	378,45±21,03	-
275	SMA2b	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	4,74±,46	0,00±0,00	0,00±0,00	-
276	SMA3	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	9,76±1,37	114,21±19,03	289,16±32,46	-
277	SMB4	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	10,46±1,44	0,00±0,00	0,00±0,00	-
278	SMB12	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	11,65±1,47	0,00±0,00	0,00±0,00	-
279	SMB15	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,36±1,86	177,33±9,07	0,00±0,00	-
280	SMB15	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	8,85±1,28	177,33±9,07	0,00±0,00	-
281	SMB4	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	9,53±1,74	265,22±14,57	290,15±28,39	+
282	SMB1	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus mégathérium</i>	0,00±0,00	131,05±23,02	214,42±15,89	-
283	SMB21	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-
284	SMB11	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	13,54±1,65	156,06±19,92	129,62±22,45	-
285	SMB12	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	12,64±1,36	0,00±0,00	0,00±0,00	++
286	SMB18	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	8,65±0,26	0,00±0,00	0,00±0,00	+
287	SMC13	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	8,73±0,37	0,00±0,00	0,00±0,00	-
288	SMC3	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	12,66±0,38	0,00±0,00	0,00±0,00	-
289	SMC22	-ve	Bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	9,98±1,35	0,00±0,00	0,00±0,00	-
290	SMC33	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	6,47±1,94	128,15±15,89	187,91±18,67	++
291	SMC24	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	N.D	8,73±0,63	141,32±14,53	342,39±30,17	-
292	SMC41	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	6,38±1,25	0,00±0,00	0,00±0,00	++
293	SMC43	-ve	Cocco bacille	-ve	-ve	+ve	N.D	8,92±1,64	112,11±22,69	214,71±05,37	-
294	SMC66	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	0,00±0,00	215,94±17,08	450,45±28,06	-
295	SMC65	-ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Pseudomonas sp</i>	0,00±0,00	275,03±18,54	193,29±14,89	-
296	SMC46	+ve	Bacille	-ve	+ve	+ve	<i>Bacillus sp</i>	12,65±2,78	0,00±0,00	0,00±0,00	-



*Publications*

# Free-Living Diazotrophic Rhizobacteria with Plant Growth Promoting Traits Isolated from the Rhizosphere of Wheat Grown on Saline Soil in West Algeria

Hamoum Hakim<sup>a\*</sup>, Bouznad Ahcene<sup>a</sup>, Mekhaldi Abdelkader<sup>a</sup>, Ratet Pascal<sup>b-c</sup> and Djibaoui Rachid<sup>a</sup>

<sup>a\*</sup>Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, Algeria

<sup>b</sup>Institute of Plant Sciences Paris Saclay IPS2, CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université Evry, Université Paris-Saclay, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France

<sup>c</sup>Institute of Plant Sciences Paris-Saclay IPS2, Paris Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Bâtiment 630, 91405, Orsay, France

Received: July 31, 2016

Accepted: September 18, 2016

## ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) represent a very small portion of plant rhizobacteria that have the ability to promote plants growth. In this work we evaluated the potential of free-living diazotrophic bacteria isolated from saline soil in west Algeria for the presence of PGP traits. Selective media were used for the isolation and selection of these plant growth-promoting rhizobacteria. A total of 296 strains were isolated from rhizospheres of wheat in eleven different saline soil areas of the perimeter of Mina (Relizane province – west Algeria). All the strains were evaluated for Indole acetic acid (IAA) production, phosphate solubilization, siderophores production, Hydrogen cyanide (HCN) production and ammonia production. Amongst these 296 strains 35 with multiple PGPR traits were in addition tested for their ability to use ACC as a sole nitrogen source and for nitrogenase activity using the Acetylene Reduction Activity test. These thirty five strains selected for their high PGP traits performance were further characterized by 16S rRNA sequencing.

**KEY WORDS:** diazotrophic bacteria, PGPR, IAA, ACC, HCN, Siderophore

## INTRODUCTION

Beneficial soil microorganisms such as PGPRs have received attention of researchers all over the world because of their potential use to develop a durable agriculture. They represent a very small portion of rhizobacteria (plant root associated bacteria) that have the ability to promote growth of plants and protecting them from disease and abiotic stresses [1, 2]. The PGPR promote plant growth by several mechanisms which they are not completely understood, but they supposed to include (i) the production of plant growth regulators like phytohormones [3], (ii) atmospheric nitrogen fixation [4], (iii) phosphate solubilization [5] and (iv) antagonism against phytopathogenic microorganisms [6].

The soil salinity presents major challenge in agriculture for many countries. To solve this problem, many strategies can be used including the application of halotolerant plant growth promoting Rhizobacteria to improve plant cultivation in saline soils [7]. In microbial selection salinity soil salinity plays an important role as environmental stress which is known as a reducing factor of bacterial diversity [8]

A few studies of researchers were focusing on salt tolerant Rhizobacteria such as those reported by [9] but the information on them are still limited [10]. Because soil salinity grows in many parts of the world due to irrigation, there is a need to improve the performance of the plant and biological nitrogen fixation (BNF) in salt stress conditions [11].

In addition to having PGP traits, PGPR strains must be rhizospheric competent, able to survive and colonize the plant [12].

This study was designed to explore wheat rhizosphere microbial diversity of diazotrophic bacteria having combinations of PGP activities and belonging to *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Pseudomonas* and *Bacillus* genus for their multiple PGP traits.

## METHODS

### Collection of Soil Samples:

Soil samples were collected from different saline soil areas in the perimeter of Mina (Relizane province – west Algeria, ( 35°44'N 0°33'E) between April 2014 and March 2015. The samples were brought to laboratory and pH, soil moisture and electrical conductivity were measured.

\*Corresponding Author: Hamoum Hakim, Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, Algeria, E-mail: hakim.hamoum@univ-mosta.dz  
Phone: +213 770 00 88 34 Address: P O Box 36 Lardjem Tissemsilt 38002 ALGERIA

**Isolation of diazotrophic bacteria:**

For the isolation of diazotrophic bacteria, 3 different N-poor medium were used: (i): N free semi solid malate medium [13], (ii): Burk medium [14] and (iii): Ashby medium [15]. The pure culture obtained were maintained on nutrient agar slants and stored at 4°C for subsequent analysis.

The preliminary identification was carried out on the bases of cellular morphology, Gram stain, colony morphology, and biochemical characterization.

**In vitro screening of bacterial isolates for their Nitrogen fixation capacity:**

The acetylene reduction assay was used to determine The Nitrogenase activity. All the isolates were grown on N free semi solid medium in 20 mL sterile vials containing 12 mL of medium. Cultures were grown at 30°C without shaking. After 4 days of incubation, 500 µl of acetylene was injected, and the incubation was continued for 14h. The presence of ethylene was detected by gas chromatography in Agilent Technologies 7820A chromatograph as described in [16].

**Assay for Indole acetic acid (IAA) production:**

Quantification of IAA production was performed using the method of [17]. Bacterial cultures were grown for 72 h with 160 rpm on a rotary shaker on their respective media supplemented with 1 g/l of NH<sub>4</sub>Cl and 200 mg/l of tryptophan at 30° C. Cultures were centrifuged at 6000 rpm for 20 min. 1 ml of the supernatant was mixed with 2ml of the Salkowski reagent (50 ml, 35% of perchloric acid, 1ml 0.5M FeCl<sub>3</sub> solution) and two drops of orthophosphoric acid. Development of a pink color indicates IAA production. Optical density was taken at 530 nm using an UV-visible spectrophotometer (JENWAY 6715). The amount of IAA produced by cultures was estimated against a calibration curve of IAA obtained in the range of 0–100 mg/ml.

**Screening of phosphate solubilizing ability:****Qualitative estimation of phosphate solubilization:**

The capacity of bacterial isolates to solubilize phosphate was evaluated qualitatively using Pikovskaya's agar plates [18]. All strains were inoculated and incubated at 30° C for 7 days. Appearance of a clear halo surrounding the developed bacterial colonies was considered as positive for phosphate solubilization.

**Quantitative estimation of phosphate solubilization:**

Quantitative assay of phosphate solubilization was done in liquid culture using National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) [19]. Strains were inoculated into 50ml of NBRIP medium in 250ml Erlenmeyer flask, incubated at 30° C with shaking at 160 rpm for 7 days, then centrifuged at 6000 × g for 20 min. The content of soluble Phosphate in the supernatant was measured by the Vanadomolybdate-yellow colorimetric Method [20]. The phosphorus content was estimated against a calibration curve of standard KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution.

**Siderophore production:**

All the isolates were tested for the production of siderophores using chrome azurol S agar (CAS) described by [21]. plates containing CAS agar were prepared and inoculated with test strain. After 4 to 5 days of incubation at 30 ° C, the change of Blue color to yellow-orange around the colony is considered as positive result for siderophore production

**In vitro ACC-metabolism assay:**

Selection of isolates for ACC metabolism was done based on the ability of isolates to use ACC as a sole nitrogen source. The ACC metabolism assay was carried out using to the method described by [22]. All isolates were inoculated into tube containing 5ml of TSB for 2 days at 30° C with shaking at 160 rpm. Then the cultures were diluted ten times in sterile 0.1 M of MgSO<sub>4</sub>. In 96-well plate, 150 µL of DF salts medium [23] was added in all wells. In lane 3, 6, 9 and 12, 15 µL 0.1M MgSO<sub>4</sub> was added and in lane 2, 5, 8, and 11, 15µL 0.1 M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> was added. 3 mM ACC was filter sterilized with 0.2µm syringe filter and was stored at -20°C before the assay. This was allowed to thaw before use; 15µL of ACC was filled in the lane 1, 4, 7 and 10. In each well 22µL of bacterial culture were used for inoculation and 22µL 0.1M MgSO<sub>4</sub> was used for control wells. Well plate reader Labsystems®) was used to measure the optical density after 0, 24, 48, 72 and 96 hours at 620 nm.

**Hydrogen cyanide production**

All bacterial isolates were tested for their ability to produce HCN. Using the method of [24], Nutrient broth was modified with 4.4 g / l of glycine and bacteria were streaked on them. A filter paper soaked in sodium carbonate 2% in a picric acid solution 0.5% was placed in the upper part of the plate. The plates were sealed with parafilm M® and incubated at 30 ° C for 96h. Orange to red developing color from initial yellow indicates HCN production.

**Ammonia production:**

All isolates were tested for ammonia production in peptone water. Bacterial cultures were inoculated into tube containing 10 ml of peptone water and incubated for 2-3 days at 30° C. In each tube 0.5 ml of Nessler's reagent was added. brown to yellow color development was a positive test for ammonia production. [25]

### Genotypic identification of isolates

16S rRNA gene partial sequencing of different isolates was used to identify bacterial isolates. For the extraction of total DNA, NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel GmbH & Co.KG . Neumann-Neander-Str.6-8. 52355 Düren.Germany, <http://www.mn-net.com/>) was used. For the amplification of the 16S rRNA gene from genomic DNA by means of polymerase chain reaction, universal Forward Primer (1390): 5'-AACGGGCGGTGTGTRCAA-3 and Reverse Primer (PA2): 5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3 were used [26]. The sequencing of PCR products of partial 16S rDNA genes were done by Eurofins Genomics GmbH (<http://www.eurofinsgenomics.eu/>). BLASTn program (NCBI BLAST® homepage: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) was utilized to analyze the sequence. All sequences of 16S rRNA gene were aligned by ClustalW using MEGA 6.0 software (<http://www.megasoftware.net/>) and a neighbor-joining (NJ) tree was generated using the same software.

### Statistical analysis:

All the experiments were performed in triplicate. The data were evaluated by analysis of variance using Statbox version 6.4 (<http://www.statbox.com/>). The comparison of means was performed using the least significant difference (LSD) within confidence limits of  $p \leq 0,05$ .

## RESULTS

Eleven soil samples were collected in the region of Mina (Relizane province – west Algeria). The GPS coordinates of the sampling area are given Table 1. Soil samples were transported to the laboratory and the physical properties were measured (Table.1). In general the pH was alkaline with values ranging from 7,67 to 8,12. The soil moisture ranged from 11,33 % to 17,84% and the electrical conductivity values ranged from 6,10 to 13,30 dm/S.

**Table 1.** pH, soil moisture and electrical conductivity of soil samples

Sample	coordinated map	electrical Conductivity dm/S	pH	Moisture %
1	0° 29' 24" E 35° 44' 23" N	9,60 ± 0,14	7,72 ± 0,04	15,88 ± 0,12
2	0° 29' 32" E 35° 44' 14" N	9,10 ± 0,16	7,95 ± 0,07	15,86 ± 0,22
3	0° 29' 15" E 35° 44' 09" N	9,90 ± 0,06	8,00 ± 0,03	17,40 ± 0,16
4	0° 42' 10" E 35° 57' 15" N	9,60 ± 0,23	7,67 ± 0,06	14,44 ± 0,34
5	0° 42' 32" E 35° 57' 09" N	8,00 ± 0,11	7,89 ± 0,09	13,39 ± 0,24
6	0° 44' 34" E 35° 56' 48" N	12,50 ± 0,22	7,98 ± 0,04	12,34 ± 0,32
7	0° 37' 16" E 35° 55' 19" N	13,30 ± 0,09	7,97 ± 0,08	13,66 ± 0,44
8	0° 36' 59" E 35° 55' 24" N	8,40 ± 0,11	7,71 ± 0,08	13,03 ± 0,38
9	0° 41' 02" E 35° 57' 30" N	7,30 ± 0,13	7,79 ± 0,02	12,35 ± 0,21
10	0° 44' 45" E 35° 56' 00" N	6,40 ± 0,16	7,98 ± 0,06	11,92 ± 0,18
11	0° 38' 20" E 35° 55' 23" N	6,30 ± 0,11	7,93 ± 0,04	11,33 ± 0,27
12	0° 36' 50" E 35° 55' 00" N	8,80 ± 0,10	7,71 ± 0,01	11,39 ± 0,17
13	0° 41' 01" E 35° 56' 33" N	6,90 ± 0,13	7,80 ± 0,02	13,79 ± 0,24
14	0° 44' 42" E 35° 55' 43" N	8,00 ± 0,08	7,79 ± 0,04	13,92 ± 0,08
15	0° 29' 17" E 35° 43' 54" N	6,10 ± 0,09	8,12 ± 0,05	17,84 ± 0,31

Numerical values are mean±SD of three independent observations, values with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  in all the treatments.

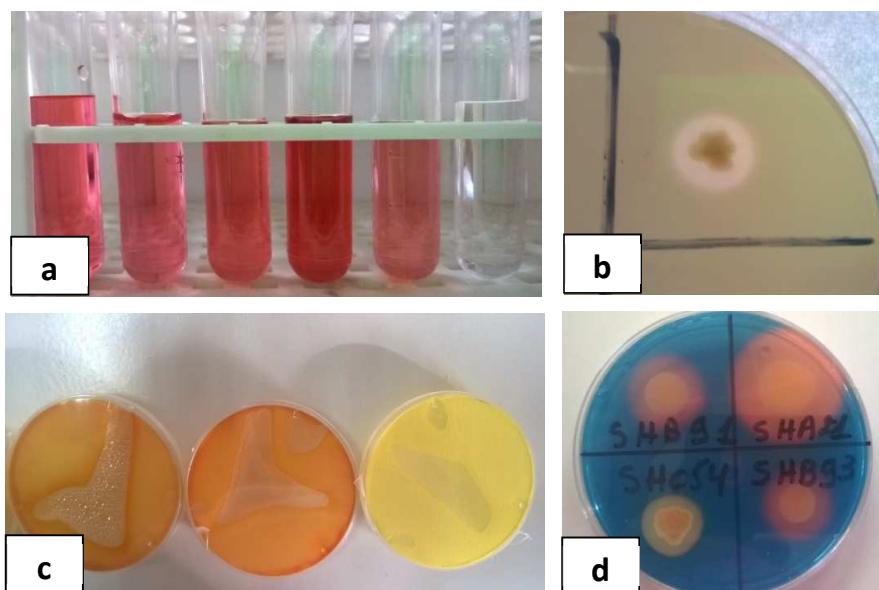
### Nitrogen fixation capacity of the isolated strains

Selective nitrogen poor media were used for the isolation and selection of diazotrophic growth-promoting rhizobacteria. We selected a total of 296 isolates amongst the growing colonies that were subsequently screened for their multiple PGP traits. From the 296 isolates (Data not shown) only 35 were retained for their high-performance PGP traits (Table 2) and are described below.

In order to know if the bacteria isolated on nitrogen poor media are effective diazotrophs we measured their nitrogen fixation capacity using the Acetylene Reduction Assay as described in Material and Methods. Four strains (NHA13, NHA79, NHA66, NHB9) showed acetylene reduction activities ranging from 3,29±0,13 to 2,19±0,01°  $\eta\text{mol C}_2\text{H}_4 / \text{h}$  and represent the most efficient diazotrophs in this assay. Twenty four strains had intermediate values between 1  $\eta\text{mol C}_2\text{H}_4 / \text{h}$  and 0,05  $\eta\text{mol C}_2\text{H}_4 / \text{h}$ . The other seven isolates were below 0,05  $\eta\text{mol C}_2\text{H}_4 / \text{h}$  or had no activity at all (NHA67) (Table 2).

**Table 2.** Summary of plant growth promoting traits showed by diazotrophic isolates

Isolat	ARA µmolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h	IAA	Phosphate	ACC de-aminase	Siderophore	HCN	Ammonia
NHA13	3,29±0,13 <sup>a</sup>	5,05±0,83 <sup>u</sup>	185,91±5,72 <sup>o</sup>	++	+	-	+
MHA24	0,03±0,00 <sup>s</sup>	13,67±0,28 <sup>o</sup>	337,91±5,24 <sup>i</sup>	+	+++	-	+
BHA10	0,85±0,04 <sup>f</sup>	5,62±0,47 <sup>stu</sup>	557,52±16,43 <sup>d</sup>	-	+	-	+
BHA0	0,57±0,02 <sup>ij</sup>	7,35±0,76 <sup>f</sup>	47,67±5,51 <sup>f</sup>	-	+	-	+
NHA19	0,70±0,01 <sup>h</sup>	6,84±0,27 <sup>rs</sup>	568,19±4,97 <sup>d</sup>	+++	++	-	+
NHA79	2,22±0,01 <sup>c</sup>	74,81±0,94 <sup>a</sup>	145,81±3,02 <sup>p</sup>	++	+++	-	+
NMB8	0,60±0,01 <sup>ij</sup>	67,37±0,13 <sup>c</sup>	183,71±3,74 <sup>o</sup>	-	++	-	+
NHA67	0,00±0,00 <sup>s</sup>	63,76±0,21 <sup>d</sup>	402,43±5,01 <sup>h</sup>	-	+	-	+
BHA62	1,05±0,00 <sup>e</sup>	5,43±0,41 <sup>iv</sup>	262,43±5,76 <sup>m</sup>	-	+	-	+
SHB91	0,35±0,03 <sup>mn</sup>	47,23±0,74 <sup>e</sup>	656,81±16,72 <sup>bc</sup>	-	++	-	+
SHB54	0,48±0,01 <sup>k</sup>	15,78±0,57 <sup>n</sup>	118,71±11,54 <sup>q</sup>	-	+	-	+
MHB62	0,32±0,01 <sup>mno</sup>	23,25±0,58 <sup>i</sup>	98,71±6,73 <sup>q</sup>	++	+	-	+
MHC9	0,31±0,02 <sup>no</sup>	14,66±0,57 <sup>no</sup>	101,10±2,86 <sup>q</sup>	-	-	-	+
MHC54	0,29±0,01 <sup>o</sup>	72,62±0,48 <sup>b</sup>	291,29±5,91 <sup>i</sup>	-	+	-	+
MHB52	0,36±0,01 <sup>mn</sup>	13,52±0,54 <sup>o</sup>	527,91±7,09 <sup>e</sup>	+	+	-	+
SHB57	0,54±0,02 <sup>j</sup>	18,48±0,56 <sup>l</sup>	299,00±57,26 <sup>kl</sup>	-	-	-	+
NHA21	0,27±0,01 <sup>o</sup>	6,69±1,04 <sup>rst</sup>	672,33±7,37 <sup>bc</sup>	+++	+++	-	+
SHA21	0,76±0,01 <sup>g</sup>	7,79±0,37 <sup>f</sup>	579,57±9,50 <sup>d</sup>	++	+++	+	+
NHA15	0,01±0,00 <sup>s</sup>	25,36±0,57 <sup>h</sup>	422,00±8,54 <sup>b</sup>	+	+	-	+
MHA59	0,22±0,00 <sup>p</sup>	25,90±0,44 <sup>sh</sup>	447,95±5,58 <sup>g</sup>	-	+	-	+
MHB56	0,56±0,01 <sup>ij</sup>	41,59±0,52 <sup>f</sup>	320,91±1,15 <sup>k</sup>	-	++	-	+
SMA4	0,03±0,00 <sup>s</sup>	5,69±0,14 <sup>stu</sup>	646,71±6,60 <sup>c</sup>	-	+++	+	+
MHA30	0,38±0,01 <sup>lm</sup>	21,73±1,19 <sup>j</sup>	281,29±6,71 <sup>lm</sup>	++	+++	-	+
NHC12	0,75±0,01 <sup>g</sup>	8,01±0,91 <sup>f</sup>	572,05±5,56 <sup>d</sup>	+	+	-	+
NHA23	0,41±0,01 <sup>i</sup>	19,67±0,87 <sup>k</sup>	285,00±1,73 <sup>lm</sup>	-	-	-	+
SHB93	0,78±0,01 <sup>g</sup>	7,21±0,53 <sup>f</sup>	570,63±2,66 <sup>d</sup>	+++	++	-	+
MHB51	1,24±0,03 <sup>d</sup>	11,35±0,53 <sup>p</sup>	679,86±8,37 <sup>b</sup>	-	+	-	+
NHA20A	0,02±0,00 <sup>s</sup>	20,75±0,07 <sup>jk</sup>	660,62±8,18 <sup>bc</sup>	+++	+	-	+
NHA68	0,16±0,00 <sup>q</sup>	19,98±0,91 <sup>k</sup>	804,67±4,04 <sup>a</sup>	-	++	-	+
NHA78	0,01±0,00 <sup>s</sup>	17,42±0,90 <sup>m</sup>	483,05±5,27 <sup>f</sup>	++	++	-	+
NHA66	2,19±0,01 <sup>c</sup>	14,80±0,25 <sup>no</sup>	364,47±4,08 <sup>i</sup>	++	++	-	+
NHB9	2,43±0,03 <sup>b</sup>	26,84±0,21 <sup>g</sup>	224,71±3,98 <sup>n</sup>	++	-	-	+
NMA27	0,11±0,00 <sup>r</sup>	23,57±0,27 <sup>i</sup>	320,95±4,65 <sup>k</sup>	+++	+++	-	+
NMA14	0,05±0,00 <sup>s</sup>	20,59±0,41 <sup>jk</sup>	522,04±18,15 <sup>e</sup>	++	-	-	+
NHB19	0,17±0,01 <sup>q</sup>	10,10±0,76 <sup>q</sup>	490,38±10,00 <sup>f</sup>	++	++	-	+

**Figure 1.** PGP activities of the isolates, (a): IAA Production (b): P solubilisation (c): HCN production, (d): Siderophore production

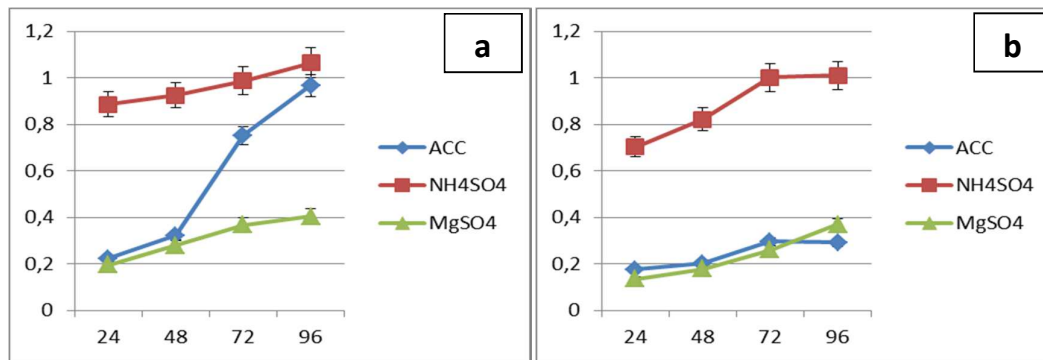


Figure 2. ACC metabolism by the isolates, (a): NMA14 (positive), (b): SMA4 (negative)

### PGPR traits of the isolated strains

The 35 isolates were tested for their ability to produce IAA, ammonia, siderophore, HCN, to solubilize phosphate or to use ACC as sol nitrogen source.

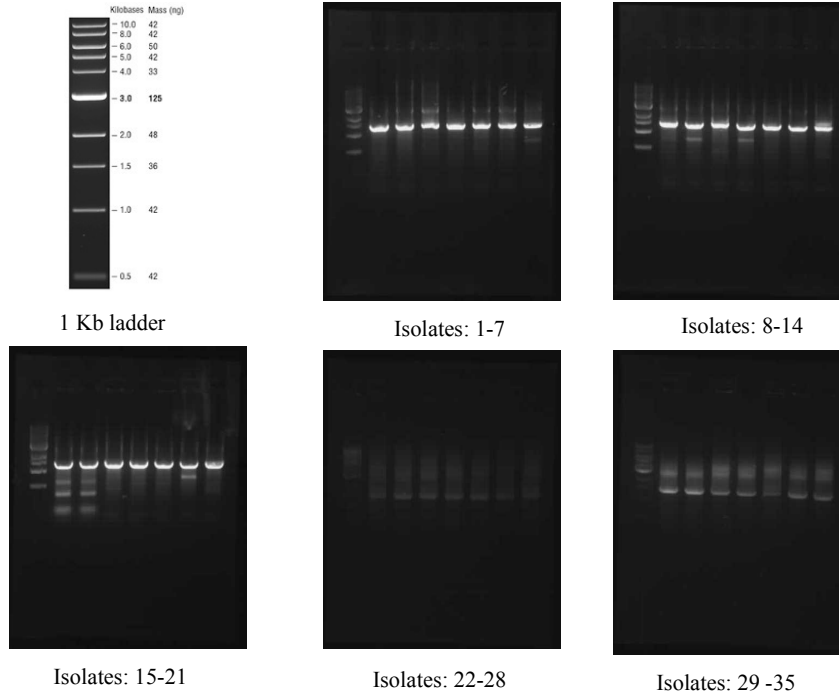
The 35 isolates were able to produce IAA (Figure 1a). Using the method of [17] with a medium supplemented with 200 mg/l of Tryptophan, the detected quantities of IAA produced by the isolated strains ranged from 5,05±0,83 µg/ml to 74,81±0,94µg/ml by the isolate NHA13 and NHA79 respectively. The majority of the values were over 20µg/ml and only 9 were under 10µg/ml (Table 2).

All the isolates were also able to solubilize phosphate by producing clear zones around the bacterial colonies on Pikovskaya medium (Figure 1b). In liquid broth media, the highest quantity of solubilized phosphate was detected for the isolate NHA68 with 804,67±4,04 µg/ml and the lowest quantity by isolate BHA0 with 47,67±5,51µg/ml. It should be noted that almost all the isolates showed high values for phosphate solubilization around 300 or 400µg/ml.

Table 3. Biochemical description and genotypic identification of isolates

Isolate	Gram reaction	Shape	Ox	cata	Genus(16 rRNA sequence)
NHA13	+ve	Rod	-ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>
MHA24	+ve	Rod	-ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>
BHA10	+ve	Rod	-ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>
BHA0	+ve	Rod	-ve	+ve	<i>Bacillus megaterium</i>
NHA19	+ve	Rod	-ve	+ve	<i>Bacillus subtilis</i>
NHA79	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
NMB8	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
NHA67	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
BHA62	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Enterobacter aerogenes</i>
SHB91	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
SHB54	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MHB62	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MHC9	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MHC54	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MHB52	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
SHB57	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Klebsiella oxytoca</i>
NHA21	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
SHA21	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
NHA15	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Raoultella planticola</i>
MHA59	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Raoultella planticola</i>
MHB56	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Raoultella planticola</i>
SMA4	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Raoultella sp</i>
MHA30	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Raoultella sp</i>
NHC12	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
NHA23	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
SHB93	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
MHB51	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Serratia odorifera</i>
NHA20A	-ve	Rod	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>
NHA68	-ve	Rod	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>
NHA78	-ve	Rod	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>
NHA66	-ve	Rod	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>
NHB9	-ve	Rod	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>
NMA27	-ve	Rod	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>
NMA14	-ve	Rod	+ve	+ve	<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>
NHB19	-ve	Rod	-ve	+ve	<i>Enterobacter sp</i>

+ve: positive, -ve: negative, Ox: oxidase test, Cata: catalase test

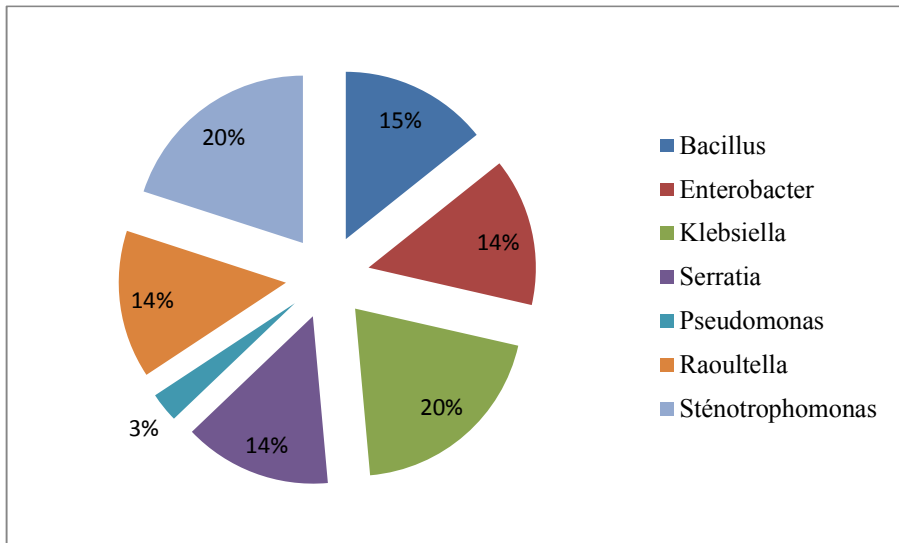


**Figure 3.** Amplification of 16S RNA gene. 1KB DNA Ladder

The five isolates MHC9, NHB9, SHB57, NHA23 and NMA14 were not able to produce siderophore. For the others, the diameters of yellow–orange halos around the bacteria colonies were not similar. The majority of the tested isolates showed a large halo but few showed a small one (Figure 1d and Table 2).

All the isolates were tested for ACC de-aminase activity by using ACC as the sole nitrogen source. Among 35 isolates, 19 grew well on DF medium with either ACC or ammonium sulphate serving as the sole nitrogen source. DF salt minimal medium without nitrogen source was used as a control (Figure 2).

Only two isolates (SH21 and SMA4) could produce HCN, however all strains were positive for ammonia production.

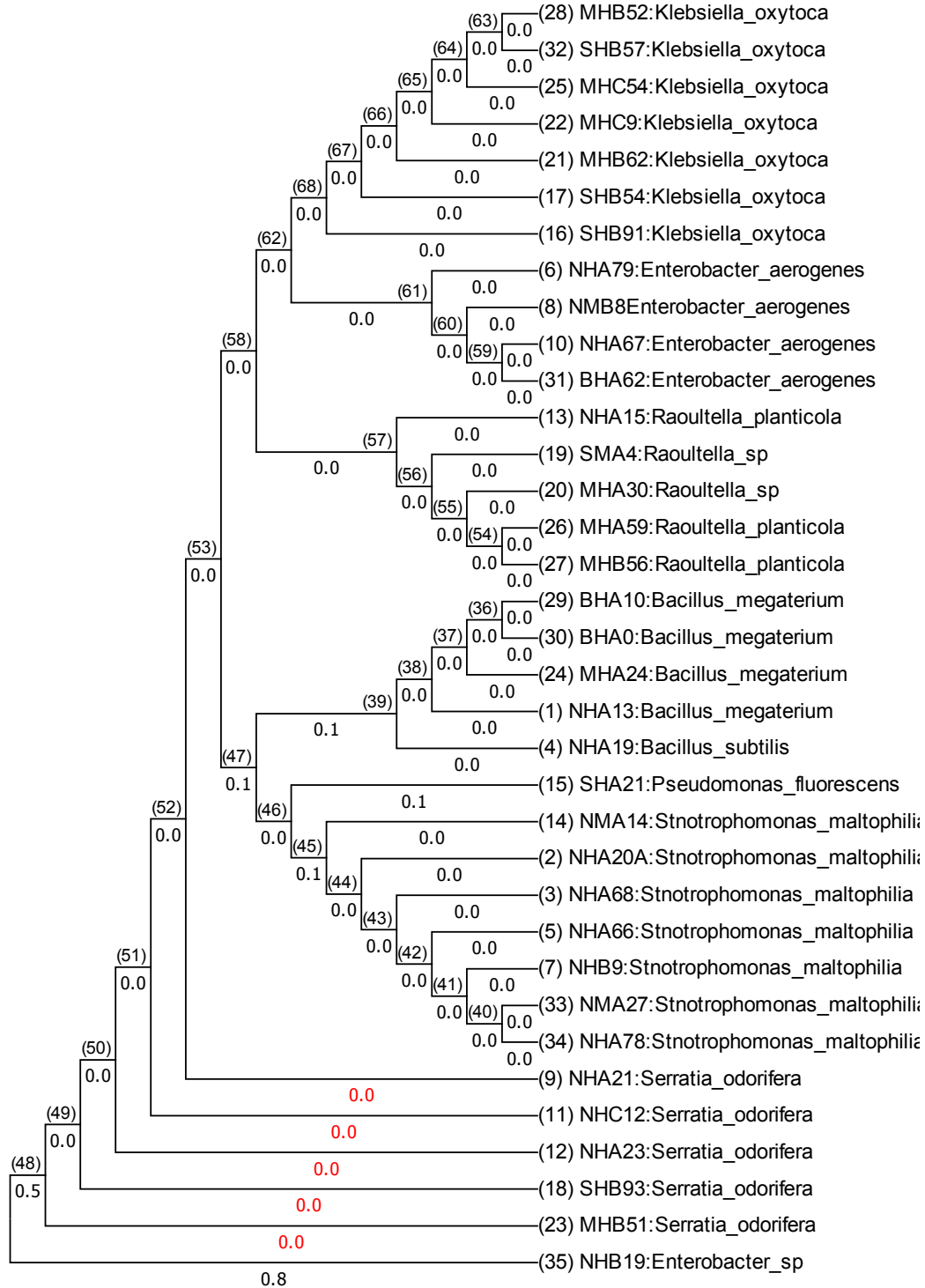


**Figure 4.** Diversity of isolates identified by 16S rRNA gene

**Molecular identification**

In order to better characterize the isolated rhizobacteria, their 16S rRNA gene sequence was determined. The 16S rRNA sequence was amplified and complete (1200 bp) or partial (900bp) sequences were obtained (Figure

3) and BLASTN-aligned with the sequences of different bacterial genera from the GenBank database (Table 3). This analysis of the sequences of 16S rDNA classified the isolates to the following seven bacterial genera: *Bacillus* (15%), *Stenotrophomonas* (20%), *Enterobacter* (14%), *Klebsiella* (20%), *Serratia* (14%), *Pseudomonas* (3%), *Raoultella* (14%), most of them (30) belonging to the division gamma-proteobacteria (Figure 4). The phylogenetic tree reflecting the relationship among the isolates is presented in Figure 5.



**Figure 5.** Phylogenetic relationships of isolates based on 16S rDNA sequence and related sequences. Neighbor-joining (NJ) tree was generated using the MEGA 6.0 software ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)). The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support.

## DISCUSSION

Rhizobacteria that have a combination of plant growth promoting traits, including phosphate solubilization, indole acetic acid and siderophore productions as well as nitrogen fixation capacity, have a potential to be used as PGP inoculants to increase crop yield production [27]. Many researchers all over the world have studied PGPR to understand how to use them to promote plant growth, to protect plants from pathogens and to benefit to agriculture. Various genera such as, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Rhodococcus* and *Xanthomonas* have been found in the rhizosphere of different plants [28, 29].

Isolating free-living diazotrophic bacteria from saline soil and screening all the isolates on the basis of their PGP activities were the focus of this work. Seven different genera of rhizobacteria (*Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Raoultella*) were found in the rhizospheric soil of wheat plants in mina perimeter (west Algeria). *Bacillus* and *Stenotrophomonas* were previously described from wheat rhizosphere [30], Isolation of *Enterobacter*, *Azospirillum* and *Bacillus* from the rhizosphere of wheat has been reported from the same cropping fields in Pakistan [31]. *Serratia* and *Raoultella* with other genera were also found in the rhizosphere of Wheat in Rio Grande do Sul, Brazil [32].

Various genera including *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* were isolated from rhizosphere of Wheat plants in different parts of the NHZ of India [33].

The ability to reduce acetylene is an indirect measure of N<sub>2</sub>-fixation. It is specific for monitoring functional Nitrogenase activity and is indicative of N<sub>2</sub>-fixing potential [34]. Selective media and ARA test were used for the isolation and characterization of the different isolates described in this study. Previous investigations proved these method to be fast and simple [35] and effectively resulted in our work in the isolation of diazotrophs from several bacterial genus.

It is assumed that 80% of rhizospheric bacteria may produce plant growth promoting substances [36]. Saline soil is also considered as a rich source of bacteria that can produce IAA as 75% of the bacteria isolated from soil have the ability to produce IAA [37]. In our study, 68,82 % of the 296 isolated strains were IAA producers and from the 35 strains described in more details here the IAA production ranged from 5,05±0,83µg/ml to 74,81±0,94µg/ml. Such differences in the ability of IAA production may be attributed to the inherent properties of the individual bacteria [38]. This IAA production by PGPR is considered as very important for plant growth improvement.

Phosphate solubilization is an additional essential activity of plant growth promotion because bacteria solubilizing phosphate are making phosphate available for plants [39]. Amongst the 296 strains isolated from the wheat rhizosphere in our study 51% were able to solubilize Phosphate at different levels. The amount of phosphate solubilized by 35 bacteria studied here ranged from 47 to 804 µg/ml. In order to make the Phosphate available for plant, it must be hydrolysed into inorganic Phosphate by phosphatase. The major source of phosphatase in soil is considered as being from microorganism [40], in addition many studies support the role of PSB in making Phosphate available to plants.

The production of siderophores is another important trait of PGPR. Siderophores are iron chelators and an important key in increasing plant growth either directly by supplying iron to the plant or indirectly by influencing the plant growth. In addition, by producing siderophores binding to the available form of iron in the rhizosphere, the PGPR makes the iron unavailable to the phyto-pathogens and are consequently protecting the plant [3]. From the 296 isolates 39,45% produced siderophores and almost all of the selected 35 isolates were found to be siderophores producers.

Rhizobacteria containing ACC-de-aminases have been reported to decrease the inhibitory effects of ethylene both under saline stress [41]. These ACC-de-aminases hydrolyses ACC, the precursor of ethylene in plants into  $\alpha$ -ketobutyrate and ammonia instead of ethylene [42, 43]. In this work, the 35 selected isolates were screened for ACC de-aminase activity and we found that 19 of them (54%) showed various level of ACC de-aminase activity.

## Conclusion

Our results showed that diazotrophic bacteria isolated from saline soil in west Algeria in the rhizosphere of wheat had a high potential to produce growth promoting traits. Among the 35 isolates, two isolates of *Stenotrophomonas*, *Bacillus* and *Enterobacter* showed a high ability to fix nitrogen. The PGPR potentials of the strains isolated in this work were variable with the isolate NHA79 identified as *Enterobacter aerogenes* showing one of the best combined characteristics. The results described here suggest that the bacteria described in this work are exhibiting a combination of PGP activities that can be used as biofertilizer and might improve plant (wheat) growth and yield.

## Acknowledgement

We are grateful to our colleagues from the Laboratory of Microbiology and Plant Biology, University of Mostaganem and from the Institute of Plant Science of Paris Saclay (IPS2), France for their collaboration and support.

## REFERENCES

1. M. Grover, SKZ. Ali, V. Sandhya, A. Rasul, B. Venkateswarlu, "Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses", *World J Microbiol Biotechnol.* **27**, 1231–1240 (2011).
2. B.R. Glick, "Plant growth-promoting bacteria", *Mechanisms and applications.* Scientifica, **2012**, 1–15 (2012).
3. B. Glick, "The enhancement of plant growth by free living bacteria", *Can. J. Microbiol*, **41**, 109–114 (1995).
4. R.M. Boddey, J. Dobreiner, "Nitrogen fixation associated with grasses and cereals", recent progress and perspectives for the future. *Fert. Res.* **42**, 241–250 (1995).
5. J.R. De Freitas, M.R. Banerjee, J.J. Germida, "Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.)", *Biol. Fertil. Soi*, **24**, 358–364 (1997).
6. F.M. Scher, R. Baker, "Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil uppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens", *Phytopathology*, **72**, 1567–1573 (1982).
7. S. Mayak, T. Tirosh, B.R. Glick, "Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato and pepper plants to salt stress", *Plant Physiol Biochem*, **167**, 650–656 (2004).
8. J. Borneman, P. W. Skroch, K. M. O'Sullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, E. W. riplett, "Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin", *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(6), 1935-1943 (1996).
9. D. Egamberdiyeva, K.R. Islam, "Salt-tolerant rhizobacteria: plant growth promoting traits and physiological characterization within ecologically stressed environments". In: I. Ahmad, J. Pichtel, S. Hayat, (eds) *Plant-bacteria interactions – strategies and techniques to promote plant growth.* WILEY, Weilheim, pp 257–281 (2008).
10. B. Reinhold, T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans, J. Deley, "*Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca*) (L.) (Kunth)", *Int J Syst Bacteriol.* **37**, 43–51(1987).
11. E. Nabti, M. Sahnoune, S. Adjrad, A. Van Dommelen, M. Ghoul, M. Schmid, A. Hartmann, "A halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilense* strain from Algerian soil restores wheat growth under saline conditions", *Eng Life Sci*, 7,354–360 (2007).
12. A.J. Cattelan, P.G. Hartel, J.J. Fuhrmann, "Screening of plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth", *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**, 1670–1680 (1999).
13. N. R. Krieg, J. Döbereiner, "Genus *Azospirillum*" In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* N.R. Krieg (ed.), Vol. 1: 94-104 (1984). Williams & Wilkins, Baltimore.
14. M.V. Martinez-Toledo, J. Gonzalez-Lopez, T. De La Rubia, A. Ramos-Cormenzana, "Isolation and characterization of *Azotobacter chroococcum* from the roots of *zea mays*", *FEMS Microbiology Ecology*, **3**, 197-203 (1985).
15. S.F. Ashby, "Some observations on the assimilation of atmospheric nitrogen by a free living soil organism – *Azotobacter chroococcum* of Beijerinck", *J. Agric. Sci.* **2**, 35–51 (1907).
16. F. Berrabah, M. Bourcy, A. Cayrel, A. Eschstruth, S. Mondy, P. Ratet, et al. "Growth Conditions Determine the DNF2 Requirement for Symbiosis", *PLoS ONE* **9**(3), e91866 (2014).
17. J.E. Loper, M.N. Schroth, "Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet" *Phytopathology.* **76**, 386-389 (1986).
18. R. I. Pikovskaya, "Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species", *Mikrobiologiya*, **17**, 362-370 (1948).
19. V. Nautiyal, "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms", *Microbiol. Lett.* **170**, 265–270 (1999).
20. M.L. Jackson, "Soil Chemical Analysis", Prentice Hall of Englewood cliffs, New dersey, USA (1973).
21. B. Schwyn, J.B. Neilands, "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores" *Anal. Biochem.* **160**, 47–56 (1987).
22. C.B. Jacobson, J.J. Pasternak, B.R. Glick, "Partial purification and characterization of ACC-deaminase from plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* GR12-2", *Can. J. Microbiol.* **40**, 1019-1025 (1994).
23. M. Dworken, J. Foster, "Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen", *J. Bacteriol.* **75**, 592-601 (1958).
24. Lorck, H, "Production of hydrocyanic acid by bacteria", *Physiol. Plant.* **1**, 142–146 (1948).

25. J.C. Cappuccino, N. Sherman, "In: Microbiology: A Laboratory Manual", third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125–179 (1992).
26. D. Zheng, E. W. Alm, D. A. Stahl, L. Raskin, "Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies", *Appl. Environ. Microbiol*, **62**, 4504-4513 (1996).
27. A.Venieraki, M. Dimou, P. Pergalis, I. Kefalogianni, I. Chatzipavlidis, P. Katinakis, "The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat", *Microb. Ecol*, **61**,277-285 (2011).
28. A.L. Hanna, H.H. Youssef., W.M. Amer, M. Monib, M. Fayez, N.A. Hegazi, "Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts", *Egypt. J Adv Res*, **4**, 13–26 (2013).
29. A. Beneduzi, D. Peres, L.K. Vargas, M.H. Bodanese–Zanettini, L.M.P. Passaglia, "Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen–fixing Bacilli isolated from rice fields in South Brazil", *Appl Soil Ecol*, **4**, 311–320 (2008).
30. A. Majeed, M.K. Abbasi, S. Hameed, A. Imran, N. Rahim, "Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion" *Front. Microbiol*, **6**, 198 (2015).
31. M. Tahir, M.S. Mirza, A. Zaheer, M.R. Dimitrov, H. Smidt, S. Hameed, "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.)", *Aus J Crop Sci*, **7**,1284–1292 (2013).
32. F. D.S. Moreira, P.B.D. Costa, R. D. Souza, A. Beneduzi, B. B. Lisboa, L. K. Vargas, L. M. Passaglia, "Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops", *Genetics and molecular biology*, **39**(1), 111-121 (2016).
33. P. Verma, A. N. Yadav, K. S. Khannam, N. Panjiar, S. Kumar, A. K. Saxena, A. Suman, "Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India *Annals of Microbiology*", **65**(4), 1885-1899 (2015).
34. G., Andrade, E., Esteban, L., Velasco, J.L., E.J., MariaBedmar, "Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.)", *Plant Soil*, **197**, 19–23 (1997).
35. J. Döbereiner, Jm. Day, "Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites", In: Newton, W.E., Nyman, C.J. eds, *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation Vol 2*. Washington State Univ Press, Pullman, Washington pp 518-538 (1976).
36. C. Patten, B.R. Glick, "Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid", *Canadian Journal of Microbiology*. **42**, 207-220 (1996).
37. N. Bhavdish, A. Johri, J. Sharma, S. Viridi, "Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health", *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, **84**, 49-89 (2003).
38. M. Sarwar, D.A., Arshad, W.T. Martens, J.R. Frankenberger, "Tryptophan dependent biosynthesis of auxins in soil", *Plant Soil*, **147**, 207-215 (1992).
39. S. El-Azeem, T.A. Mehana, A.A. Shabayek, "Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region", *Egypt. Afr Crop Sci Conf Proc*, **8**,1517–25 (2007).
40. H. Rodriguez, R. Fraga, "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion", *Biotechnol. Adv.* **17**, 319–339 (1999).
41. B. Shaharoona, R. Bibi, M. Arshad, Z. Zahir, U. Zia, "1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase rhizobacteria attenuates ACC-induced classical triple response in etiolated pea seedlings", *Pak J Bot*, **38**(5), 1491-1499 (2006).
42. M. Arshad, M. Saleem, S. Hussain, "Perspectives of bacterial ACC-deaminase in phytoremediation", *Trends Biotechno*, **25**, 356-362 (2007).
43. B.R. Glick, D.M. Penrose, J. Li, "A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria", *J Theor Biol*, **190**, 63-68 (1998).



Young Tunisian  
Researchers in Biology



# CERTIFICATE

Herewith we confirm that

**HAKIM HAMOUM**

Attended the

**First International Symposium of Young Researchers in Biology**

**in Monastir Tunisia, May 12-14, 2016, and participated in the**

**Biotechnology Session with a Poster presentation entitled :**

**« ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FREE LIVING DIAZOTROPHIC BACTERIA  
ISOLATED FROM SALINE SOIL IN WEST ALGERIA AND EVALUATION OF THEIR  
PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITIES »**



**Organizing committee**



## Certificat de Participation

Les Organisateur de l'Association Tunisienne de Biotechnologie attestent que Mr/Mme/Mlle **hakim hamoum** a participé aux Journées Internationales de Biotechnologie (JIB2015) par une communication par affiche intitulée : «*Isolement des bactéries diazotrophiques à partir du sol salin et évaluation de leurs effet sur la croissance du maïs sous stresse salin*» et qui se sont tenues du 20 au 24 décembre 2015 à Djerba.

**Pour le Comité d'organisation**

**Prof. Samir BEJAR**

الجمعية التونسية للتكنولوجيا الحيوية  
ATBT  
Téléfax : 74 970 002