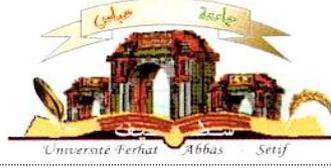


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2017

**THÈSE**

Présentée par

**RAI Abdelwahab**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>ÈME</sup> CYCLE**

**Filière : BIOLOGIE**

**Spécialité : MICROBIOLOGIE**

**THÈME**

**Effet du stress salin sur les bactéries du sol : rôle  
d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*,  
*Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la  
relation bactérie-plante sous stress salin.**

Soutenue publiquement le 07/10/2017.

DEVANT LE JURY

Président	MEBARKIA Abdelkrim	Pr. UFAS-1
Directeur	NABTI Elhafid	Pr. UAMB
Examineur	HOUALI Karim	Pr. UMMTO
Examineur	KHENCHOUCHE Abdelhalim	MCA UFAS-1
Examineur	AOUF Abdelhakim	MCA UFAS-1
Invité	GHOUL Mostefa	Pr. UBIBBA

*Laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables/Equipe Biomasse et Environnement.*

# *Dédicace*

## *Dédicace*

*À mes très chers parents*

*Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce manuscrit le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices. À travers vous, le travail est également dédié à la mémoire de mes quatre frères Abdeslam, Abderrazak, Farid et Samia.*

*À mon frère Amine, Je te souhaite tout le bonheur et toute la réussite.*

*À et ma sœur Aicha et son mari Hichem, ainsi qu'à leur petite Bismutha.*

*À ma sœur Soumia et son fiancé Sofiane, je vous souhaite une longue vie pleine de joie et de bonheur.*

*À ma petite sœur Zineb, ne change rien, tu es la meilleure.*

*À tous mes enseignants, du primaire jusqu'à ce dernier examen.*

*À mes copains Hamza, Hakim, Anis, Mennad, Hanafi, Makhlouf, Aghilas, Nabil et Naim de la chambre J314 au niveau de la résidence universitaire 1000 lit de Béjaïa. Ce fut un bonheur de passer ces derniers années entouré de vous.*

*À tous les affamés de la planète, trouvez dans ce travail, un petit effort visant à alléger vos peines.*

*À tous ceux qui travaillent sans cesse pour un avenir sein afin de préserver notre environnement. De vos paillasse de laboratoire, jusqu'aux champs agricoles, nous assureront la durabilité et nous éviterons l'épuisement de nos ressources.*

*À la mémoire de Mr HAMAIDI Mohand Saïd, mon enseignant et le chef d'option « Microbiologie, Bactériologie » à l'université de Blida. On ne vous oubliera jamais.*

*RAI Abdelwahab.*

# *Remerciements*

# Remerciements

*En préambule à ce manuscrit, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de cette thèse.*

*Je tiens à remercier sincèrement Monsieur **Elhafid Nabti**, qui, en tant que mon directeur de thèse, mais aussi un irremplaçable ami, était ma source d'inspiration. Je le remercie vivement pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer, pour sa générosité sans limite et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges professionnelles.*

*Je remercie également messieurs **Houali Karim, Khenchouche Abdelhalim** et **Aouf Abdelhakim** pour leur examen du manuscrit et leur participation à la réussite de la soutenance, ainsi que monsieur **Mebarkia Abdelkrim** pour l'avoir présidée. Vos efforts participeront, sans doute, à la valorisation et à l'amélioration de ce manuscrit.*

*Je tiens à remercier vivement les membres du laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables, particulièrement ceux de mon équipe « Biomasse et Environnement » : **Abassi Houssine, Dahdah Kamel, Tabli Nacera, Bensidhoum Leila, Khelloufi Nouria, Ait Bessai Syla et Belkebla Nadia**. Sans oublier Mademoiselle **Bouaoud Yousra**, membre du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Béjaïa, merci pour votre disponibilité.*

*Je remercie également Monsieur **Chérif Ameer** et son équipe du « LBVBGR-Laboratoire de Biotechnologie et de Valorisation des Bio-Géoressources » à Tunis. Je n'oublierai jamais votre soutien pendant les moments difficiles, votre accueil chaleureux et l'espace familial que vous m'avez*

*offert pendant mon séjour chez vous. Mes remerciements les plus sincères sont également adressés à Monsieur **Mohamed Naifar**, à Mesdames **Fatma Naili**, **Leila Jmeii** et tous les autres membres de ce laboratoire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Cristina Cruz**, cheffe du laboratoire « cE3c-centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes » à Lisbonne. Chère Cristina, vous avez changé ma vision des choses, vous aviez participé et vous participez encore à chaque partie de ce travail, mais aussi à construire mon esprit scientifique, aujourd'hui et grâce à vous, plus averti que jamais.*

*Je tiens également à remercier Monsieur **João Evandro Brandão Travares** et Madame **Margarida Samanta**, membres du laboratoire c3Ec, pas seulement pour leur aide scientifique durant mon séjour au Portugal, mais également pour les moments de bonheurs qu'on a partagé. Sans oublier Monsieur **Rodrigo Nascimento Maia** pour la mise en disponibilité de son appareillage d'HPLC, ainsi que son aimable soutien.*

*Je remercie infiniment Monsieur **Silini Allaoua**, le chef du département de Microbiologie à l'université de Sétif-1 et Monsieur **Kezal Salim** de l'institut Pasteur d'Alger, pour leurs idées pertinentes, ainsi que pour les produits chimiques qu'ils me l'ont aimablement fourni en cas de besoin.*

*Mes remerciements s'adressent également aux messieurs **Oumouna M.**, **Benyahia N.**, **Mohand Said R.**, **Errahmani B.**, **Benhelal A.**, **Souami K.** et à tous mes autres enseignants durant les cinq années de mon cursus Licence-Master à l'université de Blida, pour l'inspiration et l'encouragement qu'ils ont bien voulu me consacrer.*

*Je remercie vivement Monsieur **Ghoul Mostefa**, qui, en tant que mon ex-encadreur, pour la proposition de la thématique et son soutien continue en cas de besoin, ce travaille lui est dédié ainsi qu'à Monsieur **Anton Hartmann** à l'occasion de leur retraite.*

*Un remerciement spécial s'adresse à tout le personnel de l'université de Béjaïa. Merci aux agents de sécurité de nous avoir facilité l'accès aux laboratoires à des heures tardives de nuit. Merci à Mennas Badria, Atti Fatima, Dib Salima et tous les ingénieurs des laboratoires de leur agréable participation.*

*Merci à tous et à toutes.*

*Veillez retrouver ici, le fruit de nos efforts.*

*Rai Abdelwahab.*

ملخص

## ملخص

يتأثر التفاعل بين النبات والبكتيريا المحفزة لنموه بالضغط الحيوية وغير الحيوية مثل الفطريات الضارة، انعدام التوازن الغذائي وارتفاع نسبة الملوحة. في هذا العمل، تم اختيار 70 عزلة بكتيرية مثبتة للأزوت وفقا لقدرتها على إنتاج جزيئات ذات أهمية زراعية. بعد التشخيص الجيني للعزلات المختارة، تم دراسة تأثير مستخلصات كل من التين الشوكي (OFI) واثنين من الطحالب البحرية *Ulva lactuca* (UL) و *Enteromorpha intestinalis* (EI) على قدرة هذه العزلات على مقاومة الملوحة. أيضا، تم تحديد التأثير المشترك لكل من المستخلصات والعزلات المختارة على إنتاش بذور القمح الصلب وعلى نمو الطماطم تحت تأثير الملوحة. أخيرا، تم التشخيص الجيني للعزلة البكتيرية RhiNA وتقييم قدرتها على تثبيط نمو الفطريات *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *Botrytis cinerea* و *Mucor sp.* كما تم اختبار فعاليتها كعامل بيولوجي لمكافحة العفن الرمادي على فواكه التفاح. جميع العزلات المختارة، BEA4، BEC9، BOA4 و SEB9، التي تم تشخيصها ك *Flavobacterium johnsoniae*، *Pseudomonas putida*، *Achromobacter xylosoxidans* و *Azotobacter chroococcum* على التوالي لديها القدرة على إنتاج مجموعة واسعة من الانزيمات المحللة، حمض الأندول (BEA4: 76.3، BEC9: 25.7، BOA4: 47.4 و SEB9: 32.2 ميكرو غرام/مل) والسيدروفورات، كما أنها قادرة على تحليل الفوسفات ثلاثي الكالسيوم. في وجود 300 Mm NaCl، السلالة BEA4 ومستخلص OFI قاما بتحسين نسبة إنتاش بذور القمح الصلب من 2.8 (الشاهد) إلى 25 و 39% على التوالي، في حين أن الجمع بينهما حسن هذه النسبة إلى 47%. في وجود 150 mM NaCl وبعد شهر من النمو، لم يؤثر كل من مستخلص UL والسلالة BEC9 على وزن نبات الطماطم، في حين أن وجودهما معا حسنه من 0.038 (الشاهد) إلى 0.077 ملغ/نبته. ارتفع تركيز البرولين في نباتات الطماطم تحت الإجهاد الملحي من 11.5 (الشاهد) إلى 24.8 و 32.05 ميكرو غرام/مل في وجود كل من السلالة BOA4 ومستخلص EI على التوالي. السلالة RhiNA، والتي تم تشخيصها ك *Pseudomonas protegens*، منحت حماية معتبرة لثمار التفاح ضد العفن الرمادي، حيث قللت المساحة المتضررة من 530 مم<sup>2</sup> (الشاهد) إلى 173 مم<sup>2</sup>. جميع العزلات المختارة في هذا العمل، إضافة إلى المستخلصات OFI، UL و EI تشكل دعائم واعدة من أجل زراعة بيئية مستدامة في المستقبل.

**كلمات مفتاحية:** الإجهاد الملحي، PGPR، Osmoprotecteurs، بروتين، حمض الجلوتاميك، الفطريات المضرة بالنبات.

# *Résumé*

## Résumé

L'interaction plantes-PGPR est fortement affectée par les stress biotiques et abiotiques tels que les phytopathogènes, le déséquilibre nutritionnel et la salinité élevée. Dans ce travail, 70 isolats bactériens diazotrophes ont fait l'objet d'une sélection hiérarchique selon leur capacité à produire des métabolites d'intérêt agricole. Après identification des isolats sélectionnés, l'effet des extraits issus des raquettes de *Opuntia ficus-indica* (OFI), *Ulva lactuca* (UL) et *Enteromorpha intestinalis* (EI) sur l'halotolérance bactérienne a été étudié. L'effet combiné des extraits et des isolats sélectionnés sur la germination des graines de blé dur et sur la germination et la croissance de la tomate sous stress salin a été également étudié. Enfin, un isolat bactérien (RhiNA) a été identifié, évalué pour son antagonisme vis-à-vis de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea* et *Mucor* sp. et testé pour son efficacité comme agent de biocontrôle de la pourriture grise due à *B. cinerea* sur fruits de pomme. Les isolats sélectionnés (BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9), respectivement identifiés comme (*Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Azotobacter chroococcum*), sont des fixateurs d'azote, ayant la capacité de produire une large gamme d'enzymes lytiques, de l'acide indole acétique (BEA4 : 76,3 ; BEC9 : 25,7 ; BOA4 : 47,4 et SEB9 ; 32,2 µg/mL), des sidérophores et sont capables de solubiliser le phosphate tricalcique. A 300 mM NaCl, la souche BEA4 et l'extrait OFI ont restauré le taux de germination de blé dur de 2,8 (témoin) à 25 et 39% respectivement, alors que l'association BEA4-OFI l'a restauré à 56%. A 150 mM NaCl et après un mois de croissance, la taille des plantules de tomate n'a été amélioré ni en présence de la souche BEC9 ni de l'extrait UL. Cependant, leur association l'a significativement restauré de 0,038 à 0,077 g/plante. La concentration de proline dans les plantules de tomate stressées a augmenté de 11,5 (témoin) à 24,8 et 32,05 µg/mL en présence de la souche BOA4 et de l'association BOA4-EI respectivement. La souche RhiNA, identifiée comme *Pseudomonas protegens*, a permis de réduire la superficie de la zone pourrie des pommes infectées par *B. cinerea* de 530 (témoin) à 173 mm<sup>2</sup>. L'ensemble des souches sélectionnées ainsi que les trois extraits OFI, UL, et EI constituent un bon support de perspectives pour une meilleure agriculture écologique et renouvelable.

**Mots clé :** Stress salin, Osmoprotecteurs, PGPR, Proline, Acide Glutamique, Phytopathogènes.

# *Abstract*

## Abstract

The plant-PGPR interaction is strongly affected by biotic and abiotic stresses such as phytopathogens, nutritional imbalance and high salinity. In this work, 70 diazotrophic bacterial isolates were hierarchically selected according to their ability to produce metabolites of agricultural interest. After molecular identification of the selected strains, the effect of extracts from *Opuntia ficus-indica* (OFI), *Ulva lactuca* (UL) and *Enteromorpha intestinalis* (EI) on bacterial halotolerance was studied. The combined effect of extracts and the selected isolates on durum wheat germination and on tomato germination and growth under salt stress was also determined. Finally, the bacterial strain RhiNA was identified, evaluated for its antagonism against *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea* and *Mucor* sp., then tested for its effectiveness as biocontrol agent of *B. cinerea* gray mold on apple fruits. The selected nitrogen fixing strains, BEA4, BEC9, BOA4 and SEB9, respectively identified as *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Azotobacter chroococcum* have the ability to produce wide range of lytic enzymes, Indole Acetic Acid (BEA4: 76.3, BEC9: 25.7, BOA4: 47.4 and SEB9: 32.2  $\mu\text{g/mL}$ ), siderophores and are capable of solubilizing tricalcium phosphate. At 300 mM NaCl, the strain BOA4 and OFI-extract restored wheat germination percentage from 2.8 (control) to 25 and 39% respectively, where BEA4-OFI association restored it to 56%. At 150 mM NaCl and after one month, tomato seedlings' fresh weight was not restored either with the strain BEC9 nor UL-extract. However, their association significantly increased it from 0.038 to 0.077 g/plant. Proline concentration in tomato stressed seedlings was enhanced from 11.5 (control) to 24.8 and 32.05  $\mu\text{g/mL}$  in presence of BOA4 and BOA4-EI respectively. The strain RhiNA, identified as *Pseudomonas protegens*, remarkably reduced rotted zone in *B. cinerea*-infected apples from 530 (control) to only 173  $\text{mm}^2$ . All the selected isolates as well as OFI-, UL- and EI- extracts constitute promising supports of perspectives for ecological and renewable agriculture in future.

**Key words:** Salt stress, Osmoprotectants, PGPR, Proline, Glutamic acid, Phytopathogens.

# *Liste des abréviations*

### Liste des abréviations

ABA : Acide Abscissique.  
AIA : Acide Indole Acétique.  
ACC : Aminocyclopropane carboxylate.  
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool.  
CAM : craculacean acid metabolism.  
CAS : Chrome Azurol S.  
EC : Electrical Conductivity.  
ddNTP : di désoxy Nucléotide Triphosphate.  
DMSP : Dimethylsulfoniopropionate.  
dNTP : désoxy Nucléotide Triphosphate.  
dS : DéciSiemens.  
EI : *Enteromorpha intestinalis*.  
F : Fischer test.  
GB : Glycine Bétaïne.  
kDa : kilo Dalton.  
NCBI : National Center for Biotechnology Information.  
NF-b : Nitrogen Free-broth.  
OFI : *Opuntia ficus-indica*.  
PRO : Proline.  
PCR : Polymerase Chain Reaction.  
rpm : rotation par minute.  
ROS : Reactive Oxygen Species.  
ISR : induced systemic resistance.  
IST : induced systemic tolerance.  
UL : *Ulva lactuca*.

# *Liste des tableaux*

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 01</b> : Quelques processus métaboliques dus aux microorganismes dans le sol .....	06
<b>Tableau 02</b> : Réponse microbienne aux facteurs abiotiques .....	14
<b>Tableau 03</b> : Les grands groupes de solutés compatibles.....	18
<b>Tableau 04</b> : Les voies de synthèse du tréhalose et les enzymes impliquées.....	20
<b>Tableau 05</b> : Contenu des nopals du figuier de barbarie en acides aminés (g/100g de protéine), selon les stades de maturité .....	29
<b>Tableau 06</b> : Localisation géographique des échantillonnages de sol.....	34
<b>Tableau 07</b> : Lieux d'échantillonnage des algues et des raquettes d' <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	36
<b>Tableau 08</b> : Systématique de blé dur ( <i>Triticum durum</i> ) .....	57
<b>Tableau 09</b> : Systématique de la tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	62
<b>Tableau 10</b> : Profile de flux des solvants de migration pour l'HPLC .....	66
<b>Tableau 11</b> : Métabolites d'intérêt agricole, tests et références .....	68
<b>Tableau 12</b> : Propriétés physiques et chimiques des échantillons de sol .....	72
<b>Tableau 13</b> : Activités enzymatiques des 70 isolats .....	75
<b>Tableau 14</b> : Production d'AIA par les 28 isolats sélectionnés .....	82
<b>Tableau 15</b> : Production de sidérophores par les isolats sélectionnés.....	84
<b>Tableau 16</b> : Résultat de la solubilisation du phosphate tricalcique .....	88
<b>Tableau 17</b> : Caractères morpho-physicochimiques des quatre souches sur milieu LB .....	96
<b>Tableau 18</b> : Germination des graines de tomate sous différents traitements.....	111
<b>Tableau 19</b> : Métabolites d'intérêt agricole produite par les deux souches bactériennes <i>P. protegens</i> -RhiNA et <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 <sup>T</sup> .....	126

# *Liste des figures*

## Liste des Figures

<b>Figure 01</b> : Pertes agricoles liées aux facteurs biotiques et abiotiques.....	08
<b>Figure 02</b> : Structure du tréhalose .....	19
<b>Figure 03</b> : Synthèse de la glycine bêtaïne à partir de la choline .....	22
<b>Figure 04</b> : Synthèse de DMSP chez les algues marines et les plantes .....	23
<b>Figure 05</b> : Position du figuier de barbarie dans le monde végétal .....	24
<b>Figure 06</b> : Détails de l' <i>Opuntia ficus-indica</i> Miller .....	26
<b>Figure 07</b> : <i>Enteromorpha intestinalis</i> .....	34
<b>Figure 08</b> : <i>Ulva lactuca</i> .....	34
<b>Figure 09</b> : <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	35
<b>Figure 10</b> : localisation géographique des lieux d'échantillonnage des sols, des raquettes de l' <i>Opuntia ficus-indica</i> , de <i>Ulva lactuca</i> et <i>Enteromorpha intestinalis</i> .....	35
<b>Figure 11</b> : Schéma illustratif de la procédure d'isolement.....	38
<b>Figure 12</b> : Schéma récapitulative de la méthode des disques d'agar .....	40
<b>Figure 13</b> : Test de production de l'acide 3-indole acétique sur milieu liquide .....	43
<b>Figure 14</b> : Test de production de sidérophores .....	45
<b>Figure 15</b> : Utilisation de l'ACC comme seule source d'azote .....	46
<b>Figure 16</b> : Test de production de l'ammoniaque.....	47
<b>Figure 17</b> : Test de production de l'acide cyanhydrique (HCN).....	48
<b>Figure 18</b> : Présentation schématique de la procédure d'extraction d'ADN.....	49
<b>Figure 19</b> : Protocole d'identification moléculaire des isolats sélectionnés.....	53
<b>Figure 20</b> : Halotolérance des quatre souches en présence et/ou en absence de GB [1mM] et de l'extrait hydro-alcoolique d' <i>U. lactuca</i> , <i>E. intestinalis</i> et <i>O. ficus-indica</i> [1%].....	56
<b>Figure 21</b> : Graines de <i>Triticum durum</i> variété BOUSSALEM .....	57
<b>Figure 22</b> : Représentation schématique du test de germination des graines de blé dur .....	60
<b>Figure 23</b> : graines de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) variété Marmande .....	61
<b>Figure 24</b> : Les deux inocula bactériens et les extrait aqueux de <i>U. lactuca</i> , <i>E. intestinalis</i> et <i>O. ficus-indica</i> utilisés dans l'expérience de la tomate .....	63
<b>Figure 25</b> : Pots utilisés durant le premier mois de l'expérience de la tomate.....	64
<b>Figure 26</b> : Pots utilisés durant la deuxième partie de l'expérience de la tomate .....	64

<b>Figure 27</b> : Les souches fongiques <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor</i> sp. et <i>Botrytis cinerea</i> .....	67
<b>Figure 28</b> : Les principales étapes du test <i>in vivo</i> sur pommes (originale).....	70
<b>Figure 29</b> : Corrélation positive entre les valeurs pH (H <sub>2</sub> O) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes .....	76
<b>Figure 30</b> : Corrélation positive entre les valeurs pH (KCL) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes. ....	76
<b>Figure 31</b> : Corrélation négative entre les valeurs SOM (%) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes. ....	77
<b>Figure 32</b> : Corrélation négative entre les valeurs humidité ( $\theta_g$ ) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes.....	77
<b>Figure 33</b> : Corrélation négative entre les valeurs conductivité électrique (ds/m) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes .....	78
<b>Figure 34</b> : Corrélation entre les conductivités électriques (ds/m) des échantillons du sol et à la fois leurs contenus en matière organique et en eau (humidité) .....	78
<b>Figure 35</b> : Production de sidérophores par les souches BEA3, BEA4, BEC4 et BEC9 après 48heures d'incubation.....	84
<b>Figure 36</b> : Zone de solubilization du phosphate tricalcique par l'isolat SEB9 sur le milieu de Pikovskaya après 48 h d'incubation .....	88
<b>Figure 37</b> : Croissance des quatre souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 en absence et en présence de NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) ou d'ACC comme seule source d'azote dans le milieu.....	91
<b>Figure 38</b> : Production d'ammoniaque par les isolats (de gauche à droite) : BEA4 (-), BEC9 (+), SEB9 (-), BEA3 (+), BOA4 (+).....	94
<b>Figure 39</b> : production de l'HCN par les quatre isolats BEA4 (-) ; BEC9 (-) ; BOA4 (-) ; SEB9 (+).....	94
<b>Figure 40</b> : Arbre phylogénétique construit par l'algorithme <i>Neighbor-Joining</i> sur la base de quelques séquences d'ARN <sub>r</sub> 16S obtenues par BLAST.....	95
<b>Figure 41</b> : Aspect des souches après coloration de Gram.....	95
<b>Figure 42</b> : Aspect, sur milieu LB, des quatre souches .....	97
<b>Figure 43</b> : Aspect, sur milieu Jensen, des quatre souches.....	97

<b>Figure 44</b> : Détermination du pH optimum de la croissance souches A : <i>F. johnsoniae</i> -BEA4 ; B : <i>P. putida</i> -BEC9 ; C : <i>A. xylooxidans</i> -BOA4 ; D : <i>A. chroococcum</i> -SEB9 .....	98
<b>Figure 45</b> : Effet de la glycine bétaïne des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> , <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche BEA4 sur le milieu de culture NF-b.....	100
<b>Figure 46</b> : Effet de la glycine bétaïne des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> , <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche BEC9 sur le milieu de culture NF-b.....	101
<b>Figure 47</b> : Effet de la glycine bétaïne des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> , <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche BOA4 sur le milieu de culture NF-b.....	102
<b>Figure 48</b> : Effet de la glycine bétaïne des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> , <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche SEB9 sur le milieu de culture NF-b.....	103
<b>Figure 49</b> : Effet de la glycine des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche BEA4 sur le milieu de culture LB.....	103
<b>Figure 50</b> : Effet de la glycine des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche BEC9 sur le milieu de culture LB.....	104
<b>Figure 51</b> : Effet de la glycine des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche BOA4 sur le milieu de culture LB .....	104
<b>Figure 52</b> : Effet de la glycine des extraits de : <i>Ulva lactuca</i> <i>Enteromorpha intestinalis</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> sur l'halotolérance de la souche SEB9 sur le milieu de culture LB .....	105
<b>Figure 53</b> : Effet de la glycine bétaïne et des extraits aqueux de : <i>O. ficus-indica</i> , <i>U. lactuca</i> et <i>E. intestinalis</i> sur la germination des graines de blé dur sous stress salin.....	106
<b>Figure 54</b> : Effet des souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 sur la germination des graines de blé dur sous stress salin .....	107
<b>Figure 55</b> : Effet des souches et des associations souche-glycine bétaïne, souche- <i>O. ficus-indica</i> , souche- <i>U. lactuca</i> et souche- <i>E. intestinalis</i> sur la germination des graines de blé dur sous stress salin.....	108

<b>Figure 56 :</b> Effet des extraits de : <i>O. ficus-indica</i> , <i>U. lactuca</i> et <i>E. intestinalis</i> sur le poids frais des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence (B) de stress salin.....	112
<b>Figure 57 :</b> Effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9- <i>O. ficus-indica</i> (OFI), BEC9- <i>U. lactuca</i> (UL) et BEC9- <i>E. intestinalis</i> (EI) sur le poids frais des plantules de la tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence de stress salin (B).....	113
<b>Figure 58 :</b> Effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4- <i>O. ficus-indica</i> (OFI), BOA4- <i>U. lactuca</i> (UL) et BOA4- <i>E. intestinalis</i> (EI) sur le poids frais des plantules de la tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence de stress salin (B).....	114
<b>Figure 59 :</b> Effet des extraits de : <i>O. ficus-indica</i> , <i>U. lactuca</i> et <i>E. intestinalis</i> ( ) sur la taille des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence (B) de stress salin.....	115
<b>Figure 60 :</b> Effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9- <i>O. ficus-indica</i> (OFI), BEC9- <i>U. lactuca</i> (UL) et BEC9- <i>E. intestinalis</i> (EI) sur la taille des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence (B) de stress salin (150 mM NaCl).....	115
<b>Figure 61 :</b> Effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4- <i>O. ficus-indica</i> (OFI), BOA4- <i>U. lactuca</i> (UL) et BOA4- <i>E. intestinalis</i> (EI) sur la taille des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence de stress salin (B) (150 mM NaCl).....	116
<b>Figure 62 :</b> Poids frais des plantules de tomate après 47 J de croissance en présence de la souche BOA4 et/ou des extraits aqueux de <i>O. ficus-indica</i> (OFI), <i>U. lactuca</i> (UL) et <i>E. intestinalis</i> (EI).....	117
<b>Figure 63 :</b> Acide glutamique accumulé par les plantules de tomate après 47J de croissance en présence de la souche BOA4 et/ou des extraits aqueux d'OFI, UL et EI.....	118
<b>Figure 64 :</b> Proline accumulés par les plantules de tomate après 47J de croissance en présence de la souche BOA4 et/ou des extraits aqueux d'OFI, UL et EI.....	118
<b>Figure 65 :</b> Arbre phylogénétique construit par l'algorithme <i>Neighbor-Joining</i> sur la base de quelques séquences d'ARN <sub>r</sub> 16S obtenues par BLAST. La barre indique 2% de divergence entre les séquences.....	125
<b>Figure 66 :</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i> , <i>A. niger</i> , <i>M. sp.</i> , et <i>A. flavus</i> .....	128

**Figure 67** : Pourcentage de germination des spores de *B. cinerea*, *A. niger*, *M. sp.*, et *A. flavus*.....129

**Figure 68** : Zone pourrie des fruits de pomme attaquées par *B. cinerea*, en présence et en absence de la souche antagoniste RhiNA.....130

**Figure 69** : zones pourries des pommes attaquées par *B. cinerea*, en présence et en absence de la souche antagoniste RhiNA .....130

*Production scientifique*

## 1. Publications Internationales :

Publications internationales <b>Article</b>	Titre	Caractérisation d'une souche d'actinobactérie, <i>Dietzia</i> sp. productrice de métabolites d'intérêt agricole.	
	Auteurs	DAHDAH	Kamel
		<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		BENSIDHOM	Leila
		SCHMID	Michael
		HARTMANN	Anton
		NABTI	El-Hafid
	Année	2015/2016	
Revue	Microbiologie industrielle, sanitaire, et environnementale (REMISE)		
Site	<a href="http://www.remise.ma">www.remise.ma</a>		

Publications internationales <b>Article</b>	Titre	Biological Control of <i>Botrytis cinerea</i> by <i>Bacillus</i> sp. Strain S7LiBe Under Abiotic Stress	
	Auteurs	BENSIDHOM	Leila
		<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		Tabli	Nacera
		Kahouadji	Nabila
		Khaber	Meriem
		Nabti	Elhafid
	Année	2015/2016	
Revue	International Journal of Scientific Research of Science and Technology (IJRST)		
Site	<a href="http://www.ijrst.com">www.ijrst.com</a>		

Publications internationales <b>Article</b>	Titre	A <i>Pseudomonas Protegens</i> with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits against <i>Botrytis Cinerea</i> Gray Mold.	
	Auteurs	<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		BENSIDHOM	Leila
		TABLI	Nacera
		NABTI	El-Hafid
	Année	2016/2017	
	Revue	Microbiologie industrielle, sanitaire, et environnementale (REMISE)	
Site	<a href="http://www.ijrst.com">www.ijrst.com</a>		

Publications internationales <b>Chapitre de livre</b>	Titre	Therapeutic and Pharmaceutical Application of Seaweeds	
	Auteur	<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
	Année	2016/2017	
	Edition	NOVA Publisher	
	Site	<a href="https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=61204">https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=61204</a>	
	Titre du livre	Biotechnological Applications of Seaweeds. E. Nabti (ed.)	
	ISBN	978-1-53610-968-9	

Publications internationales <b>Chapitre de livre IN PRESS</b>	Titre	Plant Growth-Promoting Bacteria: Importance in Vegetable Production	
	Auteur	<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		<b>NABTI</b>	<b>Elhafid</b>
	Année	2016/2017	
	Edition	Springer International Publishing AG	
	Site	<b>IN PRESS</b>	
	Titre du livre	Microbial Strategies for Vegetable Production. A. Zaidi, M.S. Khan (eds.)	
DOI	DOI 10.1007/978-3-319-54401-4_2		

Publications internationales <b>Article IN PRESS</b>	Titre	Extracts from seaweeds and <i>Opuntia ficus-indica</i> cladodes enhance diazotrophic-PGPR halotolerance, their enzymatic potential, and their impact on wheat germination under salt stress.	
	Auteur	<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		<b>AMEUR</b>	<b>Cherif</b>
		<b>CRUZ</b>	<b>Cristina</b>
		<b>NABTI</b>	<b>Elhafid</b>
	Année	2016/2017	
	Revue	Pedosphere	
Site	<a href="http://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&amp;filename=TRQY20170515001&amp;dbname=CAPJLAST">http://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&amp;filename=TRQY20170515001&amp;dbname=CAPJLAST</a>		
DOI	doi:10.1016/S1002-0160(17)60333-3		

## 2. Communications Internationales

<b>Communications internationales</b>	Titre	Bactéries diazotrophes d'intérêt agricole isolées à partir des wilayas (Béjaïa, Bouira, Médéa, Sétif) de l'Algérie.	
	Auteurs	<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		NABTI	El-Hafid
		BENSIDHOUM	Leila
		DAHDAH	Kamel
	Séminaire	Séminaire International sur les Sciences Alimentaires ''Biotechnologies Alimentaires Alimentation, Nutrition et Santé, Technologies Agro-Alimentaires''	
	Année	2014/2015	
	Lieu	Constantine, Algeria	
	Titre	The role of natural compatible solutes from <i>Ulva lactuca</i> and <i>Enteromorpha intestinalis</i> in the halotolerance of diazotrophic PGPR isolated from agricultural lands.	
	Auteurs	<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		NABTI	El-Hafid
		CHERIF	Ameur
	Séminaire	The second international conference ATEM II "Microbes and Ecosystems: The Universal Hidden Force"	
	Année	2014/2015	
	Lieu	Hammamet, Tunisia	
	Titre	Extract from <i>Enteromorpha intestinalis</i> enhance PGPR activities and amino acids accumulation for tomato growth restauration under salt stress.	
Auteurs	RAI	Abdelwahab	
	NABTI	El-Hafid	
	CRUZ	Cristina	
Séminaire	Conférence international sur les symbioses végétales et leurs applications biotechnologiques, agronomiques et environnementales.		
Année	2015/2016		
Lieu	Khemiss Miliana, Algérie		
Titre	The role of natural compatible solutes from <i>Ulva lactuca</i> , <i>Enteromorpha intestinalis</i> and <i>Opuntia ficus indica</i> in the halotolerance of diazotrophic PGPR and the germination of wheat seeds under salt stress.		
Auteurs	RAI	Abdelwahab	
Séminaire	The 1 <sup>st</sup> international conference on microbial ecology. Towards new challenges.		
Année	2014/2015		
Lieu	Sétif, Algérie		
<b>Workshop international</b>	Auteurs	RAI	Abdelwahab
	workshop	Chromatography systems, Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).	
	Année	2013/2014	
	Lieu	Sidi Thabet, Tunisie	

### 3. Communications Nationales

<b>Communications nationales</b>	Titre	Effets de quelques souches bactériennes productrices de substances d'intérêt agricole, et leur résistance aux métaux lourds	
	Auteurs	BENSIDHOUM	Leila
		NABTI	El-Hafid
		GUETTAFI	Narimane
		AZROU	Silia
		<b>RAI</b>	<b>Abdelwahab</b>
		DAHDAH	Kamel
	Séminaire	Les 20èmes Journées Nationales de Microbiologie	
	Année	2014-2015	
Lieu	Jijel		

### 4. Co-Encadrements des Mémoires de Master

Nom et prénom de 1 <sup>er</sup> étudiant : Soumia Korichi	Nom et prénom de 2 <sup>ème</sup> étudiant :	Année Univ. 2014-2015
Sujet : Rôle osmoprotecteur des extraits hydroalcooliques des deux algues : <i>Ulva lactuca</i> et <i>Cystociera sp.</i> dans la restauration de la croissance de deux bactéries à intérêt agricole sur milieu salin		
Nom et prénom de 1 <sup>er</sup> étudiant : Benaoudia Nadia	Nom et prénom de 2 <sup>ème</sup> étudiant : Medjoudj Saloua	Année Univ. 2014-2015
Sujet : Amélioration de la germination de blé dur sous stress salin par l'apport des bactéries PGPR et d'osmoprotecteurs dérivés de l'algue marine <i>Ulva lactuca</i> .		

# *Sommaire*

## Sommaire

<b>Dédicace</b>	i
<b>Remerciements</b>	iii
<b>ملخص</b>	vi
<b>Résumé</b>	vii
<b>Abstract</b>	viii
<b>Liste des abréviations</b>	ix
<b>Liste des tableaux</b>	x
<b>Liste des figures</b>	xi
<b>Production scientifique</b>	xvi
<b>Introduction</b>	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Sol et rhizosphère</b>	5
1. Le sol	5
2. L'humus	5
3. La rhizosphère	5
<b>II. Production agricole et stress abiotique</b>	7
1. Croissance démographique et problèmes de nutrition	7
2. L'influence du stress abiotique sur la production agricole	7
2.1. <i>La salinité</i>	7
2.2. <i>La sécheresse</i>	9
2.3. <i>Les températures extrêmes</i>	9
2.4. <i>Le déséquilibre nutritionnel en Azote (N)</i>	10
3. Les problèmes abiotiques dans les zones arides et semi-arides	11
<b>III. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes</b>	11
1. Définition des PGPR	12
2. Principaux rôles des PGPR	12
3. PGPR et stress biotique	13
4. Interaction PGPR-plante sous stress abiotique	15
<b>IV. Stress salin et solutés compatibles</b>	16
1. La salinisation des sols	16
2. Solutions possibles pour une meilleure agriculture	16

3.	Définition d'un soluté compatible .....	17
4.	Solutés compatibles et stress abiotique.....	17
5.	Les différents types de solutés compatibles.....	17
6.	Mécanismes d'osmoprotection .....	19
6.1.	<i>Rôle primaire du potassium (K<sup>+</sup>)</i> .....	19
6.2.	<i>Osmoprotecteurs</i> .....	19
<b>V.</b>	<b>Le figuier de barbarie (<i>Opuntia ficus-indica</i>)</b> .....	<b>23</b>
1.	Le figuier de barbarie dans le monde végétal .....	24
2.	Origine et répartition géographique.....	25
3.	Généralités sur <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	25
4.	Écologie du figuier de barbarie et adaptations aux conditions extrêmes.....	27
4.1.	<i>Ecologie du figuier de barbarie</i> .....	27
4.2.	<i>Adaptation aux conditions extrêmes</i> .....	27
5.	Teneur en eau et composition en éléments biochimiques .....	28
<b>VI.</b>	<b>Les macroalgues marines</b> .....	<b>30</b>
1.	Définition.....	30
2.	Les grands groupes de macroalgues marines.....	30
2.1.	<i>Les Chlorophycées</i> .....	30
2.2.	<i>Les Rhodophycées</i> .....	31
2.3.	<i>Les Phéophycées</i> .....	31
3.	Utilisation des macroalgues marines .....	31
4.	Algues marines et solutés compatibles .....	32

## Chapitre II : Matériel et Méthodes.

**Première partie :** Isolement, sélection hiérarchique et identification des bactéries.

<b>I.</b>	<b>Echantillonnage</b> .....	<b>34</b>
1.	Echantillonnage du sol.....	34
2.	Echantillonnage des macro-algues et des raquettes d' <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	35
<b>II.</b>	<b>Propriétés physiques et chimiques des échantillons de sol</b> .....	<b>36</b>
1.	PH .....	36
2.	Conductivité électrique .....	36

---

3.	Contenu humide gravimétrique (humidité) .....	36
4.	Matière organique totale .....	37
<b>III.</b>	<b>Isolement et purification des bactéries diazotrophes</b> .....	<b>37</b>
1.	Procédure d'isolement .....	37
2.	Composition du milieu N-free Jensen .....	39
<b>IV.</b>	<b>Sélection hiérarchique des souches</b> .....	<b>39</b>
1.	Production d'enzymes d'intérêt agricole .....	39
1.1.	<i>Cellulase</i> .....	40
1.2.	<i>Chitinase</i> .....	40
1.3.	<i>Amylase</i> .....	41
1.4.	<i>Protéase</i> .....	41
1.5.	<i>Estérase</i> .....	42
1.6.	<i>Lipase</i> .....	42
1.7.	<i>Uréase</i> .....	42
2.	Production de l'acide 3-indole acétique (AIA) .....	43
3.	Production de sidérophores .....	44
4.	Solubilisation du phosphate tricalcique .....	45
5.	L'utilisation de l'ACC comme seule source d'azote .....	46
6.	Production d'ammoniaque (NH <sub>3</sub> ) .....	47
7.	Production de l'acide cyanhydrique (HCN) .....	47
<b>V.</b>	<b>Identification moléculaire</b> .....	<b>49</b>
1.	L'extraction d'ADN total ( <i>boiling lysis</i> ) .....	49
2.	Amplification du gène codant pour l'ARN 16S .....	50
3.	Electrophorèse sur gel d'agarose .....	50
4.	Séquençage .....	50
5.	Analyse phylogénétique .....	51
<b>VI.</b>	<b>Caractérisation morpho-physicochimique des souches sélectionnées</b> .....	<b>51</b>
1.	Aspect des colonies .....	51
2.	Aspect microscopique .....	52
2.1.	<i>La mobilité bactérienne (observation à l'état frais)</i> .....	52
2.2.	<i>Coloration de Gram</i> .....	52
3.	Recherche de la catalase .....	52

4. Le test de l'oxydase .....	52
5. Détermination du pH optimum de la croissance des souches.....	52
 <b>Deuxième partie : Effet des extraits bruts de <i>O. ficus indica</i>, <i>U. lactuca</i> et <i>E. intestinalis</i> sur l'halotolérance des souches sélectionnées et leur interaction avec les graines de blé en germination.</b>	
<b>I. Halotolérance des isolats sélectionnés .....</b>	<b>54</b>
1. Milieux de culture.....	54
1.1. <i>NF-b</i> .....	54
1.2. <i>LB</i> .....	54
2. Préparation des extraits hydro-alcooliques .....	54
3. Ajout des extraits et de glycine bêtaïne aux milieux de culture .....	55
4. Préparation des inocula et détermination de la croissance bactérienne .....	55
<b>II. Germination des graines de blé.....</b>	<b>57</b>
1. Provenance des graines .....	57
2. Stérilisation des graines .....	58
3. Bactérisation des graines .....	58
4. Protocole expérimental .....	58
 <b>Troisième partie : Effet des extraits bruts de <i>O. ficus indica</i>, <i>U. lactuca</i> et <i>E. intestinalis</i> et/ou des souches sélectionnées sur la croissance de la tomate sous stress salin.</b>	
<b>I. Halotolérance de la tomate en présence des souches et des extraits.....</b>	<b>61</b>
1. Provenance des graines.....	61
2. Suivre de la croissance de la tomate sous serre .....	62
2.1. <i>Souches bactériennes utilisées</i> .....	62
2.2. <i>Stérilisation des graines</i> .....	62
2.3. <i>Bactérisation des graines</i> .....	62
2.4. <i>Protocol expérimental</i> .....	63
<b>II. HPLC pour la détermination des acides aminés accumulés .....</b>	<b>65</b>
1. Produits chimiques et solutions .....	65
2. Matériel.....	65
3. L'appareil de l'HPLC .....	65
4. Méthode .....	66

4.1. Préparation de l'échantillon .....	66
4.2. Dérivatisation.....	66
4.3. Analyse .....	66

#### **Quatrième partie : *Pseudomonas protegens* comme agent de biocontrôle.**

<b>I. Souches bactériennes et champignons phytopathogènes.....</b>	<b>67</b>
1. Souches bactériennes .....	67
2. Souches fongiques .....	67
<b>II. Production de métabolites d'intérêt agricole par la souche RhiNA.....</b>	<b>68</b>
1. Métabolites antifongiques.....	68
2. Autres métabolites d'intérêt agricole.....	68
<b>III. Identification moléculaire.....</b>	<b>68</b>
<b>IV. Tests d'antagonisme <i>in vitro</i> .....</b>	<b>68</b>
1. Inhibition de la croissance mycélienne.....	68
2. Inhibition de la germination des spores fongiques .....	69
<b>V. Inhibition de la pourriture grise sur fruits de pomme .....</b>	<b>69</b>
<b>VI. Analyses statistiques .....</b>	<b>71</b>

#### **Chapitre III : Résultats et Discussion**

<b>I. Propriétés physicochimiques des échantillons du sol.....</b>	<b>72</b>
<b>II. Sélection hiérarchique des isolats .....</b>	<b>72</b>
1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique .....	72
2. Activités enzymatiques des isolats .....	75
2.1. Résultats des activités enzymatiques .....	75
2.2. Interaction paramètres physicochimiques-activités enzymatiques .....	76
2.3. Interactions salinité-matière organique et salinité-humidité.....	78
3. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA).....	82
4. Production de sidérophores.....	84
5. Solubilisation de phosphate tricalcique .....	87
6. L'utilisation de l'ACC comme seule source d'azote.....	90
7. Production de l'acide cyanhydrique .....	93
8. Production de l'ammoniac .....	94

---

<b>III. Identification et caractérisation des isolats sélectionnés</b> .....	95
1. Identification moléculaire.....	95
2. Caractères morpho-physicochimiques.....	95
3. PH optimum de croissance.....	97
<b>IV. Halotolérance des isolats sélectionnés</b> .....	100
1. Extrait ajoutés au milieu NF-b.....	100
2. Extrait ajoutés au milieu LB.....	103
<b>V. Germination des graines de blé, effet des souches et/ou extraits</b> .....	105
1. Effet des extraits.....	105
2. Effet des souches.....	106
3. Effet de l'association Souche-Extrait.....	107
<b>VI. Halotolérance de la tomate, effet des souches et/ou extraits</b> .....	111
1. Pourcentage final des graines germées.....	111
2. Poids frais des plantules après un mois de croissance.....	112
2.1. <i>Effet des extraits en absence de stress salin (00 mM NaCl)</i> .....	112
2.2. <i>Effet des extraits en présence de stress salin (150 mM NaCl)</i> .....	112
2.3. <i>Effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9-extraits</i> .....	113
2.4. <i>Effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4-extraits</i> .....	113
3. Taille (mm) des plantules de la tomate après un mois de croissance.....	114
3.1. <i>Effet des extraits</i> .....	114
3.2. <i>Effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9-extraits</i> .....	115
3.3. <i>Effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4-extraits</i> .....	116
4. Poids frais des plantules de tomate après 47 jours de croissance.....	116
5. Proline et acide glutamique accumulés par les plantules de tomate.....	117
<b>VII. <i>Pseudomonas protegens</i> comme agent de biocontrôle</b> .....	125
1. Identification moléculaire.....	125
2. Production des métabolites d'intérêt agricole.....	126
3. Inhibition de la croissance mycélienne des champignons étudiés.....	128
4. Inhibition de la germination des spores (SGP%).....	129
5. Inhibition de la pourriture grise due à <i>B. cinerea</i> sur fruits de pomme.....	129
<b>Conclusion et Perspectives</b> .....	132

# *Introduction*

## Introduction

En 2004, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a estimé que vers la fin de l'année 2050, la population humaine est supposée atteindre 8.9 milliard habitant sur terre. Ces estimations correspondent à une augmentation approximative de 47 %. En 2011, l'ONU a également annoncé que cette population venait d'atteindre 7 milliard habitants sur terre. Cependant, ces présomptions ont été corrigées vers la fin de l'année 2015, signalant que notre planète est supposée abriter plus de 9.725 et 11.213 milliard habitants vers la fin des années 2050 et 2100, respectivement (UN. 2004 ; Ashraf *et al.*, 2012 ; UN. 2015).

Cette explosion démographique alarmante, particulièrement en Asie (60%) et en Afrique (16%), nécessitera sans doute une augmentation considérable des besoins nutritionnels provenant essentiellement de l'agriculture (Waughray, 2011). D'un autre côté, le CSCDGC "*Center for Study of Carbon Dioxide and Global Change*" a indiqué que 60 à 100 % d'augmentation dans la production agricole sera nécessaire pour nourrir la planète. Il a également indiqué que seule une augmentation de 34.5 à 51.5 % sera probablement achevée entre 2009 et 2050 (Idso, 2011). A titre d'exemple, la production du riz et du blé dans les pays en développement est supposée augmenter de 4.2 et de 3.1 à 4.7 et 3.5 Tons/Hectare entre les années 2015 et 2030, respectivement. Selon les études présomptives de la croissance démographique dans ces régions de la planète, une telle augmentation de la production céréalière, mais aussi d'autres produits agricoles, semble loin d'être satisfaisante (UN, 2015 ; FAO, 2012).

L'explosion démographique ne constitue pas la seule contrainte affectant la production agricole. En l'occurrence, plusieurs activités humaines, principalement liées à l'industrialisation et l'utilisation excessive des hydrocarbures, mais aussi à d'autres pratiques agricoles comme l'irrigation et l'application hystérique des fertilisants, pesticides et herbicides chimiques ont amélioré, ensemble, la vie humaines. Malheureusement, ces activités ont parallèlement provoqué une accumulation de quantités considérablement accrues de produits toxiques de différentes natures, menant à une dégradation sans précédent des terrains agricoles et à une privation des sols (Tak *et al.*, 2013). Ainsi, une accentuation des changements climatiques de la planète, les pertes de la biodiversité, une diminution des réserves planétaires

en eau, une dégradation de l'environnement et une salinisation des terrains agricoles en sont les résultats (Shahbaz and Ashraf, 2013).

Parmi ces contraintes, la salinisation des terrains agricoles impose des défis énormes, à la fois aux scientifiques et aux agriculteurs, exigeant une exploitation croissante des ressources naturelles à la recherche de solutions prometteuses (Ashraf *et al.*, 2012). Environ 6 % de la surface terrestre est affectée par la salinité, correspondant à 20 % des terrains irrigués au niveau mondial. Ces sites sont majoritairement localisés dans les zones arides et semi-arides du globe où la pluviométrie est insuffisante pour éliminer les sels accumulés dans les couches superficielles du sol. De plus, il a été estimé que plus de 50 % des terrains agricoles seront affectés par la salinité vers la fin de l'année 2050 (Jamil *et al.*, 2011 ; Dikilitas and Karakas, 2012 ; Stanković *et al.*, 2015). En Algérie, près de 10 à 15 % des terres irriguées sont affectés, occupant 3.2 millions d'hectares de la superficie totale, localisées aussi bien au Nord qu'au Sud du pays (Silini, 2016).

Face à cette situation angoissante, où la salinité est responsable de pertes agricoles et économiques énormes, la culture de nouvelles variétés connues pour leur tolérance au stress salin, la recherche et la sélection de germplasm existants des cultures potentielles, la production de cultures génétiquement modifiées et l'application exogène de solutés compatibles connus pour leur rôle osmoprotecteur constituent les principales stratégies visant la promotion du rendement agricole sous stress salin (Ashraf *et al.*, 2012). Ajoutant à ça, l'accumulation des données concernant les modalités d'interactions plantes-microorganismes a permis de distinguer un groupe de bactéries vivant dans la rhizosphère des plantes et capable de conférer des avantages bénéfiques à la fois aux plantes et au sol. Ce groupe de bactéries est connu sous le nom « PGPR », de l'anglais : « *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ». Outre leur pouvoir promoteur de la croissance des plantes sous condition non stressées, certains PGPR sont capables d'établir différentes formes d'interactions symbiotiques ou non-symbiotiques avec les plantes sous conditions de stress, participant à la remédiation du sol et la restauration de la croissance des plantes stressées (Choudhary et Varma, 2016).

La capacité inhérente aux PGPR de fixer l'azote atmosphérique, de solubiliser des formes insolubles de nutriments nécessaires à la croissance des plantes et de produire d'autres métabolites à grand intérêt agricole comme les sidérophores, les phytohormones et les

antibiotiques a fait de ces microorganismes une alternative écologique irréprochable afin d'éviter l'application excessive des produits chimiques à la fois chers et de plus en plus non souhaitables en agriculture. Ainsi, l'application des PGPR est considérée comme la méthode écologique la moins chère utilisée pour augmenter la production agricole via la stimulation de la croissance des plantes, le contrôle des phytopathogènes, la dégradation des polluants et la bioremédiation des terrains dégradés (Bhattacharyya et Jha 2012 ; Landa *et al.*, 2013).

Vivants dans un même environnement, les PGPR sont exposés aux mêmes concentrations de sels que les plantes, entravant, à des niveaux critiques, la croissance et l'interaction des deux partenaires. Suite à l'exposition des cellules à des concentrations élevées en sels, l'activité de l'eau dans leurs cytoplasmes diminue, altérant l'activité des protéines et inhibant plusieurs processus biologiques tels que la synthèse des macromolécules et la réplication de l'ADN (Nabti *et al.*, 2010 ; Bhattacharyya et Jha, 2012). En réponse au stress salin, les plantes et les PGPR synthétisent et/ou accumulent des solutés compatibles (osmoprotecteurs) ; des métabolites compatibles avec le comportement cellulaire, jouant un rôle important dans le rééquilibrage osmotique et protégeant les cellules contre la plasmolyse (Cánovas *et al.*, 1997 ; Göller *et al.*, 1998 ; Wani *et al.*, 2013).

Ajoutant à ça, certains organismes comme le figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) et la plupart des macroalgues marines sont sur la première ligne des organismes connus pour leur tolérance aux stress hydriques. Cette tolérance est en grande partie liée à leur capacité de synthétiser et d'accumuler des solutés compatibles dans les cytoplasmes de leurs cellules. La composition chimique de ces plantes, mais aussi leurs modes d'adaptation aux stress abiotiques, suggèrent la possibilité de les utiliser comme sources exogène d'une large gamme de soluté compatibles (Edwards *et al.*, 1988 ; Ghoul *et al.*, 1995 ; Kirst 1996 ; Pichereau *et al.*, 1998 ; Nabti *et al.*, 2007 ; Sáenz *et al.*, 2013).

Dans cette optique, on s'est assigné les objectifs suivants :

1. Isolement, sélection et identification de bactéries diazotrophes ayant la capacité de produire « *in vitro* » des métabolites d'intérêt agricole.

2. Evaluation de l'effet des extraits issus des deux algues marines *Ulva lactuca* et *Enteromorpha intestinalis* et des raquettes de *l'Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance des isolats sélectionnés.

3. Screening de l'effet des isolats sélectionnés et de leurs associations avec les extraits précédemment cités sur la germination des graines de blé dur sous stress salin.

4. Evaluation de l'effet des isolats sélectionnés et de leurs associations avec les extraits précédemment cités sur la germination, la croissance, et l'accumulation d'acides aminés par les plantules de tomate sous stress salin.

5. Isolement et sélection d'une souche bactérienne à fort pouvoir antagoniste vis-à-vis des champignons phytopathogènes *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea* et *Mucor* sp.

6. Evaluation de la performance antagoniste de la souche isolée dans la prévention de la pourriture grise due à *Botrytis cinerea* sur fruits de pomme.

# Synthèse bibliographique

## I. Sol et rhizosphère

### 1. Le sol

Le sol est défini comme étant une entité naturelle vivante et dynamique sur la surface de la terre, il est composé de solides (organique et minérale), liquides et gazes, présentant au moins l'un des deux caractères suivants :

- Composé de couches qui se différencient par leurs matières premières suite à des ajouts, des pertes ou des transformations de matière et d'énergie.
- Capacité à supporter les plantes enracinées dans un environnement naturel (Osman, 2013).

Le sol constitue le support de vie d'une très grande variété d'organismes vivants en interactions continues (plantes, vers, nématodes, acariens, protozoaires, algues, champignons, eubactéries, archaea, etc.) (Scow, 2004).

### 2. L'humus

L'humus constitue la portion, de couleur foncée, des substances organiques insolubles dans le sol qui résultent de la décomposition de la matière organique (Stenesh, 1989).

C'est un composant essentiel du sol ; il détermine le niveau de la fertilité du sol et son contenu en éléments minéraux ainsi que ses propriétés physicochimiques. D'un autre côté, l'humus participe à la régulation de la distribution de l'eau et de l'air dans le sol (Rusanov et Anilova, 2009).

La partie vivante du sol est composée d'insectes, protozoaires, champignons, bactéries etc. les microorganismes qui y sont présents sont responsables d'une multitude de réactions biochimiques impliquées dans les cycles cataboliques ou anaboliques de la matière organique tel que la minéralisation, l'immobilisation et la nitrification (Tableau 1) (Taiz et Zeiger, 2002).

### 3. La rhizosphère

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, il a été largement admis que les plantes encouragent la prolifération des microorganismes autour de leurs racines, cela a conduit Lorenz Hiltner à définir, en 1904, la rhizosphère comme étant « **la partie du sol qui entoure immédiatement les racines de la plante** » (Elmerich, 2007).

Les racines des plantes libèrent une large variété de substances (divers alcools, éthylène, sucres, acides aminés, acides organiques, vitamines, nucléotides, polysaccharides et enzymes). Cette multitude de molécules secrétées par les racines influence considérablement les microorganismes environnants et constitue un écosystème rhizosphérique très favorable à leur croissance (Prescott, 2002).

La plupart des microorganismes de la rhizosphère aident à leur tour, par mutualisme, les plantes par la fixation de l'azote atmosphérique et la dégradation de la matière organique, ainsi que par la stimulation de la croissance et la protection des végétaux (Schmitt-Kopplin *et al.*, 2007). D'un autre côté, le sol exerce un effet sur les communautés microbiennes au niveau de la rhizosphère en maintenant des pH, des aérations et des caractéristiques physico-chimiques différentes (Marschner *et al.*, 2001).

**Tableau 1** : processus métaboliques dus aux microorganismes dans le sol (Prescott, 2002).

<i>La fixation biologique de l'azote</i>	Conversion bactérienne de l'azote moléculaire en ammoniac.
<i>L'immobilisation</i>	L'absorption et l'assimilation de l'ammonium ou de nitrate par les microorganismes.
<i>Ammonification</i>	Catabolisme bactérien et fongique de la matière organique azotée dans le sol en ammonium.
<i>Nitrification</i>	L'oxydation bactérienne de l'ammonium en nitrite puis des nitrites en nitrates.
<i>Dénitrification</i>	Conversion bactérienne du nitrate en oxyde nitreux et en azote moléculaire.
<i>Minéralisation</i>	Catabolisme bactérien et fongique de la matière organique dans le sol en azote moléculaire à travers l'ammonification ou la nitrification.

## **II. Production agricole et stress abiotique**

La croissance rapide de la population humaine pose de plus en plus un nombre de défis agricoles et alimentaires. L'altération de la biodiversité, la dégradation des environnements et la diminution de la disponibilité des nutriments obligent à exploiter les ressources naturelles et à trouver des outils performants pour diminuer le risque dû aux facteurs environnementaux (Ashraf *et al.*, 2012).

### **1. Croissance démographique et problèmes de nutrition**

En 2011, l'ONU avait annoncé que la population mondiale a dépassé 7 milliards habitant sur terre (Ashraf *et al.*, 2012). Cette population croissante exigera une quantité et une qualité croissantes de nourriture provenant de l'agriculture. Pour répondre à ces nouvelles exigences, un doublement de la production sera probablement nécessaire dans les quarante prochaines années. A titre d'exemple, la demande mondiale de céréales devrait augmenter de 585 millions à 828 millions de tonnes en 2025, ce qui correspond à une augmentation de 42% (Waughray, 2011).

### **2. L'influence du stress abiotique sur la production agricole**

Plusieurs facteurs environnementaux sont impliqués dans la diminution du rendement final d'un produit agricole ou dans l'altération de sa qualité. La sécheresse, le pH, la salinité, le déséquilibre des nutriments (toxicité et déficience minérale) et les températures extrêmes constituent, souvent, les principales contraintes environnementales affectant la production agricole (Ashraf et Foolad, 2007).

Le stress abiotique est donc considéré comme le principal responsable des pertes associées aux cultures ; la sécheresse et la salinité sont responsables de 17 et 20% de pertes, respectivement, alors que la température élevée ou basse est responsable de 40 et 15% de pertes respectivement, 8% de pertes sont liées à d'autres facteurs (Athar et Ashraf, 2009) (figure 1).

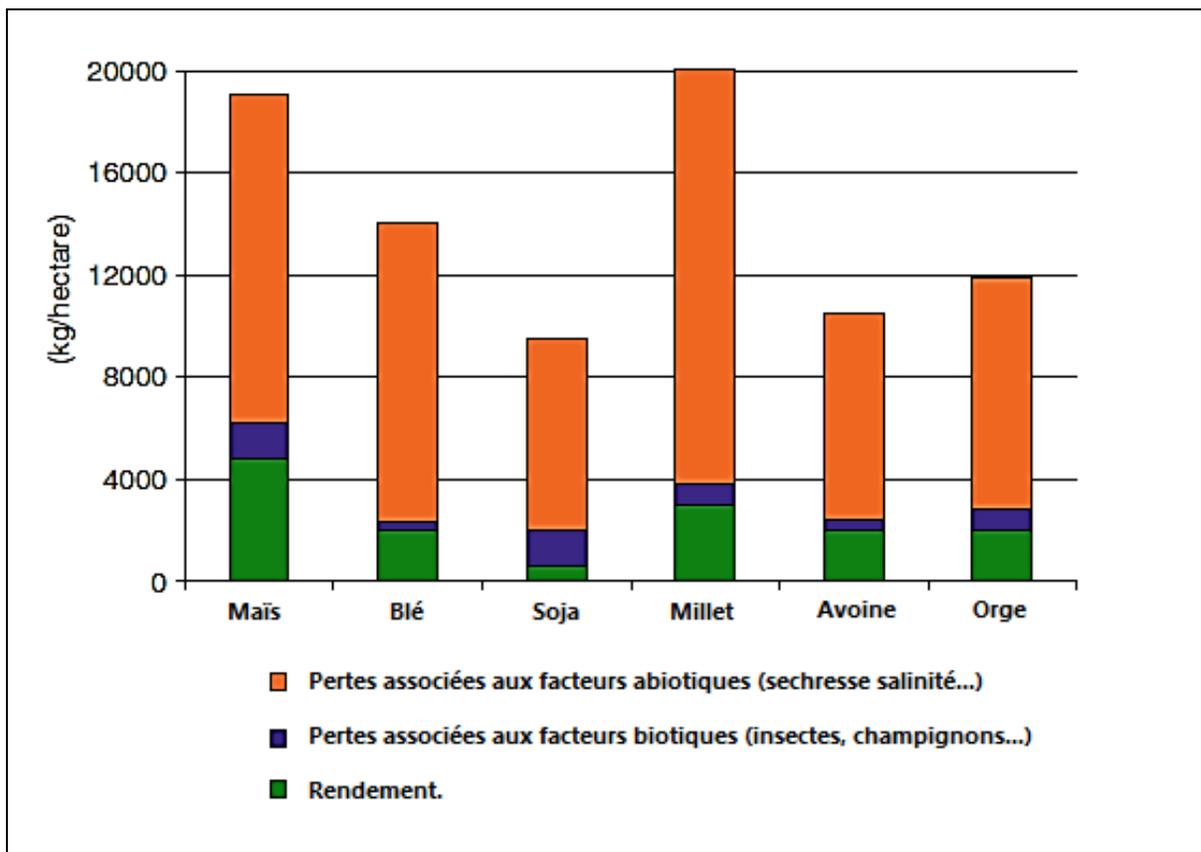
#### *2.1. La salinité*

La concentration élevée des différents ions de sel dans le sol, principalement le sodium et le chlore mais aussi d'autres ions tel que [potassium, calcium, carbonate, nitrate, sulfate] provoque une diminution dans l'acquisition de l'eau par les racines des plantes. Aussi, La

concentration de certains ions, notamment  $\text{Na}^+$ , est maintenue basse grâce à des vacuoles intracellulaires qui stockent ces ions à l'aide de pompes à ions ATP-dépendantes (Kosová *et al.*, 2011).

Le chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) constitue le principal agent responsable du stress salin chez les plantes, son effet peut être observé par la diminution de la croissance ou même la mort de la plante. La salinité du sol provoque le stress chez la plante soit en rendant difficile le captage de l'eau par les racines ou bien par toxicité via l'accumulation d'une grande concentration de sel dans la plante. De plus, la salinité peut affecter la synthèse protéique, la photosynthèse et les métabolismes lipidiques (Rojas-Tapias *et al.*, 2012).

Avec l'augmentation de la population humaine et ses besoins nutritionnels, l'utilisation, de plus en plus importante, de l'irrigation a considérablement augmenté. Cette dernière a accentué la salinisation du sol, provoquant ainsi une diminution importante des rendements agricoles (Poustini et Siosemardeh, 2004).



**Figure 1 :** pertes agricoles dues aux facteurs biotiques et abiotiques au niveau planétaire (Ashraf *et al.*, 2012).

## 2.2. *La sécheresse*

L'eau constitue l'élément de vie universel. Il est évident qu'elle est considérée depuis longtemps comme étant le principal déterminant de la répartition de la végétation sur la terre (Parker, 1956).

La sécheresse limite considérablement le rendement et la productivité des cultures, particulièrement dans les régions arides et semi-arides (Yang *et al.*, 2009 ; Lashkari et Bannayan, 2012). Elle affecte le mouvement des nutriments dans le sol empêchant ainsi leur arrivée jusqu'aux racines de la plante (Powell et Klironomos, 2007).

Environ 45% des zones agricoles au niveau mondial constitue l'objet d'une sécheresse continue ou fréquente, et c'est là où réside plus de 38% de la population mondiale humaine (Ashraf et Foolad, 2007). Si cette évolution de la sécheresse évolue dans le même sens pour les années qui suivent, il est attendu que, vers l'année 2025, environ deux milliards personnes vivront dans des pays souffrants d'un manque absolu d'eau (Athar et Ashraf, 2009).

Dans les sols secs, les racines ne gardent pas leurs structures normales et ne peuvent pénétrer convenablement dans le sol afin d'en tirer profit ; la disponibilité en nutriments devient alors restreinte aux zones proches des racines (Tinker et Nye, 2000).

Le stress dû à la sécheresse peut affecter toute les étapes du développement des cultures. Les mécanismes de son influence sont très complexes, ils peuvent affecter plusieurs processus métaboliques et à plusieurs stades de développement de la plante, tels que la gamétogénèse, la fertilisation, l'embryogénèse et le développement des grains ainsi que le développement reproductif au moment de la floraison (Alqudah *et al.*, 2011).

## 2.3. *Les températures extrêmes*

Les températures extrêmes influencent considérablement le rendement des cultures à plusieurs niveaux et pendant les différents stades de vie de la plante.

L'augmentation de la température au niveau mondial due au réchauffement climatique pose des problèmes majeurs en agriculture. Ainsi, Il a été démontré que les températures élevées affectent plusieurs stades du développement des plantes tels que la floraison et la fructification (Sarma *et al.*, 2012). De même, une grande partie des enzymes impliquées dans

la photosynthèse est influencée ; le photosystème II (PSII) est endommagé à des températures au-delà de 45°. D'un autre côté, l'assimilation du CO<sub>2</sub> par les plantes est également inhibée par les températures élevées (Brestic et Zivcak, 2013).

La plupart du temps, le stress dû à la température élevée est lié à la sécheresse, ce qui rend difficile la détermination de l'effet de la chaleur sur les cultures et la réponse de ces dernières à ce type de stress. L'étude de l'effet de la chaleur sur les plantes peut être déterminée uniquement dans des conditions extrêmement humides. Ce type d'étude se réalise en se basant sur plusieurs paramètres tels que la proportion des tissus nécrotiques, la stabilité de la membrane et de la chlorophylle ainsi que le développement, la croissance et le rendement de la plante (Hall *et al.*, 1979).

Le stress dû au froid est l'une des causes majeures des pertes agricoles, les conséquences de ce type de stress dépendent du degré de sévérité et du temps d'exposition. Les semis constituent le stade le plus sensible au froid, les principaux symptômes liés au froid se résument principalement à des lésions de surface, jaunissement des feuilles, dessiccation, destruction des tissus, accélération du vieillissement de la plante, diminution de sa durée de vie et production de l'éthylène. Concernant la reproduction, le froid peut engendrer la stérilité des pollens etc. (Yadav, 2010).

Au niveau cellulaire, plusieurs études ont montré que la membrane est le premier site de perception du froid, cette perception est le résultat de la rigidité membranaire et d'une modification qualitative et quantitative des lipides membranaires. Des modifications au niveau du cytosquelette cellulaire sont aussi observées sous l'effet du froid ; ces modifications exprimées par des réarrangements au niveau des microfilaments d'actine résultent de la modification de la fluidité membranaire (Solanke et Sharma, 2008).

#### 2.4. *Le déséquilibre nutritionnel en Azote (N)*

L'azote (N) est un élément très important pour le développement des cultures, c'est un constituant de chlorophylle, des acides aminés et des acides nucléiques etc. Sa disponibilité pour les plantes est généralement inférieure à celle nécessaire pour leur bon développement. Ce manque est, dans la plupart du temps, compensé par l'ajout d'engrais azotés. Cependant,

seulement 40% de cet azote est assimilé par les cultures, ce qui peut aboutir à l'accumulation de cet élément dans le sol (Cavatte *et al.*, 2012).

### 3. Les problèmes abiotiques dans les zones arides et semi-arides

Dans les régions arides et semi-arides tel que les territoires méditerranéens, le fonctionnement des écosystèmes est adapté aux conditions climatiques sévères (la température élevée et la faible pluviométrie). Cependant, les changements de température au niveau mondial et de la configuration des précipitations aboutissent à des périodes de sécheresse plus longues. Dans ces écosystèmes méditerranéens, la sécheresse est la principale conséquence du changement climatique, ce dernier n'affecte pas uniquement la végétation mais aussi la biomasse microbienne au niveau du sol, et particulièrement dans les zones rhizosphériques des plantes (Hueso *et al.*, 2011).

L'irrigation s'est avérée comme la principale solution pour lutter contre la sécheresse et compenser le manque d'eau pour les cultures. Ainsi, 40% de la production vivrière est assurée sur des sols irrigués (17% des terrains agricoles dans le monde). Une grande partie de ces terrains irrigués est cependant menacée par la salinisation, ce qui peut altérer irrémédiablement les surfaces agricoles. Cette salinisation frappe le plus durement les régions arides et semi-arides où 25 % des surfaces agricoles irriguées sont touchées (chaque année 1 à 2% de la superficie irriguée dans le monde est concernée par ce problème) (FAO, 2002).

L'origine du sel dans les sols des régions arides et semi-arides est surtout la conséquence de l'évapotranspiration élevée où le mouvement ascendant de l'eau accompagnée de sels des couches les plus profondes aboutit à l'accumulation de ce dernier dans les régions des racines, entravant ainsi, leurs capacités d'absorber l'eau (Chaudhary *et al.*, 2003).

### III. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les bactéries sont ubiquitaires et si certaines d'entre elles sont responsables de maladies infectieuses chez les autres vivants (animaux, végétaux...), la plupart sont souvent indispensables au développement des autres formes de vie sur terre. Parmi ces bactéries, les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes ou « **PGPR**, de l'anglais : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* », jouent un rôle très important dans l'amélioration de la croissance des plantes à différentes stades de leurs développement.

L'utilisation des microorganismes afin d'améliorer la disponibilité des nutriments et protéger les plantes constitue actuellement l'une des pratiques très importantes utilisées en agriculture. Ainsi, durant les deux décennies précédentes, l'utilisation des PGPR pour augmenter le rendement des cultures a été largement envisagée, les résultats de ces avancements sont prometteurs et incitent à continuer les travaux dans cette approche (Figueiredo *et al.*, 2010).

### 1. Définition des PGPR

En se basant sur leurs travaux, Kloepper et Schroth (1978) ont introduit le mot « Rhizobactéries » qualifiant la communauté bactérienne qui colonise compétitivement les racines des plantes, tout en améliorant leurs croissances (Bhattacharyya et Jha, 2012). Les PGPR sont donc des bactéries de la rhizosphère des plantes. Ainsi, une rhizobactérie est dite PGPR si, inoculée dans la rhizosphère d'une plante, elle est capable de lui apporter un effet bénéfique (Darrah, 1993 ; Barriuso *et al.*, 2008).

### 2. Principaux rôles des PGPR

La compréhension de l'effet de la rhizosphère sur les communautés microbiennes ainsi que l'effet de ces dernières sur la croissance des plantes a permis d'apporter une nouvelle lumière sur le rôle de ces microorganismes dans le fonctionnement des écosystèmes (Nie *et al.*, 2009). Les mécanismes par lesquels les PGPR peuvent améliorer le rendement d'une plante sont divers ; leurs effets se manifestent à plusieurs niveaux et à différentes stades du développement de la plante.

Au fil du temps, pas mal de travaux ont été publiés concernant le rôle des PGPR comme inducteurs de la tolérance des plantes aux stress abiotiques (la sécheresse, la salinité, l'excès ou la déficience nutritionnels et même aux métaux lourds). Le terme '*tolérance systémique induite*' (TSI) a été proposé pour désigner la tolérance conférée aux plantes par les PGPR vis-à-vis à ces types de stress (Yang *et al.*, 2009).

Le rôle des PGPR ne s'arrête pas à la stimulation de la croissance de la plante et/ou la réduction des maladies causées par les phytopathogènes (virus, bactéries, champignons, nématodes), certaines PGPR stimulent des changements physiques ou chimiques améliorant

les défenses de la plante, ce qui est désigné par '*résistance systémique induite*' (RSI) (Shukla *et al.*, 2012).

Les PGPR jouent aussi un rôle vital pour les plantes par la fixation de l'azote atmosphérique et sa disponibilité conséquente dans le sol. Ces bactéries produisent aussi des sidérophores captant le fer qui sera fourni et assimilé par les racines des plantes. Elles assurent également la solubilisation des minéraux comme le phosphate indispensable pour la nutrition des végétaux (Reddy, 2013).

Les PGPR partagent le même environnement avec les racines des plantes. Les échanges entre ces deux partenaires sont très complexes et les associations symbiotiques nécessaires pour la survie et le bon développement de chacun d'entre eux sont mal comprises jusqu'à nos jours. De plus, les microorganismes du sol, dont une grande partie est considérée comme PGPR, partagent le même environnement que les racines des cultures. Elles sont donc exposées aux mêmes contraintes environnementales que ces derniers (Saharan et Nehra, 2011).

### 3. PGPR et stress biotique

La membrane cytoplasmique des organismes est perméable à l'eau, mais rarement aux autres métabolites. Ainsi, un choc hyper ou hypo-osmotique provoque chez la cellule un influx ou un efflux d'eau aboutissant, respectivement, à une augmentation ou une diminution du volume cytoplasmique, ce qui peut provoquer une plasmolyse (Ghoul, 1990).

En cas d'exposition de la cellule à une osmolarité élevée, l'activité de l'eau dans le cytoplasme diminue, la conséquence en est une perturbation de l'activité des protéines et d'autres macromolécules et une inhibition d'un grand nombre de processus biologiques comme la synthèse des macromolécules et la réplication de l'ADN. Pour les associations symbiotiques PGPR-plantes, la salinité élevée altère les protéines bactériennes impliquées dans la première étape d'attachement aux racines de la plante hôte et inhibe la nodulation bactérienne et la fixation de l'azote (Nabti *et al.*, 2010).

La température, aussi, affecte profondément les bactéries. Le changement de l'activité enzymatique est le principal aspect d'une modification de la température. Ainsi, cette activité augmente avec la température jusqu'à un certain seuil qui constitue la température optimale de

croissance. Au-delà duquel l'activité enzymatique et donc, tous les processus cellulaires diminuent (Prescott, 2002).

Chaque bactérie possède des propriétés lui permettant de croître à des valeurs bien définies d'un facteur abiotique donné. Au-dessus ou en dessous de ces valeurs, la croissance de ce microorganisme commence à s'altérer. Ci-après un tableau précisant la réponse des microorganismes à certains facteurs environnementaux (tableau 2).

**Tableau 2 :** réponse microbienne aux facteurs abiotiques (Ghoul, 1990 ; Prescott, 2002).

Description du terme		Définition	
Selon la tolérance au sel.	Non-halophiles	Croissance optimale	À moins de 0,2 M NaCl.
	Halophiles faibles		Entre 0,2 et 0,5 M NaCl.
	Halophiles modérés		Entre 0,5 et 2,5 M NaCl.
	Halophiles extrêmes		Entre 2,5 et 5,2 M NaCl.
	Halotolérants	Ce sont les non-halophiles qui peuvent tolérer le sel.	
Selon la température de croissance.	Psychrophiles	Croissance à 0°C et un optimum à 15°C ou moins.	
	Psychrotrophes	Croissance positive entre 0 et 7°C. Optimum de croissance entre 20 et 30°C. Température maximale à environ 35°C.	
	Mésophiles	Optimum de croissance entre 20 et 45°C.	
	Thermophiles	Croissance possible à 55°C ou plus. Optimum de croissance entre 55 et 65°C.	
	Hyperthermophiles	Optimum de croissance entre 80 et 113°C.	
Selon le pH.	Acidophiles	Optimum de croissance à un pH	Entre 0 et 5,5.
	Neutrophiles		Entre 5,5 et 8.
	Alcalophiles		Entre 8,5 et 11,5.

#### 4. Interaction PGPR-plante sous stress abiotique

Sous des conditions de stress abiotique, les PGPR synthétisent ou accumulent certaines molécules dites « **solutés compatibles** », car compatibles avec le fonctionnement physiologique de la cellule entière ; ces molécules permettent à la cellule de s'adapter aux conditions sévères de stress salin, thermique, nutritionnel, oxydatif etc. (Caldas *et al.*, 1999 ; Oren, 2003). De même, le stress abiotique active chez les PGPR la synthèse de biomolécules actives jouant un rôle dans le captage des nutriments et l'adaptation de ces microorganismes et des plantes co-environnantes aux conditions inhabituelles.

Certains PGPR produisent des sidérophores, composés de faibles poids moléculaire, généralement inférieurs à 1 kDa contenant des groupements fonctionnels capables de capter le fer en le rendant assimilable par les plantes. D'un autre côté, environ 30 à 50% du phosphate dans le sol se présente souvent sous une forme organique non souhaitable par la plante. Cependant, certains PGPR jouent un rôle important dans la solubilisation de ce phosphate et généralement dans l'établissement d'un équilibre nutritionnel dans le sol (Ahmad *et al.*, 2008).

Dans les conditions de stress abiotiques, les PGPR provoquent chez les plantes des modifications à plusieurs niveaux (physiques, moléculaires etc.), ceci s'effectue le plus souvent par la synthèse d'enzymes permettant d'induire la croissance des plantes. Parmi elles, la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (AAC) désaminase joue un rôle important dans la régulation du niveau de l'éthylène produit par les plantes en réduisant sa synthèse sous des conditions inconvenables ; l'éthylène est une phytohormone de croissance dont la synthèse est accélérée sous conditions de stress abiotiques, empêchant ainsi le développement des plantes et leur rendement final (Saleem *et al.*, 2007 ; Singh et Singh, 2013).

Plusieurs bactéries, considérées comme PGPR, produisent des auxines comme une partie de leurs métabolismes. A titre d'exemple, l'auxine acide indole 3-acétique (AIA) joue un rôle très important dans la régulation de la croissance des plantes ; il affecte principalement les racines de ces dernières, leurs dimensions, le nombre des ramifications racinaires, et ainsi, la surface racinaire en contact avec le sol (Jha et Saraf, 2012). Les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscisique et l'éthylène constituent, également, d'autres groupes de phytohormones bactériennes impliquées dans la promotion de la croissance des plantes (Morrone *et al.*, 2009; Reddy, 2014; Endo *et al.*, 2014).

#### **IV. Stress salin et solutés compatibles**

##### **1. La salinisation des sols**

L'accumulation des sels à des niveaux nuisibles aux surfaces des sols et dans les régions racinaires des plantes, souvent sous forme d'un mélange de cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) et d'anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), est définie comme un processus de salinisation (Ghassemi *et al.*, 1995). Ces quantités élevées de sels conduisent donc à un stress hydrique. Un sol est considéré comme salin si sa conductivité électrique dépasse  $4 \text{ dSm}^{-1}$  avec un taux de sodium échangeable supérieur à 15% (Shrivastava et Kumar, 2015).

La salinité affecte environ 6% de la surface terrestre dans le monde entier et environ 20% des zones irriguées, signalant un danger majeur en agriculture. Ce problème ne s'arrête pas uniquement à l'altération de la croissance et du rendement des plantes mais aussi à un déséquilibre dans la croissance des microorganismes dans les régions rhizosphériques, affectant ainsi les associations symbiotiques entre les plantes et les microorganismes et augmentant dans certains cas la virulence des germes phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Dikilitas et Karakas, 2012). La salinité affecte aussi la disponibilité des nutriments pour les cultures, le phosphate par exemple a tendance à se précipiter avec le calcium dans les sols salins, ce qui rend difficile son captage par les plantes (Singh et Singh, 2013).

##### **2. Solutions possibles pour une meilleure agriculture**

Les maladies des plantes dues aux pathogènes ainsi qu'aux facteurs abiotiques sont interconnectés dans les sols salins. Leurs impacts combinés sont très complexes et difficiles à étudier. A nos jours, quatre principales stratégies sont utilisées pour aboutir à des rendements meilleurs sous contrainte de salinité élevée ; (1) la culture de nouvelles variétés connues pour leur tolérance au stress ; (2) la recherche et la sélection de germplasm existants des cultures potentielles ; (3) la production des cultures génétiquement modifiées ; (4) l'utilisation exogène de solutés compatibles connus pour leur rôle osmoprotecteur (Ashraf *et al.*, 2012).

Les êtres vivants ont développé des mécanismes très complexes pour faire face aux contraintes environnementales tels que le stress osmotique ou ionique dus à la sécheresse ou à la salinité. Ces mécanismes d'adaptation peuvent être classés en deux grandes catégories ; la première catégorie fait recours à des modifications physiologiques et morphologiques de

l'organisme, alors que la deuxième est biochimique, elle est relativement simple et basée sur la production et/ou l'accumulation des **solutés compatibles** (Bohnert *et al.*, 1999).

### 3. Définition d'un soluté compatible

Les solutés compatibles sont des composés organiques de faible poids moléculaire qui confèrent aux organismes la capacité de survivre dans des environnements caractérisés par une concentration extracellulaire en solutés dépassant celle du cytoplasme cellulaire (Prescott, 2002). Le terme « soluté compatible » a été utilisé pour la première fois en 1972 par Brown et Simpson, faisant référence à des molécules qui n'inhibent pas les métabolismes cellulaires ni le fonctionnement des enzymes et des protéines de l'organisme ; elles sont donc compatibles avec le fonctionnement de la cellule (Oren, 2003).

### 4. Solutés compatibles et stress abiotique

Les organismes accumulent et/ou synthétisent les solutés compatibles comme un résultat d'adaptation aux conditions de stress abiotique. La présence de ce type de molécules permet à une grande variété de vivants de résister aux conditions extrêmes telles que les variations de température et la salinité élevée (Smiatek *et al.*, 2012). Ainsi, plusieurs études ont montré que de nombreux organismes hyperthermophiles accumulent des solutés compatibles dans leurs cytoplasmes pour faire face aux températures plus élevées que celles qu'ils peuvent tolérer (Silva *et al.*, 1999). D'autres travaux parlent du rôle joué par ces composés organiques dans la régulation de la déshydratation et de la quantité d'eau dans le cytoplasme, ainsi que, la conservation de la structure membranaire et l'activité enzymatique dans le cas de stress dû au froid (Yadav, 2010). En dehors de l'ajustement osmotique, ces composés fonctionnent comme piègeurs des « ROS » de l'anglais, *Reactive oxygen species*, ayant des activités de type chaperons et aident à la détoxification métabolique. Plusieurs solutés compatibles jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des protéines et des membranes pendant les dommages oxydatifs induits par les « ROS » (Saxena *et al.*, 2013).

### 5. Les différents types de solutés compatibles

Les solutés compatibles peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), certains acides aminés et dérivés (proline, acide glutamique, glutamine, acide  $\gamma$ -aminobutyrique, glycine bêtaïne), éctoïne et dérivés et des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol) (Karima, 2007).

Les solutés compatibles sont soit synthétisés par l'organisme lui-même ou bien importés à partir du milieu extérieur. Il faut distinguer 2 classes de solutés compatibles :

- Les éléments de la première classe n'ont aucun effet de stimulation de la croissance des cellules en milieu à forte osmolarité.
- Les autres, par contre, ont un effet remarquable de stimulation des taux de croissance lorsqu'ils sont ajoutés au milieu. Ce sont des « **osmoprotecteurs** » (Ghoul, 1990).

Le tableau ci-après représente les principaux groupes de solutés compatibles selon leurs structures chimiques (tableau 3).

**Tableau 3 :** les grands groupes de solutés compatibles (Bartlett et Roberts, 2004).

Solutés compatibles	Description	Exemples
Sucres et polyols	Sucres et les polyols sont couramment utilisés pour l'équilibre osmotique de divers organismes, y compris les procaryotes, les levures, les algues, les plantes, et les cellules de mammifères.	Glycérine, saccharose, tréhalose, glucose, glucosylglycérol,
Les acides $\alpha$ -aminés et leurs dérivés	Les acides aminés libres et leurs dérivés sont également utilisés pour l'équilibre osmotique chez une large gamme d'organismes. Il existe souvent des systèmes à haute affinité d'absorption	Glycine, proline, hydroxyproline, ectoïne, hydroxyectoïne, glutamate ... etc.
Les acides $\beta$ -aminés et leurs dérivés	pour internaliser ces solutés.	$\beta$ -glutamate, $\beta$ -glutamine,
Les méthylamines et leurs analogues	La glycine bêtaïne est largement répandue dans la nature et s'accumule dans des espèces éloignées comme les archaea, les entérobactéries, les plantes et les humains.	Glycine bêtaïne, Choline, DMSP.

## 6. Mécanismes d'osmoprotection

### 6.1. Rôle primaire du potassium ( $K^+$ )

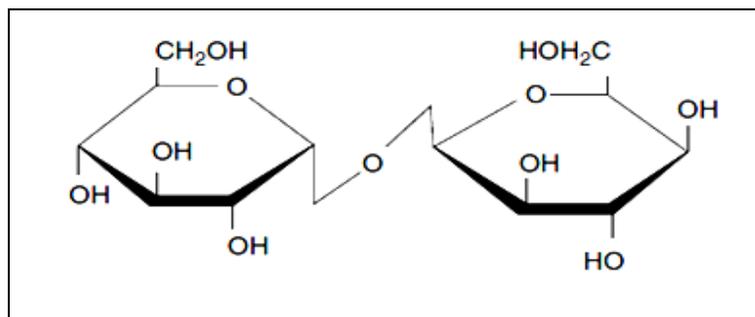
La pression de turgescence consiste à maintenir une osmolarité cytoplasmique supérieure à celle de l'environnement. Cette différence positive d'osmolarité entre les deux côtés de la membrane est nécessaire pour la croissance et la division cellulaire (Ghoul, 1990). En cas de pression osmotique externe élevée, les procaryotes répondent en accumulant certains solutés, diminuant ainsi, l'activité de l'eau dans leurs cytoplasmes, mais retenant en même temps le volume cellulaire et la pression de turgescence en état normal. L'accumulation du potassium ( $K^+$ ) constitue la première ligne de défense en cas de stress osmotique (Bartlett et Roberts, 2004).

L'absorption du potassium est généralement suivie par une synthèse immédiate de glutamate ; il y a donc une forte augmentation de la concentration du potassium dans le cytoplasme, suivie d'une éventuelle accumulation de glutamate. Par la suite, la concentration de ces deux éléments diminue puis se stabilise à un taux qui dépend de l'osmolarité du milieu (Strom, 1998).

### 6.2. Osmoprotecteurs

#### 6.1.1. Le tréhalose

Le tréhalose est un disaccharide formé par une liaison  $\alpha,\alpha$ -1,1 entre deux molécules de glucose. Cette molécule est retrouvée chez plusieurs organismes tels que les bactéries, les champignons et les insectes. Le rôle du tréhalose dans ces organismes varie de la protection des membranes à la stabilisation des protéines et des enzymes cellulaires sous stress abiotique dû au froid, à la dessiccation ou à la chaleur (figure 2) (Streeter et Gomez, 2006).



**Figure 2** : Structure du tréhalose (Streeter et Gomez, 2006).

La synthèse du tréhalose peut se faire par 5 voies différentes, selon l'organisme qui le produit. Les différentes réactions ainsi que les enzymes impliquées sont résumées dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** les voies de synthèse du tréhalose et les enzymes impliquées (López-Gómez et Lluch, 2012).

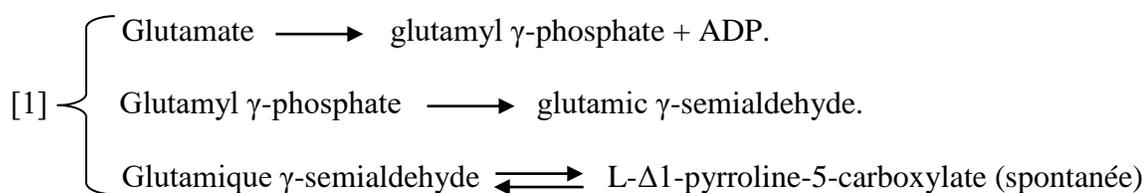
Enzymes	Synthèse
TPS	UP-glucose + glucose-6-P $\longrightarrow$ UDP + tréhalose-6-P
TPP	UDP + tréhalose-6-P $\longrightarrow$ UDP + P <sub>i</sub> + tréhalose
TreY	[Glu- $\alpha$ (1-4)] <sub>n</sub> glu- $\alpha$ (1-4)]glu $\longrightarrow$ [glu- $\alpha$ (1-4)] <sub>n</sub> glu- $\alpha$ (1-1)]glu
TreZ	[Glu- $\alpha$ (1-4)] <sub>n</sub> glu- $\alpha$ (1-1)]glu $\longrightarrow$ [glu- $\alpha$ (1-4)] <sub>n</sub> + tréhalose
TreS	Glucose- $\alpha$ (1-4)glucose (maltose) $\longrightarrow$ tréhalose
TreP	Glucose-1-P + glucose $\longrightarrow$ tréhalose + P <sub>i</sub>
TreT	ADP-glucose + glucose $\longrightarrow$ tréhalose + ADP

### 6.1.2. La proline

La proline, imino-acide, est l'un des solutés compatibles les plus communs qui constituent un élément essentiel dans les métabolismes cellulaires et jouent un rôle important dans l'ajustement osmotique de la cellule. En plus des plantes, l'accumulation de la proline a été observée chez les bactéries, les protozoaires, les algues et les invertébrés marins (Saxena *et al.*, 2013).

Les études des métabolismes des plantes ont montré qu'une grande partie de la proline accumulée dans ces derniers en réponse au stress est synthétisée à partir du glutamate. La proline peut également être synthétisée à partir de l'Ornithine. Pour la voie de glutamate, ce dernier est converti en glutamique  $\gamma$ -semialdéhyde et L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate par l'action de l'enzyme L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthétase [1]. Par la suite, la L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate est transformé en proline sous l'action de l'enzyme L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate réductase [2] (Hare et Cress, 1997).

Chez les bactéries, le métabolisme de la proline a été largement étudié. Chez *Escherichia coli*, sa synthèse est assurée par trois enzymes codées par les trois gènes pro B, pro A, pro C. Premièrement, le glutamate est transformé en glutamyl  $\gamma$ -phosphate sous l'action de l'enzyme  $\gamma$ -glutamyl kinase codée par le gène pro B. par la suite, l'enzyme glutamate  $\gamma$ -semialdehyde déshydrogénase, codé par le gène pro A, transforme le glutamyl  $\gamma$ -phosphate en glutamate  $\gamma$ -semialdehyde transformé spontanément à son tour en L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate. La dernière étape est commune avec les plantes, où le L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate est transformé sous l'action de l'enzyme L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate réductase, codée par le gène pro C, en proline (Sokhansanj *et al.*, 2006).



### 6.1.3. Les ammoniums quaternaires (la glycine bêtaïne)

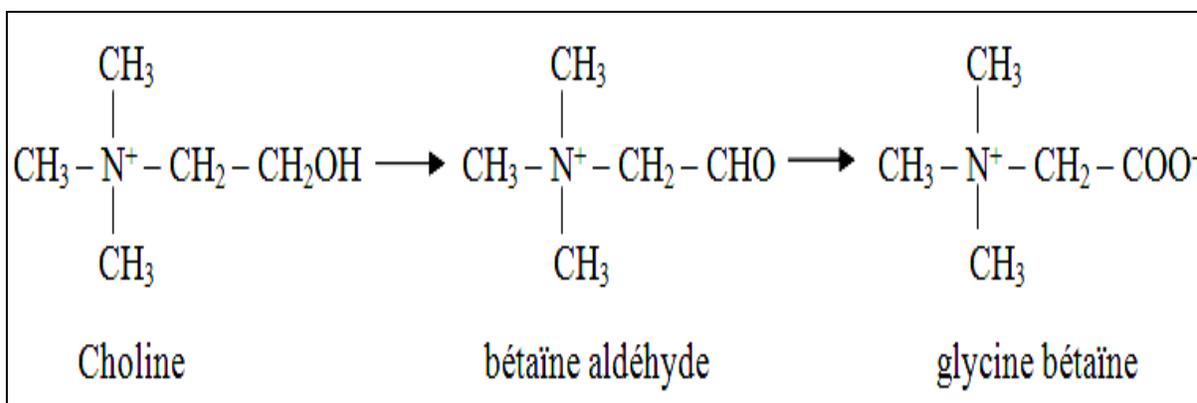
Les composés ammoniums quaternaires naturels constituent une classe de métabolites avec plus de cent molécules rapportés, y compris des représentants bien connus comme la choline et la glycine bêtaïne. Ces composés sont largement distribués dans la nature et synthétisés par une grande variété d'organismes. Avec le temps, il est devenu évident que certains de ces composés s'opposent aux stress exogènes (Anthoni *et al.*, 1991).

La glycine bêtaïne est l'un des osmolytes les plus couramment accumulés dans la nature, ainsi que la molécule osmoprotectrice la plus performante et stimulatrice de la croissance des bactéries sous conditions de stress (Le Marrec, 2011). Au niveau cellulaire, la glycine bêtaïne posséderait plusieurs fonctions : stabilisation de la structure quaternaire des enzymes et des protéines, maintenance de la stabilité membranaire et rétention de l'eau intracellulaire sous conditions de stress salin, de froid ou de température élevée (Saxena *et al.*, 2013).

La voie de synthèse la plus connue de la glycine bêtaïne inclus deux étapes d'oxydation de la choline avec la bêtaïne aldéhyde comme un intermédiaire. Chez les plantes, la première réaction d'oxydation de la choline est catalysée par la choline monooxygénase (CMO). La

deuxième étape est assurée par l'enzyme bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH), qui est composée de deux sous-unités identiques de 54 kD. Les deux enzymes précédemment citées sont localisé au niveau des stromas des chloroplastes (McNeil *et al.*, 1999).

Chez les bactéries, et même les animaux, la première réaction d'oxydation est catalysée par l'enzyme choline déshydrogénase (CDH). Cependant, chez certaines bactéries, l'enzyme impliquée dans la transformation de la choline en bêtaïne aldéhyde est la choline oxydase (COD). La deuxième étape d'oxydation aboutissant à la glycine bêtaïne est assurée par l'enzyme (BADH). De même, les deux enzymes (CDH et COD) peuvent aussi catalyser cette deuxième réaction d'oxydation (figure 3) (Takabe *et al.*, 2006).

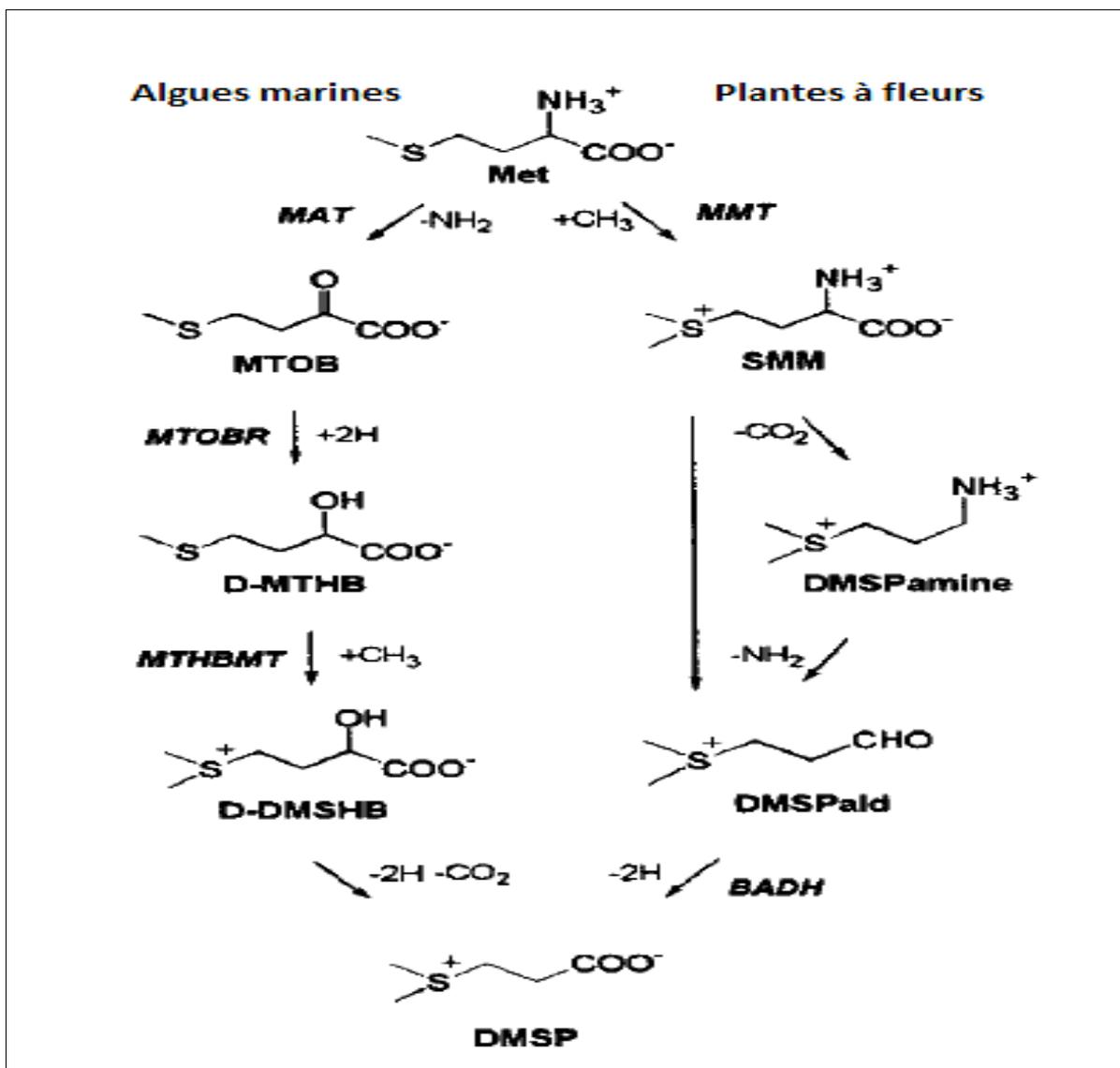


**Figure 3** : synthèse de la glycine bêtaïne à partir de la choline (Takabe *et al.*, 2006).

#### 6.1.4. Les sulfoniums tertiaires (Diméthylsulfoniopropionate)

Le composé sulfonium tertiaire Diméthylsulfoniopropionate (DMSP) est commun chez les algues marines et plusieurs familles des plantes supérieures (Asteraceae, Poaceae etc.) (Kirst, 1996 ; Rathinasabapathi, 2000). La remarquable similitude de structure entre la glycine bêtaïne et le DMSP a poussé les chercheurs à déterminer si cet analogue soufré peut se substituer à la glycine bêtaïne en tant qu'osmoprotecteur chez les bactéries. Leurs travaux ont permis de révéler sa grande efficacité dans l'amélioration des cultures bactériennes sous conditions de stress (Le Rudulier *et al.*, 1996).

La méthionine est le précurseur du DMSP chez les plantes ainsi que chez les algues marines. Cependant, les étapes de sa synthèse et les enzymes impliquées varient entre les deux (figure 4) (McNeil, 1999).



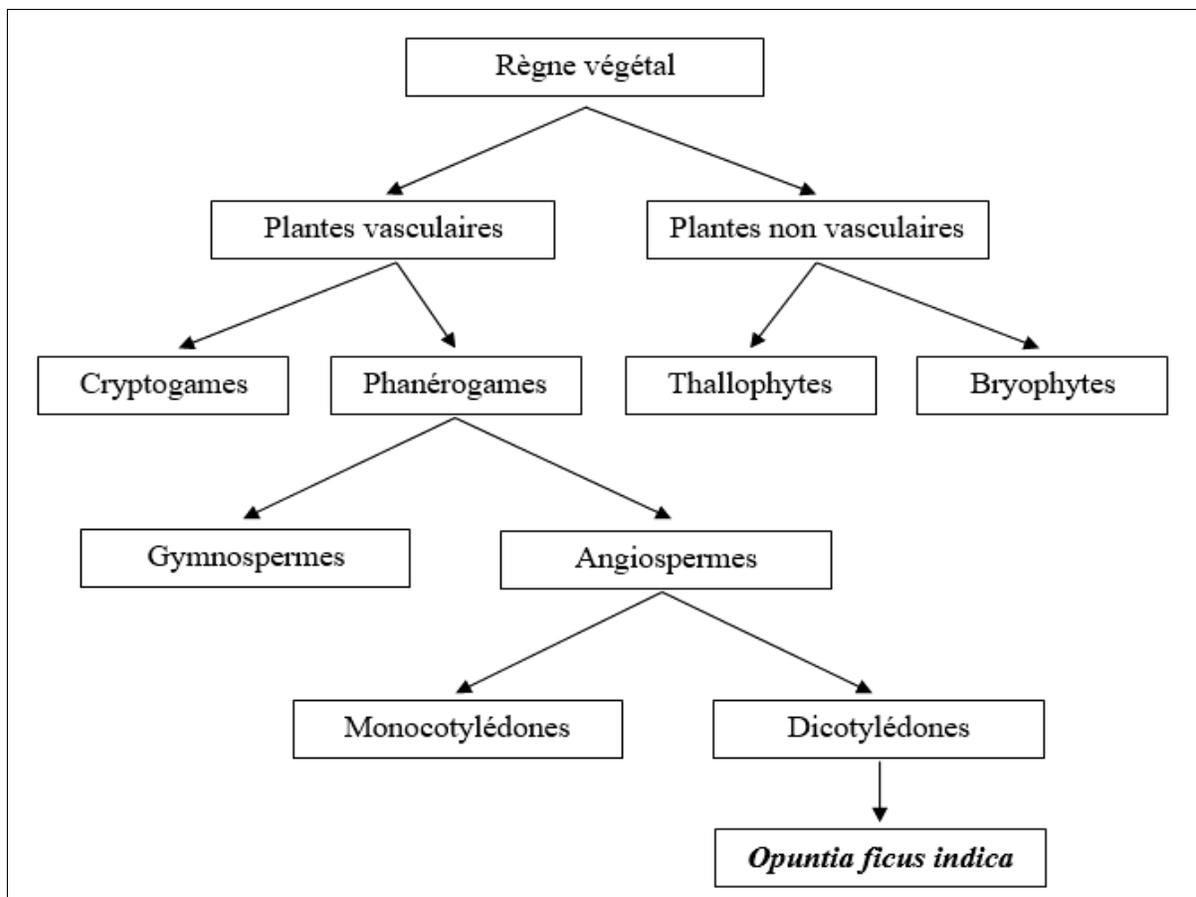
**Figure 4 :** synthèse de DMSP chez les algues marines et les plantes (McNeil, 1999).

### V. Le figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*)

Les changements climatiques qui touchent, de plus en plus, plusieurs régions du monde s'expriment principalement par une augmentation des températures et une sécheresse dégradant les terrains agricoles. Ces changements obligent les chercheurs à cibler leurs travaux vers l'amélioration du rendement des cultures dans les conditions extrêmes. Vu sa résistance remarquable aux différents stress, le figuier de barbarie a toujours attiré l'attention des scientifiques pour une éventuelle valorisation visant l'utilisation de cette plante en agriculture grâce à ses caractéristiques particulières de croissance et sa richesse en éléments nutritifs.

## 1. Le figuier de barbarie dans le monde végétal

*Opuntia ficus-indica* appartient à la famille des cactacées caractérisée par la présence des épines au niveau des nœuds et à la sous-famille des opuntiodées caractérisée par la présence de glochides (Arba, 2009). Cette famille est représentée par des plantes vasculaires à fleurs (phanérogames) et à graines dicotylédones renfermées dans des fruits (angiospermes) (figure 05).



**Figure 05** : position du figuier de barbarie dans le monde végétal (Habibi, 2004).

Les cactacées sont des plantes dialypétales caliciflores de l'ordre des caryophyllacées, elles ont développé des aptitudes à se contenter de peu d'eau, ce qui leur permet de survivre pendant de longues périodes de sécheresses. Ces plantes sont capables d'emmagasiner l'eau dans leurs tissus. Ce sont donc des **xérophytes succulentes**. Le genre le plus abondant de cette famille est le genre *Opuntia*, il est représenté par environ 300 espèces dont la plus connue est *Opuntia ficus-indica* (figuier de barbarie) qui appartient, à son tour, au sous-genre *Platyopuntia* (Habibi, 2004).

## 2. Origine et répartition géographique

Toutes les cactacées sont originaires des plateaux du centre et du nord Mexicains caractérisées par un climat sec et chaud (Griffith, 2004 ; Abid *et al.*, 2009). La grande adaptation du figuier de barbarie dans le bassin méditerranéen amène beaucoup de gens à le considérer comme une espèce autochtone, il s'est également adapté à d'autres pays comme l'Afrique de sud, le sud-ouest des Etats-Unis d'Amérique, plusieurs pays de l'Amérique latine ainsi que d'autres aires géographiques (PNTTA, 2000). Cette plante succulente s'est naturalisée un peu partout et prolifère aujourd'hui sur les terrains arides, secs et pierreux des cinq continents (Schweizer, 1999 ; El-Guizani *et al.*, 2012).

## 3. Généralités sur *Opuntia ficus-indica*

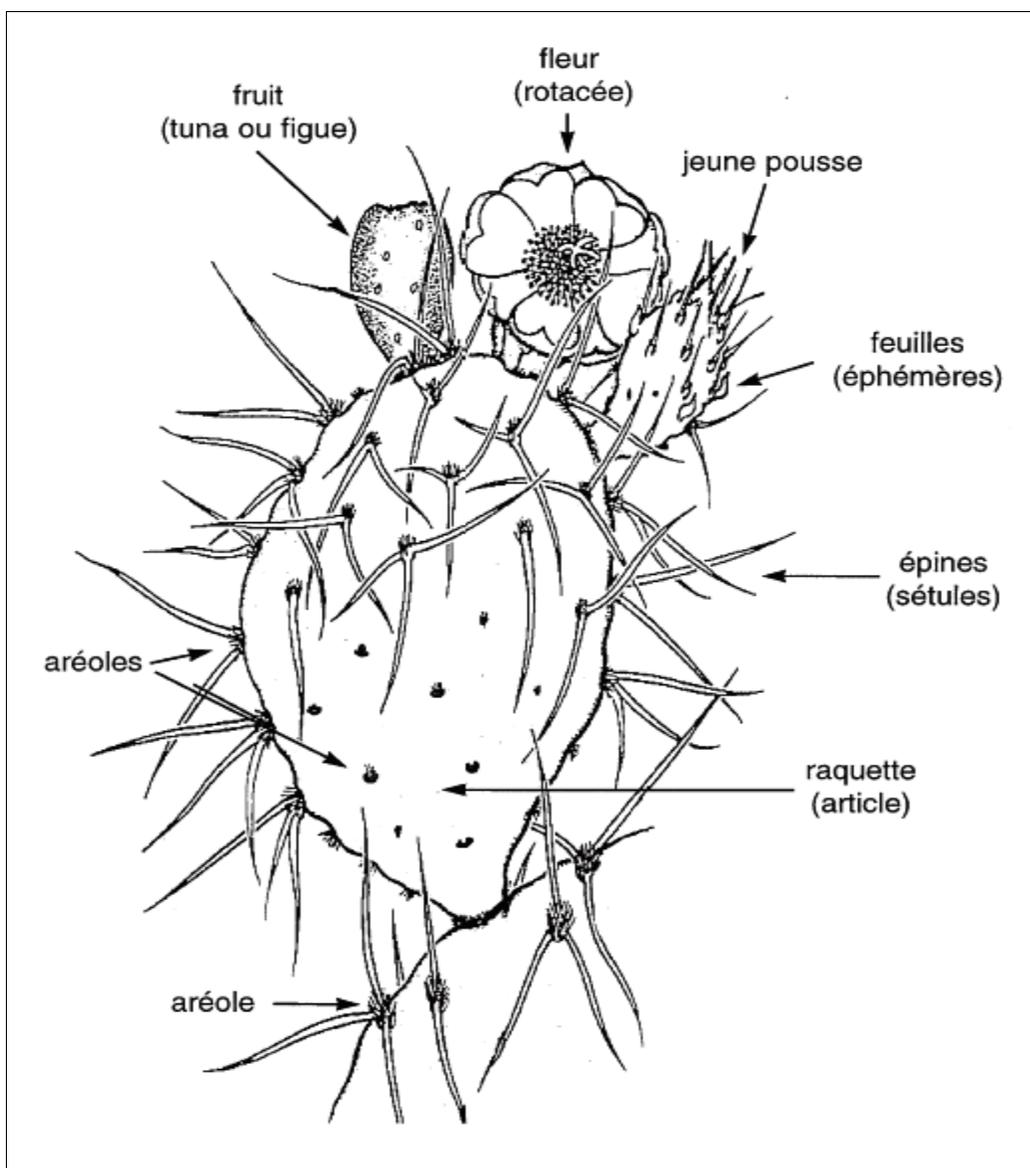
Il existait, à travers l'histoire et selon les régions, plusieurs dénominations de cette plante. Nopal, le nom mexicain de la plante, vient du mot « *Nochtli* » en Nahuatl, langue classique des Aztèques. « *Opuntia* », son appellation savante, vient du latin « *Opuntius* », d'Oponte. En Espagne, outre Nopal, Nopallito, on l'appelle familièrement Nopalctio, Tuna, Ensada, Higos de Pala. Dans les pays francophones du bassin méditerranéen où elle est très populaire, l'*Opuntia* est surnommé cardasse, chardon d'Afrique, cactus à raquette, Fiquier de barbarie, figuier d'inde. En Angleterre, *prickly pear*. Au Maghreb et en Algérie, El hindi ou Karmous en N'sarra (Schweizer, 1999).

Le figuier de barbarie présente un cycle photosynthétique appelé CAM « *craculacean acid metabolism* » ou métabolisme acide des crassulacées (Arba, 2009). Ce type métabolique est utilisé par les plantes succulentes pour faire face aux contraintes environnementales telles que la sécheresse et la température élevée. Les plantes CAM sont caractérisées par leur capacité à fixer le CO<sub>2</sub> durant la nuit grâce à l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC). Ce type de plantes possède aussi la capacité de fermer ses stomates pendant le jour afin de minimiser les échanges avec l'extérieur et la déshydratation, du fait que le CO<sub>2</sub> nécessaire pour la photosynthèse est déjà accumulé pendant la nuit (Brulfert *et al.*, 1996).

*Opuntia ficus-indica* est un arbuste de 3 à 5 m d'hauteur, avec un tronc court et robuste, de 30 à 45 cm de diamètre. La tige est formée d'articles ovales, charnus et aplatis communément appelés des raquettes (25 à 60 cm de longueur/20 à 40 cm de largeur) avec une surface parsemée d'alvéoles et protégée par des poiles regroupés en touffes et armés de

redoutables épines (Lim, 2012). Dans les articles en formation, et à partir des alvéoles, naissent des feuilles fragiles, éphémères et caduques.

Au-dessus des raquettes apparaissent les fleurs ; de belles et grandes corolles latérales jaunes, oranges ou rouges, aux nombreux pétales soudés à leur base et s'ouvrant gaiement à leur extrémité. Les fleurs, de 6 à 7 cm de longueur, et de 5 à 7 cm de diamètre, donnent naissance au fruit, une grosse baie ovoïde et charnue, elle aussi ornée de piquants. Ce fruit est comestible, et contient des graines de 5 mm de diamètre, dures, indigestes, mais riches en vitamines (Schweizer, 1999) (figure 06).



**Figure 06** : détails de *l'Opuntia ficus-indica* Miller (Schweizer, 1999).

#### 4. Écologie du figuier de barbarie et adaptations aux conditions extrêmes

Le figuier de barbarie peut s'adapter à une large gamme de conditions climatiques. De tropical à subtropical, d'aride à semi-aride de 0 à 2600 m d'altitude. Ces plantes sont extrêmement tolérantes à la sécheresse et aux températures élevées (Lim, 2012).

##### 4.1. Écologie du figuier de barbarie

*Opuntia ficus-indica* peut se développer sur les côtes, les plateaux arides, les canyons, les sites perturbés, les pentes rocheuses et les berges ... etc. Cette espèce préfère une température moyenne annuelle de 18 à 26°C, mais elle peut survivre pendant de brèves périodes de gel à une température allant de -2 à -3°C (Lim, 2012). Cependant, certaines variétés peuvent tolérer des températures allant jusqu'à -10°C (Loudyi, 1995). La précipitation annuelle optimale pour cette plante varie de 150 à 500 mm (Lim, 2012).

Le figuier de barbarie s'adapte bien aux sols pauvres, mais se développe mieux sur les sols sableux profonds ou légèrement acides, et les sols qui se drainent facilement. La plante est sensible aux sols asphyxiants, l'humidité prolongée est donc nuisible et peut conduire à la mort de la plante. Si le climat est très sec, les sols argileux sont tolérés. Dans les zones humides, un pH proche de la neutralité est préférable, tandis que dans les régions sèches des pH plus acides peuvent être tolérés. Cependant une forte acidité peut inhiber la plante. *Opuntia ficus-indica* pousse en plein de soleil et ne nécessite aucun abri contre le vent. Le pH peut, donc, être un facteur limitant mais, cette espèce est rencontrée même sur des sols calcaires (Habibi, 2004).

##### 4.2. Adaptation aux conditions extrêmes

L'introduction de plantes tolérantes à la salinité est l'une des techniques utilisée pour la valorisation des sols marginaux. Face à ce problème, l'espèce *Opuntia ficus-indica* est une espèce végétale pérenne qui présente une capacité de s'adapter à diverses conditions climatiques. Elle participe à la stabilisation du sol et la lutte efficace contre l'avancée du désert (Shedbalkar *et al.*, 2010).

Khales et Baaziz ont étudié, en 2006, la résistance de 5 écotypes d'*Opuntia ficus-indica* à la salinité, ceux-ci après la mise en culture des boutures de raquettes des 5 écotypes en présence de concentrations croissante de NaCl (de 0 à 400 mM). Le suivie de la croissance des

plantules, après 15 et 60 jours de la culture, a montré que leur croissance n'a pas été significativement atteinte par les différentes concentrations de sel, la plupart ont plutôt été stimulés par l'augmentation de la concentration du sel dans le milieu (Khales et Baaziz, 2006).

Le figuier de barbarie est caractérisé par une forte tolérance aux températures élevées et à la sécheresse. Cette tolérance est le résultat d'un mode de vie et de caractéristiques physiologiques particulières. La transformation des organes photosynthétiques (tiges, feuilles) en raquettes couvertes d'une cuticule dure, et le cycle photosynthétique particulier des CAM, protègent la plante de l'évapotranspiration. De point de vue physiologique, les stomates sont fermés pendant le jour, et ne s'ouvrent que durant la nuit permettant l'accumulation du CO<sub>2</sub> nécessaire au processus photosynthétiques, évitant donc, les échanges pendant la période chaude du jour (Arba, 2009).

Des tissus en éponges avec des cellules de grandes tailles (parenchyme aquifère) permettent au figuier de barbarie de stocker une grande quantité d'eau quand il est disponible pour l'utiliser au moment de son besoin. Après une pluie, la plante émet des racines primordiales qui absorbent le maximum d'eau afin de le stocker. Par contre, et au moment de la sécheresse, les racines primordiales vont disparaître et les racines latérales vont émettre une gaine qui les protège de la dessiccation (Shedbalkar *et al.*, 2010).

Le cactus n'a aucune exigence vis-à-vis de la nature chimique du sol, il peut supporter les sols gypseux et légèrement salins à condition qu'ils soient bien drainés (Loudyi, 1995).

## 5. Teneur en eau et composition en éléments biochimiques

*Opuntia ficus-indica* est l'une des plantes les plus économiques en matière d'utilisation et de stockage d'eau, ceux-ci est due à ses caractéristiques morphologiques et physiologiques particulières, l'eau existe en proportions qui varie de 91 à 94,5 % (Figueux, 1859 ; Hadj Sadok *et al.*, 2008).

Les cladodes de figuier de barbarie contiennent des teneurs élevées en minéraux (19% du poids frais) (Malainine *et al.*, 2003) ; elles sont riches en calcium, magnésium, potassium et Cuivre mais ont une faible teneur en phosphore (tableau 05) (Hadj Sadok *et al.*, 2008). Pour la composition en éléments chimiques essentiels, *Opuntia ficus indica* est riche en graisses (7,2% du poids frais). Les polysaccharides constituent la fraction la plus importante des cladodes

(69,6% du poids frais). La lignine est présente en faible proportion (3,6%), alors que la cellulose est présente à 21,6% du poids frais des cladodes (Malainine *et al.*, 2003).

Hadj Sadok et ses coéquipiers ont étudié, en 2008, la composition chimique des cladodes d'*Opuntia ficus-indica* variété inerme, provenant de la région de Blida (Algérie), durant les 5 stades de sa vie, les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 05.

Les cladodes jeunes constituent une source importante de protéines riches en acides aminés essentiels ainsi que des vitamines. Plusieurs études ont signalé des proportions élevées en acides aminés dans les cladodes, spécialement la proline, l'acide glutamique et l'acide aspartique (tableau 05) (Hernández-Urbiola *et al.*, 2010). La proline est l'un des solutés compatibles les plus accumulés par les plantes, y compris la famille Cactacées, qui vivent sous des conditions de stress (Silva-Ortega *et al.*, 2008). Autrement, l'addition de cet acide aminé (proline) stimule considérablement la germination des cactacées par rapport à ceux qui sont cultivées à son absence (Shedbalkar *et al.*, 2010).

**Tableau 05.** Contenu des nopals du figuier de barbarie en acides aminés (g/100g de protéine), selon les stades de maturité (Hernández-Urbiola, 2010) :

	Age (jours)					
	40	50	60	80	100	125
<b>A. aspartique</b>	0.51	0.56	0.66	0.62	0.66	0.62
<b>A. glutamique</b>	1.29	1.53	1.81	1.93	1.87	2.22
<b>Sérine</b>	0.32	0.47	0.42	0.46	0.56	0.65
<b>Glycine</b>	0.27	0.37	0.31	0.36	0.43	0.44
<b>Histidine</b>	0.13	0.19	0.11	0.16	0.16	0.17
<b>Arginine</b>	0.15	0.14	0.14	0.16	0.18	0.16
<b>Thréonine</b>	1.53	1.56	1.31	1.39	1.25	1.21
<b>Alanine</b>	0.49	0.48	0.42	0.53	0.45	0.41
<b>Proline</b>	0.42	0.54	<b>0.64</b>	0.46	0.31	0.34
<b>Tyrosine</b>	0.39	0.17	0.19	0.21	0.16	0.14
<b>Valine</b>	0.50	0.63	0.73	0.54	0.58	0.51
<b>Méthionine</b>	0.19	0.12	0.15	0.19	0.12	0.13
<b>Isoleucine</b>	0.70	0.76	0.61	0.64	0.64	0.67
<b>Leucine</b>	0.85	0.64	0.75	0.61	0.81	0.91
<b>Phénylalanine</b>	1.69	1.93	1.39	1.36	1.21	1.61
<b>Lysine</b>	0.52	0.44	0.48	0.56	0.52	0.67
<b>Tryptophane</b>	0.15	0.19	0.17	0.14	0.15	0.17

## VI. Les macroalgues marines

Le terme « *Algae* » désigne les macroalgues, ajoutées à un groupe de microorganismes hautement diversifiés appelées les micro-algues. A la différence des plantes, les algues montrent de faibles niveaux de différenciation ; Elles ne forment pas d'embryons, toutes les cellules de leurs structures reproductives sont potentiellement fertiles et les cellules stériles à activités protectrices sont absentes. Le développement parenchymateux n'est présent que chez quelques groupes d'algues. Aussi, les algues montrent les deux formes de reproduction, sexuée et asexuée. Leurs tailles varient d'organismes unicellulaires de 0.2 à 2 µm de diamètre, à des formes géantes pouvant aller jusqu'à 60 m de longueur (Barsanti *et al.*, 2008).

### 1. Définition

Les macroalgues marines sont des organismes qui vivent généralement attachés aux rochers ou à d'autres substrats durs dans les zones côtières. Elles appartiennent à trois groupes différents, ces groupes ont été déterminés sur la base de la couleur du thalle (Rindi *et al.*, 2012):

- Les Chlorophytes (algues vertes).
- Les Rhodophytes (algues rouges).
- Les Ochrophytes (algues brunes).

Les différences entre ces trois groupes sont plus importantes que celles indiquées par cette simple désignation ; les caractéristiques ultra-structurales et métaboliques, telles que les pigments photosynthétiques, les composés de stockage, la structure fine des chloroplastes et la composition de la paroi cellulaire, sont variables d'un groupe à l'autre et même d'une espèce à l'autre dans le même groupe (Rindi *et al.*, 2012).

### 2. Les grands groupes de macroalgues marines

Selon leur pigmentation, les macro-algues sont divisées en trois groupes : les chlorophycées (Algues vertes), les rhodophycées (Algues rouges) et les phéophycées (algues brunes) (Mohamed *et al.*, 2012).

#### 2.1. Les Chlorophycées

Les chlorophycées jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux. Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les

chlorophylles a et b, aux quelles sont associées des carotènes et des xanthophylles, comme les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieu marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre (Céline). Les genres les plus répons dans la nature sont représentés par *Ulva* (laitue de mer) et *Enteromorpha* (cheveux de mer) (Mohamed *et al.*, 2012).

## 2.2. Les Phéophycées

Les algues brunes constituent, phylogénétiquement, la division la plus ancienne dans le monde des algues, et contient plus de 5000 espèces. Elles sont principalement des organismes marins pluricellulaires, et qui diffèrent des autres groupes d'algues par la composition polysaccharidique des parois de leurs cellules et de leurs matrices intracellulaires (Usov, 2011).

## 2.3. Les Rhodophycées

Les rhodophycées doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments comme les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques-unes vivent également en eau douce (Guillaume *et al.*, 2011).

## 3. Utilisation des macroalgues marines

En agriculture et en agro-alimentaire, Les algues sont utilisées comme mouilleurs dans le sol et comme engrais pour la production alimentaire humaine ou animale. La capacité des algues à absorber les métaux est utilisée en traitement biologique des sols contaminés (Reisser, 2010).

Pour les pays qui possèdent d'importants littoraux, Les algues ont, déjà, une valeur commerciale reconnue dans pas mal de domaines (alimentation, cosmétique, textile, papeterie, pharmacie et médecine). Elles constituent une source importante de polysaccharides (agars, alginates...) utilisés comme agents émulsifiants, épaississants et stabilisateurs dans les industries alimentaires. Leurs propriétés antibiotiques, antivirales et anti-inflammatoires leurs confèrent une valeur appréciée en pharmacie et en médecine (Tarik, 2011).

#### **4. Algues marines et solutés compatibles**

Les composés bioactifs produits par les algues marines sont très diversifiés et jouent un rôle important dans plusieurs activités biologiques telles que les processus de survie de ces organismes dans des environnements extrêmes. Dans le monde des algues, une grande variété de solutés compatibles a été identifiée. Le nombre de ces composés est plus important que celui détecté chez les cyanobactéries. Les molécules à activités osmoprotectrices produites par les algues marines peuvent être divisées en plusieurs classes ; hétérosides (floridoside, isofloridoside ...), alcools polyhydriques (glycérol, mannitol, sorbitol ...), sucres simples (mannose), acides aminés (proline), des dérivés d'acides aminés (DMSP). Un grand nombre de ces mêmes solutés compatibles est communément rencontré chez les bactéries et même chez les plantes (Oren, 2007).

# *Matériel et Méthodes*

Ce travail a été divisé en quatre parties, la première partie consistait à isoler et sélectionner des bactéries de sol ayant la capacité de produire une large gamme de molécules d'intérêt agricole. La sélection a été réalisée selon une hiérarchie de critères, visant à éliminer à chaque fois les bactéries qui ne présentent pas le caractère recherché. A la fin de cette partie, une identification moléculaire des isolats sélectionnés a été réalisée.

La deuxième partie de ce travail s'intéressait à l'étude de l'halotolérance des souches sélectionnées, ainsi que le rôle de l'osmoprotecteur synthétique « Glycine bêtaïne » et des extraits brut d'*Opuntia ficus-indica*, *Ulva lactuca* et *Enteromorpha intestinalis* sur la restauration de leur croissance en présence de stress salin. L'étude de l'effet des isolats sélectionnés et/ou des extraits précédemment cités sur la germination des graines de blé dur faisait également un élément de cette partie.

La troisième partie visait l'étude de la germination et la croissance de la tomate (*Solanum lycopersicum*) vivant sous stress salin et son contenu en acides aminés sous l'effet des isolats sélectionnés et des extraits aqueux des deux macroalgues marines (*Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis*) ainsi que des raquettes du figuier de barbarie.

L'étude de l'activité antifongique d'un nouvel isolat « RhiNA » vis-à-vis des quatre champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea*, *Mucor* sp., *Aspergillus niger* et *A. flavus*, ainsi que le suivi de l'effet *in vivo* de cet isolat sur la propagation de la pourriture grise des pommes, (*Malus domestica*) variété Golden Delicious, infectées par *B. cinerea* constituaient la quatrième partie de ce travail.

## Première partie : Isolement, sélection hiérarchique et identification des bactéries.

### I. Echantillonnage :

#### 1. Echantillonnage du sol :

Les échantillons du sol ont été prélevés de façon aseptique à partir de sept sites agricoles exploités en culture du blé en Algérie (tableau 06). 500 g de sol de chaque site ont été prélevés en utilisant des carottiers métalliques stériles à une profondeur approximative allant de 10 à 30 cm. La surface du sol a été désinfecté et écarté avec de l'éthanol (70%) avant l'échantillonnage. Il est important de mentionner que les sept sites sont situés à différentes distances de la Méditerranée (de 500 m jusqu'à environ 150 km), à différentes altitudes et caractérisés par différentes variations météorologiques (figure 10).

**Tableau 06** : localisation géographique des échantillonnages de sol.

Échantillon	Localisation	Date
BEA	Béjaïa : 36°42'11.60"N, 5°5'14.47"E	21/01/2014
BEB	Béjaïa : 36°41'30.19"N, 4°55'46.13"E	02/01/2014
BEC	Béjaïa : 36°40'44.54"N, 4°53'35.55"E	29/01/2014
BOA	Bouira : 36°7'41.29"N, 3°32'55.89"E	29/01/2014
MEA	Médéa : 36°15'38.8"N, 3°23'29.25"E	31/01/2014
SEA	Sétif : 36°12'3.81"N, 5°22'1.44"E	24/02/2014
SEB	Sétif : 36°11'30.55"N, 5°22'16.79"E	24/02/2014



**Figure 07** : *Enteromorpha intestinalis*.



**Figure 08** : *Ulva lactuca* (originale).

## 2. Echantillonnage des macroalgues et des raquettes d'*Opuntia ficus-indica* :

Les deux macroalgues marines (Chlorophytes) *Enteromorpha intestinalis* (figure 07) et *Ulva lactuca* (figure 08) ainsi que les raquettes de la figue de Barbarie (*Opuntia ficus-indica*) (figure 09) utilisés pour la préparation des milieux de culture ont été récoltés à Boulimat (wilaya de Bejaïa) (tableau 07) et transportés au laboratoire à 4 ° C pour la préparation des extraits.



Figure 09 : *Opuntia ficus-indica* (originale).



Figure 10 : localisation géographique des lieux d'échantillonnage (Google maps) :  Sol.  
○ Raquettes de l'*Opuntia ficus-indica*, *Ulva lactuca* et *Enteromorpha intestinalis*.

**Tableau 07** : Lieux d'échantillonnage des algues et des raquettes d'*Opuntia ficus-indica*.

Échantillon	Localisation	Date
Ulva lactuca	Béjaïa : 36°48'54.5"N 4°59'11.1"E	13/05/2014
Enteromorpha intestinalis	Béjaïa : 36°48'54.5"N 4°59'11.1"E	13/05/2014
Opuntia ficus-indica	Béjaïa : 36°48'05.5"N 5°00'15.7"E	15/05/2014

## II. Propriétés physiques et chimiques des échantillons de sol :

### 1. PH :

L'acidité d'un sol est déterminée par sa teneur en ions H<sup>+</sup>. Les valeurs pH-eau (acidité effective) et pH-KCl (acidité titrable ou de réserve) des échantillons de sol ont été déterminés selon le protocole suivant :

Vingt-cinq mL d'eau distillée (pour le pH-eau) ou d'une solution KCl 1N (pour le pH-KCl) sont ajoutés à 10 g de l'échantillon de sol préalablement tamisé (< 2 mm) et séché à 40°C dans un Bécher. L'ensemble est agité pendant une minute à l'aide d'une baguette en verre puis laissé décanter pendant une heure. L'électrode d'un pH-mètre (Hanna Instruments-HI 2210) est plongée dans la solution pour la lecture des valeurs de pH (Rouiller *et al.*, 1994).

### 2. Conductivité électrique :

La conductivité électrique d'un sol est considérée comme un indicateur de sa salinité ; plus un sol est salé plus il est conductible. Pour la détermination de la conductivité électrique de chaque échantillon, 10 g de sol sont ajoutés à 50 ml d'eau distillée. Le mélange est agité pendant 30 minutes puis laisser décanter. La conductivité électrique (EC) est mesurée par un conductimètre (Hanna Instruments-HI 98129) à partir du surnageant (Hardie et Doyle, 2012).

### 3. Contenu humide gravimétrique (humidité) :

Dans les analyses microbiologiques, l'humidité d'un sol est souvent reportée comme le contenu humide gravimétrique « *gravimetric moisture content* :  $\theta_g$  » qui, comme son nom l'indique, constitue le rapport entre la masse d'un sol humide et la masse unitaire de ce même sol à l'état sec. Pour ceux-ci, une masse initialement connue de chaque échantillon a été séchée sous dans une étuve à une température entre 165 et 175°C et pesée à plusieurs reprises

jusqu'à ce que son poids final se stabilise. La valeur du contenu humide gravimétrique est donnée par la formule suivante : (Pepper et Gerba, 2004).

$$\theta_g = (m - d) / d$$

Où :

- $\theta_g$  : contenu humide gravimétrique,
- $m$  : la masse initiale d'un sol (à l'état humide),
- $d$  : la masse de ce même sol après séchage (à l'état sec).

#### 4. Matière organique totale :

1 g de l'échantillon est pesé dans un bécher 250 mL. 10 mL d'eau distillée et 10 ml de 30% d' $H_2O_2$  sont ajoutés à l'échantillon avant de couvrir le bécher avec du papier aluminium. Si la réaction n'est pas trop vigoureuse, le bécher est placé sur un bain de vapeur et suivi jusqu'à ce que la réaction s'arrête (plus de bulles qui se forment). La digestion se termine habituellement dans une heure. Le contenu du bécher est manuellement mélangé occasionnellement durant la réaction afin d'amener les particules les plus légères de la matière organique en contact avec la solution. A la fin de la digestion, l'échantillon est séché à  $105^\circ C$  puis pesée à plusieurs reprises jusqu'à ce que son poids se stabilise (Huang *et al.*, 2009).

La proportion de la matière organique présente dans l'échantillon est déterminée par la formule suivante :

$$MOT (\%) = P_{sec} / P_{original}$$

Où :

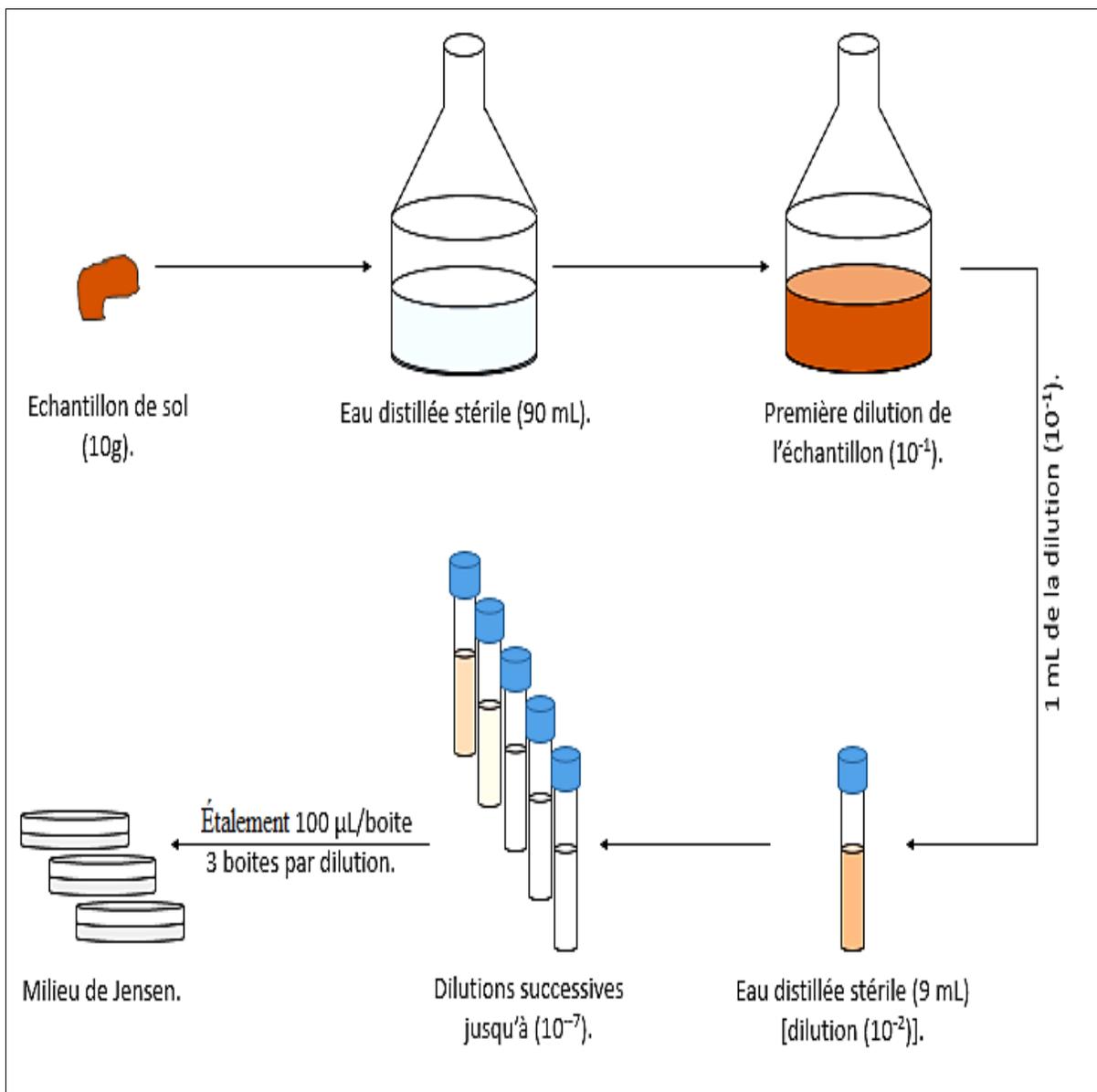
- MOT : Matière Organique Totale
- $P_{sec}$  : la masse de l'échantillon avant traitement,
- $P_{original}$  : la masse de l'échantillon après traitement et séchage.

### III. Isolement et purification des bactéries diazotrophes :

#### 1. Procédure d'isolement :

La fixation d'azote est le processus biologique dans lequel l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) est convertit en  $NH_3$ . Cette caractéristique est utilisée pour préparer des milieux de culture sélectifs pour les bactéries fixatrices libres de l'azote atmosphérique. Le milieu de culture N-free Jensen, dépourvu de toute source d'azote, a été utilisé dans le cadre de ce travail pour

l'isolement des bactéries diazotrophes à partir des sept échantillons du sol (Thompson, 1989). 10 g de chaque échantillon de sol sont ajoutés à 90 ml d'eau distillée stérile et mélangés pour constituer la première dilution  $10^{-1}$ , à partir de laquelle, des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-7}$  ont été préparées. 300  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sont utilisés pour ensemencer 3 boîtes de pétrie contenant le milieu (N-free Jensen). La procédure est réalisée en triplicata (figure 11).



**Figure 11** : schéma illustratif de la procédure d'isolement (originale).

Les boîtes sont incubées à une température de  $30^{\circ}\text{C}$  durant une période allant jusqu'à une semaine. Après incubation et à partir de chaque échantillon de sol, dix colonies présentant des aspects différents sont purifiées sur le même milieu de culture.

**2. Composition du milieu N-free Jensen (Thompson, 1989) :**

Le milieu Jensen contient (g) dans 1 L d'eau distillée :

- Mannitol (20) ;
- $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  (1) ;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.5) ;
- NaCl (0.5) ;
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.1) ;
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0.005) ;
- Agar (17) ;
- pH ajusté à 7.1.

**IV. Sélection hiérarchique des souches :**

Les 70 souches purifiées au cours de la première étape de ce travail (10 souches à partir de chaque échantillon du sol) ont fait l'objet d'une sélection basée sur leur capacité à produire des métabolites d'intérêt agricole. Cette sélection est principalement basée sur la capacité inhérente à ces isolats de produire :

- Production d'enzymes d'intérêt agricole (cellulase, chitinase, protéase, lipase, estérase).
- De l'acide 3-indole acétique.
- Des sidérophores.
- Solubilisation du phosphate tricalcique.
- L'utilisation de l'ACC comme seule source d'azote.
- Production d'HCN.
- Production d'ammoniac.

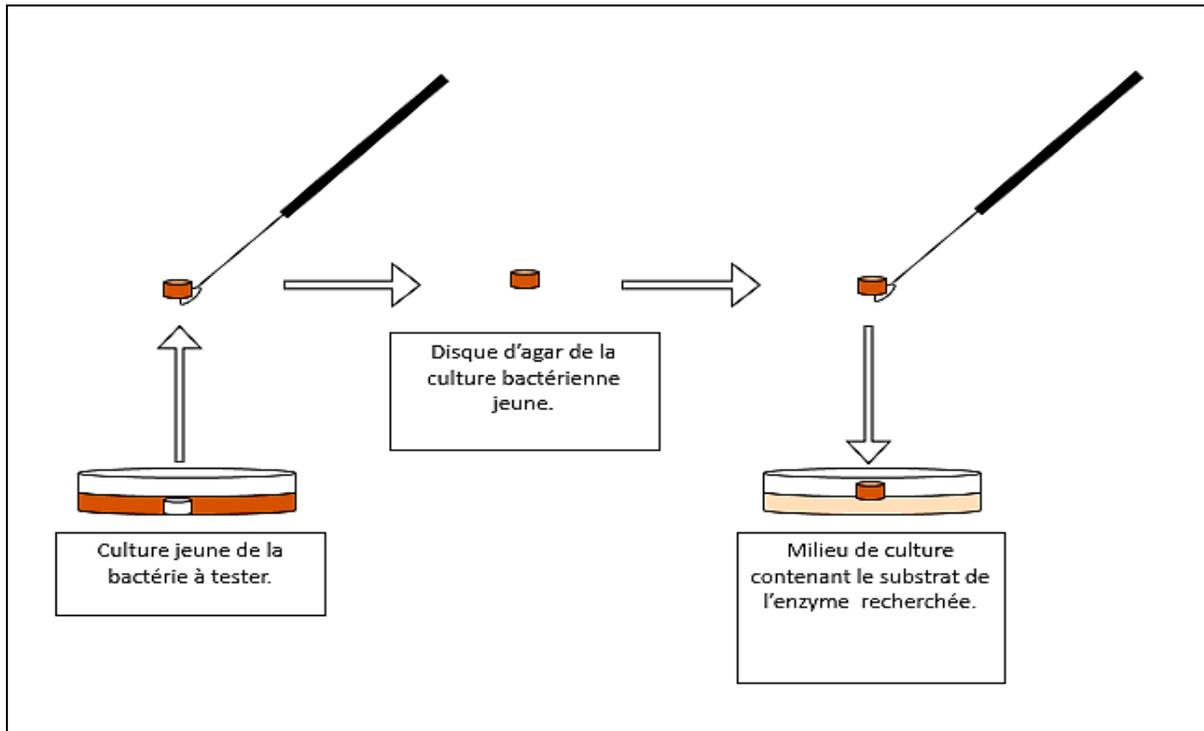
**1. Production d'enzymes d'intérêt agricole :**

Certaines enzymes produites par les bactéries du sol (cellulase, la chitinase, protéase etc.) jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique dans le sol en participant à sa fertilité et à la disponibilité des éléments minéraux nécessaires pour la nutrition des plantes. L'expression d'éventuelles enzymes par les 70 isolats purifiés a constitué la première étape de sélection. Tous les tests des activités enzymatiques ont été réalisés en duplicata.

### 1.1. Cellulase

Pour révéler l'expression d'enzymes à activité cellulosique, des disques d'agar de 5 mm de diamètre contenant des cultures bactériennes jeunes sont déposés à l'intérieur de boîtes de Pétri contenant le milieu de Carder (1986) ; composition en g/L :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6) ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3) ;  $\text{NaCl}$  (0,5) ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1) ; Extrait de levure (3) ; CMC (carboxyméthylcellulose) (7) ; Agar (15) ;  $7.2 \pm 0.02$  pH. Les boîtes sont par la suite incubées pendant environ une semaine à  $30^\circ\text{C}$ , (Carrim *et al.*, 2006) (figure 12).

Après incubation, une solution de rouge Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies. 20 minutes après, la surface de la boîte est inondée avec une solution de 1M de  $\text{NaCl}$  puis laissée au repos pendant une nuit. L'apparition d'un halo clair autour des cylindres indique la dégradation de la CMC et traduit la présence d'une cellulase extracellulaire.



**Figure 12** : schéma récapitulatif de la méthode des disques d'agar (original).

### 1.2. Chitinase

Pour la révélation de l'activité chitinasique des isolats, le milieu de culture décrit par Kopečný *et al.* (1996) et contenant en g/L d'eau distillée : La chitine colloïdale (0.8 à 0.6) ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2.7) ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.3) ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.7) ;  $\text{NaCl}$  (0.5) ;  $\text{KCl}$  (0.5) ; Extrait de levure (0.13) ; Agar (15) ;  $7.2 \pm 0.02$  pH.

Le milieu est ensemencé par la méthode des cylindres d'agar, les boîtes sont incubées une semaine à 30°C. La présence de la chitinase extracellulaire dans le milieu se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des disques.

La chitine colloïdale est préparée en suspendant 1g de chitine dans 9 ml de HCl concentré. La solution est laissée sous agitation pendant 2 heures jusqu'à dissolution (apparition d'une couleur brune). Par la suite, la solution est transférée dans une fiole de 250 ml en complétant le volume avec de l'eau distillée.

Après un temps de repos (une nuit), le culot est suspendu dans de l'eau distillée après écartement du surnageant. La procédure de lavage et de décantation est répétée trois fois avec de l'eau de robinet et trois fois avec l'eau distillée. Enfin, le surnageant est éliminé et la chitine décantée est filtrée à l'aide d'un tamis métallique de 0,5 mm. L'effluent est stocké dans une bouteille opaque à 4°C.

### 1.3. *Amylase*

La mise en évidence de la capacité des souches étudiées à dégrader l'amidon est réalisée sur un milieu de culture à base d'amidon, préparé selon la méthode décrite par Vinoth *et al.* (2009) ; composition en g/L : KNO<sub>3</sub> (0.5) ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.0) ; MgSO<sub>4</sub> (0.2) ; CaCl<sub>2</sub> (0.1) ; FeCl<sub>3</sub> (0.001) ; amidon soluble (10.0) ; agar (15.0) ; 7.2 ± 0.02 pH.

Le test est réalisé selon la méthode des disques d'agar contenant des cultures jeunes des isolats à tester et déposés à la surface du milieu préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées durant une période allant de 48-72 h à 30°C.

A la fin de la période d'incubation, une solution de (lugol) est utilisée pour inonder le milieu de culture à l'intérieur des boîtes. Après quelques minutes de contact, les boîtes sont lavées à l'eau distillée.

La solution de lugol révèle la dégradation de l'amidon dans le milieu par l'apparition de zones claires autour des disques d'agar, ce qui est traduit par la présence d'amylase extracellulaires d'origine bactérienne dans le milieu. Les zones dont l'amidon n'est pas dégradé apparaissent en bleu noirâtre.

### 1.4. *Protéase*

La révélation de l'activité protéasique des isolats est réalisée selon la méthode proposée par Kavitha *et al.* (2013), en utilisant le milieu ayant la composition suivante dans 1L d'eau

distillée : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levures (2,5) ; Glucose (1), et Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7 et autoclavé 20 minutes à 120°C. Parallèlement, 100 ml d'une solution de lait écrémé à 10% autoclavée (120°C/10 min) est préparée et ajoutée au milieu. Ce dernier est ensuite ensemencé par la méthode des disques. Les bactéries ayant une activité protéasique montrent un halo transparent autour des disques.

### 1.5. Estérase

Le milieu de culture utilisé est celui utilisé par Sierra (1957) (Carrim *et al.*, 2006). Il contient en g/l : peptone (10) ; NaCl (5.0) ; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (0.1) ; Tween 80 (1%, v/v) et Agar (18). Le pH est ajusté à 7,4. Le milieu est ensemencé et incubé à 30°C/48h. La présence d'une activité estérasique est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Sierra, 1957).

### 1.6. Lipase

La recherche de l'activité lipolytique est réalisée de la même manière que l'activité estérasique. Toutefois, le tween 80 est remplacé par le tween 20. Un résultat positif est déterminé par la présence d'un halo clair autour des colonies (Sierra, 1957 ; Carrim *et al.*, 2006).

### 1.7. Uréase

Selon Christensen (1946), la révélation de l'uréase bactérienne est réalisée par la méthode des disques d'agar sur un milieu à pH de 6,8 préparé comme suit :

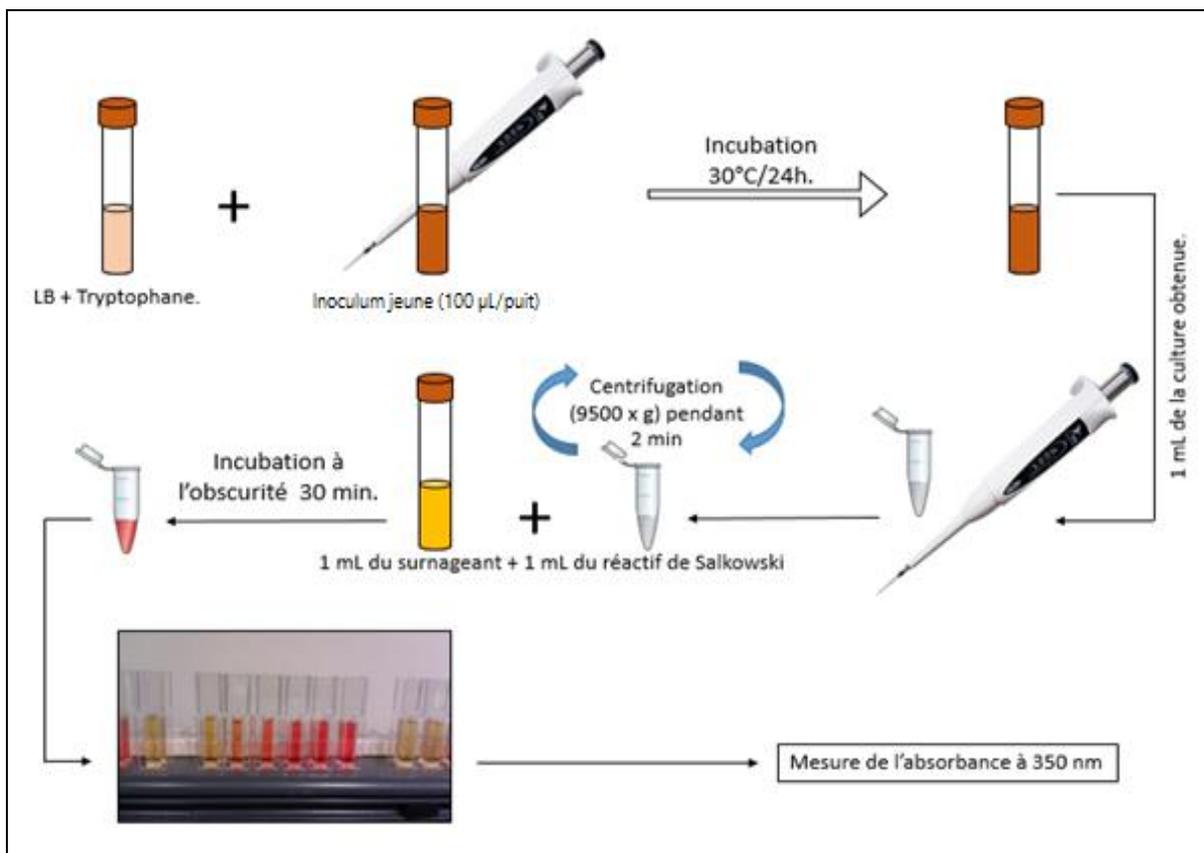
- Ajouter (en g) à 950 mL d'eau distillée :
  - Peptone (1) ;
  - Glucose (1) ;
  - NaCl (5) ;
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.2) ;
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.8) ;
  - Rouge de phénol (0.012) ;
  - Agar (15).
- Après autoclavage, ajouter 50 ml d'une solution stérile d'urée (40%) et versez le milieu dans des boîtes de Pétri.
- Les isolats ayant produit de l'uréase montrent un halo rose autour de leurs colonies.

## 2. Production de l'acide 3-indole acétique (AIA) :

L'AIA est quantifié en utilisant le milieu Luria Bertani (LB) ; Composition en g/L d'eau distillée : Extrait de levure (10) ; Tryptone (5) ; NaCl (5). Le milieu est additionné, après autoclavage, de 1 g de tryptophane, préalablement filtré à travers une membrane millipore (0.22  $\mu\text{m}$ ), est ajouté au milieu. Le milieu est ensemencé par 100  $\mu\text{L}$  de la culture jeune à tester et incubé à 30°C pendant 24h (figure 13).

Après incubation, 1,5 ml de la culture sont transférés dans des microtubes et centrifugés à température ambiante (9500  $\times$  g) pendant 2 min. 1 ml du surnageant a été transféré dans des tubes ensemble avec 1 mL du réactif de Salkowski (1 ml de 0,5 mol/L  $\text{FeCl}_3$  et 49 ml de  $\text{HClO}_4$  à 35%). Une demi-heure plus tard, l'absorbance à 350 nm est mesurée. Les valeurs d'AIA produite par chaque souche sont calculées par extrapolation sur une courbe standard préparée avec de l'AIA (Sigma-Aldrich ®) (Bric *et al.* 1991).

Le développement d'une couleur rose après l'addition du réactif de Salkowski indique la production d'auxine par l'isolat. Quatorze isolats révélés comme producteurs de cette auxine, ils ont été élus et testés pour leur capacité à produire des sidérophores.



**Figure 13 :** Test de production de l'acide 3-indole acétique sur milieu liquide (originale).

### 3. Production de sidérophores :

La capacité des 14 souches sélectionnées de produire des sidérophores a été testée en utilisant la méthode des disques d'agar sur le milieu gélosé à base de Chrome azurol S (CAS). Le milieu est préparé selon le protocole initialement proposé par Schwyn et Neilands (1987) et modifié par Alexander et Zuberer (1991). Il est composé de quatre solutions qui doivent être préparées séparément avant d'être mélangées.

- La solution indicatrice de Fe-CAS (1) :

Elle est préparée en mélangeant 10 ml de 1 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (préparée dans une solution de 10 mM HCl) avec 50 ml d'une solution de CAS ( $1,21 \text{ mg mL}^{-1}$ ). La mixture est ajoutée lentement à 40 mL d'une solution aqueuse d'HDTMA ( $1,82 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

- La solution tampon (2) :

Elle est préparée en dissolvant 30,24 g de PIPES dans 750 ml d'une solution de sels composée de : de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.3 g) ; de NaCl (0.5 g) ; de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1.0 g) ; d'agar (15 g). Le pH a été ajusté continuellement à 6,8 avec du KOH 50%. Le volume de la solution est complété à 800 mL avec de l'eau distillée.

- La Solution nutritive (3) :

La solution nutritive est constituée de : glucose (2 g) ; mannitol (2 g) ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (493 mg) ; de  $\text{CaCl}_2$  (11 mg) ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,17 mg) ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (1,4 mg) ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (0,04 mg) ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,2 mg) ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,0 mg). L'ensemble est mélangé dans 70 mL d'eau distillée.

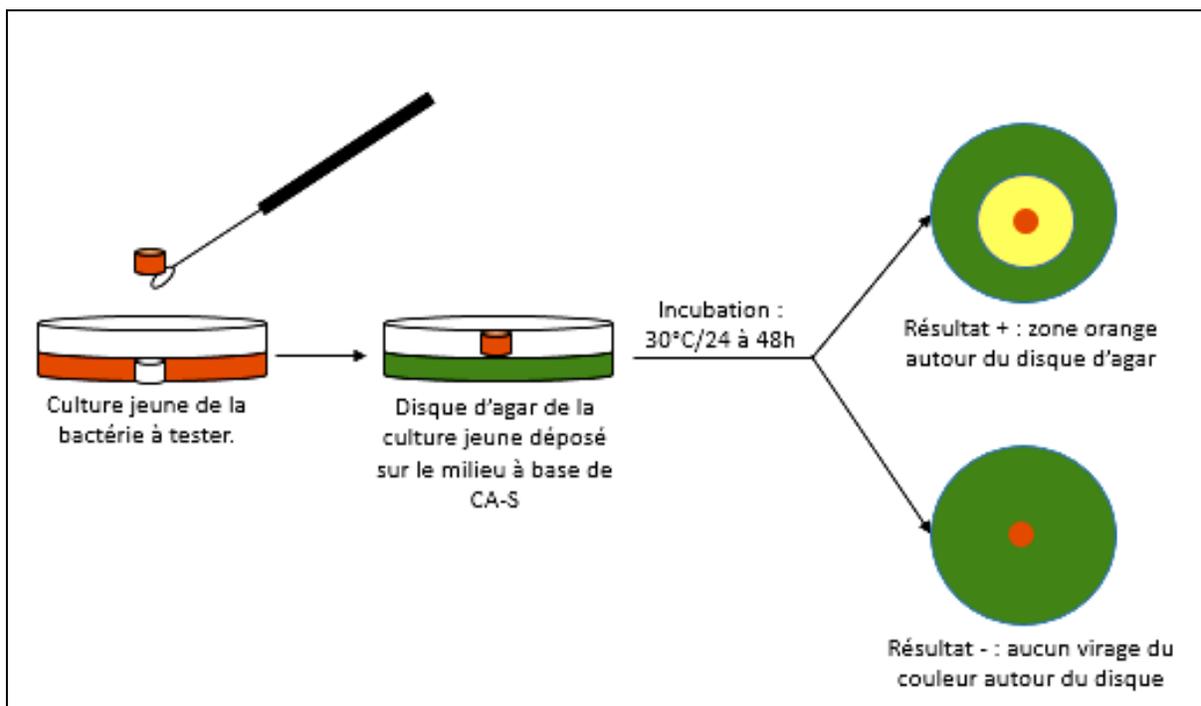
Les trois solutions obtenues ont été autoclavées séparément, puis laissées se tiédir jusqu'à  $50^\circ \text{C}$ .

- La solution (4) :

Elle contient 10% (p/v) de casamino-acide et stérilisée par filtration.

30 mL de la solution (4) sont mélangés avec les solutions (3) et (2). La solution indicatrice est ajoutée en dernier avec une agitation suffisante pour mélanger les ingrédients sans former de bulles.

Le milieu est coulé dans des boîtes de pétries pour être utilisé dans la révélation de la production des sidérophores par la méthode des disques d'agar. Une bactérie productrice de sidérophores forme un halo orange autour du disque d'agar. Sur la base de ce test, huit isolats considérés comme producteurs de sidérophores ont été sélectionnés pour des études ultérieures (figure 14).



**Figure 14 :** test de production de sidérophores (originale).

#### 4. Solubilisation du phosphate tricalcique :

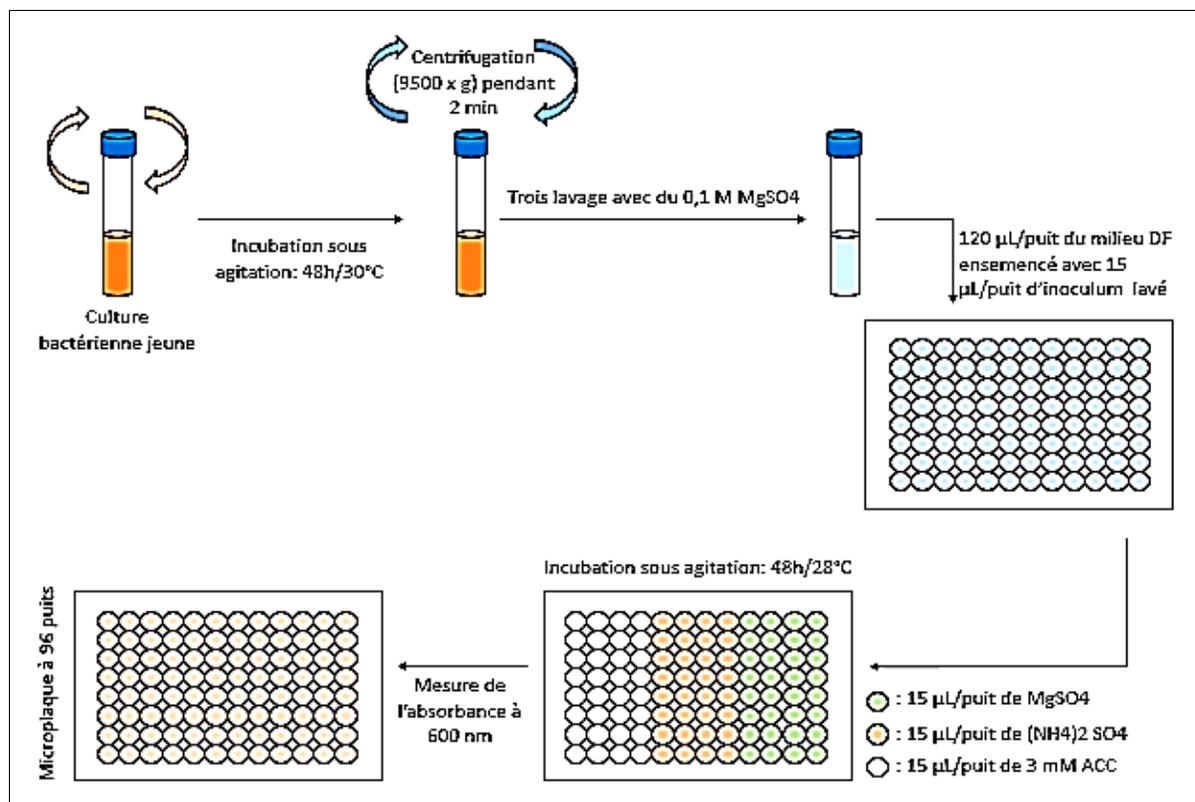
Les huit souches sélectionnées sont testées pour leur capacité à solubiliser le phosphate de roche inorganique  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ . La méthode des disques d'agar est utilisée sur le milieu de Pikovskaya (PKV) contenant par litre d'eau distillée : de glucose (10 g) ;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (5 g) ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5 g) ; (0,2 g) de NaCl ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g) ; KCl (0,2 g) ; extrait de levure (0,5 g) ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,002 g) ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,002 g) ; agar (15 g). La capacité d'un isolat à solubiliser le phosphate inorganique est indiquée par l'apparition d'un halo clair autour du disque d'agar (Sagervanshi *et al.* 2012).

Le test de la solubilisation de phosphate a permis de sélectionner 4 souches ayant la capacité de solubiliser le phosphate tricalcique. Les quatre souches sont par la suite testées afin de révéler leur capacité, ou non, à utiliser l'ACC comme seule source d'azote, à produire de l'HCN ou de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ).

### 5. L'utilisation de l'ACC comme seule source d'azote :

Les quatre bactéries sélectionnées sont cultivées sur un milieu riche contenant (par litre) : Tryptone (5 g) ; 2.5 extrait de levure (2.5 g) ; glucose (2 g), puis incubées sous agitation (100 rpm) (48 h à 30° C). La biomasse obtenue est lavée trois fois avec une solution stérile de 0,1 M MgSO<sub>4</sub> et remise en suspension dans la même solution. Dans une plaque à 96 puits, 120 µL du DF milieu, contenant (par litre) : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4.0 g) ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6.0 g) ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.2 g) ; glucose (2.0 g) ; acide gluconique (2.0 g) ; acide citrique (2.0 g) ; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.0 mg) ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (10 mg) ; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (11.19 mg) ; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (124.6 mg) ; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (78.22 mg) ; MoO<sub>3</sub> (10 mg) ; pH 7.2, ont été ajoutés à chaque puits (Penrose et Glick, 2003).

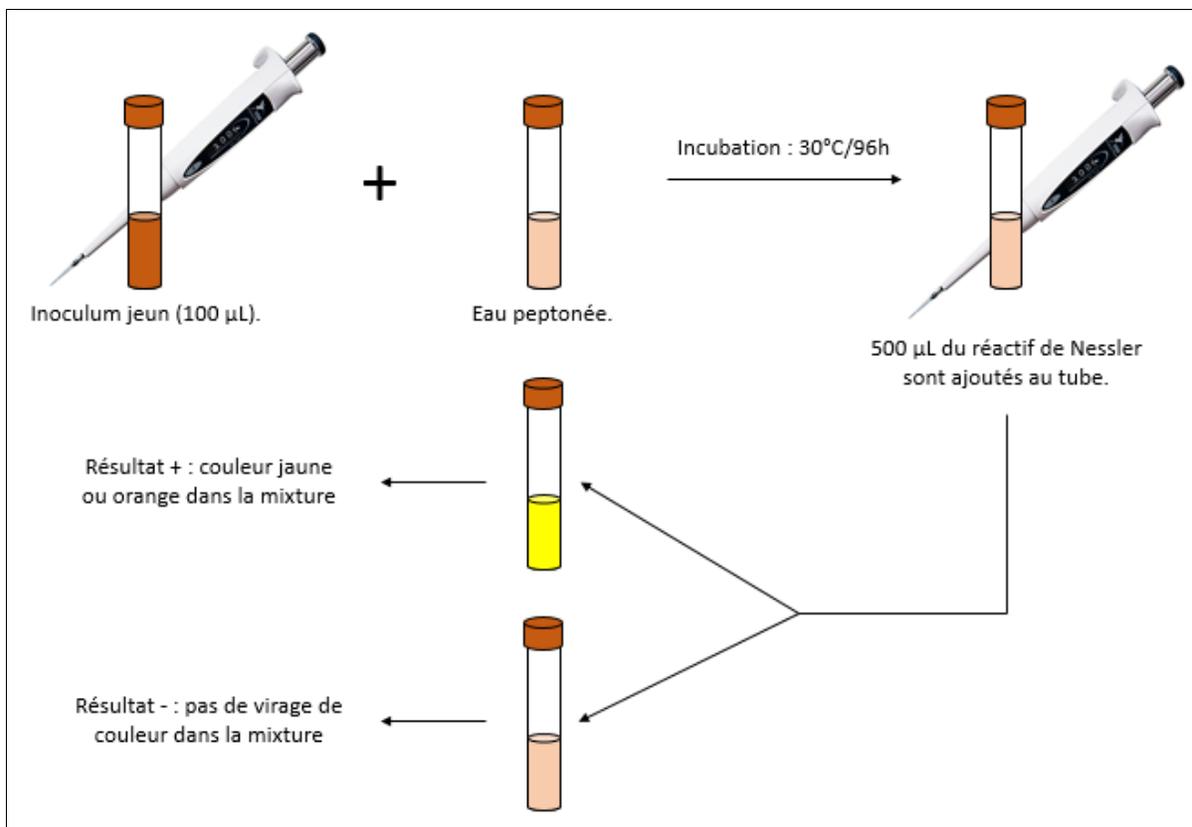
15 µL de 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, de 0.1 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou d'une solution d'ACC (3 mM) filtrée (0,22 µm) sont ajoutés au premier, au deuxième et au troisième tiers de colonnes de la microplaque respectivement (Figure 15). Pour l'inoculation de chaque puits, 15 µL/puits de la culture bactérienne lavée sont utilisés. Un contrôle sans bactéries est également utilisé (Shahzad *et al.*, 2010). Après incubation (48 h à 28 ° C), la croissance bactérienne est estimée en mesurant la densité optique (600 nm).



**Figure 15** : utilisation de l'ACC comme seule source d'azote (originale).

## 6. Production d'ammoniaque (NH<sub>3</sub>) :

100 µL de la suspension bactérienne jeune sont inoculés dans des tubes contenant 10 mL d'eau peptonée (EP). Les tubes sont incubés à 30°C pendant 96 h. A la fin de la période d'incubation, 500 µL du réactif de Nessler sont ajoutés à chaque tube. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur jaune ou orange dans la mixture (Figure 16), ce qui indique la production d'ammoniac par la souche testée (Capuccino et Sherman, 1992).



**Figure 16** : test de production de l'ammoniaque (originale).

## 7. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) :

Le test est réalisé selon le protocole suivant (Lorck, 1948) :

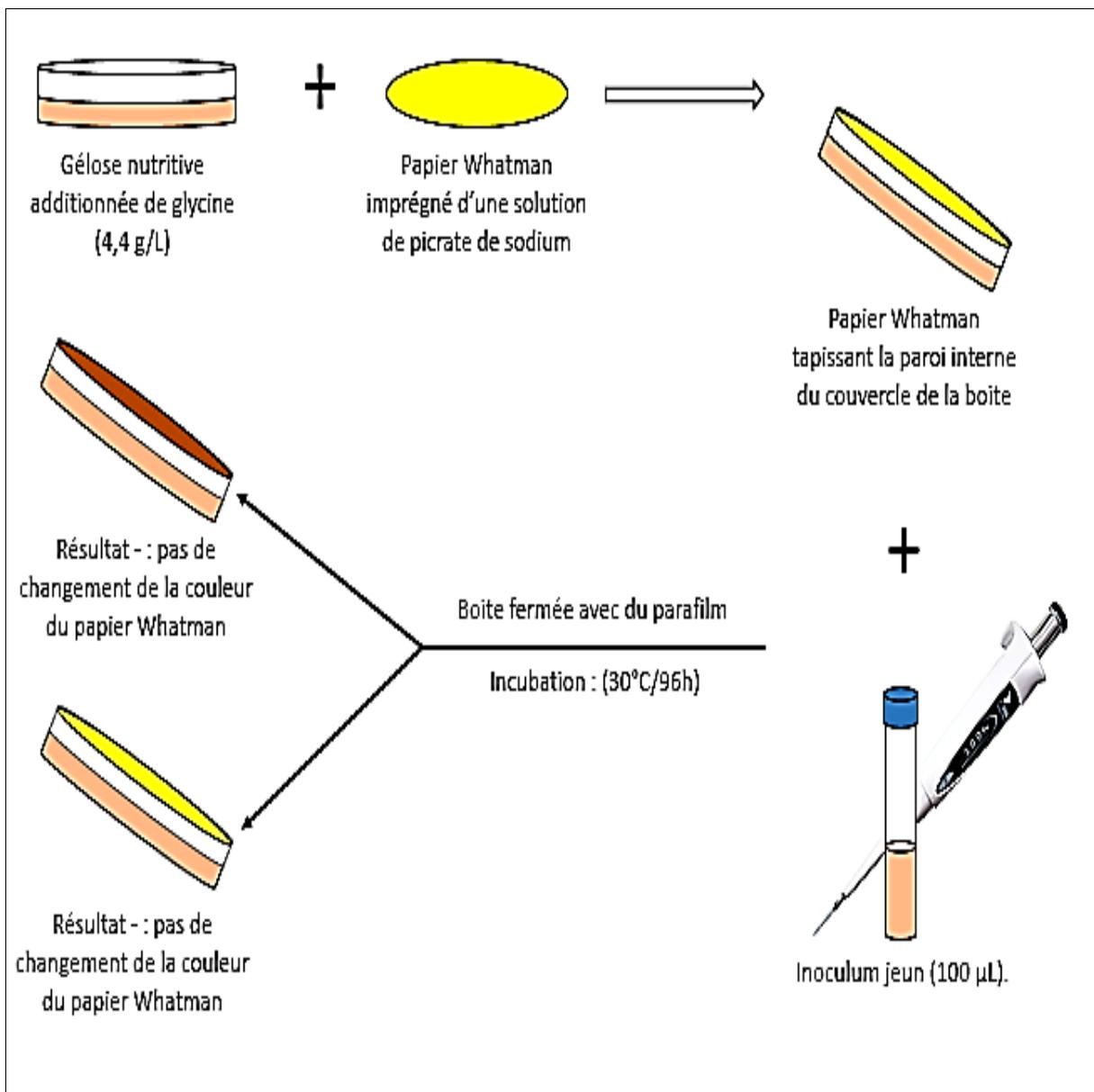
- Une gélose nutritive est fondue dans un bain marrai puis additionnée d'une solution stérile de glycine (filtrée à travers une membrane millipore 0.22 µm), à une concentration finale de 4.4 g/L. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre.
- Des disques en papier Whatman, ayant des diamètres proches à ceux des couvercles des boîtes de Pétri, sont imprégnés d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique additionné de 2% de carbonate de sodium anhydre).

- Les disques en papier Whatman sont déposés d'une façon à ce qu'ils tapissent les parois internes des couvercles des boîtes.

- 100  $\mu$ L de la culture bactérienne à tester est inondée sur la gélose à l'aide d'un écouvillon stérile.

- Les boîtes sont fermées avec du parafilm puis incubées à 30°C pendant 96 h.

Un résultat positif est traduit par un virage du papier Whatman de la couleur jaune (conférée par la solution du picrate de sodium) à une couleur orange ou marron, indiquant la production de l'HCN par la souche testée (Figure 17).



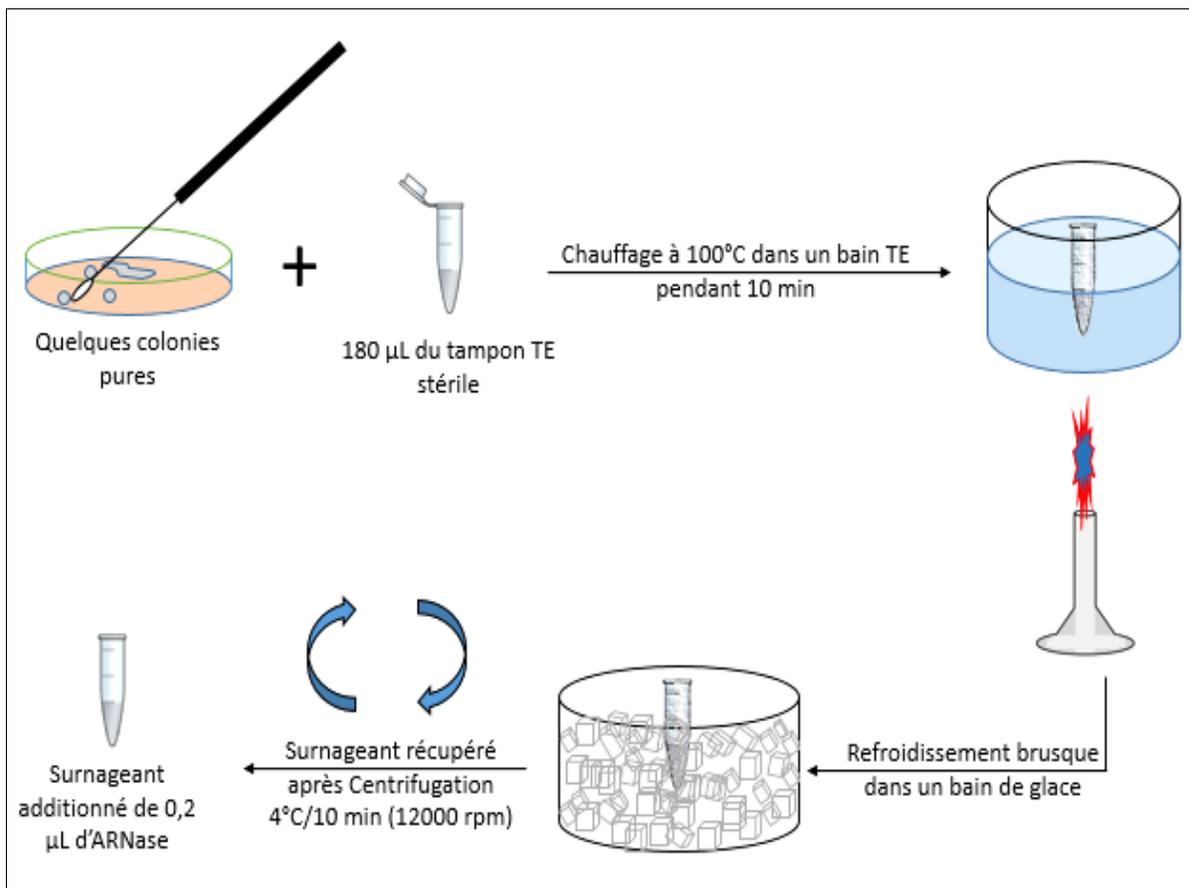
**Figure 17 :** test de production de l'acide cyanhydrique (HCN) (originale).

## V. Identification moléculaire :

L'identification moléculaire des quatre souches a été réalisée au laboratoire de Biotechnologie et de Valorisation des Bio-Géo-ressources à l'institut de Biotechnologie de l'université de la Manouba, Tunis. Les quatre souches sélectionnées ont été identifiés sur la base de leurs fragments d'ADN codant pour les séquences d'ARNr 16S.

### 1. L'extraction d'ADN total (*boiling lysis*) :

L'extraction de l'ADN total bactérien est réalisée par un chauffage à 100°C dans un tampon Tris-EDTA (TE) (1mM de Tris-HCl et EDTA 10mM pH 7,4). Plusieurs colonies d'une culture pure sont agitées dans un tube Eppendorf contenant 180 µL du tampon TE stérile. La suspension est chauffée à 100°C dans un bain pendant 10 min puis brusquement refroidie dans un bain de glace pendant 10mn ; le choc thermique permet la lyse cellulaire. La suspension est centrifugée à 4°C/10 min (12000 rpm). Le surnageant est récupéré stérilement dans un autre tube Eppendorf ensemble avec 0.2 µL d'ARNase. Les mixtures sont gardées à 4°C pendant une nuit pour permettre l'élimination de l'ARN (figure 18).



**Figure 18 :** présentation schématique de la procédure d'extraction d'ADN (originale).

## 2. Amplification du gène codant pour l'ARN 16S :

L'extraction de l'ADN total est suivie d'une amplification du gène codant pour l'ARNr 16S en utilisant des amorces universelles caractérisées par les séquences suivantes :

- (5'-SD-Bact-0008-as-20-3'): (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
- (5'-SD-Bact-1495-as 20-3'): (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

Le mélange de la réaction d'amplification est composé de :

- 2,5 µL tampon de la réaction PCR
- 2,5 µL MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 µL désoxynucléoside triphosphate
- 0,3 µL de chaque amorce
- 0,2 µL de Taq ADN polymérase
- 1.0 µL de l'ADN total.

Le programme de PCR consistait en une étape initiale à 94 ° C pendant 3 minutes, 35 cycles de dénaturation à 94 ° C pendant 45 secondes, anelage pendant 1 minute à 55 ° C, l'élongation pendant 2 minutes à 72 ° C et d'une étape d'élongation finale à 72 ° C pendant 8 minutes. La *Taq* ADN polymérase possède une activité terminal-transférase qui a pour effet l'ajout d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. La PCR est réalisée dans un thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) (Daffonchio *et al.*, 2000).

La réaction PCR nécessite un témoin positif (ADN d'une souche de collection de référence amplifiée selon le même protocole) et un témoin négatif (réactifs sans ADN).

## 3. Electrophorèse sur gel d'agarose :

Un gel d'agarose à 1,5% est préparé pour réaliser une migration électrophorétique (20 min/ 100 V) des produits de PCR dans un tampon Tris-borate 0.5x-EDTA suivie d'une coloration à une solution de bromure d'ethidium 0,5 mg. L<sup>-1</sup> pendant 30 minutes avant de les révéler sous une lumière UV.

## 4. Séquençage :

Un séquençage enzymatique des fragments d'ADN amplifiés est effectué selon la méthode de Sanger. Une purification des fragments d'ADN amplifiés est réalisée au préalable par un traitement enzymatique (exonucléase I et Shrimp phosphatase alcaline SAP) dégradant

les amorces et les dNTP restants. Par la suite, les échantillons sont amplifiés à nouveau et marqués en utilisant un kit de marquage « *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* » (*Applied Biosystems*). Le milieu réactionnel est composé de :

- La Taq polymérase
- Des dNTP
- Des ddNTP marqués par un composé fluorescent « Dye »
- Une amorce reverse fraîchement préparée à une concentration de 25  $\mu$ M
- Un tampon de dilution (200mM Tris pH9, 5mM MgCl<sub>2</sub>) et de
- L'eau ultra-pure.

L'amplification s'effectue dans un thermocycleur selon le programme suivant : 1mn à 96°C, puis 25 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 4 mn à 60°C (amplification) et un cycle à 4°C (refroidissement). L'ADN obtenu est ensuite précipité par 1 $\mu$ l de l'acétate de sodium 3M pH 5.2 dans 50 $\mu$ l d'éthanol à 95%, centrifugé 4000 rpm/40min, lavé avec de l'éthanol à 70% et centrifugé une deuxième fois à 4000 rpm/ 30°C. Le culot est séché par centrifugation à 1000 rpm dans une centrifugeuse plaque inversée (Soft Start). Le culot sec est suspendu dans une solution de formamide, puis introduit dans un séquenceur (ABI Prism 3130 DNA séquenceur, Applied Biosystems).

## 5. Analyse phylogénétique :

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences disponibles auprès du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant l'algorithme BLAST. Un dendrogramme phylogénétique est construit par la (*neighbor joining method*) et un arbre de topologie est évaluée en effectuant une analyse de bootstrap 1000 ensembles de données en utilisant MEGA4.01 (Kumar *et al.*, 2004).

## VI. Caractérisation morpho-physicochimique des souches sélectionnées :

### 1. Aspect des colonies :

Après repiquage des souches, Les colonies sont soumises à l'observation macroscopique (forme, couleur, relief, diamètre etc....). L'observation est réalisée après culture sur les deux milieux différents, milieu Jensen et milieu NF-b.

## 2. Aspect microscopique :

### 2.1. La mobilité bactérienne (observation à l'état frais) :

L'observation microscopique à l'état frais est réalisée sur des cultures en phase de croissance exponentielle. Une colonie pure est prélevée et mélangée avec une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA®) au grossissement x 40.

### 2.2. Coloration de Gram :

La coloration a été réalisée selon le protocole cité dans (Prescott, 2009).

## 3. Recherche de la catalase :

Une colonie bactérienne est déposée sur une lame en verre propre en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à 10 volumes. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Levy *et al.*, 1992).

## 4. Le test de l'oxydase :

L'oxydase est recherchée sur des disques commercialisés pour la recherche de l'oxydase (HIMEDIA®). Une colonie pure est déposée sur le disque, la réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

## 5. Détermination du pH optimum de la croissance des souches :

Pour déterminer l'effet du pH sur la croissance souches, le milieu LB liquide est préparé à une gamme de pH allant de 5 à 9 (5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 et 9).

L'expérience a été conduite sur des microplaques à fond rond de 96 puits. Chaque puits servira à inoculer 200  $\mu$ L du milieu avec 10  $\mu$ L de la suspension bactérienne. Chaque colonne de la microplaque contient un milieu ayant le même pH. Enfin, les microplaques sont incubées à 30 °C pendant 24 h.

La lecture est réalisée, en duplicata, par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu Mini 1240®). Les deux lectures sont obtenues en mélangeant le contenu de chaque 4 puits (8 au total) dans deux cuves à spectrophotomètre.

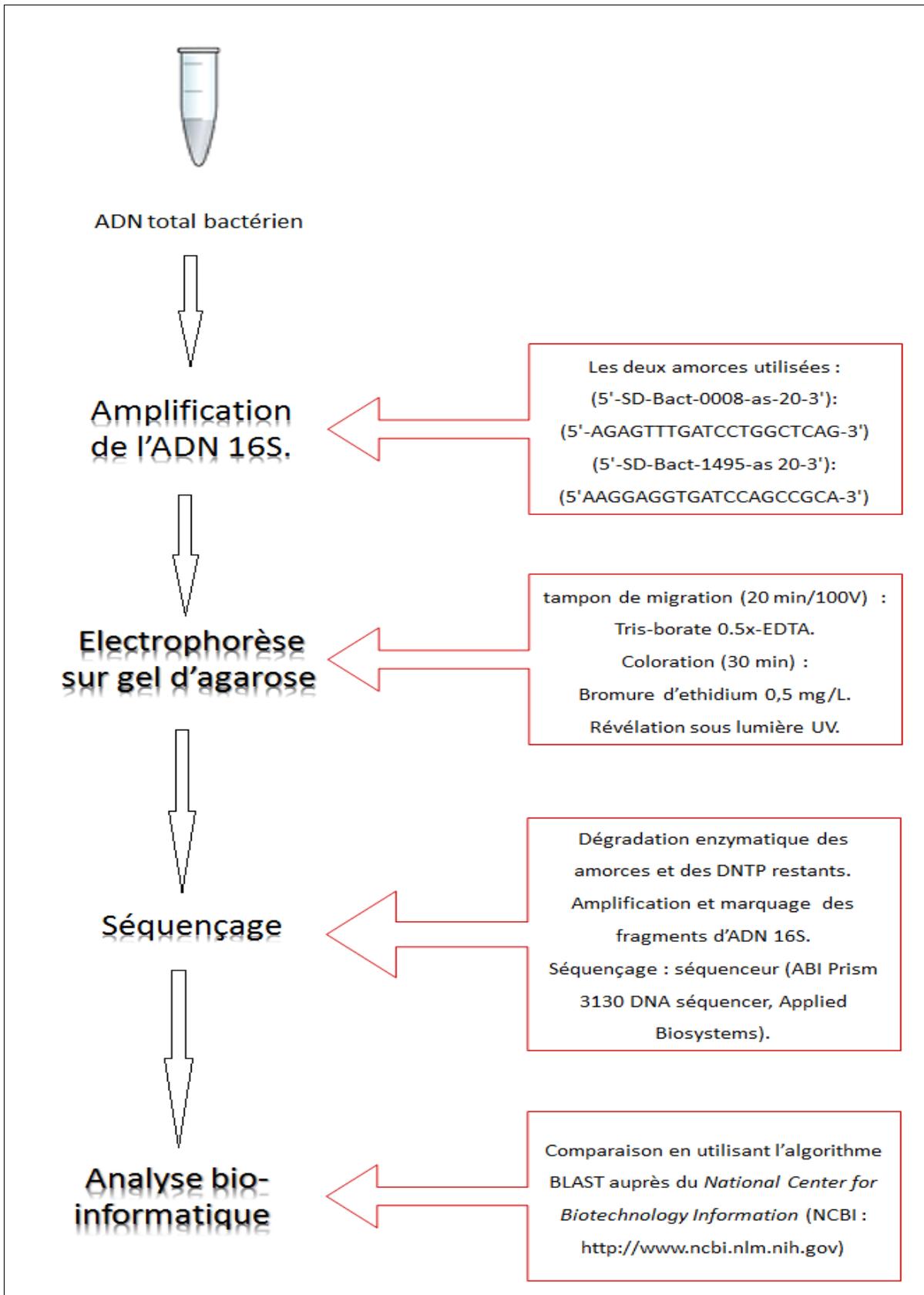


Figure 19 : protocole d'identification moléculaire des isolats sélectionnés (originale).

**Deuxième partie : Effet des extraits bruts de *O. ficus indica*, *U. lactuca* et *E. intestinalis* sur l'halotolérance des souches sélectionnées et leur interaction avec les graines de blé en germination.**

**I. Halotolérance des isolats sélectionnés :**

L'halotolérance des souches sélectionnées a été étudiée en utilisant deux milieux de culture ; le milieu de culture minimum NF-b (Nitrogen Free-broth) et le milieu riche LB (Luria Bertani).

Dans un premier temps, l'expérience a été réalisée en utilisant le milieu de culture NF-b préparé en présence d'extrait aqueux des deux algues marines et de l'*Opuntia ficus-indica*. Par la suite la même expérience a été répétée en utilisant le milieu LB en présence d'extraits hydro-alcoolique de ces mêmes plantes.

**1. Milieux de culture :**

*1.1. NF-b :*

Le milieu NF-b, additionné de glucose comme seule source de carbone, a été préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 et 650 mM). Il contient la composition suivante dans un litre d'eau distillée : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4 g), MgSO<sub>4</sub> (0.2 g), NaCl (0.1 g), CaCl<sub>2</sub> (0.02 g), FeCl<sub>3</sub> (0.01 g), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0.002 g), Extrait de levure (0.05 g), Glucose (5 g) (Nabti *et al.*, 2007).

*1.2. LB :*

Le milieu LB a été préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.3, 1.5, 1.8 et 2.0 M). Il contient la composition suivante dans un litre d'eau distillée : Tryptone (5 g), Extrait de levure (10 g), NaCl (5g).

**2. Préparation des extraits hydroalcooliques :**

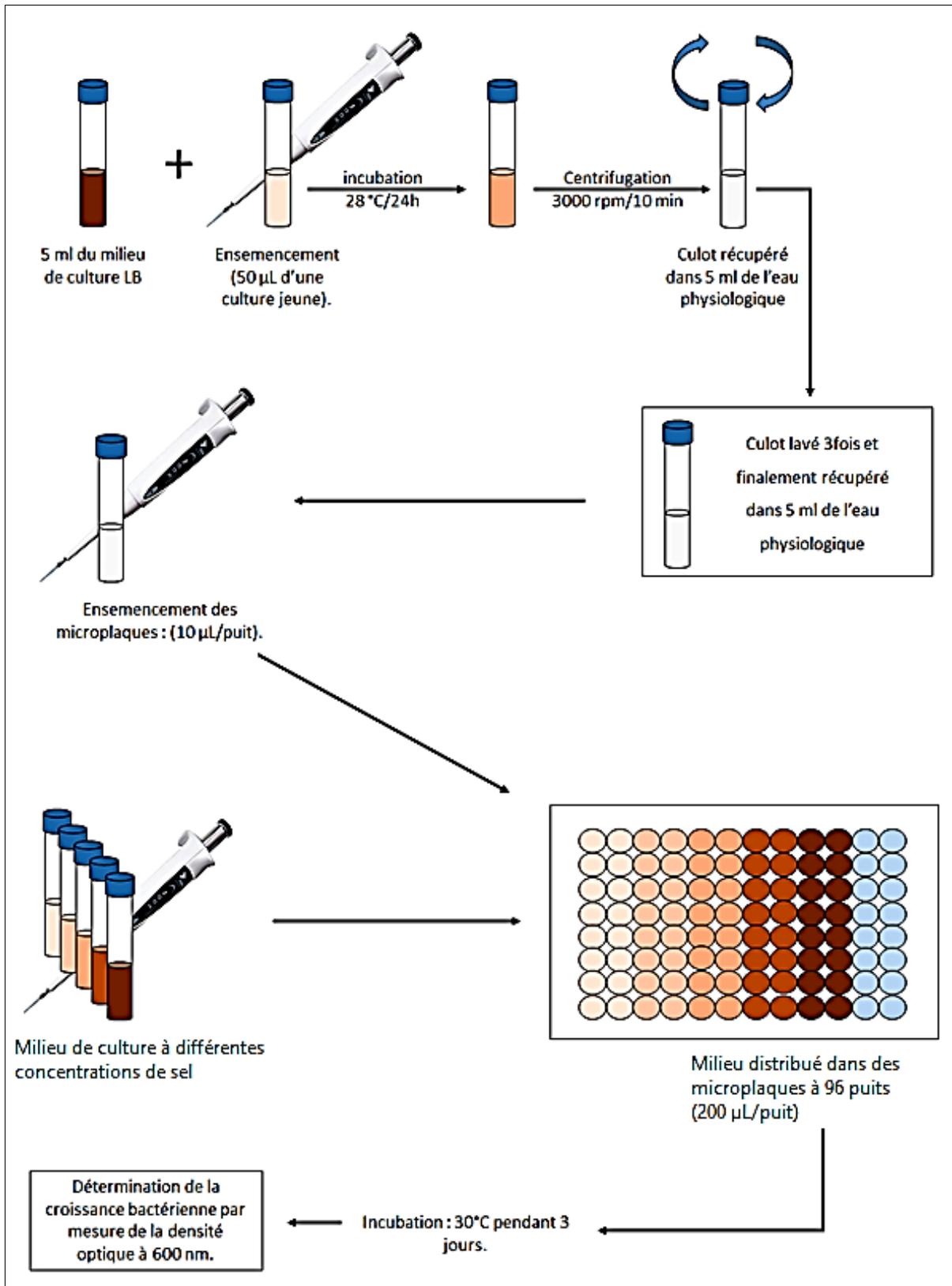
Cinquante g du matériel biologique sec et broyé en poudre (algues ou raquettes) sont homogénéisés dans de l'éthanol 70 % (vol /vol) sous agitation à température ambiante. Le mélange est filtré à travers un papier filtre pour éliminer les particules solides. Le filtrat est évaporé à sec, sous vide à 40°C. La patte est récupérée dans 10 ml d'eau distillée (figure 18) (Ghoul *et al.*, 1995).

### 3. Ajout des extraits et de glycine bétaïne aux milieux de culture :

Les deux algues marines ainsi que les raquettes d'*Opuntia ficus-indica* ont été découpés en petits morceaux afin de faciliter un meilleur relargage de substances intracellulaires. 2,5 g (poids frais) ont été immergés dans des flacons contenant 50 ml du milieu NF-b avec les concentrations de NaCl précitées. Les flacons ont ensuite été passés à l'autoclave à 110 ° C pendant 30 min. Après décantation, 10 ml du surnageant ont été distribués dans des tubes et serviront à remplir les microplaques afin d'étudier l'halotolérance bactérienne. La glycine bétaïne est ajoutée par filtration (filtre millipore 0.22 µm) au milieu déjà autoclavé à une concentration finale de 1 mM (Ghoul *et al.*, 1995).

### 4. Préparation des inocula et détermination de la croissance bactérienne :

5 ml du bouillon LB a été inoculé avec une culture fraîche (18 h) de la souche testée (BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9). Après incubation à 28 ° C pendant 24 heures, la culture a été centrifugée à 3000 rpm pendant 10 min. Le culot a été lavé trois fois avec 5 ml de solution saline normale (8,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl) et enfin remis en suspension dans 5 ml de la même solution. Les suspensions bactériennes obtenues ont servi àensemencer le milieu de culture déjà distribué dans des microplaques. Après incubation (28 ° C pendant quatre jours), la croissance bactérienne est estimée par mesure de l'absorbance de la culture à 600 nm. L'expérience a été ensuite répétée en remplaçant (NF-b) avec (LB) supplémenté ou non avec de glycine bétaïne [1 mM] ou des extraits hydroalcooliques [10<sup>-2</sup> ; v/v] de *Opuntia ficus-indica*, *Ulva lactuca* et *Enteromorpha intestinalis* (figure 21) (Ghoul *et al.*, 1995).



**Figure 20** : Halotolérance des quatre souches en présence et/ou en absence de GB [1mM] et des extraits hydroalcooliques d'*U. lactuca*, *E. intestinalis* et *O. ficus-indica* (originale).

## II. Germination des graines de blé :

Afin de déterminer l'effet des souches étudiées, de la glycine bêtaïne et des extraits hydroalcoliques d'*Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur la germination des graines de blé dur sous stress salin, les graines sont sélectionnées rigoureusement en fonction de leur morphologie, leur taille et leur état.

### 1. Provenance des graines :

Les graines de blé dur, *Triticum durum* (Tableau 08) variété BOUSSALEM, récolte de la saison (2014), ont été fournies par l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales-Union des Coopératives Agricoles, Béjaïa-Algérie (Figure 22).

**Tableau 08** : systématique de blé dur (*Triticum durum*), selon Brouillet *et al.* (2006).

<b>Règne</b>	plantea (végétale)
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Liliopsida
<b>Ordre</b>	Cyperales
<b>Famille</b>	Poaceae
<b>Genre</b>	<i>Triticum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Triticum durum</i>



**Figure 21** : graines de *Triticum durum* variété BOUSSALEM (originale).

## 2. Stérilisation des graines :

Les graines ont été stérilisées selon la méthode de Götz *et al.* (2006) en trois étapes :

- Les graines sont trempées dans de l'éthanol (70% pendant 1 min) avec une douce agitation.
- Les graines sont remises dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 12% pendant 15 minutes.
- Pour se débarrasser du chlore, six lavages successifs à l'eau distillée stérile sont enfin appliqués (15 minutes au minimum).

## 3. Bactérisation des graines :

Après stérilisation des graines, elles sont imbibées dans des suspensions bactériennes lavées (DO = 0.8) des quatre souches à tester (BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9). La durée de contact entre la bactérie et les graines est de 30 minutes.

## 4. Protocole expérimental (Ramados *et al.*, 2013) :

Des disques en papier filtre standard d'un diamètre égal à celui des boîtes de Pétri sont stérilisés au four Pasteur à 180°C pendant 15 minutes puis placés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre (deux papier filtre/boîte).

Dans chaque boîte de Pétri, le papier filtre est imbibé avec des solutions à différentes concentrations de sel (5ml/boîte). Ces solutions sont additionnées, ou non, de GB (à une concentration finale de 1mM) et des extraits hydroalcooliques d'*Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* (à une concentration finale de 1%). Des contrôles sans NaCl, sans traitement bactérien, sans glycine bêtaïne et sans extraits ont été utilisés.

L'expérience a été réalisée à l'obscurité à une température moyenne de 25°C. Le suivi de la germination est effectué durant 12 jours en dénombrant les graines germées dans chaque boîte (une lecture / 2 jours). Une graine est considérée comme germée après la sortie de l'embryon de la cuticule (3 mm de longueur au minimum). A la fin de l'expérience, le pourcentage final de germination dans chaque boîte est déterminé.

La première expérience a été réalisée en absence de souches et désigné : **EXP (I)**. Elle est constituée de 5 sous expériences organisées comme suit :

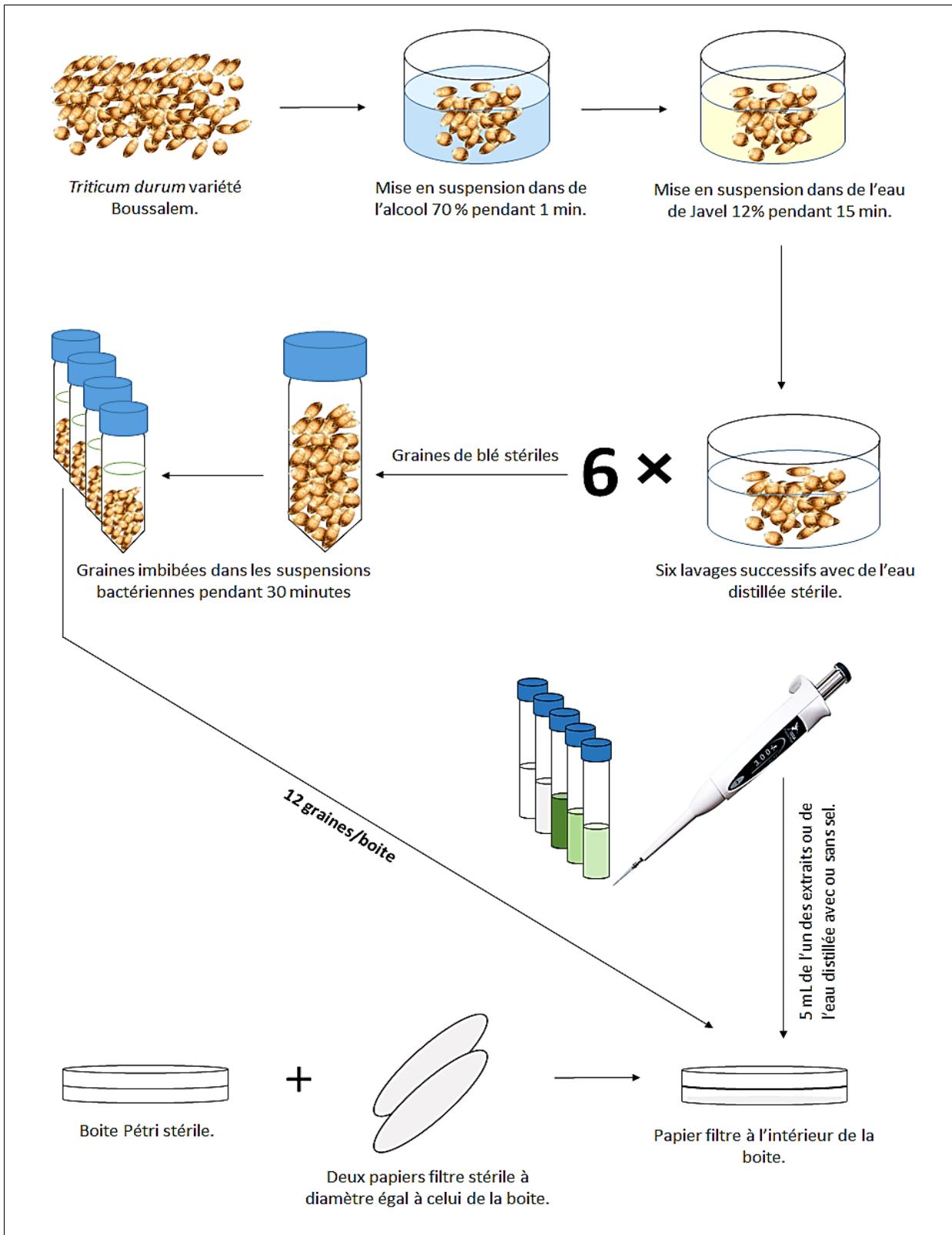
1. Première sous expérience réalisée en absence d'osmoprotecteurs : **SOUS EXP (I)**.
2. Deuxième sous expérience réalisée en présence de GB [1 mM] : **SOUS EXP (2)**.

3. Troisième sous expérience réalisée en présence de l'extrait d'UL [ $10^{-2}$ ] : **SOUS EXP (3)**.
4. Quatrième sous expérience réalisée en présence de l'extrait d'EI [ $10^{-2}$ ] : **SOUS EXP (4)**.
5. Cinquième sous expérience réalisée en présence de l'extrait d'OFI [ $10^{-2}$ ] : **SOUS EXP (5)**.

Chaque sous-expérience a été divisée en quatre tests réalisés en Triplicata (**A**, **B** et **C**), où chaque répétition est réalisée sur 12 graines par boîte :

- Premier test (**T1**) : réalisé à 0 mM d'NaCl.
- Deuxième test (**T2**) : réalisé à 100 mM d'NaCl.
- Troisième test (**T3**) : réalisé à 200 mM d'NaCl.
- Quatrième test (**T4**) : réalisé à 300 mM d'NaCl.

Les quatre expériences **EXP (II)**, **EXP (III)**, **EXP (IV)** et **EXP (V)** constituent des répétitions de l'expérience **EXP (I)** en présence des quatre souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9, respectivement (figure 23, 24).



**Figure 22 :** Représentation schématique du test de germination des graines de blé dur (originale).

**Troisième partie : Effet des extraits bruts de *O. ficus indica*, *U. lactuca* et *E. intestinalis* et/ou des souches sélectionnées sur la croissance de la tomate sous stress salin.**

La troisième partie de ce travail a été réalisée au centre d'écologie, évolution et changements environnementaux (cE3c) de la faculté des sciences de l'université de Lisbonne-Portugal. Elle consistait à étudier le comportement de la tomate sous salinité élevée et l'effet des extraits étudiés ainsi que des souches sélectionnées sur sa croissance. L'accumulation des acides aminés (particulièrement la proline et l'acide glutamique) comme osmoprotecteurs de la tomate durant sa croissance sous stress salin a également été évaluée.

**I. Halotolérance de la tomate en présence des souches et des extraits :**

**1. Provenance des graines :**

Les graines de tomate (*Solanum lycopersicum*, variété Marmande) ont été fournies par le centre d'écologie, évolution et changements environnementaux (cE3c) de la faculté des sciences de l'université de Lisbonne. Cette variété est caractérisée par une maturation précoce facilitant les études à courte durée. Elles sont commercialisées sous licence « Vilmorin » (figure 25, tableau 09).



**Figure 23 :** graines de tomate (*Solanum lycopersicum*) variété Marmande (originale).

**Tableau 09** : systématique de la tomate (*Solanum lycopersicum*), selon (Blancard, 2009)

<b>Règne</b>	plantea (végétale)
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Solanales
<b>Famille</b>	Solanaceae
<b>Genre</b>	<i>Solanum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>

## 2. Suivre de la croissance de la tomate sous serre :

### 2.1. Souches bactériennes utilisées :

Deux souches bactériennes ont été utilisées pour l'inoculation des graines de tomate, il s'agit des deux isolats BEC9 : isolé de l'échantillon du sol BEC provenant de la Wilaya de Béjaïa ; BOA4 : isolé de l'échantillon su sol BOA provenant de la Wilaya de Bouira (figure 26).

### 2.2. Stérilisation des graines :

Les graines de tomate ont été stérilisées en surface pendant 4 min avec (0,7% p/v) d'hypochlorite de sodium (NaOCl). Elles sont par la suite lavées cinq fois avec de l'eau distillée stérile (Appenroth *et al.*, 2006).

### 2.3. Bactérisation des graines :

- Des colonies pures des deux isolats à tester ont été repiquées sur le milieu LB et incubées sous agitation (100 rpm) pendant 24 h à une température de 30°C ;
- Les cultures obtenues sont centrifugées (3000 rpm/10min).
- Les culots sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique stérile.
- L'inoculum final est standardisé à une DO de 0.8 ( $\lambda=600\text{nm}$ ).

Les graines de tomate ont été mises en contact avec les suspensions bactériennes pendant 30 minutes, les graines non inoculées sont mises en contact avec de l'eau physiologique stérile.

L'expérience a été réalisée avec (150 mM) ou sans (00 mM) effet de sel. Le stress salin a été appliqué dans les solutions d'irrigation des pots.



**Figure 24 :** les deux inocula bactériens et les extraits aqueux de *U. lactuca*, *E. intestinalis* et *O. ficus-indica* utilisés dans l'expérience de la tomate (originale).

#### 2.4. *Protocol expérimental :*

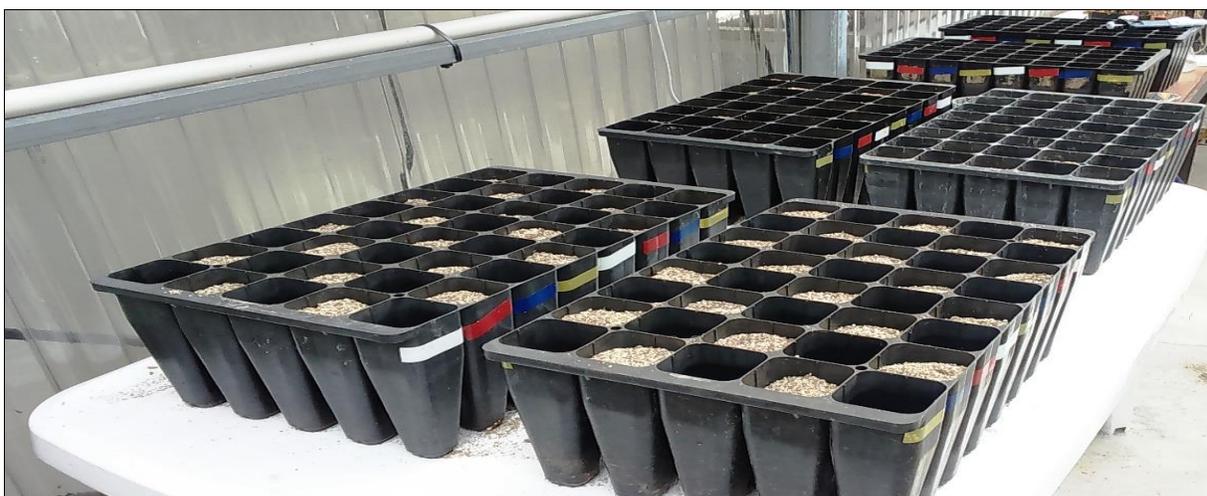
Le sol utilisé dans l'expérience est un sol à faible contenu minéral. Il a été fourni par le centre d'écologie, évolution et changements environnementaux (cE3c) de la faculté des sciences de l'université de Lisbonne. Il a été mélangé avec de la vermiculite (50/50 : v/v) avant utilisation. Par la suite, les graines de tomate ont été placées dans des pots (8 x 20 cm) à raison de 5 graines/pot, à une profondeur d'environ 1 cm dans la mixture sol-vermiculite.

Les pots ont été irrigués chacun avec 15 ml des solutions contenant les extraits aqueux de *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica*. Les extraits sont préparés à une concentration de 1.5 % (m/v) dans de l'eau distillée additionnée, ou non, de l'NaCl à une concentration de 150 mM. Durant les premiers 15 jours de l'expérience, les pots ont été irrigués avec les mêmes solutions chaque 3 jours, puis avec de l'eau de robinet chaque 2 jours pendant 15 jours (30 mL/pot) (figure 26).

Des témoins sans apport d'extraits ou sans bactérisation ou sans apport d'extraits ni bactérisation ont été utilisés. L'expérience a été réalisée à raison de 5 répétitions par traitement (25 graines) (figure 27).

Les pots ont été placés sous serre à une photopériode naturelle et une température moyenne de 30°C.

A la fin du premier mois, l'expérience est poursuivie avec une seule plante par pot. Pour le reste des plantules, la taille de la partie aérienne ainsi que les poids frais et sec dans chaque traitement ont été déterminés (figure 28).



**Figure 25 :** pots utilisés durant le premier mois de l'expérience de la tomate (originale).

Les plantes gardées pour poursuivre l'expérience ont été déplacées vers des pots de 15 x 20 cm et contenant le même sol. Elles ont été irriguées chaque trois jour avec de l'eau de robinet (50 mL/pot). A la fin de l'expérience (50 jours), la taille et le poids frais/sec des plantes de chaque traitement ont été mesurés. Une analyse par HPLC des acides aminés accumulés par les différentes plantes de chaque traitement a également été réalisée.



**Figure 26 :** pots utilisés durant la deuxième partie de l'expérience de la tomate (originale).

## II. HPLC pour la détermination des acides aminés accumulés :

Les acides aminés, particulièrement la proline et l'acide glutamique, constituent un groupe très important de molécules connues pour leur rôle osmoprotecteur chez les bactéries et les plantes. Afin de déterminer l'effet des extraits et des bactéries utilisés sur l'accumulation de telles molécules sous stress salin, une HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) a été réalisée sur des extraits préparés à partir des plantes de tomate récoltées à la fin de l'expérience. L'HPLC a été réalisée selon le protocole de Fabiani *et al.* (2002), dans le but de déterminer la concentration de certains acides aminés qui y sont accumulés.

### 1. Produits chimiques et solutions :

- Acide hydrochlorique 0.01 M ;
- Hydroxyde de sodium ;
- Acétate de sodium (tampon acétate, 50 mM pH 4.2) ;
- Borate de sodium (tampon borate, 200 mM pH 10) ;
- Acétonitrile pour HPLC ;
- FMOC chloride (15 mM dans de l'acétonitrile) ;
- ADAM (1-aminoadamantane hydrochloride) acétonitrile 300 mM (1 : 1) / (v : v) ;
- Solutions standards d'acides aminés (dans de l'HCl 0.01M) ;
- Extraits des plantes de tomate issus de l'expérience.

### 2. Matériel :

- Filtres millipore 0.45  $\mu\text{m}$  ;
- Tubes 2.5 mL ;
- Seringues 5 mL ;
- Tubes falcon 50 mL.

### 3. L'appareil de l'HPLC :

- Colonne : RP-18 250 x 4mm 5 $\mu\text{m}$  à 25°C ;
- Colonne similaire de réserve ;
- Détecteur UV à  $\lambda=263\text{nm}$  ;
- Système de pompe à gradient binaire.

#### 4. Méthode :

##### 4.1. Préparation de l'échantillon :

- Dissoudre les acides aminés en poudre dans une solution acide (0.01 M HCl) préparée dans de l'eau ultra-pure (milli-Q water) : 20, 40, 80, 120 (mg/25mL) ;
- Agiter la solution pendant une heure ;
- Centrifuger à 1500 x g pendant 15 min à 4°C.

##### 4.2. Dérivatisation :

La dérivatisation est réalisée à la température ambiante selon la méthode suivante :

A 300 µL de l'échantillon ajouter :

- 1) 600 µL de tampon borate ;
- 2) 600 µL de la solution FMOC-Cl (laisser réagir pendant 5 min) ;
- 3) 600 µL de la solution ADAM (laisser réagir pendant 1 min).

Le mélange réactionnel est filtré à travers une membrane millipore (0.45 µm).

##### 4.3. Analyse :

Gradient de flux (tableau 10) :

- Solvant de migration A : 50 mM tampon acétate ;
- Solvant de migration B : acétonitrile ;
- Le temps de migration est d'environ 30 minutes ;
- L'identification des pics est réalisée par comparaison aux standards ;
- La quantification des acides aminés dans les extraits des plantes de tomate est réalisée par extrapolation sur des courbes d'étalonnage préparées par la méthode des standards externes.

**Tableau 10** : profile de flux des solvants de migration pour l'HPLC :

Temps	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	72	28
3	72	28
27	55	45
32	0	100
37	0	100
39	72	28
47	72	28

Flux 1 mL/min à 25°C (détection à une longueur d'onde :  $\lambda=263\text{nm}$ )

### Quatrième partie : *Pseudomonas protegens* comme agent de biocontrôle

Dans cette partie, l'activité antifongique de la souche *P. protegens* RhiNA contre les champignons phytopathogènes *B. cinerea*, *A. flavus*, *A. niger* et *Mucor* sp. et son rôle dans l'atténuation de la pourriture grise des pommes infectées par *B. cinerea* ont été évalués.

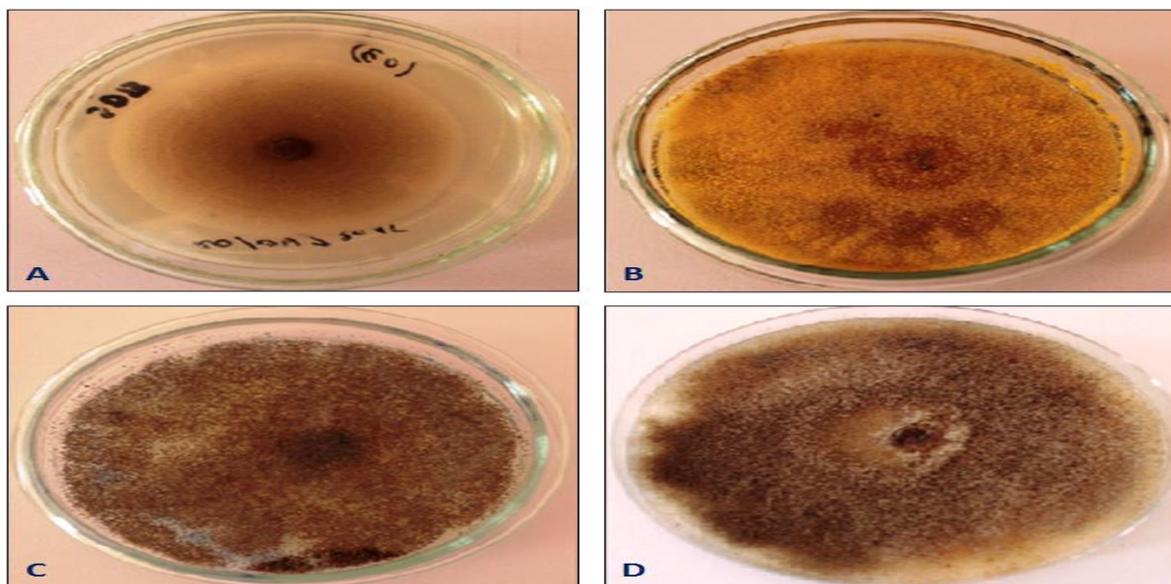
#### I. Souches bactériennes et champignons phytopathogènes :

##### 1. Souches bactériennes :

La souche bactérienne RhiNA a été isolée en 2014 par le laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables-équipe Biomasse et environnement de l'université A. Mira de Béjaïa-Algérie à partir d'un sol agricole situé au nord de l'Algérie (Béjaïa). La souche de référence *Pseudomonas protegens* CHAO<sup>T</sup> a été gracieusement fournie par le professeur Anton Hartmann, *German Research Center for Environmental Health (GmbH)*, Unité de recherche (*Microbe-Plant Interactions*)-Allemagne.

##### 2. Souches fongiques :

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*-BC1 a été généreusement fourni par le laboratoire de mycologie-Université A. Mira de Béjaïa-Algérie. Cette souche a été isolée en France par le Laboratoire (Protection des Plantes) (INRA-STPV, Avignon). Les champignons *Aspergillus niger*, *A. flavus* et *Mucor* sp. ont été fournis par le laboratoire de microbiologie appliquée, Université A. Mira de Béjaïa-Algérie (Figure 29).



**Figure 27** : les souches fongiques (A) *Mucor* sp. ; (B) *A. flavus* ; (C) *A. niger* ; (D) *B. cinerea*.

## II. Production de métabolites d'intérêt agricole par la souche RhiNA :

### 1. Métabolites antifongiques :

La production d'acide cyanhydrique, d'ammoniaque de chitinase et de sidérophores par l'isolat RhiNA a été évaluée selon les protocoles de Lorck (1948), Cappucino et Sherman (1992), Kopečný *et al.* (1996) et Alexander et Zuberer (1991), respectivement. Les quatre protocoles sont détaillés dans les pages 47, 47, 40 et 45, respectivement.

### 2. Autres métabolites d'intérêt agricole :

La souche RhiNA a été également testée pour sa capacité à produire des enzymes lytiques, de l'acide indole acétique et à solubiliser le phosphate tricalcique (Tableau 11).

**Tableau 11** : métabolites d'intérêt agricole, tests et références.

Métabolite	Référence	Titre et page
Cellulase	Carder (1986)	IV.1.1. (page 40)
Estérase/Lipase	Sierra (1957)	IV.1.5. et 6. (page 42)
Protéase	Kavitha <i>et al.</i> (2013)	IV.1.4. (page 41)
Amylase	Vinoth <i>et al.</i> (2009)	IV.1.3. (page 41)
Uréase	Christensen (1946)	IV.1.7. (page 42)
AIA	Malik et Sindhu (2011)	IV.2. (page 43)
Solubilisation du Phosphate	Sagervanshi <i>et al.</i> (2012)	IV.4. (page 45)

## III. Identification moléculaire

L'identification moléculaire de la souche a été simultanément réalisée avec celle des souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9, suivant le même protocole détaillé dans le titre numéro (V) détaillé dans les pages 49-51.

## IV. Tests d'antagonisme *in vitro*

### 1. Inhibition de la croissance mycélienne

L'antagonisme de la souche *P. protegens*-RhiNA vis-à-vis des champignons *B. cinerea*, *A. niger*, *A. flavus* et *Mucor* sp. a été étudié en utilisant la méthode de diffusion sur gélose (Sagahón *et al.* 2011). Des disques d'agar envahit par des cultures jeunes de chaque

champignon (0,5 cm de diamètre) ont été placés aux centres de boîtes de Pétri contenant du milieu pomme de terre-dextrose-agar (PDA). Des disques similaires de la bactérie à tester ont été placés à 2,5 cm du disque fongique (trois disques bactériens/boîte). Des sans bactérie ont été utilisées comme témoins. Après incubation ( $25 \pm 2$  ° C, 5 jours), le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique a été calculée selon la formule suivante :

$$[(KR-R1) / KR] \times 100$$

KR : Correspond à la distance entre et la marge de la colonie fongique dans le témoin (mm).

R1 : Représente la distance entre le centre de la colonie du champignon et sa périphérie dans les boites traitées par les disques de la souche RhiNA.

## 2. Inhibition de la germination des spores fongiques :

Dans des tubes eppendorfs, 20  $\mu$ l de la suspension sporale (ajusté à  $10^6$  spores/ml) ont été mélangés avec la culture bactérienne fraîche de l'antagoniste ( $10^8$  UFC/ml). 1 ml d'eau distillée stérile additionné d'une solution filtrée de glucose, à une concentration finale de 5%, ont été ajoutés à chaque Eppendorf. Le mélange est mis en incubation à 21°C pendant 24 heures. Des tubes témoins, inoculés seulement avec les suspensions sporale, ont été préparés. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Le pourcentage de germination des spores (SGP%) a été hémocytométriquement calculé sous microscope optique (40X) selon la formule suivante (Bensidhoum *et al.*, 2015) :

$$PGS\% = SGT-SGB/SGT \times 100 \text{ où}$$

SGT : Nombre de spores germées dans le témoin.

SGB : nombre de spores germées en présence de l'antagoniste.

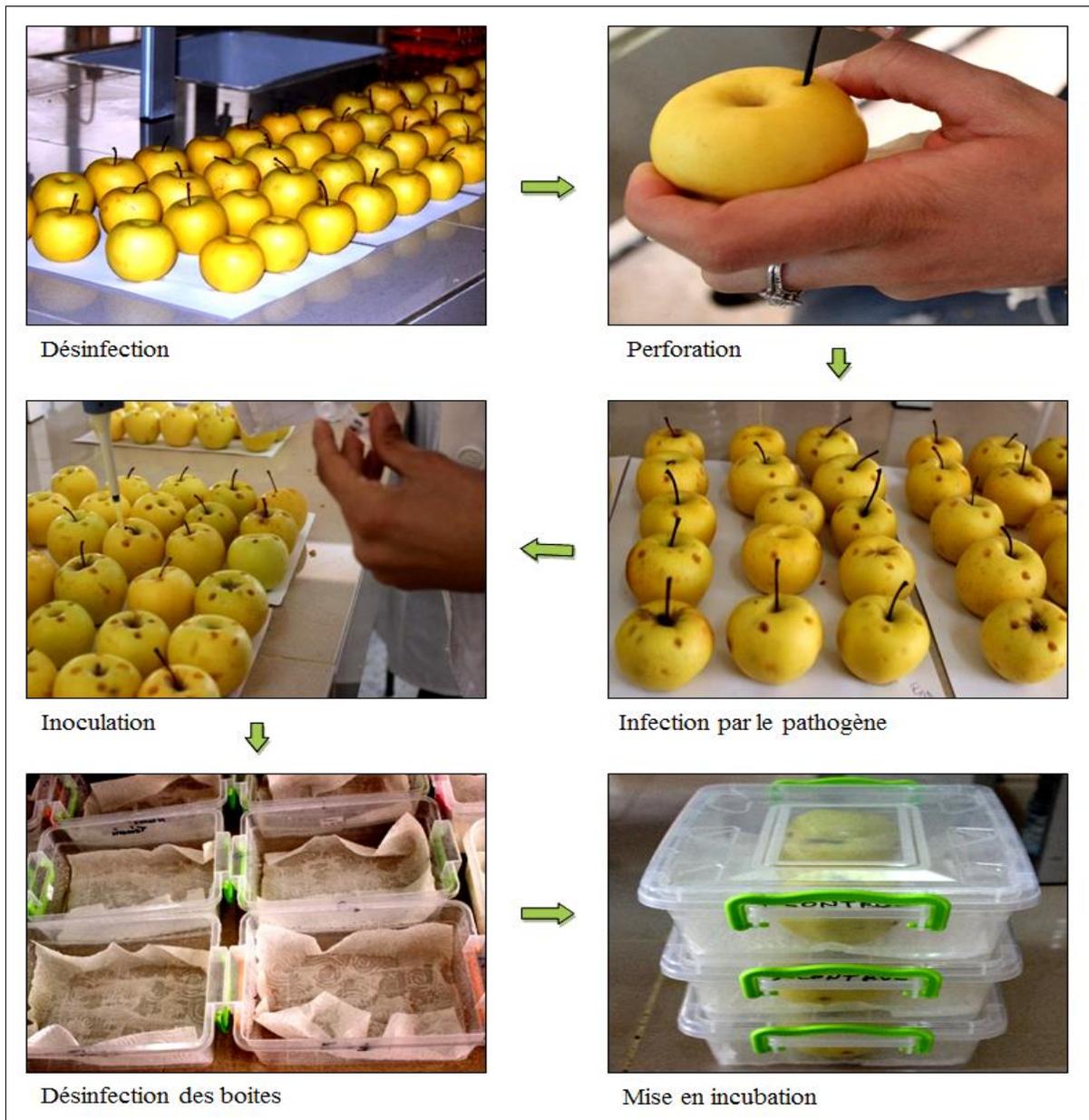
## V. Inhibition de la pourriture grise sur fruits de pomme :

Le test *in vivo* sur les pommes a été réalisé en utilisant un protocole modifié de Xiao et Kim (2008) :

- Des pommes fraîches et saines aux calibres similaires ont été désinfectées avec de l'eau distillée stérile additionné de 2% d'hypochlorite et laissées à température ambiante pour séchage. Par la suite, Trois trous équidistances (4 mm x 5 mm) ont été faites dans la zone

équatoriale des fruits et chaque trou a été inoculé avec 30  $\mu\text{L}$  de la suspension de l'antagoniste ( $10^8$  UFC/mL).

- 2 heures après, chaque puis est additionné de 15  $\mu\text{L}$  de la suspension sporale de *B. cinerea* ( $10^6$  spores/mL). Les pommes ont été placées dans des boîtes stériles tapissées du papier absorbant humidifié avec de l'eau distillée stérile (3 fruits/boîte) et incubées à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 4 jours. A la fin de l'expérience, la superficie pourrie autour de chaque trou a été mesurée en utilisant le programme Image J. L'expérience a été répétée en triplicata. Des témoins sans bactérie ont été utilisés (figure 30).



**Figure 28** : Les principales étapes du test *in vivo* sur pommes (originale).

**VI. Analyses statistiques :**

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism Version 6. Les données de l'étude de l'halotolérance et des essais de la germination du blé, ainsi que les résultats *in vivo* obtenus sur plantes de tomate ont été comparées par analyse multiple de la variance (*Two-way ANOVA*), soumise à un intervalle de confiance de 95%. La corrélation entre les résultats enzymatiques et les propriétés physiques/chimiques des échantillons de sol ont été analysés en calculant le coefficient de corrélation de Pearson (r) et la régression linéaire. Les résultats de l'activité antifongique *in vitro* ont été comparés par analyse de la variance (*One-way ANOVA*) ( $p < 0.05$ ). Les résultats de l'antagonisme sur fruits de pomme ont été analysés par le test t avec correction de Welsh.

# Résultats et Discussion

## I. Propriétés physicochimiques des échantillons du sol

L'échantillon BEA s'est avéré le seul échantillon salin ( $CE > 4$  ds/m), pour les autres échantillons, la conductivité électrique varie de 3.8 (BOA) à 2.1 ds/m (SEA). Les échantillons prélevés des wilayas de Medea (MEA) et Setif (SEA et SEB) étaient plus riches en matière organique (1.1%, 1.3% et 1.5% respectivement), alors que ceux recueillis de Bejaia et Bouira étaient moins riches en matière organique. D'un autre côté, L'échantillon SEA s'est révélée le plus humide ( $\theta_g = 0.287$ ) alors que l'échantillon BEA présente le plus faible contenu en eau ( $\theta_g = 0.137$ ) (tableau 12).

**Tableau 12** : propriétés physiques et chimiques des échantillons de sol

	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCl)	Humidité ( $\theta_g$ )	EC (dS/m <sup>3</sup> )	SOM (%)
<b>BEA</b>	8.05	7.16	0.137	<b>4.2</b>	0.8
<b>BEB</b>	8.54	7.63	0.200	3.5	0.5
<b>BEC</b>	8.20	7.29	0.240	2.4	0.9
<b>BOA</b>	8.29	7.60	0.186	3.8	0.7
<b>MEA</b>	8.12	7.34	0.211	2.9	1.1
<b>SEA</b>	8.20	7.15	0.287	2.1	1.5
<b>SEB</b>	8.19	7.41	0.222	2.4	1.3

## II. Sélection hiérarchiques des isolats

Les soixante-dix isolats bactériens, purifiés à partir des échantillons BEA, BEB, BEC, BOA, MEA, SEA et SEB (10 isolats de chaque échantillon) ont fait l'objet d'une sélection hiérarchique sur la base de leur capacité à produire des métabolites connus pour leur rôle dans la promotion de la croissance des plantes. Ainsi, les bactéries faiblement productrices, ou incapables de produire le métabolite étudié, sont éliminées à chaque fois.

### 1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique

Il est à rappeler que les 70 souches dans ce travail ont été isolées sur le milieu de culture Jensen, dépourvu de toute source d'azote. Pour s'assurer de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, les isolats ont été soumis à trois repiquages successifs sur le même milieu de culture. Les 70 isolats sont donc considérés comme fixateurs libres de l'azote atmosphérique.

L'azote moléculaire constitue 78% de l'atmosphère. C'est un élément chimiquement stable et inassimilable par les organismes supérieurs ainsi que la majorité des microorganismes. Cependant, certains microorganismes sont capables d'assurer la fixation de

l'azote atmosphérique, participant au cycle biogéochimique de l'azote (Golubyatnikov *et al.*, 2013 ; Bertrand *et al.*, 2015).

La fixation biologique de l'azote dans le sol est l'un des mécanismes à travers lesquels les microorganismes stimulent la croissance des plantes (James *et al.*, 1994 ; Glick, 1997 ; Vessey, 2003 ; Gray et Smith, 2004). Ce processus est principalement utilisé par des microorganismes procaryotes menant une vie libre (*Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Acetobacter* etc.) ou vivants en symbiose avec les plantes (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* etc.) (Reddy, 2014). La fixation de l'azote est assurée par une enzyme appelée la nitrogénase. Cette dernière est composée de deux sous-unités métalloprotéiques ; la première (deux hétérodimères / 250 kDa, codées par les gènes *nifD* et *nifK*) contient le site actif pour la réduction de l'azote ; la deuxième (deux sous-unités identiques / 70 kDa, codées par le gène *nifH*) assure l'hydrolyse de l'ATP et le transfert d'électrons entre les sous-unités (Zehr *et al.*, 2003).

L'utilisation exagérée des fertilisants chimiques pour compléter le sol en azote et l'émission de l'oxyde nitreux dans l'atmosphère dû à certaines activités humaines constituent, de plus en plus, un danger majeur et la cause principale du déséquilibre du cycle d'azote dans le sol et dans l'atmosphère. En céréaliculture, l'application des bactéries fixatrices d'azote pour minimiser l'utilisation accrue des fertilisants chimiques est largement adoptée. Ainsi, les bactéries appartenant aux genres *Azospirillum* (Rao *et al.*, 1987 ; Hartmann 1996 ; Malik *et al.*, 1997 ; Santa *et al.*, 2004 ; Nabti *et al.*, 2010 ; Volpiano *et al.*, 2014), *Pseudomonas* (Rao *et al.*, 1987 ; Hartmann, 1996; Mirza *et al.*, 2006; Shabaev et Voronina, 2007), *Bacillus* (Park *et al.*, 2005), *Herbaspirillum* (Volpiano *et al.*, 2014 ; Brusamarello-Santos *et al.*, 2012), *Azotobacter* (Rao *et al.*, 1987 ; Milošević *et al.*, 2012), *Rhizobium* and *Enterobacter* (Habibi *et al.*, 2014), *Klebsiella* (Iniguez *et al.*, 2004) et *Burkholderia* (Van *et al.*, 2000 ; Govindarajan *et al.*, 2008) ont montré une grande efficacité comme substituant (ou suppléments) pour minimiser l'application des fertilisants chimiques et augmenter le rendement du blé et du riz.

A travers les années, des bactéries appartenant aux genres *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* et *Pseudomonas* ont été utilisées comme PGPR pour stimuler la croissance d'une grande variété de plantes (Malik *et al.*, 1997 ; Glick *et al.*, dans Altman et Waisel, 1997 ;

Kader *et al.*, 2002 ; Sgroy *et al.*, 2009 ; Vacheron *et al.*, 2013). Plusieurs espèces appartenant aux genres mentionnés tels que *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Azotobacter chroococcum* ont été décrites comme bactéries fixatrices d'azote dans le sol (Madkour *et al.*, 1990 ; Jha et Kumar, 2009 ; Laskar *et al.*, 2013 ; Pathania *et al.*, 2014).

Les bactéries appartenant au groupe « Rhizobia » ont gagné une place importante dans la promotion de la croissance des plantes, particulièrement à travers leur capacité d'établir des relations symbiotiques avec les légumineuses, jouant un rôle important dans le processus de fixation biologique de l'azote. Les espèces *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. japonicum* etc. ont montré une grande efficacité à supplémer l'azote à une grande diversité de plantes (Luzerne, trèfle doux, pois, lentille, haricot, niébé, etc.) (Yamaguchi, 1983). Ajoutant à ça, l'inoculation des plantes par certaines bactéries associatives comme celles appartenant au genre *Azospirillum* s'est montré très bénéfique pour l'amélioration du rendement des légumineuses d'hiver (pois et pois chiches) (Sarig *et al.*, 1986).

Dashti *et al.* (1998) ont étudié le rôle des deux bactéries (*Serratia liquefaciens* 2-68 ou *S. proteamaculans* 1-102) dans l'amélioration de la nodulation, de la fixation d'azote et du rendement total en azote de deux cultivars de soja. Les deux souches ont augmenté la nodulation du soja et accéléré le début de la fixation de l'azote. L'azote fixé, exprimé en pourcentage d'azote et de protéines totales dans les tissus de la plante, ont été augmentés par l'inoculation. D'un autre côté, Pishchik *et al.* (1998) ont rapporté l'effet d'inoculation des bactéries fixatrices d'azote, appartenant au genre *Klebsiella*, sur le rendement de la pomme de terre. Une augmentation significative du rendement en tubercules et de la teneur en azote a été obtenue après inoculation par les souches *K. mobilis* CIAM880 et CIAM853.

Récemment, Naqqash *et al.* (2016) ont observé que l'inoculation des plantes par des bactéries fixatrices d'azote, nommément *Azospirillum*, *Enterobacter* et *Rhizobium*, dans des conditions axéniques, a augmenté le rendement de la pomme de terre. A titre d'exemple, *Azospirillum* sp. TN10 a permis d'augmenter le poids frais et sec de la pomme de terre par rapport aux plantes témoins (non inoculées). De plus, une augmentation significative de la teneur en azote des tiges et des racines des plantes inoculées a été observée.

## 2. Activités enzymatiques des isolats

### 2.1. Résultats des activités enzymatiques

63 souches (90 % des isolats sélectionnés) possédaient l'activité amylasique. L'activité uréasique a été détectée chez 44.29 % des isolats, alors que la catégorie d'enzymes la moins exprimé était les protéases (37.14 %). Les activités lipolytiques, estérases, chitinolytiques et cellulolytiques étaient présentes chez 45.71, 47.14, 70 et 50 % des isolats testées, respectivement. Parmi le nombre total des isolats (70), 28 ont été sélectionnée sur la base de leurs activités enzymatiques (tableau 13).

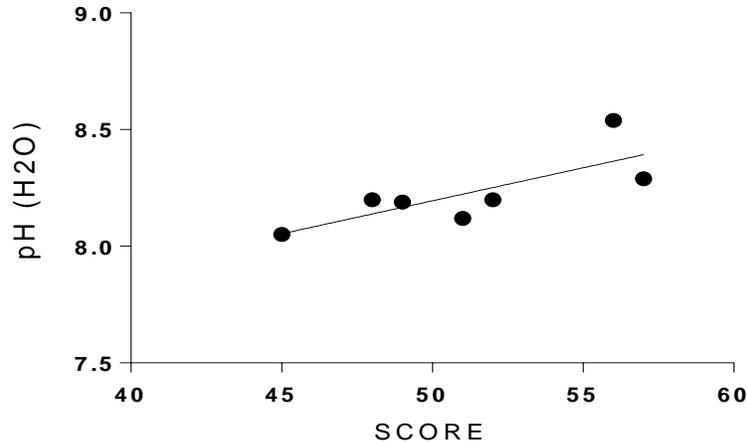
**Tableau 13 :** Activités enzymatiques des 70 isolats

Souche	Ur	Pro	Lip	Chit	Est	Am	Cell	Sco	Souche	Ur	Pro	Lip	Chit	Est	Am	Cell	Sco
BEA1	+	+	+	-	++	+	-	6	BOA6	-	-	-	+	-	+	-	2
BEA2	-	-	+	-	+	+	-	3	BOA7	-	-	-	+	-	+	++	4
BEA3	-	-	+	+	+	+++	+	7	BOA8	-	+	+	+	+	+++	+++	10
BEA4	+	-	+	+	++	+++	++	10	BOA9	-	-	-	-	-	+	-	1
BEA5	-	+	-	++	-	-	-	3	BOA10	-	-	-	+	-	+	+	3
BEA6	+	+	+	-	+	+	-	5	MEA1	+	+	-	+	++	+	+++	9
BEA7	-	-	-	+	+	+	-	2	MEA2	+	+	+	-	++	+	++	8
BEA8	-	-	+	+	+	-	-	3	MEA3	+	-	-	-	-	+	-	2
BEA9	+	-	-	-	-	++	-	3	MEA4	-	++	+	+	++	+	-	7
BEA10	+	-	-	+	-	+	-	3	MEA5	+	-	-	+	-	+	-	3
BEB1	-	+	+	-	-	+++	+	6	MEA6	+	+	-	+++	-	+	+++	9
BEB2	-	-	+	-	+	-	-	2	MEA7	-	+	-	-	-	+	-	2
BEB3	-	-	+	+	++	+++	++	9	MEA8	-	-	+	-	-	+	++	4
BEB4	-	-	+	+	+	+++	+	7	MEA9	+	+	-	-	+	+	-	4
BEB5	-	-	+	-	+	+	+	4	MEA10	-	+	-	+	-	+	-	3
BEB6	+	-	+	+	++	+++	++	10	SEA1	+	+	-	+	+	+++	+	8
BEB7	+	-	+	+	+	-	-	4	SEA2	-	-	+	-	-	+	-	2
BEB8	-	-	+	+	+	-	-	3	SEA3	+	-	-	-	+	+	-	3
BEB9	-	-	+	+	+	++	+	6	SEA4	+	++	-	+	+	++	++	9
BEB10	-	-	+	+	+	+	+	5	SEA5	+	-	-	+	-	+	-	3
BEC1	+	+	-	++	-	++	+++	9	SEA6	+	+++	+	+	+	+++	+	11
BEC2	-	-	-	+	-	+	++	4	SEA7	-	-	-	-	-	+	-	1
BEC3	-	-	-	-	-	+	-	1	SEA8	+	+	-	+	+	+	++	7
BEC4	+	+	++	++	-	++	+++	11	SEA9	-	-	-	+	-	+	-	2
BEC5	+	+	-	++	+	++	++	9	SEA10	-	-	-	-	-	+	+	2
BEC6	-	-	-	+	-	+	-	2	SEB1	+	++	-	+	-	+++	+	8
BEC7	-	-	+	-	-	-	+	2	SEB2	-	-	-	+	-	+	-	2
BEC8	-	-	-	+	-	-	-	1	SEB3	+	-	-	+	+	+	-	4
BEC9	+	+	++	++	-	++	+++	11	SEB4	+	-	+	+	-	++	+++	8
BEC10	-	-	-	+	-	+	-	2	SEB5	-	-	+	-	-	+	-	2
BOA1	-	-	+	-	-	+	+	3	SEB6	-	-	-	+	-	+	++	4
BOA2	+	+	++	+	++	++	++	11	SEB7	+	+	-	+	+	+++	+	8
BOA3	-	-	-	+	-	+	-	2	SEB8	-	-	-	+	-	+	-	2
BOA4	+	+	++	+	++	++	++	11	SEB9	+	+	-	+	+	+++	+	8
BOA5	+	+	+	+	++	++	++	10	SEB10	-	-	+	+	-	+	-	3

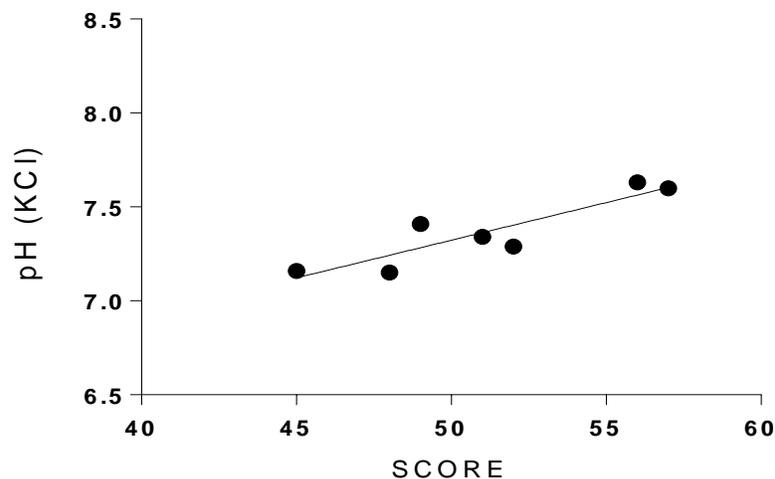
(-) négative, (+) faiblement positive, (++) modérément positive, (+++) hautement positive (Annexe 1). *Ur* : uréase, *Pro* : protéase, *Lip* : lipase, *Chit* : chitinase, *Est* : estérase, *Am* : amylase, *Cell* : cellulase. *Sco* (score) : nombre total des (+) pour une même souche. Les isolats marqués en rouge ont été sélectionnés pour d'autres tests.

## 2.2. Interaction paramètres physicochimiques-activités enzymatiques

L'intensité de l'activité enzymatique des isolats sélectionnés à partir de chaque échantillon de sol était positivement corrélée à leurs valeurs de pH (H<sub>2</sub>O et KCl) respectives. Ainsi, les bactéries produisent plus d'enzymes hydrolytiques lorsque le pH de l'échantillon dont ils sont issus est élevé (figure 31, 32).

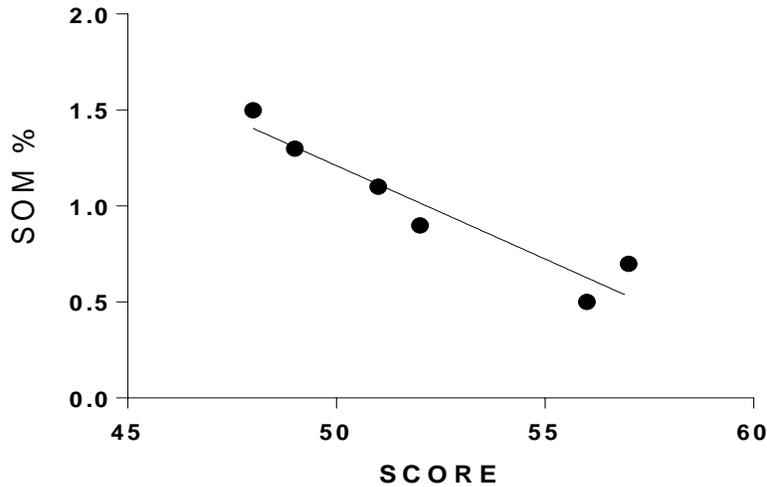


**Figure 29 :** corrélation positive entre les valeurs pH (H<sub>2</sub>O) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes ( $p > 0.05$  ;  $r = 0.7746^{**}$ ).

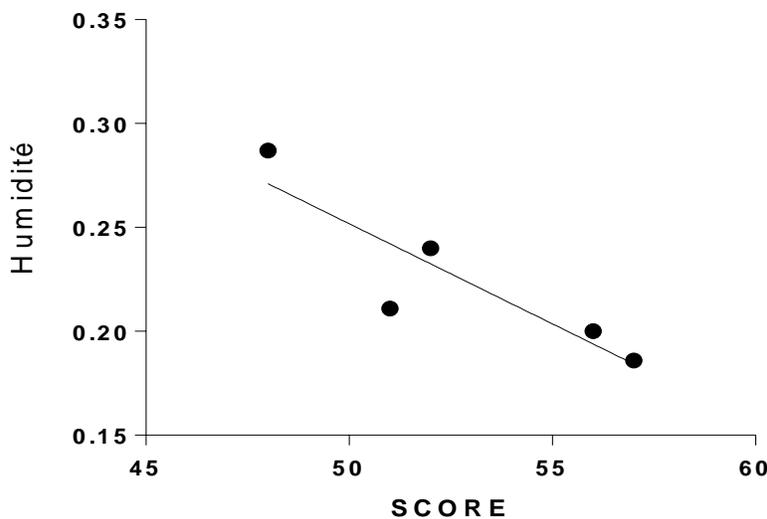


**Figure 30 :** corrélation positive entre les valeurs pH (KCL) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes ( $p > 0.05$  ;  $r = 0.8955^{**}$ ).

Les contenus en matière organique (SOM) des échantillons de sol, à l'exception de l'échantillon BEA, ainsi que leurs contenus humides gravimétriques ( $\theta_g$ ), à l'exception des deux échantillons BEA et SEB étaient négativement corrélés à l'activité enzymatique de chaque groupe d'isolats (figures 33, 34).

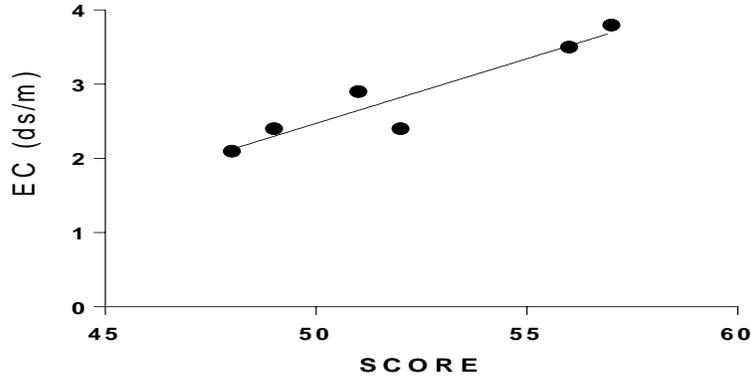


**Figure 31 :** corrélation négative entre les valeurs SOM (%) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes ( $p > 0.05$  ;  $r = - 0.9503^{**}$ ).



**Figure 32 :** corrélation négative entre les valeurs humidité ( $\theta_g$ ) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes ( $p > 0.05$  ;  $r = - 0.8912^*$ ).

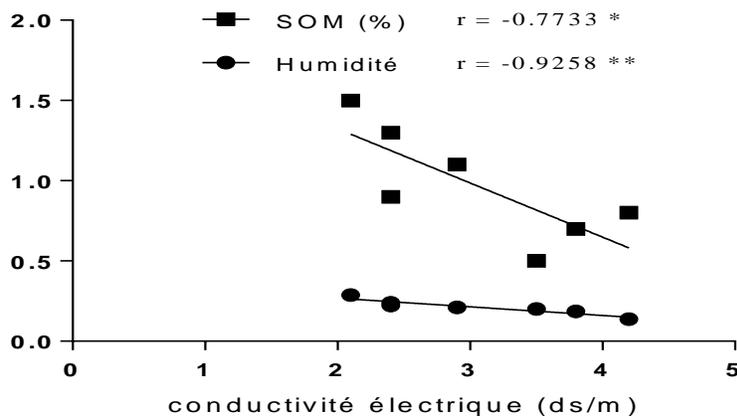
Les conductivités électriques ( $EC_s$ ) de tous les échantillons de sol, à l'exception de l'échantillon BEA, étaient positivement corrélées au score total des activités enzymatiques obtenues avec chaque groupe d'isolat correspondant (Figure 35).



**Figure 33 :** corrélation négative entre les valeurs conductivité électrique (ds/m) des échantillons du sol et le score totale des activités enzymatiques des souches qui leurs sont correspondantes ( $p > 0.05$  ;  $r = - 0.9407^{**}$ ).

### 2.3. Interactions salinité-matière organique et salinité-humidité

Une corrélation négative a été constatée entre les valeurs de la conductivité électrique (EC) des sept échantillons de sol et à la fois leurs contenus humides gravimétriques ( $\theta_g$ ) et leurs contenus en matière organique (SOM %) correspondants. Ainsi, plus la conductivité électrique d'un échantillon augmente, plus son contenu en matière organique et en eau diminue (Figure 36).



**Figure 34 :** corrélation entre les conductivités électriques (ds/m) des échantillons du sol et à la fois leurs contenus en matière organique et en eau (humidité).

Un document publié en janvier 1998 par le service de conservation des ressources naturelles aux Etats Unis (NRCS : *Natural resources conservation service*) indique que les sols caractérisés par des pH allant de 6.6 à 7.3 sont considérés comme neutres. Les sols dont le pH varie de 7.4 à 7.8 sont légèrement alcalins, tandis que ceux ayant des valeurs de pH comprises entre 7.9 et 8.4 sont considérés comme Modérément alcalins. Ceci situe nos échantillons de sol dans les deux catégories neutres et légèrement alcalins.

Le pH affecte considérablement les autres paramètres physiques et chimiques dans le sol. Il influence également ses processus biologiques tel que la fixation de l'azote atmosphérique et la dégradation de la matière organique. Par conséquent, la croissance des cultures agricoles et leur rendement est limitée à des valeurs de pH non convenables. Le pH (KCl) désigne les ions d'hydrogène échangeables dans le sol. Il permet d'avoir une idée théorique du pH « plancher » vers lequel tendent les sols à cause d'un processus d'acidification (Rouiller *et al.*, 1994 ; Niklinska *et al.*, 2005 ; Lapinskas et Motuzienė 2006 ; Rousk *et al.*, 2009).

Dans les analyses microbiologiques, la teneur en humidité d'un sol est généralement rapportée comme le contenu humide gravimétrique ( $\theta_g$ ). Comme son nom l'indique,  $\theta_g$  représente la masse d'eau par unité de masse du sol sec (Pepper et Gerba, 2004). L'humidité d'un sol affecte considérablement sa structure, sa porosité et ses autres paramètres physicochimiques. Elle influence également la croissance des plantes et la biomasse microbienne qui l'entoure (Hagan, 1955).

Le contenu d'un sol en matière organique assure la disponibilité conséquente des éléments minéraux nécessaires pour la croissance végétale et le développement de la biomasse tellurique, constituant un indice majeur de sa qualité (Reeves, 1997). La matière organique d'un sol interagit continuellement avec ses autres propriétés physicochimiques telles que le pH, la salinité et son contenu en eau. Le taux de la matière organique augmente généralement avec l'augmentation de l'humidité d'un sol en raison de la mauvaise aération engendrée par la saturation en eau. D'un autre côté, La salinité élevée et les pH extrêmes réduisent les taux de dégradation de l'humus et, par conséquent, diminuent les apports en matière organique dans le sol (Bot et Benites, 2005).

Ember *et al.* (2014) indiquent que la salinité augmente les taux de décomposition microbienne de la matière organique dans des zones humides à faibles salinité, ce qui est

conforme à la corrélation positive trouvées dans ce travail entre la conductivité électrique (salinité) des échantillons de sol et les activités enzymatiques de leurs souches correspondantes.

Les isolats issus du sol salin (BEA ; CE > 4) ont montré un score enzymatique élevé lorsqu'ils sont testés sur un milieu de culture en absence de stress salin. Malgré ça, ce même échantillon (BEA) a présenté des niveaux élevés en matière organique, ce qui est probablement dû à l'inhibition des enzymes lytiques dans l'environnement salin à partir duquel les isolats sont issus. Eivazi et Tabatabai (1988), García *et al.* (1994) et Batra et Manna (1997) ont montré que les activités des enzymes du sol sont sérieusement réduites par la salinité, affectant le recyclage des nutriments et leur utilisation par les plantes. En général, les enzymes extracellulaires bactériennes dans le sol sont alcalines, contrairement à ceux qui sont libérés par des champignons et des plantes (Bruce, 2005), ceci pourrait expliquer en grande partie la corrélation positive observée entre le pH des échantillons de sol et le score total des enzymes détectées.

La dégradation de la matière organique à travers les activités cataboliques des microorganismes dans le sol est l'un des principaux mécanismes à travers lesquels les bactéries améliorent la croissance des plantes. Les enzymes microbiennes telles que les uréases, les estérases, les lipases, les protéases, les chitinases et les cellulases jouent un rôle majeur dans les processus de transformation biologique de la matière organique. (Glick, 1995 ; Viveros *et al.*, 2010 ; Rana *et al.*, 2012 ; Xun *et al.*, 2015).

L'intérêt des bactéries ayant la capacité de sécréter de telles enzymes extracellulaires lors de leur croissance ne s'arrête pas uniquement à la dégradation de la matière organique dans le sol. Certains sont largement utilisées dans d'autres secteurs biotechnologiques (agroalimentaire, détergents, textile, pharmacie, médecine, biologie moléculaire...etc.) (Carrim *et al.* 2006/Nassira). Certains d'autres telles que les chitinase et les cellulases jouent un rôle clé comme agents de biocontrôle en dégradant les parois des champignons phytopathogènes (Mitchell et Alexander, 1963 ; Sindhu et Dadarwal, 2001).

Kathiresan *et al.* (2011) reportèrent que des bactéries appartenant au genre *Azotobacter* produisent des quantités importantes d'amylases, de cellulases, de lipases, de chitinases et de protéases. D'un autre côté, Ahmad *et al.* (2013) révélèrent que des bactéries du genre *Pseudomonas* synthétisent des protéases, des chitinases, des cellulases et des lipases qui sont

impliquées dans la dégradation de la matière organique dans le sol et dans la suppression des phytopathogènes.

Certaines bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ont la capacité de réduire la croissance des champignons filamenteux en sécrétant des enzymes lytiques telles que les chitinases. L'application de telles bactéries pour la protection biologique des cultures contre les pathogènes, en particulier celles contenant de la chitine dans la structure de leur paroi cellulaire est largement adoptée (Prasad *et al.*, 2015). Kohler *et al.* (2007) ont observé que l'inoculation des plantes de laitue avec *B. subtilis* augmentait significativement les activités uréasiques, protéasiques et phosphatasiques dans la rhizosphère, participant à l'amélioration de la croissance des plantes et l'assimilation des minéraux comme le potassium et le calcium.

L'isolat bactérien MIC 3 s'est montré capable de produire des enzymes lytiques (protéase, amylase, cellulase, chitinase et pectinase) et a présenté une activité antagoniste élevée contre *Fusarium oxysporum* et *Phoma* sp. (Avinash et Rai, 2014). Récemment, Yandigeri *et al.*, (2015) ont rapporté le rôle de l'actinomycète producteur de chitinase (*Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2) dans l'amélioration de la croissance des plantes de tomate et son efficacité comme agent de biocontrôle contre *Rhizoctonia solani*. Dans une expérience sous serre, l'enrichissement du sol en chitine avec la souche S5MW2 a significativement augmenté la croissance des plants de tomates et a considérablement réduit les symptômes induits par le pathogène *Rhizoctonia solani*.

Xu et Kim (2016) ont évalué le rôle de la souche *Paenibacillus polymyxa* SC09-21 productrice de cellulase et de protéase comme agent de lutte biologique contre le mildiou dû au champignon phytopathogène *Phytophthora* sp., ainsi que comme agent stimulateur de la croissance du poivron. Cette souche a significativement réduit la sévérité de la maladie et a augmenté les activités de la phénylalanine ammonia-lyase, de la peroxydase, du polyphénol oxydase et du superoxyde dismutase. La souche SC09-21 a stimulé l'expression des gènes protéiques liés à la pathogénèse dans les plantes inoculées. Singh *et al.* (1999) ont observé que les deux souches bactériennes chitinolytiques *Paenibacillus* sp. 300 et *Streptomyces* sp. 385 peuvent supprimer le flétrissement du concombre causé par *F. oxysporum*.

### 3. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA)

La phytohormone AIA a été produite par toutes les souches testées, sa quantité varie de 76.31 µg/mL pour l'isolat BEA4 à 3.35 µg/mL pour l'isolat BOA2. Les isolats BEC9, BOA4 et SEB9 ont produit des quantités d'AIA de 25.7 ; 47.4 et 32.2 µg/mL, respectivement (Tableau 14). Selon ce test, 14 isolats (BEA3, BEA4, BEB6, BEC4, BEC5, BEC9, BOA4, BOA5, MEA2, MEA4, SEA3, SEA4, SEB7 et SEB9), produisant le plus d'AIA, ont été sélectionnés pour poursuivre le chemin de sélection. La souche MEA2 (5.3 µg/mL) a été sélectionnée prenant en considération son activité enzymatique importante. Similairement, certains isolats producteurs d'AIA ont été écartés en raison de leur faible croissance sur le milieu Jensen ou leur faible capacité de produire des enzymes lytiques.

**Tableau 14** : production d'AIA par les 28 isolats sélectionnés

Souche	IAA (µg/ml)	Souche	IAA (µg/ml)
<b>BEA1</b>	12.3 ± 2.8	<b>BOA5</b>	40.2 ± 5.5
<b>BEA3</b>	38.0 ± 2.7	<b>BOA8</b>	20.3 ± 2.7
<b>BEA4</b>	76.3 ± 7.7	<b>MEA1</b>	11.3 ± 2.6
<b>BEA6</b>	12.3 ± 4.2	<b>MEA2</b>	05.3 ± 2.5
<b>BEB3</b>	15.4 ± 2.8	<b>MEA4</b>	31.4 ± 1.4
<b>BEB4</b>	23.1 ± 4.1	<b>MEA6</b>	07.4 ± 0.0
<b>BEB6</b>	30.3 ± 8.4	<b>SEA3</b>	26.9 ± 1.4
<b>BEB9</b>	05.3 ± 1.3	<b>SEA4</b>	24.3 ± 5.9
<b>BEC1</b>	10.2 ± 4.2	<b>SEA6</b>	03.4 ± 0.8
<b>BEC4</b>	34.2 ± 2.8	<b>SEA8</b>	23.3 ± 2.7
<b>BEC5</b>	34.4 ± 5.9	<b>SEB1</b>	12.7 ± 0.7
<b>BEC9</b>	25.7 ± 2.6	<b>SEB4</b>	08.4 ± 1.2
<b>BOA2</b>	03.3 ± 2.8	<b>SEB7</b>	32.6 ± 5.0
<b>BOA4</b>	47.4 ± 5.6	<b>SEB9</b>	32.2 ± 1.4

En plus d'être la première classe de phytohormones à être identifier, les auxines ont la capacité d'influencer, pratiquement, tous les aspects physiologiques du développement des plantes. L'AIA est une auxin qui agit sur la promotion de la division cellulaire, la dominance

apicale, l'initiation des racines, la différenciation des tissus vasculaires et la modulation des espèces réactives de l'oxygène (Went et Thimann, 1937). Depuis longtemps, l'AIA a été utilisé comme une ligne importante pour sélectionner des bactéries du sol ayant une grande capacité à promouvoir la croissance des plantes (Abd El-Azeem *et al.*, 2007 ; Bakthavatchalu *et al.*, 2012 ; Vacheron *et al.*, 2013 ; Dinesh *et al.*, 2015 ; Etesam *et al.*, 2015).

Tsavkelova *et al.* (2006), Jha et Kumar (2009), Soltani *et al.* (2010) et Kumar *et al.* (2014) ont signalé que les bactéries des genres *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Azotobacter* peuvent produire des quantités importantes d'AIA et favoriser la croissance du blé. D'un autre côté, les souches bactériennes (*Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* et *Azospirillum lipoferum*) ont été utilisées par Sharma *et al.* (2014) pour améliorer la croissance du riz. Les trois bactéries ont montré une aptitude remarquable à produire l'auxine AIA et ont aidé les plantes inoculées à exprimer des pigments photosynthétiques et une teneur en chlorophylle plus élevés. Les trois souches ont également permis d'obtenir une biomasse sèche plus élevée par rapport aux témoins non inoculés.

Une souche de *Pseudomonas putida* (BHUY23) produisait des quantités élevées d'AIA et s'est montrée utile pour l'amélioration du rendement du riz, ainsi que comme agent antagoniste efficace contre les phytopathogènes (Lavakush *et al.*, 2012). Hasan *et al.* (2014) ont confirmé les effets bénéfiques de la coinoculation des deux bactéries productrices d'AIA appartenant aux genres *Rhizobium* et *Azospirillum* sur la croissance du riz. Les deux inocula ont abouti à une augmentation de la longueur des racines et des poids frais/sec des plantes. Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Citrobacter* ont montré une amélioration significative de la croissance racinaire des plantes de riz inoculées. Ces résultats ont été attribués, entre autres, à la production d'AIA par les isolats étudiés (Yadav *et al.*, 2011 ; Habib *et al.*, 2015).

Beyeler *et al.* (1999) ont rapporté qu'une souche génétiquement modifiée de *P. fluorescens* CHA0 (surproductrice d'AIA) était plus efficace comme promotrice de la croissance du concombre que la souche sauvage. A titre d'exemple, la souche mutante CHA0/pME3468 a augmenté le poids frais des racines du concombre de 17 à 36%, par rapport à l'effet de la souche de CHA0 sauvage. Gravel *et al.* (2007) ont constaté que l'application de l'AIA (10 µg ml<sup>-1</sup>) par immersion sur le milieu de croissance ou par pulvérisation sur la partie aérienne des plantules a permis de réduire les symptômes causés par le champignon

phytopathogène *Pythium ultimum* sur des plantes de tomate. En outre, Khan *et al.* (2016) ont rapporté que parmi plusieurs souches bactériennes testées, l'endophyte *B. subtilis* LK14 produisait la plus forte quantité d'AIA (8,7  $\mu$ M) et augmentait significativement la biomasse des racines et des tiges de la tomate. La souche a également amélioré les teneurs en chlorophylle (a et b) dans les plantes inoculées par rapport au témoin.

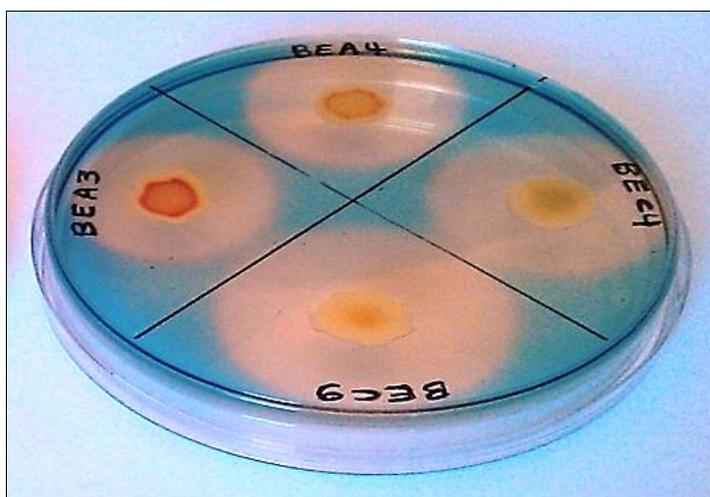
#### 4. Production de sidérophores

A l'exception des trois isolats BEB4, BOA5 et MEA4, toutes les souches testées ont montré un résultat positif sur le milieu à base de CAS-S. Ce test a permis de sélectionner 8 isolats (BEA3, BEA4, BEC4, BEC9, BOA4, SEA4, SEB7 et SEB9) producteurs de sidérophores (Tableau 15 ; Figure 37).

**Tableau 15** : production de sidérophores par les 14 isolats sélectionnés

Souche	Production de sidérophore	Souche	Production de sidérophore
BEA3	+++	BOA5	-
BEA4	+++	MEA2	++
BEB4	-	MEA4	-
BEB6	+	SEA3	+
BEC4	+++	SEA4	+++
BEC9	+++	SEB7	+++
BOA4	+++	SEB9	+++

- : résultat négatif, + : faiblement positif, ++ : modérément positif, +++ : hautement positif (annexe 1).



**Figure 35** : production de sidérophores par les souches BEA3, BEA4, BEC4 et BEC9 après 48heures d'incubation (originale).

En agriculture, la chélation du fer par l'intermédiaire de sidérophores bactériens est un caractère désiré à double intérêt; d'un côté, les sidérophores bactériens constituent une source importante de fer assimilable pour les plantes ; d'un autre côté, la chélation du fer par les PGPR constitue un caractère compétitif pour la colonisation spatiale contre les agents pathogènes des plantes (champignons, bactéries) (Sayyed *et al.*, 2005 ; Höfte et Bakker 2007 ; Miethke et Marahiel 2007 ; Tailor et Joshi 2012). Selon Laslo *et al.* (2011) et Beneduzi *et al.* (2012), les sidérophores peuvent également agir comme un signal stimulateur de la production d'autres métabolites impliqués dans la lutte contre les phytopathogènes. Ajoutant à ça, il a été rapporté que certaines bactéries nécessitent un système intact de sidérophores pour exprimer certaines fonctions vitales telles que la fixation d'azote (Neilands, 1995). Les sidérophores produits par les PGPR peuvent également être impliqués dans la chélation des métaux lourds et par conséquent, dans la stimulation de la croissance végétale sous concentrations critiques en métaux lourds (Islam *et al.*, 2014 ; Gontia-Mishra *et al.*, 2016).

Jusqu'en 2014, plus de 500 molécules de type sidérophore ont été identifiées (Kannahi et Senbagam, 2014). Des bactéries appartenant aux genres *Azotobacter* (Fekete *et al.*, 1983), *Azospirillum* (Tortora *et al.*, 2011), *Pseudomonas* (Tailor et Joshi, 2012), *Agrobacterium* (Rondon, 2004), *Alcaligenes* (Sayyed et Chincholkar, 2010), *Enterobacter* et *Achromobacter* (Tian *et al.*, 2009), *Rhizobium* (Datta et Chakrabarty, 2014), *Bradyrhizobium* (Abd-Alla, 1998) sont connus pour leur rôle potentiel dans la promotion de la croissance de nombreuses cultures à travers la production de sidérophores. Par conséquent, les sidérophores sécrétés par de nombreux PGPR sont considérés comme un trait primordial pour la sélection et l'application de bactéries efficaces dans l'amélioration de la production végétale.

L'isolat indigène *B. subtilis* CTS-G24, producteur d'un sidérophore de type hydroxamate, s'est montré efficace contre le flétrissement et la pourriture sèche des racines causées par les deux champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporium* f. sp. *Ciceri* et *Macrophomina phaseolina* chez le pois chiche (Patil *et al.*, 2014). Dans une autre étude, un pigment jaune-vert (pseudobactine) qui présentait des propriétés typiques d'un sidérophore a été isolé à partir d'une culture en bouillon de la souche *Pseudomonas* B10 cultivée dans un milieu déficient en fer (Kloepper *et al.*, 1980). Dans une expérience sous serre, l'application de la pseudobactine pure ou de la souche B10 en tant qu'inoculum a significativement amélioré la croissance de la pomme de terre par rapport aux témoins traités avec de l'eau. De plus, la

souche B10 et la pseudobactine ont significativement réduit la population fongique dans le rhizoplane des plantes, suggérant que les sidérophores bactériens jouent un rôle crucial dans l'amélioration de la croissance des plantes en séquestrant le fer dans la zone racinaire et par antagonisme vis-à-vis des phytopathogènes. Le rôle des bactéries productrices de sidérophores dans l'amélioration de la croissance de la pomme de terre a également été rapporté par Bakker *et al.* (1986) et Weisbeek *et al.* (1987).

De plus, dans une expérience en culture hydroponique, des sidérophores secrétés par la souche bactérienne *Chryseobacterium* C138 ont montré une grande efficacité comme fournisseurs de fer aux plantes de tomate poussant dans un milieu dépourvu en fer (Radzki *et al.*, 2013). De même, le rôle de la pyoverdine, siderophore fluorescent produit par la souche *Pseudomonas aeruginosa* RBL 101, dans la suppression de la fonte des semis induite par *Pythium* sur des plantes de tomate a été rapporté par Jagadeesh *et al.* (2001). Ainsi, les mutants RBL 1015 et 1011, surproducteurs de sidérophores, ont supprimé les symptômes plus efficacement (75 et 37%, respectivement) que la souche sauvage (12,5%). Dans une autre étude sur sol stérile, Valencia-Cantero *et al.* (2007) ont observé une augmentation significative de la teneur en fer et de la croissance des plantes d'haricots inoculées avec *Bacillus megaterium* UMCV1, *Arthrobacter* spp. UMCV2, *Stenotrophomonas maltophilia* UMCV3 et *S. maltophilia* UMCV4 par rapport aux plantes non inoculées. Dans des études similaires, le rôle des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *S. marcescens* dans l'induction de la résistance chez les légumes tels que le haricot, la tomate, le radis et le concombre contre des phytopathogènes comme *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. orbiculare*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium* est également rapporté. L'induction de ce type de résistance dans les cas précédemment cités nécessite un système de sidérophores bactériens, (Höfte et Bakker, 2007).

Deux souches bactériennes productrices de sidérophores et résistantes aux métaux lourds, à savoir *Enterobacter ludwigii* (HG 2) et *Klebsiella pneumoniae* (HG 3), ont été efficacement utilisées par Gontia-Mishra *et al.* (2016) pour atténuer la toxicité du mercure chez le blé (*Triticum durum*), suggérant leur utilité en tant que candidats potentiels pour l'atténuation du stress dû au mercure et l'amélioration de la croissance du blé. Pandey *et al.* (2013) ont étudié le rôle des deux souches résistantes aux métaux lourds et productrices de sidérophores *Ochrobactrum* sp. (CdSP9) et de *Bacillus* spp. (AsSP9) dans la bioremédiation

du riz. Les deux souches ont montré un potentiel important dans la réduction de l'effet toxique des métaux lourds et l'amélioration de la biomasse globale et le rapport racine/tige des plantes du riz. Dans un travail réalisé par Islam *et al.* (2014), les plantes de blé soumises à des concentrations élevées en zinc ont montré une couleur verte plus intense sur leurs feuilles et un contenu plus élevé en fer une fois inoculés par une souche bactérienne productrice de sidérophores, appartenant au genre *Pseudomonas*. Cette bactérie favorise également la croissance du blé en serre (la biomasse sèche des plantes et des racines ont été améliorées de 23% et 45%, respectivement), cela a été attribué en grande partie à la capacité de cette bactérie à produire une quantité importante de sidérophores.

Rana *et al.* (2012) ont attribué le rôle significatif d'une souche du genre *Providencia* dans la promotion de la biomasse du blé, de son rendement en graines et son teneur en macro- et en micronutriments (NPK) à sa capacité de production des sidérophores, à son activité antifongique et ses interactions synergiques avec d'autres bactéries de la rhizosphère. D'un autre côté, un *Pseudomonas fluorescens* WCS374r s'est avéré impliqué dans l'induction de la résistance systémique du riz contre *Magnaporthe oryzae*. Cette résistance est déclenchée par la pseudobactine (sidérophore), permettant d'initier une réponse de défense polyvalente répressible par l'acide salicylique (De Vleeschauwer *et al.*, 2008). Un autre complexe fer-sidérophore de la souche de *P. fluorescens* s'est révélé impliqué dans l'augmentation de la teneur en phénol et en enzymes oxydant le phénol dans les plantes de riz, induisant une résistance systémique à cette plante contre l'incitation de *Pyricularia oryzae* (Amutharaj *et al.*, 2013). De plus, Naureen *et al.*, (2015) ont utilisé un consortium de bactéries productrices de sidérophores pour améliorer la croissance du riz et induire sa résistance systémique contre le champignon phytopathogène *Rhizoctonia solani*. Dans le cadre de cette étude, Naureen et ses coéquipiers ont montré la forte corrélation entre le pouvoir antagoniste et la production de sidérophores par les bactéries étudiées.

## 5. Solubilisation de phosphate tricalcique

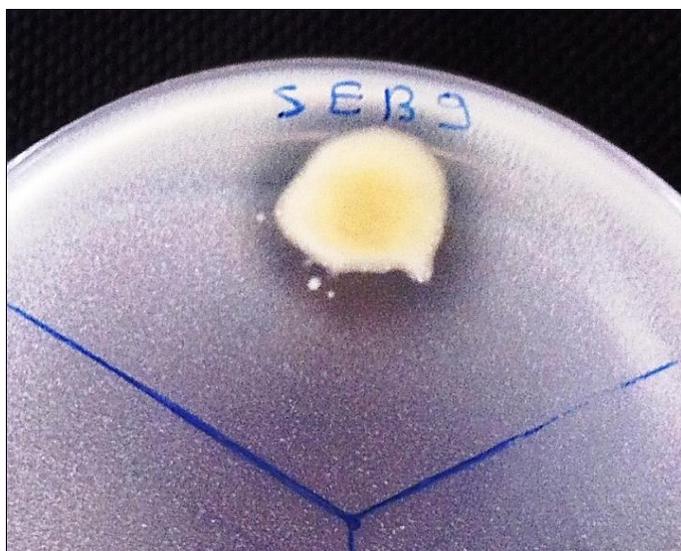
Les isolats BEA4, BEC4, BEC9, BOA4, SEB7 et SEB9 ont montré une capacité à solubiliser le phosphate tricalcique sur le milieu de Pikovskaya avec des indexes de solubilisation qui varient entre 0.36 (BOA4) et 0.83 (SEB7). Les isolats BEA3 et SEA3 n'ont pas été capables de solubiliser le phosphate tricalcique. L'isolat BEC4 a été écarté en raison de

sa faible capacité à croître sur le milieu Jensen par rapport aux autres souches sélectionnées (tableau 16, figure 38).

**Tableau 16** : solubilisation du phosphate tricalcique par les 8 isolats sélectionnés

<b>Solubilisation du phosphate</b>			
	Diamètre de la colonie (cm)	Diamètre de la zone de solubilization (cm)	<b>Index de solubilisation (SI)</b>
BEA3	1.1	1.1	1.00
<b>BEA4</b>	<b>1.1</b>	<b>1.4</b>	<b>0.79</b>
BEC4	0.6	1.0	0.40
<b>BEC9</b>	<b>0.8</b>	<b>2.0</b>	<b>0.40</b>
<b>BOA4</b>	<b>0.9</b>	<b>2.5</b>	<b>0.36</b>
SEA3	1.2	1.2	1.00
SEB7	1.0	1.2	0.83
<b>SEB9</b>	<b>1.3</b>	<b>2.0</b>	<b>0.65</b>

SI = [Diamètre de la zone de solubilization / Diamètre de la colonie] (cm).



**Figure 36** : zone de solubilization du phosphate tricalcique par l'isolat SEB9 sur le milieu de Pikovskaya après 48 h d'incubation (originale).

Parmi la grande diversité des PGPR, les espèces *Achromobacter xylosoxidans* (Ma *et al.*, 2009), *Bacillus polymyxa* (Nautiyal, 1999), *Pseudomonas putida* (Malboobi *et al.*, 2009), *Acetobacter diazotrophicus* (Dutta and Podile, 2010), *Agrobacterium radiobacter* (Leyval et Berthelin, 1989), *Bradyrhizobium mediterraneum* (Peix *et al.*, 2001), *Enterobacter aerogens* et *Pantoea agglomerans* (Chung *et al.*, 2005), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Crespo *et al.*, 2011) et *Rhizobium meliloti* (Krishnaraj et Dahale, 2014) sont connues comme solubilisatrices de phosphate dans le sol et promotrices de la croissance des plantes. Parmi les bactéries non symbiotiques, les bactéries appartenant au genre *Azotobacter* sont considérées comme de potentiels solubilisateurs de phosphate et promoteurs de la croissance végétale (Nosrati *et al.*, 2014).

Kaur et Reddy (2015) ont constaté que l'inoculation du maïs et du blé avec les deux bactéries solubilisatrices de phosphate (BSP) *Pantoea cypripedii* (PSB-3) et *Pseudomonas plecoglossicida* (PSB-5), ainsi que l'utilisation du phosphate rocheux comme fertilisant a permis d'augmenter la taille des plantes et la quantité du phosphate totale absorbé par rapport au témoin. Dans une expérience sous serre, l'application d'une BSP appartenant au genre *Azotobacter*, seule ou avec des engrais chimiques, a significativement amélioré le rendement et la biomasse racinaire de trois variétés de blé (Kumar *et al.*, 2001). De plus, plusieurs travaux ont démontré l'efficacité des BSP telles que *Pantoea*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* et *Serratia* dans la promotion de l'assimilation du phosphate et l'amélioration de la croissance du blé sous différentes conditions (Kumar et Narula, 1999 ; Afzal et Bano, 2008 ; Schoebitz *et al.*, 2013 ; Sarker *et al.*, 2014 ; Kaur et Reddy, 2015). Une expérience *in vitro* a été réalisée par Panhwar *et al.* (2012) afin d'étudier l'effet du phosphate tricalcique et des deux *Bacillus* spp. PSB9 et PSB16 sur la croissance aérobie du riz. Les résultats ont montré que le couple «bactéries-phosphate tricalcique» permet d'améliorer la croissance du riz en facilitant l'assimilation du phosphate par les plantes et en augmentant sa disponibilité dans le sol. Egalement, les deux BSP, identifiées comme *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) et *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) ont montré, dans des expériences en pots, une capacité importante à améliorer la croissance du riz (Stephen *et al.*, 2015). De même, Vahed *et al.* (2012) et Panhwar *et al.*, (2011) ont également discuté le rôle de certaines BSP dans l'amélioration de l'absorption du phosphate et la croissance du riz.

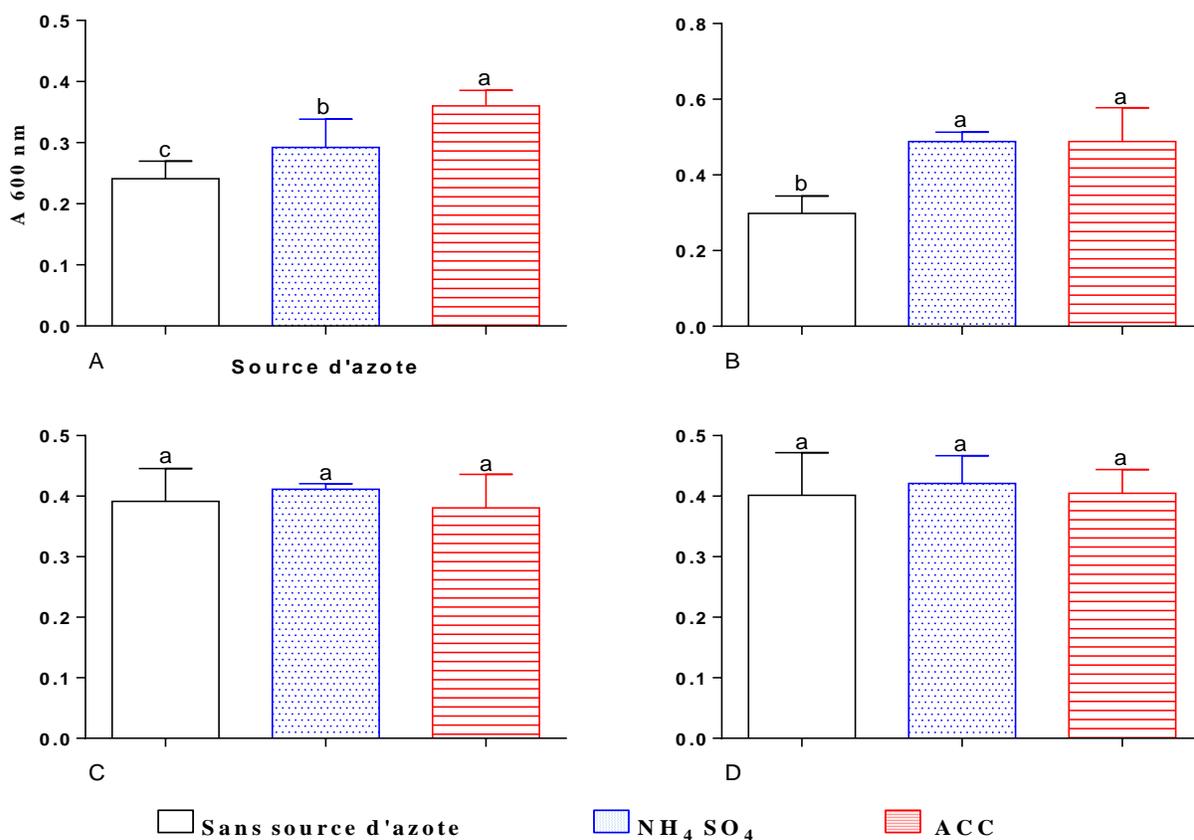
Malboobi *et al.* (2009) ont évalué la performance des trois BSP *Pantoea agglomerans* P5, *Microbacterium laevaniformans* P7 et *P. putida* P13 dans la rhizosphère de pomme de terre. Les trois isolats ont montré un grand pouvoir d'adaptation avec la microflore autochtone de la rhizosphère de la pomme de terre. La combinaison des souches P5 + P13 et P7 + P13 a permis d'obtenir une biomasse et un nombre de tubercules plus élevés sous serre et même sur champ. L'effet positif des BSP (*B. megaterium* var. Phosphatase, *P. agglomerans*, *M. laevaniformans*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *Xanthomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Acidovorans delafieldii*, *Rhizobium* sp., *A. chroococcum* et *Burkholderia anthina*) sur la promotion de la croissance certains légumes (pomme de terre, tomate, poivre, concombre, pois etc.) a été rapporté par Walpola et Yoon (2013), Rizvi *et al.* (2014), Pastor *et al.* (2014) et Bahena *et al.* (2015).

Récemment, plusieurs travaux ont rapportés l'implication des bactéries solubilisatrices de phosphate (BSP) dans la restauration de la croissance des plantes sous stress des concentrations inhibitrices en métaux lourds. Ahemad (2015) publia un travail intéressant sur le rôle des BSP dans la phytoremédiation des métaux lourds. Il rapporta que les associations plantes-BSP permettent de surmonter les inconvénients imposés par le stress dû aux métaux lourds chez les plantes. De plus, Paul et Sinha (2015) ont mené une expérience visant à isoler et à sélectionner des BSP avec une grande capacité à tolérer le stress dû métaux lourds. Ils ont suggéré que l'utilisation de telles bactéries dans les zones contaminées par des métaux lourds pourrait constituer un moyen potentiel dans le domaine de la bioremédiation.

A la fin de cette série de sélection, les quatre isolats choisis (BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9) ont été testés pour leur capacité à produire d'autres métabolites, moléculairement identifiés et conservés afin d'être utilisés dans le reste du travail.

## **6. L'utilisation de l'ACC comme seule source d'azote**

Les quatre souches BEA4, BEC9, et BOA4 SEB9 sont capables de croître en présence de l'ACC comme seule source d'azote. La croissance des deux isolats BEA4 et BEC9 était beaucoup plus rapide en présence de l'ACC et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  qu'en absence d'azote. Cependant, aucune différence significative n'a été détectée dans la croissance des deux souches et BOA4 BEC9 en présence et en absence de l'ACC comme seule source d'azote dans le milieu (Figure 39).



**Figure 37 :** croissance des quatre souches A (BEA4), B (BEC9), C (BOA4) et D (SEB9) en absence et en présence de NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>) ou d'ACC comme seule source d'azote dans le milieu.

En raison de leur capacité à fixer de l'azote atmosphérique, les quatre isolats ont pu croître en absence d'azote. Ainsi, leur croissance remarquée en présence d'ACC n'indique pas nécessairement leur capacité à le dégrader. Cependant, la différence de la vitesse de croissance et de la densité optique obtenues avec les deux souches BEA4 et BEC9 à la fin de l'expérience, en présence et en absence d'ACC, laisse suggérer la capacité de ces deux isolats à utiliser l'ACC comme une source d'azote, facilitant leur croissance sur le milieu utilisé dans cette essai.

L'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase est synthétisée par une large gamme de bactéries rhizosphériques. Cette enzyme permet de diminuer les quantités délétères d'éthylène et d'équilibrer les niveaux de l'acide abscissique (ABA) dans les tissus des plantes stressées (Glick *et al.*, 2007 ; Glick, 2014). L'enzyme ACC désaminase dégrade l'ACC (précurseur direct de l'éthylène) en  $\alpha$ -kétobutyrate et en ammoniac pour fournir de

l'azote et de l'énergie. Conséquemment, l'ACC désaminase abaisse les niveaux d'éthylène dans les tissus stressés (Penrose et Glick, 2003). Il a été démontré que de nombreux stress biotiques (virus, bactéries, champignons et insectes) et abiotiques (sel, métaux lourds, sécheresse et rayonnements etc.) pourraient être soulagés par l'application de bactéries productrices d'ACC désaminase (Shaharoon et al., 2012 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Entre autres, les bactéries du sol appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sinorhizobium*, *Kluyvera*, *Variovorax* et *Paradoxus* ont été rapportées comme ayant la capacité de produire de l'ACC désaminase (Saleem et al., 2007 ; Hao et al., 2010 ; Toklikishvili et al., 2010 ; Barnawal et al., 2012 ; Glick, 2014).

Le rôle bénéfique des bactéries productrices de l'ACC désaminase dans la croissance des légumes est largement rapporté. La souche bactérienne *Mesorhizobium ciceri* LMS-1 est transformée par accouplement triparental avec le plasmide pRKACC contenant le gène ACC deaminase (acdS) issu de la souche *Pseudomonas putida* UW4. Le mutant *Mesorhizobium ciceri* LMS-1 (pRKACC) producteur d'ACC désaminase a significativement augmenté la performance de nodulation de pois chiche et sa biomasse totale par rapport à la souche sauvage LMS-1 (127% et 125%, respectivement). Ces résultats suggèrent que l'utilisation des bactéries productrices d'ACC désaminase pourrait être très importante pour développer des inocula microbiens à des fins agricoles (Nascimento et al., 2012). D'un autre côté, Mayak et al. (2004) ont décrit le rôle d'une souche bactérienne productrice d'ACC désaminase appartenant à l'espèce *Achromobacter piechaudii* dans l'induction de la résistance chez les plantes de tomate sous stress salin. Cette bactérie a réduit de façon significative les niveaux d'éthylène dans les plantes et a augmenté le poids frais/sec de la tomate cultivée en présence de 172 mM NaCl. La bactérie a également augmenté l'efficacité de l'utilisation de l'eau par les plantes par rapport au témoin, suggérant l'utilité de telles PGPR dans l'atténuation du stress salin. De même, il a été constaté que les bactéries halotolérantes et productrices d'ACC désaminase *Brevibacterium iodinum*, *B. licheniformis* et *Zhihengliuella alba* induisaient une amélioration de la croissance et de la tolérance au sel du poivron rouge cultivé sous conditions de stress (Siddikee et al., 2011). L'inoculation des plantes avec *B. licheniformis* RS656, *Z. alba* RS111 et *B. iodinum* RS16 a permis de réduire les niveaux de l'éthylène dans les tissus du poivron à des valeurs respectives de 44, 53 et 57% et a soulagé les effets du stress sur les

plantes inoculées en comparaison au témoin. De nombreuses autres études ont signalé le rôle des PGPR productrices d'ACC désaminase dans l'amélioration du rendement agricole sous différentes contraintes (Husen *et al.*, 2011 ; Ali *et al.*, 2014 ; Belimov *et al.*, 2015). Govindasamy *et al.* (2015) ont rapporté l'effet des rhizobactéries productrices d'ACC-désaminase sur la croissance de blé sous stress dû au cadmium. Les isolats testés ont significativement augmenté l'allongement des racines et minimisé la synthèse de l'éthylène dans les plantules de blé sous concentrations élevées en cadmium. En effet, les souches les plus efficaces (*Pseudomonas* sp. PS 2-3 et *Pseudomonas fluorescens* PS 7-12) ont montré la présence du gène *acdS* codant pour l'ACC désaminase.

Abbas *et al.* (2013) ont obtenu un meilleur rendement et une meilleure teneur en chlorophylle du riz inoculé avec des bactéries productrices d'ACC désaminase sous stress salin par rapport au témoin. De même, les deux souches productrices d'ACC désaminase *Pseudomonas putida* CEN7 et *Pseudomonas fluorescens* CEN8 ont abouti à une augmentation significative de la longueur des racines, montrant un potentiel important dans la colonisation racinaire des plants de riz (Etesami *et al.*, 2014). Ajoutant à ça, l'inoculation par la bactérie productrice d'ACC désaminase *Rhizobium leguminosarum* (SN10) permet d'augmenter la biomasse, la longueur des racines et la teneur en azote chez quatre variétés de riz. De plus, la bactérie a montré une forte réaction de chimiotactisme aux graines du riz et ses exsudats racinaires (Bhattacharjee *et al.*, 2012). De nombreux autres travaux ont également évoqué le rôle des PGPR productrices de l'ACC désaminase, notamment celles appartenant au genre *Pseudomonas*, dans l'amélioration de la croissance du riz sous différentes contraintes telles que la salinité, les inondations et les métaux lourds (Bal *et al.*, 2013 ; Etesami *et al.*, 2014 ; Han *et al.*, 2015). D'un autre côté, des résultats similaires ont été obtenus avec les graines ou les plantes de blé inoculé par des bactéries productrices d'ACC-déaminase telles que *Pseudomonas*, *Serratia* et *Burkholderia* sous conditions de stress (salinité, sécheresse etc.) (Shaharoon *et al.*, 2007 ; Zahir *et al.*, 2009 ; Shakir *et al.*, 2012 ; Hassan *et al.*, 2015 ; Hassan *et al.*, 2016 ; Pande *et al.*, 2016 ; Singh et Jha, 2016).

## 7. Production de l'acide cyanhydrique

L'isolat SEB9 s'est révélé le seul ayant la capacité d'exprimer de l'HCN, le papier Whatman dans les boîtes ensemencées avec isolats BEA4, BEC9 et BOA4 n'a montré aucun virage de couleur (Figure 41).

L'acide cyanhydrique est un métabolite produit par une large gamme d'organismes, y compris des bactéries, des champignons, des plantes et des insectes. Ce métabolite gazeux possède des propriétés toxiques, agissant comme un inhibiteur métabolique général (Kamei *et al.*, 2014). L'HCN est considéré comme un trait important dans la sélection des PGPR, particulièrement ceux recherchés pour être utilisés dans le biocontrôle des phytopathogènes. En effet, le HCN fait partie des composés antifongiques puissants produits par les PGPR, étant impliqué dans la lutte biologique contre les agents pathogènes (Agbodjato *et al.*, 2015) (voir plus de discussion, pages 126-127).

### 8. Production de l'ammoniac

Parmi les quatre isolats testés, seuls BOA4 et BEC9 ont montré un virage de couleur indiquant la production d'ammoniac dans le milieu (figure 40). Des études réalisées par (REF) ont montré que des PGPR appartenant aux genres *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* et *Enterobacter* ont la capacité de produire des quantités importantes d'ammoniac, participant à la promotion de la croissance des plantes, l'amélioration de leur croissance sous stress due aux pathogènes (voir pages 126-127).



**Figure 38 :** production d'ammoniac par les isolats (de gauche à droite) : BEA4 (-), BEC9 (+), SEB9 (-), BEA3 (+), BOA4 (+).

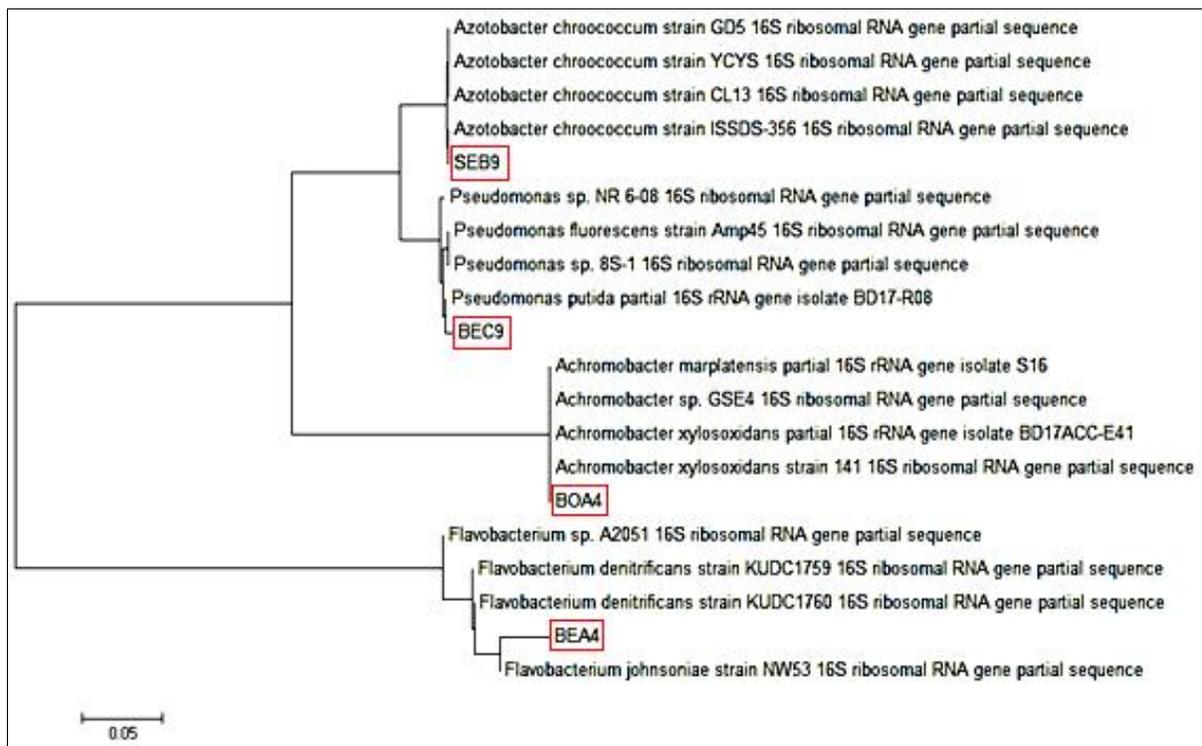


**Figure 39 :** production de l'HCN par les quatre isolats BEA4 (-) ; BEC9 (-) ; BOA4 (-) ; SEB9 (+).

### III. Identification et caractérisation des isolats sélectionnés

#### 1. Identification moléculaire

La comparaison des séquences partielles d'ARN<sub>r</sub> 16S des quatre souches (Annexe 2) avec celles déposées dans les banques de données « *GenBank* » a été réalisée par alignements multiples en utilisant les algorithmes heuristiques BLAST « *Basic Local Alignment Search Tool* ». Les quatre séquences obtenues des souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 ont été à plus de 99% similaires à celles des souches *Flavobacterium johnsoniae*-NW53, *Pseudomonas putida*-BD17-R08, *Achromobacter xylosoxidans*-141 et *Azotobacter chroococcum*-ISSDS-356, respectivement. Le logiciel MEGA 6.06 a été utilisé pour la construction de l'arbre phylogénétique des isolats identifiés en utilisant l'algorithme *Neighbor-Joining* (Figure 42).



**Figure 40 :** arbre phylogénétique construit par l'algorithme *Neighbor-Joining* sur la base de quelques séquences d'ARN<sub>r</sub> 16S obtenues par BLAST. La barre indique 5% de divergence entre les séquences (Annexe 2).

#### 2. Caractères morpho-physicochimiques

Les quatre isolats sont mobile, Gram + et ont une réaction positive au catalase et à l'oxydase. Les résultats des tests de caractérisation morpho-physicochimiques obtenus pour les quatre souches sont récapitulés dans le tableau 17. Repiquées sur le milieu LB, les quatre

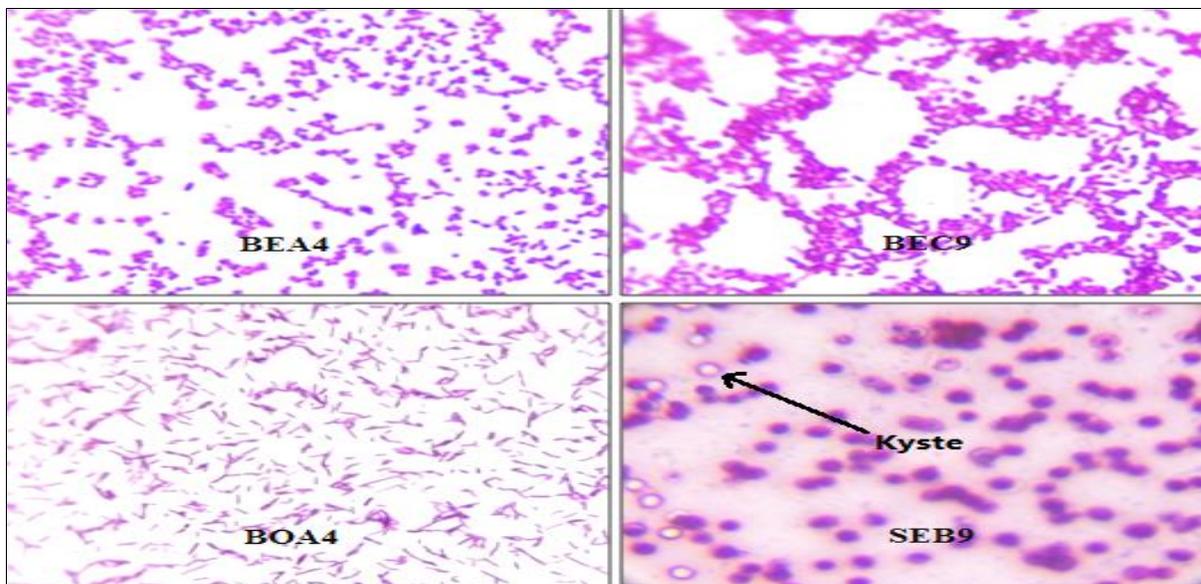
souches donnent des colonies à formes arrondies, légèrement bombées et de couleurs variables. Cependant, les colonies présentent des formes et des couleurs différentes une fois repiquées sur le milieu N-free Jensen. Elles deviennent de couleur blanchâtre, plus muqueuses et poussent en nappes en prolongeant la durée d'incubation (Figures 43, 44, 45). Ce changement de formes est probablement lié à la production d'une quantité considérablement accrue d'exopolysaccharides servant à la protection de la nitrogénase. Ces exopolysaccharides protègent également les bactéries de la dessiccation par modification de leurs microenvironnements en se liant aux cations sodium ( $\text{Na}^+$ ) et sont souvent impliqués dans les cas de stress hydrique (Robertson et Firestone, 1992 ; Becker et Pühler, 1998).

Les critères morfo-physicochimiques étudiés pour les quatre souches coïncident avec les données de la littérature. Ainsi, les souches *F. johnsoniae*, *P. putida*, *A. xylooxidans* sont caractérisées par une forme bacillaire de taille qui varie d'une espèce à l'autre (McBride, 2004 ; Brenner *et al.*, 2005). Les cellules de la souche *A. chroococcum* prennent de multiples formes sur la même lame (pléomorphe) avec présence de kystes (figure x) (Winogradsky, 1938 ; Dhanasekar *et al.*, 2003 ; Kisten *et al.*, 2006 ; Becking, 2006).

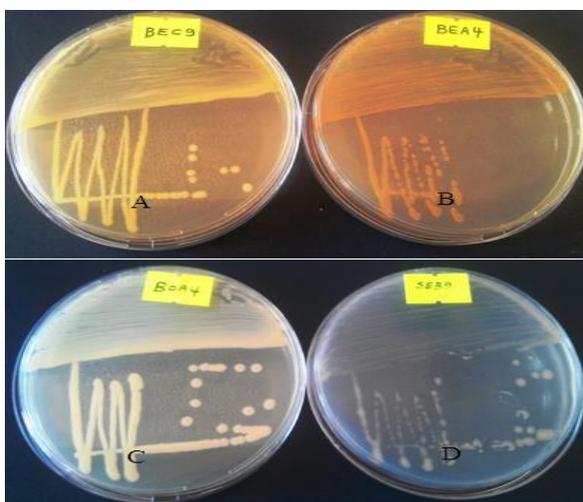
Les espèces appartenant aux genres *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Azotobacter* sont des bactéries Gram négative (Duggan *et al.*, 1996 ; Manfredi *et al.*, 2000 ; Aquilanti *et al.*, 2004 ; Brenner *et al.*, 2005). Aussi, les quatre souches *F. johnsoniae*, *P. putida*, *A. xylooxidans* et *A. chroococcum* se sont révélées mobiles, avec une réaction positive à l'oxydase et au catalase, se concordant avec les travaux de Tchan (1984), Duggan *et al.* (1996), McBride (2004) et Henry et Speert (2011).

**Tableau 17** : Caractères morfo-physicochimiques des quatre souches sur milieu LB

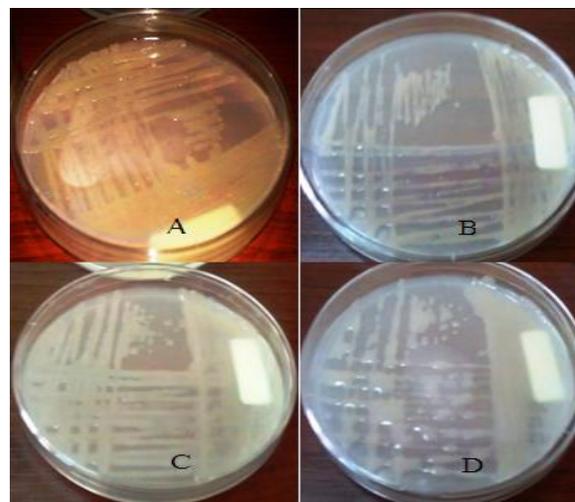
	BEA4	BEC9	BOA4	SEB9
Aspect macroscopique	Arrondies, Aplaties, Oranges-dorées	Bombé, Légèrement verdâtre	Bombé, Blanchâtre, Aspect régulier	Blanchâtre, muqueuse, diffuse
Enkystement	-			+
Forme microscopique	Bacilles			Pléomorphes
Mobilité	+			
Gram	-			
Catalase	+			
Oxydase	+			



**Figure 41** : Aspect des souches après coloration de Gram (*F. johnsoniae*-BEA4 ; *P. putida*-BEC9 ; *A. xylooxidans*-BOA4 ; *A. chroococcum*-SEB9).



**Figure 42** : Aspect, sur milieu LB, des quatre souches (A : *P. putida*-BEC9 ; B : *F. johnsoniae*-BEA4 ; C : *A. xylooxidans*-BOA4 ; D : *A. chroococcum*-SEB9).

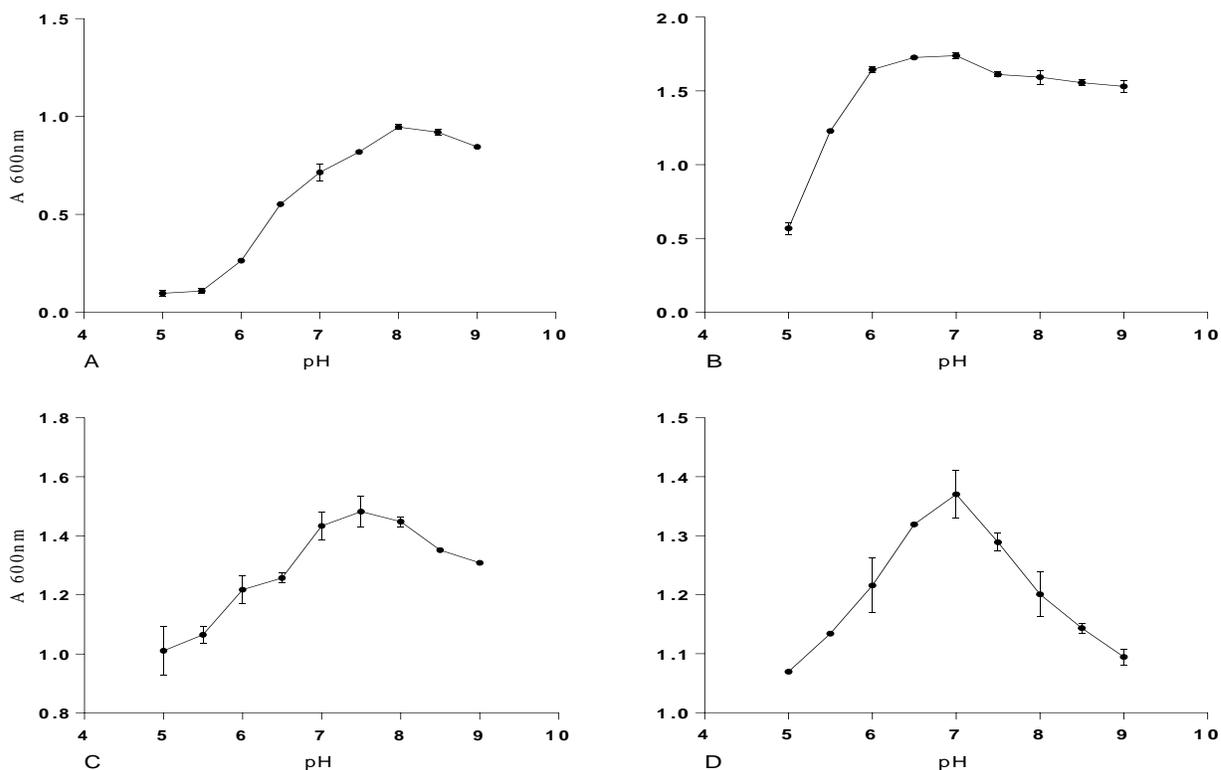


**Figure 43** : Aspect, sur milieu Jensen, des quatre souches (A : *P. putida*-BEC9 ; B : *F. johnsoniae*-BEA4 ; C : *A. xylooxidans*-BOA4 ; D : *A. chroococcum*-SEB9).

### 3. PH optimum de croissance

La souche BEA4, présente une meilleure croissance dans un pH légèrement alcalin 8,00. En deçà et au-delà, on observe une diminution de la croissance. La souche BEC9 est moins sensible aux variations de pH par rapport aux autres souches, elle croit le mieux à un pH situé entre 6,5 et 7. Une meilleure croissance a été observée avec la souche BOA4 à un pH de 7,5. Après cette valeur la croissance bactérienne diminue. Un pH neutre (7,00) favorise le mieux la

croissance de la souche SEB9. Cette dernière est la plus sensible aux variations du pH (figure 46). La croissance des souches s'est révélée meilleure sur une gamme de pH variant de 6.5 à 8, avec un optimum de pH aux alentours de la neutralité. Goodfellow et Williams (1983) ont montrées que la plupart des bactéries du sol préfèrent les pH neutres et légèrement alcalins ce qui est en corrélation avec nos résultats ainsi que les résultats obtenus lors de l'étude des propriétés physicochimiques des échantillons du sol à partir desquels les souches ont été isolées (Tableau 12).



**Figure 44 :** Détermination du pH optimum de la croissance souches A : *F. johnsoniae*-BEA4 ; B : *P. putida*-BEC9 ; C : *A. xylosoxidans*-BOA4 ; D : *A. chroococcum*-SEB9.

Les souches *F. johnsoniae*-BEA4, *P. putida*-BEC9 et *A. xylosoxidans*-BOA4 peuvent croître sur une large gamme de pH allant de 6,5 à 9. Des valeurs similaires ont été constatées chez d'autres souches appartenant aux mêmes espèces ou d'espèces voisines (McMahon *et al.*, 2007 ; Chávez-Parga *et al.*, 2012 ; Elsayed et El-Nady, 2013 ; Sreedevi *et al.*, 2013). D'après notre étude, la souche *Azotobacter chroococcum*-SEB9 croît sur une gamme de pH très étroite ce qui est confirmé avec d'autres souches de cette même espèce dans des travaux réalisés par Lees et Postgate (1973), Hine et Lees (1976), Pozo *et al.* (2002) et Kisten *et al.* (2006).

Les PGPR peuvent affecter la croissance des plantes à travers plusieurs mécanismes. Dans la première partie de ce travail, nous avons établi une sélection hiérarchique sur la base de certaines propriétés connues pour leurs rôles potentiels en agriculture telles que la fixation d'azote, les activités cataboliques (uréase, protéase, lipase, chitinase, estérase, amylase et cellulase), la production de l'AIA, de sidérophores et la solubilisation de phosphate, ceux-ci dans le but d'isoler des bactéries diazotrophes ayant la capacité de promouvoir la croissance des plantes. Quatre souches bactériennes BEA4-*Flavobacterium johnsoniae*, BEC9-*Pseudomonas putida*, BOA4-*Achromobacter xylosoxidans* et SEB9-*Azotobacter chroococcum* ont été sélectionnées en utilisant cette méthode.

Nos résultats concernant le test de production de l'AIA sont conformes aux résultats obtenus dans d'autres travaux. Rubio *et al.* (2000), Tsavkelova *et al.* (2006), Jha et Kumar (2009), Soltani *et al.* (2010) et Kumar *et al.* (2014) ont rapporté que les genres *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Azotobacter* peuvent produire des quantités importantes d'AIA, favorisant la croissance des plantes.

D'autres travaux ont montré que les espèces bactériennes *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter chroococcum* et *Achromobacter xylosoxidans* produisent des sidérophores, étant impliqués dans la promotion de la croissance d'une large gamme de cultures agricoles (Suneja *et al.* 1996 ; Hynes *et al.* 2008 ; Moretti *et al.* 2008 ; Sgroy *et al.* 2009 ; Tian *et al.* 2009 ; Ahmed et Kibret, 2014).

Dutta et Podile (2010) ont mis en évidence, dans un article de synthèse, la capacité de certaines souches bactériennes appartenant aux espèces *Achromobacter xylosoxidans*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas putida* et *Flavobacterium johnsoniae* à solubiliser diverses formes de phosphate inassimilables par les plantes, facilitant ainsi leurs croissance et minimisant l'utilisation accrue des fertilisants chimiques.

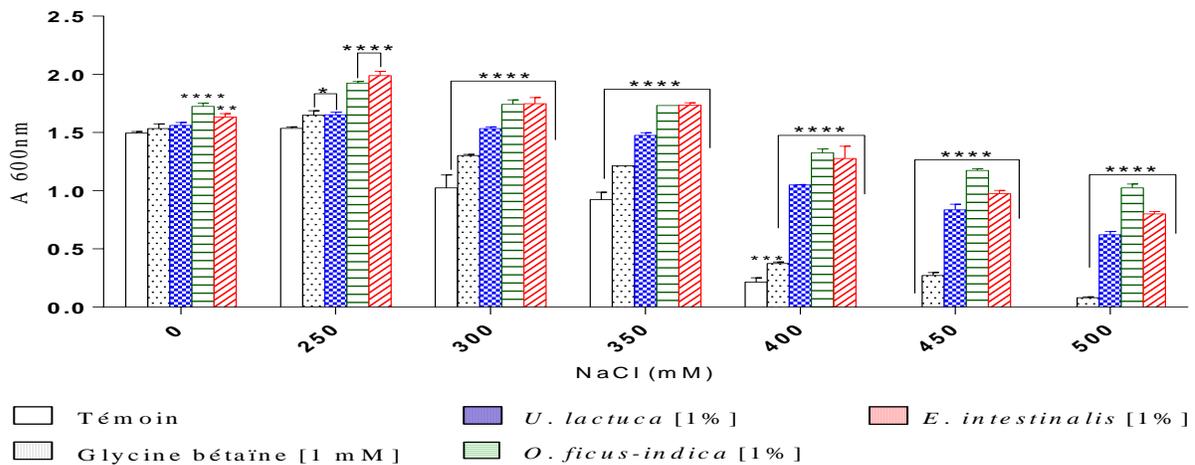
Tous les caractères précédemment discutés (fixation de N, enzymes hydrolytiques, synthèse IAA, solubilisation de phosphate, dégradation de l'ACC et production de sidérophores) sont impliqués, directement ou indirectement, dans l'amélioration de la tolérance des plantes au stress salin (Egamberdieva, 2009 ; Walpola et Arunakumara, 2010 ; Kizildag *et al.*, 2012 ; Shrivastava et Kumar, 2015).

#### IV. Halotolérance des isolats sélectionnés

L'halotolérance des isolats a été étudiée sur les deux milieux de culture LB (milieu riche) et NF-b (milieu minimum à composition déterminée). En absence de glycine bêtaïne et d'extraits étudiés, le milieu LB confère plus de protection aux bactéries contre le stress salin que le milieu NF-b. Généralement, les différents traitements (Glycine bêtaïne et extraits) confèrent une halotolérance aux bactéries sous concentrations élevées en NaCl. En absence de stress salin, aucune des souches testées n'a été négativement affecté par l'ajout de glycine bêtaïne (GB) ou d'extraits de *O. ficus indica* (OFI), *U. lactuca* (UL) ou *E. intestinalis* (EI).

##### 1. Extrait ajoutés au milieu NF-b

La souche s'est BEA4 avérée la plus halotolérante. Sur milieu NF-b et en absence de glycine bêtaïne et d'extraits, elle a pu visiblement croître jusqu'à une concentration de 400 mM NaCl. Cela peut être dû à la salinité relativement élevée de l'échantillon du sol à partir duquel elle a été isolée ( $EC > 4$ ). Comparée aux autres traitements, la glycine bêtaïne était la moins efficace au-delà de 400 mM NaCl.

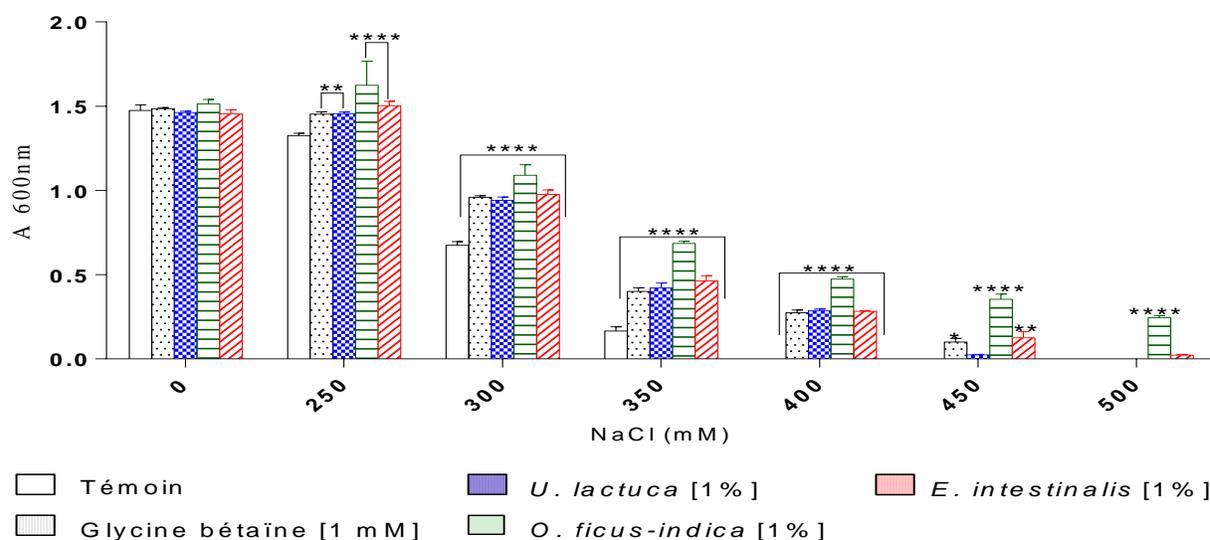


**Figure 45 :** effet de la glycine bêtaïne des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche BEA4 sur le milieu de culture NF-b. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

Les deux extraits *Opuntia ficus-indica* (OFI) et *Enteromorpha intestinalis* (EI) ont montré un effet stimulateur de la croissance de la souche BEA4 en absence de stress salin (la croissance de la souche a été améliorée avec 15 et 9 % en présence des deux extraits OFI et EI, respectivement). La croissance de la souche a été restaurée jusqu'à 8, 25 et 30% à 250 mM

NaCl en présence des extraits de OFI, UL et EI, respectivement. D'un autre côté, 387, 493 et 515% de la croissance a été restaurée à 400 mM de sel en présence des extraits UL, EI et OFI, respectivement (figure 47).

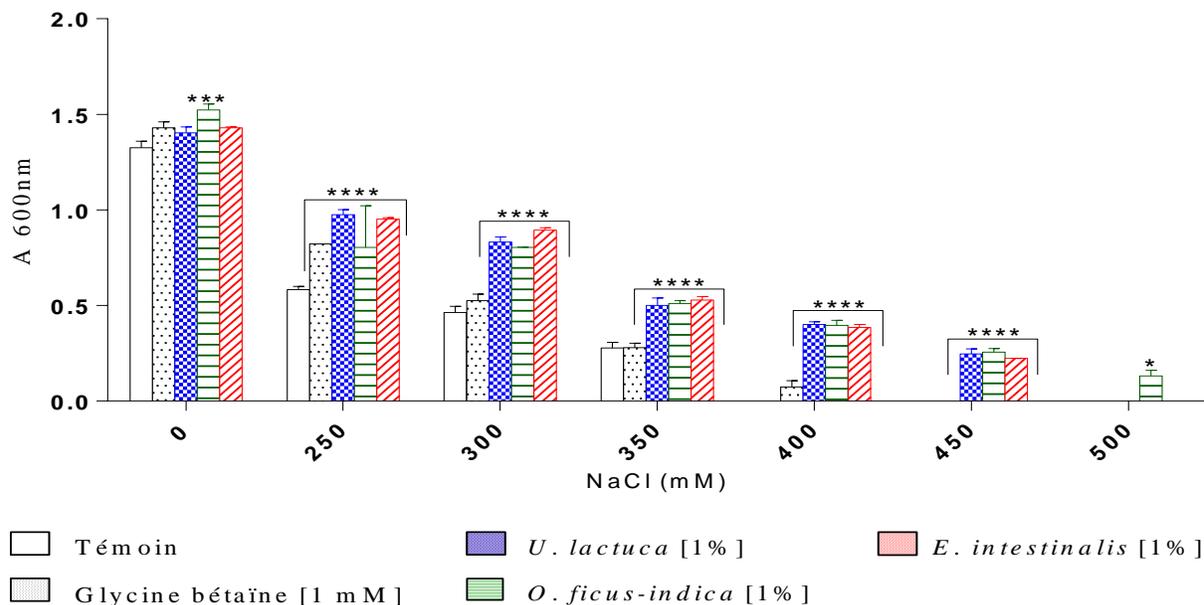
La souche BEC9 a pu croître sur le milieu NF-b jusqu'à 350 mM NaCl. La meilleure croissance a été obtenue avec l'extrait d'OFI à 250 mM NaCl. Entre 300 et 400 mM NaCl, la glycine bêtaïne et les trois extraits OFI, UL et EI ont montré un effet stimulateur de la croissance de la souche BEC9. Ainsi, la croissance de la souche s'est améliorée de 10, 23, 10 et 13 % (250 mM NaCl) et 42, 61, 39 et 45 % (300 mM NaCl) en présence de la GB, OFI, UL et EI, respectivement. Également, l'ajout de l'extrait OFI au milieu de culture a apporté une meilleure protection contre le stress salin par rapport aux autres traitements. Cet extrait a permis de restaurer 314% de la croissance du témoin à 350 mM NaCl et d'obtenir une croissance positive jusqu'à 500 mM NaCl (figure 48).



**Figure 46 :** effet de la glycine bêtaïne des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche BEC9 sur le milieu de culture NF-b. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

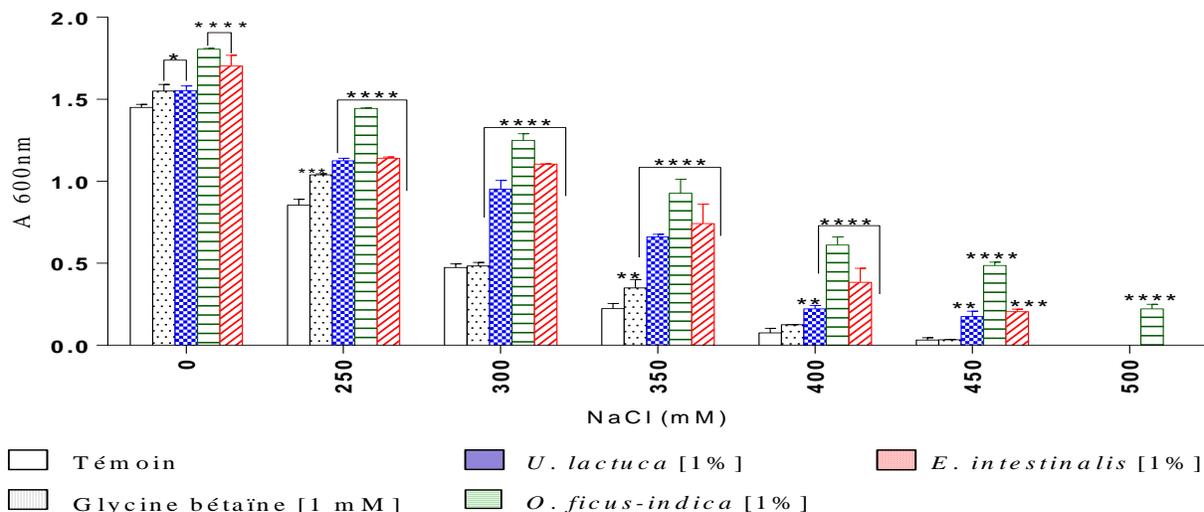
Concernant la souche BOA4 et contrairement aux extraits OFI, UL et EI, la présence de la glycine bêtaïne dans le milieu n'a apporté aucune différence significative à partir de 300 mM NaCl par rapport au témoin. L'extrait OFI a montré le meilleur effet sur la croissance de la souche BOA4, ceux-ci même en absence de stress salin. En présence de stress salin, seul l'ajout de l'extrait OFI au milieu a permis à l'isolat de survivre à une concentration de 500 mM

NaCl. Les trois extraits (OFI, UL et EI) ont permis de restaurer (65, 67, 87%) et (67, 58, 73%) de la croissance de la souche BOA4 à 300 et à 350 mM NaCl, respectivement. De plus, les trois extraits ont pu restaurer la croissance de cet isolat à 400 et 450 mM NaCl (Figure 49).



**Figure 47** : effet de la glycine bétaïne des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche BOA4 sur le milieu de culture NF-b. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

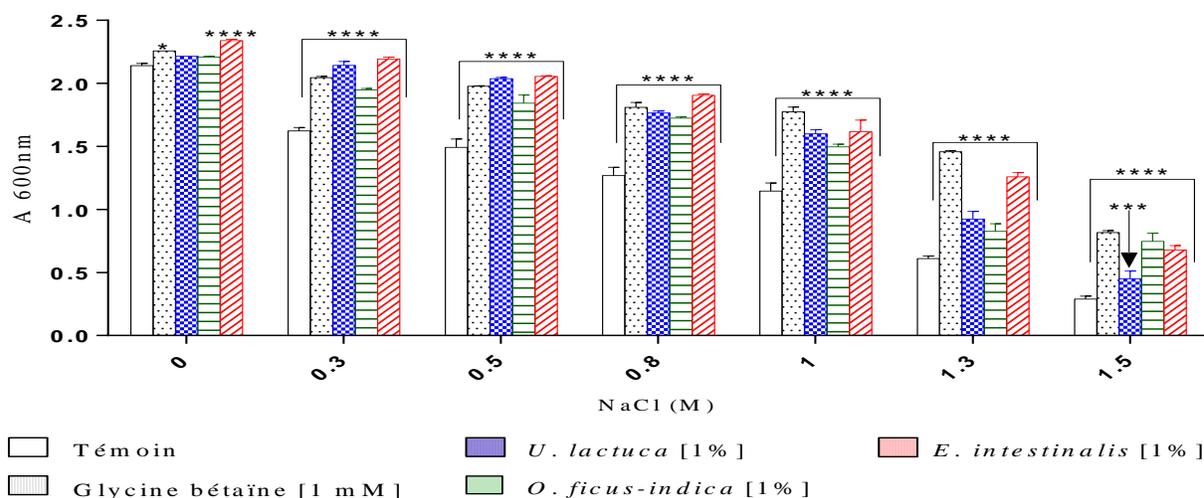
En absence de stress salin, la GB ainsi que les trois extraits OFI, UL et EI ont montré un effet stimulateur de la croissance de la souche SEB9. De même qu'avec la souche BOA4, l'extrait d'OFI a permis d'améliorer significativement la croissance de la souche SEB9 à 00 mM NaCl. Egalement, l'effet des trois extraits est meilleur que celui de la GB en présence de stress salin. La croissance de la souche est complètement inhibée à partir de 350 mM de sel en absence des quatre traitements. Cependant, la présence de la GB a permis de restaurer sa croissance jusqu'à 400 mM NaCl. Les trois extraits OFI, UL et EI ont montré un effet stimulateur de la croissance de la souche SEB9 en présence de concentrations élevées en sel. Ainsi, sa croissance a été restaurée de (31, 100, 195, 192 et 447%) en présence d'UL, de (33, 132, 232, 406 et 538%) en présence d'EI et de (69, 163, 314, 708 et 1414%) en présence d'OFI à (250, 300, 350, 400 et 450 mM NaCl), respectivement. Parmi tous les traitements, OFI est le seul qui a permis de restaurer la croissance de la souche SEB9 à 500 mM de sel (figure 50).



**Figure 48 :** effet de la glycine bêtaïne et des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche SEB9 sur le milieu de culture NF-b. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

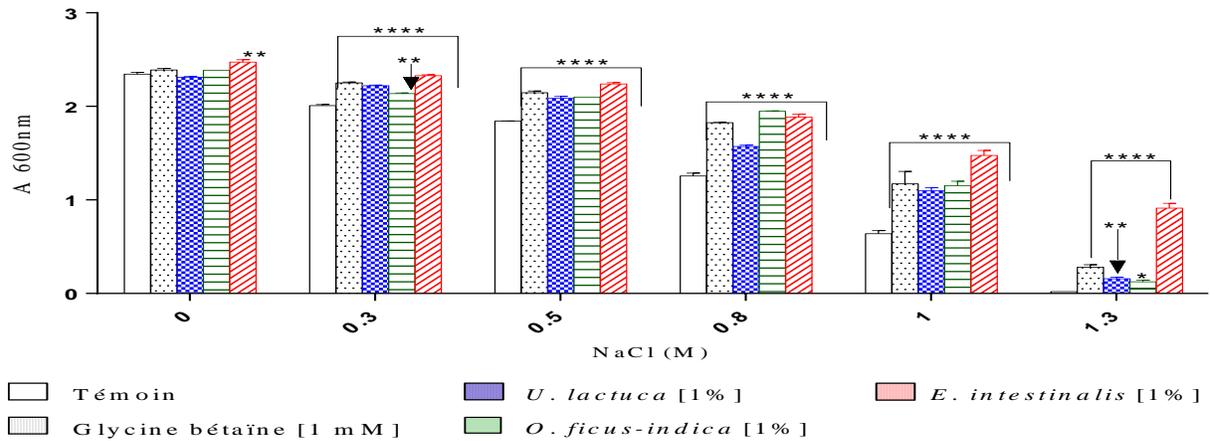
## 2. Extrait ajoutés au milieu LB

Comme sur le milieu NF-b, la souche BEA4 s'est montrée la plus tolérante au sel sur le milieu LB. Elle a pu tolérer jusqu'à 1500 mM NaCl en absence d'extraits ou de glycine bêtaïne dans le milieu. L'ajout de ces derniers a significativement ( $p < 0.0001$ ) amélioré la croissance de cette souche à toutes les concentrations de sel testées (figure 51).

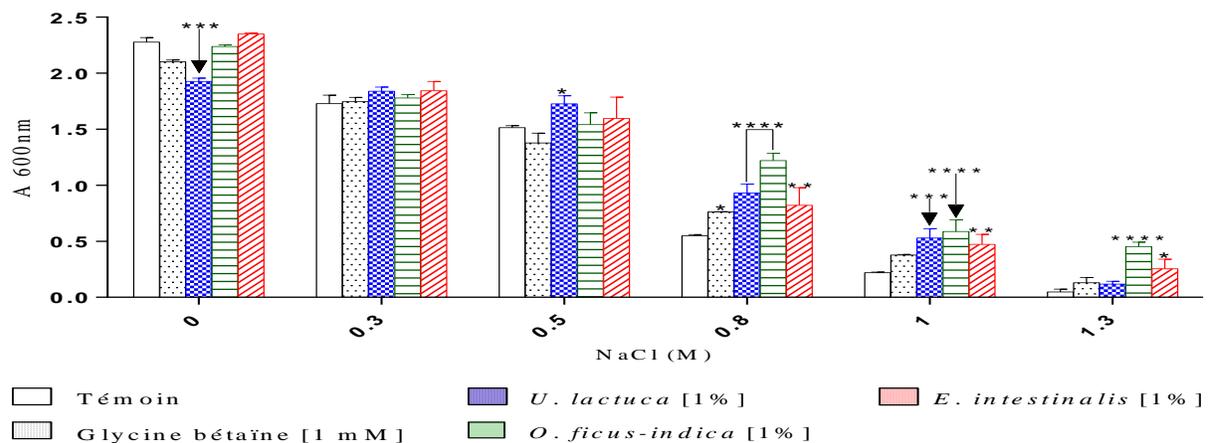


**Figure 49 :** effet de la glycine bêtaïne et des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche BEA4 sur le milieu de culture LB. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

Concernant la croissance des souches BEC9 et BOA4, elle est pratiquement inhibée au-delà de 1000 mM NaCl. En absence de stress salin, seul la présence de l'extrait OFI a permis de restaurer la croissance de la souche BEC9. Tous les traitements (GB, UL, EI et OFI) ont apporté un effet bénéfique sur la croissance de ce même isolat à toutes les concentrations testées. L'extrait OFI semble avoir le meilleur effet sur la croissance de la souche BEC9 à 1.3 M NaCl (4576% de la croissance du témoin a été restaurée). A cette même concentration de sel, l'extrait EI a permis de restaurer 850% de la croissance de l'isolat BOA4 par rapport au témoin (Figures 52, 53).

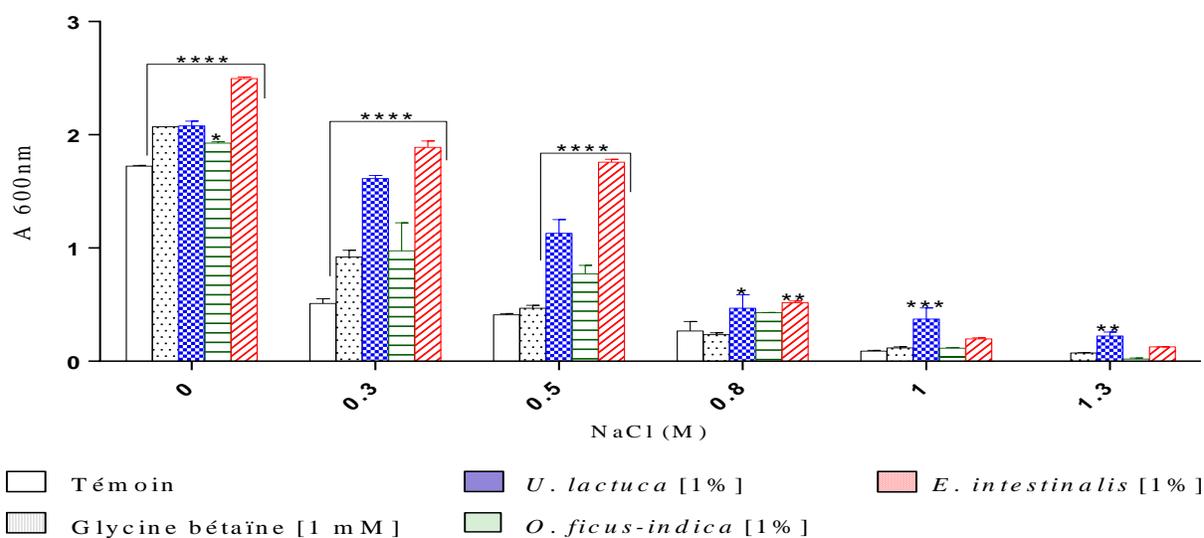


**Figure 50 :** effet de la glycine bêtaïne et des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche BEC9 sur le milieu de culture LB. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 51 :** effet de la glycine bêtaïne et des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche BOA4 sur le milieu de culture LB. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

La souche SEB9 semble être la plus sensible au stress salin, sa croissance en absence de GB ou d'extraits est fortement inhibée à partir de 300 mM de sel. A l'exception du traitement GB-500 mM NaCl, tous les traitements ont apporté un effet stimulateur de la croissance de cet isolat jusqu'à 500 mM de sel. Cependant, seuls les deux extraits UL et OFI ont amélioré la croissance de l'isolat SEB9 à 0.8 M NaCl et seul l'extrait UL a significativement amélioré sa croissance à 1 et 1.3 M NaCl. A 500 mM de sel, les extraits (UL, EI et OFI) ont permis de restaurer la croissance de l'isolat à des valeurs respectives de (216, 108, 270%) et (176, 230, 329%) en présence 0.3 et 0.5 M NaCl. L'ajout de l'extrait UL au milieu a permis de restaurer 318% de la croissance de la souche SEB9 à 1000 mM de sel (Figure 54).



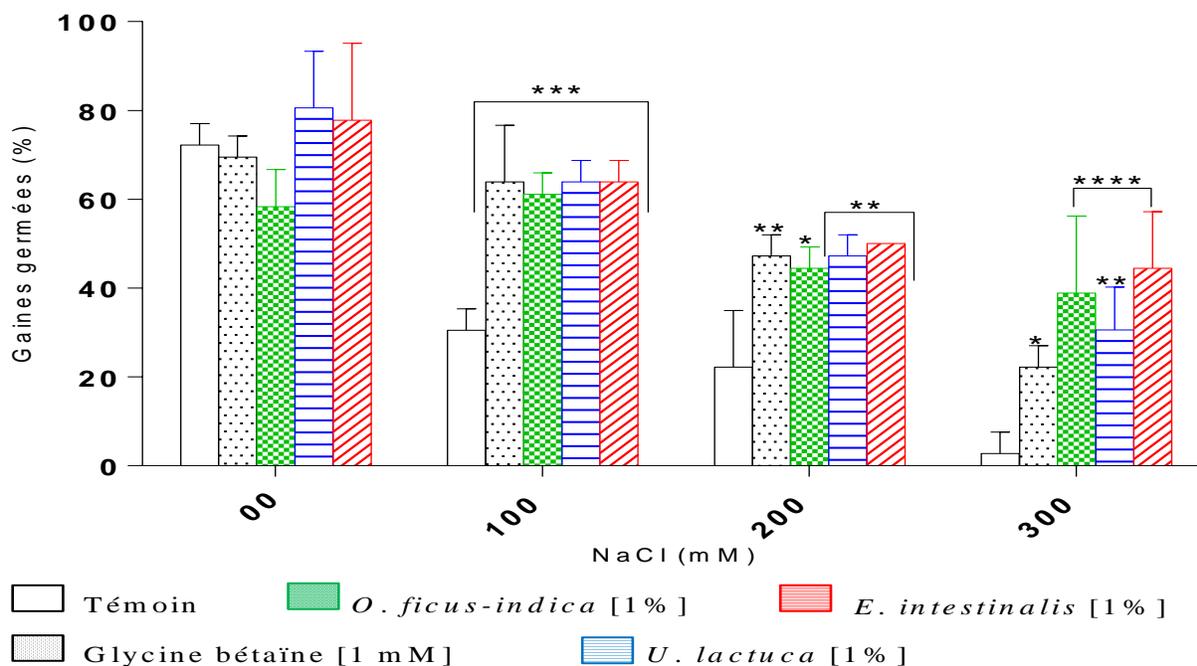
**Figure 52 :** effet de la glycine bétaïne et des extraits de : *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Opuntia ficus-indica* sur l'halotolérance de la souche SEB9 sur le milieu de culture LB. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

## V. Germination des graines de blé, effet des souches et/ou extraits

### 1. Effet des extraits

En absence de stress salin, aucun des traitements (GB, UL, EI, OFI) n'a apporté un effet stimulateur de la germination des graines de blé. Les deux extraits UL et EI ont légèrement augmenté le taux de germination de 72% à 81 et 77%, respectivement. Cependant, les trois extraits, ainsi que la GB, ont montré un effet stimulateur de la germination des graines à toutes les concentrations de sel testées. La GB et les trois extraits OFI, UL et EI ont significativement amélioré le taux de germination finale des graines de blé à 100, 200 et 300 mM NaCl. La GB a

permis de restaurer le pourcentage de germination de (31, 22 et 3%) à (64, 47 et 22%) sous les trois concentrations respectives de (100, 200 et 300 mM NaCl). Les trois extraits (OFI, UL et EI) ont permis d'augmenter le taux de germination de 31% à (61, 64 et 64%), de 22% à (44, 47 et 50%) et de 3% à (39, 31 et 44%) à 100, 200 et 300 mM NaCl, respectivement. A 300 mM de sel, les deux extraits UL et OFI ont montré un meilleur effet sur la germination des graines, avec une différence significative à  $p < 0.0001$  (Figure 55).

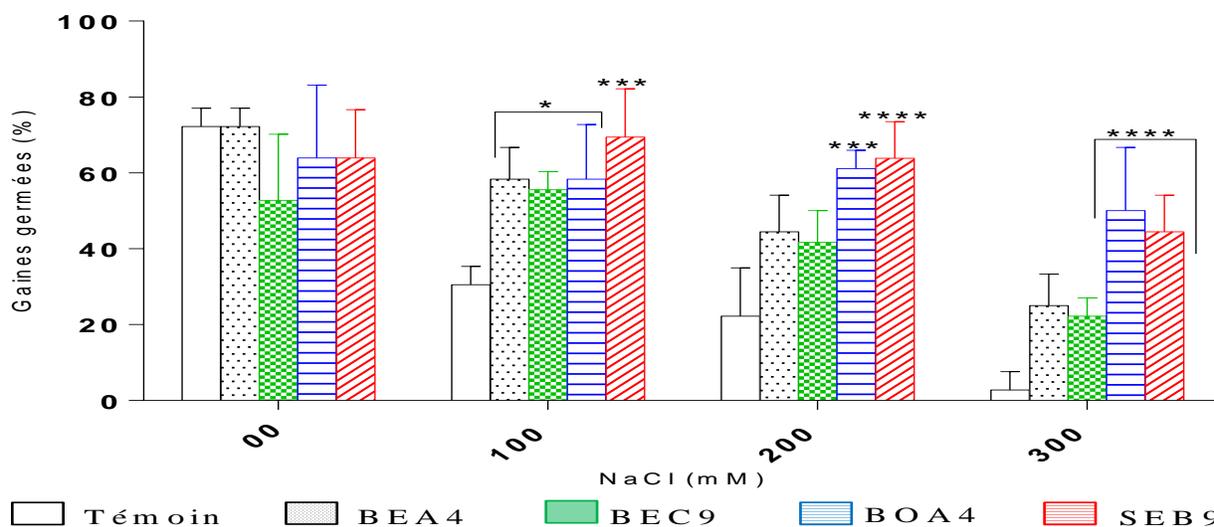


**Figure 53 :** effet de la glycine bêtaïne et des extraits aqueux de : *O. ficus-indica*, *U. lactuca* et *E. intestinalis* sur la germination des graines de blé dur sous stress salin. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ); \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ); \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

## 2. Effet des souches

En absence de stress salin, aucune des souches bactériennes BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 n'a affecté le taux de germination final des graines de blé (aucune différence significative par rapport au témoin). A 100 mM de sel, les trois souches BEA4, BEC9 et BOA4 ont montré un effet positive sur la germination des graines avec une différence significative à  $p < 0.001$ . A cette même concentration, la souche SEB9 semble être la plus efficace dans l'atténuation du stress salin. Seules les deux souches BOA4 et SEB9 ont montré une différence significative à 200 et à 300 mM de sel par rapport au témoin. En présence des quatre isolats BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9, Le pourcentage final de germination des graines

a sauté de 31% à (58, 56, 58 et 69%), de 22% à (44, 42, 61 et 63%) et de 3% à (25, 22, 50 et 44%) sous les concentrations 100, 200 et 300 mM NaCl, respectivement (Figure 56).



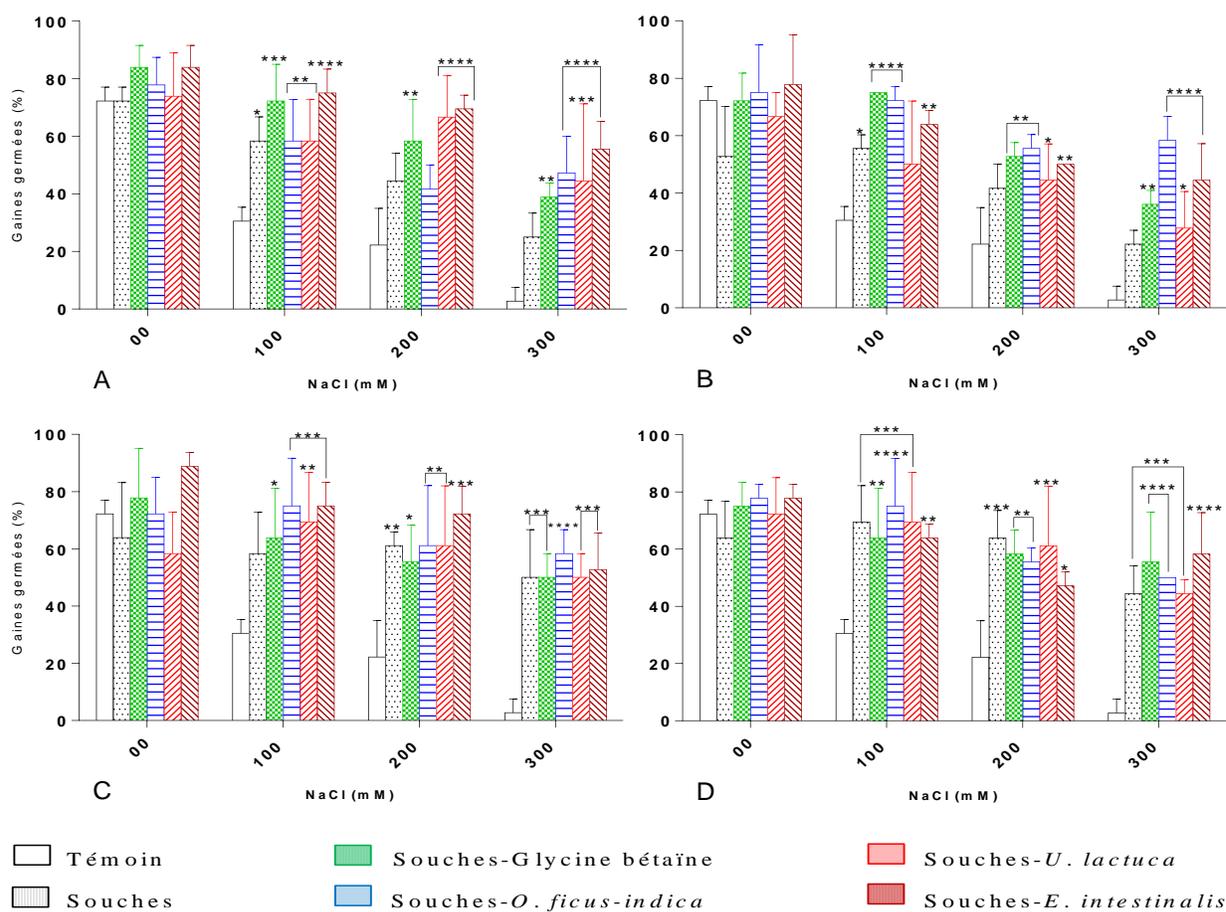
**Figure 54 :** effet des souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 sur la germination des graines de blé dur sous stress salin. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

### 3. Effet de l'association Souche-Extrait

En absence de stress salin, l'association BEA4-GB a permis d'améliorer le pourcentage final de germination des gaines de 72 et 69% en présence de BEA4 et GB séparément, à 83% en présence des deux ensembles. Egalement, un effet de synergie a été noté entre l'extrait EI et la souche BEA4 à 100 Mm NaCl. Ainsi, le pourcentage de graines germées en présence de BEA4 et EI est de 58 et 64%, respectivement. Cependant, l'association BEA4-EI a permis de d'obtenir 75% de succès. A 200 mM NaCl, les deux associations BEA4-UL et BEA4-EI ont permis d'obtenir un succès de germination de 67 et 96%, respectivement, alors que les effets respectifs séparés des trois traitements BEA4, UL et EI était de 44, 47 et 55%. D'un autre côté et à 300 mM de sel, l'ajout des extraits OFI, UL et EI après bactérisation des graines avec la souche BEA4 a permis de restaurer le taux final de germination de 38, 30 et 44% à 47, 44 et 56%, respectivement, alors que l'effet de la souche BEA4, sans ajout d'extrait, a permis d'obtenir succès de germination de seulement 25% à cette même concentration de sel.

A 300 mM de sel, L'effet combiné de la souche SEB9 avec l'extrait OFI a permis d'améliorer le taux final de germination de 22%, en présence de SEB9 seule, et de 39%, en présence OFI seul, à 58% en présence des deux ensemble.

En absence de stress salin, l'effet de l'association BOA4-OFI a permis d'augmenter le succès de germination de 88 et 75% à 0 et 100 mM NaCl. Cependant le taux de germination des graines en présence des deux traitements BOA4 et OFI séparément étaient de (63, 58%) et (58, 61%) en présence de ces mêmes concentrations en sel, respectivement. Aucun effet de synergie n'a été constaté entre les effets séparés de GB, OFI, UL et EI et celui de la souche SEB9 à toutes les concentrations de sel testées. A 300 mM de sel, les différents traitements BEA4-OFI, BEA4-EI, BEC9-OFI, BOA4, BOA4-OFI, BOA4-UL, BOA4-EI et SEB9-OFI ont permis d'améliorer, significativement, le pourcentage final de germination des graines par rapport à l'osmoprotecteur synthétique GB. Cette dernière n'a montré aucun effet positif sur le pourcentage final de germination des graines à 300 mM NaCl (figure 57).



**Figure 55 :** effet des souches et des associations souche-glycine bêtaïne, souche-*O. ficus-indica*, souche-*U. lactuca* et souche-*E. intestinalis* sur la germination des graines de blé dur sous stress salin. A : souche BEA4 ; B : souche BEC9 ; C : souche BOA4 ; D : souche SEB9. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

L'utilisation des PGPR gagne, de plus en plus, sa place comme une pratique répandue en agriculture, visant à remplacer l'utilisation excessive et incontrôlable des engrais chimiques. Cependant, l'application de tels microorganismes peut être encore plus bénéfique sous conditions de stress. Il est donc important de s'assurer que l'inoculum testé soit capable de survivre sous l'effet des conditions particulières dans lesquelles son utilisation est proposée. Dans un environnement salin, la tolérance microbienne au stress peut être améliorée en utilisant des solutés compatibles synthétisés par le microorganisme et/ou accumulés du milieu (Madkour *et al.*, 1990). Ce dernier mécanisme est préféré lorsque des substances appropriées sont présentes dans l'environnement (Lamosa *et al.*, 1998 ; Paul et Nair, 2008).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons démontré que l'extrait d'*O. ficus-indica* est, dans la plupart des cas, plus efficace que la glycine bêtaïne pour la promotion de la croissance bactérienne (BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9) et la germination des graines de blé sous stress salin. D'un autre côté, le fait que le milieu LB confère une meilleure protection aux cultures bactériennes que le milieu NF-b en absence d'autres sources de solutés compatibles est probablement dû à la présence de l'extrait de levure dans le premier. Cet extrait est très riche en proline, bêtaïnes et autres molécules connues pour leur rôle osmoprotecteur (Nagata *et al.*, 1996 ; Wood, 2007).

Il est également important de rapporter les résultats positifs obtenus en ajoutant les extraits de *U. lactuca* et *E. intestinalis*. Ces deux macroalgues marines sont connues pour leur aptitude à synthétiser et à accumuler une large gamme d'osmoprotecteurs sous stress salin (Dickson *et al.*, 1982 ; Edwards *et al.*, 1987 ; Plettner *et al.*, 2005). Les extraits de macroalgues marines ont déjà été utilisés pour améliorer l'halotolérance de bactéries telles que *Sinorhizobium Meliloti*, *Azospirillum brasilense* et *Escherichia coli* (Ghoul *et al.*, 1995 ; Pichereau *et al.*, 1998 ; Nabti *et al.*, 2007). Le diméthylsulfonopropionate et d'autres sulfoniums tertiaires, les sucres, les polyols et les composés N-organiques constituent les solutés compatibles les plus abondamment accumulés sous stress salin par les macroalgues marines, y compris *U. lactuca* et *E. intestinalis* (Edwards *et al.*, 1988 ; Kirst, 1996).

Il est important de noter qu'il s'agit de la première utilisation enregistrée d'*Opuntia ficus-indica* comme source d'osmoprotecteurs naturels (Rai *et al.*, 2017). Aucun rapport préalable n'a précisé la nature chimique de tels composés, ni les conditions de leur synthèse par cette plante connue pour sa résistance au stress environnemental. Cependant, la teneur totale en

acides aminés libres (257,24 mg [100 g]<sup>-1</sup>) est remarquablement supérieure à la moyenne constatée chez d'autres plantes. *O. ficus-indica* est également caractérisée par des niveaux relativement élevés en sérine, acide g-aminobutyrique, glutamine, proline, arginine, histidine, et contient de la méthionine (Sáenz *et al.*, 2013), suggérant que les acides aminés pourraient constituer la majorité des osmoprotecteurs naturels fournis par l'extrait de cette plante. De plus, les cladodes *O. ficus-indica* sont riches en minéraux tels que le potassium, le calcium, le phosphore et le fer (Hadj Sadok *et al.*, 2008). Les éléments minéraux fournis par cet extrait participent à l'enrichissement des milieux de culture, favorisant ainsi la croissance bactérienne. Le tryptophane, précurseur direct de l'AIA, est un composé abondant dans les raquettes de *O. ficus-indica* [1,04 g / 100 g] (El-Mostafa *et al.*, 2014). Généralement, la production de tels éléments joue un rôle clé dans la promotion de la croissance des plantes et le soulagement du stress salin (Egamberdieva, 2009 ; Kaya *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2013).

Nabti *et al.* (2007) ont rapporté l'utilisation de PGPR et de l'extrait brute d'*Ulva lactuca* pour favoriser la germination et la croissance des graines de blé sous stress salin. Cependant, notre rapport sur l'utilisation d'extraits d'*Opuntia ficus-indica* et d'*Enteromorpha intestinalis* pour favoriser la croissance des plantes sous salinité élevée est nouveau. Basavaraju *et al.* (2002), Kaymak *et al.* (2009), Tam et Diep (2014) et Rathi *et al.* (2014) ont rapporté le rôle de bactéries comme *Achromobacter xylosoxidans*, *Flavobacterium* sp. *Pseudomonas putida* et *Azotobacter chroococcum* en tant que PGPR pour améliorer la germination des graines et restaurer la croissance des plantes sous stress salin.

## VI. Halotolérance de la tomate, effet des souches et/ou extraits

### 1. Pourcentage final des graines germées

En l'absence de stress salin, aucun traitement n'a apporté une amélioration au pourcentage final de germination des graines de tomate. L'ajout des extraits OFI, UL et EI a permis d'augmenter le nombre de graines germées de 64% à 100, 100 et 88%, respectivement. L'inoculation avec les deux bactéries BEC9 et BOA4 a permis d'obtenir un taux de germination de 76 et 84%, respectivement. En présence de stress salin, l'ajout de l'extrait OFI aux graines de tomate a permis d'améliorer, significativement, le pourcentage finale de germination (de 52 à 92%). Aucun autre traitement n'a apporté une amélioration significative du taux de germination sous stress salin. Cependant, les associations BEC9-UL et BOA4-UL ont permis de restaurer le de taux de germination des graines de 52% à 76 et 76%, respectivement (tableau 18).

**Tableau 18** : germination des graines de tomate sous différents traitements.

	En absence de stress (%)	En présence de stress (%)
Témoin (sans traitement)	<b>64</b>	<b>52</b>
<i>O. ficus-indica</i>	100	92
<i>U. lactuca</i>	100	68
<i>E. intestinalis</i>	88	68
BEC9	76	68
BOA4	84	48
BEC9 + <i>O. ficus-indica</i>	92	52
BEC9 + <i>U. lactuca</i>	84	76
BEC9 + <i>E. intestinalis</i>	92	68
BOA4 + <i>O. ficus-indica</i>	88	56
BOA4 + <i>U. lactuca</i>	92	72
BOAC + <i>E. intestinalis</i>	88	68

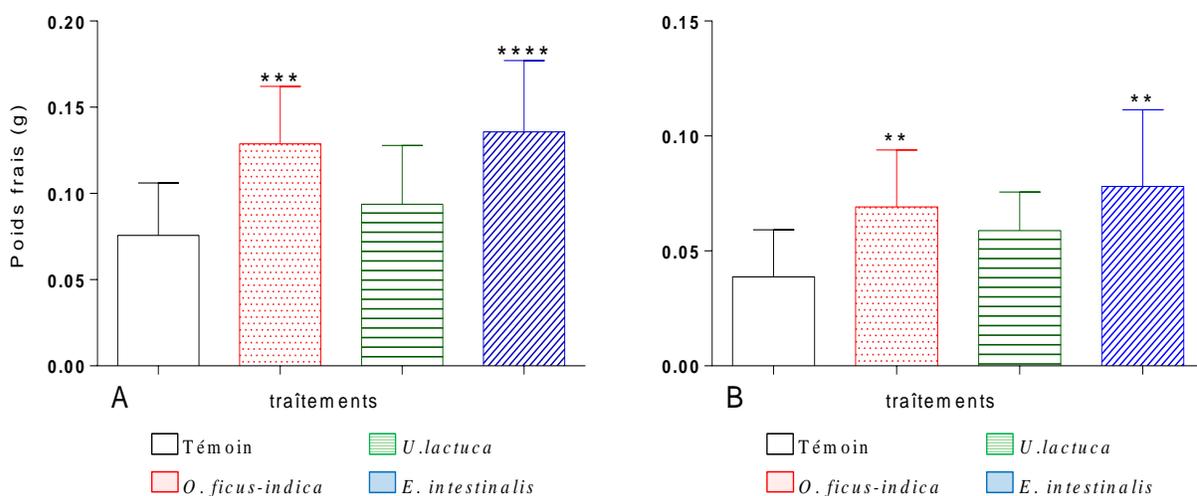
## 2. Poids frais des plantules après un mois de croissance

### 2.1. Effet des extraits en absence de stress salin

Le poids frais de la partie aérienne des plantules de tomate, obtenu après un mois de croissance, était de 75.76 mg en absence de traitement. L'ajout des extraits OFI et EI a significativement améliorer le poids des plantules (128.76 et 135.68 mg, respectivement). Cependant, l'ajout de l'extrait UL n'a apporté aucun effet significatif sur le poids frais des plantules de tomate, avec une légère amélioration de 75.76% (pour le témoin) à 93.71% (en présence de l'extrait) (Figure 54).

### 2.2. Effet des extraits en présence de stress salin (150 mM NaCl)

La présence de sel dans les solutions d'irrigation a considérablement affecté le poids frais des plantules de tomate. Le poids du témoin est passé de 75.76 mg en absence de sel à 38.7 mg en présence de 150 mM de sel. L'ajout de l'extrait EI a permis d'obtenir la meilleure croissance par rapport au témoin. Ainsi, le poids frais est passé de 37.76 mg en absence de traitement à 78.07 mg en présence de cet extrait, avec une différence significative à  $p < 0.0001$ . L'extrait OFI a également montré un effet positif sur le poids frais des plantules de tomate (69 mg), avec une différence significative à  $p < 0.001$ . D'un autre côté, une légère amélioration, non significative, a été constatée en présence de l'extrait UL (le poids frais est passé de 38.7 à 58.86 mg en présence et en absence de l'extrait, respectivement) (Figure 58).

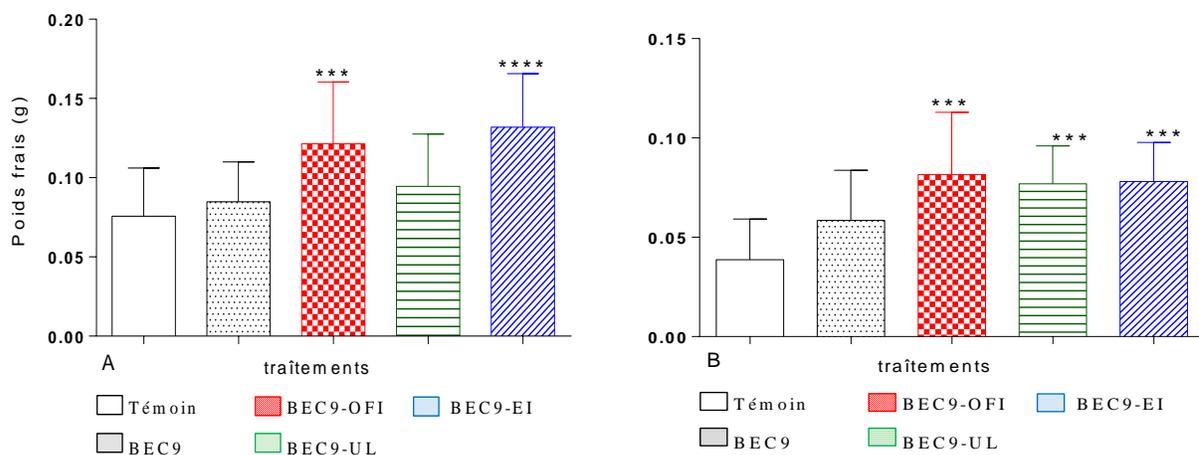


**Figure 56 :** effet des extraits de : *O. ficus-indica*, *U. lactuca* et *E. intestinalis* sur le poids frais des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence (B) de stress salin. \*\*: différence significative ( $p < 0.005$ ); \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

### 2.3. Effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9-extraits

En absence de stress salin, la souche BEC9 n'a apporté aucun effet positif sur le poids frais des plantules de tomate. Le poids frais est passé de 75.76 mg (témoin) à 84.88, 121.4, 94.5 et 131.85 mg en présence de la souche BEC9 et des associations BEC9-UL, BEC9-UL et BEC9-EI, respectivement. Ainsi, aucun effet synergétique n'a été observé entre les extraits et la bactérie à 0 mM de sel (Figure 55).

En présence de stress salin (150 mM NaCl), la souche BEC9 n'a montré aucun effet de stimulation du poids frais des plantules de tomate. Cependant, une légère amélioration, non significative, a été constatée (de 38.7 à 58.53 mg en absence et en présence de la souche, respectivement). L'association BEC9-UL a montré un effet stimulateur synergétique de la croissance des plantules de tomate en présence de stress salin. Ainsi, le poids frais obtenu avec les deux traitements BEC9 et UL était de 58.53 et 58.86 mg, respectivement (différence non significative par rapport au témoin). Cependant l'association BEC9-UL a permis de restaurer le poids frais de 38.7 à 76.88 mg (une différence statistiquement significative à  $p < 0.001$ ) (Figure 59).

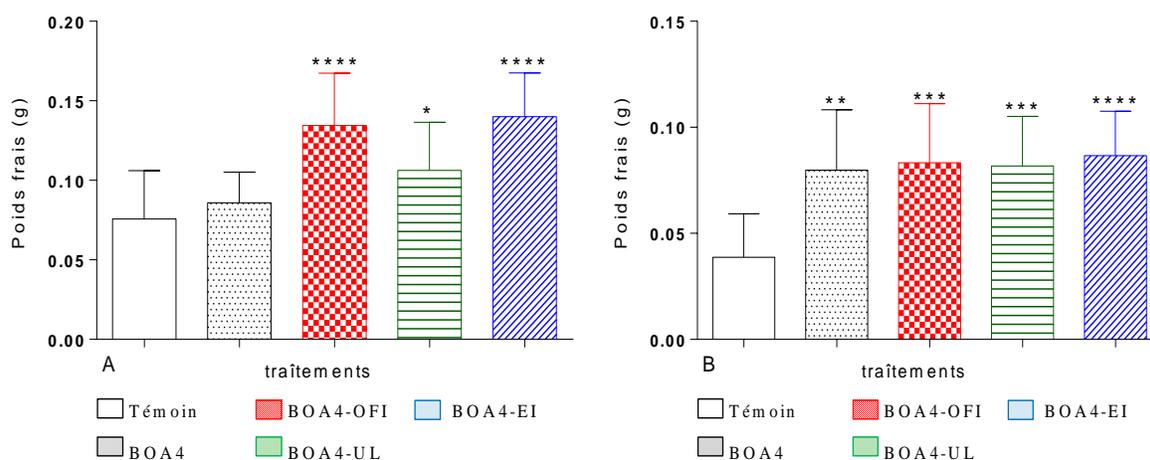


**Figure 57 :** effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9-*O. ficus-indica* (OFI), BEC9-*U. lactuca* (UL) et BEC9-*E. intestinalis* (EI) sur le poids frais des plantules de la tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence de stress salin (B). Différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

### 2.4. Effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4-extraits

En absence de stress salin, la bactérie BOA4 n'a apporté aucun effet stimulateur de la croissance des plantes de tomate. Cependant, son association avec les trois extraits OFI, UL et EI a significativement amélioré le poids frais des plantules de 75.77 mg, en absence de

traitement, à 134.52, 106.25 et 140.11 mg en présence des trois extraits, respectivement. En présence de 150 mM NaCl, l'application de la souche BOA4, seule, a permis d'augmenter significativement le poids frais des plantules. Les deux associations BOA4-OFI et BOA4-UL semble avoir un effet légèrement meilleur par rapport à l'association BOA4-UL. Les quatre traitements BOA4, BOA4-OFI, BOA4-UL et BOA4-EI ont significativement augmenté le poids des plantules de 38.7 mg (témoin) à 79.78, 83.27, 81.8 et 86.64 mg, respectivement (figure 60).



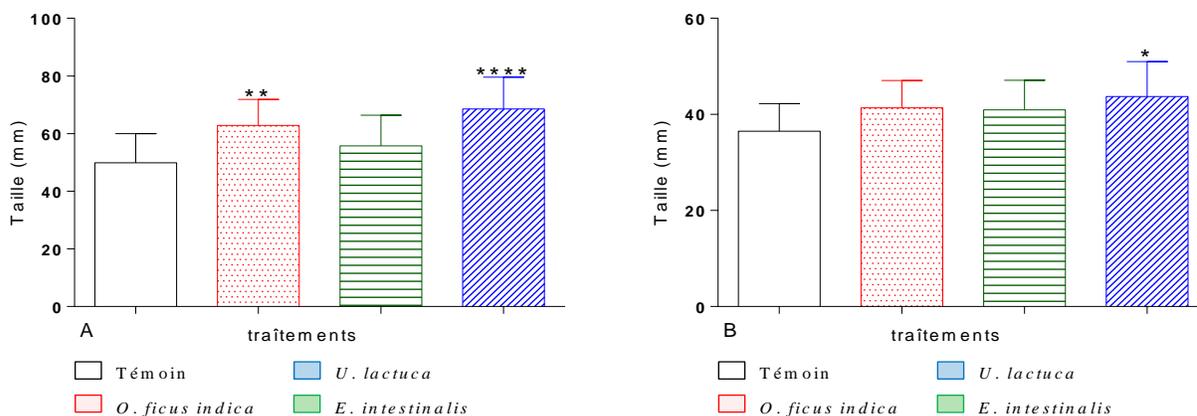
**Figure 58 :** effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4-*O. ficus-indica* (OFI), BOA4-*U. lactuca* (UL) et BOA4-*E. intestinalis* (EI) sur le poids frais des plantules de la tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence de stress salin (B). \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

### 3. Taille (mm) des plantules de la tomate après un mois de croissance

#### 3.1. Effet des extraits

En absence de stress salin, l'extrait UL n'a apporté aucune amélioration significative aux tailles des plantules par rapport au témoin (témoins : 49.8 ; UL : 55.7 mm). L'extrait EI a permis d'obtenir les meilleures longueurs de la partie aérienne des plantules de tomate (EI : 68.6 mm). L'extrait OFI a également apporté un effet bénéfique par rapport aux tailles des plantules (OFI : 62.8 mm).

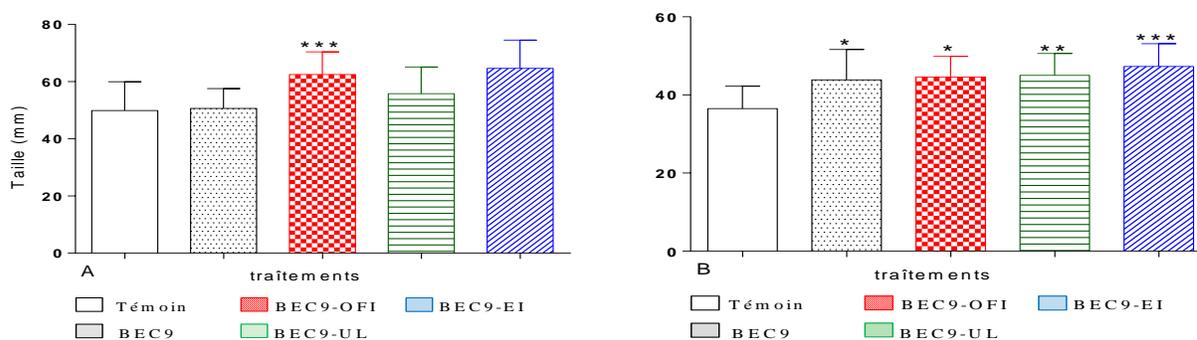
La taille des plantules irriguées avec la solution saline (150 mM NaCl) n'a pas été améliorée par l'apport des deux extraits OFI et EI (témoin : 36.5 ; OFI : 41.3 ; UL : 40.9 mm). Cependant, l'extrait EI a permis de restaurer, significativement, la taille des plantules sous stress salin (EI : 43.7mm) (figure 61).



**Figure 59 :** effet des extraits de : *O. ficus-indica*, *U. lactuca* et *E. intestinalis* () sur la taille des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence (B) de stress salin. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

### 3.2. Effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9-extraits

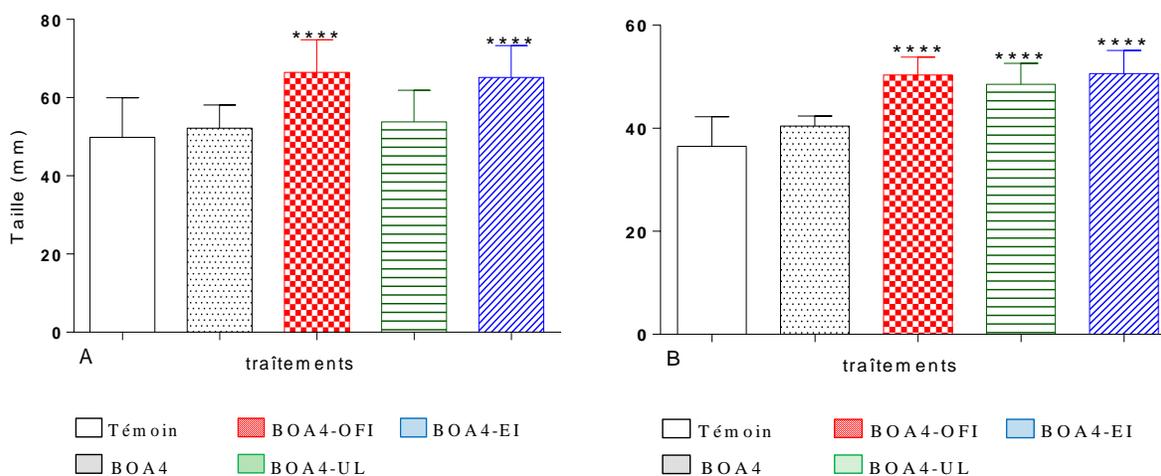
A 0 mM NaCl, la souche BEC9 et l'association BEC9-UL ne semblent avoir aucun effet stimulateur de la taille des plantules de tomate (témoin : 49.85 ; BEC9 : 50.62 mm ; BEC9-UL : 55.78). Cependant, les associations BEC9-OFI et BEC9-EI ont permis d'obtenir des plantules significativement plus longues que celles du témoin (BEC9-OFI : 62.54 ; BEC9-EI : 64.6 mm). L'association BEC9-EI semble avoir le meilleur effet stimulateur de la taille des plantules de tomate sous stress salin (témoin : 36.5 ; BEC9-EI : 47.8 mm). De même, tous les autres traitements ont significativement amélioré la taille des plantules sous 150 mM NaCl (BEC9 : 43.85 ; BEC9-OFI : 44.6 ; BEC9-UL : 45 mm). Cependant, aucun effet synergétique n'a été constaté entre la bactérie et les extraits testés (Figure 62).



**Figure 60 :** effet de la souche BEC9 et de l'association BEC9-*O. ficus-indica* (OFI), BEC9-*U. lactuca* (UL) et BEC9-*E. intestinalis* (EI) sur la taille des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence (B) de stress salin (150 mM NaCl). \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ).

### 3.3. Effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4-extraits

La bactérie BOA4 n'a montré aucun effet stimulateur de la taille des plantules de tomates sous les deux concentrations de sel testées. Cependant, les deux traitements BOA4-OFI et BOA4-EI ont significativement amélioré la taille des plantules de 49.84 mm (témoin) aux valeurs respectives de 66.47 et 65.16 mm en absence de stress salin. A 150 mM NaCl, un effet synergétique a été constaté entre la souche BOA4 et les deux extraits UL et OFI. Ces associations ont permis d'améliorer significativement la taille des plantules par rapport aux effets séparés des trois traitements (BOA4 : 42 mm ; UL : 40.92 ; OFI : 41.35 ; BOA4-UL : 48.53 ; BOA4-OFI : 50.36). L'association BOA4-EI a permis d'obtenir la meilleure amélioration de la taille des plantules sous stress salin (50.64 mm) (Figure 63).



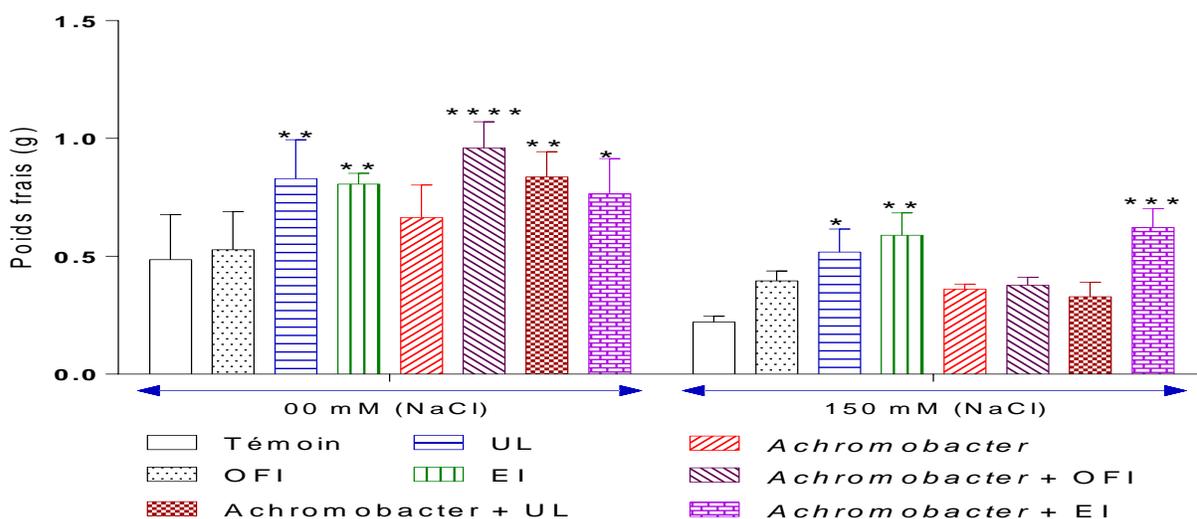
**Figure 61 :** effet de la souche BOA4 et de l'association BOA4-*O. ficus-indica* (OFI), BOA4-*U. lactuca* (UL) et BOA4-*E. intestinalis* (EI) sur la taille des plantules de tomate après un mois de croissance en absence (A) et en présence de stress salin (B) (150 mM NaCl). \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

#### 4. Poids frais des plantules de tomate après 47 jours de croissance

En absence de stress salin et après 47 jours de croissance, les deux extraits UL et EI ainsi que les trois associations BOA4-UL, BOA4-UL et BOA4-EI ont significativement amélioré le poids frais des plantules de tomate. L'application de la souche bactérienne BOA4 ou de l'extrait OFI seule a apporté une légère amélioration non significative au poids des plantules. L'association BOA4-OFI a présenté le meilleur effet par rapport au témoin (97% du poids frais a été restauré). Les deux associations BOA4-UL et BOA4-EI ont permis d'améliorer le poids des plantules de témoin de 486 mg à 836 et 764 mg, respectivement.

Egalement, les deux extraits UL et EI ont restauré 70 et 65% du poids des plantules, respectivement.

En présence stress salin, seul les trois traitements UL, EI et BOA4-EI ont permis de restaurer, significativement, le poids frais des plantules. L'application de l'extrait OFI a permis d'augmenter, légèrement, le poids frais des plantules de 222 mg (témoin) à 396 mg. L'association BOA4-EI semble avoir le meilleur effet sur le poids des plantules (180% du poids de témoin a été restauré). D'un autre côté, l'application de la souche BOA4 et des deux associations BOA4-OFI et BOA4-UL n'a montré aucun effet significative sur le poids des plantules après 47J de croissance (371, 377 et 329 mg, respectivement). Le traitement des plantules avec les deux extraits UL et EI a permis de restaurer 133 et 166% de poids des plantules non traitées (figure 64).

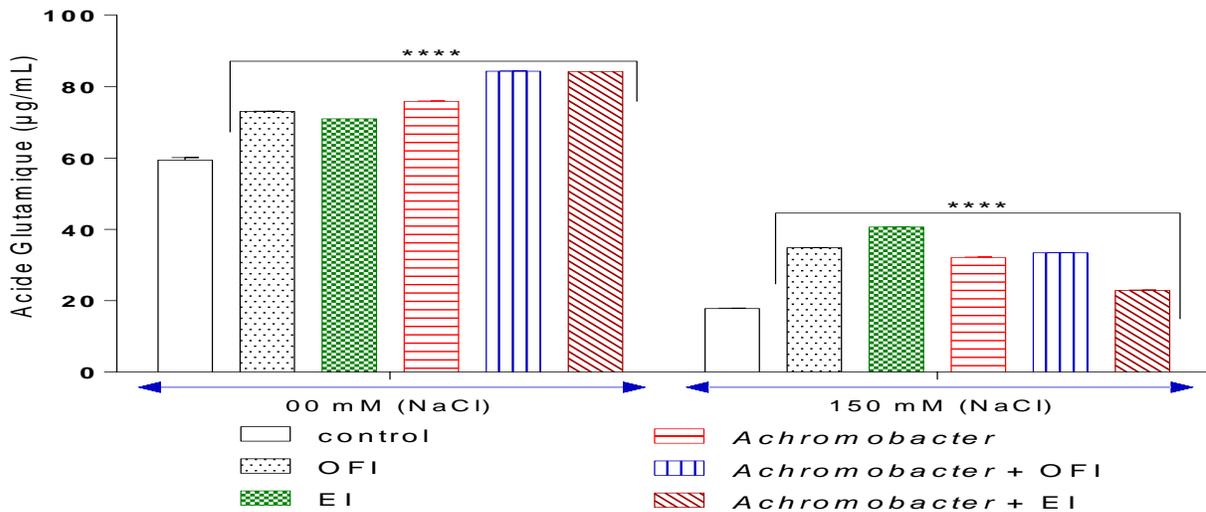


**Figure 62 :** poids frais des plantules de tomate après 47 J de croissance en présence de la souche BOA4 et/ou des extraits aqueux de *O. ficus-indica* (OFI), *U. lactuca* (UL) et *E. intestinalis* (EI). \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

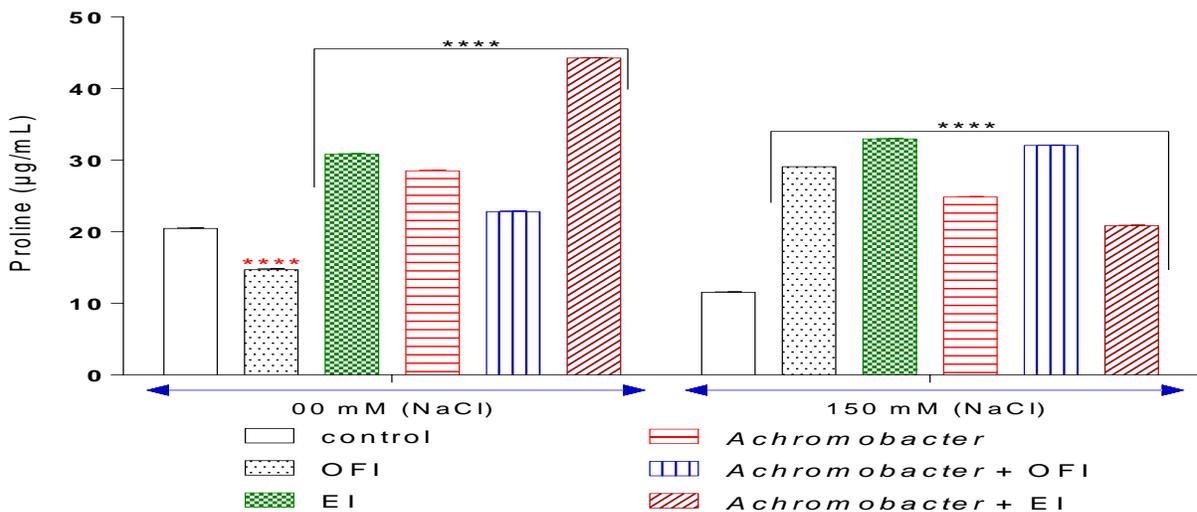
### 5. Proline et acide glutamique accumulés par les plantules de tomate :

Tous les traitements, à l'exception d'OFI, ont significativement amélioré le taux de proline dans les tissus de la plante en absence et en présence de stress salin (150 mM NaCl). En absence de stress salin, l'ajout de l'extrait OFI aux plantes a significativement diminué le taux de proline dans les plantes de 20 à 14.7  $\mu\text{g/mL}$ . Les autres traitements EI, BOA4, BOA4-OFI et BOA4-EI ont permis d'augmenter le taux de proline de 20 à 31, 29, 23 et 44  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. En présence de 150 mM NaCl, Les traitements OFI, EI, BOA4, BOA4-OFI et

BOA4-EI ont permis d'améliorer le taux de la proline dans les tissus de la plante de 12 (témoin) à 29, 33, 25, 32 et 21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivement. d'un autre côté, tous les traitements ont permis d'augmenter le taux d'acide glutamique dans les tissus des plantes sous les deux concentrations de sel testées. Les différents traitements (OFI, EI, BOA4, BOA4-OFI et BOA4-EI) ont permis d'augmenter le taux de l'acide glutamique de 59 (témoin) à (73, 71, 76, 84 et 84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et de 18 (témoin) à (35, 41, 32, 33 et 23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en présence et en absence de stress salin, respectivement (Figure 65, 66). (Annexe 3,4).



**Figure 63 :** Acide glutamique accumulé par les plantules de tomate après 47J de croissance en présence de la souche BOA4 et/ou des extraits aqueux d'OFI, UL et EI. \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 64 :** Proline accumulés par les plantules de tomate après 47J de croissance en présence de la souche BOA4 et/ou des extraits aqueux d'OFI, UL et EI. \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

L'application exogène d'osmoprotecteurs afin de protéger les cultures de tomate sous stress salin constitue une alternative très intéressante à envisager, où la plupart des cultivars commerciaux sont sensibles à des niveaux modérés de salinité, mais aussi au fait que les programmes de sélection et de développement de variétés tolérantes au sel sont limités par la complexité des procédures et le manque de connaissances génétiques et physiologique des caractères responsable de la tolérance (Singh *et al.*, 2012).

Au fil du temps et vu l'importance de la tomate, étant l'un des légumes les plus consommés au monde, plusieurs travaux ont été réalisés sur l'effet de la salinité sur la germination, la croissance et le rendement de cette plante. Certains travaux s'intéressaient particulièrement aux réponses physiologiques des plantes stressées, tandis que la plupart se dirigeaient vers les réponses biochimiques (Dombrowski, 2003 ; Akinci *et al.*, 2004 ; Debouba *et al.*, 2006 ; Maggio *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 2007 ; Hossain et Nonami, 2012 ; Lovelli *et al.*, 2012 ; Murshed *et al.* 2014 ; Palaniyandi *et al.*, 2014 ; Campos *et al.*, 2016).

Singh *et al.* (2012) ont constaté que le taux et la vitesse de germination des graines de tomate diminuent avec l'augmentation du stress salin. Ils ont également démontré que le rapport poids sec (racines/tiges) des plantules et le contenu en Na<sup>+</sup> augmentent, tandis que la concentration en K<sup>+</sup> diminue. Signalant que cette plante (*Lycopersicon esculentum*) est modérément sensible à la salinité, et qu'une attention accrue à la salinité est requise dans la production de tomate. Egalement, El-Iklil *et al.* (2000) ont étudié l'effet de stress salin sur Trois cultivars de *Lycopersicon esculentum* (Edkawy, Ramy et Vemar). Ils ont démontré le rôle de la salinité dans l'induction de la production d'éthylène, ainsi que la réponse physiologique des plantes vis-à-vis de la salinité (0, 50, 100 et 200 mM de NaCl). Leurs résultats ont démontré que le rapport poids sec (racines/tiges) augmente avec l'augmentation du stress et cela dépendait des génotypes, de la durée d'exposition, de l'âge des plantules et de la sévérité du stress. La quantité d'éthylène produite par les plantes stressées dépendait également des mêmes paramètres. Cette dernière est positivement corrélée à l'expression des signes de stress et la sensibilité du génotype. D'un autre côté, Amjad *et al.* (2014) ont étudié l'effet de la salinité sur deux génotypes de tomate : (1) tolérant aux sels (Indent-1) et (2) sensible (Red Ball). Ils ont démontré que les deux génotypes réagissent différemment au stress salin. Ainsi, la production d'éthylène, d'acide abscisique, l'accumulation de K<sup>+</sup>, la

conductance stomatique et l'homéostasie ionique ont été altérés sous concentrations enlevées en sel, indiquant que la production d'éthylène a significativement augmenté en absence de  $K^+$ , connu pour son rôle primaire dans l'halotolérance des plantes. D'autres travaux ont également évoqué le rôle primaire des ions  $K^+$  et de l'éthylène et d'autres aspects physiologiques de la réponse de tomate au stress salin (Feng et Barker, 1992 ; Johnson *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2003 ; Zhou *et al.*, 2007 ; Saida *et al.*, 2014).

Le rôle des PGPR dans l'amélioration de la croissance de la tomate à travers différents mécanismes d'action est largement abordé. El-Tarabily (2008) a étudié le rôle de bactéries productrices d'ACC désaminase appartenant au genre *Streptomyces* dans l'amélioration de la croissance des plantes de tomate sous stress à travers la réduction des niveaux d'ACC endogène et la diminution conséquente des taux d'éthylène dans les tissus végétaux. Almaghrabi *et al.* (2013) ont étudié le rôle de PGPR appartenant aux espèces *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* dans la promotion de la croissance de la tomate et la reproduction des nématodes sous serres. L'application de ces bactéries a significativement amélioré la croissance des plantes, réduisaient de manière remarquable la présence de galles et de masses d'œufs de nématodes sur les racines. Un *Azospirillum brasilense* s'est avérée capable de favoriser le développement racinaire chez les plantes de la tomate à travers la production d'éthylène. En effet, l'apport d'éthylène exogène à la plante a imité l'effet de l'inoculation par *Azospirillum brasilense*, tandis que l'addition d'un inhibiteur de la biosynthèse d'éthylène a bloqué cet effet (Ribaudó *et al.*, 2006). Le rôle d'autres bactéries telles que *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum* et *Bacillus* dans la promotion de la germination, du développement racinaire, de la croissance, la qualité des fruits et le biocontrôle des phytopathogène de la tomate a également été reporté (Kokalis-Burelle *et al.*, 2002 ; Mena-Violante et Olalde-Portugal, 2007 ; Sharafzadeh, 2012).

Il est clair que le rôle de PGPR ne s'arrête pas uniquement à l'amélioration de la croissance des légumes en absence de stress, certains sont également capables de la restaurer en présence de stress hydrique, souvent lié à la salinisation des sols ou à la sécheresse. Les espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Halomonas*, *Planococcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Achromobacter* et *Pseudomonas* peuvent favoriser la croissance de la pomme de

terre, du pois chiche, de la tomate, du haricot, de la laitue et du concombre sous des salinités élevées (Qurashi et Sabri, 2012; Gururani *et al.*, 2013; Egamberdieva et Lugtenberg, 2014). Plusieurs autres travaux ont également signalé que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Variovorax*, *Citrobacter*, *Bacillus* et *Mesorhizobium* pourraient être utilisés pour améliorer la croissance des pommes de terre et des tomates sous autres types de stress hydrique tel que la sécheresse (Bensalim *et al.*, 1998 ; Gururani *et al.*, 2013 ; Belimov *et al.*, 2015 ; Ullah *et al.*, 2016). Egalement, Tank et Saraf (2010) ont montré que des bactéries productrices de sidérophores et de l'ACC désaminase peuvent être d'une grande utilité dans la restauration de la croissance des plantes de tomate sous stress salin. Similairement, Mayak *et al.*, (2004) ont montré que la bactérie *Achromobacter piechaudii* a significativement augmenté le poids frais et sec des plants de tomates cultivés en présence de 172 mM NaCl. La bactérie a significativement réduit la production d'éthylène par les plants, mais elle n'a pas réduit la teneur en Na<sup>+</sup>. Cependant, elle a légèrement augmenté l'absorption de phosphore et de potassium, contribuant à l'activation des processus impliqués dans l'atténuation de l'effet du sel.

Dans notre travail, les deux bactéries (1) *Achromobacter xylosoxidans*-BOA4 (non productrice d'ACC désamine) et (2) *Pseudomonas putida*-BEC9 (productrice d'ACC désaminase) ont significativement restauré le poids frais et la taille des plantules de tomate sous stress salin, laissant suggérer que l'effet positive des PGPR sur l'atténuation de stress ne s'arrête pas uniquement à la réduction des effet nuisibles de l'éthylène, mais aussi à la production d'autres métabolites d'intérêt agricole (enzymes lytiques, phytohormones, sidérophores etc.) (Rai *et al.*, 2017). On a également constaté que l'inoculation bactérienne participe à la stimulation de l'assimilation de proline et d'acide glutamique par les plantes. Ces deux acides aminés sont connus pour leur rôle dans l'osmoprotection cellulaire, étant accumulés à des quantités importantes en état de stress. Les acides aminés participent également à la régulation du transport ionique, la modulation de l'ouverture stomatique et la désintoxication des métaux lourds (Botsford et Lewis, 1990 ; Fougère *et al.*, 1991 ; Gzik, 1996 ; Aziz *et al.*, 1999 ; Rai, 2002 ; Amini et Ehsanpour, 2005 ; Claussen, 2005). L'effet positive de certains PGPR sur la stimulation des quantités d'osmoprotecteurs accumulés par les plantes (acides aminés, ammoniums quaternaires, sulfonium tertiaires, sucres etc.) a été également rapporté dans plusieurs travaux. A titre d'exemple, Qurashi et Sabri (2011) ont

constaté que l'accumulation de proline endogène chez les plantes de lentilles a augmenté de 68 et 51% à 100 et 200 mM de NaCl. Cependant, l'inoculation bactérienne des plantes avec une souche halotolérante de *Staphylococcus saprophyticus* a augmenté l'accumulation de proline à 98% à 100 mM de NaCl. Ainsi, l'accumulation d'un niveau plus élevé d'osmoprotecteurs dans les plantes est une caractéristique halophytique. Afin de surmonter la salinité élevée, les plantes augmentent leur accumulation d'osmolytes endogènes pour éviter le déficit hydrique des plantes à un tout premier niveau (Nemati *et al.*, 2011). D'un autre côté, Bharti *et al.* (2016) ont montré que la stimulation de l'expression de diverses enzymes antioxydantes ainsi que la teneur en proline dans les plantes de blé traités par des PGPR a augmenté la tolérance des plantes au stress salin. Egalement, Kim *et al.* (2014) ont rapporté qu'une *Enterobacter sp.* EJ01, une bactérie isolée en Chine, a amélioré la croissance végétale et soulagé le stress salin chez la tomate et l'*Arabidopsis*. EJ01 était capable de produire de l'ACC et de l'AIA. L'isolat EJ01 a permis d'augmenter le poids frais, le poids sec et la hauteur des plantes de la tomate et de l'*Arabidopsis* dans des conditions normales et salines. Au niveau moléculaire, le traitement à court terme avec EJ01 a augmenté l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress salin. L'expression de gènes de biosynthèse de proline (c'est-à-dire P5CS1 et P5CS2) et de gènes liés à des processus d'amorçage (c'est-à-dire MPK3 et MPK6) ont également été surexprimés.

L'ajout des extraits aqueux des raquettes d'*O. ficus-indica* et des deux macroalgues marines *U. lactuca* et *E. intestinalis* au sol a permis d'augmenter le taux des deux acides aminés proline et acide glutamique dans les tissus des plantules de tomate en absence et en présence de stress salin. Les extraits ont également permis de restaurer la croissance des plantes avec ou sans inoculation bactérienne. Ceci peut être expliqué du fait que ces extraits sont connus pour leur richesse en composés osmoprotecteurs, particulièrement les molécules N-organiques et les acides aminés libres (Dickson *et al.*, 1982 ; Edwards *et al.*, 1987 ; Edwards *et al.*, 1988 ; Ghoul *et al.*, 1995 ; Kirst, 1996 ; Pichereau *et al.*, 1998 ; Plettner *et al.*, 2005 ; Nabti *et al.*, 2007 ; Hadj Sadok *et al.*, 2008 ; Egamberdieva, 2009 ; Kaya *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2013 ; Sáenz *et al.*, 2013 ; El-Mostafa *et al.*, 2014). Les travaux révélant la richesse de ce type d'extraits en éléments nutritifs expliquent, en grande partie, leurs capacités à promouvoir la croissance des plantes en absence de stress en améliorant la fertilité des sols pauvres,

constituant une source de P et de N, ainsi que d'autres éléments de croissance (Nedzarek et Rakusa-Suszczewski, 2004).

Il est également important de mentionné les effets de synergie remarqués, dans certains cas, entre l'inoculation bactérienne des plantes et l'ajout des extraits au sol. Cela peut être expliqué par le fait que l'extrait à fournis des avantages à la fois aux plantes et à la bactérie. Cette dernière semble avoir un effet plus remarquable une fois protégée du stress salin par l'apport des extraits (Rai *et al.*, 2017). Nabti *et al.* (2010) et Arif *et al.* (2015) ont signalé que la restauration réussie de la croissance du blé dur dans des conditions de salinité après inoculation avec *Azospirillum brasilense* NH et l'application concomitante d'extraits aqueux de *U. lactuca* fournit constitue une nouvelle approche d'une formulation d'un inoculum de graines pour l'amélioration de la croissance du blé dans les salins.

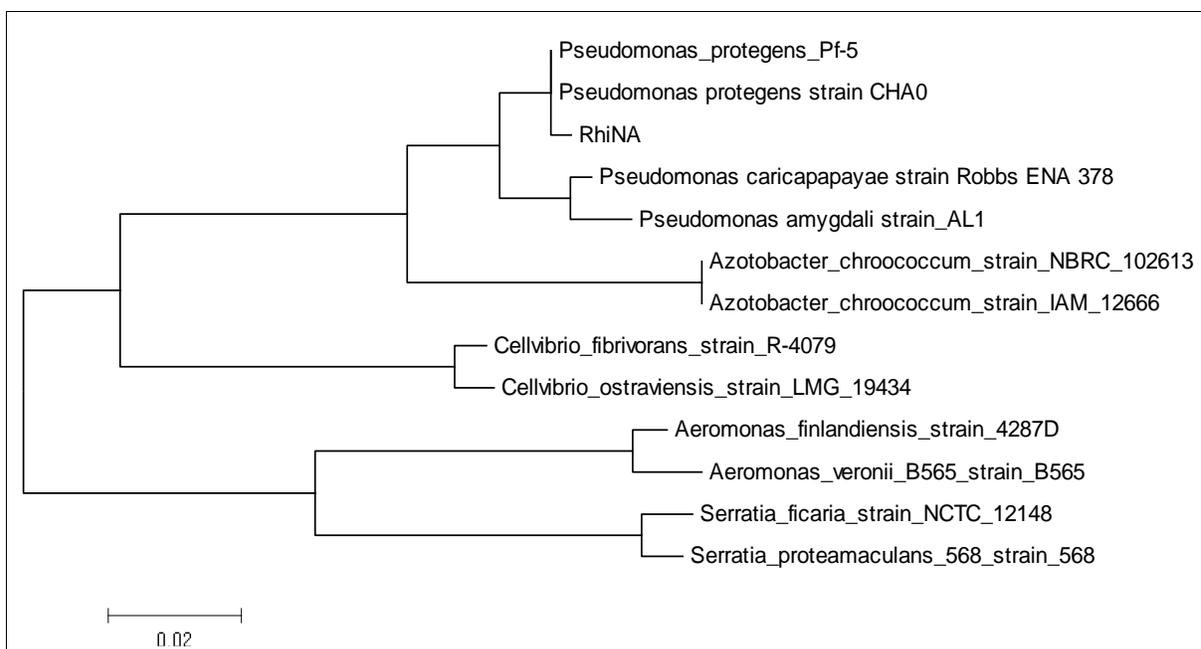
Il est crucial de mentionner que jusqu'à présent, aucune antithèse claire n'a été conduite contre l'application d'algues comme biofertilisants. Cependant, l'application à long terme des algues en agriculture, ainsi que leur teneur élevée en sel (Na +, Cl-, K + et Ca<sup>2+</sup> + etc.) peuvent augmenter sa quantité dans les tissus végétaux et contribuer à la salinisation des sols. De tels problèmes pourraient être évités en incluant le repos du sol et des périodes de rinçage par la pluie pour diminuer la teneur en sel des sols (Angus et Dargie, 2002 ; MacArtain *et al.*, 2007). Dans le cas contraire, les différences entre les composés organiques des algues comme les carraghénanes, les laminarines et les ulvanes et celles appartenant à des plantes terrestres telles que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine peuvent exposer la communauté microbienne du sol à des composés nouveaux et moins dégradables (Jiménez-Escrig et Sánchez-Muniz, 2000 ; Jaulneau *et al.*, 2010). En outre, l'alginate, une molécule d'algues brunes qui agit comme un composé contenant de l'eau, peut affecter la répartition de cette dernière dans le sol (Fourest et Volesky, 1997 ; Jiménez-Escrig et Sánchez-Muniz, 2000). D'autre part, les algues sont considérées comme des accumulateurs dynamiques de métaux lourds et d'autres contaminants dans les environnements marins (Vasquez et Guerra, 1996, Fourest et Volesky, 1997 ; Dadolahi-Sohrab *et al.*, 2011, Karthick *et al.*, 2012 ; Sudharsan *et al.*, 2013). L'application d'algues recueillies à partir de ces sites contaminés dans les sols agricoles peut accroître la teneur de ces molécules agressives à la fois dans les sols et dans les plantes (Woznitza et Barrantes, 2005). De plus, la décomposition anaérobie des composés sulfatés des algues

conduit à la production de sulfures. Par conséquent, la concentration d'ions hydrogène dans le sol augmente par l'oxydation microbienne de ces sulfures et provoque donc une acidification des sols (Brady et Weil, 2008). De tout cela, l'application de l'extrait d'*Opuntia ficus-indica* dans ce travail a révélé son efficacité comme alternative non négligeable aux extraits issus des macro-algues marines afin de protéger les sols de l'accumulation des sels nocifs (Rai *et al.*, 2017). Ajoutant à ça, la nature résistante du figuier de barbarie à des périodes de stress hydrique prolongées, une caractéristique majeure du Sahara Algérien, ouvre une grande fenêtre de perspective pour l'application de cette plante en agriculture moderne comme biofertilisant pour une meilleure exploitation de nos ressources.

## VII. *Pseudomonas protegens* comme agent de biocontrôle

### 1. Identification moléculaire

L'analyse de la séquence d'ADN 16S de la souche RhiNA l'a clairement affilié au genre *Pseudomonas* avec un minimum de divergence obtenue avec la souche *Pseudomonas protegens* CHA0 (ressemblance >99%) (Figure 67, Annexe 2).



**Figure 65 :** arbre phylogénétique construit par l'algorithme *Neighbor-Joining* sur la base de quelques séquences d'ARN<sub>r</sub> 16S obtenues par BLAST. La barre indique 2% de divergence entre les séquences.

Après identification, la souche RhiNA était affiliée au genre *Pseudomonas*. Ce groupe de bactéries est largement répandu dans la nature. Il joue un rôle important dans les processus physico-chimiques et biologiques du sol (Kahlon, 2016). Plus de 99% de similitude a été noté entre la séquences ARN 16S de la souche RhiNA et celle de la souche *Pseudomonas protegens* souche CHAO. Récemment, l'espèce *P. protegens* espèces a été incluse dans le groupe *P. fluorescens*. Ce groupe est décrit comme un groupe de PGPR antagoniste par excellence en raison de sa capacité à améliorer la protection de la croissance des plantes et des cultures végétales contre les phytopathogènes (Garrido-Sanz *et al.*, 2016). Il est connu que la souche *P. protegens* CHAO produit des métabolites secondaires avec un large spectre d'activité antibiotique (HCN, NH<sub>3</sub>, 2,4-diacétylphloroglucinol, et pyolutéorine pyrrolnitrine), exhibant une activité élevée d'inhibition de phytopathogènes (Jouss *et al.*, 2014).

## 2. Production des métabolites d'intérêt agricole

La souche *P. protegens*-RhiNA s'est révélée capable de produire des quantités d'HCN (la couleur du papier Wattman a changé du jaune au marron dans les trois répétitions). En présence de tryptophane (0.1 g/L), la souche RhiNA a produit  $6.86 \pm 4.84$  µg/mL d'acide indole acétique dans le milieu. Les deux souches *P. protegens* RhiNA et *P. protegens* CHA0 ont produit toutes les enzymes recherchées, à l'exception de la chitinase pour la souche CHA0 et de l'uréase pour la souche RhiNA. Cette dernière est capable de produire des niveau élevés de protéase, lipase, estérase, uréase et des quantité modérées de chitinase. Les deux souches produisent des quantités importantes de sidérophores et solubilise le phosphate tricalcique sur le milieu de culture Pikovskaya (tableau 19).

**Tableau 19 :** métabolites d'intérêt agricole produite par les deux souches bactériennes *P. protegens*-RhiNA et *Pseudomonas protegens* CHA0<sup>T</sup>

PGP-traits	RhiNA	CHA0 <sup>T</sup>	PGP-traits	RhiNA	CHA0 <sup>T</sup>
AIA (µg/mL)	6.86±0.48	/	Estérase	++	+
HCN	+++	++	Cellulase	+++	+
Sidérophores	+++	++	Lipase	++	++
Chitinase	+	-	Uréase	-	+
Protéase	++	++	Solubilization du (P)	++	++

(-) négative, (+) faiblement positive, (++) modérément positive, (+++) hautement positive (Annexe 1).

L'HCN et l'ammoniac sont connus pour être toxiques pour la croissance et l'activité fongique (McCallan et Weedon, 1940 ; Howell *et al.*, 1988). De nombreux travaux ont signalé l'implication des bactéries du genre *Pseudomonas*, y compris l'espèce *P. protegens*, dans le biocontrôle d'une large gamme de maladies fongiques chez les plantes. Cette activité a été attribuée en grande partie à la production de l'HCN et de l'ammoniaque (O'Sullivan et O'Gara 1992 ; Dowling et O'Gara, 1994 ; Pal *et al.*, 2000 ; Walsh *et al.*, 2001 ; Bensidhoum *et al.*, 2016).

La dégradation de la matière organique du sol, via les activités enzymatiques, est l'un des processus majeurs fournis par les microorganismes pour améliorer la qualité des sols et la croissance des plantes. Les enzymes microbiennes (uréase, lipase, protéase, chitinase, amylase

et cellulase) jouent un rôle primordial dans les transformations biologique et physicochimiques dans le sol (Glick, 1995 ; Viveros *et al.*, 2010 ; Rana *et al.*, 2012 ; Xun *et al.*, 2015). Les enzymes telles que la chitinase et la cellulase jouent également un rôle important comme métabolites microbiens impliqués dans le biocontrol des agents pathogènes, participant à la dégradation des parois fongiques (Mitchell et Alexander, 1963).

Sindhu et Dadarwal (2001) et Ahmad *et al.* (2013) ont montré que plusieurs souches appartenant au genre *Pseudomonas* produisent des protéases, des cellulase, des chitinase et des lipases, sont impliquées dans la dégradation de la matière organique dans le sol et dans le biocontrol des phytopathogènes. Un *Pseudomonas protegens*, isolé à partir de la rhizosphère des *Solanaceae*, s'est révélé d'une grande efficacité contre un large spectre de champignons phytopathogènes. Son activité antagoniste a été attribuée à l'expression de chitinase, HCN, Siderophores, NH<sub>3</sub> et autre métabolites secondaires (Ramyasmruthi *et al.*, 2012). Egalement, Malathi et Viswanathan (2013) ont souligné le rôle des *Pseudomonas* producteurs de chitinase dans le biocontrol de la pourriture rouge causée par *Colletotrichum falcatum* chez la canne à sucre. Bensidhoum *et al.*, (2015) et Bensidhoum *et al.*, (2016) ont montré le rôle d'un *P. protegens* (LiBe S5) dans la promotion de la croissance de l'orge sous concentration élevée en métaux lourds. Cette même bactérie a montré une activité antifongique contre un large spectre de champignons phytopathogènes et s'est montré efficace contre la propagation de *Botrytis cinerea* sur feuilles de la laitue. Les activités PGPR de cette souche ont été attribuées en grande partie à sa capacité de produire des quantités importantes d'enzymes lytiques (cellulase, chitinase, amylase, uréase, protéase et lipase), de l'AIA, l'HCN, l'NH<sub>3</sub>, des sidérophores et des phosphatases. De tels caractères peuvent être impliqués dans le caractère antagoniste de la souche RhiNA contre les champignons testés dans ce travail.

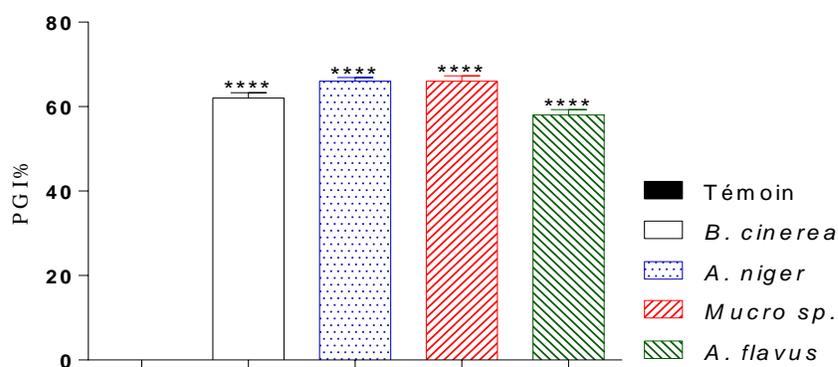
Dans le sol, les sidérophores jouent un rôle important dans la promotion de la croissance des plantes. Egalement, leur caractère compétiteur et antagoniste vis-à-vis des pathogènes n'est pas négligeable (Simões *et al.*, 2007 ; Hider et Kong, 2010 ; Beneduzi *et al.*, 2012). Le *Pseudomonas fluorescens* WCS374r est impliqué dans l'induction de la résistance systémique chez le riz contre le champignon phytopathogène *Magnaporthe oryzae*. Cette RSI est basée sur un complexe de protection répressible médité par un complexe de sidérophores (De Vleeschauwer *et al.*, 2008). Un autre complexe Fe-sidérophores, produit par *P. protegens*, est

impliqué dans l'amélioration de la teneur en phénol et en enzymes impliquées dans son oxydation chez les plantes du riz. Le résultat en est une induction de la résistance systémique contre *Pyricularia oryzae* (Amutharaj *et al.*, 2013). Étonnamment, les sidérophores peuvent également stimuler la biosynthèse d'autres composés antimicrobiens impliqués dans les défenses et la santé végétale (Laslo *et al.*, 2011 ; Beneduzi *et al.*, 2012).

Il est bien établi que les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont d'excellents producteurs d'auxines, participant à l'amélioration du rendement des cultures de plantes (Karnwal, 2009 ; Malik et Sindhu 2011 ; Bharucha *et al.*, 2013 ; Kamble et Galerao, 2015). De plus, certaines études admettent que les auxines bactériennes, telles que l'AIA, participent à la médiation de l'antagonisme bactérien et stimulent les défenses des plantes et la suppression des maladies (Khare et Arora, 2010 ; Yu et Zheng, 2007). En outre, Petti *et al.* (2012) ont étudié le rôle de l'AIA produit par *P. fluorescens* dans la médiation de la lutte biologique contre *Fusarium*.

### 3. Inhibition de la croissance mycélienne des champignons étudiés

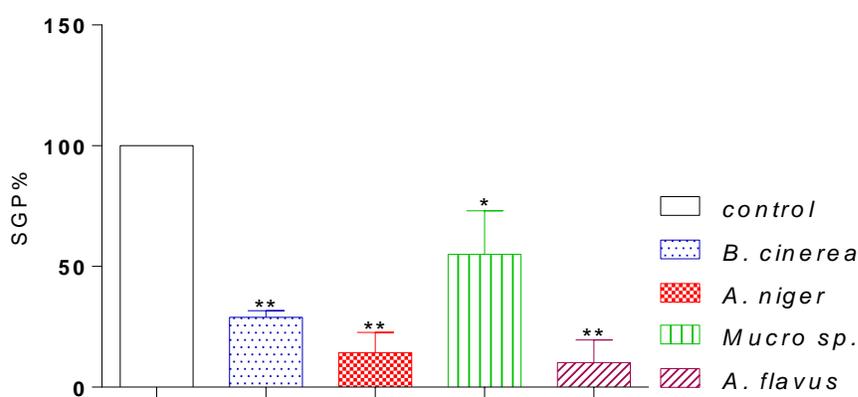
Les résultats ont montré que la souche RhiNA a exercé une inhibition potentielle de la croissance mycélienne une fois confrontée aux champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* et *Mucor* sp. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été obtenu contre le champignon *A. niger* ( $66\% \pm 0.88$ ), suivi par *M. sp.* ( $66\% \pm 1.33$ ). Les PGI (%) obtenus contre *B. cinerea* et *A. flavus* étaient de  $62 \pm 1.33$  et  $58\% \pm 1.33$ , respectivement. Aucune différence significative n'a été constatée entre les différents PGI (%) obtenus contre les quatre champignons (Figure 68).



**Figure 66** : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *B. cinerea*, *A. niger*, *M. sp.*, et *A. flavus*. \*\*\*\* : (différence significative à  $p < 0.0001$ ). Témoin non représenté [0%].

#### 4. Inhibition de la germination des spores (SGP%)

La germination des spores de tous les champignons a été fortement inhibée par la souche RhiNA. La plus forte inhibition a été obtenue contre *A. flavus* avec un succès de germination de seulement  $10.15\% \pm 9.4$ , suivie par *A. Niger* (seulement  $14,32 \pm 8,38\%$  des spores ont arrivé à germées en présence de la souche RhiNA).  $28.92\% \pm 2.72$  des spores de *B. cinerea* ont réussi à germer en présence de l'antagoniste. Les spores du champignon *Mucor* sp. Étaient moins sensibles à la présence de la souche RhiNA, avec un PGI% de  $55,10\% \pm 17,96$  (Figure 69).



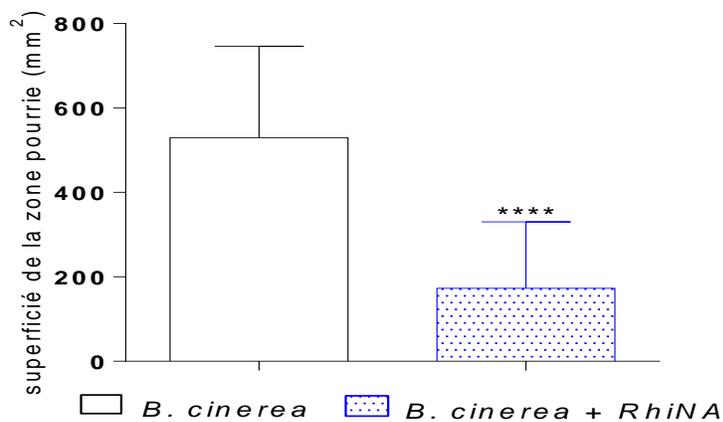
**Figure 67** : pourcentage de germination des spores de *B. cinerea*, *A. niger*, *M. sp.*, et *A. flavus*. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative à ( $p < 0.005$ ). Témoin représenté avec [100%].

#### 5. Inhibition de la pourriture grise due à *B. cinerea* sur fruits de pomme

Dans cette expérience, les fruits de pomme inoculés avec *B. cinerea*-BC1 ont montré des symptômes caractéristiques habituellement générés par ce champignon (pourriture grise). L'antagoniste *P. protegens*-RhiNA a exprimé une forte activité inhibitrice vis-à-vis développement de *B. cinerea* sur les pommes inoculées. Ainsi, une superficie moyenne de  $529,74 \text{ mm}^2$  a été touchée par la propagation fongique en absence de la souche RhiNA, alors que seulement  $172,823 \text{ mm}^2$  de la zone a été affectée en présence de l'antagoniste *P. protegens* RhiNA. Ces proportions correspondent à un pourcentage d'inhibition de 32,62% (Figure 70, 71).

La souche *P. protegens*-RhiNA a montré une forte inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne de *B. cinerea*, *A. Niger*, *A. flavus* et *Mucor* sp. Les

quatre champignons sont connus pour être des parasites de plantes et des producteurs potentiels de mycotoxines (Michailides, 1991 ; Sétamou *et al.*, 1997 ; Calvo *et al.*, 2010 ; Sharma, 2012 ; Peng *et al.*, 2015). De nombreux travaux ont signalé l'utilité des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* dans la lutte biologique contre les organismes phytopathogènes (Janisiewicz et Marchi, 1992 ; Luna-Romero *et al.*, 2000 ; Yunus *et al.*, 2016). Egalement, le champignon *B. cinerea* est connu pour être responsable de pertes pré et post-récolte considérables dans de nombreuses cultures à travers le monde (Montealegre *et al.*, 2010).



**Figure 68** : zone pourrie des fruits de pomme attaquées par *B. cinerea*, en présence et en absence de la souche antagoniste RhiNA, \*\*\*\* : différence significative ( $p < 0,0001$ ).



**Figure 69** : zones pourries des pommes attaquées par *B. cinerea*, en présence (B) et en absence (A) de la souche antagoniste RhiNA.

Dans cette partie, l'application du champignon phytopathogène *B. cinerea* sur les fruits de pomme a abouti à l'expansion de la moisissure grise aux alentours des points d'inoculation. Cependant, l'application de l'isolat *P. protegens*-RhiNA comme agent de biocontrol contre *B. cinerea* a considérablement contribué à l'inhibition de la maladie sur les fruits testés. Pendant le stockage, la contamination entre les fruits adjacents peut souvent avoir lieu, menant à des pertes énormes du produit (Xiao et Kim, 2008). Peighami-Ashnaei *et al.* (2009) ont constaté que la double culture de *Pseudomonas fluorescens* P-5 et *Bacillus subtilis* B-3 réduit, à 60%, la pourriture grise due à *B. cinerea* sur fruits de pommes après 20 jour de l'application. Ils ont également prouvé l'absence de différence significative entre l'effet de ces deux antagonistes et celui de la thiabendazole (une substance antifongique utilisée en agriculture) contre *Botrytis cinerea*. En outre, un autre *Pseudomonas cepacia* a été utilisé par Janisiewicz et Roitman (1988) pour contrôler la propagation de *B. cinerea* dans les pommes. L'application de cette souche a sauvé 20% de la zone endommagée par rapport au témoin.

# Conclusion

**Conclusion et Perspectives :**

Les PGPR occupent progressivement une place importante en agriculture moderne. Dans ce travail, nous avons révélé que la salinité affecte considérablement l'activité lytique de ces microorganismes dans le sol (cellulolytique, protéolytique, lipolytique, uréasique, chitinolytique etc.). Egalement, l'ensemble des autres paramètres physicochimiques d'un sol (pH, contenu en matière organique, humidité) sont affectés à la fois par la salinité et par les activités lytiques des bactéries du sol. De ce point de vu, cette partie apporte des informations d'une grande valeur pour une meilleure compréhension de la distribution des bactéries productrices d'enzymes lytiques et leur interaction avec l'environnement. D'autres travaux détaillés, avec un nombre plus significatif d'échantillons et d'isolats, sont nécessaires pour une meilleure compréhension de l'impact des facteurs abiotiques sur le comportement des bactéries du sol et pour une exploitation plus profonde des résultats obtenus.

Les bactéries productrices d'enzymes lytiques peuvent être exploitées en agriculture. Elles participent à la dégradation de la matière organique et l'enrichissement conséquent des terrains agricoles en éléments nécessaires au développement des plantes. Elles peuvent également être exploitées dans d'autres domaines d'industrie (alimentaires, pharmaceutique, cosmétique etc.).

Certaines pratiques agricoles ont amélioré la production agricole au niveau planétaire. Cependant, l'irrigation excessive et l'application exagérée d'engrais, fongicides, pesticides et herbicides synthétiques a considérablement contribué à la salinisation des sols, la pollution des terrains agricoles et la perturbation de la qualité nutritionnelle des aliments issus de l'agriculture. La deuxième partie de notre travail comporte un isolement et une sélection « *in vitro* » de quelques bactéries du sol, pouvant être d'une utilité comme bioinoculants en agriculture et comme restaurateurs de la croissance des plantes sous stress salin.

Les souches bactériennes *F. johnsoniae*-BEA4, *P. putida*-BEC9, *A. xylosoxidans*-BOA4 et *A. chroococcum*-SEB9 ont été capables de fixer l'azote atmosphérique, de produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques, de solubiliser le phosphore inorganique insoluble, de produire des sidérophores, de synthétiser des quantités importantes d'AIA et d'utiliser l'ACC comme seule source d'azote.

Les extraits aqueux et hydroalcooliques de *O. ficus-indica*, *U. lactuca* et *E. intestinalis* ont considérablement amélioré l'halotolérance des souches précitées. La germination des graines de blé a été également boostée par l'inoculation bactérienne avec les quatre souches et/ou l'application des extraits aqueux d'OFI, UL et EI. Toutefois, d'autres études *in vivo* sont nécessaires pour déterminer l'effet des extraits et/ou des souches sur des stades prolongés de la croissance du blé et leurs impact à long terme, à la fois sur la croissance des plantes et les propriétés du sol.

L'expérience réalisée sur tomate a révélé que les deux bactéries *P. putida*-BEC9 et *A. xylooxidans*-BOA4, avec ou sans extraits (OFI, UL et EI), participent à la stimulation de la germination et de la croissance des plantules de tomate. Les différents traitements, particulièrement certaines associations bactérie-extrait, participent également à la restauration de la croissance des plantules de tomate sous stress salin et améliorent leur capacité à accumuler des acides aminés tels que la proline et l'acide glutamique comme osmoprotecteurs pour se protéger du stress. Cependant, d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer l'effet des souches et des extraits ou de leur association sur le rendement finale des plantes de tomate, leur sécurité et leur valeur nutritionnelle, ainsi que pour la détermination de la nature des autres solutés accumulés comme osmoprotecteurs.

Dans la dernière partie de ce travail, l'isolat *P. protegens*-RhiNA a présenté une remarquable activité inhibitrice de la croissance mycélienne et de la germination des spores de *B. cinerea*, *A. niger*, *A. flavus* et *Mucor* sp. Cette souche a significativement minimisé la propagation de la moisissure grise due à *B. cinerea* sur fruits de pomme. Ainsi, cette souche pourrait être valorisée et efficacement utilisée comme agent de lutte biologique en agriculture, particulièrement dans les processus de conservation post-récolte des fruits et des légumes.

Enfin, ce travail constitue une initiation prometteuse visant le développement d'une procédure de formulation d'engrais biologiques et de sélection de bactéries utiles en agriculture. D'un côté, pour la promotion de la croissance de certaines plantes potentielles en agriculture (céréales : blé ; légumes : tomate) et le biocontrôle de phytopathogènes touchant les produits post-récolte (fruits : pomme). D'un autre côté, pour la restauration de la croissance des plantes (céréales : blé ; légumes : tomate) sous stress salin.

L'optimisation des concentrations d'extraits à appliquer et de leurs effets à long terme (à la fois sur le sol et sur les plantes), la détermination des molécules à rôle osmoprotecteur dans les trois extraits, de leurs valeurs nutritionnelles et leurs contenus en éléments minéraux sont nécessaires pour une meilleure compréhension de leurs mode d'action et de leurs impacts sur l'environnement. Egaleme nt, le dépistage de la sécurité des inocula, de leur survie et leur modalité d'interactions au sein de leur nouvel environnement et de leurs modes d'action sur les plantes inoculées constituent d'autres perspectives au futur.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

**Abbas, T., Pervez M, A., Ayyub, C. M. et Ahmad, R.** 2013. Assessment of morphological, antioxidant, biochemical and ionic responses of salt tolerant and salt-sensitive okra (*Abelmoschus esculentus*) under saline regime, *Pak. J. Life Social Sci.* 11(2): 147–153.

**Abd El-Azeem, S. A. M., Mehana, T. A. et Shabayek, A. A.** 2007. Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. African Crop Science Conference Proceedings, El-Minia, Egypt. 8: 1517-1525.

**Abd-Alla, M.H.** 1998. Growth and siderophore production *in vitro* of *Bradyrhizobium* (Lupin) strains under iron limitation. *Eur. J. soil Biol.* 34:99-104.

**Abid, A., Zouhri, A., Ider, A. et Kholtei, S.** 2009. Valorisation d'un nouveau bio flocculant (extrait de cactus) dans le traitement physico-chimique des rejets liquides chargés en cuivre, en zinc et en matière en suspension. *Rev. Energies Renouv.* 12(2): 321-330.

**Afzal, A. et Asghari, B.** 2008. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Agric. Biol.* 10: 85-88

**Agbodjato, N.A., Noumavo, P.A., Baba-Moussa, F., Salami, H.A., Sina, H., Sèzan, A., Bankolé, H., Adjanooun, A. et Baba-Moussa, L.** 2015. Characterization of Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Maize (*Zea mays* L.) in Central and Northern Benin (West Africa). *Appl. Environ. Soil Sci.* doi:901656, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/901656>

**Ahemad, M.** 2015. Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. *3Biotech.* 5: 111-121

**Ahmad, I., Pitchel, J. and Hayat, S.** 2008. *Plant-Bacteria interaction: Strategies and techniques to promote plant growth.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

**Ahmad, N., Shinwari, Z.K., Bashir, S. et Yasir, M.,** 2013. Function and phylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with GM and non-GM maize. *Pak. J. Bot.* 45(5): 1781-1788.

**Ahmed, M., and Kibret, M.** 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26: 1-20

**Akinci, S., Yilmaz, K. et Akinci, I. E.** 2004. Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to salinity in the early growth stages for agricultural cultivation in saline environments. *J. Environ. Biol.* 25(3): 351-357.

**Alexander, B., Zuberer, D. A.** 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* 12: 39-45.

**Ali, S., Charles, T.C. et Glick, B.R.** 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol. Biochem.* 80: 160-167.

**Almaghrabi, O.A, Massoud, S.I. et Abdelmoneim, T.S.** 2012. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi J. Biol. Sci.* 20: 57-61.

**Alqudah, A. M., Samarah, N. H. et Mullen, R. E.** 2011. Drought Stress Effect on Crop Pollination, Seed Set, Yield and Quality. In: Lichtfouse, E. (ed). *Alternative Farming Systems, Biotechnology, Drought Stress and Ecological Fertilization, Sustainable Agriculture Reviews 6*. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, The Netherlands, pp 193-213.

**Amini, F. et Ehsanpour, A.A.** 2005. Soluble Proteins, Proline, Carbohydrates and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Changes in Two Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Cultivars under *in vitro* Salt Stress. *American J. Biochem. Biotech.* 1(4): 212-216.

**Amjad, M., Akhtar, J., Anwar Ul-Haq, M., Yang, A. Akhar, S.S., et Jacobsen, S.E.** 2014. Integrating role of ethylene and ABA in tomato plants adaptation to salt stress. *Scientia horticulturae*.172: 109-116.

**Amutharaj, P., Sekar, C. et Natheer, S.,** 2013. Development and use of different formulations of pseudomonas fluorescens siderophore for the enhancement of plant growth and induction of systemic resistance against pyricularia oryzae in lowland rice. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 4(2): 831-838.

**Angus, S. et Dargie, T.** 2002. The UK Machair habitat action plan: progress and problems. *Bot. J. Scotl.* 54: 63–74

**Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L.V., Govindasamy, V., Bose, P. et Ramadoss, D.,** 2013. PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 405-425.

**Anthoni, U., Christophersen, C., Hougaard, L. et Nielsen, P. H.** 1991. Quaternary ammonium compounds in the Biosphere-an example of a versatile Adaptive strategy. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 99(1): 1-18.

**Appenroth, K.J., Lenk, G., Goldau, L. et Sharma, R.** 2006. Tomato seed germination: regulation of different response modes by phytochrome B2 and phytochrome A. *Plant Cell Environ.* 29: 701–709.

**Aquilanti, L., Favilli, F. et Clementi, F.** 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1475-1483.

**Arba, M.** 2009. Le cactus *Opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. *Symposium international « agriculture durable en région méditerranéenne (AGDUMED) »*, Rabat, Maroc, 14-16 Mai 2009, pp 215-223.

**Arif, F., Silini, A., Cherif-Silini, H. et Ghoul, M.** 2015. Plant growth promoting and antagonistic traits of indigenous *Pseudomonas* spp. isolated from wheat rhizosphere and *A. Halimus* endosphere. *Eur. Sci. J.* 11(24): 129-148.

**Ashraf M. et Foolad, M.R.** 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Experim. Bot.* 59: 206-216.

**Ashraf, M., Ahmad, M. S. A., Öztürk, M. et Aksoy A.** 2012. Crop Improvement through Different Means: Challenges and Prospects. In: Ashraf, M. et al. (eds). *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 1-15.

**Athar, H. R. et Ashraf, M.** 2009. Strategies for Crop Improvement against Salinity and Drought Stress: An Overview. In: Ashraf, M. (ed). *Salinity and Water Stress*. Springer Science + Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 1-16.

**Avinash, T.S. et Rai, R.V.** 2014. Antifungal activity of plant growth promoting rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. of Cucurbitaceae. In: Kharwar RN et al. (eds.) *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, Springer, India, pp. 257-264

**Aziz, A., Martin-Tanguy, J., et Larher, F.** 1999. Salt stress -induced proline accumulation and changes in tyramine polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci.* 145(2), 83-91.

**Bahena, M.H.R, Salazar, S., Velázquez, E., Laguerre, G. et Peix, A.** 2015. Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria associated with pea (*Pisum sativum* L.) isolated from two agricultural soils. *Symbiosis.* 67, 33-41

**Bakker, P.A.H.M., Lamers, J.G., Bakker, A.W., Marugg, J.D., Weisbeek, P.J. et Schippers, B.** 1986. The role of siderophores in potato tuber yield increase by *Pseudomonas putida* in a short rotation of potato. *Neth. J. Plant Path.* 92:249-256

**Bakthavatchalu, S., Shivakumar, S. et Sullia S.B.** 2012. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluation of their potential as biocontrol agents. *Acta Biologica Indica.* 1(1): 61-67.

**Bal, H. B., Nayak, L., Das, S. and Adhya, T. K.** 2013 Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil.* 366: 93-105.

**Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S. et Kalra, A.** 2012. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 227-235.

**Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. A., Lobo, A. P., García-Villaraco, A. et Mañero, F. J. G.** 2008. Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad, I., Pitchel, J. and Hayat, S. (eds). *Plant-Bacteria interaction: Strategies and techniques to promote plant growth*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 1-17.

**Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Vesentini, N. et Gualtieri, P.** 2008. The World of Algae. In: V. Evangelista et al. (eds). *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. Springer Science + Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 1-15.

**Bartlett, D. H. et Roberts, M. F.** 2004. Osmotic stress. In: Schaechter, M. (ed). *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Ltd, China, pp 754-766.

**Basavaraju, O., Rao, A. R.M. et Shankarappa, T. H.** 2002. Effect of Azotobacter inoculation and nitrogen levels on growth and yield of radish (*Raphanus sativus L.*). In: R. R. C. (ed.), *Biotechnology of Microbes and Sustainable Utilization*. Jabalpur, India. pp. 155-160

**Batra, L. et Manna, M. C.** 1997. Dehydrogenase activity and microbial biomass carbon in salt affected soils of semi-arid regions. *Arid Soil Res. Rehabil.* 3: 293–303.

**Becker, A. et Pühler, A.** 1998. Production of exopolysaccharides. In: Spaink, H.P., Kondorosi, A. et Hooykaas, P.J.J. (eds.) *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 97-118.

**Becking, J.** 2006. The family of *Azotobacteraceae*. *Prokaryotes*. 6: 759-783.

**Belimov, A.A., Dodd, I.C., Safronova, V.I., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T.S., Makarova, N.M., Davies, W.J. et Tikhonovich, I.A.** 2015. Rhizobacteria that produce auxins and contain 1 amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase decrease amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*). *Annals. Appl. Biol.* 167: 11-25

**Beneduzi, A., Ambrosini, A. et Passaglia, L.M.P.** 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35 (4): 1044-1051

**Bensalim, S., Nowak, J. et Asiedu, S.K.** 1998. A Plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Amer. J. Potato. Res.* 75: 145-152

**Bensidhoum, L., Nabti, E., Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., Keel, C., Hartmann, A.,** 2016. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 75 : 38-46.

**Bensidhoum, L., RAI, A., Tabli, N., Kahouadji, N., Khaber, M. et Nabti, E.** 2015. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus sp.* strain S7LiBe under abiotic stress. *IJSRST.* 1(6): 7-14

**Bertrand, J. C., Bonin, P., Caumette, P., Gattuso, J. P., Grégori, G., Guyoneaud, R., Le Roux, X., Matheron, R. et Poly, F.** 2015. Biogeochemical Cycles. In: Bertrand JC et al. (eds.) Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology, Springer Science+Business Media Dordrecht. pp 511-617

**Beyeler, M., Keel, C., Michaux, P. et Haas, D.** 1999. Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 elects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against Pythium root rot. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 225-233

**Bharti, N., Pandey, S.S., Barnawal, d., Patel, V.K., et Kalra, A.** 2016. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific Reports.* 6:34768. doi: 10.1038/srep34768

**Bharucha, U., Patel, K et Trivedi, U.B.,** 2013. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agric. Res.* 2(3): 215-221.

**Bhattacharjee, R. B., Jourand, P., Chaintreuil, C., Dreyfus, B., Singh, A. et Mukhopadhyay, S. N.** 2012. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. *Biol. Fertil. Soils* 48: 173-182.

**Bhattacharyya, P. N. et Jha, D. K.** 2012 Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327–1350.

**Blancard, D.** 2009. Les maladies de la tomate : Quae Editions, France.

**Bohnert, H. J., Su, H. et Shen, B.** 1999. Molecular Mechanisms of Salinity Tolerance. In: Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (eds). *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. R.G. Landes Company, USA, pp 29-60.

**Bot, A. et Benites, J.** 2005. The importance of soil organic matter key to drought-resistant soil and sustained crop production. *FAO soils bulletin*.

**Botsford, J.L., et Lewis, T.A.** 1989. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Production of Glutamic Acid in Response to Osmotic Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 488-494.

**Brady, N.C. et Weil, R.** 2008. *The nature and properties of soils*, 14th edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River NJ.

**Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. et Garrity, G.M.** 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria). Springer, New York.

**Brestic, M. et Zivcak, M.** 2013. PSII Fluorescence Techniques for Measurement of Drought and High Temperature Stress Signal in Crop Plants: Protocols and Applications. In: Rout, G. R. and Das, A. B. (eds). *Molecular Stress Physiology of Plants*. Springer India, India, pp 87-131.

**Bric, J. M., Bostock, R. M. et Silverstone, S. E.** 1991. Rapid in Situ Assay for Indole Acetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (2): 535-538

**Brouillet L., Coursol, F. et Favreau, M.** 2006. VASCAN. The database of Canadian vascular plants. Herbarium Marie-Victorin, Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal <http://data.canadensys.net/vascan/about>

**Bruce, A. C.** 2005 Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia*. 49: 637-644.

**Brulfert J., Ravelomanana D., Gehrig H. et Kluge, M.** 1996. Signification biogéographique des processus d'adaptation photosynthétique. I : l'exemple des Kalanchoe malgaches. In: Lourenço, W.R. (ed). *Biogéographie de Madagascar*. Editions de l'ORSTOM, Paris, France, pp 147-156.

**Brusamarello-Santos, L. C. C., Pacheco, F., Aljanabi, S. M. M., Monteiro, R. A., Cruz, L. M., Baura, V. A., Pedrosa, F. O., Souza, E. M. et Wassem, R.** 2012. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 356: 113-125

**Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A. et Richarme, G.** 1999. Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiol.* 145: 2543-2548.

**Calvo, J., Calvente, V., Orellano, M.E., Benuzzi, D., Sanz, M.I.,** 2010. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on Apple Fruit by Mixtures of Bacteria and Yeast. *Food. Bioprocess. Technol.* 3: 644-650.

**Campos, J.F., Cara, B., Pérez-Martín, F., Pineda, B., Egea, I., Flores, F.B., Fernandez-García, N., Capel, J., Moreno, V., Angosto, T., Lozano, R., et Bolarin, M.C.** 2016. The tomato mutant *ars1* (altered response to salt stress 1) identifies an R1-type MYB transcription factor involved in stomatal closure under salt acclimation. *Plant Biotech. J.* 14: 1345-1356.

**Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias, G. F., Csonka, L. N., Rhodes, D., Ventosa, A., et Nieto, J. J.** 1997. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J. Biol. Chem.* 272: 25794-25801.

**Cappucino, J.C., et Sherman, N.,** 1992. Negative staining. *Microbiology: A laboratory Manual*. 3: 125-179.

**Carrim, A.J.I., Barbosa, E.C., et Gonçalves Vieira, J.D.,** 2006. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49: 353-359.

**Cavatte, P. C., Martins, S. C. V., Morais, L. E., Silva, P. E. M. and DaMatta, F. M.** 2012. The Physiology of Abiotic Stresses. In: Fritsche-Neto, R. and Borém, A. (eds.), *Plant Breeding for Abiotic Stress Tolerance*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, pp 21- 51.

**Chaudhary, R. C., Manda, J. S. and Tran, D. V.** 2003. Guide d'identification des contraintes de terrain à la production de riz. FAO, Rome.

**Chávez-Parga Del Carmen, M., Munguia-Franco, A., Aguilar-Torres, M. et Escamilla-Silva, E. M.** 2012. Optimization of Zeaxanthin Production by Immobilized *Flavobacterium* sp. Cells in Fluidized Bed Bioreactor. *Adv. Microbiol.* 2(4): 598-604.

**Choudhary, D. K. and Varma, A.** 2016. *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer Science+Business Media, Singapore.

**Christensen, W. B.** 1946. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J. Bacteriol.* 52(4): 461–466.

**Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H. et Sa, T.** 2005. isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1970-1974.

**Claussen, W.** 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.* 168: 241-248.

**Crespo, J., Boiardi, J. et Luna, M.** 2011. Mineral phosphate solubilization activity of *gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agric Sci.* 2:16-22.

**Dadolahi-Sohrab, A., Nikvarz, A., Nabavi, S.M.B., Safahyeh, A. et Ketal-Mohseni, M.** 2011. Environmental monitoring of heavy metals in seaweed and associated sediment from the Strait of Hormuz, I.R. Iran. *WJFMS.* 3(6):576–589

**Daffonchio, D., Cherif, A. et Borin, S.** 2000. Homoduplex and Heteroduplex Polymorphisms of the Amplified Ribosomal 16S-23S Internal Transcribed Spacers Describe Genetic Relationships in the “*Bacillus cereus* Group”. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5460–5468.

**Darrah PR.** 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. In: Barrow, N. J. (Ed). *Plant nutrition-from genetic engineering to field practice.* Kluwer Academic Publishers, USA, pp 3-22.

**Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R. et Smith, D.L.** 1998. Plant growth promoting rhizobacteria accelerates nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. *Plant Soil.* 200: 205-213.

**De Vleeschauwer, D., Bakker, P. A. H. M., Djavaheri, M. et Hofte, M.** 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol.* 148: 1996-2012

**Debouba, M., Gouia, H., Valadier, M.H., Ghorbel, M.H., et Suzuki, A.** 2006. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grow under high or low nitrate medium. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 409-419.

**Dhanasekar, R., Viruthagiri, T. et Sabarathinam, P.L.** 2003. Poly (3-hydroxy butyrate) synthesis from a mutant strain *Azotobacter vinelandii* utilizing glucose in a batch reactor. *Biochem. Eng. J.* 16(1): 1–8.

**Dickson, D. M. J., Jones, R. G. W. et Davenport, J.** 1982. Osmotic adaptation in *Ulva lactuca* under fluctuating salinity regimes. *Planta*. 155: 409-415

**Dikilitas, M. et Karakas, S.** 2012. Behavior of Plant Pathogens for Crops Under Stress During the Determination of Physiological, Biochemical, and Molecular Approaches for Salt Stress Tolerance. In: Ashraf, M. et al. (eds). *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 417-441.

**Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y. K., Subila, K. P. et Aravind, R.** 2015. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiol. Res.* 173: 34-43.

**Dombrowski, J.E.** 2003. Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiol.* 132: 2098-2107.

**Dowling, D.N. et O'Gara, F.,** 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *TIBTECH.* 12: 133-141.

**Duggan, J.M., Goldstein, S.J., Chenoweth, C.E., Kauffman, C.A. et Bradley, S.F.** 1996. *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 23(3): 569-76.

**Dutta, S. et Podile, A. R.** 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Crit. Rev. Microbiol.* 36(3): 232–244

**Edwards, D. M., Reed, R. H. et Stewart, W. D. P.** 1988. Osmoacclimation in *Enteromorpha intestinalis*: long-term effects of osmotic stress on organic solute accumulation. *Mar. Biol.* 98: 467-476

**Edwards, D.M., Reed. R.H., Chudek, J.A., Foster, R. et Stewart, W. D. P.** 1987. Organic solute accumulation in osmotically stressed *Enteromorpha intestinalis*. *Mar. Biol.* 95: 583-592

**Egamberdieva, D. et 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 Science+Business Media, New York, pp. 73-96.

**Egamberdieva, D.** 2009. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta. Physiol. Plant.* 31: 861–864

**Eivazi, F. et Tabatabai, M. A.** 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil. Biol. Biochem.* 20: 601-606

**El-Guizani, T., Tlili, N. et Triki, S.** 2012. Fruit characteristics and chemical proprieties of juice and seeds of three *Opuntia ficus indica* cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 11(6): 1460-1464.

**El-Iklil, Y., Karrou, M., et Benichou, M.** 2000. Salt stress effect on epinasty in relation to ethylene production and water relations in tomato. *Agron.* 20: 399-406.

**Elmerich, C.** 2007. Historical perspective: from Bacterization to endophytes. In: Elmerich, C. and Newton, W. E. (eds.). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–20.

**El-Mostafa, K., EL Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M. S., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B. et Malki, M. C.** 2014. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules.* 19: 14879-14901

**Elsayed B. et El-Nady, M.F.** 2013. Bioremediation of pendimethalin-contaminated soil. *African J. Microbiol. Res.* 7 (21): 2574-2588.

**El-Tarabily, K.A.** 2008. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil.* doi:10.1007/s11104-008-9616-2

**Ember, M. M., Jaimie, L. G., Joseph, C., Morina, B. F. et Rima, B. F.** 2014. Salinity affects microbial activity and soil organic matter content in tidal wetlands. *Glob. Change Biol.* 20: 1351-1362.

**Endo, A., Okamoto, M. et Koshiba, T.** 2014. ABA Biosynthetic and Catabolic Pathways. In: Zhang DP (ed.) Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling. Springer Science+Business Media Dordrecht. pp 21-46.

**Etesami, H., Alikhani, H. A. et Hosseini, H. M.** 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*. 2: 72-78.

**Etesami, H., Hosseini, H. M., Alikhani, H. A., Mohammadi, L.** 2014. Bacterial Biosynthesis of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase and Indole-3-Acetic Acid (IAA) as Endophytic Preferential Selection Traits by Rice Plant Seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 33: 654-670.

**Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G.P., Castellari, M. et Galassi, S.** 2002. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with 9-Fluorenylmethyl-Chloroformate. *J. Chromato. Sci.* 40: 14-18.

**FAO.** 2012-Alexandratos, N. et J. Bruinsma. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.

**FAO.** 2002. Rapport du Sommet mondial de l'alimentation : cinq ans après. Rome, 10-13 juin 2002. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/005/y7106f.pdf>

**Fekete, F.A., Spence, J.T. et Emery, T.** 1983. Siderophores produced by nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii* OP in iron-limited continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1297-1300.

**Feng, J., et Barker, A.V.** 2008. Ethylene evolution and ammonium accumulation by tomato plants under water and salinity stresses. *J. Plant nutrition.* 15: 2471-2490.

**Figueiredo, M. V. B., Seldin, L., de Araujo, F. F. et Mariano, R. L. R.** 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In: Maheshwari, D. K. (ed). *Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, pp 21-43.

**Figueux, M.** 1859. Etude sur le cactus *Opuntia*. VICTOR ROZIER EDITEUR, Paris, France.

**Fougère, F., Le Rudulier, D., et Streeter, J.G.** 1991. Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 96: 1228-1236.

**Fourest, E. et Volesky, B.** 1997. Alginate properties and heavy metal biosorption by marine algae. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 67: 215–226.

**García, C., Hernández, T., Costa, F. et Ceccanti, B.** 1994. Biochemical parameters in soils regenerated by addition of organic wastes. *Waste. Manage. Res.* 12: 457-466.

**Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J.P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R. et Redondo-Nieto, M.,** 2016. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. PLoS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0150183.

**Ghassemi, F., Jakeman, A. J., et Nix, H. A.,** 1995. Salinization of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Center for resource and environmental studies, The Australian National University, Canberra, Australia.

**Ghoul, M.** 1990. Halotolerance de *Escherichia coli*, Effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de doctorat, université de Rennes I, U.F.R. de PHARMACIE. Soutenue publiquement le : 2 juillet 1990.

**Ghoul, M., Bernard, T. et Cormier, M.** 1990. Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(2): 551-554.

**Ghoul, M., Minet, J., Bernard, T., Dupray, E. et Cormier, M.** 1995 Marine Macroalgae as a Source for Osmoprotection for *Escherichia coli*. *Microb. Ecol.* 30: 171-181.

**Glick, B.R.** 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169:30-39.

**Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. et Duan, J.** 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 329-339.

**Glick, B. R.** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117

**Glick, B. R., Ghosh, S., Liu, C. et Dumbroff, E. B.** 1997. Effects of a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium (*Pseudomonas putida* GR12-2) on the Early Growth of Canola Seedlings. In: A. A. and W. Y. (eds.) *Biology of Root Formation and Development*. Plenum Press, New York. pp. 253-258

**Göller, K., Ofer, A. et Galinski, E.A.** 1998. Construction of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS. Microbiol. Lett.* 161: 293-300.

**Golubyatnikov, L. L., Mokhov, I. I. et Eliseev, A. V.** 2013. Nitrogen Cycle in the Earth Climatic System and Its Modeling. *Atmospheric and Oceanic Physics.* 49(3): 229–243

**Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A. and Tiwari, S.** 2016. Alleviation of Mercury Toxicity in Wheat by the Interaction of Mercury-Tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J. Plant. Growth Regul.* doi: 10.1007/s00344-016-9598-x

**Goodfellow, M. et Williams, S.T.** 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.

**Götz, M., Nirenberg, H., Krause, S., Wolters, H., Draeger, S., Buchner, A., Lottmann, J., Berg, G. et Smalla, K.** 2006. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 58: 404–413.

**Govindarajan, M., Balandreau, J., Kwon, S. W., Weon, H. Y. et Lakshminarasimhan, C.** 2008. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. *Microb. Ecol.* 55: 21-37

**Govindasamy, V., Senthilkumar, M. et Annapurna, K.** 2015. Effect of mustard rhizobacteria on wheat growth promotion under cadmium stress: characterization of *acdS* gene coding ACC deaminase. *Ann. Microbiol.* 65: 1679-1687

**Gravel, V., Antoun, H. et Twaddell, R.J.** 2007) Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 457-462

**Gray, E. J. et Smith, D. L.** 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil. Biol. Biochem.* 37: 395–412

**Griffith M. P.** 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *Amer. J. Botany.* 91(11): 1915-1921.

**Guillaume P., Valérie S., Camille J. Amira M., Marianne G. et Thierry M.** 2011. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotech. Bioprocess Eng.* 16(5): 937-945.

**Gururani, M.A., Upadhyaya, C.P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A. et Park, S.W.** 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *J. Plant Growth Regul.* 32: 245-258

**Gzik, A.** 1996. Accumulation of proline and pattern of  $\alpha$ -amino acids in sugar beets plants in response to osmotic, water and salts stress. *Environ. Experim. Botany.* 36: 29-38.

**Habib, S. H., Kausar, H., Saud, H.M., Ismail, M. R. et Othman, R.** 2015. Molecular Characterization of Stress Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Growth Enhancement of Rice. *International Journal of Agriculture and Biology.* doi: 10.17957/IJAB/15.0094

**Habibi, S., Djedidi, S., Prongjunthuek, K., Mortuza, M. D. F., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto, H. et Yokoyoma, T.** 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil.* 379: 51-66.

**Habibi, Y.** 2004. Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie, les polysaccharides pariétaux, caractérisation et modification chimique. Thèse de doctorat de l'université Joseph Fourier et de l'université Cadi Ayyad. Soutenue publiquement le 10/05/2004.

**Hadj Sadok, T., Aid F., Bellal, M., Abdul Hussain, M. S.** 2008. Composition Chimique des Jeunes Cladodes d'*Opuntia ficus indica* et Possibilités de Valorisation Alimentaire. *Agr. Pract. Sci.* 1(2): 39-48.

**Hagan, R.M.** 1955. Factors affecting soil moisture-plant growth relations. In: *Report 14th Int. Hortic. Cong.* The Hague, The Netherlands, pp. 82–102.

**Hall, A.E., Foster, K.W. et Waines, J.G.** 1979. Crop Adaptation to Semi-Arid Environments. In: A. E. Hall et al. (eds). *Agriculture in Semi-Arid Environments*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, pp 148-179.

**Han, Y., Wang, R., Yang, Z., Zhan, Y., Ma, Y., Ping, S., Zhang, L., Lin, M. et Yan, Y.** 2015. 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase from *Pseudomonas stutzeri* A1501 Facilitates the Growth of Rice in the Presence of Salt or Heavy Metals. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(7): 1119-1128

**Hao, Y., Charles, T.C. et Glick, B.R.** 2010. ACC deaminase increases the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of commercial canola cultivars. *FEMS Microbiol. Lett.* 307:185-190.

**Hardie, M. and Doyle, R.** 2012 Measuring Soil Salinity. In: S. S. and C. T. A. (eds.) *Plant Salt Tolerance: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology vol 913. Springer Science+Business Media LLC, Netherlands. pp. 415-425

**Hare, P. D. and Cress, W.A.** 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79-102.

**Hartmann, A.** 1996. Biotechnological aspects of diazotrophic bacteria associated with rice In: Rahman et al. (eds.) *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*. Springer Science+Business Media Dordrecht. pp 211-224

**Hasan, M., Bano, A., Hassan, S. G., Iqbal, J., Awan, U., Rong-ji, D. et Khan, K. A.** 2014. Enhancement of Rice Growth and Production of Growth-Promoting Phytohormones by Inoculation with *Rhizobium* and Other Rhizobacteria. *World Appl. Sci. J.* 31(10): 1734-1743.

**Hassan, W., Bashir, S., Ali, F., Ijaz, M., Hussain, M. et David, j.** 2016. Role of ACC-deaminase and/or nitrogen fixing rhizobacteria in growth promotion of wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium pollution. *Environ. Earth Sci.* doi: 10.1007/s12665-015-4902-9

**Hassan, W., Hussain, M., Bashir, S., Shah, A. N., Bano, R., David, J.** 2015. ACC-deaminase and/or nitrogen fixing rhizobacteria and growth of wheat (*Triticum Aestivum* L.) *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15(1): 232-248

**Henry, D. et Speert, D.** 2011. Pseudomonas. In: Versalovic, J., Carroll, K., Funke, G., Jorgensen, J., Landry, M. et Warnock, D. (eds). *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition.* ASM Press, Washington, DC. pp 677-691. doi: 10.1128/9781555816728.ch40

**Hernández-Urbiola, M.I., Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Quevedo, G. Rojas-Molina, J.I., Cortes M.E. et Rodríguez-García, M.E.** 2010. Study of Nutritional Composition of Nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at Different Maturity Stages. *Open Nutr. J.* 4: 11-16.

**Hider, R.C. et Kong, X.,** 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Royal Society Chem.* 27: 637-657.

**Hine, P. W., et Lees, H.** 1976. The growth of nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* in continuous culture under intense aeration. *Can. J. Microbiol.* 22: 611-618.

**Höfte, M. et Bakker, P. A. H. M.** 2007 Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Varma A, Chincholkar SB (Eds.) *Soil Biology, Vol 12. Microbial Siderophores.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 121-133

**Hossain, M.M. et Nonami, H.** 2012. Effect of salt stress on physiological response of tomato fruit grown in hydroponic culture system. *Hort. Sci.* 39(1): 26-32.

**Howell, C.R., Beier, R.C. et Stipanovic, R.D.** 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control *Pythium premergens* Damping-off by the bacterium. *Phytopathol.* 78(8): 1075-1078.

**Huang, P., Patel. M., Santagata, M.C. et Bobet, A.** 2009. Classification of Organic Soils. Publication FHWA/IN/JTRP-2008/02, Joint Transportation Research Program, Indiana Department of Transportation and Purdue University, West Lafayette, *Indiana*. doi: 10.5703/1288284314328

**Hueso, S., Hernández, T. et García, C.** 2011. Resistance and resilience of the soil microbial biomass to severe drought in semiarid soils: The importance of organic amendments. *Appl. Soil Ecol.* 50: 27-36.

**Husen, E., Wahyudi, A.T., Suwanto, A. et Giyanto.** 2011. Growth enhancement and disease reduction of soybean by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing *Pseudomonas*. *Amer. J. Appl. Sci.* 8:1073-1080.

**Hynes, R. K., Leung, G. C. Y., Hirkala, D. L. M. et Nelson, L. M.** 2008. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. *Can. J. Microbiol.* 54(4):248-258.

**Idso, C.D.** 2011. Estimates of global food production in the year 2050: will we produce enough to adequately feed the world? Center for the Study of Carbon Dioxide and Global Chang. [www.co2science.org](http://www.co2science.org)

**Iniguez, A. L., Dong, Y. et Triplett, E. W.** 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17(10): 1078-1085.

**Islam, F., Yasmeen, T., Ali, Q., Ali, S., Arif, M. S., Hussain, S. et Rizvi, H.** 2014. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. *Ecotox. Environ. Saf.* 104: 285-293.

**Jagadeesh, K.S., Kulkarni, J.H. et Krishnaraj, P.U.** 2001. Evaluation of the role of fluorescent siderophore in the biological control of bacterial wilt in tomato using Tn5 mutants of fluorescent *Pseudomonas* sp. *Curr. Sci.* 81: 882-883.

**James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J. I. et Dobereiner, J.** 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* 45(275): 757-766

**Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M. et Foolad, M. R.** 2011. Gene expression profiling of plants under salt stress. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 30(5): 435–458.

**Janisiewicz, W.J. et Marchi, A.** 1992. Control of storage rot on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant. Dis.* 76: 555-560.

**Janisiewicz, W.J., Roitman, J.** 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* 78 : 1697-1700.

**Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Brian, X., Esquerré-Tugayé, M.T. et Dumas, B.** 2010. Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the Jasmonic acid signaling pathway. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2010/52529

**Jha, C. K. et Saraf, M.** 2012. Hormonal Signaling by PGPR Improves Plant Health under Stress Conditions. In: Maheshwari, D. K. (ed). *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, pp 119-140.

**Jha, P. et Kumar, A.** 2009. Characterization of Novel Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from Wheat *Plant. Microb. Ecol.* 58: 179–188.

**Jiménez-Escrig, A. et Sánchez-Muniz, F.J.** 2000. Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr. Res.* 20(4):585–598

**Johnson, H.E., Broadhurst, D., Goodacre, R. et Smith, A.R.** 2003. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochem.* 62: 919-928.

**Jouss, A., Schuldes, J., Keel, C., Maurhofer, M., Daniel, R., Scheu, S. et Thuermer, A.** 2014. Full-genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. *Genome. Announc.* doi:10.1128/genomeA.00322-14.

**Kader, M.A., Mian, M.H. et Hoque, M. S.** 2002. Effects of *Azotobacter* inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat. *J. Biol. Sci.* 2(4): 259-261

**Kahlon, R.S.** 2016. *Pseudomonas*: Genome and Comparative Genomics, in: Kahlon, R.S. (Ed.), *Pseudomonas*: Molecular and Applied Biology. Springer International Publishing., Switzerland, pp. 127-191.

**Kamble, K.D., Galerao, D.K.** 2015. Indole acetic acid production from *Pseudomonas* species isolated from rhizosphere of garden plants in Amravati. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 4(1): 23-31.

**Kamei, A. Dolai, A.K. et Kamei, A.** 2014. Role of Hydrogen Cyanide Secondary Metabolite of Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biopesticides of Weeds. *Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary.* 14(6): 109-112.

**Kannahi, M. et Senbagam, N.** 2014. Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity. *J. Chem. Pharm. Res.* 6: 1142-1145.

**Karima, K.** 2007. Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri–Constantine, 04 / SN / 2007. Soutenu publiquement le: 09 / 09 / 2007.

**Karnwal, A.** 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* 91(1): 61-63.

**Karthick. P., Siva Sankarb, R., Kaviarasanb, T. et Mohanrajua, R.** 2012. Ecological implications of trace metals in seaweeds: bioindication potential for metal contamination in Wandoor, South Andaman Island. *Egyptian J. Aquat. Res.* 38:227–231.

**Kathiresan, K., Saravanakumar, K., Anburaj. R., Gomathi, V., Abirami. G., Sahu. S.K. et Anandhan, S.** 2011. Microbial enzyme activity in decomposing leaves of mangroves. *Intl. J. Adv. Biotech. Res.* 2(3): 282-389.

**Kaur, G. et Reddy, M. S.** 2015. Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping Cycle and Economics. *Pedosphere*. 25(3): 428–437.

**Kavitha, T., Nelson, R. et Jesi, S. J.** 2013. Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *macrophomina phaseolina*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 4: 177 – 186.

**Kaya, C., Tuna, A. L. et Yokas, I.** 2009. The Role of Plant Hormones in Plants Under Salinity Stress. In: A. M. *et al.*, (eds.) Salinity and Water Stress, Springer Science+Business Media, Netherlands. pp. 45-50

**Kaymak, H. C., Guvenc, I., Yarali, F. et Donmez, M. F.** 2009. The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus L.*) seeds under saline conditions. *Turk. J. Agric. Forest.* 33:173–179.

**Khales, A. and Baaziz, M.** 2006. Etude des peroxydases d'écotypes d'opuntia ficus indica L. en relation avec le développement dans des conditions de stress salin. *Deuxième Congrès International de Biochimie*. Agadir (Maroc), 9, 10, 11, et 12 Mai 2006, pp 133-136.

**Khan, A.L., Halo, B.A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A. et Lee, I.J.** 2016. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic J. Biotechnol.* 21: 58-64.

**Khare, E. et Arora, N.K.** 2010. Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in Suppression of Charcoal Rot Disease of Chickpea. *Curr. Microbiol.* 61: 64-68.

**Kim, K., Jang, Y.J. Lee, S.M., Oh, B.T. Chae, J.C. et Lee K.J.** 2014. Alleviation of Salt Stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in Tomato and *Arabidopsis* is accompanied by Up-Regulation of Conserved Salinity Responsive Factors in Plants. *Mol. Cells.* 37(2): 109-117.

**Kirst G. O.** 1996. Osmotic adjustment in phytoplankton and macroalgae, The Use of Dimethylsulfoniopropionate (DMSP). In: Kiene R. P. et al. (ed). *Biological and*

*Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds*. Plenum Press, New York, USA, pp 121-129.

**Kisten, A.G., Kurdish, I.K., Bega, Z.T. et Tsarenko, A.Y.** 2006. The effect of several factors on the growth of pure and mixed cultures of *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42: 278-283.

**Kizildag, N., Sagliker, H.A., Kutlay A, Cenkseven, Ş. et Darici, C.** 2012. Some soil properties and microbial biomass of *Pinus maritima*, *Pinus pinea* and *Eucalyptus camaldulensis* from the Eastern Mediterranean coasts. *Eurasia. J. Biosci.* 6: 121-126.

**Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. et Schroth, M.N.** 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* 286: 885-886.

**Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L. et Roldán, A.** 2007. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Appl. Soil Ecol.* 35:480–487.

**Kokalis–Burelle, N., Vavrina, C.S., Roskopf, E.N. et Shelby R.A.** 2002. Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil.* 238: 257-266.

**Kopečný, J., Hodrová, B. et Stewart, C. S.** 1996. The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 195-198.

**Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T. ڤ Renaut, J.** 2011. Plant proteome changes under abiotic stress—Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Prot.* 7 4: 1301-1322.

**Krishnaraj, P.U. et Dahale, S.** 2014. Mineral Phosphate Solubilization: Concepts and Prospects in Sustainable Agriculture. *Proc. Indian. Natn. Sci. Acad.* 80:389-405.

**Kumar, A., Kumar, K., Kumar, P., Maurya, R., Prasad, S. et Singh, S. K.** 2014. Production of indole acetic acid by *Azotobacter* strains associated with mung bean. *Plant Arch.* 14(1): 41-42.

**Kumar, N. R., Krishnan, M., Kandeepan, C. et Kayalvizhi, N.** 2014. Molecular and functional diversity of PGPR fluorescent *Pseudomonas* isolated from rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 5(3): 490-505

**Kumar, S., Tamura, K. Nei,** 2004. MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5(2), 150-163.

**Kumar, V., Behl, R. K. et Narula, N.** 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiol. Res.* 156: 87-93.

**Kumar, V. et Narula, N.** 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fertil. Soils.* 28: 301-305.

**Lamosa, P., Martins, L. O., Da Costa, M. S. et Santos, H.** 1998. Effects of Temperature, Salinity, and Medium Composition on Compatible Solute Accumulation by *Thermococcus spp.* *Appl. Environ. Microb.* 64(10): 3591–3598.

**Landa, B.B., Montes-Borrego, M. et Navas-Cortés, J.A.** 2013. Use of PGPR for controlling soilborne fungal pathogens: assessing the factors influencing its efficacy. In: Maheshwari DK (ed.) *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 259-292.

**Lapinskas, E. et Motuzienė, L. P.** 2006. The influence of soil acidity on symbiotic and non-symbiotic nitrogen fixation. *Zemdirbyste.* 93(4): 210-220.

**Lashkari, A. et Bannayan, M.** 2012. Agrometeorological study of crop drought vulnerability and avoidance in northeast of Iran. *Theor. Appl. Climatol.* doi:10.1007/s00704-012-0769-9

**Laskar, F., Sharma, G. D. et Deb, B.** 2013. Characterization of Plant Growth Promoting Traits of Diazotrophic Bacteria and their Inoculating Effects on Growth and Yield of Rice Crops. *Global Res. Anal.* 2(4): 2277-8160.

**Laslo, E., György, E., Mathé, I., Mara, G., Tamas, E., Abraham, B. et Lanyi, S.** 2011. Replacement of the traditional fertilizer with microbial technology: isolation and characterization of beneficial nitrogen fixing rhizobacteria. *U. P. B. Sci. Bull.* 73(SB): 109-114.

**Lavakush, Yadav, J. et Verma, J. P.** 2012. Isolation and Characterization of Effective Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Rice Rhizosphere of Indian Soil. *Asian J. Biol. Sci.* 5: 294-303. doi:10.3923/ajbs.2012.294.303

**Le Marrec, C.** 2011. Responses of Lactic Acid Bacteria to Osmotic Stress. In: Tsakalidou, E. and Papadimitriou, K. (eds). *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria, Food Microbiology and Food Safety*. Springer Science+Business Media, LLC, USA, pp 67-90.

**Le Rudulier, D., Pocard, J. A., Boncompagni, E. et Poggi M. C.** 1996. Osmoregulation in bacteria and Transport of onium compounds. In: Kiene R. P. et al. (ed). *Biological and Environmental Chemistry of DMSO and Related Sulfonium Compounds*. Plenum Press, New York, USA, pp 253-263.

**Lees, H. et Postgate, J. R.** 1973. The behavior of *Azotobacter chroococcum* in oxygen- and phosphate-limited chemo- stat culture. *J. Gen. Microbiol.* 75: 161-166.

**Lévy, E., Eyal, Z., Chet, I., et Hochman, A.** 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40, 163-171.

**Leyval, C. et Berthelin, J.** 1989. Interaction between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium agrobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil.* 117: 103-110.

**Lim T. K.** 2012. *Opuntia ficus indica*. In: Lim, T. K. (ed). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volume 1, Fruits*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 417-441.

**Liu, Y., Shi, Z., Yao, L., Yue, H., Li, H. et Li, C.** 2013. Effect of IAA produced by *Klebsiella oxytoca* Rs-5 on cotton growth under salt stress. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59: 59-65.

**López-Gómez, M. et Lluch G.** 2012. Trehalose and Abiotic Stress Tolerance. In: Ahmad P. et Prasad M.N.V. (eds). *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity*. Springer Science+Business Media, LLC, USA, 253-265.

**Lorck, H.**, 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* 1: 142-146.

**Loudyi D. W.** 1995. Quelques espèces fruitières d'intérêt secondaire cultivées au Maroc. In : Llácer G., Aksoy U. and Mars M. (eds). *Underutilized fruit crops in the Mediterranean region*. CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp 47-62.

**Lovelli, S., Scopa, A., Perniola, M., Di Tommaso, T. et Sofo, A.** 2012. Abscisic acid root and leaf concentration in relation to biomass partitioning in salinized tomato plants. *J. Plant. Physiol.* 169(3): 226-233.

**Lugtenberg B et Kamilova F.** 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63:541-556.

**Luna-Romero, I.J., Carvajal-Moreno, M., Flores-Martínez, A. et Ferrera-Cerrato, R.** 2000. Possibility of Biological Control of *Aspergillus flavus* with *Pseudomonas fluorescens* on Maize Ear. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 18(1). 50-54.

**Ma, Y., Rajkumar, M. et Freitas, H.** 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J. Env. Manag.* 90: 831-837.

**MacArtain. P., Cir, G., Brooks. M., Campbell, R. et Rowland, I.** 2007. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr. Rev.* 65(12): 535–543.

**Madkour, M. A., Smith, L.T. et Smith, G. M.** 1990. Preferential Osmolyte Accumulation: A Mechanism of Osmotic Stress Adaptation in Diazotrophic Bacteria. *App. Environ. Microb.* (56)9: 2876-2881.

**Maggio, A., Raimondo, G., Martino, A. et De Pascale, S.** 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environ. Experim. Botany.* 59(3): 276-282.

**Malainine ME, Alain Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, R. et Vignon, M. R.** 2003. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 51: 77-83.

**Malathi, P. et Viswanathan, R.** 2013. Role of Microbial Chitinase in the Biocontrol of Sugarcane Red Rot Caused by *Colletotrichum falcatum* Went. *EJBS*. 6(1): 17-23.

**Malboobi, M.A, Behbahani, M., Madani, H., Owlia, P., Deljou, A., Yakhchali, B., Moradi, M. et Hassanabadi, H.** 2009. Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1479-1484.

**Malik, D.K. et Sindhu, S.S.** 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 17(1): 25-32.

**Malik, K. A., Bilal, R., Mehnaz, S., Rasul, G., Mirza, M. S. et Ali, S.** 1997. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil*. 194: 37–44.

**Manfredi, R., Nanetti, A., Ferri, M. et al.** 2000. *Pseudomonas* spp. complications in patients with HIV disease: An eight-year clinical and microbiological survey. *Eur. J. Epidemiol.* 16, 111. doi:10.1023/A:1007626410724

**Marschner P., Yang C. H., Lieberei, R. et Crowley, D. E.** 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1437-1445.

**Mayak, S., Tirosh, T. et Glick, B.R.** 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 42(6): 565-572.

**McBride, M.J.** 2004. Cytophaga-*Flavobacterium* gliding motility. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7(1-2): 63-71.

**McCallan, S.E.A. et Weedon, F.R.** 1940. Toxicity of ammonia, chlorine, hydrogen cyanide, hydrogen sulfide, and sulfide dioxide gases. II fungi and bacteria. *Contrib. Boyce. Thompson Inst.* 11: 331-342.

**McMahon, A.M., Doyle, E.M., Brooks, S. et O'Connor, K.E.** 2007. Biochemical characterization of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enz. Microbial Technol.* 40(5): 1435–1441.

**McNeil, S. D., Nuccio, M. L. et Hanson, A. D.** 1999. Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance. *Plant Physiol.* 120 : 945-949.

**Mena-violante, H.G. et Olalde-Portugal, V.** 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae.* 113(1): 103-106.

**Michailides, T.J.** 1991. Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from stone fruits from California and Chile. *Plant Dis.* 75: 373-380.

**Miethke, M. et Marahiel, M.A.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:413-451

**Milošević, N., Tintor, B., Protić, R., Cvijanović, G. et Dimitrijević, T.** 2012. Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. *Romanian Biotechnol. Lett.* 17(3): 7352-7357

**Mirza, M. S., Mehnaz, S., Normand, P., Prigent-Combaret, C., Moëgne-Loccoz, Y., Bally, R. et Malik, K. A.** 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol. Fertil. Soils.* 43: 163-170

**Mitchell, R. et Alexande, M.** 1963. Lysis of soil fungi by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 6: 169-177.

**Mohamed, S., Hashim, S.N. et Rahman, H.A.** 2012. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci. Tech.* 23: 83-96.

**Montealegre, J.R., López, C., Stadnik, M.J., Henríquez, J.L., Herrera, R., Polanco, R., Piero, R.M.D. et Pérez, L.M.** 2010. Control of grey rot of apple fruits by biologically active natural products. *Trop. Plant Pathol.* 35(5): 271-276.

**Moretti, M., Gilardi, G., Gullino, M. L. et Aribaldi, A.** 2008. Biological Control Potential of *Achromobacter xylosoxidans* for suppressing *Fusarium* wilt of Tomato. *Int. J. Bot.* 4(4): 369-375.

**Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Kim, G., Anterola, A., Bender, K. et Peters, R.J.** 2009. Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Lett.* 583:475-80.

**Murshed, R. Lopez-Lauri, F. et Sallanon, H.** 2014. Effect of salt stress on tomato fruit antioxidant systems depends on fruit development stage. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 20(1): 15-29.

**Nabti, E., Sahnoune, M., Adjrad, S., Dommelen, A. V., Ghoul, M., Schmid, M. et Hartman, A.** 2007. A Halophilic and Osmotolerant *Azospirillum brasilense* Strain from Algerian Soil Restores Wheat Growth under Saline Conditions. *Eng. Life Sci.* 7(4): 354-360.

**Nabti, E., Sahnoune, M., Ghoul, M., Fischer, D., Hoffmann, A., Rothballer, M., Schmid, M. et Hartman, A.** 2010. Restoration of Growth of *Durum* Wheat (*Triticum durum* var. Waha) Under Saline Conditions Due to Inoculation with the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* NH and Extracts of the Marine Alga *Ulva lactuca*. *J. Plant. Growth. Regul.* 29: 6–22.

**Nagata, S., Adachi, K. et Sano, H.** 1996. NMR analyses of compatible solutes in a halotolerant *Brevibacterium sp.* *Microbiol.* 142: 3355-3362.

**Naqqash, T., Hameed, S., Imran, A., Hanif, M.K., Majeed, A. et van Elsas, J.D.** 2016. Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria. *Front. Plant Sci.* 7:144.

**Nascimento, F., Brigido, C., Alho, L., Glick, B.R. et Oliveira, S.** 2012. Enhanced chickpea growth-promotion ability of a *Mesorhizobium* strain expressing an exogenous ACC deaminase gene. *Plant Soil.* 353:221-230.

**Naureen, Z., Hafeez, F. Y., Hussain, J., Al Harrasi, A., Bouqellah, N. et Roberts, M. R.** 2015. Suppression of incidence of *Rhizoctonia solani* in rice by siderophore producing rhizobacterial strains based on competition for iron. *Eur. Sci. J.* 11(3): 186-207.

**Nautiyal, C.S.** 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265-270.

**Nedzarek, A. et Rakusa-Suszczewski, S.** 2004. Decomposition of macro algae and the release of nutrients in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Polar Biosci.* 17: 16-35.

**Neilands, J.B.** 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726.

**Nemati, I., Moradi, F., Gholizadeh, S., Esmaeili, M.A. et Bihamta, M.R.** 2011. The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environ.* 57(1): 26-33.

**Nie, M., Zhang, X., Wang, J., Jiang, L., Yang, J., Quan, Z., Cui, X., Fang, C. et Li, B.** 2009. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. *Soil Biol. Biochem.* 41: 2535–2542.

**Niklinska, M., Chodak, M. et Laskowski, R.** 2005. Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biol. Biochem.* 37: 2185–2194.

**Nosrati, R., Owlia, P., Saderi, H., Rasooli, I. et Malboobi, M. A.** 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran J. Microbiol.* 6(4): 285-295.

**NRCS (National Soil Survey Center in cooperation with the Soil Quality Institute), USDA, and the National Soil Tilth Laboratory, Agricultural Research Service, USDA.** 1998. Soil Quality Indicators: pH. Washington, USA. Disponible sur le site: <http://soils.usda.gov>

**Oren, A.** 2003. Organic compatible solutes. In: Oren, A. (ed). *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats, volume 5: Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 279-305.

**Oren, A.** 2007. Diversity of organic osmotic compounds and osmotic adaptation in cyanobacteria and algae. In: Seckbach, J. (ed). *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, USA, 639–655.

**Osman, K. T.** 2013. Concepts of soil. In: Osman K.T. (ed) *Soils: Principles, Properties and Management*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp 1-7.

**O'Sullivan, D.J. et O'Gara, F.,** 1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiol. Rev.* 56(4): 662-676.

**Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R. et Singh, C.S.,** 2000. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. *Microbiol. Res.* 155: 233-242.

**Palaniyandi, S.A., Damodharan, K., Yang, S.H. et Such, J.W.** 2014. *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *J. Appl. Microbiol.* 117(3): 766-773.

**Pande, A.M., Kulkarni, N. S. et Bodhankar, M. G.** 2016. Effect of PGPR with ACC-Deaminase activity on growth performance of wheat cultivated under stress conditions. *Inter. J. Appl. Res.* 2(1): 723-726.

**Pandey, S., Ghosh, P. K., Ghosh, S., De, T. K. et Maiti, T. K.** 2013. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *J. Microbiol.* 51(1): 11-7.

**Panhwar, Q. A., Radziah O., Zaharah, A. R., Sariah, M. et Razi, I. M.** 2011. Role of phosphate solubilizing bacteria on rock phosphate solubility and growth of aerobic rice. *J. Environ. Biol.* 32: 607-612. .

**Panhwar, Q.A., Radziah, O., Zaharah, A.R., Sariah, M. et Mohd Razi, I.** 2012. Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria from aerobic rice. *Afr. J. Biotechnol.* 11(11): 2711–2719.

**Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. et Sa, T.** 2005 Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160: 127-133.

**Parker, J.** 1956. Drought resistance in woody plants. *The Botanical Review.* 22, 241-289.

**Pastor, N., Rosas, S., Luna, V. et Rovera, M.** 2014. Inoculation with *Pseudomonas putida* PCI2, a phosphate solubilizing rhizobacterium, stimulates the growth of tomato plants. *Symbiosis.* 62: 157-167.

**Pathania, N., Gosal, S. K., Saroa, G. S. et Vikal, Y.** 2014. Molecular characterization of diazotrophic bacteria isolated from rhizosphere of wheat cropping system from central plain region of Punjab. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8(9): 862-871.

**Patil, S., Bheemaraddi, M.C., Shivannavar, C.T. et Gaddad, S.M.** 2014. Biocontrol activity of siderophore producing *Bacillus subtilis* CTS-G24 against wilt and dry root rot causing fungi in chickpea. *IOSR-JAVS.* 7:63-68.

**Paul, D. et Nair, S.** 2008. Stress adaptations in a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *J. Basic Microbiol.* 48: 378–384.

**Paul, D. et Sinha, S. N.** 2015. Isolation and characterization of a phosphate solubilizing heavy metal tolerant bacterium from River Ganga, West Bengal, India. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 37(6): 651-657.

**Peighami-Ashnaei, S., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M. et Behboudi, K.** 2009. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Botrytis cinerea* in apple (*Malus domestica*) and in comparison with application of thiabendazole. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 74(3): 739-43.

**Peix, A.A.A., Rivas-Boyer, A.A.P.F., Mateos, P.F., Rodriguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E. et Velazquez, E.** 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.

**Peng, X.D., Huang, S.L. et Lin, S.H.** 2015. First report of corn kernel brown spot disease caused by *Mucor irregularis* in China. *J. Plant Dis.* 99(1): 159-160.

**Penrose, D. M. et Glick, B. R.** 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum.* 118: 10–15. 2003.

**Pepper, I. L. et Gerba, C. P.** 2004. Environmental Microbiology, a Laboratory Manual, 2nd edition. Elsevier Academic Press, USA.

**Petti, C., Reiber, K., Ali, S.S., Berney, M. et Doohan, F.M.** 2012. Auxin as a player in the biocontrol of *Fusarium* head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC Plant Biol.* 12(224): 1-9.

**Pichereau, V., Pocard, J. A., Hamelin, J., Blanco, C. et Bernard, T.** 1998. Differential Effects of Dimethylsulfiopropionate, Dimethylsulfiacetate, and Other S-Methylated Compounds on the Growth of *Sinorhizobium meliloti* at Low and High Osmolarities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4): 1420-1429.

**Pishchik, V.N., Chernyaeva, I.I., Kozhemaykov, A.P., Vorobyov, N.I., Lazarev, A.M. et Kozlov, L.P.** 1998. Effect of inoculation with nitrogen-fixing *Klebsiella* on potato yield. In: Malik KA et al. (eds.) Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Kluwer Academic Publishers, Great Britain, pp. 223-235

**Plettner, I., Steinke, M. et Malin, G.** 2005. Ethene (ethylene) production in the marine macroalga *Ulva (Enteromorpha) intestinalis* L. (*Chlorophyta, Ulvophyceae*): effect of light-stress and co-production with dimethyl sulphide. *Plant Cell Environ.* 28: 1136-1145.

**PNTTA, Bulletin mensuel de d'information et de liaison du programme national de transfert de technologie en agriculture.** 2000. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, B. P. 6446, Rabat, Maroc, numéro 68, ISSN 1114-0852.

**Poustini K. et Siosemardeh A.** 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. *Field Crops Res.* 85: 125-133.

**Powell, J. et Klironomos, J.** 2007. The Ecology of Plant–Microbial Mutualisms. Paul EA (ed). *Soil biology and Biochemistry, third edition.* Elsevier Inc, USA, pp 257-281.

**Pozo, C., Martínez-Toledo, M.V., Rodelas, B. et González-López, J.** 2002. Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *J. Biotechnol.* 97(2): 125-31.

**Prasad, R., Kumar, M. et Varma, A.** 2015. Role of PGPR in Soil Fertility and Plant Health. In: Egamberdieva D et al. (eds.) *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants, Soil Biology 42.* Springer International Publishing Switzerland, pp. 247-260

**Prescott, L. M.** 2002. *Microbiology*, 5th edition. The McGraw–Hill Companies, New York, USA, p 675.

**Qurashi, A.W. et Sabri, A.N.** 2012. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.* 43:1183-1191.

**Rai, V.K.** 2002. Role of amino acids in plant responses to salt stresses. *Biologia Plantarum.* 45(4): 481-487.

**Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S. et Annapurna, K.** 2013. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Plus.* doi:10.1186/2193-1801-2-6

**Ramyasmruthi, S., Pallavi, O., Pallavi, S., Tilak, K. et Srividya, S.** 2012. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae

rhizosphere effective against broad-spectrum fungal phytopathogens. *Asia. J. Plant Sci. Res.* 2(1), 16-24.

**Rana, A., Saharan, B., Nain, L., Prasanna, R. and Shivay, Y. S.** 2012. Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. *Soil Sci. Plant Nutr.* 58: (5)573-582.

**Rao, V. R., Jena, P. K. et Adhya, T. K.** 1987. Inoculation of rice with nitrogen-fixing bacteria-problems and perspectives. *Biol. Fertil. Soils.* 4(1): 21-26

**Rathi, M. S., Sangeeta, P., et Kumar, J. T.** 2014. Response of wheat to inoculation with mycorrhizae alone and combined with selected rhizobacteria including *Flavobacterium* sp. as a potential bioinoculant. *J. Plant Nutr.* 37:76–86.

**Rathinasabapathi, B.** 2000, Progress and Prospects in Engineering Crops for Osmoprotectant Synthesis. In: Cherry, J. H. et al. (eds.), *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*. Kluwer Academic Publishers, USA, pp 139-154.

**Reddy, P. P.** 2013. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: Reddy, P. P. (ed). *Recent Advances in Crop Protection*. Springer India, India, pp 131-158.

**Reddy, P. P.** 2014. Potential Role of PGPR in Agriculture. In: Reddy, P. P. (ed.) *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection*. Springer, India. pp 17-34

**Reeves, D.W.** 1997. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil Tillage Res.* 43: 131-167.

**Reisser, W.** 2010. The future is green: on the biotechnological potential of green algae. In: Israel, A. et al. (eds). *Seaweeds and their Role in Globally Changing Environments, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, The Netherlands, pp 373-383.

**Ribaudó, C.M.** Krumpholz, E.M., Cassán, F.D., Bottini, R., Cantore, M.L., et Cura, J.A. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant Growth Reg.* 25: 175-185. doi:10.1007/s00344-005-0128-5

**Rindi, F., Soler-Vila, A. et Guiry, M. D.** 2012. Taxonomy of Marine Macroalgae Used as Sources of Bioactive Compounds. In: Hayes, M. (ed). *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer Science+Business Media, LLC, USA, pp 1-53.

**Rizvi, A., Khan, M.S. et Ahmad, E.** 2014. Inoculation impact of phosphate-solubilizing microorganisms on growth and development of vegetable crops. In: Khan MS et al. (eds.) *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 287-297

**Roberson, E.B. et Firestone, M.K.** 1992. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(4): 1284-1291.

**Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D. et Bonilla, R.** 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Appl. Soil Ecol.* 61: 264-272.

**Rondon, M.R., Ballering, K.S. et Thomas, M.G.** 2004. Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Microbiol.* 150: 3857-66.

**Rouiller, J., Souchier, B., Bruckert, S., Fellere, C., Toutain, F. et Vedy, J. C.** 1994. Méthodes D'analyses Des Sols. In : B. M. and S. B. (eds.) *Pédologie : 2. Constituants et propriétés du sol*. Masson, Paris. pp. 619-654

**Rousk, J., Brookes, P. C. et Bååth, E.** 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(6): 1589–1596.

**Rubio, M. G. T., Plata, S. A. V., Castillo, J. B. et Nieto, P. M.** 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 42: 171-176.

**Ruíz-Sánchez, M., Armada, E., Muñoz, Y., de Salamone, I. E. G., Aroca, R., Ruíz-Lozano, J. M. et Azcón, R.** 2011. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *J. Plant Physiol.* 168: 1031-1037.

**Rusanov, A. M. et Anilova, L. V.** 2009. The Humus Formation and Humus in Forest-Steppe and Steppe Chernozems of the Southern Cisural Region. *Eur. Soil Sci.* 42 (10): 1101-1108.

**Sáenz, C., Berger, H., Félix, A. R., Galletti, L., García, J. C., Sepúlveda, E., Varnero, M. T., Cortázar, V. G., García, R. C., Arias, E., Mondragón, C., Higuera, I. et Rosell, C.** 2013. Agro-industrial utilization of cactus pear. FAO, Rome.

**Sagahón, I.P., Anducho-Reyes, M.A., Silva-Rojas, H.V., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A.A., Cárdenas-Álvarez, I.O. et Mercado-Flores, Y.** 2011. Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 5522-5537.

**Sagervanshi, A., Kumari, P., Nagee, A. et Kumar, A.** 2012. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from an agriculture soil. *Int. J. Life. Sci. Pharma. Res.* 2: 256-266.

**Saharan, B. S. et Nehra, V.** 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sci. Med. Res.* 21: 1-30.

**Saida, C., Houria, B. et Mébarek, B.** 2014. Interactive effects of salinity and potassium on physio-morphological traits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.; var: heintz). *Agriculture and Biology Journal of North America.* doi:10.5251/abjna.2014.5.3.135.143

**Saleem, M., Arshad, M., Hussain S. et Bhatti A. S.** 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 635–648.

**Santa O. R. D., Hernández R. F., Alvarez G. L. M., Junior P. R. et Soccol C. R.** 2004. *Azospirillum* sp. Inoculation in Wheat, Barley and Oats Seeds Greenhouse Experiments. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 47(6): 843-850.

**Sarig, S., Kapulnik, Y. et Okon, Y.** 1986. Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant Soil.* 90: 335-342.

**Sarker, A., Talukder, N. M. et Islam, M. T.** 2014. Phosphate solubilizing bacteria promote growth and enhance nutrient uptake by wheat. *Plant Sci. Today.* 1(2): 86-93.

**Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, D.P. et Singh, H. B.** 2012. Rhizobacteria Mediated Induced Systemic Tolerance in Plants: Prospects for Abiotic Stress Management. In: Maheshwari DK et (ed). *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, pp 225-238.

**Saxena, S. C., Kaur, H., Verma, P., Petla, B. P., Andugula, V. R. et Majee, M.** 2013. Osmoprotectants: Potential for Crop Improvement under Adverse Conditions. In: Tuteja, N. and Gill S. S. (eds). *Plant Acclimation to Environmental Stress.* Springer Science+Business Media, New York, USA, pp 197-232.

**Sayyed, R.Z. et Chincholkar, S.B.** 2010. Growth and siderophores production in *Alcaligenes faecalis* is regulated by metal ions. *Indian J. Microbiol.* 50:179-182.

**Sayyed, R. Z., Badgujar, M.D., Sonawane, H.M., Mhaske, M.M. et Chincholkar, S.B.** 2005. Production of microbial iron chelators (siderophores) bu fluorescent Pseudomonads. *Indian J. Biotechnol.* 4: 484-490.

**Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Frommberger, M., Lucio, M., Englmann, M., Fekete, A. et Gebefugi, I.** 2007. Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass Spectrometry for Non-Targeted Metabolomics of Molecular Interactions in the Rhizosphere. In: Varma, A. and Oelmüller, R. (Eds). *Soil biology, Volume 11, Advanced techniques in soil microbiology.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp 281-293.

**Schoebitz, M., Ceballos, C. et Ciampi, L.** 2013. Effect of immobilized phosphate-solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 13(1): 1-10

**Schweizer, M.** 1999. *Docteur nopal le médecin du bon dieu.* APB & Marc SCHWEIZER, Paris, France.

**Schwyn, B. et Neilands, J.B.** 1987. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochem.* 160: 47-56.

**Scow, K. M.** 2004. Soil microbiology. In: Schaechter, M. (ed). *The Desk Encyclopedia of Microbiology.* Elsevier Ltd, China, pp 914-926.

**Sétamou, M., Cardwell, K.F., Schulthess, F. et Hell, K.** 1997. *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Contamination of Preharvest Maize in Benin. *Plant Disease.* 81(11): 1323-1327.

**Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Papa, M. F. D., Lagares, A. et Luna, V.** 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-009-2116-3.

**Shabaev, V. P. et Voronina, L. P.** 2007. Grain Yield and Quality of Winter Wheat Inoculated with a Mixed Culture of *Pseudomonas* Bacteria against the Background of Increasing Nitrogen Fertilizer Rates. *Russ. Agric. Sci.* 33(5): 311-313.

**Shaharoon, B., Arshad, M., Waqas, R. et Khalid, A.** 2012. Role of ethylene and plant growth-promoting rhizobacteria in stressed crop plants. In: Venkateswarlu B et al (eds.) *Crop Stress and Its Management: Perspectives and Strategies.* Springer Science+Business Media B.V., pp 429-446

**Shaharoon, B., jamro, G. M., zahir, Z. A., arshad, M. et memon, K. S.** 2007. Effectiveness of Various *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia caryophylli* Containing ACC-Deaminase for Improving Growth and Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(8): 1300-1307.

**Shahbaz, M. et Ashraf, M.** 2013. Improving salinity tolerance in cereals. *Crit. Rev. Plant Sci.* 32: 237–249.

**Shahzad, S. M., Khalid, A., Arshad, M. et Kalil-ur-Rehman,** 2010. Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. *Soil Environ.* 29(1): 38-46.

**Shakir, M.A., Bano, A et Arshad, M.** 2012. Rhizosphere bacteria containing ACC-deaminase conferred drought tolerance in wheat grown under semi-arid climate. *Soil Environ.* 31(1): 108-112.

**Sharafzadeh, S.** 2012. Effects of PGPR on growth and nutrients uptake of tomato. *IJ AET.* 2(1): 27-31.

**Sharma, A., Shankhdhar, D., Sharma, A. et Shankhdhar, S. C.** 2014. Growth promotion of the rice genotypes by pgprs isolated from rice rhizosphere. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14(2): 505-517.

**Sharma, R.** 2012. Pathogenicity of *Aspergillus niger* in plants. *Cibtech J. Microbiol.* 1(1): 47-51.

**Shedbalkar, U. U., Adki, V. S., Jadhav, J. P. et Bapat, V. A.** 2010. Opuntia and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biol.* 3: 136-150.

**Shrivastava, P. et Kumar, R.** 2015. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* 22: 123-131.

**Shukla, P. S., Agarwal, P. K. et Jha, B.** 2012. Improved Salinity Tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the Interaction of Halotolerant Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *J. Plant Growth Regul.* 31: 195-206.

**Siddikee, M.A., Glick, B.R., Chauhan, P.S., Yim, W.J. et Sa, T.** 2011. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiol. Biochem.* 49:427-434.

**Sierra, G. A.** 1957. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *A. Van Leeuw.* 28: 15-22.

**Silini, A., Cherif-Silini, H. et Yahiaoui, B.** 2016. Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *African J. Microbiol. Res.* 10(12): 387-399.

**Silva, Z., Borges, N., Martins. L. O., Wait, R., da Costa, M. S. et Santos, H.** 1999. Combined effect of the growth temperature and salinity of the medium on the accumulation of compatible solutes by *Rhodothermus marinus* and *Rhodothermus obamensis*. *Extremophiles*, 3: 163-172.

**Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Gerardo A. Aguado-Santacruz, G. A. et Jiménez-Bremont, J. F.** 2008. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 82-92.

**Simões, M., Cleto, S., Simões, L.C. et Pereira, M.O.** 2007. Microbial interactions in biofilms: role of siderophores and iron-dependent mechanisms as biocontrol strategies, in: Gilbert, P. *et al.*, (Eds.), *Biofilms: Coming of Age*. Biofilm Club., Manchester, pp. 157-165.

**Sindhu, S. S. et Dadarwal, K. R.** 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas sp.* antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium sp.* Cicer in chickpea. *Microbiol. Res.* 156: 353–358.

**Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. et Chung, Y.R.** 1999. Biological Control of *Fusarium* Wilt of Cucumber by Chitinolytic Bacteria. *Phytopathol.* 89: 93-99.

**Singh, J. S. et Singh, D. P.** 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Microbes in Sustainable Agriculture. In: Malik A. *et al.* (eds). *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, The Netherlands, pp 361-385.

**Singh, J., Divakar Sastry, E. V. et Singh, V.** 2012. Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during seed germination stage. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 18(1): 45-50.

**Singh, R. P. et Jha, P. N.** 2016. Mitigation of salt stress in wheat plant (*Triticum aestivum*) by ACC deaminase bacterium *Enterobacter* sp. SBP-6 isolated from Sorghum bicolor. *Acta Physiol. Plant*. doi:10.1007/s11738-016-2123-9

**Smith, A. R., Johnson, H. E. et Hall, M.** 2003. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue*, 153-163.

**Sokhansanj, A., Noori, S. A. S. et Niknam, V.** 2006. Comparison of Bacterial and Plant Genes Participating in Proline Biosynthesis with Osmotin Gene, with Respect to Enhancing Salinity Tolerance of Transgenic Tobacco Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 53(1): 110-115.

**Solanke, A. U. et Sharma, A. K.** 2008. Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 14(1, 2): 69-79.

**Soltani, A. A., Khavazi, K., Asadi-Rahmani, H., Omidvari, M., Dahaji, P. A. et Mirhoseyni, H.** 2010. Plant Growth Promoting Characteristics in Some *Flavobacterium* spp. Isolated from Soils of Iran. *J. Agric. Sci.* 2(4): 106-115.

**Sreedevi, S., Sajith, S. et Benjamin, S.** 2013. Cellulase Producing Bacteria from the Wood-Yards on Kallai River Bank. *Advances in Microbiology*. 3(4): 326-332.

**Stanković, M. S., Petrović, M., Godjevac, D. et Stevanović, Z. D.** 2015. Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *J. Arid. Environ.* 120: 26-32.

**Stenesh, J.** 1989. *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, second edition.* John Wiley and Sons, Inc., USA, p 226.

**Stephen, J., Shabanamol, S., Rishad, K. S. et Jisha, M. S.** 2015. Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and Burkholderia sp. (MTCC 8369) under greenhouse conditions. *3Biotech.* 5: 831-837.

**Streeter, J. G. et Gomez. M. L.** 2006. Three Enzymes for Trehalose Synthesis in Bradyrhizobium Cultured Bacteria and in Bacteroids from Soybean Nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(6): 4250-4255.

**Strom, A. R.** 1998. Osmoregulation in the model organism Escherichia coli: genes governing the synthesis of glycine betaine and trehalose and their use in metabolic engineering of stress tolerance. *J. Biosci.* 23(4): 437-445.

**Sudharsan, S., Mallavarapu, M., Bolan, N. et Naidu, R.** 2013. Effect of seaweeds on degradation of DDT in soils. *Water Air Soil Pollut.* 224:1715. doi:10.1007/s11270-013-1715-x

**Suneja, S., Narula, N., Anand, R. C. et Lakshminarayana, K.** 1996. Relationship of *Azotobacter chroococcum* Siderophores with Nitrogen Fixation. *Folia Microbiol.* 41(2): 154-158.

**Tailor, A.J. et Joshi, B.H.** 2012. Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. *J. Env. Res. Dev.* 6(3A): 688-694

**Taiz, L. et Zeiger, E.** 2002. Assimilation of Mineral Nutrients. In: Taiz, L. and Zeiger, E. (eds). *Plant Physiology*, 3rd ed. Sinauer Associates, USA, pp 260-282.

**Tak, H. I., Ahmad, F. et Babalola, O. O.** 2013. Advances in the Application of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Phytoremediation of Heavy Metals. In: Whitacre DM (ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer Science+Business Media, New York. pp 33-52

**Takabe, T., Rai, V. et Hibino, T.** 2006. Metabolic Engineering of Glycine Betaine. In: Rai, A. K. and Takabe, T. (eds). *Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer. The Netherlands, pp 137-151.

**Tam, H. M. et Diep, C. N.** 2014. Isolation, Characterization and Identification of Endophytic Bacteria in Sugarcane (*Saccharum* spp. L.) Cultivated on Soils of the Dong Nai Province, Southeast of Vietnam. *Am. J. Life. Sci.* 2(6): 361-368.

**Tank, N. et Saraf, M.** 2010. Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants, *Journal of Plant Interactions.* 5(1) : 51-58. doi:10.1080/17429140903125848

**Tarik, M.** 2011. Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*. Thèse de doctorat de l'université Hassan II – Casablanca. Soutenu publiquement le, 28 mai 2011.

**Tchan, Y.T. et New, P. B.** 1984. Azotobacteraceae. 219–225. In: Krieg, N., et Holt, J. G., (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1.* Williams & Wilkins. Baltimore, USA, pp 220-229.

**Thompson, J. P.** 1989. Counting viable *Azotobacter chroococcum* in vertisols II. Comparison of media. *Plant Soil.* 117: 17-29.

**Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L. et Du, B.** 2009. Genetic Diversity of Siderophore-Producing Bacteria of Tobacco Rhizosphere. *Braz. J. Microbiol.* 40: 276-284.

**Tinker, P. B. et Nye, P. H.** 2000. Root System Architecture, Density, and Measurement. In: Tinker, P. B. and Nye P. H. (eds). *Solute movement in the rhizosphere.* Oxford University Press, Inc., New York, USA, pp 224-268.

**Toklikishvili, N., Dandurishvili, N., Vainstein, A., Tediashvili, M., Giorgobiani, N., Lurie, S., E. Szegedi, E., Glick, B.R. et Chernin, L.** 2010. Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis*. *Plant Pathol.* 59: 1023-1030.

**Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C. et Pedraza, R.O.** 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch. Microbiol.* 193: 275-86.

**Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A. et Netrusov, A. I.** 2006. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Appl. Biochem. Micro.* 42(2): 117-126.

**Ullah, U., Ashraf, M., Shahzad, S.M., Siddiqui, A.R., Piracha, M.A. et Suleman, M.** 2016. Growth behavior of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under drought stress in the presence of silicon and plant growth promoting rhizobacteria. *Soil Environ.* 35: 65-75.

**United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division.** 2004. World Population Prospects: World Population to 2300. Working Paper No. ST/ESA/SER.A/236. New York

**United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division.** 2015. World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.241. New York

**Usov, A. I.** 2011. Polysaccharides of the Red Algae. *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* 65: 115-217.

**Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Loccoz, Y. M., Muller, D., Legendre, L., Dyé, F. W. et Combaret, C. P.** 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant. Sci.* doi: 10.3389/fpls.2013.00356.

**Vahed, H.S., Shahinroksar, P. et Heydarnezhad, F.** 2012. Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of rice (*Oryza Sativa* L.) in the presence of phosphorus fertilizer. *Intl. J. Agri. Crop Sci.* 4(17): 1228-1232.

**Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., Joel, E., López-Meza, Alfaro-Cuevas, R. et López-Bucio, J.** 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 291: 263-273.

**Van, V. T., Berge, O., Kê, S. N., Balandreau, J. et Heulin, T.** 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil.* 218: 273-284

**Vasquez, J.A. et Guerra, N.** 1996. The use of seaweeds as bioindicators of natural and anthropogenic contaminants in northern Chile. *Hydrobiologia*. 326:327–333.

**Vessey, J. K.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255: 571–586.

**Vinoth, R. S., Kanikkai, R. A., Babu, V. A., Manoj, G. T., Naman, H. S., Johnson, A. J., Infant, S. B. et Sathiyaseelan, K.** 2009. Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent. res. sci. Technol.* 1(1): 008–013.

**Viveros, O. M., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. et Mora, M. L.** 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.* 10(3): 293-319.

**Volpiano, C.G., Estevam, A., Saatkamp, K., Furlan, F., Vendruscolo, E.C.G. et Santos, M.F.D.** 2014. Physiological responses of the co-cultivation of PGPR with two wheat cultivars in vitro under stress conditions. *BMC Proceedings*. doi:10.1186/1753-6561-8-S4-P108

**Walpola, B. C. et Arunakumara, K. K. I. U.** 2010. Effect of salt stress on decomposition of organic matter and nitrogen mineralization in animal manure amended soils. *J. Agric. Sci.* 5: 9-18

**Walpola, B.C. et Yoon, M.H.** 2013. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. *Afric. J. Microbiol. Res.* 7:266-275.

**Walsh, U.F., Morrissey, J.P. et O'Gara, F.** 2001. Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opinion Biotechnol.* 12: 289-295.

**Wani, S. H., Singh, N.B., Haribhushan, A. et Mir, J.I.** 2013. Compatible Solute Engineering in Plants for Abiotic Stress Tolerance - Role of Glycine Betaine. *Curr. Genomics.* 14(3): 157-165.

**Waughray, D.** 2011. Agriculture. In: Waughray, D. (ed). *The World Economic Forum Water Initiative, Water Security: The Water-Food-Energy-Climate Nexus*. World Economic Forum, Washington, USA, pp 17-43.

**Waughray, D.** 2011. Water security: the water-food-energy-climate nexus: the World Economic Forum water initiative. Island Press Washington.

**Weisbeek, P., Marugg, J., van der Hofstad, G., Bakker, P. et Schippers, B.** 1987. Siderophore biosynthesis, uptake and effect on potato growth of rhizosphere strains. In: Verma DPS et al. (eds.) *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 51-53.

**Went, F.W. et Thimann, K.V.** 1937. *Phytohormones*. The Macmillan Company, New York.

**Winogradsky, S.** 1938. Sur la morphologie et ecologie des *Azotobacter*. *Ann. Inst. Pasteur*. 60, 351-400.

**Wood, J. M.** 2007. Bacterial osmosensing transporters. In H. D. and S. H. (eds.) *Methods in ENZYMOLOGY*, volume 428, osmosensing and osmosignaling. Elsevier Inc. pp 77-109

**Xiao, C.L. et Kim, Y.K.** 2008. Postharvest fruit rots in apples caused by *Botrytis cinerea*, *Phacidiopycnis washingtonensis*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. *Online. Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2008-0919-01-DG

**Xu, S. et Kim, B.S.** 2016. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* strain SC09-21 for biocontrol of Phytophthora blight and growth stimulation in pepper plants. *Trop. Plant Pathol.* 41:162

**Xun, F., Xie, B., Liu, S. et Guo, C.** 2015. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22:598–608.

**Yadav, J., Verma, J. P. et Tiwari, K. N.** 2011. Plant Growth Promoting Activities of Fungi and their effect on Chickpea Plant Growth. *Asian J. Biol. Sci.* doi:10.3923/ajbs.2011

**Yadav, S. K.** 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30: 515–527.

**Yamaguchi, M.** 1983. World Vegetables: Principles, Production and Nutritive Values. AVI PUBLISHING COMPANY, INC. Westport, Connecticut, United States

**Yandigeri, M.S., Malviya, N., Solanki, M.K., Shrivastava, P. et Sivakumar, G.** 2015. Chitinolytic *Streptomyces vinaceus drappus* S5MW2 isolated from Chilika Lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 1217-1225.

**Yang, J., Kloepper, J. W. et Ryu, C. M.** 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Sci.* 14(1): 1-4.

**Yu, T. et Zheng, X.D.** 2007. Indole-3-acetic acid enhances the biocontrol of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear fruit by *Cryptococcus laurentii*. *FEMS Yeast Res.* 7: 459-464.

**Yunus, F.N., Iqbal, M., Jabeen, K., Kanwal, Z. et Rashid, F.** 2016. Antagonistic Activity of *Pseudomonas fluorescens* against Fungal Plant Pathogen *Aspergillus niger*. *Sci. Lett.* 4(1): 66-70.

**Zahir, Z.A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S. M. et Asghar, H. N.** 2009. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Arch. Microbiol.* 191(5): 415-24.

**Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. and Steward, G.F.** 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Env. Microbiol.* 5: 539-554.

**Zhou, S., Wei, S., Boone, B. et Levy, S.** 2007. Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. *African J. Environ. Sci. Technol.* 1 (2): 014-026.

# Annexes

## **Annexes**

### **Annexe 1 :**

Signification des signes (-, +, ++ et +++) exprimés dans la partie résultats et discussion.

- : Absence d'activité

+ : Diamètre de la zone d'activité autour du disque (inférieur ou égal à 10 mm).

++ : Diamètre de la zone d'activité autour du disque (entre 10 et 20 mm).

+++ : Diamètre de la zone d'activité autour du disque (supérieur à 20 mm).

### **Annexe 2 :**

Les séquences d'ADN<sub>r</sub> 16S des 5 souches BEA4, BEC9, BOA4, SEB9 et RhiNA.

#### **Séquence ADN<sub>r</sub> 16S de la souche BEA4 :**

```
GGGGTCTAGAGCGGCGCACGGGTGCTTTCACAGAGGGATAGCCCTTTGGATTAATACCTC
ATAGTAAAGTCACAACGGTGAAAGATGAGCATGCGTCCATTAGTTAGTTGGTAAGGTAA
CGGCTTACCAAGACTTCGATGGGTAGGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCCACTGGTACT
GAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCA
AGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACGGTCCTATGGATTGTAAACTGCTTTTGT
ACGAGAAGAAACTCCTACGTGTAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGG
TTTAAAGGGTCCGTAGGCGGTCTTGTAAGTCAGTGGTGAAAGCCATCGCTCAACGATGG
AACGGCCATTGATACTGCAGGACTTGAATTACCAGGAAGTAACTAGAATATGTAGTGTAG
CGGTGAAATGCTTAGAGATTACATGGAATACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTACTGGTTT
ATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAAC
```

#### **Séquence ADN<sub>r</sub> 16S de la souche :**

```
CTTGCTCTCTGCGGCGGAGGGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAA
AGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC
TATCAATGAGCCTAGGTCGGATTACTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT
CCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGCAGTAAATTAATACTTT
GCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCAGCCGCGGTAATAC
AGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTTGGTTCGTTAAGTT
GGAGTGAAAGCCCCGGGCTCACCTGAACTGCATTCAAACCTGACGAGCTAGAGTATGGTA
GAGGGTGGTG
```

**Séquence ADN<sub>r</sub> 16S de la souche BOA4 :**

GGCAGCACGGCGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGCGGAACGTGCCTAGTAGCGGGGGATA  
AAAGCGTAGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTG  
CACTATTAGAGCGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGA  
CGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATC  
CCGCGTGTGCGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAACGTCAT  
GGGCTAATACCCCGTGAAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTG  
CGCAGGCGGTTTCGGAAGAAAGAGTGAAATCCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTA  
ACTACGGGCTAGAGTGTGTCAGAGGAGGTGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTA  
GATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAAGCCTCCTGGGATAAACTGACGCTCATGCAG  
AAAGCGTGGGGAAA

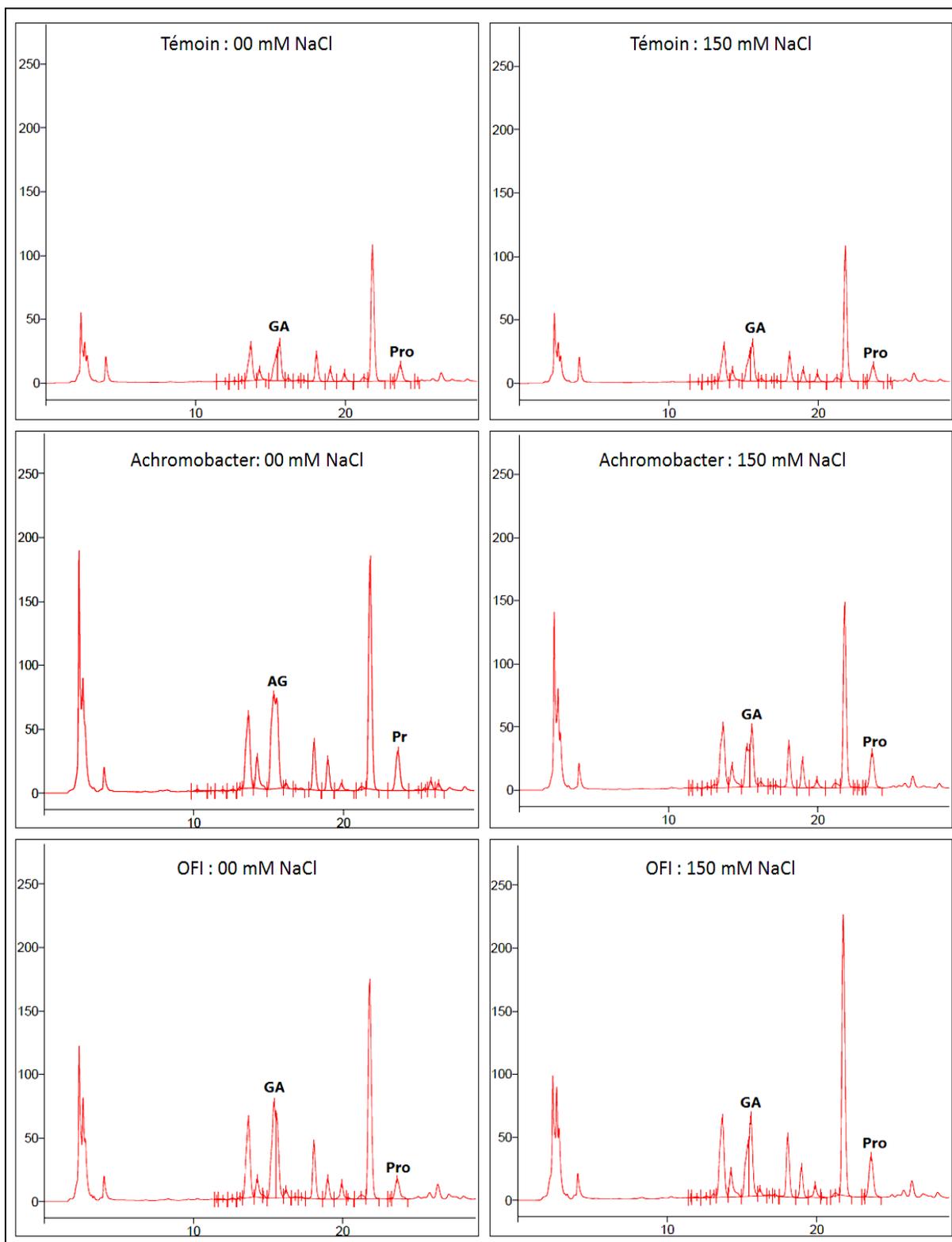
**Séquence ADN<sub>r</sub> 16S de la souche SEB9 :**

TCCGGGGGTGCTTGCACCTCGATTACGCGGCGGGGCCTAGGAATCTGCCCAGATAGTGGGG  
GAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGCTCTT  
CGGACCTCACGCTATCGGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTC  
ACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCACACTGGAAGTACGACACGGT  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC  
AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTCGGGAGGAA  
GGGCTGTAAGCGAATACCTTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT  
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA  
AAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT  
GCATCCAAAAGTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGACCACCTGGCTGATACT  
GAACTGAGTGCG

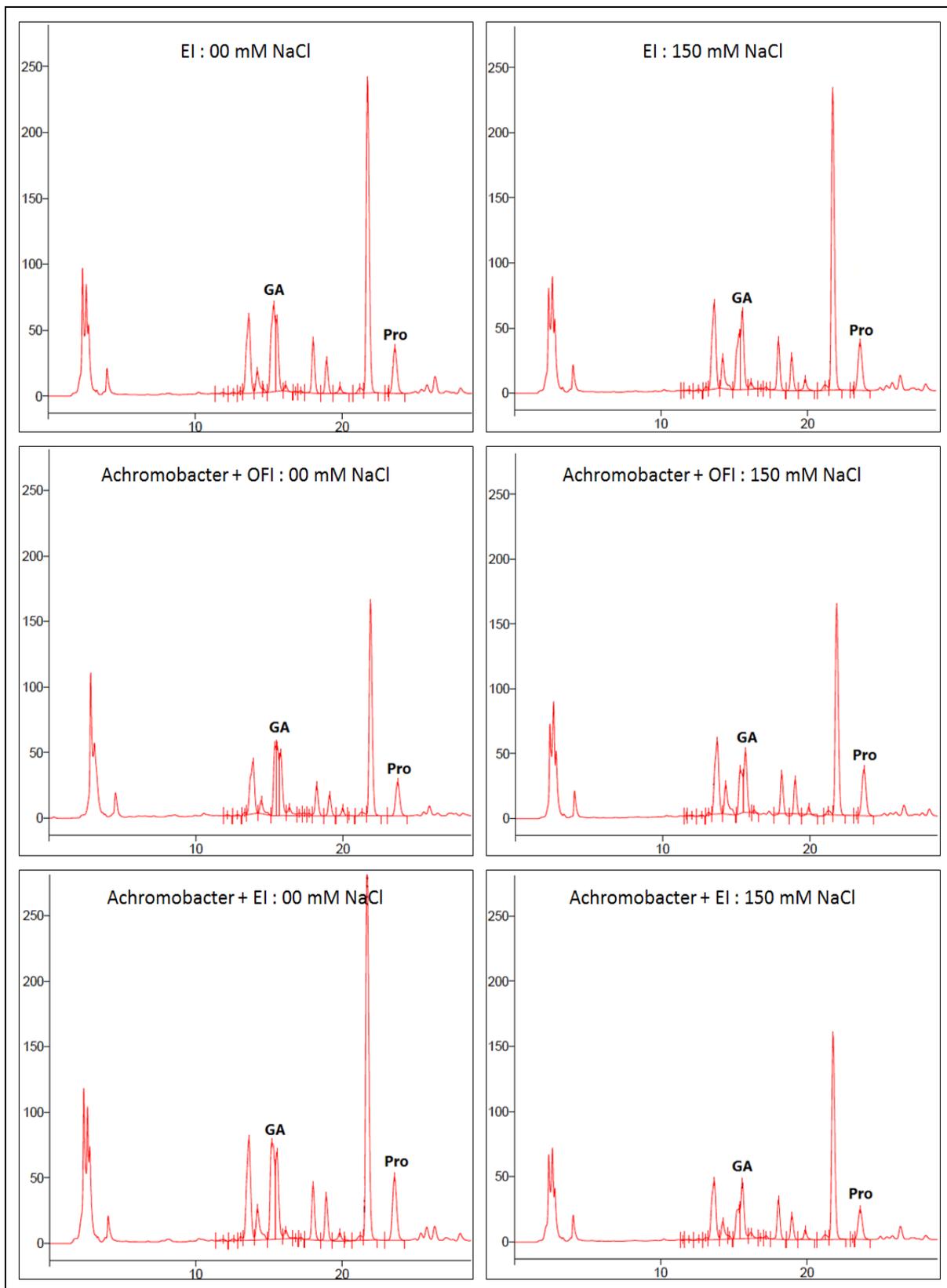
**Séquence ADN<sub>r</sub> 16S de la souche RhiNA :**

CGTCCGGCATAAGTATGCGAGTCGCGCGGGGCACGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGC  
GGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGG  
GCGTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATT  
AGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCTACCAAGGCTACGATCC  
GTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG  
TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAATTACCT  
AATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAACAG  
CCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAG  
GTGGTTTGTAAAGTTGAATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGT  
GGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
TATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAATGCGACCACCTGGACTGATACTGAACTGAGGTGC  
GAAAGCTTGCGGA

### Annexe 3 :



Chromatogrammes issus de l'analyse HPLC des acides aminés dans les plantules de tomate.



Chromatogrammes issus de l'analyse HPLC des acides aminés dans les plantules de tomate.

#### Annexe 4 :

Photos du test *in vivo* sur tomate après 40 jours de croissance.



De droite à gauche : témoin (0 mM NaCl), OFI (0 mM NaCl), UL (0 mM NaCl), EI (0 mM NaCl)



De droite à gauche : témoin (150 mM NaCl), OFI (150 mM NaCl), UL (150 mM NaCl), EI (150 mM NaCl)



De droite à gauche : BOA4 (00 mM NaCl), BOA4+UL (00 mM NaCl), BOA4+OFI (00mM NaCl), BOA4+EI (00 mM NaCl).



De gauche à droite : BOA4 (150 mM NaCl), BOA4+OFI (150 mM NaCl), BOA4+UL (150 mM NaCl), BOA4+EI (150 mM NaCl).



De droite à gauche : BEC9 (00 mM NaCl), BEC9+OFI (00 mM NaCl), BEC9+UL (00 mM NaCl), BEC9+EI (00 mM NaCl).



BEC9+EI (150 mM NaCl).

*Publication de la  
soutenance*

## A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis Cinerea* Gray Mold

Rai Abdelwahab<sup>1,2</sup>, Bensidhoum Leila<sup>1</sup>, Tabli Nacera<sup>1</sup>, Bouaoud Yousra<sup>3</sup>, Naili Fatma<sup>4</sup>, Cristina Cruz<sup>5</sup>  
Elhafid Nabti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Béjaïa, FSNV, Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables (LMER), Equipe de Biomasse et Environnement, Targa Ouzemmour, 06000 Béjaïa, Algérie.

<sup>2</sup>Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif-1-Algérie. <sup>3</sup>Université de Béjaïa, FSNV, Laboratoire de Mycologie appliquée, Targa Ouzemmour, 06000 Béjaïa, Algérie.

<sup>4</sup>LR Biotechnology and Bio-Geo Resources Valorization, Higher Institute for Biotechnology, University of Manouba, Sidi Thabet Biotechpole, 2020 Sidi Thabet, Ariana, Tunisia.

<sup>5</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais (cE3c), Lisboa, Portugal.

### ABSTRACT

Using beneficial bacteria to control plant pathogens has become an ecofriendly alternative to the excessive use of chemicals. In this investigation, a bacterial strain RhiNA, isolated from an agricultural land in northern Algeria (Bejaïa), was selected based on its ability to produce antifungal and plant growth promoting (PGP)-metabolites. It was then molecularly identified and screened for its antagonistic activity against *B. cinerea*, *Mucor* sp., *A. niger* and *A. flavus*. The isolate was also tested for its ability to attenuate gray mold caused by *B. cinerea* on apple fruits. This strain, identified as *Pseudomonas protegens*, produced several hydrolytic enzymes, IAA, siderophores, HCN, ammonia and showed potential inhibition of mycelial growth and spore fungal germination (PGI : 66,66,62 and 58% ; SGP : 14,32, 55,10, 28,92 and 10,15% against *A. niger*, *Mucor* sp., *B. cinerea* and *A. flavus*, respectively). Only 172,823 mm<sup>2</sup> of each inoculated area on apple fruits were touched by *B. cinerea*-gray mold, compared to 529,74 mm<sup>2</sup> of rotted zone in absence of the strain. *P. protegens*-RhiNA shows high efficiency against a virulent fungal strain of *B. cinerea*. Thus, it could be used as a biocontrol agent for a sustainable agriculture in future.

**Keywords:** PGPR, Biocontrol, Phytopathogens, IAA, Siderophores, Phosphate Solubilization.

### I. INTRODUCTION

The alarming increase of human population, that is supposed to cross 9 billion by the end of 2050, requires more food and feed production; especially in countries where resources are damaged due to uncontrolled human activities and environmental degradation. Agriculture is the main source of food for humans. Its total production needs to jump by 70 to 100% to satisfy global increased demands in the next few years [1]. However, agricultural practices are threatened by various abiotic and biotic stresses, which require more resources exploitation to avoid decreased productivity [2]. Among these challenges, phytopathogens are responsible of 10 and 20% of yield losses in both developed and underdeveloped countries respectively, where fungi like *Botrytis* spp., *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Thielaviopsis* spp., *Verticillium* spp., *Ustilago* spp., *Rhizoctonia* spp. and *Puccinia* spp. are in the first line of implication [3,4,5]. Their virulence exhibits considerable diversity both in

their developmental biology and in the types of induced symptoms [6].

Over time, several scientific practices have been used to attenuate and/or eliminate fungal pathogens from agricultural lands. The application of fungicides to control phytopathogens effects is one of the most important tools exploited for plant protection and crop improvement. Nevertheless, their regular use present a serious risk for environment, especially if residues persist in soil or migrate to waterways, hence damaging soil and water quality [4]. In addition, resistance emergence in phytopathogen populations to these chemicals, their low ability to penetrate in plant tissues, their high cost application, and the deleterious effects caused by fungicides to some beneficial organisms in soil constitute difficult obstacles [7-9].

Under pressure of the aforementioned problems, scientific and farmers were obliged to find other alternatives to reduce fungicides utilization such as selection, cultivation

and breeding of resistant crops [7]. In the last few years, a new ecofriendly and cost-effective approach consisting to use beneficial soil bacteria to control plant pathogens, but also to improve plant growth under different conditions, was widely adopted by both scientists and farmers. This kind of telluric microorganism is referred to as Plant Growth Promoting Bacteria or rhizobacteria (PGPBR) [10]. PGPBR can affect plant growth by providing elementary elements essential for plant growth, producing secondary metabolites like phytohormones, antibiotics, biologically active compounds etc., and suppressing or decreasing phytopathogens via competition [11].

Beside their antagonism, some PGPBR can induce biochemical and physiological modifications in plant tissues, improving their defenses against pathogens, which is designated by the term Induced Systemic Resistance (ISR) [12]. Several works proved that bacteria belonging to the genera *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia* and *Alcaligenes* are known to be PGPBR capable to exhibit high antagonistic activities against phytopathogenic fungi like *Fusarium solani*, *Pythium ultimum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Phytophthora cryptogea* [13, 14, 15 and 16].

In this work, the bacterial isolate (RhiNA) was selected, among others, based on multi-PGP-traits and antifungal metabolites screening. It was then molecularly identified and tested for its ability to inhibit mycelial growth and spores germination of four fungi *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* and *Mucor* sp. Finally, this strain was assessed *in vivo* to demonstrate the antagonistic efficiency against *Botrytis cinerea*-BC1 affecting apple fruits.

## II. METHODS AND MATERIAL

### 1. Bacterial strain and Plant pathogens

The strain RhiNA was isolated in 2014 by the Laboratory of Mastery of Renewable Energies from an agricultural soil in northern Algeria (Bejaia). A reference strain *Pseudomonas protegens* CHAO<sup>T</sup> was kindly provided by Professor Anton Hartmann from the German Research Center for Environmental Health (GmbH), Research Unit Microbe-Plant Interactions-Germany. The phytopathogen fungus *Botrytis cinerea*-BC1 was generously provided by the laboratory of

mycology-University A. Mira of Bejaia-Algeria. This strain was originally isolated in France by the Laboratory of Plant Protection (INRA-STPV, Avignon). The fungi *Aspergillus niger*, *A. flavus* and *Mucor* sp. were offered by the laboratory of applied microbiology, University of Bejaia-Algeria. Apple fruits (*Malus domestica*) variety Golden Delicious were freshly harvested in Bejaia-Algeria, and immediately transported to the laboratory before use.

## 2. Production of Antifungal Compounds

### A. Cyanhydric acid (HCN)

HCN detection was carried out following Lorck's protocol (1948) [17]. For this, a nutrient agar was supplemented with filter-sterilized glycine solution to a final concentration of 4.4 g/L. The medium was then casted in Petri dishes (9 mm of diameter). The covers were upholstered by Whatman paper impregnated with a sodium picrate solution (5% picric acid addition of 2% of anhydrous sodium carbonate acid). 100  $\mu$ L of bacterial culture was flooded on agar using sterile swabs. Petri dishes were sealed with parafilm and incubated at 30°C/96 h. Ammonia production is expressed by transformation of the yellow color on the Whatman paper (provided by the solution of sodium picrate) to orange or brown.

### B. Ammonia

For ammonia detection, 100  $\mu$ L of fresh culture (DO = 0.7) was inoculated in tubes containing 10 mL of peptone broth medium. After incubation (30°C/96 h), 500  $\mu$ L of Nessler reagent were added to each tube. A positive result is designated by apparition of yellow or orange color in the mixture, indicating ammonia production by strain [18].

### C. Chitinase assay

Chitinase was screened according to the protocol of [19]. Agar medium with the following composition in 1 L of distilled water ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.7 g) ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.3 g) ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.7 g) ; NaCl (0.5 g) ; KCl (0.5 g) ; yeast extract (0.13 g) ; Agar (15) ; 7.2  $\pm$  0.02 pH was supplemented with colloidal chitin (0.8  $\pm$  0.6 g). This last is prepared by suspending 1 g of chitin in 9 mL of concentrated HCl. The solution is left under stirring for

2 h before bringing the volume to 250 mL. After 24 h, the obtained pellet is re-suspended in distilled water, washed 3 times with normal water and three times with distilled water then left for decantation. The mixture was filtered through metallic sieve (0.5 mm) and the filtrate was stocked at 4°C before using. The strain is inoculated by the disc agar method. A positive result is expressed by a clear halo around the disc.

#### D. Siderophores

Siderophores were screened on Chrome azurol S (CAS). The CAS medium contains four separately prepared solutions. The Fe-CAS indicator solution (1) contained 10 mL of 1 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (in 10 mM HCl) and 50 mL of CAS solution (1.21 mg mL<sup>-1</sup>); the mixture was added slowly to 40 mL of an aqueous solution of HDTMA (1.82 mg/mL). Buffer solution (2) was prepared by dissolving 30.24 g of PIPES in 750 mL of a salt solution (0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g NaCl, 1.0 g NH<sub>4</sub>Cl, 15 g agar); pH was adjusted to 6.8 using 50% KOH and water was added to bring the volume to 800 mL. The solution (3) contained per 70 mL water: 2 g glucose, 2 g mannitol, 493 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11 mg CaCl<sub>2</sub>, 1.17 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.04 mg CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 1.2 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 1.0 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in 70 mL of distilled water. Solutions (1) (2) (3) were autoclaved separately then cooled to 50°C. 30 mL of filter-sterilized solution (4) containing 10% (w/v) casamino acids was mixed with the solutions (3) and (2). The indicator solution was added last [20].

#### 3. Characterization of PGP-traits

##### A. Enzymatic activities

To study the strain's ability to degrade various organic substrates, the agar disk method was used. Cellulolytic and esterase/lipolytic activities were detected using the protocols proposed by [21] and [22], respectively. Proteolytic, amylolytic and ureasic activities were screened by the methods described in [23], [24] and [25], respectively.

##### B. Indole 3-Acetic Acid (IAA) quantification

IAA quantification was performed on LB medium supplemented with tryptophan [1g/L]. After incubation, 1.5 of culture was transferred to microtubes, centrifuged

at 9,500xg for 2 min. 1 mL of supernatant is transferred to tubes together with 1 mL of Salkowski's reagent (1 mL of 0.5 mol L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub> and 49 mL of 35 % HClO<sub>4</sub>). Half an hour later, the amount of IAA is determined by reading the mixture absorbance at 350 nm. Results are compared to those obtained with a standard curve prepared by a pure IAA (Sigma Aldrich ®). Visually, a pink color in the mixture (supernatant/Salkowski's reagent) indicates auxin's production by the stain [26].

#### C. Phosphate solubilization

The strain's ability to solubilize inorganic tricalcium phosphate was studied using Pikovskaya's medium (PKV) containing per liter: glucose, 10 g; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g; NaCl, 0.2 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g; KCl, 0.2 g; yeast extract, 0.5 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.002 g; and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.002 g; agar 15 g. The capacity of an isolate to solubilize inorganic phosphate is expressed by a clear halo around the agar disk [27].

All PGP-traits, except IAA and HCN, were simultaneously screened and compared to those of reference strain *Pseudomonas protegens*-CHAO<sup>T</sup>.

#### 4. Molecular identification

Molecular identification was carried out by sequencing DNA fragments coding for the 16S rRNA. After DNA extraction, amplification was realized using universal primers (5'-S-D-Bact-0008-a-S-20-3') and (5'-S-D-Bact-1495-a-S-20-3') having the following sequences (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') [28]. The reactional mixture for amplification contained: 2.5µL PCR reaction buffer, 2.5 µL MgCl<sub>2</sub>, 0.2µL deoxynucleoside triphosphate, 0.3µL of each primer, 0.2µL Taq DNA polymerase and 1µL of total DNA. PCR program was started at 94°C for 3 minutes, then 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 seconds, followed annealing for 1 minutes at 55°C and elongation for 2 min at 72°C, and finished by an elongation step at 72°C for 8 minutes. The amplification product was revealed by electrophoresis (1.5% agarose gel in 0.5x Tris-borate-EDTA buffer/30 minutes). The migration product was revealed under UV detector after putting them in a 0.5 mg/l ethidium bromide solution/30min.

An enzymatic sequencing of the amplified DNA fragments was realized according to the method of Sanger. Sequences were deposited in the GenBank and compared with sequences available at the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLAST algorithm [29]. A phylogenetic dendrogram was constructed via the neighbor joining method and tree topology was evaluated by performing bootstrap analysis of data sets using MEGA6.

### 5. Mycelial growth inhibition

The antagonistic activity *P. protegens*-RhiNA against the following fungi: *B. cinerea*, *Mucor* sp., *A. niger* and *A. flavus* was studied using agar diffusion method [30]. Agar discs of fresh fungal cultures (0.5 cm diameter) were putted in the center of Petri dishes containing Potato Dextrose Agar medium (PDA). Similar discs of antagonistic bacteria are placed at 2.5 cm of the fungal disc (3 discs per plate). Plates without bacteria were used as control. After incubation ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , 5 days) the percentage of fungal growth inhibition was calculated using the formula:  $[(KR-R_1)/KR] \times 100$ . KR corresponds to the distance from inoculation point to fungal colony margin in the control (mm).  $R_1$  represents the distance between fungal colony center and its periphery in the treated plates.

### 6. Inhibition of fungal spores' germination

In Eppendorfs tubes, 20 $\mu\text{l}$  of sporale suspension ( $10^6$  Spores/mL) were mixed together with fresh bacterial culture of the antagonist ( $10^8$  CFU/ml). 1 mL of sterile distilled water with 5% of glucose was added to each Eppendorf. The mixture is incubated at  $21^\circ\text{C}/24$  h. Controls were inoculated only with fungal spores. The experiment was realized in triplicate. Spore germination percentage (SGP %) was hemocytometrically calculated using an optic microscope (40X) [31].

### 7. In vivo assay on apple fruits

In vivo test on apple fruits was monitored using a modified protocol of [32]. Fresh apple fruits with similar calibers were disinfected with sterile distilled water, supplemented with 2% hypochlorite, and left at room temperature for drying. Three equidistance holes (4 mm x 5 mm) were made in equatorial zone of fruits and each hole was inoculated with 30  $\mu\text{L}$  of Bacterial suspension of the antagonist ( $10^8$  CFU/mL). After 2 h, each hole was supplemented with 15  $\mu\text{L}$  of *B. cinerea*-sporale suspension ( $10^6$  Spore/mL). Apple fruits were placed in sterile boxes walled with absorbent paper humidified with sterile distilled water (3 fruits/box), then incubated at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  for 4 days. At the end of the experiment, the rotten surface was measured using the ImageJ® program. The experiment was repeated in triplicate. Controls without bacterium were used.

### 8. Statistical analysis

Statistical analysis was carried using the software GraphPad Prism® version 6. The one-way ANOVA test was used to compare in vitro antagonistic assay's results. In vivo assay was analyzed using impaired t test with Welch's correction ( $p < 0.001$ ).

## III. RESULTS AND DISCUSSION

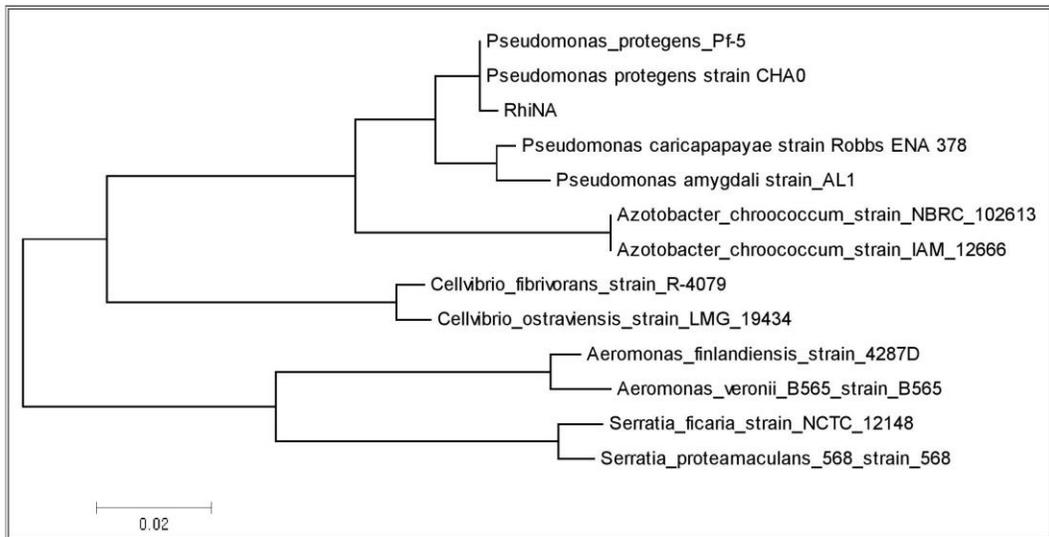
### 1. PGP-traits

The strain RhiNA was able to produce high amounts of HCN (Whatman paper color has changed from yellow to brown in the three inoculated replicates). In presence of tryptophan (1 mg/mL), this strain produced  $68.67 \pm 4.84$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the auxin-IAA. The reference strain (*P. protegens* CHAO<sup>T</sup>) produced also different studied enzymes except chitinase, while the strain RhiNA showed high level of protease, lipase, esterase, urease and moderate amounts of chitinase. The tow strains produced considerable amount of siderophores on CAS-agar medium and to solubilized tricalcium phosphate [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] on Pikovskaya's medium (Table 1).

**Table 1:** PGP-traits of the isolate RhiNA and *Pseudomonas protegens* CHA0<sup>T</sup>

PGP-traits	RhiNA	CHA0 <sup>T</sup>	PGP-traits	RhiNA	CHA0 <sup>T</sup>
IAA (µg/mL)	6.86±0.48	/	Esterase	++	+
HCN	+++	++	Cellulase	+++	+
Siderophores	+++	++	Lipase	++	++
Chitinase	+	-	Urease	-	+
Protease	++	++	(P) solubilization	++	++

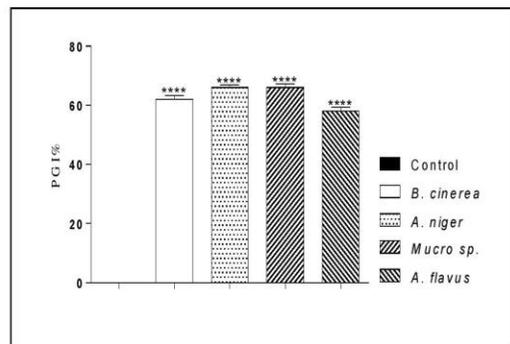
Zones of clearance or indicator color changes around colonies were measured; (+): diameter between 7 and 10 mm; (++) : diameter between 10 and 20 mm; (+++): diameter above 20 mm; (-): negative result.



**Figure 1:** Neighbor-Joining Tree obtained using MEGA6, revealing the phylogenetic relationship of the analyzed isolates. -Bar indicates 2% sequence divergence.

## 2. Mycelial growth inhibition

The results showed that the strain RhiNA exerted potential inhibition of mycelial growth when confronted to the fungi *B. cinerea*, *A. niger*, *Mucor* sp. and *A. flavus*. A highest inhibition was obtained against *A. niger* 66%±0.88, followed by *Mucor* sp. (66%±1.33). The PGI obtained against both *B. cinerea* and *A. flavus* were 62±1.33 and 58 %±1.33, respectively. No significant differences were noted between the different PGI against the four fungi (Figure 2).

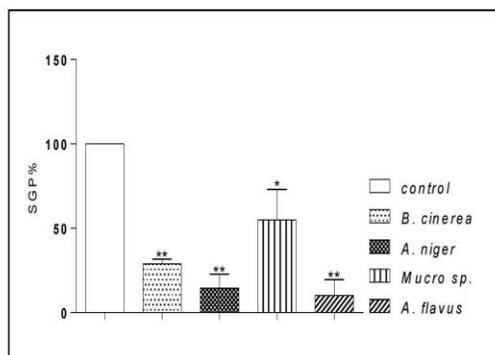


**Figure 2:** Percentage of mycelial growth inhibition (PGI %) of *B. cinerea*, *A. niger*, *Mucor* sp. and *A. flavus* by the strain RhiNA. \*\*\*\*: significant difference (p < 0.0001).

## 3. Inhibition of fungal spores' germination

Spore germination of all fungi was highly inhibited by the strain RhiNA. The highest inhibition was obtained

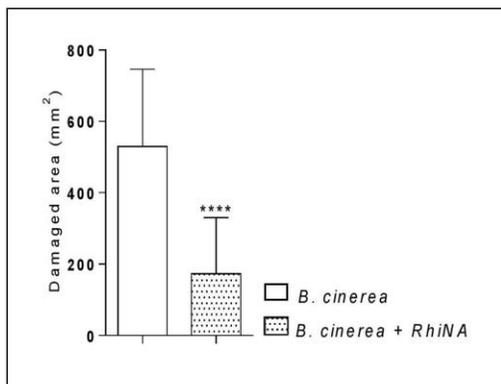
against *A. flavus* with a germination success of  $10.15\% \pm 9.4$ , followed by *A. niger*, where  $14.32\% \pm 8.38$  of spores were germinated in the presence of RhiNA. Only  $28.92\% \pm 2.72$  of *B. cinerea* spores succeeded to germinate in presence of the antagonist. *Mucor* sp. spores were less sensitive to the presence of the strain RhiNA, with a final germination percentage of  $55.10\% \pm 17.96$  (Figure 3).



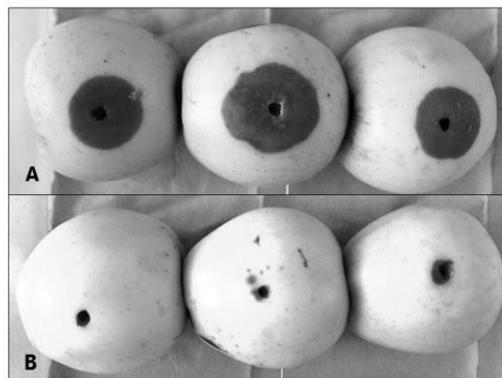
**Figure 3:** Spore germination percentage (SGP %) of *B. cinerea*, *A. niger*, *Mucor* sp. and *A. flavus* spores in presence of the strain RhiNA. \*: significant difference ( $p < 0.05$ ); \*\*: significant difference ( $p < 0.005$ ).

#### 4. In vivo assay on apple fruits

In this experiment, apple fruits inoculated with *Botrytis cinerea*-BC1 showed characteristic symptoms usually generated by this fungus (gray mold). The strain RhiNA exhibited high antagonistic activity against *B. cinerea*-BC1 on apple fruits compared to the control (only inoculated with sporale suspension of *B. cinerea*). Thereby, an average area of  $529.74 \text{ mm}^2$  was hit by the fungus propagation in absence of the strain RhiNA, whereas only  $172.823 \text{ mm}^2$  of the area was affected in presence of the strain. These proportions correspond to an inhibition percentage of 32.62% (Figures 4 and 5).



**Figure 4:** Rotten area on apple fruits attacked by *B. cinerea* in presence and absence of the antagonistic strain RhiNA, \*\*\*\*: significant difference ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 5:** *Botrytis cinerea* gray mold on apple fruits, treated (B), or not (A), with the bacterial antagonist RhiNA after 3 days of incubation.

#### IV. DISCUSSION

After identification, the strain RhiNA was affiliated to the genus *Pseudomonas*. This group of bacteria is widely distributed in nature. It plays an important role in soil biological and physicochemical processes [33]. Over than 99% of sequences similarity was established between RNA 16S of RhiNA and *Pseudomonas protegens* strain CHAO. *P. protegens* species is included in the *P. fluorescens* group, described as PGPR due to its ability to enhance plants growth and to perform vegetable crops protection against phytopathogens [34]. In addition, it is well known that *P.*

*protegens* CHAO produces secondary metabolites with large-spectrum of antibiotic activity such as HCN, NH<sub>3</sub>, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin and pyrrolnitrin, hence exerting high phytopathogen inhibition [35]. HCN and NH<sub>3</sub> are considered as toxic metabolite and efficient inhibitors of fungal growth and development [36 and 37]. Many records signaled the implication of HCN and ammonia-producing *Pseudomonas*, including species *P. protegens*, in the biocontrol of a wide range of fungal diseases in plants [38, 39, 40, 41 and 42].

Soil organic matter (SOM) degradation, via enzymatic activities, is one of the most important processes provided by microorganisms to enhance both soil quality and plant growth. Microbial enzymes such as urease, esterase, lipase, protease, chitinase, amylase and cellulase play a crucial role in soil biological and physicochemical transformations [43, 44, 45 and 46]. In addition, enzymes such as chitinase and cellulase play an important role as biocontrol agents by degrading fungal cell walls [47]. [48] and [49] showed that several *Pseudomonas* strains produce protease, cellulase, chitinase and lipase that are implicated in SOM degradation and plant pathogens biocontrol. Another *P. protegens* (R), isolated from *Solanaceae* rhizosphere was found to be effective against broad-spectrum of phytopathogens. Its antagonistic activity was attributed to expression of chitinase, HCN, siderophores, NH<sub>3</sub> and other secondary metabolites [50]. Otherwise, [51] underlined the role of chitinase-producing *Pseudomonas* spp. in the biocontrol of Sugarcane Red Rot Caused by *Colletotrichum falcatum* Went. [31] and [42] highlighted the role of multi-PGP-traits *P. protegens* (LiBe S5) in enhancing barely growth under heavy metal contaminated conditions, and protecting lettuce leaves against *B. cinerea*. This strain was found to produce high amounts of hydrolytic enzymes (cellulase, chitinase, amylase, urease, protease and lipase), IAA, HCN, ammonia, siderophores and phosphatase. Such characters could be implicated in the high antagonistic activity expressed by the strain RhiNA against the tested phytopathogens in this work.

Siderophores are iron-chelating compounds whose biosynthesis is regulated by iron availability in the surrounding environment. In soil, they play a key role in plant growth enhancement by improving roots iron-uptake, but also by their competitive and antagonistic

characters against fungal pathogens [52, 53 and 10]. A *Pseudomonas fluorescens* WCS374r is implicated in systemic resistance induction in rice against *Magnaporthe oryzae*. This ISR is based on siderophore-mediated priming for a salicylic acid-repressible complex defense response [54]. Another siderophore-iron complex from *P. protegens* strains was found to enhance phenol content and phenol-oxidizing enzymes content in rice, inducing plant systemic resistance against the incitation of *Pyricularia oryzae* [55]. Impressively, siderophores can stimulate biosynthesis of other antimicrobial compounds implicated in plant defenses and health [56, 10].

Regarding indole acetic acid (IAA) is the most commonly produced phytohormone that interferes with different aspects of plant growth and development. Its effect on vegetables depends on plant sensitivity and the amount of IAA produced by bacteria [57]. It is well established that bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* are excellent auxins-producers that enhance crop yield of different plants [58, 59, 60 and 26]. Moreover, some studies admit that bacterial auxins, such as IAA, mediate bacterial antagonism and stimulate plant defenses and disease suppression [61, 62]. In addition, [63] studied the role of IAA produced by *P. fluorescens* in mediating the biocontrol of *Fusarium* head blight disease of barley.

It is well known that soil phosphorus is in the second line of factors limiting plant nutrition after nitrogen. Phosphate-solubilizing microorganisms (PSM) are the most option that provides phosphorus to plants and allow avoiding fertilizers accumulation in soil [64, 65, 66, 67, 68 and 69]. [70], [71], [72], [73] and [42] highlighted the phosphate solubilization capacity of bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* (*P. protegens*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. lutea* etc.) and their implication in plant growth enhancement and crop improvement.

The bacterial antagonist RhiNA showed high inhibition of both spore germination and mycelial expansion against *B. cinerea*, *A. niger*, *A. flavus* and *Mucor sp.* The four fungi are known to be potential mycotoxins producers and plant parasites [74, 75, 76 and 77, 4]. Many researchers have reported the usefulness of bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* in the biocontrol of these phytopathogens [78, 79 and 80]. *B.*

*cinerea* is responsible of considerable pre- and postharvest losses in many crops worldwide [81]. In our study, the application of this fungus on apple led to characteristic gray mold expansion from the inoculation point. During storage, the contamination between adjacent fruits may frequently acquire leading to considerable losses [32]. [82] Found that a dual culture of *Pseudomonas fluorescens* P-5 and *Bacillus subtilis* B-3 reduced *B. cinerea*-gray mold in apple fruits to 60% after 20 days of their application. They also proved the absence of significant difference between these antagonists and thiabendazole effects against *B. cinerea* affecting apple fruits. In addition, another *Pseudomonas cepacia* was used by [83] to control *B. cinerea*-gray mold in apple fruits. Application of this strain saved 20% of the damaged area compared to control.

## V. CONCLUSION

The isolate *P. protegens* RhiNA is a multi-PGP traits bacterium that displayed high ability to inhibit mycelial growth and spore germination of *B. cinerea*, *A. niger*, *A. flavus* and *Mucor* sp. It also decreased gray mold caused by *B. cinerea* on apple fruits. Thus, this strain could be valorized and efficiently used as a biocontrol agent in agriculture.

## VI. REFERENCES

- [1] Lafe, O. 2013. Agriculture, in: Lafe, O. (Ed.), Abulecentrism, Rapid Development of Society Catalyzed at the Local Community Level. Springer International Publishing., Switzerland, pp, 127-132.
- [2] Singh, P.K., Kumar, V., Maurya, N., Choudhary, H., Kumar, V., Gupta, A.K. 2014. Grassroots Solutions to Overcome Abiotic and Biotic Environmental Stress in Agriculture, in: Singh, S.B., et al. (Eds.), Translational Research in Environmental and Occupational Stress. Springer., India, pp, 11-16.
- [3] Glick, B.R. 2015. Biocontrol Mechanisms, in: Glick, B.R. (Ed.), Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Springer International Publishing., Switzerland, pp. 123-157.
- [4] Peng, X.D., Huang, S.L., Lin, S.H. 2015. First report of corn kernel brown spot disease caused by *Mucor irregularis* in China. *J. Plant Dis.* 99(1), 159-160.
- [5] Reddy, P.P. 2015. Impacts on Plant Pathogens, in: Reddy, P.P. (Ed.), Climate Resilient Agriculture for Ensuring Food Security. Springer., India, pp, 151-177.
- [6] Soanes, D.M., Skinner, W., Keon, J., Hargreaves, J., Talbot, N.J. 2002. Genomics of Phytopathogenic Fungi and the Development of Bioinformatic Resources. *MPMI.* 15(5), 421-427.
- [7] Paoletti, M.G., Pimentel, D. 1996. Genetic Engineering in Agriculture and the Environment, Assessing risks and benefits. *BioScience.* 46(9), 665-673.
- [8] Komárek, M., Čadková, E., Chrástný, V., Bordas, F., Bollinger, J.C. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* 36, 138-151.
- [9] Hollomon, D.W. 2015. Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem, in: Ishii, H. Hollomon, D.W. (Eds.), Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Springer., Japan, pp. 3-11.
- [10] Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35 (4), 1044-1051.
- [11] Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S and Boyce, A.N. 2016. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. *Molecules.* doi:10.3390/molecules21050573.
- [12] Choudhary, D.K., Prakash, A., Johri, B.N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47, 289-297.
- [13] Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L.V., Govindasamy, V., Bose, P., Ramadoss, D. 2013. PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 405-425.
- [14] Reddy, P.P. 2013. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), in: Reddy, P.P. (Ed.), *Recent Advances in Crop Protection.* Springer., India, pp, 131-158.
- [15] Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* 7(2), 96-102.
- [16] 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.
- [17] Lorck, H. 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* 1, 142-146.
- [18] Cappucino, J.C. Sherman, N., 1992. Negative staining. *Microbiology: A laboratory Manual.* 3, 125-179.
- [19] Kopečný, J., Hodrová, B., Stewart, C.S. 1996. the isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 195-198.
- [20] Alexander, B., Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* 12, 39-45.
- [21] Carder, J.H. 1986. Detection and quantification of cellulase by congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. *Anal. Biochem.* 153, 75-79.
- [22] Sierra, G.A. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *A. Van. Leeuw.* 28, 15-22.
- [23] Kavitha, T., Nelson, R., Jesi, S.J. 2013. Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *macrophomina phaseolina*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 4, 177-186.
- [24] Vinoth, R.S., Kanikkai, R.A., Babu, V.A., Manoj, G.T., Naman, H.S., Johnson, A.J., Infant, S.B., Sathiyaseelan, K. 2009. Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent. Res. Sci. Technol.* 1(1), 008–013.
- [25] Christensen, W.B. 1946. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J. Bacteriol.* 52(4), 461–466.
- [26] Malik, D.K., Sindhu, S.S. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 17(1), 25-32.
- [27] Sagervanshi, A., Kumari, P., Nagee, A., Kumar, A. 2012. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from an agriculture soil. *Int. J. Life Sci. Pharma. Res.* 2, 256-266.
- [28] Daffonchio, D., Cherif, A. Borin, S. 2000. Homoduplex and Heteroduplex Polymorphisms of the Amplified Ribosomal 16S-23S Internal Transcribed Spacers Describe Genetic Relationships in the “*Bacillus cereus* Group”. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12), 5460–5468.
- [29] Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5(2), 150-163.
- [30] Sagahón, I.P., Anducho-Reyes, M.A., Silva-Rojas, H.V., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A.A., Cárdenas-Álvarez, I.O., Mercado-Flores, Y. 2011. Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5522-5537.
- [31] Bensidhoum, L., RAI, A., Tabli, N., Nabila, K., Meriem, K., Nabti, E. 2015. Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. Strain S7LiBe under Abiotic Stress. First International Symposium of Applied Biology CIBA USTO-MB. *IJSRST.* 1, 7-14.
- [32] Xiao, C.L., Kim, Y.K. 2008. Postharvest fruit rots in apples caused by *Botrytis cinerea*, *Phacidopycnis washingtonensis*, and *Sphaeropsis pyripitrescens*. Online. *Plant Health Progress.* doi:10.1094/PHP-2008-0919-01-DG.
- [33] Kahlon, R.S. 2016. *Pseudomonas: Genome and Comparative Genomics*, in: Kahlon, R.S. (Ed.), *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer International Publishing., Switzerland, pp. 127-191.
- [34] Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J.P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., Redondo-Nieto, M. 2016. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS ONE.* doi:10.1371/journal.pone.0150183.
- [35] Jousset, A., Schuldes, J., Keel, C., Maurhofer, M., Daniel, R., Scheu, S., Thuermer, A. 2014. Full-genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. *Genome. Announc.* doi:10.1128/genomeA.00322-14.
- [36] McCallan, S.E.A., Weedon, F.R. 1940. Toxicity of ammonia, chlorine, hydrogen cyanide, hydrogen sulfide, and sulfide dioxide gases. II fungi and bacteria. *Contrib. Boyce. Thompson Inst.* 11, 331-342.
- [37] Howell, C.R., Beier, R.C., Stipanovic, R.D. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control *Pythium preemergens* Damping-off by the bacterium. *Phytopathology.* 78(8), 1075-1078.
- [38] 5Sétamou, M., Cardwell, K.F., Schulthess, F., Hell, K. 1997. *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Contamination of Preharvest Maize in Benin. *Plant Disease.* 81(11), 1323-1327.

- [39] 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.
- [40] Dowling, D.N. O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *TIBTECH*. 12, 133-141.
- [41] Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R., Singh, C.S. 2000. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. *Microbiol. Res*. 155, 233-242.
- [42] Walsh, U.F., Morrissey, J.P., O'Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 289-295.
- [43] Bensidhoum, L., Nabti, E., Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., Keel, C., Hartmann, A. 2016. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 75, 38-46.
- [44] Glick, B.R. 1995. the enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109-117.
- [45] Viveros, O.M., Jorquera, M.A., Crowle, D.E., Gajard, G., Mora, M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10(3), 293-319.
- [46] Rana, A., Saharan, B., Nain, L., Prasanna, R., Shivay, Y.S. 2012. Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. *Soil Sci. Plant Nutr.* 58(5), 573-582.
- [47] Xun, F., Xie, B., Liu, S., Guo, C. 2015. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 598-608.
- [48] Mitchell, R., Alexande, M., 1963. Lysis of soil fungi by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 6, 169-177.
- [49] Sindhu, S.S., Dadarwal, K.R. 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicer* in chickpea. *Microbiol. Res*. 156, 353-358.
- [50] Ahmad, N., Shinwari, Z.K., Bashir, S., Yasir, M. 2013. Function and phylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with GM and non-GM maize. *Pak. J. Bot.* 45(5), 1781-1788.
- [51] Ramyasmruthi, S., Pallavi, O., Pallavi, S., Tilak, K., Srividya, S. 2012. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad-spectrum fungal phytopathogens. *Asia. J. Plant Sci. Res.* 2(1), 16-24.
- [52] Malathi, P., Viswanathan, R. 2013. Role of Microbial Chitinase in the Biocontrol of Sugarcane Red Rot Caused by *Colletotrichum falcatum* Went. *EJBS*. 6(1), 17-23.
- [53] Simões, M., Cleto, S., Simões, L.C., Pereira, M.O. 2007. Microbial interactions in biofilms: role of siderophores and iron-dependent mechanisms as biocontrol strategies, in: Gilbert, P. et al., (Eds.), *Biofilms: Coming of Age*. Biofilm Club., Manchester, pp. 157-165.
- [54] Hider, R.C., Kong, X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *The Royal Society of Chemistry*. 27, 637-657.
- [55] De Vleeschauwer, D., Bakker, P.A.H.M., Djavaheri, M., Hofte, M. 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant. Physiol.* 148 1996-2012.
- [56] Amutharaj, P., Sekar, C., Natheer, S. 2013. Development and use of different formulations of *pseudomonas fluorescens* siderophore for the enhancement of plant growth and induction of systemic resistance against *pyricularia oryzae* in lowland rice. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 4(2), 831-838.
- [57] Laslo, E., György, E., Mathé, I., Mara, G., Tamas, E., Abraham, B., Lanyi, S. 2011. Replacement of the traditional fertilizer with microbial technology: isolation and characterization of beneficial nitrogen fixing rhizobacteria. *U. P. B. Sci. Bull.* 73(SB), 109-114.
- [58] Pant, G., Agrawal, P.K. 2014. Isolation and characterization of Indole Acetic Acid Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria from rhizospheric soil of *Withania somnifera*. *JBSO*. doi:10.7897/2321-6328.02687.
- [59] Karnwal, A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* 91(1), 61-63.
- [60] Bharucha, U., Patel, K. Trivedi, U.B. 2013. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant

- Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agric. Res.* 2(3), 215-221.
- [61] Kamble, K.D., Galerao, D.K. 2015. Indole acetic acid production from *Pseudomonas* species isolated from rhizosphere of garden plants in Amravati. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 4(1), 23-31.
- [62] Khare, E., Arora, N.K. 2010. Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in Suppression of Charcoal Rot Disease of Chickpea. *Curr. Microbiol.* 61, 64-68.
- [63] Yu, T., Zheng, X.D. 2007. Indole-3-acetic acid enhances the biocontrol of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear fruit by *Cryptococcus laurentii*. *FEMS Yeast Res.* 7, 459-464.
- [64] Petti, C., Reiber, K., Ali, S.S., Berney, M., Doohan, F.M. 2012. Auxin as a player in the biocontrol of *Fusarium head blight* disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC Plant Biology.* 12(224), 1-9.
- [65] Kumar, V., Aggarwal, N.K., Singh, B.P. 2000. Performance and Persistence of Phosphate Solubilizing *Azotobacter chroococcum* in wheat Rhizosphere. *Folia. Microbiol.* 45(4), 343-347.
- [66] Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34, 33-41.
- [67] Hussain, M.I., Asghar, H.N., Akhtar, M.J., Arshad, M. 2013. Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil Environ.* 32(1), 71-78.
- [68] Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus. doi:10.1186/2193-1801-2-587.
- [69] Khan, M.S., Zaidi, A., Ahmad, E. 2014. Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms, in: Khan, M.S. et al. (Eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Springer International Publishing., Switzerland, pp, 31-62.
- [70] Nosrati, R., Owlia, P., Saderi, H., Rasooli, I., Malboobi, M.A. 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran J. Microbiol.* 6(4), 285-295.
- [71] Peix, A., Rivas, R.I., Regina, I.S., Mateos, P.F., Molina, E.M., Barrueco, C.R., Velázquez, E. 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 847-850.
- [72] Rosas, S.B., Andrés, J.A., Rovera, M., Correa, N.S. 2006. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biol. Biochem.* 38, 3502-3505.
- [73] Park, K.H., Lee, C.Y., Son, H.J. 2009. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 222-228.
- [74] Sashidhar, B., Podile, A.R. 2010. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J. App. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x.
- [75] Michailides, T.J. 1991. Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from stone fruits from California and Chile. *Plant Dis.* 75, 373-380.
- [76] Calvo, J., Calvente, V., Orellano, M.E., Benuzzi, D., Sanz, M.I. 2010. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on Apple Fruit by Mixtures of Bacteria and Yeast. *Food. Bioprocess. Technol.* 3, 644-650.
- [77] Sharma, R. 2012. Pathogenicity of *Aspergillus niger* in plants. *Cibtech Journal of Microbiology.* 1(1), 47-51.
- [78] Janisiewicz, W.J., Marchi, A. 1992. Control of storage rot on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant. Dis.* 76, 555-560.
- [79] Luna-Romero, I.J., Carvajal-Moreno, M., Flores-Martínez, A., Ferrera-Cerrato, R. 2000. Possibility of Biological Control of *Aspergillus flavus* with *Pseudomonas fluorescens* on Maize Ear. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 18(1), 50-54.
- [80] Yunus, F.N., Iqbal, M., Jabeen, K., Kanwal, Z., Rashid, F. 2016. Antagonistic Activity of *Pseudomonas fluorescens* against Fungal Plant Pathogen *Aspergillus niger*. *Sci. Lett.* 4(1), 66-70.
- [81] Montealegre, J.R., López, C., Stadnik, M.J., Henríquez, J.L., Herrera, R., Polanco, R., Piero, R.M.D., Pérez, L.M. 2010. Control of grey rot of apple fruits by biologically active natural products. *Trop. Plant Pathol.* 35(5), 271-276.
- [82] Peighami-Ashnaei, S., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Behboudi, K. 2009. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Botrytis cinerea* in apple (*Malus domestica*) and in

comparison with application of thiabendazole.  
*Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 74(3), 739-43.

- [83] Janisiewicz, W.J., Roitman, J. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*. 78, 1697-1700.

يتأثر التفاعل بين النبات والبكتيريا المحفزة لنموه بالضغط الحيوية وغير الحيوية مثل الفطريات الضارة، انعدام التوازن الغذائي وارتفاع نسبة الملوحة. في هذا العمل، تم اختيار 70 عزلة بكتيرية مثبته للازوت وفقا لقدرتها على إنتاج جزيئات ذات أهمية زراعية. بعد التشخيص الجيني للعزلات المختارة، تم دراسة تأثير مستخلصات كل من التين الشوكي (OFI) واثنتين من الطحالب البحرية *Ulva lactuca* (UL) و *Enteromorpha intestinalis* (EI) على قدرة هذه العزلات على مقاومة الملوحة. أيضا، تم تحديد التأثير المشترك لكل من المستخلصات والعزلات المختارة على إنتاش بذور القمح الصلب وعلى نمو الطماطم تحت تأثير الملوحة. أخيرا، تم التشخيص الجيني للعزلة البكتيرية RhiNA وتقييم قدرتها على تثبيط نمو الفطريات *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *Botrytis cinerea* و *Mucor sp.* كما تم اختبار فعاليتها كعامل بيولوجي لمكافحة العفن الرمادي على فواكه التفاح. جميع العزلات المختارة، BEA4، BEC9، BOA4، SEB9، التي تم تشخيصها ك *Pseudomonas putida*، *Flavobacterium johnsoniae*، *Azotobacter chroococcum* و *Achromobacter xylosoxidans* على التوالي لديها القدرة على إنتاج مجموعة واسعة من الإنزيمات المحللة، حمض الأندول (BEA4): 76.3، BEC9: 25.7، BOA4: 47.4 و SEB9: 32.2 ميكرو غرام/مل) والسيدروفورات، كما أنها قادرة على تحليل الفوسفات ثلاثي الكالسيوم. في وجود 300 mM NaCl، السلالة BEA4 ومستخلص OFI قاما بتحسين نسبة إنتاش بذور القمح الصلب من 2.8 (الشاهد) إلى 25 و 39% على التوالي، في حين أن الجمع بينهما حسن هذه النسبة إلى 47%. في وجود 150 mM NaCl وبعد شهر من النمو، لم يؤثر كل من مستخلص UL والسلالة BEC9 على وزن نبات الطماطم، في حين أن وجودهما معا حسنه من 0.038 (الشاهد) إلى 0.077 ملغ/نبته. ارتفع تركيز البرولين في نباتات الطماطم تحت الإجهاد الملحي من 11.5 (الشاهد) إلى 24.8 و 32.05 ميكرو غرام/مل في وجود كل من السلالة BOA4 ومستخلص EI على التوالي. السلالة RhiNA، والتي تم تشخيصها ك *Pseudomonas protegens*، منحت حماية معتبرة لثمار التفاح ضد العفن الرمادي، حيث قلت المساحة المتضررة من 530 مم<sup>2</sup> (الشاهد) إلى 173 مم<sup>2</sup>. جميع العزلات المختارة في هذا العمل، إضافة إلى المستخلصات OFI، UL و EI تشكل دعائم واعدة من أجل زراعة بيئية مستدامة في المستقبل.

**كلمات مفتاحية:** الإجهاد الملحي، PGPR، Osmoprotecteurs، بروتين، حمض الجلوتاميك، الفطريات المضرة بالنبات.

## Résumé

L'interaction plantes-PGPR est fortement affectée par les stress biotiques et abiotiques tels que les phytopathogènes, le déséquilibre nutritionnel et la salinité élevée. Dans ce travail, 70 isolats bactériens diazotrophes ont fait l'objet d'une sélection hiérarchique selon leur capacité à produire des métabolites d'intérêt agricole. Après identification des isolats sélectionnés, l'effet des extraits issus des raquettes de *Opuntia ficus-indica* (OFI), *Ulva lactuca* (UL) et *Enteromorpha intestinalis* (EI) sur l'halotolérance bactérienne a été étudié. L'effet combiné des extraits et des isolats sélectionnés sur la germination des graines de blé dur et sur la germination et la croissance de la tomate sous stress salin a été également étudié. Enfin, un isolat bactérien (RhiNA) a été identifié, évalué pour son antagonisme vis-à-vis de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea* et *Mucor sp.* et testé pour son efficacité comme agent de biocontrôle de la pourriture grise due à *B. cinerea* sur fruits de pomme. Les isolats sélectionnés (BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9), respectivement identifiés comme (*Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Azotobacter chroococcum*), sont des fixateurs d'azote, ayant la capacité de produire une large gamme d'enzymes lytiques, de l'acide indole acétique (BEA4 : 76,3, BEC9 : 25,7, BOA4 : 47,4 et SEB9 : 32,2 µg/mL), des sidérophores et sont capables de solubiliser le phosphate tricalcique. A 300 mM NaCl, la souche BEA4 et l'extrait OFI ont restauré le taux de germination de blé dur de 2,8 (témoin) à 25 et 39% respectivement, alors que l'association BEA4-OFI l'a restauré à 56%. A 150 mM NaCl et après un mois de croissance, le poids frais des plantules de tomate n'a été amélioré ni en présence de la souche BEC9 ni de l'extrait UL. Cependant, leur association l'a significativement restauré de 0,038 à 0,077 g/plante. La concentration de proline dans les plantules de tomate stressées a augmenté de 11,5 (témoin) à 24,8 et 32,05 µg/mL en présence de la souche BOA4 et de l'association BOA4-EI respectivement. La souche RhiNA, identifiée comme *Pseudomonas protegens*, a permis de réduire la superficie de la zone pourrie des pommes infectées par *B. cinerea* de 530 (témoin) à 173 mm<sup>2</sup>. L'ensemble des souches sélectionnées ainsi que les trois extraits OFI, UL, et EI constituent un bon support de perspectives pour une meilleure agriculture écologique et renouvelable.

**Mots clé :** Stress salin, Osmoprotecteurs, PGPR, Proline, Acide Glutamique, Phytopathogènes.

## Abstract

The plant-PGPR interaction is strongly affected by biotic and abiotic stresses such as phytopathogens, nutritional imbalance and high salinity. In this work, 70 diazotrophic bacterial isolates were hierarchically selected according to their ability to produce metabolites of agricultural interest. After molecular identification of the selected strains, the effect of extracts from *Opuntia ficus-indica* (OFI), *Ulva lactuca* (UL) and *Enteromorpha intestinalis* (EI) on bacterial halotolerance was studied. The combined effect of extracts and the selected isolates on durum wheat germination and on tomato germination and growth under salt stress was also determined. Finally, the bacterial strain RhiNA was identified, evaluated for its antagonism against *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea* and *Mucor sp.*, then tested for its effectiveness as biocontrol agent of *B. cinerea* gray mold on apple fruits. The selected nitrogen fixing strains, BEA4, BEC9, BOA4 and SEB9, respectively identified as *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Azotobacter chroococcum* have the ability to produce wide range of lytic enzymes, Indole Acetic Acid (BEA4: 76.3, BEC9: 25.7, BOA4: 47.4 and SEB9: 32.2 µg/mL), siderophores and are capable of solubilizing tricalcium phosphate. At 300 mM NaCl, the strain BOA4 and OFI-extract restored wheat germination percentage from 2.8 (control) to 25 and 39% respectively, where BEA4-OFI association restored it to 56%. At 150 mM NaCl and after one month, tomato seedlings' fresh weight was not restored either with the strain BEC9 nor UL-extract. However, their association significantly increased it from 0.038 to 0.077 g/plant. Proline concentration in tomato stressed seedlings was enhanced from 11.5 (control) to 24.8 and 32.05 µg/mL in presence of BOA4 and BOA4-EI respectively. The strain RhiNA, identified as *Pseudomonas protegens*, remarkably reduced rotted zone in *B. cinerea*-infected apples from 530 (control) to only 173 mm<sup>2</sup>. All the selected isolates as well as OFI-, UL- and EI- extracts constitute promising supports of perspectives for ecological and renewable agriculture in future.

**Key words:** Salt stress, Osmoprotectants, PGPR, Proline, Glutamic acid, Phytopathogens.