

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة



DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2015

THÈSE

Présentée par

ARIF Fouzia

Pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : **Biologie**

Spécialité : **Microbiologie**

THÈME

**Effets du stress salin et d'osmoprotecteurs naturels sur la
germination de blé dur (*Triticum durum*) inoculé par
Pseudomonas fluorescens.**

Soutenue publiquement le/...../2015

DEVANT LE JURY

Président :	Dr LAROUS Larbi	Prof	Université Sétif 1
Directeur:	Dr GHOUL Mostefa	Prof	Université Sétif 1
Examineurs:	Dr KACEM Mourad	Prof	Université d'Oran
	Dr NABTI El hafid	Prof	Université de Béjaia
	Dr DAHIA Mostefa	MCA	Université de djelfa

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

DEDICACES

À mes très chers parents

Que Dieu les garde

À mon mari

À mes enfants

**À tous mes enseignants qui m'ont
éclairé la voie du savoir**

REMERCIEMENTS

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à **Monsieur M. GHOU**, Professeur de Microbiologie, pour m'avoir confié le sujet de cette étude. Je lui suis redevable pour l'aide et les conseils qu'il m'a prodigués et les qualités pédagogiques et scientifiques dont il a fait preuve à mon égard tout le long de ce travail. Un grand merci pour sa patience lors de la correction du manuscrit.*

***Monsieur L. LAROUS** m'a honoré en présidant ce Jury, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.*

***Messieurs M. KACEM, E. H. NABTI et M. DAHIA** ont accepté spontanément de faire partie de ce jury, je leur témoigne toute ma gratitude. Vos critiques et vos remarques me seront d'une grande utilité.*

*Je voudrais associer à mes remerciements **Monsieur R. GHARZOULI** pour avoir assuré l'identification de la plante halophyte.*

*Les algues marines sont généreusement fournies par Mr. **NABTI**, professeur à l'Université Béjaia, je le remercie beaucoup pour son aide et ses conseils.*

*Ma profonde gratitude va à Messieurs **SAHRAOUI**, directeur du CNCC et **SERSOUB**, Directeur de l'ITGC pour avoir fourni les semences de blé. Je les remercie pour leur accueil chaleureux et leurs encouragements.*

*Je tiens également à remercier Messieurs **SILINI** et **HABI** pour m'avoir fait profiter de leurs expériences.*

*J'exprime mes profonds remerciements à Monsieur **ZERROUG** pour ses conseils, son aide et son soutien.*

*Madame **CHERIF-SILINI** m'a beaucoup aidé dans la réalisation de l'arbre phylogénique, qu'elle trouve ici mes sincères remerciements*

*Je remercie beaucoup Madame **BOUSSOUALIM** pour son intervention dans des éclaircissements au cours de la réalisation de l'étude statistique.*

*Mes plus sincères remerciements vont à Messieurs **BENMOUHAMED, HAFSI** et Melle **HADDA**, pour leur aide et leurs conseils*

*Madame **NANCIB** m'a beaucoup soutenue et encouragée à aménager le laboratoire. Je la remercie pour ses discussions et son esprit scientifique.*

*Je remercie spécialement Melle **RABHI** pour son aide.*

*L'étude de quelques caractères physico-chimique était réalisé au laboratoire de pédologie, je tiens à remercier Mr. **SOUALILI** pour son aide.*

*Je n'oublie pas de remercier mes collègues **A. ROUABHI, A. BOUGUERRA, T. Guemez** et l'ingénieur de laboratoire **WARDA** pour leur aide et leur soutien.*

*Je dois remercier spécialement Melle **ASMA GHOUL** pour sa grande contribution à la finalisation de ce travail.*

MES PROFONDS REMERCIEMENTS VONT À MES PARENTS, MON MARI ET MES ENFANTS QUI ONT PARTAGÉ AVEC MOI LES MOMENTS DIFFICILES DE CETTE THÈSE. JE LES REMERCIE POUR LEUR PATIENCE ET LEURS SACRIFICES.

Résumé

La flore totale bactérienne et les *Pseudomonas* fluorescents de deux écosystèmes telluriques différents (blé et *Atriplex halimus*) sont évalués. Les numérations renseignent sur une richesse en bactéries des 2 rhizosphères. L'endosphère de *Atriplex halimus* abrite un nombre important d'espèces bactériennes. 23 isolats à Gram- présentant une fluorescence et des caractères biochimiques similaires à ceux des *Pseudomonas* fluorescents spp. sont retenus. Ils produisent des molécules bioactives stimulant la croissance végétale (acide indole acétique, sidérophores, ammoniac) et solubilisent les phosphates. La majorité exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de 2 champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata*, produit l'acide cyanhydrique et possède une protéase. Quatre souches sont identifiées comme *Pseudomonas putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5, *P. fluorescens* RB13 et *P. aeruginosa* EH4, par séquençage de l'ARNr 16S. Inhibées à 500 mM/ NaCl, la croissance des 4 souches est restaurée par un apport exogène de glycine bétaine et de Proline (1 mM). L'extrait de l'algue *U. lactuca* (au 1/ 100^{ème}) exerce un effet plus fort que les 2 molécules synthétiques. Tandis que celui de *A. halimus* n'apporte pas d'osmoprotection. En présence de 800 mM l'inhibition est totale quelles que soient les conditions. L'inoculation du blé dur Mohamed Ben Bachir par *P. fluorescens* RB13, *P. fluorescens* CHAO, isolément ou en culture mixte, en présence d'osmoprotecteurs [glycine bétaine, proline (5 mM) et extrait d'algue (3%)], augmente le taux cumulé de germination et la biomasse des plantes. La co-inoculation a un effet synergique évident par l'obtention d'un rendement maximal. *In vitro*, sur milieu de germination MS, les caractéristiques morpho-biochimiques sont significativement améliorées chez le blé co-inoculé et sous stress salin de 200 mM/ NaCl. L'effet synergique de la co-inoculation et de *U. lactuca* restaure considérablement les paramètres étudiés (biomasse, taux de proline, de chlorophylle et de caroténoïdes). Ces résultats sont en faveur d'une inoculation des graines de blé par des souches actives et halotolérantes de *P. fluorescens*. Une supplémentation en osmoprotecteurs naturels provenant de *U. lactuca* serait très bénéfique pour une agriculture durable dans les sols affectés par la salinité.

Mots clé : *A. halimus*, Caroténoïdes, Chlorophylle, Co-inoculation, Glycine bétaine, *P. fluorescens*, PGPR, Proline, Salinité, *T. durum*, *U. lactuca*.

ملخص

بينت الدراسة البكتريولوجية لعينات تربة من نظامين بيئيين مختلفين (قمح *Triticum durum* ونبات ملحي *Atriplex halimus*) أن تراب المنطقة اللصيقة بالجذور غني في عدد البكتريات وأن endosphere النبات الملحي يحوي عددا معتبرا من الأنواع البكتيرية. تم عزل 23 نوعا بكتيريا سالبة الغرام تعطي وميضا وتتمتع بالخصائص الكيميائية الحيوية المشابهة لـ *Pseudomonas fluorescens*. تمت معاينة قدرتها على إنتاج عدد من الجزيئات الحيوية التي لها القدرة على تحفيز نمو النباتات (حامض الأندول AIA، والسيدوروفور Siderophores، والأمونيا) وكذا انحلالية الفوسفات. أغلب العينات تثبط نمو الفطريات الممرضة *Fusarium oxysporum* و *Alternaria alternata*، وتنتج سيانيد الهيدروجين وتمتلك إنزيم بروتياز. شخصت أربع عينات بكتيرية بطريقة التسلسل الجيني لـ 16S ARNr على أنها

Pseudomonas putida AF2, *P. aeruginosa* RB5, *P. fluorescens* RB13, *P. aeruginosa* EH4. تأثير الملح على هذه السلالات تثبيطا في وجود 500 مليمول من NaCl واسترجاع النمو عند إضافة جليسين بيتاين (glycine) وبتاين (bétaine) وبرولين (proline) (1 ميلليمول). وكان مستخلص الطحلب *U. lactuca* أكثر فعالية من الجزيئيتين الاصطناعيتين. بينما لم يمنح مستخلص النبتة الملحية أي حماية للبكتيريا المجهدة بالملح. في وجود 800 مليمول كان التثبيط كليا في جميع الحالات. بينت عملية التلقيح الفردي أو المزدوج للقمح الصلب نوع محمد بن بشير بـ *P. fluorescens* و *P. fluorescens* RB13 وCHA0 وبإضافة الجزيئات التي تحمي من الملوحة [جليسين بيتاين، برولين (5مليمول) ومستخلص الطحلب (3%)] تحت ظروف الإجهاد الأسموزي تحسنا معتبرا في نسبة الإنتاش ووزن النبات. كان للتلقيح المزدوج تأثيرا تآزريا تمثل في تحسين المردود. أما التجربة التي أجريت في وسط إنتاش MS فبينت أن القمح الملقح بمزيج من البكتيريا والمجهد بتركيز 200 مليمول أظهر نتائج جيدة من حيث الخصائص المورفوبيوكيميائية. إن الجمع بين السلالتين البكتيريتين ومستخلص *U. lactuca* في تلقيح القمح مكن النبات من استعادة الخصائص التي تمت دراستها (الكتلة الحية، كمية البرولين، الكاروتين والكلوروفيل). إن هذه النتائج يمكن تطبيقها في تلقيح القمح بهذه السلالات النشطة والمقاومة للملوحة من نوع *P. Fluorescens* وبالإستعانة بالمستخلصات الطبيعية من *U. lactuca* يمكن استغلال الأراضي المتضررة بالملوحة من أجل زراعة مستدامة.

الكلمات المفتاحية: *A.halimus* الكاروتين، الكلوروفيل، التلقيح المزدوج، Glycine bétaine، *P. fluorescens*، PGPR،

البرولين، ملوحة، *U. lactuca*, *T. durum*

Abstract

The total bacterial flora and fluorescent *Pseudomonas* of two different ecosystems (wheat and *Atriplex halimus*) was evaluated. The counts provided information on the abundance of bacteria in the 2 rhizospheres. The endosphere of *Atriplex halimus* contains a significant number of bacteria. 23 Gram⁻ isolates exhibiting fluorescence and biochemical characteristics similar to those of fluorescent *Pseudomonas* spp. were retained. They produced bioactive molecules stimulating plant growth (indole acetic acid, siderophores, ammonia) and they solubilized phosphates. Most exerted inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternate*, produced hydrogen cyanide and has a protease. Four strains were identified as *Pseudomonas putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5, *P. fluorescens* RB13 and *P. aeruginosa* EH4 by sequencing the 16S rRNA gene. Inhibited by 500 mM/ NaCl, the growth of the strains 4 was restored by exogenous supply of glycine betaine and proline (1 mM). The extract of seaweed *U. lactuca* (1/100 th) exerted a stronger effect than the 2 synthetic molecules, while that of *A. halimus* showed no osmoprotection. Total inhibition was observed in the presence of 800 mM, no molecule could overcome stress. The seed inoculation of durum wheat variety Mohamed Ben Bachir with *P. fluorescens* RB13, *P. fluorescens* CHAO, singly or mixed culture, in the presence of osmoprotectors [glycine betaine, proline (5 mM) and seaweed extract (3%)], increased the cumulative rate of germination and plant biomass. The co-inoculation has a clear synergistic effect by obtaining maximum yield. *In vitro*, on MS germination medium, the morphological and biochemical characteristics were significantly improved with the co-inoculated wheat under an osmotic stress of 200 mM/ NaCl. The synergistic effect of co-inoculation and *U. lactuca* considerably restored the parameters studied (biomass, rate of proline, chlorophyll and carotenoids). These results are in favor of the inoculation of wheat seeds by active and halotolerant strains of *P. fluorescens*. Supplementation with natural osmoprotectant *U. lactuca* would be very beneficial for sustainable agriculture in the soils affected by salinity. .

Keywords: *A. halimus*, carotenoids, Chlorophyll, Co-inoculation, Glycine betaine, *P. fluorescens*, PGPR, Proline, Salinity, *T. durum*, *U. lactuca*.

Liste des Principales abréviations

ADNr : ADN ribosomal

AIA : Acide Indole Acétique

ARNr : ARN ribosomique

C_E: Conductivité électrique

CTAB : Cetyltriméthylammonium bromure

D.O : Densité optique

ddNTP : Didésoxyribonucléoside

dNTP : Deoxyribonucléoside triphosphate

dS: DéciSiemens

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

GB : Glycine bétaine

h : Heure

J : Jour

MF : Matière fraîche

mn : minute.

mM : millimolaire

mS : milliSiemens

nm : nanomètre

O.P: Osmoprotecteurs

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction)

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PHB: Poly (β -hydroxybutyrate)

Pro : Proline

EPS : Exopolysaccharides

rpm : Rotation par minute

ROS: Reactive Oxygen Species (Dérivés réactifs d'oxygène)

s : seconde

SDS : Dodécylsulfate de sodium (Sodium dodecyl sulfate)

SNR: Sol non rhizosphérique

TBE : Tris borate EDTA

TE : Tris-EDTA

UV: Ultraviolet

Liste de figures

Fig. 1	Compartiments du sol	5
Fig. 2	Sites de production des différentes classes de rhizodépôts	7
Fig. 3	Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire et la colonisation de la rhizosphère	8
Fig. 4	Colonisation endophytique de <i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	10
Fig. 5	Types d'endophytes et leur processus de colonisation des racines	10
Fig. 6	Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries...	12
Fig. 7	Mécanismes d'action des rhizobactéries sur les plantes	18
Fig. 8	Vue d'ensemble des différentes voies de synthèse de l'AIA chez les bactéries	20
Fig. 9	Effet des PGPR producteurs d'ACC désaminase	22
Fig. 10	Mécanismes impliqués dans la protection des plantes par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp	25
Fig. 11	Résistance systématique induite chez les plantes par des rhizobactéries	29
Fig. 12	Structures des principaux osmolytes/solutés compatibles accumulés dans la nature	34
Fig. 13	Modalités de l'atténuation du stress osmotique par les PGPR.....	39
Fig. 14	Localisation géographique de la zone de prélèvement d'un sol fertile	42
Fig. 15	Localisation géographique de la zone de prélèvement d'un sol salin	42
Fig. 16	<i>Atriplex halimus</i>	42
Fig. 17	Énumération de la flore bactérienne totale dans différents échantillons	50
Fig. 18	Dénombrement des <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp. sur milieux King B et S ₁	52
Fig. 19	Comparaison entre les deux milieux king B et S ₁	52
Fig. 20	Production d'AIA par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	73
Fig. 21	Taux de production des sidérophores par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	74
Fig. 22	Diamètres de solubilisation des phosphates par les souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	76
Fig. 23	Solubilisation des phosphates sur milieu NBRIP liquide par les souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents	76
Fig. 24	Production d'HCN par la souche <i>P. fluorescens</i> CHA0	78
Fig. 25	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporum</i>	80
Fig. 26	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>A. alternata</i>	80
Fig. 27	Effet inhibiteur des isolats sur <i>A. alternata</i> et <i>F. oxysporium</i>	80
Fig. 28	Zone de dégradation de la caséine par des isolats de sol salin	81

Fig. 29	Diamètres de dégradation de la caséine	81
Fig. 30	Arbres phylogénétiques basés sur la comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des souches isolées et de certaines souches phylogénétiquement proches	83
Fig. 31	Photo de l'algue marine <i>Ulva lactuca</i>	91
Fig. 32	CCM (gel de silice –isopropanol/ eau 3 :1) de substances Dragendorff- positive à partir de l'halophyte <i>A. halimus</i>	99
Fig. 33	Effet de différentes concentrations de NaCl sur les souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents	100
Fig. 34	Effet de différentes concentrations de NaCl et d'osmoprotecteurs sur la croissance des 4 souches de <i>Pseudomonas</i>	101-103
Fig. 35	Effet du NaCl/200 mM sur la germination du blé	104
Fig. 36	Effets de différentes concentrations de NaCl et d'osmoprotecteurs sur le taux cumulé de germination du témoin non inoculé de blé dur	104
Fig. 37	Effets de l'inoculation sur le taux cumulé de germination de blé stressé par différentes concentrations de NaCl	105
Fig. 38	Effet du sel et d'OP sur le taux cumulé de germination de blé inoculé par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	105-106
Fig. 39	Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais du blé non inoculé	107
Fig. 40	Effet de l'inoculation et du stress salin sur le poids frais du blé	107
Fig. 41	Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais du blé inoculé par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	108
Fig. 42	Effet de l'inoculation sur le poids sec de blé stressé par NaCl	109
Fig. 43	Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le poids sec du blé inoculé par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents	110
Fig. 44	Germination du blé sur milieu MS à 100 mM / NaCl	111
Fig. 45	Germination du blé sur milieu MS à 200 mM / NaCl	111
Fig. 46	Effet du sel sur la longueur de la plante de blé	112-113
Fig. 47	Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur la longueur de la partie aérienne du blé co- inoculé	113
Fig. 48	Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais du blé co-inoculé	114
Fig. 49	Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids sec du blé co-inoculé	115
Fig. 50	Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le nombre de racines de blé co-inoculé	115
Fig. 51	Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la longueur des racines de blé co-inoculé	116
Fig. 52	Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais des racines de blé co-inoculé	117
Fig. 53	Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le contenu foliaire en proline endogène de blé dur co-inoculé	118
Fig. 54	Effet de la co-inoculation sur le taux foliaire de chlorophylles en présence	

	de sel et d'osmoprotecteurs	119
Fig. 55	Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le taux de caroténoïdes des feuilles de graines co-inoculées	120

Liste des Tableaux

Tab. 1	Répartition de la population microbienne (UFC. g ⁻¹ de sol) dans la rhizosphère du blé et dans le sol	9
Tab. 2	Caractères importants de 3 espèces fluorescents de <i>Pseudomonas</i>	13
Tab. 3	Espèces appartenant actuellement au genre <i>Pseudomonas</i>	16
Tab. 4	Taxonomie du blé dur	43
Tab. 5	Taxonomie de <i>A. halimus</i>	43
Tab. 6	Paramètres physico-chimiques des 2 sols étudiés	49
Tab. 7	Tableau récapitulatif des résultats de dénombrement de la flore totale et des <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp. isolés de différents échantillons	51
Tab. 8	Pourcentage des <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp. présents dans les échantillons analysés.....	53
Tab. 9	Observations macro- et microscopiques des colonies isolées du milieu CSEA	54
Tab. 10	Quelques caractères biochimiques des colonies isolées sur milieu CSEA	54
Tab. 11	Caractères biochimiques des souches isolées à partir du sol fertile et de la souche de référence <i>P. fluorescens</i> CHA0	55
Tab. 12	Caractères biochimiques des souches isolées à partir de la rhizosphère du blé	56
Tab. 13	Caractères biochimiques des souches isolées à partir du milieu salin ...	56
Tab. 14	Séquences et positions des amorces utilisées	70
Tab. 15	Composition du mélange réactionnel	70
Tab. 16	Programmes et cycles d'amplification des ITS – PCR	70
Tab. 17	Composition du mélange réactionnel pour le séquençage	72
Tab. 18	Cycles de dénaturation-hybridation-élongation lors du séquençage	72
Tab. 19	Production de NH ₃ par les isolats du sol fertile	77
Tab. 20	Production de NH ₃ par les isolats de la rhizosphère de blé et de la souche de référence <i>P. fluorescens</i> CHA0	77
Tab. 21	Production de NH ₃ par les isolats de l'écosystème salin	77
Tab. 22	Production d' HCN par les isolats du sol fertile	78
Tab. 23	Production d' HCN par les isolats de la rhizosphère du blé et de la souche de référence.....	78
Tab. 24	Production d'HCN par les isolats de l'écosystème salin	78
Tab. 25	Taxonomie de l'algue marine <i>Ulva lactuca</i>	90

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publication

Cherif-Silini, H., A. Silini, M. Ghoul, B. Yahiaoui and **F. Arif**. **2013**. Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *African Journal of Microbiology Research*. **7**: 4562- 4571.

Arif, F., Silini A., Cherif-Silini H and Ghoul, M. **2015**. Plant growth promoting and antagonistic traits of indigenous fluorescent *Pseudomonas* spp. Isolated from wheat rhizosphere and *A. halimus* endosphère. *European Scientific Journal*, 11 (24): 129- 148

Communications:

ARIF, F. et GHOUL, M. (**2007**). Halotolérance des *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés du sol. Effet osmoprotecteur d'halophytes. Quatrièmes journées de microbiologie appliquée. (Bejaia, Algérie, 10-11 Novembre).

ARIF, F., RABHI, N. E. H., CHERIF, H. et GHOUL, M. (**2010**). Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads isolated from Algerian soil. Journées Internationales de Biotechnologie. (Yasmine Hammamet, Tunis, 19-22 Décembre).

RABHI, N. E. H., **ARIF, F.**, Cherif, H. et GHOUL, M. (**2011**). Production of secondary metabolites by indigenous halotolerant strains of fluorescent Pseudomonads. Mediterranean Conference on natural Products. (Tipaza, Alegria, 9-10 October).

ARIF, F. et GHOUL, M. (**2011**). Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur *P. fluorescens* CHAO. 17^{ème} Journées Nationales de Microbiologie. (Sétif, Algérie, 20 et 21 Novembre).

RABHI, N. E. H., **ARIF, F.**, Silini, A. et GHOUL, M. (**2011**). Production of plant regulator, indole-3-acetic acid, by fluorescent Pseudomonads under saline condition. 17^{ème} Journées Nationales de Microbiologie. (Sétif, Algérie, 20 et 21 Novembre).

ARIF, F., Rabhi N. E. H. et GHOUL, M. (**2011**). Activités PGPR de *Pseudomonas fluorescens* CHAO. Réponse au stress osmotique et aux osmoprotecteurs synthétiques. Journées Internationales de Biotechnologie. (Sousse, Tunis, 19- 22 décembre).

Rabhi, N. E. H., **ARIF, F.** et GHOUL, M. (**2011**). Effect of salt stress on plant growth promoting *Pseudomonas aeruginosa* and responses to natural osmoprotectants added. Journées Internationales de Biotechnologie. (Sousse, Tunis, 19- 22 Décembre).

Rabhi, N. E. H., **ARIF, F.** et GHOUL, M. (**2012**). *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from saline soil showing indole- 3- acetic acid production under saline condition. 3rd International Workshop on Industrial Biotechnology. (Sfax, Tunisia, April 23-24).

Silini, A. Cherif Silini, H. et **ARIF, F.** (**2012**). Characterization of rhizobacteria for their many activities improving the plant growth. International Congress "Microbial Biotechnology for Development" (MICROBIOD2). (Marrakech, Morocco, 02- 04 October).

Cherif Silini H., Silini A., **ARIF, F.**, Baiche, K. (2012). Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. International Congress "Microbial Biotechnology for Development" (MICROBIOD2). (Marrakech, Morocco, 02- 04 October).

ARIF, F., Rabhi, N. E. H., Cherif, H. et GHOUL, M. (2012). Solubilisation des phosphates par les *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de la rhizosphère du blé. Effet de sel et d'osmoprotecteurs. 18^{èmes} Journées Nationales de microbiologie. (Tizi Ouzou, Algérie, 26-27 Novembre).

ARIF, F., Cherif, H., Silini, A., Habi, S. et GHOUL, M. (2012). Effect of salt and osmoprotectors on the growth of fluorescent Pseudomonads with PGP activities. BIODESERT International, Conference (Microbial resource management for agriculture in arid lands) (Hammamet, Tunisia, 16- 19 December).

ARIF, F., N.E.H. Rabhi, Cherif, H, Habi, S. et GHOUL, M. (2012). Production d'acide indole acétique par les *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de la rhizosphère de blé. Effet de sel et d'osmoprotecteurs. Journées Internationales de Biotechnologie (Mahdia, Tunis, 19-22 Décembre).

ARIF, F., Rabhi, N. E. H., Silini, A. et GHOUL, M. (2013). Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads as biocontrol agents. 1^{er} forum de biotechnologie & valorisation des biosources (Tabarka, Tunis, 05- 07 Mars).

ARIF, F., Rabhi, N. E. H., Cherif, H. et GHOUL, M. (2013). Characterization of fluorescent pseudomonads isolated from wheat rhizosphere as plant growth promoters. 4th International Workshop on Industrial biotechnology. (Tlemcen, Algérie, April 10-11).

Rabhi, N. E. H., **ARIF, F.** et GHOUL, M. (2013). Use of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing siderophores as biopesticides and the halophyte *Atriplex halimus* as biofertilizer under saline conditions. 4th International Workshop on Industrial biotechnology. (Tlemcen, Algérie, April 10-11).

Rabhi, N. E. H., **ARIF, F.** et GHOUL, M. (2013). Use of halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* strains producing bioactive molecules as biocontrol agents. 1^{er} SNBMBPC. (Batna, Algeria, Octobre 2013).

ARIF, F. et GHOUL, M. (2013). Molécules bioactives synthétisées par *P. fluorescens* CHA0. Effet de sel et d'osmoprotecteurs naturels. 11^{ème} Rencontres de Fertilisation raisonnées et de l'analyse. (Paris, France, Novembre 20-21).

Rabhi, N.E. H., **ARIF, F.** et GHOUL, M. (2014). Antifungal activity of halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from salt affected rhizospheric soil. 1^{er} séminaire national "Etat des lieux, conservations et possibilités de valorisation des ressources biologiques dans l'est Algérien". (Mila, Algérie, Mars 11-12)

ARIF, F., N.E.H. Rabhi, H. Cherif, A. Silini, S. Habi et GHOUL, M. (2014). *Pseudomonas fluorescens* en tant qu'agent de biofertilisation et de biocontrôle. Halotolérance en présence et en absence de deux molécules osmoprotectrices. 2^{ème} congrès de biotechnologie et valorisation des bio-ressources. (Tabarka, Tunisie, Mars 18-20).

ARIF, F., N.E.H. Rabhi, A. Silini, S. Habi et GHOUL, M. (2014). Bioactive molecules produced by *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Effect of salt and synthetic osmoprotectants. 25^{ème} forum International des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB. (Hammamet, Tunisie, Mars 24- 27).

ARIF, F., N.E.H. Rabhi et GHOUL, M. (2014). *Pseudomonas putida* en tant qu'agent de biofertilisation et de biocontrôle. 20^{èmes} Journées Nationales de Microbiologie. (Jijel, Algérie, 12- 13 Novembre).

ARIF, F., N. E. H. Rabhi, A. Slini, H. Cherif-Silini, S. Habi et M. GHOUL. (2014). Rôle de *Pseudomonas fluorescens* RB13 dans la biofertilisation et le biocontrôle des phytopathogènes. (Hammamet, Tunisie, 20 -24 Décembre).

ARIF. F. et M. GHOUL, (2015). Effet de l'inoculation par *Pseudomonas putida* AF2 et des molécules osmoprotectrices sur la germination du blé sous stress salin. Séminaire International des Biotechnologies (SIBC). (Constantine, Octobre 19, 20 et 21).

ARIF. F et M. GHOUL. (2015). Amélioration de la croissance de blé inoculé par *Pseudomonas fluorescens* RB13 sous stress salin. (Séminaire International « Systèmes de production en Zones Semi-arides. Diversité agronomique et Systèmes de cultures »). (Msila, Novembre 04- 05).

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1- Sol et bactéries	5
1-1 Sol	5
1-2 Rhizosphère	5
1-2-1 Rhizodéposition	6
1-2-2 Effets rhizosphériques	8
1-2-3 Rhizobactéries	9
2- Bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>	11
2-1 Classification	11
2-2 Caractéristiques générales	11
2-3 Evolution de la taxonomie du genre <i>Pseudomonas</i>	11
2-4 Critères actuels de la taxonomie de <i>Pseudomonas</i>	15
3- Effets bénéfiques des rhizobactéries	17
3-1 Phytostimulation	18
3-1-1 Acide indole acétique (AIA)	19
3-1-2 cytokinines	21
3-1-3 Gibberellines	21
3-1-4 ACC désaminase.....	21
3-2 Amélioration de la nutrition de la plante	22
3-2-1 Solubilisation des phosphates	22
3-2-2 Production de sidérophores	23
3-2-3 Fixation d'azote	23
3-3 Protection des plantes	24
3-3-1 Antibiose	25
3-2-2 Composés volatiles	26
3-2-3 Production d'enzymes	27
3-2-4 Compétition pour le fer et la production de sidérophores	27
3-2-5 Résistance Systémique Induite (RSI)	28

4- Effet du sel et Osmorégulation chez les plantes	29
4- 1 Stress abiotique	29
4-2 Salinité du sol	29
4-3 Action du sel sur les plantes	29
4-3-1 Glycophytes	30
4-3-2 Halophytes	31
a- Définition et Classification	31
b- Effets du sel	31
4-4 Aspects et mécanismes de l'halotolérance	31
4-4-1 La détoxification	32
4-4-2 L'homéostasie	32
a- L'héméostasie ionique	32
b- L'homéostasie moléculaire	33
4-4-3 Synthèse de solutés compatibles	33
a- Glycine bêtaïne	33
b- Proline	35
c- Sulfoniums tertiaires	35
d- Ectoïne	35
e- Polyols	35
f- Potassium	36
5- Osmorégulation chez les bactéries	36
6- Effets des PGPR sur les plantes stressées par le sel	37
PARTIE PRATIQUE.....	40
Chapitre I : Isolement et caractérisation des <i>Pseudomonas</i>	
fluorescents spp.	41
1- Matériel et méthodes	41
1-1 Echantillonnage	41
1-1-1 Sols	41
1-1-2 Rhizosphères	41
1-2- Analyse physico-chimique du sol	43
1-2-1 Mesure du pH et de la conductivité électrique	43
1-2-2 Taux de Carbone organique	44

1-2-3 Taux d'humidité	44
1-3- Analyse microbiologique	45
1-3-1- Isolement et dénombrement de la flore bactérienne totale	45
a- À partir des sols et des rhizosphères	45
b- A partir des endosphères	46
1-3-2 Isolement et dénombrement des <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	46
1-3- 3 Expression des résultats	47
a- Nombre d'UFC/g de sol	47
b- Calcul du rapport R/S	47
1-3-4 Purification	47
1-3-5 Identification des isolats	48
1-3-6 Conservation des souches	48
2- Résultats	48
2-1 Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés	48
2-2 Dénombrement de la flore bactérienne totale	49
2-3 Calcul de l'effet thizosphérique	50
2-4 Dénombrement des <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	50
2-4-1 A partir des sols	50
2-4-2 A partir des rhizosphères	51
2-4-3 À partir des endosphères	51
2-5 Tests d'identification des isolats	53
2-5-1 A partir du milieu CSEA	53
2-5-2 A partir des milieux sélectifs	53
3- Discussion	57
3-1 Analyse physico-chimique du sol	57
3-2 Dénombrement de la flore totale	58
3-3 Dénombrement des <i>Pseudomonas</i> fluorescents spp.	60
3-4 tests d'identification	61
4- Conclusion	61
Chapitre II Activités promotrices de la croissance végétale (PGPR)...	63
1- Matériel et méthodes	63

1-1 Pouvoir phytoestimulant : production de l'acide indole acétique (AIA)	63
1-2 Pouvoir biofertilisant	63
1-2-1 Production de sidérophores	63
a- Sur milieu solide	63
b- Sur milieu liquide	64
1-2-2 Solubilisation des phosphates	64
a- Sur milieu solide	64
b- Sur milieu liquide	64
1-2-3 Production d'ammoniac	65
1-3 Rôle de biocontrôle	65
1-3-1 Production d'acide cyanhydrique	65
1-3-2 Activité antifongique	66
1-3-3 Hydrolyse de la caséine	66
1-4 Analyses statistiques des données	66
1-5 Identification moléculaires des isolats	66
1-5-1 Extraction de l'ADN génomique	67
a- Lyse de la membrane	67
b- Extraction	68
c- Précipitation	68
1-5-2 Quantification de L'ADN	68
1-5-3 Amplification de l'ADN par PCR	69
1-5-4 Amplification des séquences de l'ADN ribosomal nucléaire	69
1-5-5 Visualisation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	69
1-5-6 Séquençage	71
1-5-7 Traitement des résultats	72
2- Résultats	72
2-1 Production d'AIA	72
2-2 Production de sidérophores	73
2-3 Solubilisation des phosphates	74
2-4 Production d'ammoniac	76
2-5 Production d'acide cyanhydrique	77
2-6 Activité antifongique	78
2-7 Protéase	81

2-8 Identification moléculaire	82
3- Discussion	83
4- Conclusion	88
Chapitre III : Effet du stress salin sur la germination de blé inoculé en présence et en absence d'osmoprotecteurs naturels et synthétiques	89
1- Matériel et méthodes	89
1-1 Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur les bactéries	89
1-1-1 Milieu de culture	89
1-1-2 O.P synthétiques	90
1-1-3 O.P naturels	90
1-1-4 Détection des composés osmoprotecteurs naturels	91
a- Cas de la GB	91
b- Cas de la proline	92
1-1-5 Étude de l'effet d'O.P naturels sur les bactéries	92
1-1-6 Inoculation des milieux	92
1-2 Effet du sel et d'O.P sur la germination du blé inoculé	92
1-2-1 Choix et préparation des souches bactériennes	92
1-2-2 Choix du matériel végétal	93
1-2-3 Préparation des solutions d'O.P	93
1-2-4 Inoculation du blé	93
1-2-5 Effet du stress osmotique et des O.P	94
1-2-6 Détermination des paramètres de croissance	94
1-3- Effet du sel, de la GB et de l'extrait de <i>U. lactuca</i> sur la germination du blé co-inoculé. Expérimentation <i>in vitro</i>	95
1-3-1 Milieu de germination	95
1-3-2 Milieu MS à base d'extrait de <i>U. lactuca</i>	95
1-3-3 Bactérisation du blé	96
1-3-4 Pré-germination	96
1-3-5 Germination sur milieu MS	96
1-3-6 Paramètres morphologiques	97
1-3-7 Paramètres physiologiques	97

a- Dosage de la proline	97
b- Dosage des pigments photosynthétiques	98
1-3-8 Analyse statistique	98
2- Résultats	98
2-1 Détection des composés osmoprotecteurs	98
2-2 Halotolérance des <i>Pseudomonas fluorescents</i> spp.	99
2-3 Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la germination du blé inoculé	103
2-3-1 Effet du sel et d'O.P sur le taux cumulé de germination	103
2-3-2 Effet du sel et d'OP sur le poids frais et sec du blé inoculé	106
2-4 Effet du sel, de la GB et de l'extrait d'<i>U. lactuca</i> sur la germination du blé co-inoculé par <i>P. fluorescens</i> RB13 et <i>P. fluorescens</i> CHA0	110
2-4-1 Caractères morphologiques	112
a- Partie aérienne	112
b- Partie racinaire	115
2-4-2 Caractères biochimiques	117
a- Taux de proline	117
b- Taux de chlorophylle	118
3- Discussion	120
3-1 Halotolérance des <i>Pseudomonas fluorescents</i> spp. en présence d'O.P	120
3-2 Effet de l'inoculation et des osmoprotecteurs sur la germination du blé inoculé sous stress salin	123
4- Conclusion	131
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE	 132
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	 134

INTRODUCTION

Le sol, symbole de la production agricole, est le support de la biodiversité. C'est le réacteur biologique qui assure de nombreuses fonctions environnementales. Il offre un habitat pour un très grand nombre de microorganismes. La rhizosphère, fraction du sol riche en exsudats racinaires, est occupée par différents groupes bactériens connus par leur pouvoir promoteur de la croissance végétale, d'où leur nom : PGPR (de l'anglais Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Par leur production de phytohormones (Patten et Glick, 1996), de sidérophores et par leur solubilisation des phosphates (Glick, 1995), ces bactéries favorisent la croissance de leur plante hôte. Par la synthèse d'antibiotiques et d'acide cyanhydrique, elles assurent un rôle de biocontrôle des phytopathogènes (Thomashow et Weller, 1988 ; Voisard *et al.*, 1989).

Tout comme leur plante hôte, les bactéries rhizosphériques sont soumises à de multiples contraintes abiotiques dont la salinité élevée de leur écosystème. Dans les zones arides et semi-arides, la contrainte saline reste l'un des facteurs majeurs limitant la production agricole. L'accumulation de sel dans ces écosystèmes est la conséquence d'une forte irrégularité des précipitations associée à une importante évaporation de l'eau (Ashraf et Foolad, 2007).

En effet, environ 10% de la surface terrestre sont concernés par ce problème (Schofield et Kirkby, 2003). Selon Flowers et Colmer (2015), plus de 72 % des sols sont touchés par une accumulation excessive d'ions Na^+ and Cl^- et donc perdus, souvent de manière irréversible. En Algérie, les terres agricoles se situent principalement dans l'étage bioclimatique semi-aride. Les sols salins occupent une surface importante estimée de 3,2 millions d'hectares, ce qui représente approximativement 40 % de la surface des sols fertiles (Chadli et Belkhodja, 2007). À terme, ce phénomène risque de mettre en péril la sécurité alimentaire.

Le stress salin perturbe le fonctionnement physiologique normal de la plante, ralentit sa croissance et limite sa productivité. Face à cette contrainte, les plantes mettent en œuvre plusieurs mécanismes d'adaptation, parmi lesquels une excrétion des ions (Na^+ , Cl^-) (Munns, 2002) et une accumulation de solutés compatibles telles que la glycine bêtaïne et la proline (Hasegawa *et al.*, 2000).

Le blé constitue l'aliment de base et de choix depuis l'antiquité. L'Algérie occupe la 5ème place dans le classement mondial de consommation des céréales (Djermoun, 2009). La surface consacrée à la culture du blé est de $1,5 \times 10^6$ ha sur les $3,10 \times 10^6$ ha réservés à la céréaliculture. La production ne couvre pas les besoins de la population en croissance

démographique et selon le conseil International des céréales (C.I.C, 2000), l'Algérie a importé au cours des années (1990-2000) plus de 65% du blé dur destiné à l'Afrique du Nord. La salinité des sols constitue une entrave primordiale de cette culture.

L'amélioration de la productivité du blé dans des conditions de stress salin a fait l'objet de plusieurs recherches. Les modifications génétiques ont donné naissance à des variétés halotolérantes. Toutefois ces essais, onéreux, nécessitent la connaissance détaillée de tous les modes de résistance adoptés par la plante afin de déterminer des critères de sélection appropriés.

L'inoculation des plantes à intérêt économique, essentiellement le blé, par des rhizobactéries promotrices de la croissance végétale tels *Azospirillum*, *Pseudomonas* et plusieurs espèces de *Bacillus* est une approche biologique efficace et économiquement rentable pour la récupération des sols affectés par le sel et l'augmentation du rendement agricole (Mayak *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2009).

Pour inoculer les graines de blé destinées à la culture dans des régions affectées par la salinité, il est impératif de sélectionner des souches bactériennes capables de coloniser les racines des plantes hôtes et de synthétiser leurs molécules bioactives dans ces zones et dans ces conditions défavorables.

Afin de renforcer l'halotolérance des bactéries et améliorer la croissance du blé inoculé, le recours à des molécules osmoprotectrices est d'une grande nécessité. Cependant, l'usage de solutés compatibles artificiels est onéreux. En effet, la dose de glycine bétaine la plus efficace utilisée dans le traitement des semences est de 1,1 kg / ha (Ashraf et Foolad, 2007). Les plantes des écosystèmes salins (halophytes et algues marines) élaborent une variété d'osmoprotecteurs (glycine bétaine, proline et autres molécules) pour s'adapter à leur environnement. Elles constituent ainsi une source importante d'osmoprotecteurs naturels qu'il faut extraire et utiliser comme alternative aux molécules synthétiques coûteuses.

Dans le cadre des recherches multiples sur l'amélioration de la tolérance du blé aux contraintes salines, cette étude se propose de répondre aux questions suivantes :

Quelle est la conséquence de l'inoculation d'une variété locale de blé par deux espèces de *Pseudomonas fluorescens*, dont l'une est indigène, sous contrainte saline ?

La combinaison entre bactérie(s) et osmoprotecteurs naturels participerait-elle à l'atténuation de l'effet de stress sur les caractères morpho-biochimiques des graines stressées ?

Dans cet ordre, la stratégie suivante est adoptée :

- Un isolement de *Pseudomonas* fluorescents spp. à partir de deux écosystèmes différents : fertile (sol, rhizosphère de blé) et salin (sol, rhizosphère et endosphère d'une plante halophyte) est réalisé dans un premier temps.
- Dans une seconde étape, les souches retenues sont testées pour leurs activités stimulatrices de la croissance végétale.
- L'effet d'osmoprotecteurs (naturels et synthétiques) sur des souches de *Pseudomonas* fluorescents spp. stressées par le sel, est vérifié.
- Dans la dernière partie, l'effet combiné de l'inoculation de blé dur par 2 souches de *P. fluorescens* et d'un apport exogène de molécules osmoprotectrices sur la germination et les caractères morpho-biochimiques est testé.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1- Sol et bactéries

1-1 Sol

Le sol, ou encore « épiderme vivant de la terre », n'est qu'une infime pellicule à la surface de la croûte terrestre où s'ancrent les racines des plantes pour puiser l'eau et les éléments minéraux nécessaires à la croissance végétale. Trois compartiments physiques y sont distingués : solide, liquide et gazeux. Le sol est également un support de vie fondé sur la matière organique (Davet, 1996 ; Pansu, 2003), (Fig. 1).

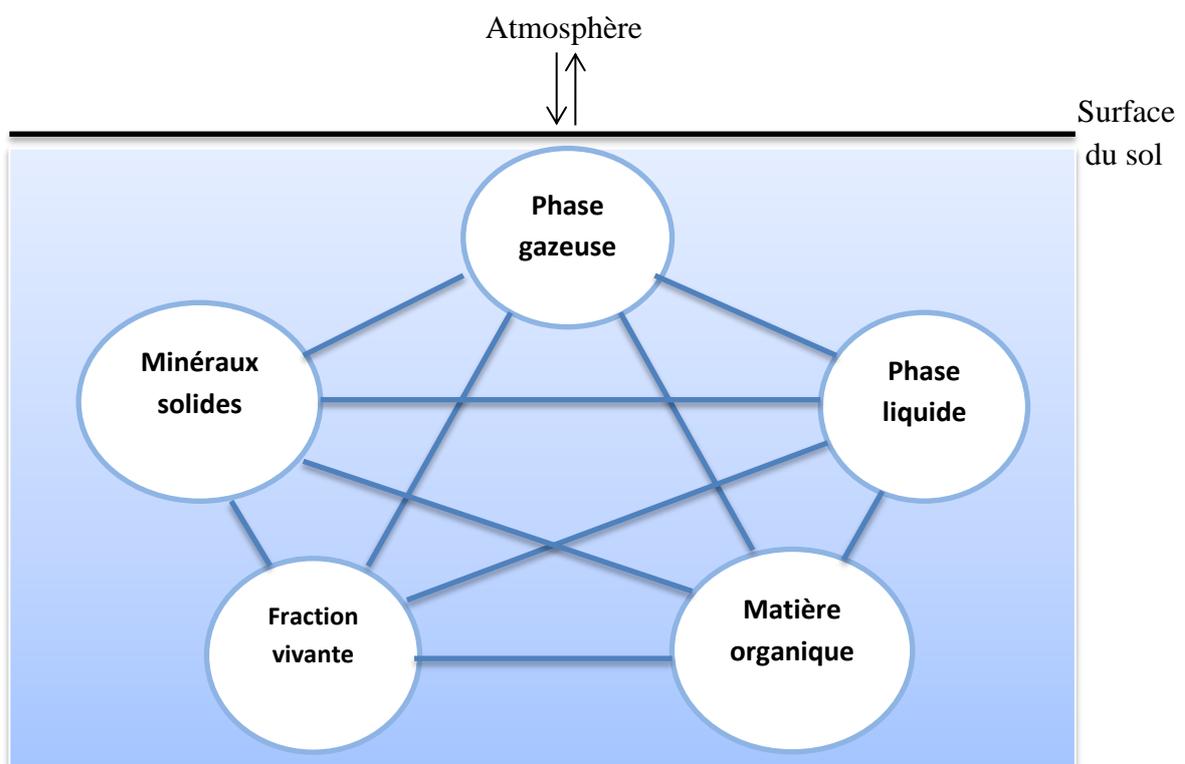


Fig. 1 : Compartiments du sol. Chacun des traits symbolise une possibilité d'interaction (Davet, 1996).

1- 2 Rhizosphère

Le terme « rhizosphère » fût utilisé pour la première fois par Hiltner (1904) pour désigner la zone des interactions entre bactéries et racines des légumes (Durand et Knusden, 2002). Plus tard, Curl et Truelove (1986) décrivent la rhizosphère comme « une zone étroite du sol sujette à l'influence des racines, suite à la perte ou à l'exsudation de substances affectant l'activité microbienne ». Ainsi, la rhizosphère -s'étendant à 5 mm en dehors de la surface racinaire- est formée de l'interaction de la plante, du sol adjacent à la racine et des micro-organismes associés (Durand et Knusden, 2002). Globalement, il existe trois éléments

distincts reconnus dans la rhizosphère : la rhizosphère *per se* (en soi : sol), le rhizoplan, et la racine elle-même.

- La rhizosphère est la zone de sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats affectant l'activité microbienne.
- Le rhizoplan est la surface de la racine, comprenant les particules de sol adhérant fortement.
- La racine est elle-même une partie du système, car certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus des racines internes (Bowen et Rovira, 1999).

Par leur activité et leurs exsudats, les racines sont qualifiées d' « ingénieurs biologiques du sol ». Elles permettent le maintien des communautés microbiennes (Lawton et Jones, 1995).

1-2- 1- Rhizodéposition

Selon Whipps (1990) et Bais *et al.* (2006), plus de 40% des photosynthétats de la plante passent au niveau du système racinaire sous forme de rhizodépôts (Fig. 2). La classification de Rovira *et al.* (1979) distingue :

- **Les exsudats *sensu stricto***

Il s'agit de composés solubles de faible poids moléculaire tels les sucres ou des acides aminés, facteurs de croissance et des hormones, libérés par diffusion passive hors des cellules racinaires (Rovira *et al.*, 1979). Ils constituent la part majeure des rhizodépôts et sont métabolisés rapidement par les microorganismes (Gobat *et al.*, 2004).

Les exsudats sont impliqués dans l'établissement des associations plantes-microorganismes et déterminent essentiellement la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère en stimulant leur chimiotaxie (Marschner *et al.*, 2001; Whipps, 2001 ; Somers *et al.*, 2004).

La structure complexe des communautés microbiennes dépend de la composition des exsudats racinaires (Yang et Crowley, 2000), de l'âge de la plante, du type de racines et de la composition du sol (Anderson *et al.*, 1993 ; Chiarini *et al.*, 1998).

- **Les sécrétions**

Les sécrétions comprennent un groupe de composés de poids moléculaire élevé libérés par transport actif (Davet, 1996). Elles incluent les polysaccharides (mucilages), les enzymes et quelquefois les vitamines (Rovira *et al.*, 1979). Les mucilages sont indispensables pour l'agrégation des micro-organismes et des particules du sol. Ils sont très rapidement

métabolisés par la microflore rhizosphérique. Cette dernière secrète, par addition de substrats riches en carbone, d'autres polysaccharides très souvent résistants à la décomposition enzymatique (Gobat *et al.*, 2004).

Les cellules peuvent excréter activement des protons ou des acides organiques dans le but de maintenir leur équilibre ionique (Gobat *et al.*, 2004).

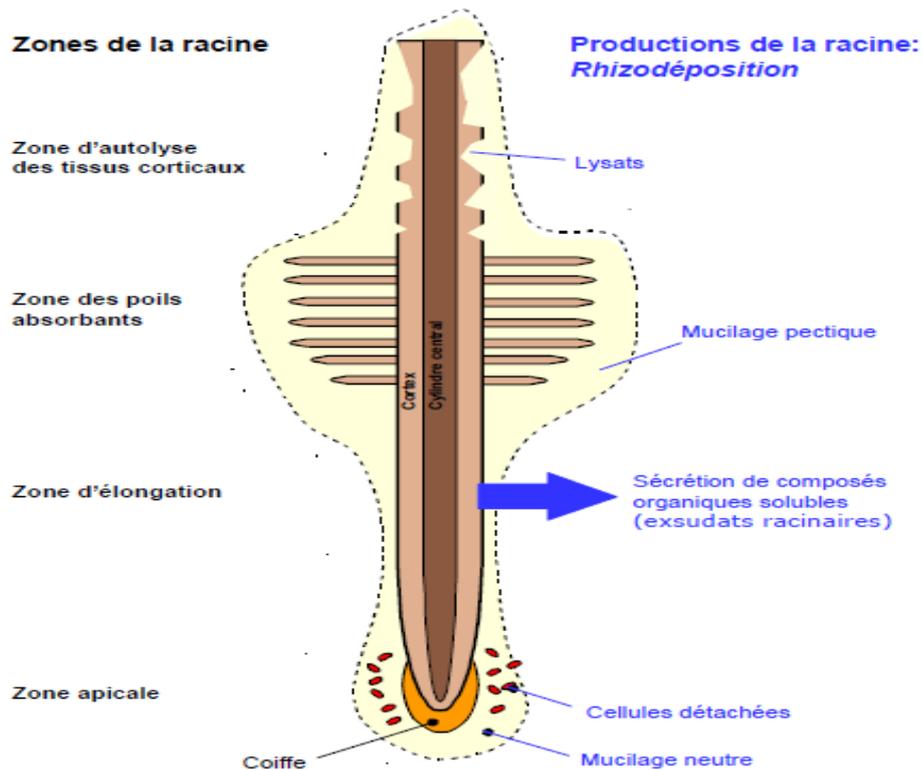


Fig. 2 : Sites de production des différentes classes de rhizodépôts le long d'une racine (Gobat *et al.*, 2004)

- Le mucigel

Ce terme introduit pour la première fois par Jenny et Grossenbacher (1963), désigne le matériel gélatineux présent à la surface des racines au niveau de la zone d'élongation et d'absorption. Il est constitué de mucilages racinaires dégradés par la microflore du sol, de cellules microbiennes et de produits de synthèse microbienne associés aux colloïdes du sol.

- Les lysats

Les lysats sont des composés résultant de l'autolyse des cellules racinaires sénescents, utilisés par les bactéries saprophytes rhizosphériques (Gobat *et al.*, 2004).

1-2-2 Effet rhizosphérique

Durant la germination et la croissance racinaire, la libération de matière organique et inorganique favorise le développement de populations microbiennes spécifiques autour de la racine. Ce phénomène est appelé : «effet rhizosphère » (Whipps, 2001 ; Durand et Knusden, 2002). Plusieurs paramètres influencent ce phénomène tel le type de sol, le taux d'humidité et l'âge de la plante (Manoharachary et Mukerji, 2006), (Fig. 3).

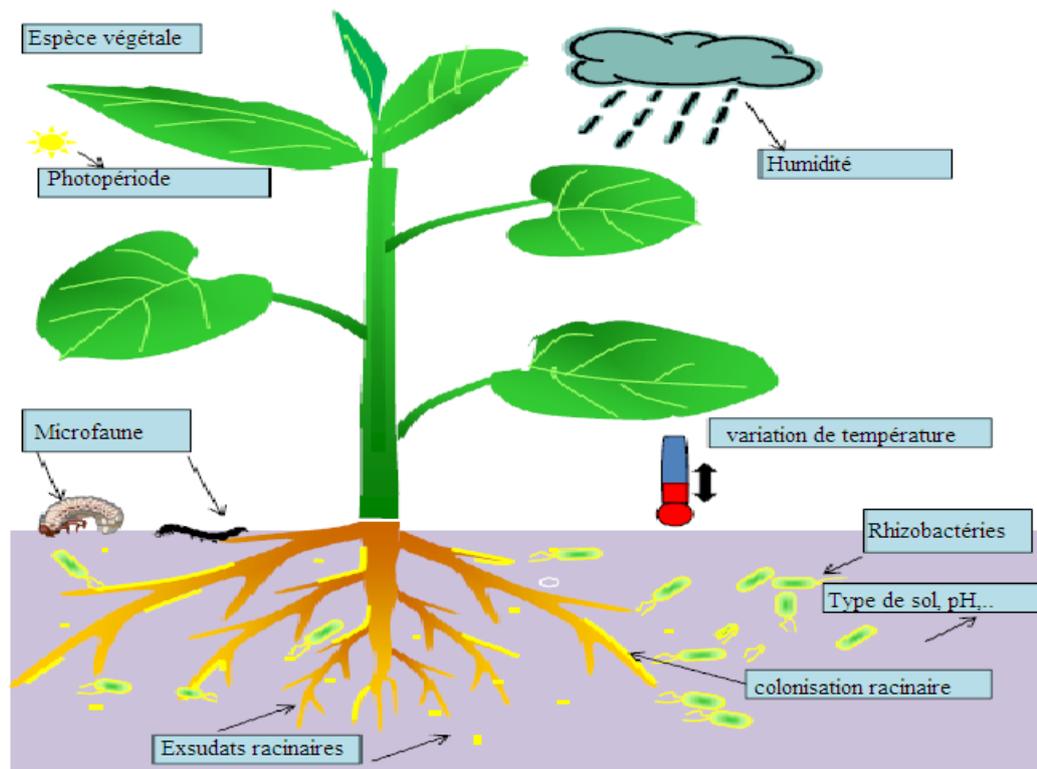


Fig. 3 : Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire et la colonisation de la rhizosphère (Nihorimbere, 2010).

L'effet rhizosphérique est mesuré en comparant les populations microbiennes dans un sol non rhizosphérique avec ceux provenant d'un sol intimement associé avec les racines (R) et est exprimé en termes de ratio R/S (Timonin, 1966). Ce rapport est utilisé pour illustrer la façon avec laquelle la rhizosphère affecte les différents groupes de micro-organismes (Antoun et Klopper, 2001). En effet, les populations bactériennes dans la rhizosphère diffèrent quantitativement et qualitativement de celle d'une masse de sol (Tab.1) ; leur nombre est plus élevé, et différentes populations y sont détectées (Durand et Knusden, 2002 ; Kent et Triplett, 2002).

Tab. 1: Répartition de la population microbienne (UFC.g⁻¹ de sol) dans la rhizosphère du blé (*Triticum aestivum* L.) et dans le sol (Gray et Williams, 1971)

Micro- organismes	Rhizosphère (R)	Sol (S)	Ratio R/S
Bactéries	1,2.10 ⁹	5,3.10 ⁷	23
Actinomycètes	4,6.10 ⁷	7,0.10 ⁶	7
Microflore ammonifiante	5,0.10 ⁸	4,0.10 ⁶	125
Microflore dénitrifiante	1,26.10 ⁸	1,0.10 ⁵	1260
Champignons	1,2.10 ⁶	1,0.10 ⁵	12

1-2-3 Rhizobactéries

Dans la rhizosphère, la concentration en bactéries peut être 10 à 1 000 fois supérieure à celle du reste du sol (Lugtenberg et Kamilova, 2009). Les bactéries occupent des niches écologiques distinctes (Bowen et Rovira, 1999) :

- La rhizosphère, zone de sol influencée par les exsudats racinaires
- Le rhizoplan, surface de la racine, comprenant les particules de sol adhérant fortement.
- Les tissus des racines internes colonisés par des microorganismes endophytes (Fig. 4) isolés après stérilisation de la surface (Mayak *et al.*, 2004).

Les bactéries du sol peuvent devenir endophytes *via* la colonisation des blessures ou suite à l'invasion de la racine par les nématodes (Fig. 5). Ces bactéries considérées comme passagères sont souvent limitées au tissu de cortex racinaire. Les endophytes opportunistes colonisent le rhizoplan suite à une réponse chimiotactique et envahissent les tissus internes de la plante à travers les fissures formées au niveau des racines latérales et des radicelles. Ces bactéries sont limitées à des tissus particuliers (comme le cortex de la racine). Les endophytes compétentes sont bien adaptées au milieu de la plante. Elles envahissent des tissus typiques (tissus vasculaires) et se propagent dans toute la plante. Elles détournent le métabolisme tout en maintenant un équilibre harmonieux avec la plante hôte, même si elles sont présentes en grandes quantités (Hardoim *et al.*, 2008).

Les bactéries (rhizosphériques ou endophytes) peuvent être à l'origine de maladies tandis que d'autres peuvent, favoriser la croissance à travers différents mécanismes.

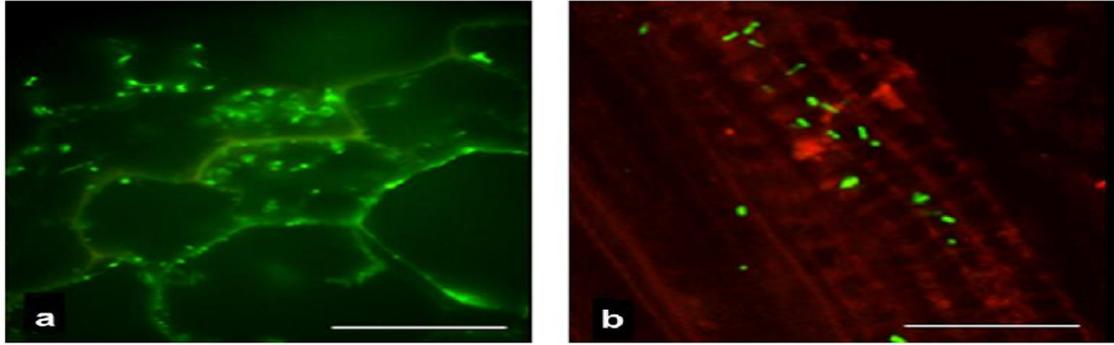


Fig. 4 : colonisation endophytique de (*Burkholderia phytofirmans* PsJN [observée par hybridation *in situ* (a) ou avec la GFP étiquetage (b)], montrant des cellules bactériennes comme des bacilles verts à l'intérieur du cortex (Compant *et al.*, 2008).

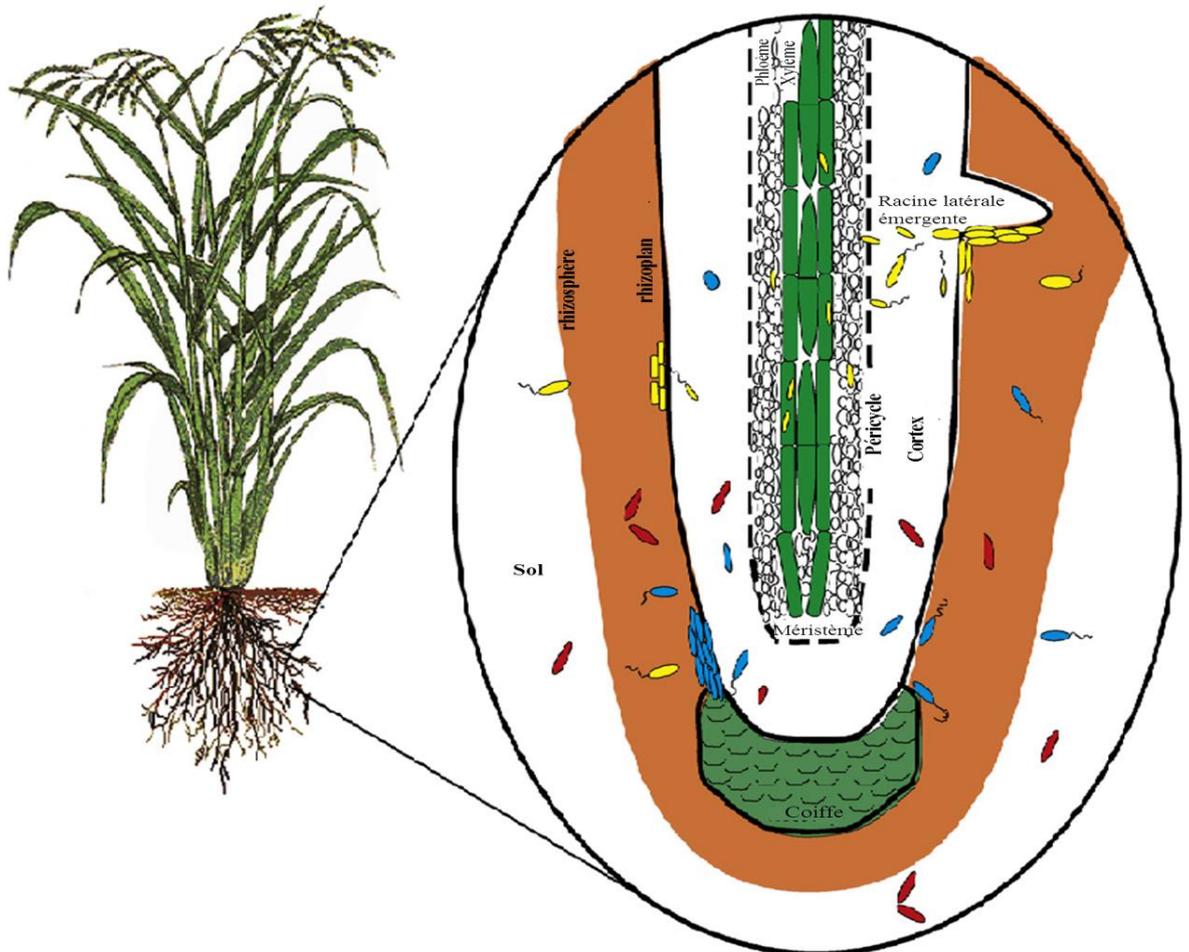


Fig. 5: Types d'endophytes et leur processus de colonisation des racines (Hardoim *et al.*, 2008).

endophytes passagers (cellules rouges) ; endophytes opportunistes (cellules bleues) ; endophytes compétentes (cellules jaunes).

2- Bactéries du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* (du grec : *pseudes*, « faux » et *mona*, « unité ») sont très ubiquistes, colonisent des niches écologiques très diverses, isolées de l'eau (eaux douces, eaux saumâtres, eaux de mer), du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux (Palleroni, 2009).

2-1 Classification

Dans la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (2005), les *Pseudomonas* sont classés comme suit :

Domaine: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Classe: Gamma-Proteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

2-2 Caractéristiques générales

Selon Palleroni (2009), les caractéristiques morphologiques de base communes à presque toutes les espèces sont la forme de bacille droit et la présence d'un ou plusieurs flagelles polaires. Aucune spore n'est produite, et la coloration de Gram est négative. Ces caractéristiques morphologiques définissent les «pseudomonads», mais l'appartenance au genre *Pseudomonas* nécessite certains caractères physiologiques supplémentaires, comme un métabolisme énergétique strictement respiratoire et la nutrition du type chimoorganotrophe.

Les *Pseudomonas* sont catalase positive avec une teneur en GC de 58-69% (Palleroni, 2009). Plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires sont comprises dans ce genre (Fig. 6). Au sein du groupe *Pseudomonas sensu stricto*, les pseudomonades fluorescents comprennent toutes les espèces ayant la capacité de produire de la pyoverdine fluorescente, spécialement *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *P. putida* et *P. fluorescens* (Tab. 2) (Palleroni, 2009).

2-3 Evolution de la taxonomie du genre *Pseudomonas*

En se basant sur la forme et l'aspect général des bactéries, Migula (1894) décrit pour la première fois le genre *Pseudomonas* (Peix *et al.*, 2009).

Le "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" édition 1923, a consacré tout un chapitre pour le genre *Pseudomonas* ; la classification des espèces étant basée sur les caractéristiques phénotypiques. Néanmoins, le classement initial des *Pseudomonas* comme étant à Gram négatif, bacilles non sporulés, aérobies, mobiles au moyen de flagelles polaires,

ne montre pas une différenciation claire des autres bactéries à Gram⁻. Elle a été donc complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (Palleroni, 2008).

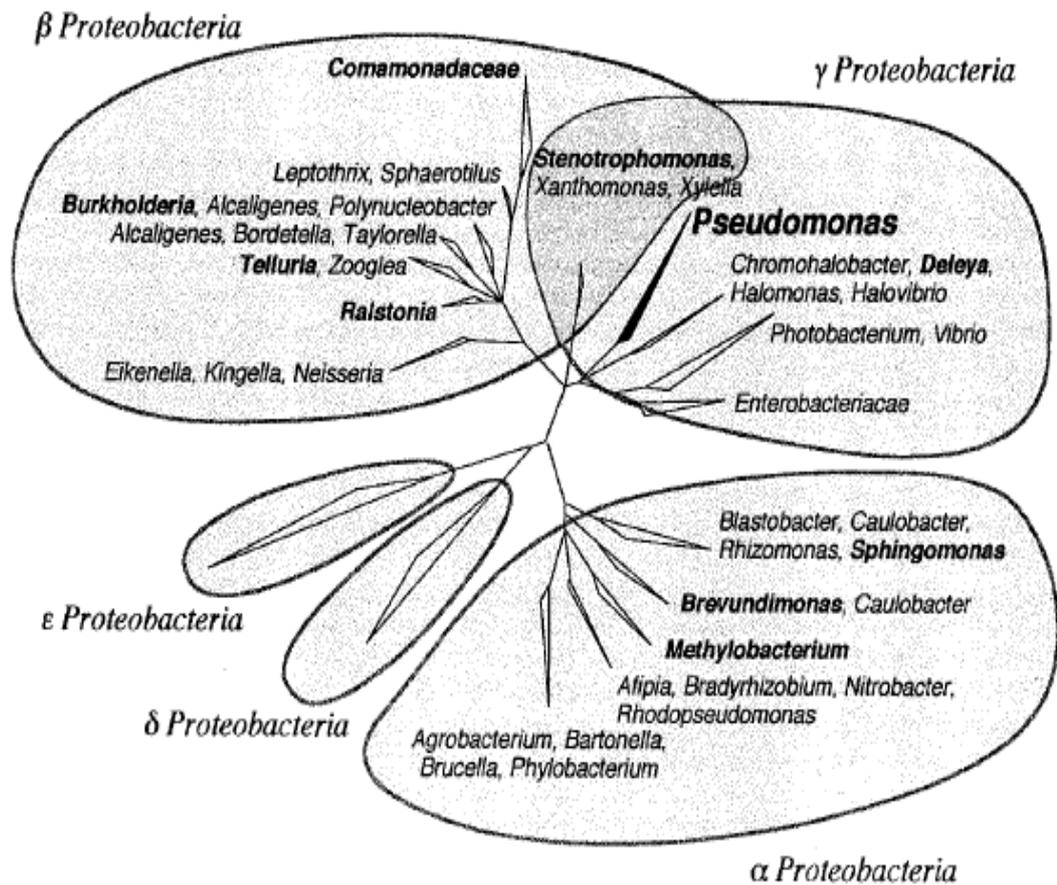


Fig. 6 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Kerstens *et al.*, 1996).

Tab. 2 : Caractères clés de 3 espèces fluorescents de *Pseudomonas* (Palleroni, 2009).

Caractère	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>
% G+C	67	60-63	59-61
Nombre de flagelles	1	>1	>1
PHB comme matière de réserve	-	-	-
Pigments fluorescents	+	+	+
Phénazine	+	-	-
Caroténoïdes	-	-	-
Dénitrification	+	-	V
Oxydase	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	V	+
Croissance à 4°C	-	V	+
Croissance à 41°C	+	-	-
Utilisation de l'H ₂ / CO ₂	-	-	-
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-
Liquéfaction de la gélatine	+	-	+
D- fructose	-	-	-
Glucose	+	+	+
Tréhalose	-	-	+
Cellobiose	-	-	-
Lactate	+	+	+

V : variable

PHB : poly-β-hydroxybutyrate

Dans les années soixante, les études de relations entre les espèces de *Pseudomonas* basée sur la composition de l'ADN et de l'hybridation ADN-ADN confirment la classification phénotypique (Johnson et Ordal, 1968)

Dans les années 1970, le succès le plus important dans la classification de genre *Pseudomonas* par des critères génotypiques a été établie par Palleroni et ses collaborateurs, qui ont classé ce groupe bactérien en cinq sous-groupes à ARNr selon le taux de parenté l'ARN-ADN. Ces subdivisions étaient phylogénétiquement très lointaines, et seuls les représentants du groupe I continuaient de figurer dans le genre *Pseudomonas* (Palleroni *et al.*,

1973). Néanmoins, ces résultats intéressants n'étaient pas inclus dans le "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" édité en 1974 et la classification du genre *Pseudomonas* a été, alors, basée sur les caractéristiques phénotypiques ; seule la teneur en G + C comme information génétique était prise en compte dans la description des espèces. Dans cette édition, le genre était inclus dans la famille des Pseudomonadaceae. Il comprenait des bacilles à Gram⁻ aérobies et mobiles avec certaines espèces dénitrifiantes. Seulement 29 espèces du genre *Pseudomonas* ont été détaillées et une longue liste d'espèces sans description phénotypique a été ajoutée (Peix *et al.*, 2009). Les espèces avec description phénotypique ont été réparties en deux groupes en fonction de leurs caractéristiques physiologiques: le groupe I, comprenait les espèces ne nécessitant pas de facteurs de croissance et le groupe II pour ceux qui peuvent s'en passer.

Le Groupe I était divisé en deux sous-groupes en fonction de l'accumulation ou non de poly- β -hydroxybutyrate. La production de pigments fluorescents, la dénitrification et l'utilisation de DL-arginine ou bétatine, étaient les critères de regroupement des espèces à l'intérieur de ces sous-groupes (Peix *et al.*, 2009).

Dans la première édition du Bergey's Manual en 1984, la classification était basée sur l'homologie ARN/ADN bien que le nombre d'espèces et la classification phénotypique aient été maintenus (Palleroni, 1984). La classification phylogénétique des bactéries en fonction de leurs gènes codants ARNr 16S conduisait à la création des trois subdivisions nommées plus tard Proteobacteria, " alpha ", " beta " et " gamma " (Woese *et al.*, 1984) .

Depuis 1990, le séquençage du gène codant ARNr 16S de toutes les bactéries connues a commencé. Des séquences ont été déposées dans les bases de données. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S ainsi que le développement de modèles mathématiques ont permis la construction d'arbres de similitude des séquences et la classification phylogénétique des procaryotes (Peix *et al.*, 2009)

Dans les années 2000, la révision taxonomique la plus détaillée du genre *Pseudomonas*, a été réalisée par Anzai *et al.* (2000), à travers l'analyse de séquences du gène ARNr 16S. En effet, ces chercheurs ont analysé les gènes de 128 espèces de *Pseudomonas* ce qui leur a permis de reclasser de nombreuses espèces de ce genre dans d'autres genres et espèces. Ainsi, la comparaison de 1073 nucléotides leur a permis de subdiviser les (57) espèces maintenues, en 7 groupes :

- Le groupe des *P. syringae*
- Le groupe des *P. chlororaphis*
- Le groupe des *P. fluorescens*
- Le groupe des *P. putida*
- Le groupe des *P. stutzeri*
- Le groupe des *P. aeruginosa*
- Le groupe des *P. pertucinogena*

L'édition actuelle du Manuel de Bergey's (Palleroni, 2005) a pris en compte tous les changements et a inclus toutes les espèces décrites jusqu'à sa publication. Depuis 2005, plusieurs nouvelles espèces de genre *Pseudomonas* ont été décrites (Tab. 3) et le nombre ne cesse d'augmenter (Peix *et al.*, 2009).

2-4 Critères actuels de la taxonomie de *Pseudomonas*

Depuis sa découverte, le genre *Pseudomonas* a subi de nombreuses modifications taxonomiques non seulement dans le nombre d'espèces inscrites mais aussi dans les critères utilisés pour leur définition et leur caractérisation. Dans l'édition actuelle de "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", une liste complète des méthodes utilisées dans la taxonomie de *Pseudomonas* est reportée (Palleroni, 2005). Ces méthodes comprennent la morphologie des cellules et leur structure, la composition de la paroi cellulaire, les types de pigments, les caractéristiques nutritionnelles et métaboliques, la sensibilité à des composés différents, la production d'antibiotique, la pathogénicité pour d'autres organismes, la structure antigénique et des caractéristiques génétiques et écologiques.

Les caractères phénotypiques comprennent un ensemble de tests, à savoir : la forme des cellules, le type de flagelles, l'utilisation des sources de carbone (acides organiques, polyols, acides aminés), la capacité de se développer dans différentes conditions de culture, la résistance aux antibiotiques, la production de substances antibiotiques et des enzymes exocellulaires (Palleroni, 2005).

Les caractères chimio-taxonomiques étaient principalement utilisés pour reclasser certaines espèces de *Pseudomonas* dans d'autres genres. Il s'agit principalement de mettre en évidence la présence de systèmes quinones, d'acide gras, de protéine, de lipides polaires ou de polyamines (Peix *et al.*, 2009).

Le sidérotypage est une autre approche taxinomique intéressante, appliquée, au début, aux *Pseudomonas* fluorescents, puis non fluorescents, par Meyer et ses collaborateurs (2002).

Tab. 3 : Espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas* (Euzéby, 2008).

<i>P. abietaniphila</i> ^a	<i>P. cuatrocienegasensis</i> ^b	<i>P. mandelii</i> ^a	<i>P. pseudoalcaligenes</i> ^a
<i>P. aeruginosa</i> ^a	<i>P. delhiensis</i> ^b	<i>P. marginalis</i> ^a	<i>P. psychrophila</i> ^b
<i>P. agarici</i> ^a	<i>P. duriflava</i> ^b	<i>P. marincola</i> ^b	<i>P. psychrotolerans</i> ^b
<i>P. alcaligenes</i> ^a	<i>P. extremorientalis</i> ^b	<i>P. mediterranea</i> ^c	<i>P. putida</i> ^a
<i>P. alcaliphila</i> ^b	<i>P. ficuserectae</i> ^a	<i>P. meliae</i> ^a	<i>P. reinekei</i> ^b
<i>P. amygdali</i> ^a	<i>P. flavescens</i> ^a	<i>P. mendocina</i> ^a	<i>P. resinovorans</i> ^a
<i>P. anguilliseptica</i> ^a	<i>P. flectens</i> ^a	<i>P. meridiana</i> ^c	<i>P. rhizosphaerae</i> ^b
<i>P. antarctica</i> ^b	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. migulae</i> ^a	<i>P. rhodesiae</i> ^a
<i>P. argentinensis</i> ^b	<i>P. fragi</i> ^a	<i>P. mohnii</i> ^b	<i>P. sabulinigri</i> ^b
<i>P. asplenii</i> ^a	<i>P. frederiksbergensis</i> ^b	<i>P. montelii</i> ^a	<i>P. salomonii</i> ^b
<i>P. avellanae</i> ^a	<i>P. fulva</i> ^a	<i>P. moorei</i> ^b	<i>P. savastanoi</i> ^a
<i>P. azotifigens</i> ^b	<i>P. fuscovaginae</i> ^a	<i>P. moraviensis</i> ^b	<i>P. segetis</i> ^b
<i>P. azotoformans</i> ^a	<i>P. gelidicola</i> ^c	<i>P. mosselii</i> ^b	<i>P. simiae</i> ^b
<i>P. balearica</i> ^a	<i>P. geniculata</i> ^c	<i>P. mucidolens</i> ^a	<i>P. straminea</i> ^a
<i>P. beteli</i> ^c	<i>P. gessardii</i> ^a	<i>P. multiresinivorans</i> ^a	<i>P. stutzeri</i> ^a
<i>P. borbori</i> ^b	<i>P. graminis</i> ^a	<i>P. nitroreducens</i> ^a	<i>P. synxantha</i> ^a
<i>P. boreopolis</i> ^b	<i>P. grimontii</i> ^b	<i>P. oleovorans</i> ^a	<i>P. syringae</i> ^a
<i>P. brassicacearum</i> ^b	<i>P. guineae</i> ^b	<i>P. orientalis</i> ^a	<i>P. taetrolens</i> ^a
<i>P. brenneri</i> ^b	<i>P. halophila</i> ^a	<i>P. oryzihabitans</i> ^a	<i>P. thermotolerans</i> ^b
<i>P. caeni</i> ^b	<i>P. indica</i> ^b	<i>P. otitidis</i> ^b	<i>P. thivervalensis</i> ^b
<i>P. cannabina</i> ^a	<i>P. japonica</i> ^b	<i>P. pachastrellae</i> ^b	<i>P. tolaasii</i> ^a
<i>P. caricapayae</i> ^a	<i>P. jessenii</i> ^a	<i>P. palleroniana</i> ^b	<i>P. tremae</i> ^a
<i>P. cedrella</i> ^a	<i>P. jinjuensis</i> ^b	<i>P. panacis</i> ^b	<i>P. trivialis</i> ^b
<i>P. chloritidismutans</i> ^b	<i>P. kilonensis</i> ^b	<i>P. panipatensis</i> ^b	<i>P. tuomuerensis</i> ^b
<i>P. chlororaphis</i> ^a	<i>P. knackmussii</i> ^b	<i>P. parafulva</i> ^b	<i>P. umsongensis</i> ^b
<i>P. cichorii</i> ^a	<i>P. koreensis</i> ^b	<i>P. peli</i> ^b	<i>P. vancouverensis</i> ^a
<i>P. cissicola</i> ^b	<i>P. libanensis</i> ^a	<i>P. pertucinogena</i> ^a	<i>P. veronii</i> ^a
<i>P. citronellolis</i> ^a	<i>P. lini</i> ^b	<i>P. pictorum</i> ^c	<i>P. viridiflava</i> ^a
<i>P. congelans</i> ^b	<i>P. lundensis</i> ^a	<i>P. plecoglossicida</i> ^b	<i>P. vranovensis</i> ^b
<i>P. corrugata</i> ^a	<i>P. lurida</i> ^b	<i>P. poae</i> ^b	<i>P. xanthomarina</i> ^b
<i>P. constantinii</i> ^b	<i>P. lutea</i> ^b	<i>P. pohangensis</i> ^b	<i>P. xiamenensis</i> ^b
<i>P. cremoricolorata</i> ^b	<i>P. luteola</i> ^a	<i>P. proteolytica</i> ^b	<i>P. xinjiangensis</i> ^b

^a: espèces incluses dans le Bergey's Manual (Palleroni, 2005)

^b: espèces décrites après la publication du Bergey's Manual (2005)

^c: espèces décrites avant la publication du Bergey's Manual (2005) qui n'ont pas été incluses dans cette édition mais dont les noms sont validés.

Elle est basée sur la caractérisation iso-electrophorétique des sidérophores et des pyoverdines. Cette approche a permis la caractérisation de plusieurs souches de *Pseudomonas* par la mise en évidence de pyoverdines spécifiques aux espèces (Meyer *et al.*, 2002). Le pouvoir de résolution et l'exactitude de cette nouvelle technique taxonomique a été améliorée par la détermination de la masse moléculaire des pyoverdines par spectroscopie de masse (Meyer *et al.*, 2008).

Actuellement, les techniques les plus modernes d'analyse des biomolécules sont appliquées pour la taxonomie des *Pseudomonas*. En effet, l'empreinte génétique par spectroscopie à fluorescence (spectres d'émission de fluorophores intrinsèques : NADH, tryptophane et le complexe acides aminés aromatiques-acide nucléique), a permis une discrimination entre les genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* ou *Stenotrophomonas* avec une grande sensibilité. Mais aussi, entre les espèces de *P. chlororaphis*, *P. lundensis*, *P. fragi*, *P. taetrolens* et *P. stutzeri* groupé séparément de *P. putida*, *P. pseudoalcaligenes* et *P. fluorescens*, correspondant aux classes phylogénétiques obtenues par Anzai *et al.* (2000) et Tourkya *et al.* (2009).

3- Effets bénéfiques des rhizobactéries

Les plantes et les bactéries peuvent établir trois types d'interactions en fonction des conséquences pour la plante :

- négatif, conduisant à des maladies (bactéries phytopathogènes) ;
- positif, à savoir symbioses mutualistes, ayant des effets bénéfiques pour les deux partenaires ; et
- *a priori* interactions neutres, en raison de l'absence d'effets négatifs ou positifs évidents sur la plante hôte (Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

Un grand nombre de genres bactériens sont des stimulateurs de la croissance végétale *per se*, en fournissant des microéléments, des hormones de croissance, et / ou par mobilisation de nutriments (Glick, 1995 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

La protection de la plante contre des infections causées par des agents phytopathogènes et les ravageurs (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Gerhardson, 2002) met en œuvre divers mécanismes tels : un antagonisme direct des pathogènes (production d'antibiotiques), compétition pour les nutriments et/ou l'espace ou en induisant les défenses de la plante (Fig. 7).

Les bactéries rhizosphériques phytostimulatrices sont reprises sous le terme « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » ou PGPR (Kloepper, 1989). Cette expression, proposée pour la première fois par Kloepper et Schroth (1978) était utilisée seulement pour les espèces de *Pseudomonas* fluorescents favorisant indirectement la croissance végétale. Actuellement, les PGPR appartiennent à plusieurs genres tels que : *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium* et *Gluconacetobacter* (Nadeem *et al.*, 2010).

3-1- Phytostimulation

L'un des mécanismes directs de promotion de la croissance utilisée par les bactéries PGPR est la production de phytohormones telles : l'acide indole acétique (AIA), l'acide abscissique, les cytokinines et les gibbérellines. L'effet positif de ces molécules sur la germination des graines, la formation de racines et l'élongation de la tige est confirmé par plusieurs chercheurs (Zahir *et al.*, 2004 ; Khalid *et al.*, 2006 ; Glick *et al.*, 2007). Ainsi et selon Patten et Glick (1996), 80% des micro-organismes isolés de la rhizosphère de diverses cultures synthétisent et libèrent des métabolites secondaires comme les auxines.

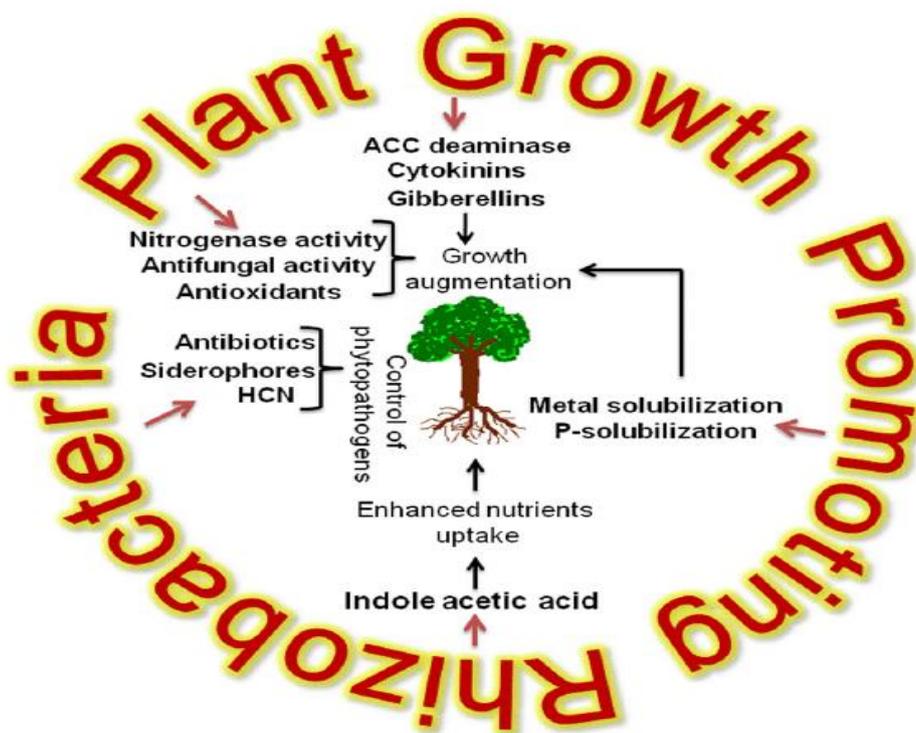


Fig. 7 : Mécanismes d'action des rhizobactéries sur les plantes (Ahemad et Kibret, 2014)

3-1-1- Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est une phytohormone puissante produite par les PGPR. Il contrôle un large éventail de processus liés au développement de la plante et de la croissance. En effet, il a un rôle clé dans l'amélioration de la croissance des racines et des poils latéraux et polaires, dans la différenciation des tissus vésiculeuse et dans l'entretien du méristème (Aloni *et al.*, 2006; Fukaki *et al.*, 2007). Selon Tien *et al.* (1979), le tryptophane est le principal précurseur de la biosynthèse de l'AIA chez les microorganismes le récupérant à partir des exsudats racinaires. Au moins 5 voies de biosynthèse ont été décrites chez les micro-organismes dont la majorité montrent une similarité avec celles décrites chez les plantes bien que certains intermédiaires peuvent différer (Patten et Glick, 1996 ; Spaepen et Vanderleyden, 2011). D'après ces auteurs, la production de l'AIA à partir du tryptophane impliquerait (Fig. 8):

- (1) La formation *via* l'acide indole-3-pyruvique et l'indole-3-acétaldéhyde. C'est le mécanisme le plus commun chez les bactéries comme *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* et *Azospirillum*.
- (2) la transformation du tryptophane en AIA peut emprunter une voie alternative aboutissant à la production de tryptamine. Cette voie est caractéristique de *Pseudomonas* et *Azospirillum*.
- (3) la biosynthèse de cette auxine *via* la formation d'indole-3-acétamide a été observée chez les bactéries phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* et *Erwinia herbicola*), *Pseudomonas* saprophytes (*Pseudomonas putida* et *P. fluorescens*)
- (4) La biosynthèse IAA impliquant la conversion du tryptophane en indole-3-acétonitrile caractérise les cyanobactéries (*Synechocystis* sp.).
- (5) La voie de « tryptophane-indépendant » est la plus commune chez les plantes, mais retrouvée également chez les *Azospirilla* et les cyanobactéries.

Ces auxines influencent les processus physiologiques des plantes et facilitent leur croissance en modifiant l'équilibre hormonal (Kang *et al.*, 2006).

D'après (Ahemad et Kibret, 2014), l'AIA :

- affecte la division cellulaire, l'extension et la différenciation,
- stimule la germination des graines des semences et des tubercules
- augmente le taux de xylème et le développement des racines,
- contrôle des processus de croissance végétative

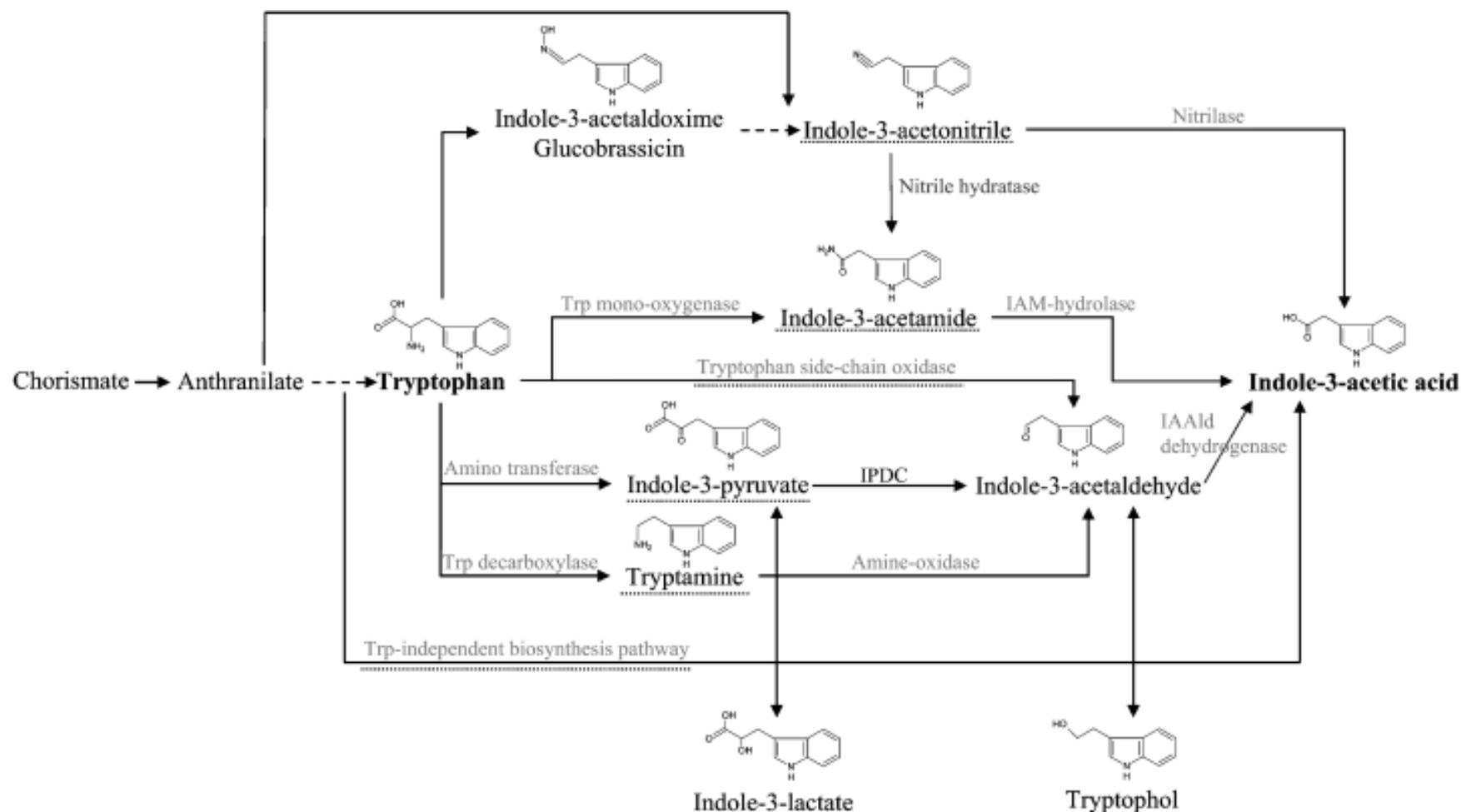


Fig. 8 : Vue d'ensemble des différentes voies de synthèse de l'AIA chez les bactéries (Spaepen *et al.*, 2007).

L'intermédiaire se référant au nom de la voie ou la voie elle-même est souligné avec une ligne en pointillé. IAALD, indole-3-acétaldéhyde; IAM, indole-3-acétamide; PIDC, indole-3-pyruvate décarboxylase; Trp, tryptophane.

- stimule la formation des racines latérale et adventives.
- intervient dans les tropismes en réponse à la gravité (gravitropisme) ou à la lumière (phototropisme)

La biosynthèse de l'AIA chez les bactéries est stimulée par différents types de stress environnementaux tels l'acidité, le stress osmotique et la carence en carbone (Spaepen *et al.*, 2007). Ainsi, la supplémentation du milieu de germination (sable-tourbe) par des souches de *Pseudomonas fluorescens* productrices d'AIA améliore la croissance des plantes de tournesol soumises à un stress salin (Shilev *et al.*, 2010).

3-1-2 Cytokinines

Les cytokinines stimulent la division cellulaire des plantes, régulent la différenciation de méristème de la racine et inhibent l'allongement des racines primaires et la formation de racines latérales (Riefler *et al.*, 2006). Divers PGPR tels que *Arthrobacter*, *Azospirillum* et *P.fluorescens*, sont capables de produire ce type de molécules (De Salamone *et al.*, 2001).

3-1-3- Gibberellines

Ces phytohormones favorisent le développement des tissus de la tige et l'extension des racines latérales (Yaxley *et al.*, 2001). Leur production est détectée chez divers PGPR tels *Azospirillum*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Azotobacter*, *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *Herbaspirillum seropedicae* et les *Rhizobia* (Bottini *et al.*, 2004).

3-1-4 ACC désaminase

Chez les plantes L'éthylène est une phytohormone inhibitrice de la croissance racinaire (Glick 1995). Le stress induit par l'éthylène est contourné par l'enzyme acide-1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) désaminase synthétisée par les PGPR (Fig. 9). Cette enzyme réduit le taux d'éthylène en clivant son précurseur : l'ACC (Glick *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2014).

L'ACC désaminase induit chez la plante une tolérance au sel et à la sécheresse (Saleem *et al.*, 2007; Zahir *et al.*, 2009). Elle est synthétisée par plusieurs genres bactériens tels *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* et *Rhizobium* (Zahir *et al.*, 2009 ; Kang *et al.*, 2010 ; Nadeem *et al.*, 2010). En conséquence, l'inoculation des semences avec des rhizobactéries productrices de l'ACC désaminase améliore l'élongation racinaire de

la plante, stimule la croissance des tiges en facilite l'absorption de N, P et K chez diverses cultures (Glick, 2007 ; Nadeem *et al.*, 2009).

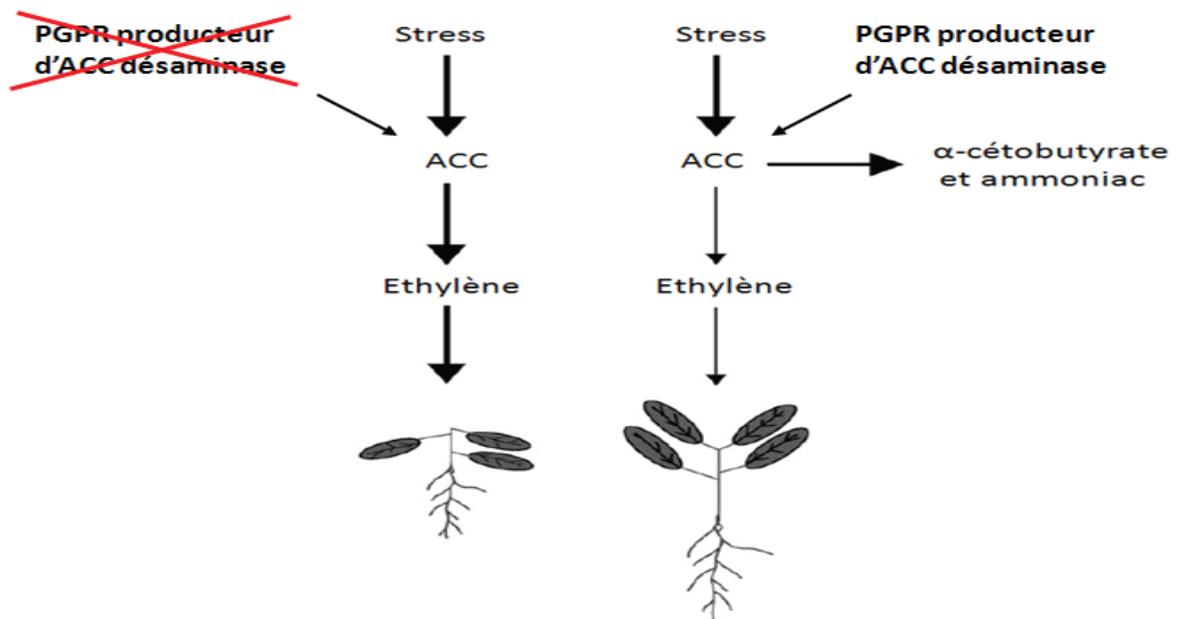


Fig. 9 : Effet des PGPR producteurs d'ACC désaminase (Glick *et al.*, 2004).

3-2 Amélioration de la nutrition de la plante

3-2-1 Solubilisation des phosphates

Le phosphore est un élément essentiel pour le développement et la croissance biologique des organismes. Il est immobilisé dans le sol par précipitation chimique, il devient par conséquent moins soluble et indisponible aux plantes. Les microorganismes solubilisant les phosphates peuvent agir comme agents biofertilisants en agriculture (Sharma *et al.*, 2007).

Les principaux mécanismes de solubilisation des phosphates employés par les PGPR comprennent :

(1) La solubilisation est la conséquence de la libération d'acides organiques de faible poids moléculaire, comme l'acide gluconique et citrique (Glick, 2012). Ils abaissent en conséquence le pH, chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles et les convertissent en formes solubles ($H_2PO_4^-$) (Trivedi et Sa, 2008).

(2) La minéralisation du phosphore organique se fait par libération d'enzymes extracellulaires, phosphatases et phytases catalysant l'hydrolyse des esters phosphoriques. Solubilisation et minéralisation peuvent co-exister chez une même espèce bactérienne (Glick, 2012).

(3) La libération de phosphates pendant la dégradation de substrat (minéralisation biologique des phosphates) est une autre stratégie (Sharma *et al.*, 2013)

Plusieurs genres bactériens solubilisent les phosphates comme : *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, et *Serratia*. (Bhattacharyya et Jha, 2012) Ces bactéries peuvent servir comme agent bio fertilisant (Glick, 2012).

3-2-2 Production de sidérophores

Le fer est un micronutriment indispensable pour la majorité des organismes. En dépit de son abondance, cet élément est peu soluble et donc peu disponible dans les sols cultivés (Ma, 2005). Pour l'acquérir, les micro-organismes ont recours à la synthèse de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987). Cette synthèse n'a lieu qu'en situation de carence en fer (whipps, 2001).

Les sidérophores sont divisés en trois grandes familles selon le groupe fonctionnel caractéristique : hydroxamates, catécholates et carboxylates. À l'heure actuelle plus de 500 types de sidérophores sont connus (Cornelis, 2010). La pyoverdine (ou pseudobactine), la pyocheline et l'acide salicylique sont les principaux groupes produits par *Pseudomonas* fluorescents (Meyer et Abdallah, 1978).

Les sidérophores sont libérés par les bactéries dans la rhizosphère où les concentrations peuvent atteindre 10^{-7} à 10^{-8} M (Powell *et al.*, 1980). Néanmoins, dans l'environnement, cette production est fortement influencée par une grande variété de facteurs tels que la concentration du fer, la nature et la concentration en source de carbone et d'azote, les teneurs en phosphate, ainsi que la présence d'éléments traces comme le magnésium, le zinc (O'Sullivan et Ogara, 1992).

L'inoculation des semences par des bactéries PGPR productrices de sidérophores améliore la croissance végétale et augmente le taux de chlorophylle (Sharma *et al.*, 2003) Parmi les espèces utilisées comme inocula, citons : *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* sp. (Sujatha et Ammani, 2013).

3-2-3 Fixation d'azote

L'azote est un élément essentiel pour toutes les formes de vie. C'est le nutriment vital pour la croissance et la productivité des plantes. Bien qu'il présente 78% de l'atmosphère, il n'est pas disponible pour les plantes. Les bactéries assurent une fixation biologique de cet

élément et le transforme en ammoniac, forme assimilable par la plante, à l'aide d'un système enzymatique complexe connu sous le nom de *nitrogénase* (Glick, 1995).

Les bactéries PGPR fixent l'azote atmosphérique par deux mécanismes : symbiotique et non symbiotique.

- La fixation symbiotique de l'azote est une relation de mutualisme entre la plante et la bactérie. Cette dernière pénètre d'abord la racine puis forme des nodules, lieu de fixation d'azote. Les *Rhizobia* tels *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* s'associent aux légumineuses alors que les espèces de *Frankia* sont trouvées chez les non-légumineuses (Tilak *et al.*, 2005).

- La fixation peut être non symbiotique chez les non légumineuses. Elle est assurée par les diazotrophes libres comme *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter* et *Pseudomonas* (Tilak *et al.*, 2005).

La fixation non symbiotique représente en général un flux d'azote plus faible que la fixation symbiotique (Glick, 2012).

L'inoculation de plantes par des bactéries fixatrices d'azote a fait l'objet de plusieurs études. Parmer et Dadarwal (1999) a démontré le rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la fixation d'azote et l'amélioration de la nodulation chez le pois chiche. *Pseudomonas fluorescens* B16 colonise fortement les racines de tomates et augmente, par conséquent, la hauteur de la plante, le nombre de fleurs et de poids total du fruit (Minorsky, 2008). Une co-inoculation des graines de soja par *Bradyrhizobium* sp. et *Pseudomonas striata* assure une fixation optimale d'azote (Dubey, 1996).

3-3 Protection des plantes

L'existence de sols suppressifs est connue depuis plusieurs années (Kent et Triplett, 2002). Ils se caractérisent par une très faible incidence d'infection ou l'absence totale de maladie (Weller *et al.*, 2002). Selon Whipps (2001), les mécanismes de la suppression de la maladie comprennent (Fig. 10) :

- l'inhibition du pathogène par des composés antimicrobiens (antibiose).
- la compétition pour le fer en vue d'une production de sidérophores.
- la compétition pour la colonisation des niches et des nutriments fournis par les exsudats racinaires.
- la dégradation des facteurs de pathogénicité telle que les toxines.
- le parasitisme implique la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire des champignons.

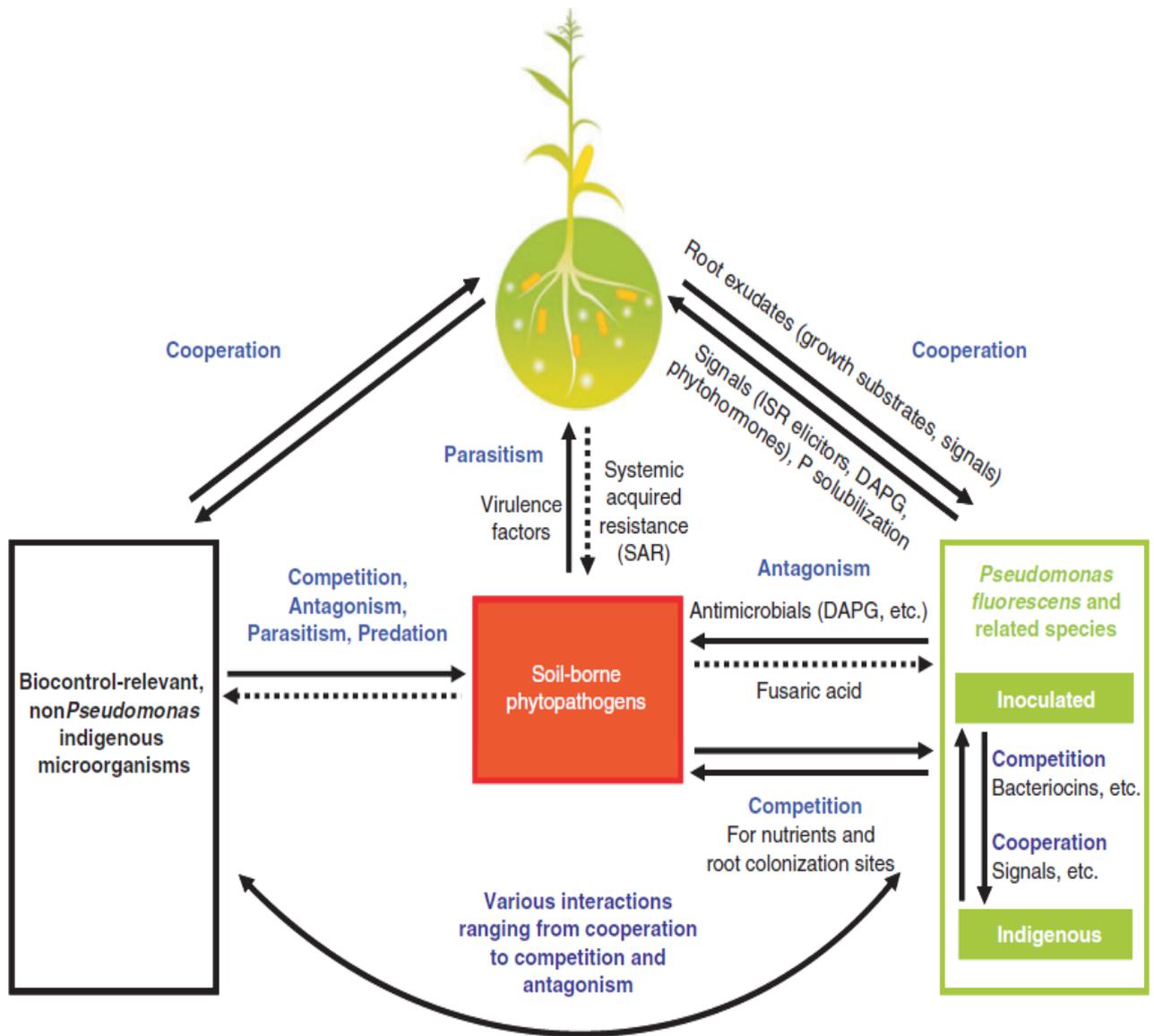


Fig. 10: Mécanismes impliqués dans la protection des plantes par les *Pseudomonas fluorescens* spp. (Couillerot *et al.*, 2009).

3-3-1 Antibiose

L'antibiose ou l'inhibition d'un micro-organisme par le produit métabolique d'un autre est une caractéristique importante des bactéries PGPR. Les actinomycètes se classent parmi les micro-organismes les plus actifs en production d'antibiotiques (Crawford *et al.* 1993).

Les *Pseudomonas fluorescens* sp. synthétisent divers antibiotiques tels que :

a- Phloroglucinols

Les phloroglucinols sont des composés phénoliques possédant un large spectre d'action : antiviraux, antibactériens, antifongiques (Scharifi-Tehrani *et al.*, 1998) et vermifuge (Maurhofer *et al.*, 1995). Le composé 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4 DAPG) produit par certaines espèces de *Pseudomonas* fluorescents est d'une importance particulière à l'agriculture en raison de son activité contre une variété de phytopathogènes. Ainsi, il assure une protection au blé (Keel et Défago, 1997), tomates (Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998) et maïs (Ventura *et al.*, 1998).

b- Phénazines

Les phénazines représentent une vaste famille de molécules hétérocycliques azotées fortement pigmentées et capables d'une action antibiotique à large spectre. Plus de 50 phénazines sont actuellement connues et certaines souches produisent jusqu'à 10 dérivés différents en même temps (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003).

L'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) est élaboré par les *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. aeruginosa* (Quan *et al.*, 2010). Ainsi la synthèse du PCA dans la rhizosphère du blé par *P. fluorescens* et *P. aurefaciens* a un effet antagoniste contre le champignon pathogène *Gaeumannomyces graminis* (Raaijmakers *et al.*, 1999 ; Thomashow *et al.*, 2002 ; Ownley *et al.*, 2003).

c- Pyrrolnitrine (PRN)

Le pyrrolnitrine est un métabolite très actif utilisé comme fongicide agricole (Hammer *et al.*, 1997). La production de ce composé par *P. fluorescens* et *B. cepacia* est impliquée dans le contrôle de certains phytopathogènes comme *G. graminis* et *F. oxysporum* (Hammer *et al.*, 1999).

d- Pyolutéorine

Le pyolutéorine, un autre antibiotique produit par différents *Pseudomonas*, possède un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes, notamment *Pythium ultimum*. Cette molécule protège le cresson et le concombre contre les champignons pathogènes (Maurhofer *et al.*, 1995).

3-3-2 Composés volatiles

Les substances volatiles sont suspectées d'inhiber la croissance de certains pathogènes. *Enterobacter cloacae*, par exemple, inhibe le champignon *pythium* par la production

d'ammoniac, produit intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires (Howell *et al.*, 1988).

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un inhibiteur efficace de la cytochrome c oxydase de la chaîne respiratoire et d'autres métallo-enzymes (Knowles, 1976) Il est excrété et métabolisé chez les bactéries par la voie de la décarboxylation oxydative en utilisant le glutamate et la méthionine comme précurseurs.

L'HCN est rencontré chez 88,89% des *Pseudomonas* et 50% des *Bacillus* d'un sol rhizosphérique (Ahmad *et al.*, 2008). Chez les *Pseudomonas*, la biosynthèse de l'HCN à partir de la glycine, comme premier précurseur, est codée par trois gènes (*hcn A, B, C*) (Blumer et Haas, 2000).

Ce gaz volatil est impliqué dans la lutte biologique contre la pourriture noire des racines de tabac (Voisard *et al.*, 1989), la pourriture des racines de la tomate et la fonte des semis chez le concombre (Ramette *et al.*, 2003). Chez la souche *P. fluorescens* CHA0, la production de HCN compte pour une grande partie du pouvoir inhibiteur envers *Thielaviopsis basicola* (Laville *et al.*, 1998).

D'autres composés volatils (2,3-butanediol et l'acétoïne) libérés par des PGPR entraînent une amélioration appréciable de la croissance de la plante en induisant sa résistance aux maladies (Ryu *et al.*, 2003).

3-2-3 Production d'enzymes

Certaines bactéries produisent des enzymes hydrolytiques, telle la β -1,3-glucanase, la chitinase, les protéases, cellulases et lipases. Ces enzymes dégradent les parois cellulaires fongiques et provoquent leur lyse (Whipps, 2001).

La chitinase et la cellulase produites par des souches de *Pseudomonas* inhibent la croissance mycélienne de plusieurs champignons (Sindhu et Dadarwal, 2001).

3-2-4 Compétition pour le fer et production de sidérophores

Une fois libérés dans le milieu extérieur, les sidérophores chélatent le fer (Fe^{3+}), le séquestrent sous une forme inutilisable par le pathogène (Lopper et Henkels, 1999). Les *Pseudomonas* fluorescents produisent de la pyoverdine, pyochéline et l'acide salicylique dont le rôle est important dans la suppression des maladies des plantes par induction de la résistance (Maurhofer *et al.*, 1998).

Les pyoverdines inhibent fortement les espèces fongiques : *Phytium* et *Fusarium* (Duijff *et al.*, 1993) tandis que les pyochelines et leur précurseur (acide salicylique), produits par *P. aeruginosa*, contribuent à la protection des tomates contre le *Phytium* (Buysens *et al.*, 1996).

En outre, les bactéries de lutte biologique forment des biofilms sur les racines protégeant ainsi les plantes contre les infections par des agents pathogènes (Bais *et al.*, 2004).

3-2-6 Résistance Systémique Induite (RSI)

Les plantes peuvent acquérir des mécanismes de défense contre les organismes pathogènes par le phénomène de résistance systémique induite (RSI). En effet, de nombreux composants bactériens (lipopolysaccharides (LPS), flagelles, acide salicylique, sidérophores, lipopeptides cycliques, acétoïne et 2,3-butanedio) activent les défenses de la plante contre différentes maladies. Lors d'une invasion pathogénique, cette « immunité » s'initie suite à la perception de la plante de molécules dites « éliciteurs » produites par les microorganismes bénéfiques (Jourdan *et al.*, 2008).

Le phénomène (RSI) fait appel à la reconnaissance d'éliciteurs chez l'hôte par l'agent inducteur, ce qui va activer l'expression des mécanismes de défense *sensu stricto* et limiter la pénétration de pathogènes dans les tissus de la plante.

Cette étape nécessite des changements structurels comme la formation de nouveaux obstacles, l'activité accrue des enzymes lytiques, la production des métabolites secondaires et des enzymes extracellulaires (Chen *et al.*, 2009)

Ce mécanisme se déroule en trois étapes principales (Fig. 11)

- A- Elicitation, les PGPR interagissent avec les racines de l'hôte et produisent des éliciteurs qui sont perçus par la plante ;
- B- après la reconnaissance des déterminants, un signal est véhiculé dans l'ensemble de la plante afin de l'alerter ;
- C- enfin, lors d'une éventuelle attaque par un agent phytopathogène, la plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression, elle devient résistante (Jourdan *et al.*, 2008).

Dans le royaume bactérien, la liste des espèces décrites comme inductrices de l'ISR a augmenté rapidement au cours des dernières années. Elle inclut plusieurs espèces bactériennes appartenant à

- *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*),
- Entérobactéries : *Serratia* (*S. marcescens*, *S. plymuthica*),
- Bacilles (*Paenibacillus polymyxa*, *B. subtilis*, *B. cereus*) (Kloepper *et al.*, 2004).

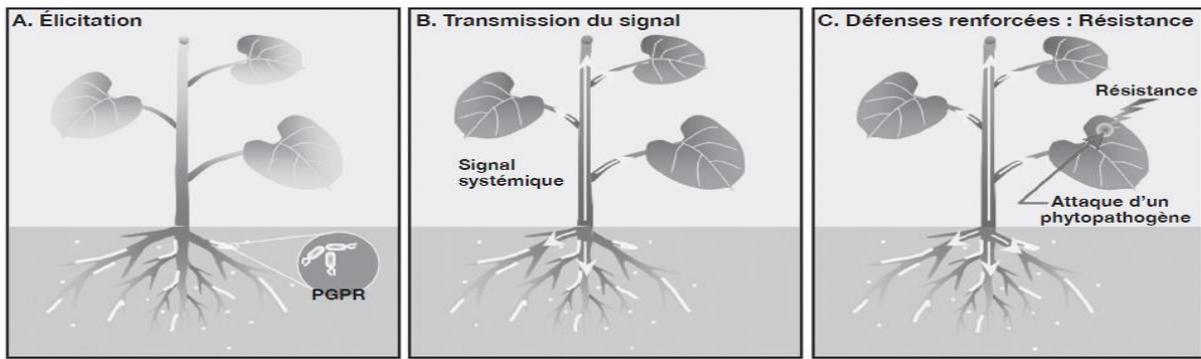


Fig. 11 : Résistance systématique induite chez les plantes par des rhizobactéries.
(Jourdan *et al.*, 2008)

4- Effet du sel et Osmorégulation chez les plantes

4- 1 Stress abiotique

Les contraintes environnementales subies par les plantes sont de plusieurs types :

- ioniques (toxicité des ions Na^+ et Cl^-) et osmotiques causées par la salinité.
- thermiques et hydriques, engendrées par la sécheresse et provoquant à leur tour des stress ioniques.

Ces différentes contraintes agissent seules ou en interaction. Ainsi le stress de l'eau, dans son sens le plus large englobe la salinité élevée du sol et la sécheresse, deux problèmes majeurs pour l'agriculture (Monneveux, 1997). Ces facteurs abiotiques empêchent la plante d'accomplir son potentiel génétique complet (Zhu, 2002).

4-2 Salinité du sol

La salinité du sol constitue une contrainte majeure pour la croissance et la survie des plantes des régions arides et maritimes. Un sol est dit « salin » si sa conductivité électrique est $> 4\text{dSm}^{-1}$ ($\sim 36\text{ mM}$) (Bui, 2013)

Les sols salins sont caractérisés par une faible teneur en phosphore et en ions calcium et par des valeurs extrêmes des rapports de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Na^+/K^+ et $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ (Grattan et Grieve, 1992).

4-3- Action du sel sur les plantes

La salinité, même à des taux faibles ($< 4\text{ dS m}^{-1}$), engendre un stress physiologique sur les plantes et constitue un problème majeur pour l'agriculture. Ses effets néfastes touchent aussi bien les glycophytes que les halophytes (Zhu, 2002).

4-3-1 Glycophytes

Les glycophytes sont des plantes apparemment dépourvues de bases génétiques pour une tolérance au sel, elles englobent la majorité des cultures végétales (Glenn et Brown, 1999). Exposées à des conditions salines, ces plantes subissent des désordres nutritionnels (Grattan et Grieve, 1992). Selon Parks *et al.* (2002), cette sensibilité est due à leur incapacité d'éliminer efficacement les ions Na⁺ du cytoplasme.

Les teneurs élevées en sel affectent les aspects suivants :

a- La photosynthèse

Mécanisme important chez les plantes, la photosynthèse est sous la dépendance de la salinité du milieu externe. Le NaCl inhibe les complexes du photosystème II (Hamilton III et Heckathorn, 2001). La fermeture des stomates, d'autre part, diminue la disponibilité du CO₂ nécessaire à la photosynthèse (Monneveux, 1997 ; Kerstiens *et al.*, 2002). Ceci conduit à une réduction des taux de la chlorophylle (Bourgeais-Chaillou *et al.*, 1991).

b- La membrane

L'excès de sel exerce des effets déstabilisants sur les membranes et dénaturants sur les protéines. De plus, chez les espèces sensibles au sel, une diminution de la teneur en phospholipides et une modification concomitante de la perméabilité sont observées (Bessières, 1998).

c- La croissance

Sous l'action de concentrations élevées de NaCl, le poids sec des pousses et des racines de blé diminuent. Les différents paramètres de croissance, à savoir le taux de germination et la croissance des tiges, des feuilles et des racines subissent également l'effet dépressif du sel (Ben Naceur *et al.*, 2001). Une réduction du poids frais des tubercules de pommes de terre (Ochatt *et al.*, 1999), une diminution de la croissance et de la biomasse chez les graines de soja (Bourgeais-Chaillou *et al.*, 1991) sont des exemples des conséquences d'une salinité élevée du sol.

Les phytohormones, essentiellement l'acide gibbérelique et la kinétine intervenant dans la germination des graines, subissent également l'action inhibitrice des teneurs élevées de NaCl (Debez *et al.*, 2001). Par contre la synthèse de l'acide abscissique est stimulée (Khan *et al.*, 2000). Cette phytohormone maintient la nouvelle croissance sous les conditions de stress ; elle a un effet majeur dans la préservation des feuilles âgées (Mäkelä *et al.*, 2003) .

4-3-2 Halophytes

a- Définition et classification

Les halophytes sont des plantes naturellement adaptées aux milieux salés. La concentration intracellulaire de ces plantes en sel peut atteindre 1M grâce à l'haloadaptation spécifique des enzymes de la paroi cellulaire et des tissus (Flowers et Colmer, 2015).

Les halophytes sont classées de différentes manières :

Sur la base du contenu interne en sel deux catégories sont distinguées : les plantes de type « inclusif » (Include) stockent le sel dans les vacuoles, le sel est ainsi isolé, par contre ceux de type « exclusif » (Exclude) empêchent le sel de remonter jusqu'aux feuilles. Une première barrière existe au niveau de l'endoderme, couche interne des cellules de la racine (Ashraf *et al.*, 2006).

Sur la base de leur réponse morphologique, les halophytes sont de deux types : excrétrices de l'excès de sel, visible sur la feuille sous forme de cristaux (Flowers et Colmer, 2015) ou succulentes capable de stocker de l'eau dans leurs feuilles épaisses (Konnerup *et al.*, 2015)

Selon leur exigence en sel, Le Houérou (1993) classe les halophytes en trois catégories :

- **Les halophytes** proprement dits : tolérant des taux relativement faibles, de 40 à 100 mM dans une solution de sol.
- **Les euhalophytes** : supportent des concentrations salines de l'ordre de 100 à 500 mM (*Atriplex* spp.).
- **Les hyperhalophytes** : se développent à des concentrations excédant celles de l'eau de mer (Espèces de *Sueda* et *Salicornia*).

Le degré d'halophilie semble être influencé par l'âge et le stade physiologique de la plante (Flowers et Colmer, 2015).

b- Effet du sel

À des salinités élevées, tous les processus physiologiques de la plante sont ralentis. La croissance est arrêtée, conséquence de l'inhibition de la division cellulaire et de la chute des teneurs intracellulaires en Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^{+} (Flowers et Colmer, 2015).

4-4 Aspects et mécanismes de l'halotolérance

Généralement les réponses des plantes à un stress osmotique sont de deux sortes : détoxification de la cellule et maintien de l'homéostasie en vue de la restauration d'une croissance normale (Zhu, 2002).

4-4-1 La détoxification

L'augmentation du taux des radicaux oxygènes libres dans les cellules, consécutivement à un stress biotique ou abiotique, présente des effets néfastes sur les macromolécules (protéines et ADN) (Hernandez *et al.*, 2001).

La détoxification de la cellule végétale est l'un des mécanismes de l'halotolérance à long terme. Elle consiste à éliminer les radicaux en question soit par synthèse de taux élevés d'enzymes antioxydatives : catalase, peroxydase et glutathion-réductase (Hernandez *et al.*, 2001), soit par l'accumulation d'osmoprotecteurs (Zhu, 2002).

4-4-2 L'homéostasie

L'homéostasie, processus d'autorégulation pour le maintien de l'équilibre et l'adaptation aux changements externes, est réalisée par les plantes dans les environnements défavorables. L'homéostasie peut être ionique ou osmotique, dans les deux cas elle doit être restaurée (Zhu, 2002).

a- L'homéostasie ionique

Le maintien de l'homéostasie ionique est critique pour les plantes confrontées à de fortes salinités. Ceci implique l'accumulation d'ions inorganiques (Na^+ , Cl^-), leur compartimentation et leur excrétion (Yeo, 1998).

L'absorption des sels est un critère vital pour les plantes des sols salés pour une croissance normale et une assimilation de l'eau (Parks *et al.*, 2002).

Afin d'épargner les enzymes cytoplasmiques des effets toxiques, les ions accumulés en excès doivent être accumulés dans des vacuoles où ils servent comme osmolytes (Bohnert et Shen, 1999 ; Hasegawa *et al.*, 2000). Les concentrations des ions Na^+ et Cl^- dans les vacuoles de *Salicornia bigelovii* et *Sueda maritima*, par exemple, peuvent dépasser 1000 mM (Khan *et al.*, 2000), elles varient de 100 à 250 mM de Na^+ dans les chloroplaste et le cytoplasme des halophytes (Flowers *et al.*, 2015).

L'accomplissement de cette étape nécessite la stimulation des pompes H^+ (Munns, 2002) et une composition lipidique modifiée des vacuoles pour empêcher toute perte de Na^+ vers le cytoplasme (Glenn *et al.*, 1999).

Les halophytes possédant cette capacité d'absorber et d'accumuler les sels sont choisies pour remédier aux sols affectés par la salinité et leur revalorisation (Keiffer et Ungar, 2002).

Le maintien de faibles concentrations en ions Na^+ dans le cytoplasme nécessite également leur excrétion par un mécanisme de transport actif contre un gradient de concentration déterminé (Zhu, 2002). Ainsi, les halophytes, par exemple, réduisent la quantité

d'ions Na^+ dans le xylème pour que la quantité de sel fournie aux feuilles soit adéquate pour la croissance (Flowers et Colmer, 2015).

b- L'homéostasie macromoléculaire

Un potentiel osmotique élevé dans les vacuoles est équilibré par une accumulation de solutés compatibles dans le cytoplasme (Bohnert *et al.*, 1999 ; Glenn et Brown, 1999). L'ajustement osmotique accompli par les solutés compatibles permet le maintien de :

- la turgescence (Sakamoto et Murata, 2002).
- nombreuses fonctions physiologiques (photosynthèse, transpiration, croissance...)
- l'état naturel des macromolécules en empêchant l'accumulation de radicaux oxygène toxiques, contribuant ainsi au contrôle redox (Hasegawa *et al.*, 2000).

Les composés azotés (protéines et autres acides aminés), hydroxylés (saccharose, polyols et oligosaccharides) et les ammoniums quaternaires sont parmi les solutés compatibles accumulés par les plantes. Le type d'osmolyte accumulé dépend de l'environnement naturel de chaque espèce végétale (Rhodes et Hanson, 1993).

4-4-3 Synthèse de solutés compatibles

En réponse à des teneurs élevées de sel du milieu externe, les plantes accumulent un soluté intracellulaire afin de rétablir la pression de turgescence et de protéger l'activité des enzymes et des macromolécules contre la déshydratation (Fig.12).

Il s'agit de solutés « **compatibles** », ainsi appelés, du fait qu'ils n'interfèrent pas avec la fonction cellulaire (la réplication de l'ADN, interactions ADN-protéines et les mécanismes métaboliques) quoique accumulés à de très fortes concentrations (Yancey, 2001).

a- Glycine bétaine (G.B)

La GB est l'ammonium quaternaire le plus répandu chez les plantes supérieures, elle est accumulée suite à un stress abiotique, telle une salinité élevée (Rhodes et Hanson, 1993). Elle joue un rôle majeur dans la stabilisation des structures des enzymes et des complexes protéiniques et dans le maintien de l'intégrité des membranes contre les effets délétères de l'excès de sel, du froid, de la chaleur et la congélation (Hayashi *et al.*, 1997 ; Sakamoto et Murata, 2002).

Le complexe de transport d'électrons (II) est protégé par la G.B contre les dommages de la salinité élevée d'où la restauration de la photosynthèse et l'augmentation du taux de

chlorophylle (Yeo, 1998 ; Hamilton III et Heckathorn, 2001). La G.B stimule aussi la fixation d'azote par les plantes soumises à un stress salin (Pocard *et al.*, 1991).

Les halophytes accumulent des quantités énormes de G.B (Bessières, 1998 ; Sakamoto et Murata, 2002). D'un autre côté, les glycophytes aussi sont concernées par l'accumulation de GB exemple : les épinards (Sulpice *et al.*, 1998), l'orge (Hayashi *et al.*, 1997) et le blé (Sabry *et al.*, 1995).

Chez les plantes supérieures, la GB se concentre dans le cytoplasme (Yeo, 1998), alors que la synthèse se déroule dans les stroma des chloroplastes (Rhodes et Hanson, 1993 ; Hayashi *et al.*, 1997 ; Yeo, 1998 ; Sakamoto et Murata, 2002). La G.B d'apport oxygène (au niveau des feuilles) est transportée vers toutes les parties de la plante en améliorant sa croissance (Mäkelä *et al.*, 2003).

La majorité des membres de la famille des *Plumbiginaceae* préfèrent la β -alanine bétaine à la G.B. Cet osmoprotecteur remplace la G.B dans des conditions salines hypoxiques (manque d'O₂) (Hanson *et al.*, 1991).

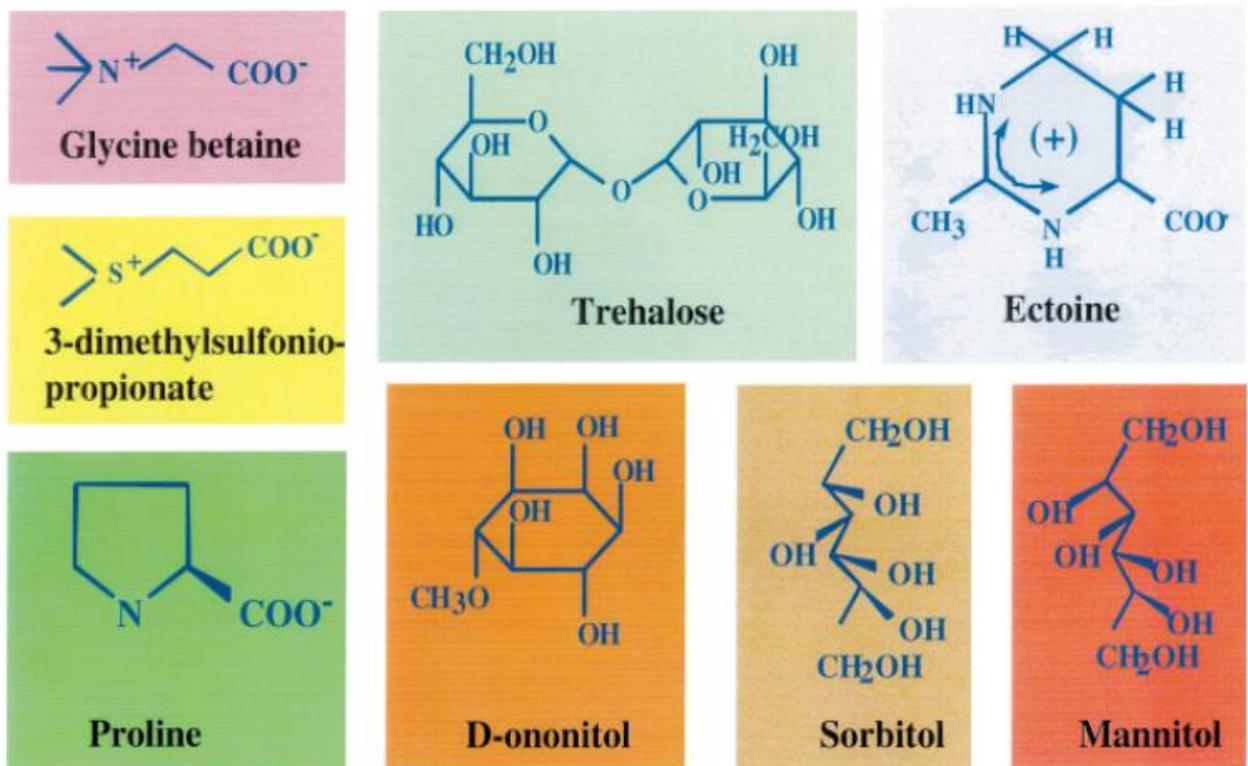


Fig. 12 : Structures des principaux osmolytes/ solutés compatibles accumulés dans la nature (Hasegawa *et al.*, 2000).

La choline-*O*-sulfate joue un rôle fondamental dans l'osmoprotection de plusieurs plantes, notamment les *Plumbaginaceae* (Hanson *et al.*, 1991). Son accumulation est également un moyen de détoxification des sulfates, souvent abondants dans les environnements salins (Mc Neil *et al.*, 1999).

b- Proline

La proline joue un rôle prépondérant dans le maintien de la turgescence et la protection des membranes et des systèmes enzymatiques (Monneveux, 1997) essentiellement du complexe de transport d'électrons II (Hamilton III et Heckathorn, 2001). Elle est surtout impliquée dans les environnements secs (Bohnert *et al.*, 1995 ; Sabry *et al.*, 1995).

Des concentrations élevées en NaCl (100 mM) déclenchent la synthèse de proline chez les espèces de soja (Bourguois-Chaillou *et al.*, 1991) et de *Poplar* (Watanabe *et al.*, 2000). Une osmoprotection efficace a été notée avec la N-méthyl-L-proline chez *Tamarix jordanis*, une plante halotolérante (Solomon *et al.*, 1994).

Cet immino-acide n'est cependant pas impliquée dans l'ajustement du stress salin à long terme (Köhl, 1997).

c- Sulfonioms tertiaires

Le dimethylsulfoniopropionate (DMSP) est omniprésent chez les algues marines (Mc Neil *et al.*, 1999) dont *U. lactuca* (Ghoul *et al.*, 1995 ; Van Alstyne *et al.*, 2007). Il est particulièrement accumulé comme osmoprotecteur par les plantes à fleurs dans les milieux carencés en azote (Rhodes et Hanson, 1993 ; Mc Neil *et al.*, 1999). Il joue aussi un rôle important dans la détoxification des sulfures dans les marécages salés (Rhodes et Hanson, 1993).

d- Ectoïne

L'introduction de gènes impliqués dans la voie biosynthétique de l'ectoïne dans les cellules de tabac conduit à une meilleure tolérance au choc hyper osmotique chez les plantes transgéniques (Nakayama *et al.*, 2000).

e- Polyols

Les polyols fonctionnent dans deux voies difficiles à séparer : ajustement osmotique (en facilitant la rétention de l'eau dans le cytoplasme) et osmoprotection (grâce à l'interaction avec les membranes, les enzymes ou les complexes protéiques) (Bohnert *et al.*, 1999).

Le mannitol et le pinitol sont accumulés par les plantes pour l'ajustement osmotique dans un milieu salé (Bohnert *et al.*, 1999)

Le D-ononitol et de myo-inositol protègent les enzymes et les membranes contre les effets de l'hyperosmolarité (Sheveleva *et al.*, 1997). Particulièrement l'accumulation du myo-inositol facilite la séquestration des ions Na^+ et protège la photosynthèse (Sheveleva *et al.*, 1997). La synthèse d'inositol augmente chez *Arbidopsis* en réponse à un stress salin (Dewald *et al.*, 2001).

f- Potassium

Le potassium est nécessaire au maintien de la turgescence et à l'ajustement osmotique. Chez les plantes sous stress salin, il est accumulé dans la vacuole pour servir de soluté compatible (Bohnert et Shen, 1999).

5- Osmorégulation chez les bactéries

Dans leurs environnements, les bactéries doivent s'adapter à diverses contraintes abiotiques parmi lesquelles le stress ionique (Galinski et Truper 1994) par le biais de l'osmoadaptation. Celle-ci comprend deux étapes :

- La réponse primaire consiste en un rétablissement du gradient de la pression osmotique à travers la membrane cellulaire par une importante augmentation de la concentration intracellulaire des ions K^+ et du glutamate (Kempf et Bremer, 1998).

- La réponse secondaire intervient lorsque l'intensité du stress persiste ou augmente (Kempf et Bremer, 1998). La cellule fait alors appel à des solutés dits « compatibles » accumulés soit par synthèse (tréhalose) soit puisés à partir du milieu extérieur (proline et autres molécules osmoprotectrices) (Bernard *et al.*, 1986).

En réponse à des teneurs élevées de sel du milieu externe, les microorganismes accumulent un soluté intracellulaire afin de rétablir la pression de turgescence et de protéger l'activité des enzymes et des macromolécules contre la déshydratation (Galinski, 1995 ; Kempf et Bremer, 1998).

Les bactéries accumulent différentes molécules selon l'intensité et la durée du stress parmi lesquelles :

- L'augmentation intracellulaire de solutés ioniques (ex : K^+) sert de signal pour la coordination des autres réponses osmorégulatrices (Kempf et Bremer, 1998). Le glutamate de

charge négative à pH neutre est synthétisé lors d'un stress osmotique pour contrebalancer les charges positives des ions K^+ (Kempf et Bremer, 1998).

- Des molécules neutres telles le tréhalose et des polyols jouent un rôle important dans l'osmoadaptation (Pocard *et al.*, 1994).

- Des osmoprotecteurs, tels la proline dont l'accumulation se fait par transport actif à partir du milieu extérieur, elle contribue à la stimulation de la croissance de plusieurs bactéries comme *S. typhimurium* et *E. coli* (Le Rudulier et Bouillard, 1983 ; Csonka, 1989).

Chez les bactéries, La G.B est l'osmoprotecteur le plus efficace (Csonka et Hanson, 1991). Elle est généralement accumulée dans le cytoplasme des cellules subissant un stress osmotique à des concentrations excédant 800 mM (Larsen *et al.*, 1987 ; Csonka, 1989). Plusieurs espèces bactériennes répondent positivement à un apport exogène de G.B, même à de faibles concentrations (1 mM) (Bernard *et al.*, 1986).

Les *Pseudomonas* accumulent à partir du milieu externe ou par synthèse *de novo* une variété de solutés compatibles. Le glutamate et le tréhalose sont utilisés par ces espèces durant la croissance dans un milieu de forte osmolarité (D'Souza-Ault *et al.*, 1993 ; Pocard *et al.*, 1994). Selon ces mêmes auteurs, plusieurs espèces de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, et *P. putida*) accumulent le N-acetylglutamyl-glutamine lorsqu'elles sont confrontées à un stress osmotique en absence de bétaine. Le glucosylglycerol est le soluté compatible prédominant chez *P. mendocina* et *P. pseudoalcaligenes* (Pocard *et al.*, 1994). Le mannitol est également détecté chez *P. putida* (Kets *et al.*, 1996). La G. B. est un osmoprotecteur puissant pour les espèces de *Pseudomonas* (D'Souza-Ault *et al.*, 1993 ; Pocard *et al.*, 1994).

6- Effets des PGPR sur les plantes stressées par le sel

L'inoculation par des rhizobactéries permet une amélioration de la résistance des plantes aux contraintes salines (Glick, 2015). Les PGPR induisent quelques ajustements conférant de nouvelles capacités d'halotolérance (Fig. 13).

La production de l'AIA par les bactéries rhizosphériques fournit un supplément à la plante pour maintenir la croissance racinaire et foliaire une fois exposée à de fortes teneurs en sel (Ahmad *et al.*, 2013). Cet effet positif est observé chez le blé inoculé avec des souches de *Pseudomonas* (Egamberdieva, 2009)

En réponse à un stress salin, les rhizobactéries réduisent la quantité d'éthylène par une synthèse abondante de l'enzyme ACC désaminase. L'activité de cette enzyme confère, par exemple, une tolérance à la tomate, le piment et la fève, se traduisant par une augmentation du

poids frais et sec des plantes et une amélioration du processus photosynthétique (Mayak *et al.*, 2004 ; Nadeem *et al.*, 2009).

Les EPS élaborés par les PGPR améliorent la structure du sol et augmentent la capacité de rétention d'eau dans la rhizosphère (Alami *et al.*, 2000). En se liant aux cations, ils réduisent la teneur en Na⁺ absorbés par la plante (Ashraf *et al.*, 2004). La formation de biofilm autour des racines (EPS et protéines) par les PGPR limite la diffusion de phytohormones et autres nutriments nécessaire à l'atténuation du stress (Timmusk *et al.*, 2013). Ainsi, l'inoculation du blé (Ashraf *et al.*, 2006), du pois chiche (Qurashi et Sabri, 2012) et du maïs (Awad *et al.*, 2012) par des bactéries productrices d'EPS, augmente le poids frais et sec, les taux de chlorophylle (a et b) et des caroténoïdes.

En réponse à un stress salin sévère, les plantes augmentent la synthèse d'osmo-protecteurs, afin d'ajuster la pression osmotique et de détoxifier les cellules (Le Rudulier, 2005 ; Ashraf et Foolad, 2007). Certaines rhizobactéries peuvent intervenir dans ces réponses en synergie avec les réponses intrinsèques des plantes. L'inoculation chez le riz par *P. pseudoalcaligenes*, surproductrice de glycine-bétaine, améliore la résistance des plantes par une augmentation de la matière sèche foliaire et racinaire (Yuwono *et al.*, 2005). Une accroissement du taux de la proline dans les feuilles est observé après bactérisation des semences de maïs par *Azospirillum* (Kandowangko *et al.*, 2009).

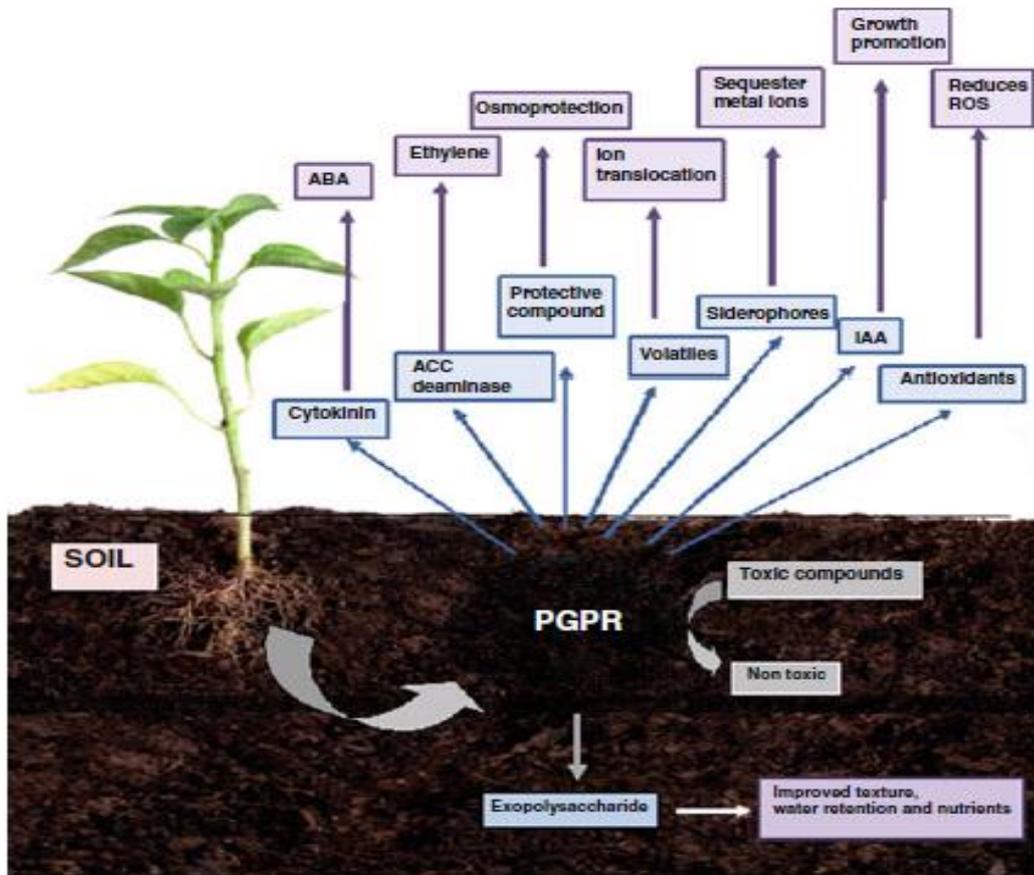


Fig. 13 : Modalités de l'atténuation du stress osmotique par les PGPR (Yang *et al.*, 2009).

ABA : Acide abscissique, **IAA** : acide indole acétique, **ROS** : Dérivé réactif d'oxygène.

PARTIE

PRATIQUE

Chapitre I

Isolement et caractérisation des *Pseudomonas* fluorescents spp.

1- Matériel et méthodes

Le sol est considéré comme le réservoir le plus riche en microorganismes sur terre. Les bactéries, de par leur nombre et leur diversité, sont impliqués dans le fonctionnement de l'écosystème tellurique grâce aux interactions microbiennes avec leur environnement et les microorganismes environnants.

Dans ce premier chapitre, les manipulations inhérentes à la microbiologie du sol consistent à estimer la flore bactérienne totale et les *Pseudomonas* du groupe fluorescent dans 2 sols l'un fertile : El-Ouricia, l'autre affecté par la salinité (Sebkhat Melloul). La rhizosphère et l'endosphère de 2 plantes caractéristiques des 2 sites sont analysées.

1-1 Échantillonnage

1-1-1 Sols

Le prélèvement de sol est effectué dans un champ de blé situé à El-Ouricia (Nord SETIF), en Mars 2011 (Fig. 14) C'est un sol fertile, noir, friable et argileux.

Après avoir écarté la couche superficielle avec une spatule stérile, approximativement 2 Kg de sol sont prélevés aseptiquement à partir de plusieurs parcelles de champ (nb=6) sur une profondeur de 20 cm et un diamètre de 23 cm.

Selon la même procédure, un deuxième échantillon est retiré à partir d'un sol salin (Sebkhat Melloul) situé au sud de la wilaya de Sétif (Daira de Ain Oulmène), à une distance de 100 m du lac principal (Fig. 15).

1-1-2 Rhizosphères

Les échantillons du sol appartenant à la rhizosphère du blé dur *Triticum durum* (sol fertile) et de l'halophyte *Atriplex halimus* (sol salin) (Fig.16) ont été prélevés soigneusement (en déracinant les plantes) sur trois points différents et recueillis dans des sachets en plastique stérilisés par U.V. L'ensemble des prélèvements est transporté dans des glacières et gardé à 4°C pour une utilisation ultérieure. (Pepper *et al.*, 2000).

L'halophyte *Atriplex halimus* L., objet de notre étude, est un arbuste vivace originaire d'Afrique du nord, adapté aux terrains salino-argileux (conductivité électrique > 4 dSm⁻¹) et aux milieux arides caractérisés par des précipitations annuelles inférieures à 150 mm. Son système racinaire profond stabilise les sols susceptibles à l'érosion (Le Houérou, 1992). C'est une espèce fourragère importante pour l'alimentation du bétail en particulier



Fig. 14: Localisation géographique de la zone de prélèvement d'un sol fertile. (Google Earth, 2015)

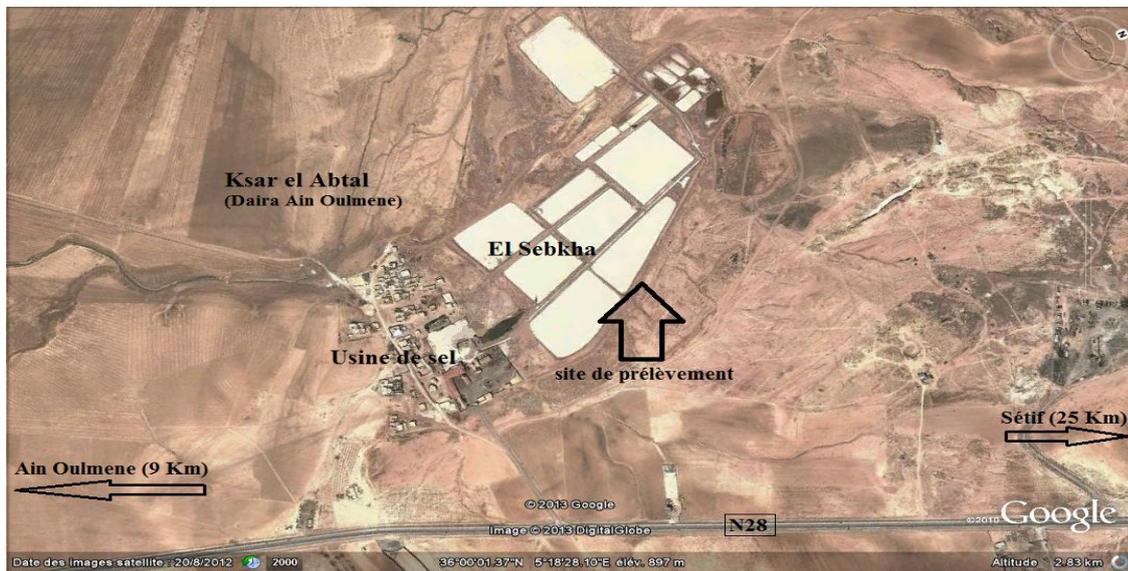


Fig. 15: Localisation géographique de la zone de prélèvement d'un sol salin. (Google Earth, 2013)



Fig. 16: *Atriplex halimus*

celle des ovins et les caprins (Walker *et al.*, 2014), d'autant plus qu'elle sert en médecine traditionnelle arabe pour traiter le diabète, le rhumatisme et les maladies cardiaques (Said *et al.*, 2008).

La taxonomie des plantes choisies pour la présente étude est reportée dans les tableaux 4 et 5.

Tab. 4 : Taxonomie du blé dur

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordre	<i>Poales</i>
Famille	<i>Poaceae</i>
Genre	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum durum</i>

Tab. 5 : Taxonomie de *A. halimus* (Kadereit *et al.*, 2010).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphyta
Sous-embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Apétales
Ordre	<i>Centrospermales</i>
Famille	<i>Amaranthaceae</i>
Sous-famille	<i>Chenopodiaceae</i>
Tribu	Atripliceae
Genre	<i>Atriplex</i>
Espèce	<i>Atriplex halimus</i>

1-2- Analyse physico-chimique du sol

1-2-1 Mesure du pH et de la conductivité électrique

Le pH et la salinité sont deux paramètres à déterminer du fait de leur importance et leur influence sur la composition de la communauté bactérienne tellurique. Les techniques adoptées sont celles décrites par Pansu et Gautheyrou (2006).

Afin de mesurer le pH, la solution du sol est préparée comme suit : 10 g de l'échantillon sont additionnés de 25 ml d'eau distillée. Après agitation vigoureuse et décantation pendant 5 minutes, le pH du surnageant est mesuré.

La salinité du sol est donnée par un salinomètre (type **HANNA HI 9032**) préalablement étalonné à l'aide d'une solution standard (Cole-Parmer) de conductivité 12,80 μS à 27,5°C. Elle est déterminée *via* l'évaluation de la conductivité électrique (C_E). Elle exprime, en fait, la capacité du sol à conduire le courant électrique en fonction de la concentration en électrolytes (Pansu et Gautheyro, 2006).

Dans ce but, un extrait aqueux du sol (1/10) est réalisé dans de l'eau distillée. Après agitation douce pendant 20 min et décantation pendant 30 mn, la C_E (exprimée en mS/cm).

1-2-2 Taux de Carbone organique

La matière organique joue un rôle déterminant dans la pédogénèse du sol. Elle amplifie grandement sa capacité d'échange cationique et retient les nutriments assimilables par les plantes. Ainsi, la matière organique constitue un réservoir de nutriments lentement assimilables et joue par conséquent un rôle important dans la fertilité du sol. Pour ces raisons, il était impératif de connaître le taux de carbone organique des 2 sols prélevés.

La méthode de Anne (1945) pour le dosage de la matière organique dans le sol est largement utilisée par les laboratoires d'analyses du sol. Cette méthode normalisée (**NF ISO 14235**) est basée sur une oxydation du carbone présent dans le sol par un mélange de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) et d'acide sulfurique. L'excès de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ est neutralisé par une solution contenant le Fe^{2+} (sous la forme de sel de Mohr ou de sulfate de fer). L'acide phosphorique est utilisé pour complexer l'ion Fer (III) et obtenir, par conséquent, un point de virage plus distinct. La différence en meq. Fe utilisée pour l'échantillon et pour l'essai à blanc permet de calculer le contenu de carbone dans le sol.

Le pourcentage de matière organique dans le sol est calculé sur la base du taux de carbone dans la matière organique comme suit :

$$\% \text{ matière organique} = \text{taux de carbone organique} \times 1.72$$

1-2-3 Taux d'humidité

La teneur en eau est déterminée par gravimétrie après séchage à une température maximale de 105°C. Cette température, maintenue pendant une période de temps contrôlée, est suffisamment élevée pour éliminer les formes "libres" de l'eau et suffisamment faible pour ne pas provoquer une perte importante de matière organique et des sels instables par volatilisation. La répétabilité et la reproductibilité sont satisfaisantes dans la majorité des sols si les procédures sont rigoureusement respectées selon Pansu et Gautheyrou (2006).

La teneur en eau du sol se détermine par deux pesées : une première pesée de l'échantillon à l'état initial constitue la masse de l'échantillon humide et une deuxième pesée après passage à l'étuve à 105°C pendant 4 heures (évaporation de l'eau libre et de l'eau capillaire), donne la masse sèche de l'échantillon. Comme le sol séché attire rapidement l'humidité de l'air, il est donc nécessaire de peser les échantillons immédiatement après refroidissement dans le dessiccateur (Pepper et *al.*, 2000).

Le taux d'humidité est alors exprimé selon la formule :

$$\% = \frac{\text{Poids humide} - \text{Poids sec}}{\text{Poids sec}}$$

1-3- Analyse microbiologique

1-3-1- Isolement et dénombrement de la flore bactérienne totale

a- À partir des sols et des rhizosphères

L'isolement des bactéries colonisant le sol non rhizosphérique (SNR) ou rhizosphérique est une opération hautement sensible. Un nombre maximal de bactéries doit être mis en culture dans le milieu nutritif. Dans ce but, le milieu « Cold Soil Extract Agar » (CSEA) proposé par Olsen et Bakken (1987) a été adopté. En effet, sa composition riche favorise la récupération d'un nombre considérablement élevé par rapport aux autres milieux testés par les 2 chercheurs cités ci-dessus. Les éléments constitutifs du milieu sont :

Extrait de sol (extrait à froid)	400 ml (Annexe 1)
Eau de robinet	600 ml
Tampon phosphate (solution stock)	1 ml (Annexe 2)
Solution nutritive (solution stock)	1 ml (Annexe 3)
Agar	20 g

Après autoclavage (121°C, 15 min) et refroidissement vers 50°C, une solution de cycloheximide (Sigma) (75µg / l), un antifongique, stérilisée par filtration sur membrane (Millipore) 0,2 µm est additionnée au milieu CSEA (Hunter et Belt, 1999).

Afin d'isoler les bactéries à partir du sol non rhizosphérique (SNR), celui-ci est débarrassé des pierres, des débris de plantes et autres corps solides puis broyé à l'aide d'un mortier stérile. Un gramme de chaque sol est dilué dans 9 ml de l'extrait de sol stérile, l'ensemble est agité pendant 30 min.

Pour récupérer les bactéries rhizosphérique du blé ou de l'halophyte, le sol non rhizosphérique est éliminé. Les racines sont immergées dans 9 ml d'eau physiologique (9 g/ l) stérile et vortexées pendant 10 min.

À partir de ces solutions- mères de chaque échantillon, des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-5}) sont réalisées dans du tampon phosphate (Annexe 4). 100 μ l de chaque dilution serviront à ensemercer le milieu de culture CSEA. L'incubation a lieu à 28°C/15 j, les numérations sont relevées toutes les 24 h.

b- À partir des endosphères

Afin d'isoler les bactéries à partir de l'endosphère du blé et de *Atriplex halimus*, le sol rhizosphérique est éliminé par lavage à l'eau distillée stérile. Les racines sont ensuite désinfectées à l'éthanol 70 % (vol/ vol) puis stérilisées en surface avec une solution d'hypochlorite de sodium à 3%. Les racines sont enfin rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer toutes traces des désinfectants puis additionnées d'eau physiologique (1 : 10) et broyées dans un mortier stérile. Un gramme du broyat est prélevé et mis en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile. À partir de cette solution (dilution 10^{-2}), une série de dilutions décimales sont alors réalisées (Forchetti *et al.*, 2007). Un aliquote de 0,1 ml de chaque dilution est étalé à la surface du milieu CSEA. L'incubation est réalisée à 37 °C/ 15 j, les dénombrements étant effectués toutes les 24 h.

1-3-2 Isolement et dénombrement des *Pseudomonas* fluorescents spp.

En vue d'un isolement sélectif des espèces de *Pseudomonas* fluorescents à partir des échantillons précédents, les milieux S₁ et King B sont utilisés.

Le milieu S₁ a été décrit par Gould *et al.* (1985), de composition :

Saccharose	10 g
Glycérol	10 ml
Acides casaminiques	5 g
NaHCO ₃ anhydre (Merck)	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1g
K ₂ HPO ₄	2,3 g
Sodium Lauryl Sarcosique (S.L.S) (Fluka)	1,2 g
Triméthoprime (Sigma)	20 g
Agar-agar	18 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

La solution de triméthoprime stérile (filtre type Millex, porosité 0,22 µm) est ajoutée après autoclavage du milieu (121°C, 15 min) et refroidissement vers 40°C. Le pH final du milieu est de 7,4 à 7,6.

Le milieu King B (King *et al.*, 1954) (Annexe 5) est également utilisé pour l'isolement des *Pseudomonas* fluorescents du sol (Gould *et al.*, 1985).

Après étalement d'un aliquote de 100 µl de chaque dilution précédemment préparée (à partir du sol, rhizosphère, endosphère), les milieux sélectifs sont incubés à 25°C/ 5 j. Les numérotations sont réalisées chaque jour.

1-3-3 Expression des résultats

a- Nombre d'UFC/g de sol

Le résultat final de tous ces dénombrements est exprimé en nombre d'UFC/ml. Pour d'exprimer le résultat en UFC /g de sol, la formule suivante est appliquée (Josephson *et al.*, 2000):

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{\text{poids de sol humide testé} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}}$$

$$\text{Nombre d'UFC par g de sol sec} = \text{UFC par ml} \times \frac{1}{\text{poids sec}}$$

Les résultats concernant l'endosphère sont exprimés en UFC/ g de racine

b- Calcul du rapport R/S

Le rapport R/S est calculé afin d'exprimer l'effet rhizosphérique accompli par les exsudats racinaires de chacune des plantes sur les bactéries. Soit R le nombre d'UFC/ g de sol rhizosphérique et S : le nombre d'UFC/ g de sol non rhizosphérique. Ce rapport concerne seulement les échantillons de sols et des rhizosphères.

1-3-4 Purification

Des colonies de chaque prélèvement sont choisies à partir du milieu CSEA selon leur dominance ou selon une couleur caractéristique et purifiées sur milieu gélose nutritive

À partir des 2 milieux sélectifs des *Pseudomonas* fluorescents, des colonies sont sélectionnées sur la base de leur fluorescence (UV 365 nm) et purifiées sur milieu King B.

1-3-5 Identification des isolats

L'identification des isolats issus du milieu CSEA est basée sur l'observation macroscopique des colonies (aspect sur milieu gélose nutritive, forme, texture et pigmentation) et l'observation microscopique (morphologie des cellules, taille, mode d'agencement, mobilité, coloration de Gram et de la spore).

Outre les études micro et macroscopique, l'identification des isolats, dont la fluorescence est confirmée sous UV, a porté sur la détermination des caractères biochimiques spécifiques des *Pseudomonas* décrits dans le « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » (Holt *et al.*, 1994) telles : l'hydrolyse de l'amidon, la production de H₂S, l'utilisation du citrate, l'hydrolyse de caséine et la liquéfaction de gélatine. La présence de catalase, d'oxydase et nitrate réductase ainsi que le type respiratoire et l'utilisation de glucose sont les principaux critères à vérifier. La fluorescence sur milieux sélectifs King A (Annexe 6) et King B ainsi que la croissance à 4 et 42°C permettent la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas* fluorescents. Ces tests préliminaires ont mené au choix d'une vingtaine de souches de la rhizosphère du blé de l'endosphère de *A. halimus*.

1-3-6 Conservation des souches

Pour une conservation de longue durée et afin d'éviter toute mutation génique, les isolats sont conservés dans du bouillon Luria Bertani (LB) (annexe 7) additionné de glycérol à 30% puis gardés à -18°C.

2- Résultats

2-1 Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés

Le sol prélevé de la région d'El- Ouricia est un sol classé parmi les sols agricoles fertiles, connus par la culture de blé. C'est un sol noir, friable et argileux. Le pH est de 7,25. La conductivité électrique (CE) à 20°C est de 486 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et la teneur en chlorures est de 233 mg/l. Le taux de matières organiques est de 0,84%.

Le deuxième prélèvement réalisé à partir du sol salin (Sebkhat Melloul) est un sol de couleur marron claire, de texture limono-sablonneux. Le pH est de 7,30. À 20°C, la conductivité électrique atteint 4,09 mS/cm avec une charge de 2,11 g/l de chlorures. Le taux de matière organique noté est de 0,63%.

Les différentes caractéristiques physico-chimiques des 2 sols étudiés sont représentées dans le tableau 6.

Tab. 6 : Paramètres physico-chimiques des 2 sols étudiés

Paramètres	Type de sol	
	Fertile	Salin
pH	07,25	07,30
Conductivité à 20°C	486 $\mu\text{s}/\text{cm}$	4,09 ms/cm
Chlorures	233 mg/l	02,11 g/l
Calcaire total	25,08%	29%
Calcaire actif	13,05%	03,84%
Nitrates / nitrites	02,30 mg/kg / 0,30 mg/kg	0,45 mg/Kg / 0,35 mg/Kg
Azote ammoniacal	07,80 mg/kg N	10,80 mg/kg N
Potassium	150 mg/kg K	180 mg/Kg K
Phosphore	30 mg/kg P	80 mg/Kg P
Matière organique (%)	0,84	0,63
Taux d'humidité	21%	15,66%

2-2 Dénombrement de la flore bactérienne totale

Suite à l'analyse microbiologique du sol fertile (SNR, sol rhizosphérique du blé) et celle du sol salin (SNR, sol rhizosphérique de *Atriplex halimus*), le dénombrement de la flore totale bactérienne sur milieu CSEA incubé à 28°C pendant 15 jours a fourni des données différentes selon l'échantillon (Tab. 7). L'analyse de la variance révèle une différence très significative ($P \leq 0.001$) entre tous les prélèvements testés (Fig.17)

Un gramme de sol fertile (NR) renferme $2,7 \cdot 10^6$ UFC alors que la charge bactérienne du sol salin est de $1,10^5$ UFC/g.

Le sol rhizosphérique du blé contient approximativement $2,8 \cdot 10^7$ UFC/g, celui de l'halophyte abrite $1,7 \cdot 10^6$ UFC/g de sol.

Un gramme de racines du blé est colonisé par $1,8 \cdot 10^5$ UFC, celui de *A. halimus* par $2,5 \cdot 10^3$ UFC/g.

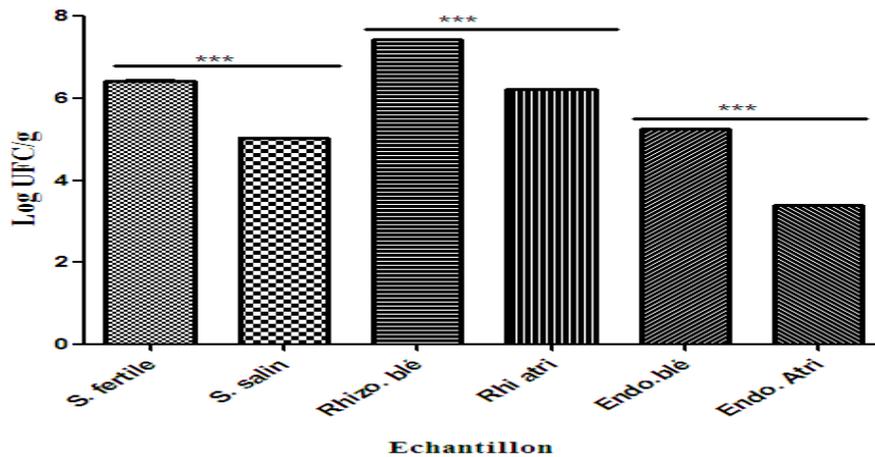


Fig. 17 : Énumération de la flore bactérienne totale dans différents échantillons

(S. sol, **Rhizo** : Rhizosphère, **Endo** : endosphère, **Atri** : *Atriplex halimus*)
 *** : $P \leq 0,001$

2-3 Calcul de l'effet rhizosphérique

L'effet rhizosphérique est communément exprimé par le rapport R/S (nombre de microorganismes dans la rhizosphère/ nombre de microorganismes dans le sol non rhizosphérique). Ainsi ce rapport a concerné, dans cette étude, seulement les bactéries. Il est équivalent à 10,37 pour le sol fertile et 15,45 pour le sol salin, valeurs représentant la moyenne de 3 répétitions.

2-4 Dénombrement des *Pseudomonas* fluorescents spp.

L'énumération des *Pseudomonas* fluorescents diffère selon le lieu de prélèvement, l'échantillon et le milieu utilisé (Tab.7).

2-4-1 À partir de sols

Après incubation (25°C/ 5 j), le milieu King B a permis de dénombrer $4,1 \cdot 10^4$ UFC/g de l'échantillon fertile et présentant une fluorescence à 365 nm. Il est à noter que les colonies non fluorescentes, de couleurs différentes détectées sur le milieu ne sont pas dénombrées. Sur milieu sélectif S₁, $5,3 \cdot 10^4$ UFC/g, dont la fluorescence est très nette, ont été énumérées. Le sol salé contient $3,2 \cdot 10^3$ et $7,5 \cdot 10^3$ UFC/g sur milieux King B et S₁, respectivement.

Tab. 7 : Tableau récapitulatif des résultats de dénombrement de la flore totale et des *Pseudomonas* fluorescents spp. isolés de différents échantillons.

UFC/g Test	ECHANTILLON					
	Sol fertile	Sol salin	Rhizosphère <i>T. durum</i>	Rhizosphère <i>A. halimus</i>	Endosphère <i>T. durum</i>	Endosphère <i>A. halimus</i>
Flore bactérienne totale (CSEA)	$2,7.10^6$	$1,1.10^5$	$2,8.10^7$	$1,7.10^6$	$1,8.10^5$	$2,5.10^3$
<i>Pseudomonas</i> Fluorescents (King B)	$4,1.10^4$	$3,2.10^3$	$5,2.10^5$	$1,3.10^4$	$4,8.10^3$	$4,5.10^2$
<i>Pseudomonas</i> fluorescents (S ₁)	$5,3.10^4$	$7,5.10^3$	$6,5.10^5$	$5,2.10^4$	$8,1.10^3$	$5,3.10^2$

2-4-2 À partir des rhizosphères

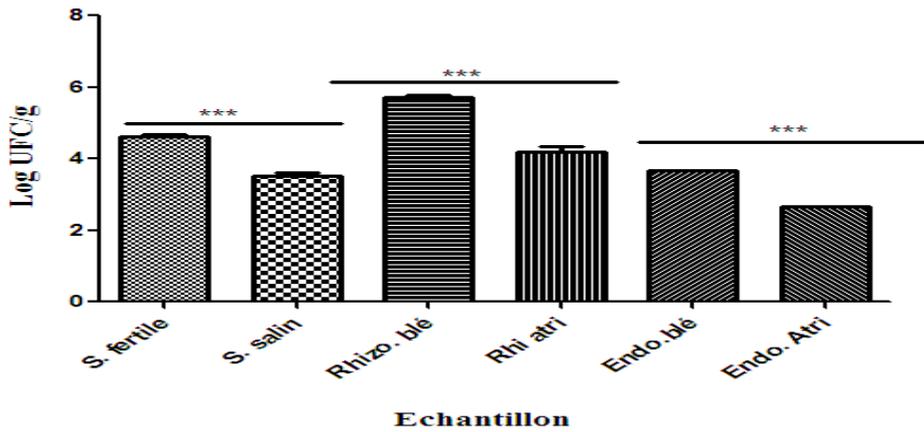
La rhizosphère du blé abrite $5,2.10^5$ UFC/ g présentant une fluorescence sur King B et $6,5.10^5$ UFC/g sur S₁. En revanche, celle de *A. halimus* renferme $1,3.10^4$ comptées sur King B et $5,2.10^4$ UFC/g sur milieu S₁.

2-4-3 À partir des endosphères

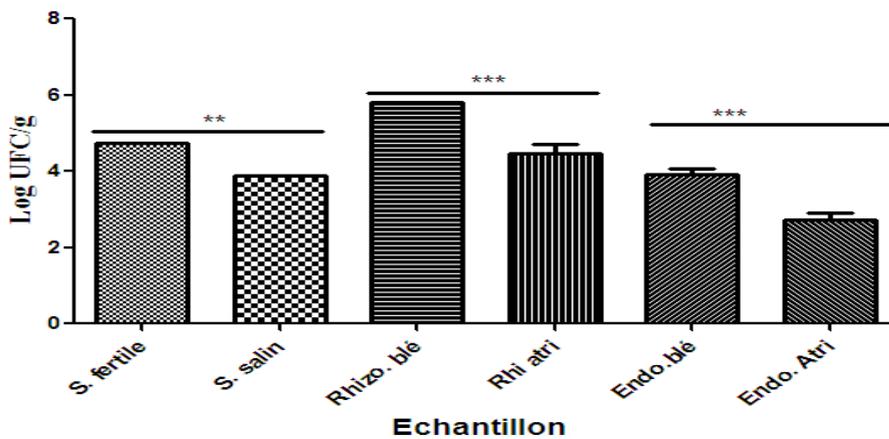
A partir l'endosphère du blé $4,8.10^3$ UFC/g ont été énumérées sur king B. Le milieu S₁ a fourni $8,10.10^3$ UFC/g.

Selon la procédure d'extraction suivie, l'endosphère de *A. halimus* renferme $4,5.10^2$ UFC/g fluorescentes isolées sur King B et $5,3.10^2$ sur S₁.

Les dénombrements obtenus sur King B et S₁ sont illustrés sur la figure 18. Elles expriment une différence très significative ($P \leq 0.001$) entre les échantillons dérivant d'un sol fertile et ceux d'un sol salin. La figure 19 montre clairement une différence non significative quant aux nombres recensés sur les 2 milieux King B et S₁.



A)



B)

Fig. 18 : Dénombrement des *Pseudomonas* fluorescens spp. sur milieux King B (A) et S₁ (B)

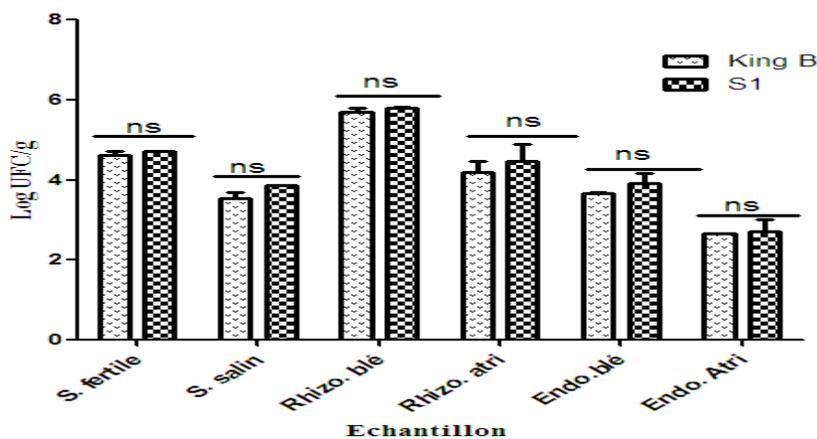


Fig. 19 : Comparaison entre les deux milieux king B et S₁

(S. : sol, Rhizo : Rhizosphère, Endo : endosphère, Atri : *Atriplex halimus*)
 ** : $P \leq 0.01$; *** : $P \leq 0.001$; ns : différence non significative.

Le taux approximatif des *Pseudomonas* fluorescents par rapport à la flore totale de chaque échantillon est présenté dans le Tableau 8.

Tab. 8 : Pourcentage des *Pseudomonas* fluorescents spp. présents dans les échantillons analysés

% <i>Pseudomonas</i> Milieu	Échantillons					
	Sol Fertile	Sol salin	Rhizosphère <i>T. durum</i>	Rhizosphère <i>A. halimus</i>	Endosphère <i>T. durum</i>	Endosphère <i>A. halimus</i>
King B	1,51	2,9	2,03	0,67	2,66	18
S ₁	1,96	6,8	2,32	3,05	4,5	21,2

2-5 Tests d'identification des isolats

L'identification des souches isolées a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

2-5- 1 A partir du milieu CSEA

Quel que soit l'échantillon à l'origine, les isolats purifiés à partir du milieu CSAE, montrent une dominance des formes bacillaires à Gram⁺ sporulées. Les bacilles d'aspect mycélien à Gram⁺ dominant. Les bacilles à Gram⁻ fermentatifs sont en nombre considérable surtout dans le sol fertile non rhizosphérique. Les bacilles à Gram⁻ oxydatifs sont largement représentés au niveau des rhizosphères. Enfin les coccobacilles à Gram⁺ existent en un nombre très faible. Les caractéristiques macroscopiques, microscopiques et quelques caractéristiques biochimiques sont résumées dans les tableaux 9 et 10.

2-5-2 A partir des milieux sélectifs

Les isolats obtenus à partir des milieux sélectifs King B et S₁ sont purifiés sur milieu King B et leur fluorescence sous UV (365 nm) est confirmée. La majorité d'entre elles donnent des colonies crème à blanchâtres (quelques une vertes), bombées et visqueuses. La présence d'une odeur aromatique caractéristique est déterminante chez certaines souches.

Tous les isolats sont des bacilles fins, quelques fois aux extrémités arrondies, à Gram négatif, mobiles et non sporulés. Les tests biochimiques confirment la présence d'une catalase, d'une oxydase, d'une nitrate réductase chez toutes les souches. La respiration est aérobie, le métabolisme du glucose se fait par voie oxydative et l'utilisation du citrate comme seule source de carbone est confirmée.

Tab. 9: Observations macro- et microscopiques des colonies isolées du milieu CSEA

Code	Examen macroscopique	Examen microscopique
SF1	Jaune, ronde, visqueuse, lisse, bombées, Ø= 4 cm.	Bacilles à Gram ⁻ , mobiles.
SF2	Translucide, ronde, sèche, plate, Ø= 7 cm	Bacilles courts à Gram ⁺ , spore centrale, mobiles.
SF3	Beige, ronde, crémeuse, lisse, Ø=3 cm.	Bacilles à Gram ⁺ , spore déformante, mobiles.
RB1	Transparente, humide, lisse, Ø= 5 cm	Bacilles à Gram ⁺ , asporulés, mobiles.
RB2	Sèche, lisse, semi-bombée, visqueuse, Ø= 5 cm.	Bacilles à Gram ⁻ , mobiles.
EB	Sèches, lisses, contours irréguliers. Ø= 3 cm	Bacilles courts à Gram ⁻ , immobiles.
SS1	Jaunâtre, ronde, lisse, semi-bombés, visqueuse, Ø= 8 mm.	Aspect mycélien à Gram ⁺ , sporulé.
SS2	Blanche, bombée, lisse, transparente, Ø= 1cm	Bacilles courts à Gram ⁺ , spore centrale, mobiles.
SS3	Rose, sèches, contours irréguliers, Ø=1mm.	Aspect mycélien à Gram ⁺ , sporulé
RA1	Verte, Déformée, contours irréguliers, sèche.	Bacilles courts à Gram ⁻ , mobiles.
RA2	Marron, Ronde, lisses, crémeuse, Ø= 1mm	Bacilles à Gram ⁺ , sporulés, immobiles
EA 1	Marron, ronde, bombée, rugueuse, Ø= 10 cm	Bacilles à Gram ⁻ , mobiles

Tab. 10 : Quelques caractères biochimiques des colonies isolées sur milieu CSEA.

Code	Catalase	oxydase	Nitrate réductase	Métabolisme glucidique	Type respiratoire
SF1	+	+	-	oxydatif	aérobie stricte
SF2	+	-	-	fermentatif	Aéro-anaérobie facultatif
SF3	+	-	-	oxydatif	Microaérophile
RB1	+	-	-	oxydatif	Microaérophile
RB2	+	+	-	inerte	aérobie stricte
EB	+	-	-	oxydatif	Aérobie strict
SS1	+	-	-	oxydatif	Aérobie strict
SS2	+	-	-	fermentatif	Aéro-anaérobie facultatif
SS3	+	-	-	oxydatif	aérobie stricte
RA1	+	-	-	inerte	aérobie stricte
RA2	+	-	-	fermentatif	aéro-anaérobie facultatif
EA1	+	-	-	inerte	microaérophile

SF : Sol fertile ; SS : Sol salin ; RB : Rhizosphère de blé ; EB : Endosphère blé ; RA : Rhizosphère *A. halimus* ; EA : Endosphère *A. Halimus*

Tous les isolats n'utilisent pas de l'indole et ne produisent pas de l'acide sulfurique. Le reste des caractères sont résumés dans les tableaux 11, 12 et 13. La souche de référence (*Pseudomonas fluorescens* CHA0) subit les mêmes tests.

Tab.11 : Caractères biochimiques des souches isolées à partir du sol fertile et de la souche de référence *P. fluorescens* CHA0

Souche \ Test	SF2	SF4	SF5	SF7	SF 8	SF 9	SF 12	SF 13	SF 14	CHA0
Fluorescence sur King B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescence sur King A	-	+	++	+	-	+	-	-	-	-
Croissance à 42°C	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Croissance à 4 °C	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Gélatinase	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mannitol	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+

Tab. 12 : Caractères biochimiques des souches isolées à partir de la rhizosphère du blé.

Souche Test	RB1	RB2	RB3	RB4	RB5	RB8	RB9	RB10	RB11	RB13	RB14
Fluorescence sur King B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescence sur King A	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+
Croissance à 42°C	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Croissance à 4 °C	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Gélatinase	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Mannitol	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+

Tab. 13 : Caractères biochimiques des souches isolées à partir du milieu salin.

Souche Test	SK1	SK2	SK3	RH1	RH2	EHK1	EHK3	EHK4
Fluorescence sur King B	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescence sur King A	-	-	-	-	+	+	-	+
Croissance à 42°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	+	+	+	+	-	-	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	-	-	-

S : sol ; **RH** : Rhizosphère halophyte ; **EH** : endosphère halophyte; **K**: souche isolée à partir du milieu King B

3- Discussion

3-1 Analyse physico-chimique du sol

Plusieurs facteurs influencent la croissance et l'activité des populations bactériennes dans le sol. Il s'agit essentiellement de la température, de l'humidité, de la taille des pores des particules du sol, de la qualité, de la disponibilité des nutriments et des types de stress (Girvan *et al.*, 2003). Dans cette étude 2 facteurs essentiels ont été déterminés en premier lieu : le pH et la salinité.

Les valeurs du pH du sol El Ouricia et du sol de sebkat étant de 7,25 et 7.30, respectivement, conviennent à la croissance bactérienne. En effet, le pH du sol est un facteur déterminant pour la structure, la diversité et la sélection de communautés bactériennes (Lauber *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2015). Selon Maier et Pepper (2000), un optimum pour la croissance et l'activité métabolique des bactéries telluriques se situe en général entre 6 et 8 ; *P. aeruginosa*, par exemple possède un pH optimum allant de 6-7. Le pH des échantillons étudiés est conforme à celui de la plupart des sols agricoles, généralement situé entre 4 et 8,5 (Coyne, 1999).

La présence de sel dans le milieu est une entrave importante à la croissance bactérienne. Le sol d'El Ouricia, avec une CE de 486 $\mu\text{S}/\text{cm}$, est considéré comme non salin, en revanche, le prélèvement ayant lieu près de la Sebkat, avec une CE de 4,09 mS/cm , est donc légèrement salin. En effet, selon les normes de Abrol *et al.* (1988) adoptées par la FAO, et selon les recherches de Bui (2013), un sol ayant un CE $> 4 \text{ dS m}^{-1}$ ($\sim 36 \text{ mM NaCl}$) est considéré comme salin, tout en sachant que $1 \text{ mS}/\text{cm} = 1 \text{ dS}/\text{m} = 1000 \mu\text{S}/\text{cm}$ (Abrol *et al.*, 1988). Selon Le Houérou (1993), un sol est considéré comme salin si la concentration minimale en NaCl est de 100 mM (5,84g/l).

Le taux de matière organique reflète la richesse du sol en éléments nécessaires à l'activité biologique des microorganismes. Ce taux est de 0,84% dans le sol El-Ouricia et est très faible dans le sol salin : 0,63%. Les 2 sols peuvent être considérés comme pauvres en matières organiques, selon les normes fixant un taux $< 2\%$, attribué aux sols déficitaires (Roussel *et al.*, 2001). La MO du sol est un élément incontournable dans l'écosystème tellurique au travers de ses différents rôles tant physiques (structure du sol) que chimiques (nutrition minérale des cultures) et biologiques (activité biologique du sol) ; c'est le substrat énergétique des organismes hétérotrophes du sol, dont les microorganismes (Balesdent, 1996). Selon le même auteur, la variété des composés organiques présents dans le sol favorise une grande diversité des organismes et des potentiels de biodégradation.

En conclusion, l'environnement physique du sol, la distribution de ses particules et sa typologie exercent un effet déterminant sur la structure de la communauté microbienne (Girvan *et al.*, 2003). Fait confirmé par Sessitsch (2001), qui, en examinant l'impact d'engrais, à long terme, sur les microorganismes, a remarqué que la diversité microbienne dépendait, beaucoup plus, des fractions particulaires du sol que des pratiques organiques.

3-2 Dénombrement de la flore totale

La méthode classique de dénombrement sur milieu solide a été adoptée dans le but ultime d'évaluer approximativement la charge bactérienne des différents échantillons testés. Cette méthode a permis de conclure une richesse très significative ($P \leq 0.001$) du sol rhizosphérique du blé par rapport aux autres échantillons, soit en estimant la flore totale bactérienne ou les *Pseudomonas* fluorescents, quel que soit le milieu utilisé. La rhizosphère de *A. halimus* est plus chargée que le sol sans végétation, la différence étant très significative ($P \leq 0.001$). Ces constatations sont confirmées par le calcul du rapport R/S, exprimant de façon incontestable l'effet rhizosphérique, s'exerçant particulièrement vis-à-vis des bactéries (Davet, 1996). Ce rapport, de 10,37 dans le cas du sol fertile et de 15,45 dans celui du sol salin, est supérieur à 1 et concorde avec les valeurs citées dans la littérature. Elles fluctuent entre 10 et 100 et peuvent même atteindre 10^3 (Martin, 1978 ; Davet, 1996). Le rapport R/S calculé à partir de la rhizosphère de blé et du sol non rhizosphérique est faible par rapport à la valeur (23) obtenue par Gray et Williams (1971) avec des échantillons semblables. Cette différence serait due au fait que la structure des communautés microbiennes dépend essentiellement de la composition des exsudats racinaires (Yang et Crowley, 2000), de l'âge de la plante, du type de racines et de la composition du sol (Chiarini *et al.*, 1998).

Le rapport enregistré avec l'échantillon salé serait la conséquence de la forte adhérence des bactéries aux racines de *A. halimus* afin de profiter des exsudats essentiellement riches en molécules osmoprotectrices. Selon (Miller *et al.*, 1989), les exsudats racinaires jouent un rôle déterminant dans la stimulation sélective des bactéries. Cependant, des études récentes (Wu *et al.*, 2000) attestent de l'existence de molécules allolépathiques en grandes quantités dans les exsudats racinaires du blé, tels que les composés phénoliques et les acides hydroxamiques. Ces dernières molécules sont synthétisées par le blé dès la germination et libérées *via* les racines tout en diminuant avec l'âge. Elles peuvent inhiber un certain nombre de champignons et bactéries phytopathogènes ou non (*S. aureus*, *E. coli*) (Bravo *et al.*, 1997). Ce phénomène aurait participé à la chute de l'effet rhizosphérique observé avec l'échantillon du sol fertile.

Le sol abrite une grande variété de microorganismes. Les bactéries sont spécialement présentes en quantité très élevées par rapport aux autres microorganismes (Gray et Williams, 1971). Dans la portion de surface de sol fertile non rhizosphérique (SNR) étudié, le dénombrement a atteint $2,77 \cdot 10^6$ UFC/ g de sol sec, ce qui est un peu faible par comparaison aux résultats rapportés par d'autres auteurs : $5,3 \cdot 10^7$ (Gray et Williams, 1971), ou 10^7 à 10^8 (Maier et Pepper, 2000). Sur le même milieu CSEA, Olsen et Bakken (1987) ont dénombré $2,8 \cdot 10^8$ UFC/g. Cette différence résiderait dans la qualité des sols testés. En effet, les sols analysés par ces chercheurs sont plus riches en matière organique (3 %) que le sol local (0,84%).

La séparation des bactéries adhérentes au sol est une étape critique dans l'isolement et le dénombrement. Selon Maier et Pepper (2000), la libération incomplète des bactéries à partir des particules de sol au cours de l'extraction ou leur mauvaise séparation durant l'étape de dilution sont parmi les causes de la faible récupération de la flore tellurique. La procédure d'extraction suivie au cours de la présente étude n'a sûrement pas permis une bonne récupération des bactéries.

Le nombre de colonies bactériennes isolées à partir du milieu salin est faible par rapport à celui de colonies isolées du milieu fertile. Ce nombre ($1,1 \cdot 10^5$ UFC/g) est en corrélation avec celui trouvé par Ragab (1993). Ce dernier a noté une corrélation négative entre le nombre de la flore totale et la concentration des sels solubles dans les sols salés mais cette corrélation est positive avec le taux de matière organique. Les numérations effectuées par le même auteur, atteignent $0,5 \cdot 10^5$ bactéries/g quand la concentration en sel est voisine de 8%. Dans notre cas, le sol salé prélevé était de nature friable, les particules séparées n'offrent pas un habitat convenable aux bactéries.

Dans cette étude, les bactéries endophytes du blé et de l'halophyte sont en nombre limité par rapport à celui des bactéries du sol et de la rhizosphère ($1,8 \cdot 10^5$ et $2,5 \cdot 10^3$ UFC/g de poids frais, respectivement). La communauté bactérienne endophyte peut varier qualitativement et quantitativement selon l'espèce de la plante et ses divers stades de croissance (Hallmann *et al.*, 1997). Gagné et collaborateurs (1987), ont pu compter $6 \cdot 10^3$ UFC /g de xylème de luzerne alors que dans les plantules de pins, 10^5 UFC/ g de tissu racinaire ont été isolées (Shishido *et al.*, 1995). Seulement 10% de la population bactérienne de *Alcaligenes faecalis* se trouvant à la surface racinaire du riz pénètrent le tissu, selon You et Zhou (1995).

En outre, les facteurs biotiques et abiotiques influencent les communautés bactériennes endophytes (Hallman *et al.*, 1997). Ces facteurs induisent une cascade de réactions conduisant à la synthèse de plusieurs enzymes, protéines et quelques fois des métabolites et des signaux

de stress, ce qui peut créer un environnement hostile pour les bactéries, expliquant ainsi la faible diversité des espèces trouvées dans les plantes stressées (Sessitch *et al.*, 2002).

3- 3 Dénombrement des *Pseudomonas* fluorescents spp.

Les *Pseudomonas* spp fluorescents récupérés sur milieux sélectifs S₁ et King B représentent un taux très faible par rapport à la flore totale isolée sur CSEA quel que soit l'échantillon testé. Ces taux sont extrêmement faibles en comparaison avec ceux rapportés par Iswandi et collaborateurs (1987): 23% de la population bactérienne totale sont obtenus avec la rhizosphère du blé, 32,9 et 58,9 % avec celle du maïs et de l'orge, respectivement. Sur milieu S₁, le groupe des *Pseudomonas* constitue moins de 0,5% de la flore bactérienne totale, ce taux baisse fortement dans la rhizoplane et l'endosphère (Miller *et al.*, 1990). Ces résultats, indiquant une présence faible du groupe des pseudomonads fluorescents dans les différents échantillons, pourraient être liés à la sélectivité relative des milieux utilisés, spécialement le milieu S₁ (Miller *et al.*, 1990). Le nombre serait fortement relié à l'âge de la plante. Dans la rhizosphère du blé, par exemple, il chute considérablement au cours de la croissance végétale (Miller *et al.*, 1990). Cependant, le calcul de ce pourcentage dépend largement du milieu choisi pour l'isolement de la flore totale.

L'endosphère de l'halophyte *A. halimus* constitue une exception « surprenante ». Le pourcentage de *Pseudomonas* fluorescents spp. ayant pu traverser la barrière pariétale de la plante est de 18 et 21,2 sur milieu King B et S₁, respectivement. En effet, ce genre figure parmi les bactéries endophytes présentes dans plusieurs espèces végétales (Hallmann *et al.*, 1997 ; Sessitch *et al.*, 2002). Sa présence était confirmée dans l'endosphère de l'halophyte *Prosopis strombulifera* où il représente 44,5% des isolats à Gram⁻ (Verónica *et al.*, 2009). Ces bactéries endophytes augmenteraient la résistance aux différentes contraintes abiotiques dont le stress osmotique (Sziderics *et al.*, 2007).

Le milieu S₁ utilisé pour l'isolement des *Pseudomonas* fluorescents est très sélectif ; le saccharose et le glycérol qu'il contient provoquent un stress osmotique sélectif pour les *Pseudomonas* spp fluorescents. Du fait de sa composition spéciale, ce milieu (S₁) permet la récupération de 82,5% des phénotypes fluorescents à partir du sol (Gould *et al.*, 1985).

Le milieu King B favorise la croissance d'autres bactéries à Gram⁻ spécialement les entérobactéries. La non sélectivité du King B est bien connue ; quelques bactéries isolées sur ce milieu peuvent donner des réactions fluorescentes faiblement définies et plusieurs bactéries à Gram⁻, sont fermentatives (Miller *et al.*, 1990). Quel que soit l'échantillon testé au cours du

présent travail, les numérations sur les 2 milieux fournissent des résultats similaires. De plus, elles concordent avec celles obtenues par Miller *et al.* (1989).

3-4 Tests d'identification

Un nombre important de bactéries isolées sur milieu CSEA est constitué par des bacilles à Gram⁺ sporulés. Selon les auteurs, le groupe de *Bacillus* représente parfois 7 à 67% des isolats du sol (Coyne, 1999), ou 2-10% des bactéries cultivables (Maier et Pepper, 2000). En se référant aux méthodes de biologie moléculaire, Garbeva *et al.* (2003) rapportent une dominance allant jusqu'à 95% de bactéries à Gram⁺, présumées être des *Bacillus*, isolées de différents types de sol. Brons et Van Elsas (2008), en analysant un sol de prairie annoncent que 76% à 86% des séquences appartenant au phylum des firmicutes sont des *Bacillus*. Dans la rhizosphère de l'orge, par exemple, les *Bacillus* sont majoritaires (Normander et Prosser, 2000). La sporulation de ce genre bactérien favorise la survie dans des environnements très divers et la résistance aux stress environnementaux.

Les formes mycéliennes à Gram⁺ sont largement présentées et pourraient appartenir aux actinomycètes. Ces derniers sont généralement les seconds groupes les plus abondants dans les sols (Coyne, 1999 ; Duineveld *et al.*, 2001). Ils constituent 10 à 50 % de la population microbienne totale (10^5 à 10^8 propagules /g de sol) (Coyne, 1999). Dans un sol non rhizosphérique, ils peuvent représenter 5 à 9 % des bactéries et 7% dans la rhizosphère du blé. Leur nombre est 10 fois plus élevé que celui du groupe *Pseudomonas* (Miller *et al.*, 1989). Ils sont essentiellement isolés des sols arides et à pH élevé (Coyne, 1999 ; Hunter-Cevera et Belt, 1999 ; Maier et Pepper, 2000).

L'identification des isolats récupérés des milieux sélectifs King B et S₁ sur la base de leur fluorescence a mené à l'élimination d'un bon nombre de bactéries manifestant une coloration de Gram⁺. Seuls les isolats présentant un nombre satisfaisant de critères conformes avec ceux décrits dans le Bergey's (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9^{ème} édition) sont maintenus pour des tests ultérieurs.

4- Conclusion

Les techniques classiques de dénombrement adoptées dans cette étude permettent de récupérer seulement une petite proportion des populations bactériennes à partir du sol ou de la rhizosphère (Smalla *et al.*, 2001). Elles mettent en évidence les bactéries cultivables (0,1 à 10% des bactéries présentes dans la rhizosphère, par exemple) (Duineveld *et al.*, 2001). De plus, les organismes viables peuvent devenir non cultivables à cause du stress qui leur est

imposé au cours de l'extraction et les processus de dilution (Josephson *et al.*, 2000). Enfin, la perte de la capacité de former des colonies est un artefact expérimental causé par l'exposition des bactéries à un stress oxydatif sur les boîtes (Mascher *et al.*, 2002).

Le choix du milieu pour le dénombrement est crucial pour la détermination du résultat (Olsen et Bakken, 1987). Aucun milieu simple n'est convenable pour une sélection de toutes les bactéries du sol (Miller *et al.*, 1990 ; Josephson *et al.*, 2000). De plus, l'incorporation d'extraits naturels et de paramètres biophysiques environnementaux dans le milieu (extrait du sol) et le diluant ayant servi dans l'étalement de l'échantillon (tampon phosphate) peuvent affecter le nombre et la diversité des bactéries isolées au laboratoire (Hunter- Cevera et Belt, 1999).

La température d'incubation choisie permet une croissance sélective d'un groupe bien déterminé de bactéries (telluriques ou endophytiques). L'incubation à des basses températures, par exemple, favorise la récupération des bactéries à croissance lente (Miller *et al.*, 1990).

Tous les inconvénients des méthodes classiques de dénombrement sur milieu solide sont évités par l'analyse de l'ADN directement extrait de la rhizosphère ou du sol (Smalla *et al.*, 2001) ou par les méthodes microscopiques actuellement recommandées (Bakken et Olsen, 1987).

Chapitre II

Activités promotrices de la croissance végétale (PGPR)

Le choix d'une ou plusieurs souches pouvant servir d'inocula aux semences de blé en vue de l'amélioration de la croissance, impose des tests préliminaires des activités PGPR. Ces tests sont réalisés en triplicata sur des isolats des sols : fertile et salin, de la rhizosphère du blé et de l'endosphère de l'halophyte et sur une souche de référence : *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Celle-ci fut isolée pour la première fois de la rhizosphère de tabac située dans un sol résistant à la maladie de la pourriture des racines en Suisse (Keel et Défago, 1997). Elle nous a été aimablement fournie par le Professeur Défago (Institute of plant sciences, Zürich, Zwitzerland).

1- Matériel et méthodes

1-1 Pouvoir phytostimulant : production de l'acide indole acétique (AIA)

Un volume de 100 µl de chaque isolat est cultivé sur 10 ml du milieu liquide L.B additionné de tryptophane (5 g/l). Après incubation (48 h / 30°C), les solutions bactériennes sont centrifugées (5000 rpm/20 mn). L'estimation de la quantité d'AIA dans le surnageant est réalisée par dosage colorimétrique (Lopper et Schroth, 1968). Un volume de 1 ml de chaque surnageant est mélangé à 2 ml de la solution de Salkowski (annexe 8). L'apparition d'une couleur rouge indique la présence d'AIA (Gordon et Weber, 1951). La densité optique est mesurée à 530 nm après une durée d'incubation de 30 mn (T° ambiante, obscurité). La quantité d'AIA est alors déduite à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec une solution standard d'AIA (Fluka).

1-2 Pouvoir biofertilisant

1-2-1 Production de sidérophores

a- Sur milieu solide

La production de sidérophores par les isolats est mise en évidence sur l'Agar au Chrome Azurol (CAS) (Schwyn et Neilands, 1987) (Annexe 9). Pour ce faire, le milieu King B est ensemencé en spots de 5 µl d'une culture fraîche de chaque isolat. Après incubation (28°C/24h), le milieu est recouvert de 15 ml de la gélose au CAS (à 45°C). Après quelques heures de contact, les bactéries élaborant des sidérophores forment un halo orange sur le milieu bleu-vert (Schwyn et Neilands, 1987 ; Sahu et Sindhu, 2011). Le diamètre de l'halo de production

de sidérophores est évalué en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total (halo+ colonie).

b- Sur milieu liquide

L'analyse qualitative est effectuée selon la méthode décrite par Payne (1994) sur milieu liquide à l'acide succinique (Succinic Medium : SM) (Annexe 10) (Meyer et Abdallah, 1978) inoculé avec 100 µl d'une culture de chaque bactérie et incubé (30°C/ 48 h). Après centrifugation des cultures (5000 rpm/ 20 mn), 500 µl de chaque surnageant sont additionnés de 500 µl de la solution CAS et incubés (30 mn, T° ambiante et à l'obscurité). La couleur change du bleu vers l'orange selon le taux de production des sidérophores. La densité optique du complexe formé est mesurée à 630 nm contre un blanc contenant 0,5 ml de milieu non inoculé additionné de 0,5 ml de la solution CAS. Le taux de sidérophores élaboré est exprimé en pourcentage selon la formule proposée par Pal et Gorkane (2010) :

$$\% \text{ unités sidérophores} = \frac{Ar-As}{Ar} \times 100.$$

Où : Ar est l'absorbance du blanc à 630 nm

As est l'absorbance de l'échantillon à 6300 nm.

1-2-2 Solubilisation des phosphates

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate inorganique tricalcique [Ca₃(PO₄)₂] est testée sur milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's Phosphate) (Annexe 11) selon la méthode de Nautiyal (1999). Étant donné que certains microorganismes peuvent solubiliser le phosphore en milieu liquide, mais non sur milieu solide, les deux milieux sont par conséquent utilisés (Nautiyal, 1999).

a- Sur milieu solide

Un spot de 5 µl de chaque suspension bactérienne est déposé sur le milieu NBRIP. Le diamètre total (diamètre du halo de solubilisation du phosphate + diamètre de la colonie) pour chaque souche est mesuré après une d'incubation (28°C/ 10 j). Le diamètre de l'halo de solubilisation est calculé en soustrayant le diamètre des colonies du diamètre total.

b- Sur milieu liquide

Une estimation quantitative de la solubilisation des phosphates sur milieu liquide est réalisée. 10 ml du milieu liquide NBRIP sont inoculés avec 100 µl d'une culture fraîche de chaque isolat. Les cultures ainsi préparées sont incubées (28°C/ 10 j) sous agitation puis

récupérées par centrifugation (1000 rpm/ 20 mn). Le phosphate présent dans le surnageant est alors estimé par la méthode colorimétrique de Olsen et Sommers (1982). 1 ml du surnageant est additionné de 10 ml de molybdate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4]$ (12 mM) et de 1ml de chlorure d'étain (SnCl_2) (5 mM). Enfin, le volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance du composé bleu obtenu est mesurée à 620 nm, exprimant ainsi la concentration du phosphate soluble (pentaphosphate : P_2O_5) dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de KH_2PO_4 (Sigma).

1-2-3 Production d'ammoniac

La production d'ammoniac (NH_3) est mise en évidence qualitativement selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). 100 μl de chaque isolat sont mis en culture dans des tubes contenant 10 ml d'eau peptonée. Après incubation (30°C/ 96 h), 500 μl de réactif de Nessler (Fluka) sont ajoutés. La production d'ammoniac est alors révélée par l'apparition d'une couleur jaune ou orange.

1- 3 Rôle de biocontrôle

Les bactéries promotrices de la croissance végétale contribuent efficacement à l'amélioration de la santé des plantes par divers mécanismes telles que la production d'antibiotiques ou d'acide cyanhydrique, ou par compétition avec les phytopatogènes pour l'espace ou les nutriments.

1-3-1 Production d'acide cyanhydrique

La méthode décrite par Castric (1975) modifiée par Bakker et Shippers (1987) est adoptée afin d'évaluer la capacité des souches de *Pseudomonas* fluorescents à produire de l'acide cyanhydrique (HCN). Les cultures bactériennes sont ensemencées sur gélose Trypticase soja (Fluka) (Annexe 13) additionnée de glycine à raison de 4,4 g/l. Sur le couvercle de chaque boîte de Pétri ensemencée, un disque de papier Whatman (9 cm de diamètre), préalablement immergé dans une solution contenant 2% de carbonate de sodium (Na_2CO_3) et 5% d'acide picrique, est déposé. Les boîtes sont alors scellées avec du papier Parafilm et incubées (28°C/ 4 j), le suivi de changement de la couleur étant effectué quotidiennement. En effet, le virage de la couleur du papier vers le jaune à l'orange atteste d'un dégagement d'HCN volatile par les souches testées.

1-3-2 Activité antifongique

Les isolats sont testés pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis de 2 champignons : *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata*, isolés par l'équipe de phytopathologie du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Université de Sétif). Un cylindre de 3 mm de diamètre de la culture fraîche (6 jours) de chaque champignon est prélevé et déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe 12) préalablement inoculée en spots avec 5 µl de la culture bactérienne à tester (à une distance approximative de 3 cm de la souche fongique). Le témoin étant inoculé avec le champignon seul. Après incubation des boîtes inoculées à 25°C ou 28°C (selon la température optimale de croissance de chaque espèce fongique) pendant 10 jours, le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule établie par Kumar *et al.*, (2002) :

$$I = [(T-C)/T] \times 100.$$

Où : I : pourcentage d'inhibition du champignon (%)

T : diamètre moyen du *mycélium* (mm)

C : diamètre moyen du *mycélium* dans les boîtes inoculées par les bactéries.

1-3-3 Hydrolyse de la caséine

La présence d'une protéase dégradant la caséine est testée. Ainsi, la gélose nutritive stérile en surinfusion est additionnée de lait écrémé stérile à 50% (V/V) (Marchal *et al.*, 1982). Après inoculation des milieux à l'aide d'un spot de chaque isolat et incubation (28°C/ 48 h), les zones de précipitation de la caséine autour des colonies sont considérées comme la conséquence d'une activité hydrolytique des souches et sont alors mesurées (Allu *et al.*, 2014).

1-4 Analyses statistiques des données

Les données relatives à la production d'AIA, de sidérophores, à la solubilisation des phosphates et à l'activité antifongique sont ensuite soumises à une analyse de la variance par les procédures de One- way ANOVA (test de Turkey) à une valeur de $P \leq 0,05$ en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA).

1-5 Identification moléculaires des isolats

Cette étape cruciale du travail a concerné seulement les souches présentant des activités importantes et une grande similitude avec les espèces fluorescents de *Pseudomonas* décrites par le Bergey's (1984). Il s'agit de 4 isolats : 3 de la rhizosphère de blé et 1 de l'endosphère de l'halophyte *A. halimus*.

L'identification génétique est conduite au Laboratoire de Microbiologie et Molécules Bioactives, Université El-Manar Tunis-Tunisie. Avant toute manipulation, les isolats sont purifiés sur milieu LB. Les cultures pures et jeunes feront l'objet des étapes d'identification moléculaire suivantes.

1-5-1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire. L'objectif des méthodes d'extraction est l'obtention d'acides nucléiques purifiés servant de matrices à amplifier. Les méthodes d'extraction font appel à trois étapes : une lyse par un détergent, une incubation avec une protéase et enfin une précipitation des acides nucléiques (Meade *et al.*, 1982).

La méthode d'extraction et de purification au Cétyltriméthylammonium Bromure (CTAB) fut élaborée pour la première fois par Murray et Thompson en 1980. Le protocole a été publié ultérieurement par Wagner et ses collègues en 1987. En effet, le détergent ionique CTAB lyse les cellules et forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans un milieu à faible teneur en sels. Les polysaccharides, les composés phénoliques et les autres contaminants restent alors dans le liquide surnageant et peuvent être, par conséquent, lavés. Le complexe d'ADN est solubilisé en augmentant la concentration en sels puis précipité avec de l'éthanol ou de l'isopropanol.

a- Lyse de la membrane

La première étape de l'extraction d'ADN est la rupture de la cellule et de la membrane nucléaire. Pour cela, l'échantillon est traité en premier lieu avec un tampon d'extraction contenant de l'EDTA, du Tris/HCl et du CTAB

Quelques colonies de cultures bactériennes jeunes et pures sont solubilisées dans 740 µl de tampon Tris-EDTA (TE) (10 mM de Tris-HCl et 1 mM EDTA-Na₂; pH 8). La biomasse est alors traitée, après homogénéisation, avec 20 µl de lysosme (100 mg/ml) puis incubée à 5 mn à température ambiante. La préparation est alors additionnée de 40 µl de SDS (10%) et 8 µl de protéinase K (10 mg/ml) puis réincubée (37°C/ 1 h). Un volume de 100 µl de NaCl (5 M) est ajouté, l'ensemble est homogénéisé par une forte agitation. Après addition du CTAB (10% CTAB dans 0,7 M NaCl) la préparation est incubée (65°C/ 10 mn).

b- Extraction

Cette phase vise la séparation des polysaccharides (PS), des composés phénoliques, des protéines dénaturées et des lysats cellulaires (dissous dans la solution aqueuse) du complexe acide nucléique/ CTAB. Les protéines dénaturées et les PS sont éliminés par des extractions respectives au chloroforme/ alcool isoamylique (24V/ 1V) et au phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (25/ 24/ 1 vol/ vol). Une centrifugation (13000 rpm, 10 mn, T° ambiante) sépare 2 phases : aqueuse et organique. Ainsi, le complexe d'acide nucléique, se trouvant dans la partie aqueuse, est purifié.

c- Précipitation

Durant cette étape finale, l'acide nucléique est libéré du détergent par précipitation ; le détergent étant élué puisque soluble dans de l'alcool. Pour cela, la phase aqueuse est additionnée de 0,6 de son volume par de l'isopropanol (-20 °C) puis incubée à température ambiante pendant 30 mn. Après centrifugation (13000 rpm /30 mn, le précipité d'ADN est lavé avec une solution d'éthanol (70%) en vue d'une élution supplémentaire des sels résiduels puis recentrifugé pendant 5 mn et enfin séché.

Le culot séché est récupéré dans 20 µl de la solution TE et conservé à -20°C.

1-5-2 Quantification de l'ADN

Le matériel génétique peut être quantifié, sa qualité et sa pureté peuvent être estimées en déterminant la quantité de rayons UV absorbés par les bases azotées. 1µl de chaque surnageant est déposé dans une cellule d'un spectrophotomètre UV (Nanodrop Thermo Scientific Applied Biosystems), la lecture est réalisée par un balayage de 230 à 280 nm. La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée à 260 nm. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un ratio : 260/230. Dans le cas d'échantillons purs, ce ratio est voisin de 2,2. Tout en sachant que les protéines absorbent à 280 nm, le ratio A260/A280 servira à estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8.

1-5-3 Amplification de l'ADN par PCR

La quantité d'ADN récupérée lors de l'extraction est trop faible pour être considérée comme un échantillonnage représentatif. Afin de comparer ou d'étudier l'ADN extrait, celui-ci doit être amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) mise au point par Mullis et collaborateurs en 1986 (Huybens *et al.*, 2009). L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de 2 amorces oligonucléotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires qui délimitent la partie d'ADN à amplifier.

1-5-4 Amplification des séquences de l'ADN ribosomal nucléaire

Le gène 16S rDNA est de loin le plus employé dans l'étude de populations bactériennes (Wang *et al.*, 2007). Étant donné que cette sous-unité contient des régions extrêmement conservées codant pour des ARN ribosomiques (ARNr) (Sriasta et Schlessinger, 1991), elle est généralement choisie pour l'amplification.

L'ADNr contient également des régions intergéniques. L'espace intergénique transcrit (*Internally Transcribed Spacer* ou ITS) est considéré comme conservé au niveau intra-spécifique et variable entre espèces. Il représente donc un bon marqueur pour la détection des espèces. L'amplification des séquences ITS a requis l'utilisation de 2 amorces universelles (Wheeler *et al.*, 1996) (Tab. 14).

Les amplifications par PCR ont été effectuées sur un thermocycleur automatique « Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) » dans un volume final de 25 µl. Pour amplifier un échantillon d'ADN de 5 µl, la composition du mélange réactionnel est reportée dans le tableau 15. Pour amplifier l'ADN, 35 cycles sont réalisés suivant les étapes résumées dans le tableau 16.

Pour le contrôle, un témoin négatif (mélange réactionnel sans ADN) et un témoin positif (ADN d'une souche de référence amplifiée selon le même protocole) sont utilisés dans les mêmes conditions.

1-5-5 Visualisation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse permet de séparer des particules en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Les molécules d'ADN chargées négativement sont attirées vers l'anode à travers un réseau solide non mobile (gel en agarose) (Huybens *et al.*, 2009). Ce réseau retient les molécules en fonction de leur taille, les plus petites gagnant plus rapidement l'anode que les grandes. Plus le réseau est dense, mieux les molécules de petites tailles seront séparées (Ausubel *et al.*, 1989).

Tab. 14 : Séquences et positions des amorces utilisées.

ADN	Amorces	Séquences
bactérien		
ITS 16S-23S	S-DBact-1494-S (Amorce F)	5'-GTCGTAACAAGGTAGTCACCCCC-3'
ITS 16S-23S	S-D-Bact-0035-A (Amorce R)	5'-CAAGGCATCCACCGT-3'

Tab. 15 : Composition du mélange réactionnel.

Constituants du mélange réactionnel	Amplification	Volume (µl)
Tampon de l'enzyme (100 mM Tris/HCl, pH 8,3 ; 500 mM KCl)	10x	1
MgCl ₂	25 mM	3
dNTP	25 mM	1
Amorce F	25 µM	1
Amorce R	25 µM	1
Taq polymérase	1 U	0,25
Eau bi-distillée stérile		q.s.p 25 µl

Tab. 16 : Programmes et cycles d'amplification des ITS – PCR

	Dénaturation initiale	dénaturation	Hybridation	Élongation	Élongation finale
Température (°C)	94	94	58	72	72
Temps	5 mn	45 s	1 mn	2 mn	7
Nombre de cycles	1	25	25	25	1

Les gels d'agarose permettent la séparation de fragments d'ADN relativement de grandes tailles. Les molécules d'ADN chargées négativement sont soumises à un courant électrique qui les fait migrer dans le gel. En fonction de la concentration de celui-ci en agarose, certaines tailles de fragment seront mieux séparées que d'autres (Huybens *et al.*, 2009).

Les électrophorèses de visualisation des produits d'amplification par PCR sont menées sur des gels d'agarose à 1,5 % (p/v) préparé dans le tampon Tris borate EDTA (TBE) 0,5X (0,9 M de Tri base ; 0,9 M d'acide borique et 0,02 M d'EDTA-Na₂ ; pH= 8). La migration est menée pendant 35 mn à 85 volts. Après récupération de la plaque, les bandes sont visualisées sous UV suite à une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (1 µg / ml).

1-5-6- Séquençage

La méthode de Sanger (1977) suivie pour le séquençage des fragments d'ADNr est un moyen de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. Elle repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase I (dépourvue d'activités exonucléasiques 5'→ 3' et 3' → 5'), d'un oligonucléotide complémentaire de la partie d'ADN à identifier (amorce), d'un mélange de dNTP et de ddNTP (di-désox-yrribonucléoside triphosphate) marqués au Big -Dye 3.1 et dont l'incorporation arrête l'élongation. Le mélange réactionnel contient respectivement et dans l'ordre les éléments tels décrits dans le tableau 17. Une fois préparé, il est transféré dans une plaque de réaction soumise au séquençage selon les conditions citées dans le tableau 18. Après refroidissement à 4°C, l'ADN obtenu est précipité par un mélange d'éthanol (96%) et l'acétate de sodium (5M), séché et récupéré dans 10 µl du formamide ultra-pure. Les fragments d'ADN sont résolus par électrophorèse capillaire « ABI PrismTM 3130 » et analysés avec le programme « Sequencing Analysis abi 5.3.1 ».

Tab. 17 : Composition du mélange réactionnel pour le séquençage

Constituants du mélange réactionnel	Quantité en µl
1. Big -Dye (Ampli taq DNA polymérase FS + ddNTP)	1,5
2. Tampon de réaction 2,5X (200 mM Tris HCL ; pH 9, 5 mM MgCl ₂)	1
3. Amorçe S-D-bact-0008-S (25 µM)	2
4. ADN matrice	5
5. Eau ultrapure	qsp 20 µl

Tab. 18 : Cycles de dénaturation-hybridation-élongation lors du séquençage

	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation
Température (°C)	96	96	50	60
Temps	1 mn	10 s	5 s	4 mn
Nombre de cycles	1	25	25	

1-5-7 Traitement des résultats

L'identification des souches est effectuée à l'aide du programme BLASTn après comparaison avec des souches de références déposées dans GenBank et disponibles dans la base des données accessibles sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les résultats sont alors exprimés en pourcentage de similitude de la souche à identifier avec les espèces apparentées et sous la forme d'arbres phylogénétiques qui montrent la position taxonomique de chaque isolat. Ces derniers sont obtenus par la méthode Neighbor-Joining (Saito et Nei, 1987) en utilisant la version MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Les séquences de nucléotides obtenues sont soumises à la GenBank bénéficiant ainsi de numéros d'accèsion.

2- Résultats

2- 1 Production d'AIA

La mise en évidence de la production d'AIA est réalisée sur milieu LB + tryptophane. Les souches testées élaborent de l'AIA (Fig. 20), mais à des taux variables. La plus grande

quantité appartient à la souche de référence *P. fluorescens* CHA0 : 88,37 µg/ml. L'analyse de la variance confirme cette observation, marquant une différence très significative ($P < 0,01$) entre la quantité produite par cette souche et tous les autres isolats quelle que soit leur provenance. La souche locale RB9 semble de loin être la plus performante avec une valeur de 58,63 µg/ml. Cependant l'analyse de la variance révèle une différence non significative avec les isolats SF7, SF9, SF12 et RB10. Les composants de l'écosystème salin analysés fournissent des souches faiblement productrices. En effet, les quantités d'AIA élaborées par les isolats du sol sont compris entre 25 et 30,98 µg/ml, ceux des isolats de la rhizosphère de *A. halimus* sont de 32 µg/ml. Les endophytes produisent 28,79 à 36,88 µg/ml. Toutes ces valeurs ne présentent aucune différence significative après analyse de la variance. Il est à remarquer, enfin, que les isolats appartenant aux composants de l'écosystème fertile sont plus actifs quant à la synthèse de l'AIA que ceux de l'écosystème salin.

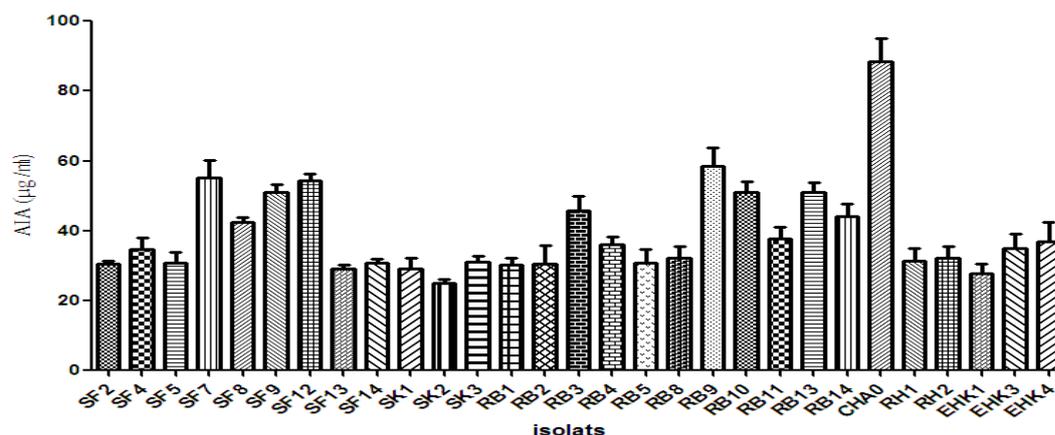


Fig. 20 : Production d'AIA par les *Pseudomonas fluorescens* spp.

SF : sol fertile ; **RB** : rhizosphère du blé ; **SK** : Sol salin isolé sur King B ; **RH** : rhizosphère de l'halophyte ; **EHK** : endosphère de l'halophyte (King B)

2-2 Production de sidérophores

Toutes les souches de *Pseudomonas fluorescens* testées produisent des sidérophores, sur le milieu solide CAS comme l'atteste l'apparition d'un halo orange autour des colonies. Son diamètre diffère d'une souche à une autre, il est maximal avec *P. fluorescens* RB13 et *P. aeruginosa* EH4 (20 mm et 19 mm) respectivement, suivi de *P. aeruginosa* RB5 (16 mm). *P. putida* AF2 et *P. fluorescens* CHA0 donnent un halo de même valeur (12 mm).

Le milieu liquide permet une évaluation précise du taux de sidérophores produit par les bactéries. Après incubation du milieu liquide SM (T° ambiante, obscurité/ 30 mn), la couleur du complexe surnageant bactérien- solution CAS vire du bleu à l'orange selon le taux de sidérophores produit par chaque souche. Les résultats obtenus (Fig. 21) permettent de classer les isolats bactériens testés en 3 groupes :

- Groupe produisant des taux relativement élevés ; l'analyse de la variance montre une différence non significative entre ses différents constituants. Les taux de production sont compris entre 43 et 51%, assurés entre autres par RB4, RB9 et RB14. Les souches extraites de l'endosphère de *A. halimus* font partie également de ce groupe avec 45 à 46 % de sidérophores.
- Groupe moyennement producteur, dont le taux de synthèse se situe entre 35% (avec une différence très significative : $P \leq 0.001$ avec le 1er groupe) et 42% (présentant une différence significative : $P \leq 0.01$). Dans ce groupe, se trouve une souche isolée du sol salin (SK1) et d'autres de la rhizosphère du blé, RB5, SF5 et RF9, par exemple.
- Un dernier groupe, minime, est représenté par l'isolat SK2, isolé de l'endosphère de *A. halimus* avec une production de 25 %.

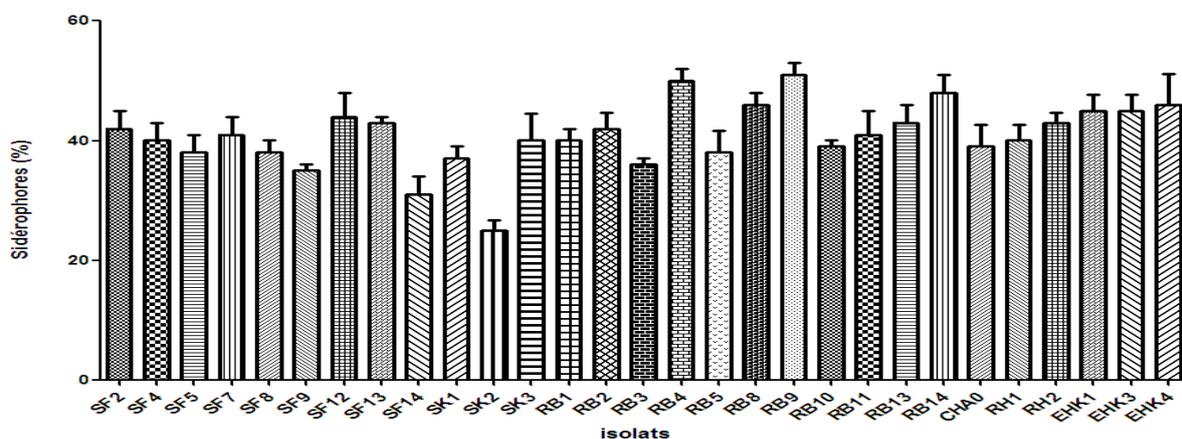


Fig. 21: Taux de production des sidérophores par les *Pseudomonas fluorescens* spp.

SF : sol fertile ; RB : rhizosphère du blé ; SK : Sol salin isolé sur King B ; RH : rhizosphère de l'halophyte ; EHK : endosphère de l'halophyte (King B).

2-3 Solubilisation des phosphates

Les souches suspectées être des *Pseudomonas fluorescens* spp. ainsi que la souche de référence *P. fluorescens* CHA0 sont testées pour leur pouvoir de solubiliser le phosphate

inorganique sur milieu solide NBRIP solide contenant du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphore. Après incubation (28°C/ 10 jours), la majorité a produit une zone claire autour de leurs colonies, traduisant ainsi une solubilisation de $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$. Le diamètre, variable selon l'espèce, atteint un maximum de 20 mm noté chez RB1, SF2 et SF5. Les autres souches manifestent une solubilisation modérée avec un diamètre allant de 10 à 14 mm. Une solubilisation très faible est notée avec les souches isolées de la rhizosphère, de l'endosphère de l'halophyte et de la souche de référence *P. fluorescens* CHA0

(Fig. 22). Cependant les isolats SF9, RB9 et EHK4 ne produisent aucun halo de solubilisation.

Le milieu NBRIP liquide permet une estimation de la quantité des phosphates solubilisés (Fig. 23). Selon leur capacité de production, les isolats sont classés en 8 groupes distincts indiqués par l'analyse de la variance :

- Le 1^{er} solubilise de grandes quantités allant de 463,98 à 513,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (SF8, SF9 et RB10).
- Le 2^{ème} est présenté par l'isolat SF4, ayant un pouvoir de solubilisation de 417,18 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Le 3^{ème} est constitué de 2 bactéries solubilisant 313,07 (RB1) et 365 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (SF5)
- Le 4^{ème} concerne RB11 avec une activité de 278,55 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Le 5^{ème} groupe englobe un bon nombre d'isolats solubilisant des quantités comprises entre 216,93 à 252,48 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Le 6^{ème} est formé d'isolats capables de solubiliser entre 145,25 et 186,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Le 7^{ème} groupe est attribué à RB2 et à la souche de référence *P. fluorescens* CHA0, avec une activité de minéralisation relativement faible : 108,45 et 110,29 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivement.
- Le 8^{ème} est constitué des isolats à faible activité (17,81 à 58,60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) s'agissant principalement des isolats du sol salin, de la rhizosphère et de l'endosphère de l'halophyte.

L'étude sur milieu liquide a permis également de relever une activité importante des souches incapables de solubiliser les phosphates sur milieu solide (estimée par l'absence d'halo).

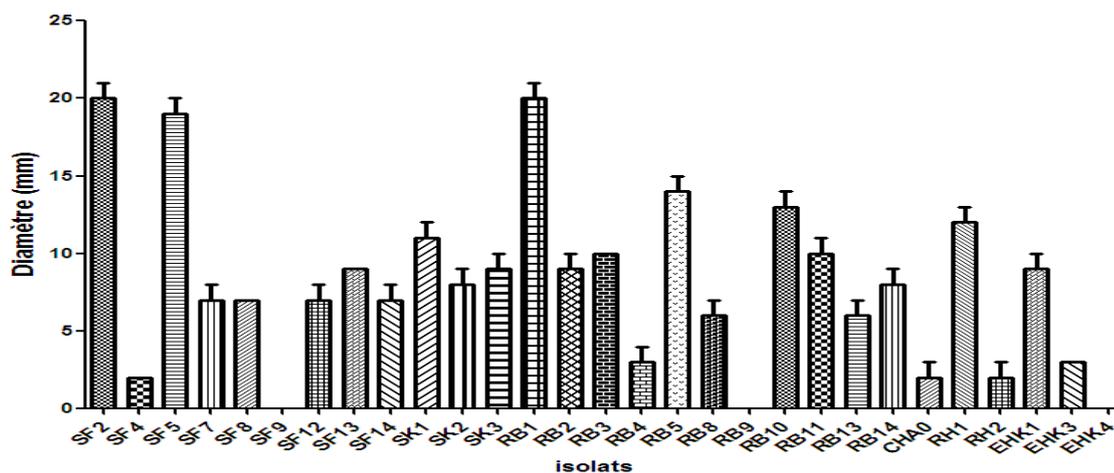


Fig. 22 : Diamètres de solubilisation des phosphates par les souches de *Pseudomonas* fluorescents

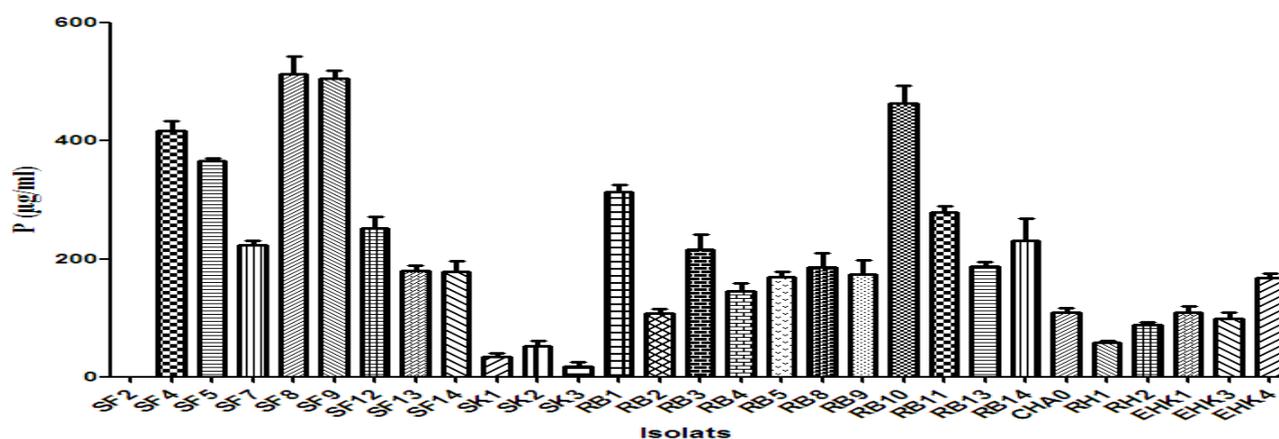


Fig. 23 : Solubilisation des phosphates sur milieu NBRIP liquide par les souches de *Pseudomonas* fluorescents

SF : sol fertile ; RB : rhizosphère du blé ; SK : Sol salin isolé sur King B ; RH : rhizosphère de l'halophyte ; EHK : Isolé à partir de l'endosphère de l'halophyte (King B).

2-4 Production d'ammoniac

Après incubation de l'eau peptonée inoculée, la production d'ammoniac est mise en évidence par addition du réactif de Nessler. L'apparition d'une couleur jaune-orange traduit une production du NH_3 , elle est variable selon les souches (Tab. 19, 20, 21). Tous les isolats du sol fertile produisent de l'ammoniac alors que 63,63% appartenant à la rhizosphère de blé ont cette capacité. Les bactéries endophytes de *A. halimus* sont également actives.

Tab. 19 : Production de NH₃ par les isolats du sol fertile

N°	SF2	SF4	SF5	SF7	SF8	SF9	SF12	SF13	SF14
NH ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 20 : Production de NH₃ par les isolats de la rhizosphère de blé et de la souche de référence *P. fluorescens* CHA0

N°	RB	CHA										
	1	2	3	4	5	8	9	10	11	13	14	0
NH ₃	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+

Tab. 21 : Production de NH₃ par les isolats de l'écosystème salin

N°	SK1	SK2	SK3	RH1	RH2	EHK1	EHK3	EHK4
NH ₃	-	-	+	+	-	+	+	+

(S : sol ; R : Rhizosphère ; E : endosphère)

+ : positif

- : négatif

2-5 Production d'acide cyanhydrique

Le virage de la couleur du papier filtre vers l'orangé foncé indique la production d'un composé volatil, l'HCN (Fig. 24). L'activité cyanogène diffère d'une souche à une autre. Elle est rapide (24 h d'incubation) et forte chez *P. fluorescens* CHA0 et l'isolat RB13. Ces dernières semblent les plus actives en production de HCN. D'autres en sont productrices après 48 h d'incubation comme RB2, RB5 ainsi que tous les isolats en provenance de l'endosphère de l'halophyte *A. halimus* (EHK1, EHK3 et EHK4). Les tableaux 22, 23 et 24 résument l'élaboration de ce gaz volatil par tous les isolats examinés.

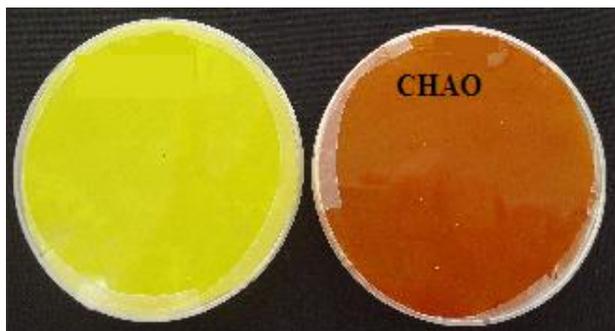


Fig. 24 : Production de HCN par la souche *P. fluorescens* CHA0

(À gauche le témoin négatif).

Tab. 22 : Production d' HCN par les isolats du sol fertile

N°	SF2	SF4	SF5	SF7	SF8	SF9	SF12	SF13	SF14
HCN	++	-	-	++	+	+	-	-	-

Tab. 23: Production d' HCN par les isolats de la rhizosphère du blé et de la souche de référence

N°	RB 1	RB 2	RB 3	RB 4	RB 5	RB 8	RB 9	RB 10	RB 11	RB 13	RB 14	CHA 0
HCN	-	++	+		++	+	-	-	-	+++	-	+++

Tab. 24 : Production d'HCN par les isolats de l'écosystème salin

N°	SK1	SK2	SK3	RH1	RH2	EHK1	EHK3	EHK4
HCN	-	-	-	+	-	++	++	++

(S : sol ; R : Rhizosphère ; E : endosphère)

+ : positif

- : négatif

2-6 Activité antifongique

Après 10 jours d'incubation à 28°C, l'activité antagoniste des souches supposées être des *Pseudomonas* spp. envers 2 champignons phytopathogènes *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum* est vérifiée. Cette action est estimée par l'observation d'une zone

d'inhibition de la croissance mycélienne autour des colonies bactériennes.

a) Quelques isolats n'ont manifesté aucune zone d'inhibition de *F. oxysporum* (RB10, RB11, RB14 et SK1). Cependant, il est fortement inhibé par quelques souches isolées du sol fertile et de la rhizosphère de blé (Fig. 25). Les isolats du sol salin ont une faible activité comparée à celle des endophytes de *A. halimus* ; le taux d'inhibition variant de 1 à 38 %.

L'analyse statistique de la variance permet de subdiviser les isolats en 4 groupes, selon leur activité (pourcentage d'inhibition) :

- Groupe à activité forte avec des taux d'inhibition allant de 35 et 38% : SF9, RB2, RB5, SF5 et SF2.
- Groupe avec des taux de 25 à 31% comprenant les isolats : RB1, SF4, SF7, SF8, SF12, SF13, SF14, RB9, EH4 et *P. fluorescens* CHA0, ne présentant aucune différence significative.
- Groupe ayant un pourcentage d'inhibition relativement faible entre 19 et 20, s'agissant des isolats : SK3, EHK1 et EHK3.
- Un seul isolat (RH2) a une activité de 15%.
- Groupe faiblement actif à l'encontre de *F. oxysporum* (10%) comprend 2 isolats de l'écosystème salin : RH1 et SK2.

b) Toutes les souches testées ont freiné le développement mycélien de *A. alternata* (Fig. 26). Le pourcentage d'inhibition de *A. alternata* varie de 3 à 27%. L'effet de *P. fluorescens* CHA0 est très marqué, avec une différence très significative ($P \leq 0.001$) par rapport à tous les autres isolats testés.

Une activité anti *Alternaria* considérable est notée avec la majorité des autres isolats même ceux isolés du sol salin et de l'endosphère.

Le comportement des isolats vis-à-vis des 2 espèces fongiques est différent. En effet, toutes les souches entravent la prolifération mycélienne de *A. alternata* quoique à des degrés différents, contrairement à *F. oxysporum* dont l'inhibition n'est pas évidente pour tous les isolats. Mis à part la souche *P. fluorescens* CHA0 et les isolats EHK1 et RH1, dotés d'un pouvoir antifongique similaire contre les 2 phytopathogènes, le reste des isolats exerce une action plus importante contre *F. oxysporum* (Fig. 27).

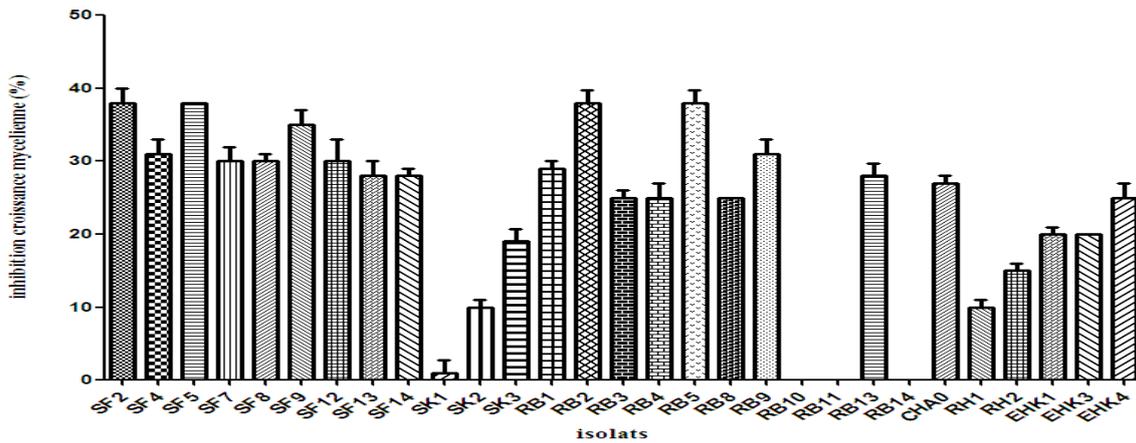


Fig. 25 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum*

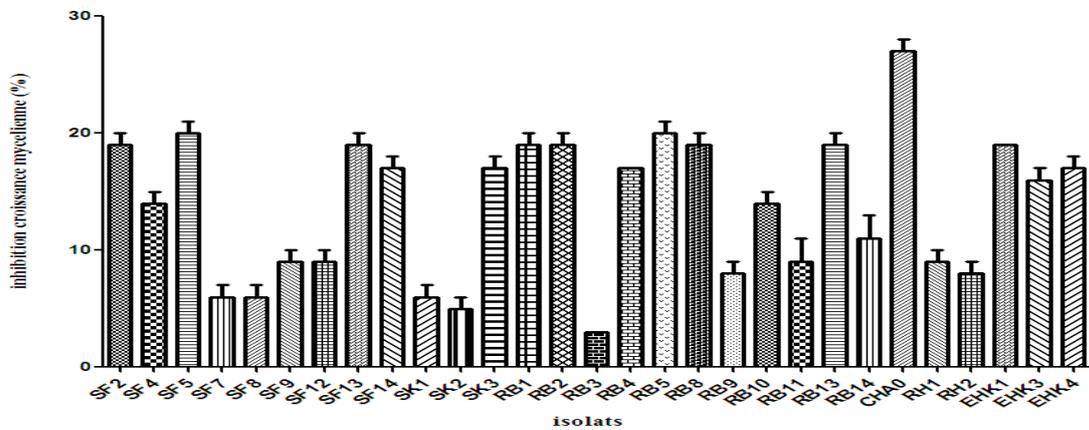


Fig. 26 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Alternaria alternata*

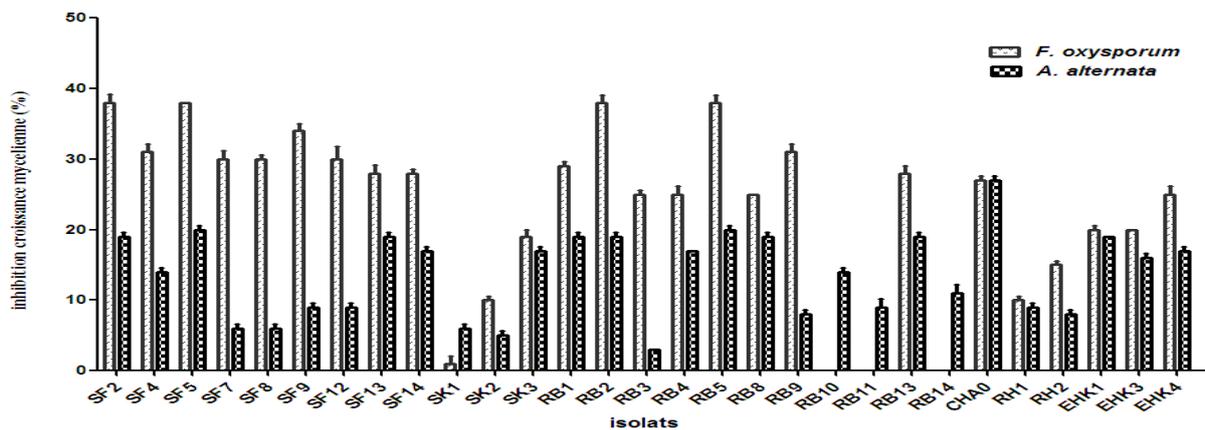


Fig. 27 : Effet inhibiteur des isolats sur *A. alternata* et *F. oxysporum*

SF : sol fertile ; RB : rhizosphère du blé ; SK : Sol salin isolé sur King B ; RH : rhizosphère de l'halophyte ; EHK : Isolé à partir de l'endosphère de l'halophyte (King B).

2-7 Protéase

Après incubation des milieux gélosés à base de lait, l'ensemble des isolats du sol fertile et de la rhizosphère du blé dégradent la caséine du lait, excepté 4 isolats SF8 et SF9, SK1 et SK2 (Fig. 28). Parmi les isolats de l'écosystème salin, ceux retirés de l'endosphère de *A. halimus* possèdent une grande capacité de dégradation à l'instar de la souche de référence *P. fluorescens* CHA0

En examinant les résultats, les isolats peuvent être divisés en 3 groupes (Fig. 29) :

- Groupe précipitant la caséine avec un diamètre ≤ 15 mm ; il représente 55,17 % des isolats testés.
- 24,13% des isolats hydrolysent la caséine avec des diamètres compris entre 10 et 13 mm.
- Une activité protéasique très faible est notée avec 10,34% d'isolats examinés.

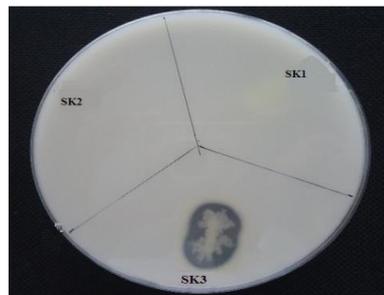


Fig. 28 : Zone de dégradation de la caséine par des isolats de sol salin

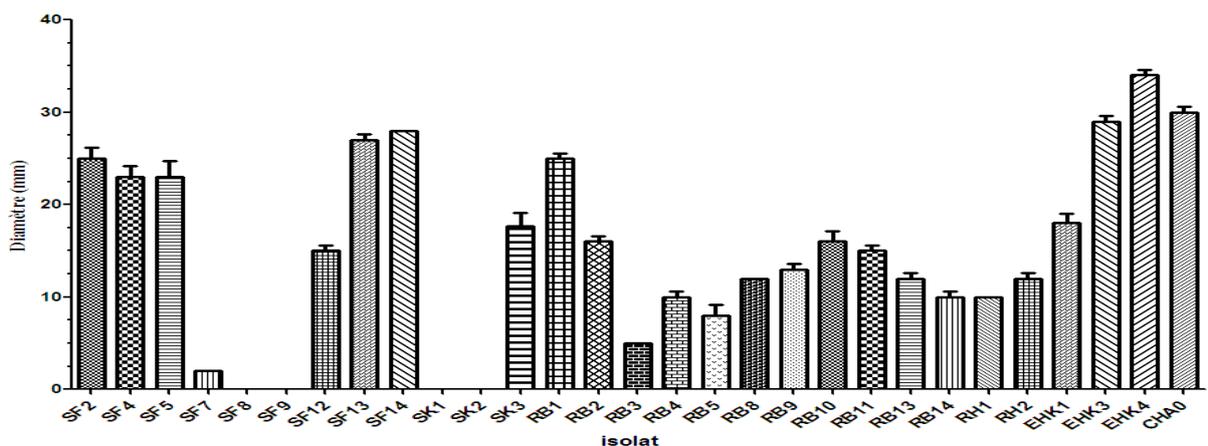


Fig. 29 : Diamètres de dégradation de la caséine

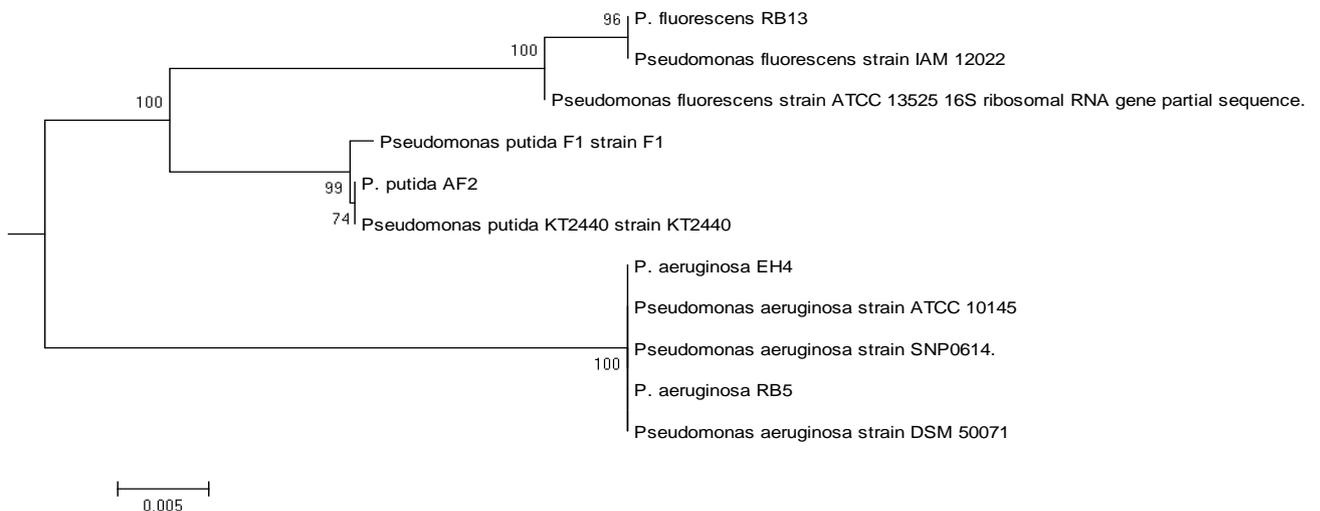
SF : sol fertile ; **RB** : rhizosphère du blé ; **SK** : Sol salin isolé sur King B ; **RH** : rhizosphère de l'halophyte ; **EHK** : Isolé à partir de l'endosphère de l'halophyte (King B).

2-8 Identification moléculaire

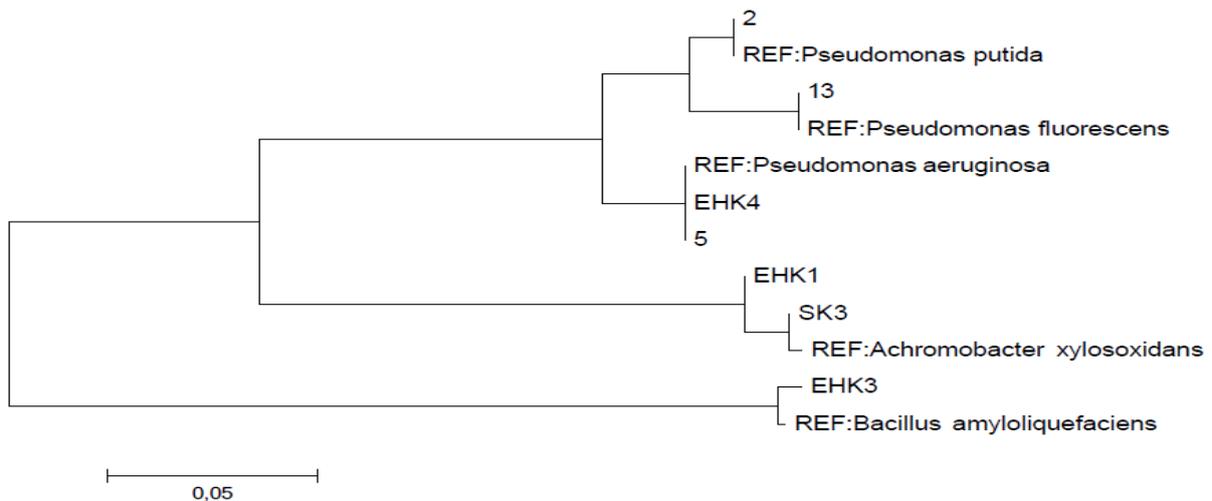
Les 4 souches sélectionnées sont identifiées par séquençage de l'ADNr 16S. L'arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S des souches choisies avec les séquences de souches proches permet de confirmer leur appartenance à une espèce. Les séquences partielles de l'ADNr 16S sont soumissionnées à Genbank. Les 4 souches sont apparentées (à 100%) aux espèces de *Pseudomonas* (Fig. 30). L'identification donne les résultats suivants :

- *Pseudomonas putida* AF2 (numéro d'accèsion KM592940),
- *P. aeruginosa* RB5 (numéro d'accèsion : KM592942),
- *P. fluorescens* RB13 (numéro d'accèsion : KM592939)
- *P. aeruginosa* EH4 (numéro d'accèsion : KM592941).

Les souches EHK1 et SK3 ont présenté une analogie à 100% avec *Achromobacter xylooxidans* et la souche EHK3 est apparentée à 100% avec *Bacillus amyloliquefaciens*.



A)



B)

Fig. 30: Arbres phylogénétiques basés sur la comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des souches isolées et de certaines souches phylogénétiquement proches.

- A) Souches de appartenant aux *Pseudomonas fluorescents* spp.
- B) Identification des souches isolées

3 – Discussion

Les phytohormones synthétisées par un bon nombre de rhizobactéries participent efficacement à l'élongation et la croissance des plantes (Patten et Glick, 2002). Les résultats obtenus indiquent une production importante d'AIA par toutes les souches testées, notamment par *P. fluorescens* CHA0 réputée pour cette activité stimulatrice de la croissance végétale (Beyler *et al.*, 1999). Les taux enregistrés dans cette étude sont supérieurs à la quantité obtenue par Goswami *et al.* (2013) avec une souche désignée *Pseudomonas* spp. souche OG (29 µg/ml) isolée à partir d'une eau marine. Cette différence serait due à l'origine du prélèvement. Ahmed *et al.* (2005) ont noté une production variable entre 7,30 et 28,9 µg/ ml avec des espèces de *Azotobacter* et entre 23,4 et 35,2 µg/ ml avec des espèces de *Pseudomonas* isolées à partir de la rhizosphère de différentes plantes. Le milieu choisi (L. B) additionné de tryptophane (5 g/ l) était adéquat pour la stimulation de la synthèse de l'AIA. En effet, selon Tien *et al.* (1979), le tryptophane est le précurseur de la production de cette phytohormone. Dans leurs expérimentations, Ahmad *et al.* (2005), Karnwal (2009) et Bharucha *et al.* (2013) ont noté une production importante d'AIA par les souches de

Pseudomonas rhizosphériques cultivées sur bouillon nutritif additionné de 2 et 5 mg/ ml de tryptophane.

La production de l'AIA par les souches de *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance végétale et l'élongation racinaire lors de la germination. Ainsi, l'inoculation de graines de plantes par des PGPR producteurs d'AIA améliore la croissance et le rendement des graines de colza et d'haricot mingo (*Vigna radiata*) (Patten et Glick, 2002), de blé (Khalid *et al.*, 2004) et de moutarde (*Brassica nigra*) (Bharucha *et al.*, 2013).

Les rhizobactéries et les endophytes de l'halophyte *A. halimus* sont capables d'élaborer des taux appréciables d'AIA en dépit de la forte salinité et participeraient à l'adaptation et à l'halotolérance de la plante.

Face à un stress les plantes produisent des auxines en quantités excessives (Yurekli *et al.*, 2004) ce qui nécessite un apport énergétique supplémentaire et conduit, par conséquence, à une réduction de la croissance. De là, l'inoculation de telles plantes stressées avec des bactéries productrices d'AIA peut améliorer la croissance des plantes en diminuant leurs demandes énergétiques (Zahir *et al.*, 2010 ; Ahmad *et al.*, 2013). L'osmotolérance de plusieurs plantes est intensifiée par ce même processus biologique tels : la tomate, le poivron, le canola, le haricot et la laitue (Glick *et al.*, 1997 ; Mayak *et al.*, 2004).

Ainsi, une amélioration de 52% de la croissance racinaire est remarquée par Egamberdieva (2009) après inoculation de blé à 100 mM/ NaCl par 3 souches de *Pseudomonas* productrices de l'AIA (5 ; 5,7 et 7,4 µg/ ml). Ces taux sont très faibles par rapport à ceux élaborés par nos souches locales, ce qui approuve leur utilisation comme inocula à des semences pour améliorer la croissance et le rendement du blé dans les sols affectés par la salinité.

L'apparition d'un halo orange autour des colonies sur milieu gélosé bleu traduit un transfert d'ions ferriques du CAS vers les sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987). Le milieu solide King B, pauvre en fer, est favorable à la mise en évidence de la production des sidérophores par les *Pseudomonas*. Le milieu SM s'est avéré convenable à la production de ces molécules en milieu liquide, cette observation est confirmée par l'étude menée par Sharma et Johri (2003). Ces derniers ont noté une faible production sur milieux complexes (King B, Trypticase-Soja et Agar Nutritif) sujets à des contaminations par le fer présent probablement dans les ingrédients constitutifs (protéoses, peptone de soja et l'extrait de viande de bœuf) (Meyer et Abdallah, 1978). De là, ils concluent que les milieux synthétiques sont mieux adaptés que les milieux complexes quant à la prévention d'un apport supplémentaire en

fer et que le taux de production de sidérophores est affecté par la source de carbone, les oligoéléments et le pouvoir tampon du milieu.

Les taux enregistrés sont relativement faibles par rapport à ceux trouvés par Sayyed *et al.* (2005) sur milieu SM, chez deux espèces : *P. fluorescens* et *P. putida* produisant 87 et 83%, respectivement. Cet écart serait dû à la différence des espèces, leur patrimoine génétique et leur origine. Les facteurs environnementaux contribuent significativement à la synthèse des sidérophores par *Pseudomonas fluorescens*, par exemple (Sharma et Johri, 2003).

Les souches testées appartiendraient aux pseudomonads connus par leur pouvoir producteur de sidérophores, tels les pyoverdines et les pseudobactines responsables d'une couleur jaune-verte et une fluorescence sous lumière UV (Sharma et Johri, 2003). Du fait de leur grande affinité pour les ions ferriques, les sidérophores chélatent le fer le rendant ainsi inaccessible pour les microorganismes phytopathogènes autour des racines (Sreedevi *et al.*, 2014). De plus, ils inhibent la germination des spores champignons pathogènes (Raaijmakers *et al.*, 1995 ; Sindhu *et al.*, 2009) tels *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* et *Phytophthora aphanidermatum* (Sahu et Sindhu, 2011).

Les sidérophores jouent également un rôle crucial dans la stimulation de la croissance végétale. Certaines plantes assimilent le fer directement à partir des sidérophores de *Pseudomonas* (Bar-Ness *et al.*, 1991).

L'exploitation des isolats sidérophore positifs en agriculture comme agents de biocontrôle, de préservation sanitaire des plantes et d'amélioration de la croissance est un créneau de recherche à développer.

L'étude qualitative a révélé un éclaircissement autour de la majorité des colonies des isolats testés ce qui traduit clairement leur capacité à utiliser le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mis à leur disposition dans le milieu de culture NBRIP. Ce même rôle est assurément accompli par ces bactéries dans leur habitat naturel. En effet, les rhizobactéries solubilisent soit le phosphore organique du sol par l'action de phosphatase, ou le phosphore inorganique par la libération d'acides organiques à faible poids moléculaire (Kloepper *et al.*, 1989) tels les acides citrique (Reys *et al.*, 2001) et gluconique (Fenice *et al.*, 2000). Les quantités solubilisées par les isolats de l'écosystème fertile et quelques isolats de l'écosystème salin (*i. e.* comprises entre 168,12 et 513,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont en accord avec celles obtenues par Chen *et al.* (2006) : *Bacillus megaterium* (140,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et *Rhodococcus erythropolis* (151,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Malgré l'incapacité de solubilisation sur milieu solide, les isolats SF9, RB9 et EHK4 possèdent cette activité en milieu liquide (506,05 ; 174,87 et 168,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), respectivement.

Ce résultat est en complète concordance avec les remarques de Nautiyal (1999). Selon ce chercheur, les acides organiques secrétés dans le but de solubiliser les phosphates circulent difficilement en milieu solide. Pour cela, le choix des souches à inoculer sur la base de la formation d'un halo de solubilisation sur milieu solide n'est pas un critère évident.

La faible production de phosphate par les isolats du sol salin, de la rhizosphère et de l'endosphère de *A. halimus* expliquerait clairement l'impact de l'environnement naturel exerçant un stress notable sur cette activité. Cependant, les quantités synthétisées (entre 17,81 et 168,45 µg/ ml) sont significativement supérieures à celles obtenues par Yasmin et Bano (2011) (entre 6 et 17,4 µg/ ml). L'effet de sel sur la solubilisation des phosphates par les *Bacillus*, étudié par Cherif- Silini *et al.* (2013) a confirmé une baisse considérable des quantités solubilisées avec l'augmentation de la concentration saline dans le milieu.

Le milieu utilisé (NBRIP) dans ses deux états (solide et liquide) est comparé avec le milieu Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948) pour mettre en évidence la solubilisation des phosphates par des espèces de *Bacillus*. Les deux milieux solides présentent au fait la même efficacité, alors que le milieu liquide NBRIP est 3 fois plus efficace que PVK (Cherif- Silini *et al.*, 2013).

Après addition du réactif de Nessler, une couleur jaune-orange apparaît, indique ainsi la production du NH₃ par la majorité des isolats testés. La production d'ammoniac est considérée comme une caractéristique importante des rhizobactéries améliorant indirectement la croissance des plantes (Joseph *et al.*, 2007) et assurant un rôle dans la signalisation lors de l'interaction plante- rhizobactéries (Becker *et al.*, 2002). Il est bien établi que l'ammoniac libéré par les bactéries accélère l'activité de la glutamine synthétase catalysant l'assimilation initiale de NH₄⁺ en glutamine (Sood *et al.*, 2002).

La majorité des isolats à Gram⁻ fluorescents produisent le gaz volatil HCN. Les espèces de *Pseudomonas* cyanogènes, telles *P. fluorescens* CHA0 sont impliquées dans la suppression de différents agents phytopathogènes, en particulier les champignons (Verma *et al.*, 1989 ; Voisard *et al.*, 1989). Des quantités de l'ordre de quelques micromoles de cyanure inhibent fortement la cytochrome c-oxydase dans la chaîne respiratoire et contribuent à la capture de certains ions métalliques en formant des complexes (Blumer et Haas, 2000). Par la synthèse de ce composé, les bactéries rhizosphériques induisent la résistance systémique des plantes aux différentes infections (Kumar *et al.*, 2012).

La différence de production entre les isolats examinés serait due à une variabilité d'expression des gènes (*hcnA*, *hcnB* et *hcnC*) (Ramette *et al.*, 2003). Cette variabilité permet de séparer les souches en deux groupes : faibles et fortes productrices. La transformation de la glycine en HCN et CO₂ est catalysée par l'enzyme HCN synthétase, considérée comme une flavoprotéine membranaire (Ramette *et al.*, 2003).

L'activité antifongique exercée par les souches, présumées appartenir aux *Pseudomonas* fluorescents, à l'encontre de *F. oxysporum* et *A. alternata* serait fortement liée à la production de substances inhibitrices de la croissance telles que les sidérophores, l'acide cyanhydrique ou divers antibiotiques dont le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) (Haas et Défago 2005). Les sidérophores produits par les isolats étudiés accentuent le déficit en fer au voisinage des colonies bactériennes, conduisant ainsi à l'inhibition de la croissance mycélienne. La production de HCN par la majorité des souches contribuerait largement à l'inhibition des 2 champignons. Yuan *et al.* (2012) ont attribué aux composés volatils produits par les bactéries une réduction importante de la croissance mycélienne et une inhibition de la germination des spores de *F. oxysporum*. Les souches bactériennes manifestent une grande activité contre *F. oxysporum*. Notz *et al.* (2002) ont montré que l'acide fusarique synthétisé par ce champignon altère le gène responsable de la synthèse du DAPG par *P. fluorescens* CHA0. L'effet antagoniste serait la conséquence de la synthèse d'autres antibiotiques tels que l'acide phénazine carboxylique, la pyrrolnitrine et la pyoluteorine (Haas et Défago, 2005). L'intensité de l'inhibition observée entre les souches s'expliquerait par la quantité et l'efficacité de l'antibiotique produit.

La majorité des isolats fluorescents examinés possèdent une protéase. Les mécanismes indirects d'action des PGPR impliquent l'élimination des microorganismes nocifs *via* la production d'antibiotiques et d'enzymes lytiques telles que la protéase, l'amylase et la catalase (Twisha et Desai, 2014). Dunne *et al.* (1997) ont démontré que la suppression du champignon phytopathogène *Pythium ultimum* dans la rhizosphère de la canne à sucre est due à l'élaboration de protéase extracellulaire par les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* W81. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 dispose d'une protéase extracellulaire dotée d'une activité antagoniste contre le nématode phytopathogène *Meloidogyne incognita* (Siddiqui *et al.*, 2005). Ainsi, les souches locales productrices de protéase, conviendraient comme agent de biocontrôle.

4- Conclusion

Sur la base de leur capacité de production de molécules stimulant la croissance végétale (solubilisation des phosphates, production d'IAA et d'ammoniac) et leurs activités de lutte biologique (élaboration de sidérophores, de HCN et un effet antifongique, certains isolats locaux, surtout ceux identifiés comme des *Pseudomonas* fluorescents spp., serviraient efficacement d'inocula au blé et amélioreraient considérablement la croissance et le rendement. Ils pourraient être exploités comme biofertilisateurs et agents de lutte biologique et constituer ainsi une alternative biologique aux engrais chimiques et fongicides synthétiques nuisibles à la santé humaine. L'utilisation des souches productrices d'AAI est une approche efficace pour atténuer le stress osmotique imposé aux plantes dans des situations bien définies. Elles pourraient être, par conséquent, exploitées pour une agriculture durable dans les sols arides et salés.

Chapitre III

Effet du stress salin sur la germination de blé inoculé en présence et en absence d'osmoprotecteurs naturels et synthétiques

Ce chapitre vise l'évaluation de l'halotolérance de souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère du blé et de l'endosphère de l'halophyte *A. halimus*, possédant un pouvoir promoteur de la croissance végétale. Ce test permettra de retenir une souche, en plus de la souche de référence (*P. fluorescens* CHA0), qui serviront d'inocula pour les semences de blé. Le but de cette étape est d'améliorer la croissance et le rendement de blé en condition de stress salin. L'apport exogène en osmoprotecteurs synthétiques (glycine bétaine et proline) et ceux naturels (extrait aqueux d'halophyte et d'algue) contribuera-t-il à surmonter le stress et rétablir la croissance des souches bactériennes et des grains de blé ?

1- Matériel et méthodes

1-1 Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur les bactéries

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) ont la capacité d'améliorer la tolérance des plantes lors de stress environnementaux en l'occurrence les contraintes osmotiques (Zahir *et al.*, 2009). L'halotolérance des souches est évaluée sur milieu minimum additionné de sel et d'osmoprotecteurs (OP) synthétiques : glycine bétaine (GB) et proline (Pro) ou naturels (extrait d'halophyte et d'algue).

1-1-1 Milieu de culture

Les tests de l'halotolérance sont conduits sur milieu liquide minimum : Glucose Mineral Medium (GMM) (Bonaterra *et al.*, 2007), ayant pour composition (g/l) :

Glucose	5
NH ₄ Cl	1
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄	2,4
NaCl	0,5
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,2
Eau distillée q. s. p	1000 ml

Le milieu est additionné ou non de NaCl à des concentrations finales : 100, 300, 500, 800, 900 et 1000 mM puis stérilisé (120°C/ 15 mn).

1-1-2 O.P synthétiques

Afin de tester leur pouvoir osmoprotecteur, la GB et la Pro stériles (filtration sur membrane Millipore 0,22 µm) sont ajoutées au milieu GMM stérile (additionné ou non de NaCl) à une concentration finale de 1 mM (Ghoul *et al.*, 1989 ; D'Souza *et al.*, 1993).

1-1-3 O.P naturels

Les extraits hydroalcooliques de 2 plantes se développant dans 2 milieux salins différents ont servi comme source d'osmoprotecteurs naturels.

- La première est une halophyte, *A. halimus*, faisant déjà l'objet de l'étude microbiologique (Chapitre I).
- La seconde est une algue verte marine, *Ulva lactuca* (Tab. 25), récoltée au niveau du Golf de Béjaia (Fig. 31). Elle nous a été aimablement fournie par le Professeur Nabti (Laboratoire de Maîtrise Des Énergies Renouvelables, Université de Béjaia).

Tab. 25 : Taxonomie de l'algue marine *Ulva lactuca* (Guiry et Guiry, 2012).

Domaine	Eukaryota
Règne	Plantae
Phylum	Chlorophyta
Classe	Ulvophyceae
Ordre	Ulvales
Famille	Ulvaceae
Genre	Ulva
Espèce	<i>Ulva lactuca</i>
Nom courant	Laitue de mer (Boisvert 1984).

U. lactuca, au même titre que de nombreuses macroalgues marines, constitue un excellent complément nutritif dans l'alimentation humaine et animale. Elles sont largement consommées dans les villes littorales et tendent à occuper une importance dans les recherches relatives aux domaines médical, diététique et cosmétique (Sîrbu *et al.*, 2006).



Fig. 31 : Photo de l'algue marine *Ulva lactuca*

1-1-4 Détection des composés osmoprotecteurs naturels

Une chromatographie sur couche mince à partir d'extraits de *A. halimus* et *U. lactuca* est réalisée pour un double objectif :

- Mettre en évidence la présence de la G.B et/ ou de la proline dans ces échantillons.
- Utiliser les extraits de ces plantes comme O.P naturels pour les bactéries, si leur présence est confirmée.

Pour ce faire, l'extrait hydro-alcoolique est préparé en premier lieu :

10 g de chaque plante bien séchée et finement broyée sont additionnées de 100 ml d'acétone. Après agitation vigoureuse, la solution est filtrée sur préfiltre. Le matériel végétal est alors récupéré dans 200 ml d'éthanol 70% et agité vigoureusement pendant 30 mn.

Les résidus solides sont ensuite éliminés par filtration sur préfiltre. L'extrait hydroalcoolique obtenu est évaporé à sec, sous vide, à 45°C (Rotavapor) puis récupéré dans 10 ml d'eau distillée.

a- Cas de la G.B

En vue de la détection de composés Dragendorff-positifs (composés ammonium), la migration est réalisée dans un système de développement isopropanol- eau (3 : 1) (Parameshwara *et al.*, 1988)

Des solutions-standard de G.B (100 mM) (Sigma) ainsi que les extraits de *A. halimus* et de *U. lactuca* sont déposés sous des volumes respectifs de 5 µl et 50 µl sur des plaques de gel de silice. La migration est limitée à un parcours de 15 cm (Parameshwara *et al.*, 1988).

Les plaques sont révélées par pulvérisation du réactif de Dragendorff (annexe 13) puis séchées à l'aide d'un sèche-cheveux. Les bétaines sont caractérisées par une coloration jaune-orangé instantanée.

b- Cas de la proline

La migration est réalisée dans le système solvant : *n*- butanol- acide acétique- eau (6 : 2 : 2 ; P/P) (Kurt, 1971). Le témoin est réalisé avec un dépôt de 5µl d'une solution-standard de proline (Sigma) (100 mM). Après migration sur un parcours de 15 cm, les plaques sont séchées et révélées par pulvérisation de ninhydrine (Sigma) puis chauffées une deuxième fois à 110°C. La proline se distingue des autres acides aminés par une coloration jaune caractéristique.

1-1-5 Étude de l'effet d'O.P naturels sur les bactéries

L'effet osmoprotecteur des extraits hydroalcooliques des 2 plantes sur la croissance bactérienne est testé. L'extrait de chaque plante est ajouté au milieu de culture GMM additionné ou non de sel à une concentration finale de 1/100^{ème} (Ghoul *et al.*, 1995). Les solutions ainsi préparées sont stérilisées : 120°C/ 20 mn.

1-1-6 Inoculation des milieux

Les souches bactériennes choisies pour tester l'effet du stress salin (concentrations croissantes de NaCl) sont : *P. putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5, *P. fluorescens* RB13, *P. aeruginosa* EH4 et la souche de référence *P. fluorescens* CHA0. Des cultures fraîches sont inoculées au milieu LB liquide (5 ml par tube) et incubées à 28°C sous agitation. Une centrifugation (3000 rpm/ 10 mn) permet de recueillir un culot (pour chaque espèce). Celui-ci est lavé trois fois avec de l'eau physiologique stérile et récupéré dans 5 ml du même diluant.

De telles suspensions dont la D.O est ajustée à 0,01- 0,05 serviront à inoculer les milieux de cultures stériles précédemment préparées, à raison de 1%. Des témoins sans sel et sans osmoprotecteurs sont réalisés à chaque fois.

L'ensemble des milieux est incubé sous agitation à 25 ± 1°C pendant 7 jours ; la croissance bactérienne dans ces conditions est mesurée à 600 nm (Mascher *et al.*, 2000). L'expérience est réalisée en triplicata.

1-2- Effet du sel et d'O.P sur la germination du blé inoculé

1-2-1 Choix et préparation des souches bactériennes

Au vu des résultats précédents, à savoir une bonne activité promotrice de la croissance végétale, une certaine halotolérance au stress salin et une réponse positive à l'apport exogène d'O.P synthétiques ou naturels, 2 souches sont retenues pour inoculer les graines de blé. Il

s'agit des souches *P. fluorescens* RB13 et *P. fluorescens* CHA0. Elles sont inoculées séparément ou ensemble.

Les suspensions bactériennes sont préparées à une charge équivalente à 10^8 UFC/ml en suivant le même protocole que précédemment, seul le lavage est réalisé avec le tampon PBS (annexe 14). Pour la préparation de l'inoculum destiné à une co-inoculation, les bouillons contenant la souche *P. fluorescens* RB13 la souche *P. fluorescens* CHA0 sont mélangés après incubation (18°C, 24 h, sous agitation). Le mélange obtenu subira les mêmes étapes (de lavage) que précédemment.

1-2-2 Choix du matériel végétal

Vu sa résistance aux stress abiotiques et l'importance de sa culture dans la région de Sétif (Chennafi *et al.*, 2011), la variété de blé dur « *Triticum durum* Desf. Var. Mohamed Ben Bachir » est choisie. Les graines sont obtenues auprès de l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) de Sétif.

1-2-3 Préparation des solutions d'O.P

Les O.P synthétiques et naturels sont évidemment testés. Pour cela, des solutions stériles contenant les différentes concentrations salines sont additionnées ou non d'OP.

Les extraits aqueux de l'halophyte *A.halimus* et de l'algue *U. lactuca* sont préparés à une concentration équivalente à 2% dans des solutions salines (0, 100, 200, 250 et 300 mM NaCl). Après agitation vigoureuse (20 min), les solutions sont stérilisées (100°C, 30 mn) afin de favoriser le relargage des substances osmoprotectrices (Ghoul, 1990) puis laissées à décanter pendant 24 h. Les surnageants sont récupérés aseptiquement, ils serviront pour les expériences ultérieures.

La GB et la Pro (stérilisées par filtration sur membrane 0,22 µm) sont ajoutées aux solutions salines à une concentration finale de 10 mM.

1-2-4 Inoculation du blé

Les graines sont décortiquées manuellement puis stérilisées en surface dans de l'éthanol 70%/ 5 mn afin d'éliminer toutes les pollutions externes d'origine fongique ou bactérienne. Après lavage avec de l'eau distillée stérile, elles sont encore immergées dans l'hypochlorite de sodium (eau de Javel : NaClO) pendant 30 min sous agitation puis rincées 5 fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace de désinfectant.

Une fois stérilisées, les graines de blé sont divisées en 4 lots :

- 1 : le témoin non inoculé, il correspond aux graines trempées dans du tampon PBS.
- 2 : graines trempées dans 50 ml de la suspension bactérienne de *P. fluorescens* RB13
- 3 : graines est immergé dans une suspension de *P. fluorescens* CHA0
- 4 : graines recouvertes d'une suspension contenant un mélange des 2 souches.

Après incubation à 28°C sous agitation/ 4 h, les graines (20/ boîte) sont déposées sur fonds de boîtes de Pétri tapissés d'une double couche de disques (9 cm de diamètre) de papier whatman (N°40)

1-2-5 Effet du stress osmotique et des O.P

Les effets de 5 concentrations salines (0, 100, 200, 250 et 300 mM), 4 O.P. (GB, Pro, extraits d'halophyte et d'algue), 3 bactéries (*P. fluorescens* RB13, CHA0 et la co-inoculation des 2) sur la germination de blé, sont testés. L'expérience est organisée en 4 groupes :

- A : il concerne les graines non inoculées stressées par le sel et ne contenant aucun O.P
- B : L'effet du sel est évalué en présence d'O.P (GB, Pro, extrait d'halophyte, extrait d'algue)
- C : L'effet combiné du stress osmotique et de l'inoculation est testé
- D : Les trois paramètres inoculation, stress salin et O.P. sont réunis

Chaque groupe est subdivisé en 5 sous-groupes correspondant aux concentrations salines prévues.

Les solutions salines additionnées ou non d'OP sont ajoutées aux boîtes de Petri contenant 20 graines de blé, à raison de 10 ml/ boîte. Les graines sont incubées à 23°C à l'obscurité. L'expérience est réalisée en triplicata. Le nombre de graines ayant germées est noté après 3, 6 et 9 jours d'incubation. La germination est constatée par l'ébauche de radicule hors des téguments de la graine dont la longueur est d'au moins de 2 mm (Côme, 1982).

1-2-6 Détermination des paramètres de croissance

Après 11 jours, le poids frais des plantules, y compris les racines et les feuilles, est déterminé après essorage soigné des plantes avec du papier absorbant afin d'éliminer l'excès d'eau.

Le poids sec des plantules est obtenu après passage à l'étuve pendant 48 h à 60 °C jusqu'à ce que le poids reste stable.

Le pourcentage de germination (G) (le 3^{ème}, le 6^{ème} et le 9^{ème} jour) est calculé comme étant :

Nombre de graines germées / Nombre de graines totales x 100

Le taux cumulé de germination est également calculé afin d'exprimer l'énergie de germination, responsable de l'épuisement des réserves de la graine. Il est calculé selon la formule proposée par Brown et Mayer (1988) et modifiée par Fowler (1991) :

$$\text{Taux cumulé de germination} = [G3/3 + G6/6 + G9/9] \times 100$$

G3, G6 et G9 sont les pourcentages de germination à 3, 6, 9 jours

1-3- Effet du sel, de la GB et de l'extrait de *U. lactuca* sur la germination du blé co-inoculé. Expérimentation *in vitro*

Les graines inoculées par un mélange de 2 bactéries (*P. fluorescens* RB13 et *P. fluorescens* CHA0) sont soumises à des contraintes osmotiques (NaCl 100 et 200 mM), en présence ou en absence des 2 OP (GB et extrait aqueux d'algue). Cette étude est motivée par les résultats encourageants de l'étape précédente.

1-3-1 Milieu de germination

Le milieu de germination (MS) proposé pour la première fois par Muraschige et Skoog (1962) a été choisi. Il est constitué principalement d'eau, d'éléments organiques (sucre : saccharose), de sels minéraux sous forme de macroéléments (N, P, K, S, Mg, Ca) et de microéléments (Fe, B, Mn, Zn, Cu, N, Co, Mo). Cette solution aqueuse est souvent légèrement solidifiée au moyen d'agar (0.7%) afin d'obtenir un milieu de consistance semi-solide.

L'assemblage de ces différents éléments nécessite une préparation des macro- et des microéléments et du Na₂Fe-EDTA séparément (Annexe 15). Le milieu est supplémenté ou non de NaCl à des concentrations finales 0, 100 ou 200 mM. Enfin, du saccharose 3% est ajouté et le pH ajusté à 5.7. Le milieu est solidifié par de l'agar à une concentration finale de 0.7%, puis réparti dans des pots à raison de 55 ml/pot. La stérilisation est assurée par un autoclavage à 120°C pendant 15 min.

La GB stérilisée par filtration est ajoutée au milieu stérile en surinfusion à une concentration finale de 5 mM.

1-3-2 Milieu MS à base d'extrait de *U. lactuca*

La préparation du milieu de germination à base d'extrait d'algue a fait l'objet de plusieurs tests afin d'en augmenter l'efficacité. Finalement, et afin de minimiser l'effet de la

réaction de Maillard résultant de l'action du sucre (saccharose) sur les protéines de *U. lactuca* qui peuvent atteindre, 10.69 g/100 g de poids sec, selon Tabarsa *et al.* (2012). Le milieu a été modifié et préparé comme suit :

- L'extrait aqueux de *U. lactuca* est préparé à 3% après une forte agitation avec chauffage sans toutefois atteindre l'ébullition afin de préserver au maximum, vitamines, sels minéraux et acides aminés naturellement présents en quantités appréciables (Tabarsa *et al.*, 2012).
- La préparation est laissée à macérer toute une nuit.
- Le surnageant est récupéré et additionné de macroéléments, microéléments (décrits ci-dessus) et de FeNa₂EDTA.

Le pH étant ajusté à 5,7 ; le milieu est solidifié par l'ajout d'agar à raison de 0.5% seulement, vu que *U. lactuca* contient déjà une quantité importante de polysaccharides soufrés pouvant atteindre 29% du poids sec (Silva *et al.*, 2013) qui confèrent une certaine viscosité au milieu (Percival et MCDowell, 1981 ; Vavilala et D'Souza, 2015).

La quantité de saccharose utilisée est légèrement réduite à 2% à cause de la richesse de l'algue en sucres ce qui pourrait engendrer un stress osmotique supplémentaire sur le blé (qui s'additionne à celui du NaCl). Afin d'éviter la possibilité de réaction de Maillard, la solution de saccharose stérile (filtration) et ajoutée au milieu MS à base d'extrait d'algue stérile en surinfusion.

1-3-3 Bactérisation du blé

Après désinfection selon la procédure décrite ci-dessus (paragraphe 1-2-4) les graines de blé sont immergées dans une solution contenant un mélange des inocula des 2 bactéries : *P. fluorescens* RB13 et *P. fluorescens* CHA0. Un temps de contact de 4 h à une température de 28°C avec agitation est suffisant pour une bonne bactérisation des graines. Le lot de témoins consiste à immerger les graines uniquement dans de l'eau distillée stérile.

1-3-4 Pré-germination

Pour initier la germination, les graines du blé co-inoculées, ou non, sont déposées, pendant 24 h à 30°C, à l'obscurité, dans des boîtes de Petri contenant le milieu proposé par Ridge et Rovira (1971) : « Seed-Germinating Agar » (Annexe 16).

1-3-5 Germination sur milieu MS

Les graines ayant germé sont transférées dans des flacons contenant 55 ml du milieu MS additionné ou non de sel, à raison d'une graine par flacon. Les flacons sont divisés en 3

groupes correspondant aux concentrations salines : 0, 100 et 200 Mm. Chaque groupe est subdivisé en 4 sous-groupes marquant le type de traitement effectué :

- 1- Témoin (0 100 et 200 mM)
- 2- Co inoculé (0, 100 et 200 mM)
- 3- Co-inoculé + GB (0, 100 et 200 mM)
- 4- Co-inoculé + Extrait d'algue (0, 100 et 200 mM)

L'expérience est reproduite en 6 réplicata et répétée 3 fois. La germination était conduite pendant 15 jours dans une chambre de croissance (phytotron), dans des conditions contrôlées diurnes/ nocturnes de 25°C et 15°C respectivement et une photopériode de 16 h d'éclairage. Les plantes sont alors récoltées et les paramètres morphologiques et biochimiques ou physiologiques sont déterminés.

1-3-6 Paramètres morphologiques

Au terme de 15 jours de stress, l'effet de la contrainte saline sur la croissance du système foliaire et racinaire est estimé par l'appréciation de la longueur et le nombre moyen des feuilles et des racines.

Les biomasses des organes aériens et racinaires sont évaluées par mesure du poids frais et sec après séchage de 72 h à 65°C.

1-3-7 Paramètres physiologiques

a- Dosage de la proline

La proline, ou acide pyrrolidine 2-carboxylique, est un bon indicateur d'une réponse positive des plantes au stress salin (Rhodes et Hanson, 1993). La quantité élaborée par le blé soumis au stress salin en présence ou en absence d'O.P a été mise en évidence initialement par la méthode Troll et Lindsley (1955) puis modifiée par Monneveux et Nemmar (1986). Dans cette méthode, le produit de la réaction proline-ninhydrine est quantifié par mesure spectrophotométrique. La proline, en se couplant avec la ninhydrine (triketohydrindène), forme un complexe coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proline dans l'échantillon.

Pour cela, 100 mg de feuilles fraîches sont découpés en petits morceaux, immergés dans de 2 ml de méthanol à 40% puis chauffés au bain marie à 85°C pendant 1 h. Après refroidissement, 1 ml de l'extrait est prélevé et additionné de :

- 1 ml d'acide acétique,
- 1 ml d'un mélange contenant (12 ml d'eau distillée, 30 ml d'acide acétique, 80 ml d'acide ortho phosphorique (H₃PO₄ densité 1.7)
- 2 ml de solution de ninhydrine (3% dans de l'éthanol pur).

La réaction nécessite une ébullition pendant 30 mn, elle aboutit à un virage progressif au rouge. Après refroidissement, 5 ml de toluène sont ajoutés à la solution et agités ; 2 phases se forment. La phase supérieure, contenant la proline, est récupérée et déshydratée par l'adjonction de sulfate dissodique anhydre (Na₂SO₄). Enfin la densité optique est déterminée à 528 nm. Les valeurs obtenues sont reportées sur la courbe d'étalonnage préalablement établie à partir d'une série de solutions de concentration en proline connue. Les teneurs en proline sont exprimées en mg/ g matière fraîche (MF) L'expérience est reproduite en triplicata.

b- Dosage des pigments photosynthétiques

La teneur en pigments photosynthétiques est déterminée selon la méthode de Arnon (1949). Pour cela, 0,5 g de matière fraîche est découpé et broyé en présence d'acétone 80%. Après filtration, la DO est lue à 663, 645 et 470 nm. Les teneurs en chlorophylles a, b, totale et caroténoïdes sont déterminées suivant les équations établies par Arnon (1949) et revues par Lichtenthaler (1987) :

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ ml}) = (12.7 \times \text{D.O}_{663}) - (2.69 \times \text{D.O}_{645})$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ ml}) = (22.9 \times \text{D.O}_{645}) - (4.68 \times \text{D.O}_{663})$$

$$\text{Chl totale } (\mu\text{g/ ml}) = (20.2 \times \text{D.O}_{645}) + (8.02 \times \text{D.O}_{663})$$

$$\text{Caroténoïdes } (\mu\text{g/ ml}) = [(1000 \times \text{D.O}_{470}) - 1.82 \text{ chl a} - 85,02 \text{ chl b}] / 198$$

1-3-8 Analyse statistique

Les données relatives aux paramètres morphologiques et physiologiques de germination ont fait l'objet d'une analyse de la variance par les procédures de One- way ANOVA (test de Turkey) à une valeur de $P \leq 0,05$ en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

2- Résultats

2-1 Détection des composés osmoprotecteurs

La chromatographie sur gel de silice d'extraits aqueux de *A. halimus* et *U. lactuca* révèle la présence chez les 2 échantillons de composés Dragendorff- positifs (Fig. 32).

Le système solvant isopropanol-eau (3 :1) a permis une bonne séparation. Un spot important correspondant à la G.B est observé avec l'halophyte *A. halimus*. Une faible tâche est détectée chez l'extrait de *U. lactuca*.

La proline, de couleur jaune caractéristique, est détectée seulement chez *A.halimus*.

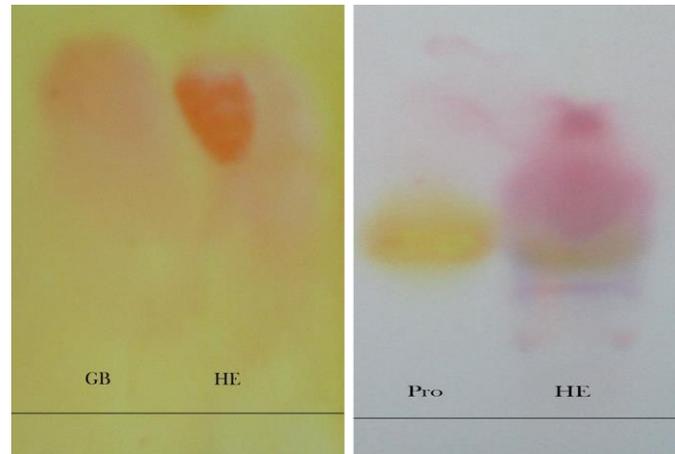


Fig. 32: CCM (gel de silice –isopropanol/ eau 3 :1) de substances Dragendorff-positive à partir de l'halophyte *A. halimus*.

2-2 Halotolérance des *Pseudomonas* fluorescents spp.

Après 7 jours d'incubation à 25°C sur milieu GMM, les souches de *Pseudomonas* fluorescents ont montré un comportement différent selon le traitement appliqué (Fig. 33).

La concentration saline 100 mM stimule très significativement ($P \leq 0.001$) la croissance de toutes les souches et à un degré moindre (à $P \leq 0.05$) celle de *P. fluorescens* CHA0. Le même effet positif est observé en présence de 300 mM de NaCl, excepté pour *P. fluorescens* CHA0, indifférente à ce changement. Toutes les souches répondent de la même manière aux deux concentrations (100 et 300 mM) sans une différence significative entre les 2 valeurs.

Face à une concentration équivalente à 500 mM, 3 bactéries sont très affectées ($P \leq 0.001$), il s'agit de *P. putida* AF2, *P. fluorescens* RB13 et *P. fluorescens* CHA0.

Cependant, *P. aeruginosa* EH4 et RB5 résistent à ce taux de salinité et sont donc plus tolérants ($P \leq 0,01$).

Les teneurs de 800 et 900 mM inhibent de façon drastique ($P \leq 0,001$) le développement de toutes les souches examinées (Fig. 33).

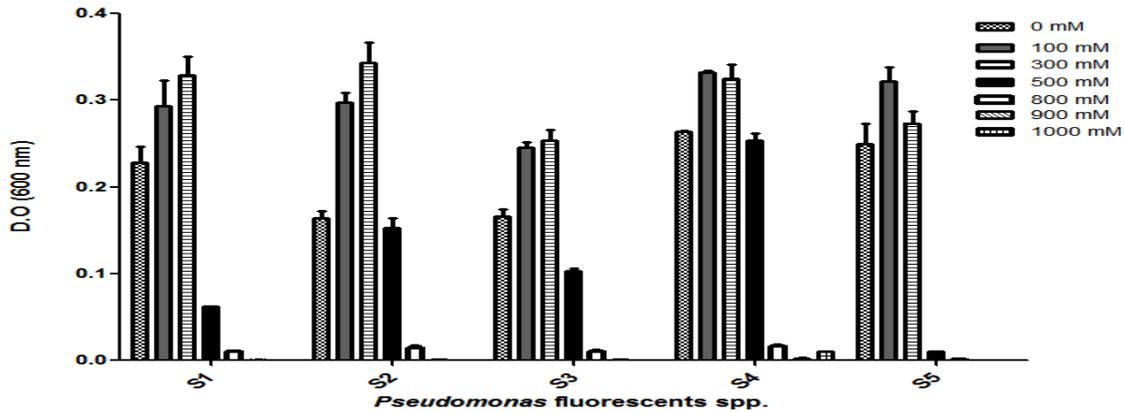


Fig. 33 : Effet de différentes concentrations de NaCl sur les souches de *Pseudomonas fluorescens*.

S1: *P. putida* AF2; S2: *P. aeruginosa* RB5; S3: *P. fluorescens* RB13; S4: *P. aeruginosa* EH4; S5: *P. fluorescens* CHA0.

L'effet d'O.P dans l'atténuation du stress salin imposé par les différentes concentrations de NaCl a fourni des résultats variant selon les espèces (Fig. 34)

En premier lieu et en absence de toute contrainte, les O.P quelle que soit leur nature n'ont présenté aucune activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries.

Additionnées à 100 mM de NaCl, la GB et la Pro n'affectent pas la croissance de bactéries, excepté *P. fluorescens* CHA0 significativement stimulée ($P \leq 0.01$) par la GB. Trois souches ne réagissent pas à l'apport d'extrait de *A. halimus* : *P. putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5 et *P. fluorescens* CHA0, en revanche, la croissance des 2 autres est largement améliorée ($P \leq 0.001$).

L'extrait de *U. lactuca* améliore considérablement la croissance de toutes les cellules ($P \leq 0.001$).

En présence de 300 mM, l'apport exogène de GB, de proline ou d'extrait d'*A. halimus* (séparément) n'exerce aucun effet promoteur de la prolifération de la majorité des souches : *P. putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5 et EH4.

La GB restaure la croissance de toutes les souches stressées par la concentration saline 500 mM. Cet effet est très important ($P \leq 0.001$) avec *P. putida* AF2 et *P. fluorescens* CHA0 et significatif, à $P \leq 0.0$ avec *P. fluorescens* RB13 et *P. aeruginosa* EH4. La proline exerce le même effet que la GB avec légère différence non significative.

L'extrait de *U. lactuca* a un effet stimulateur plus prononcé que la GB et la Pro (ex : *P. putida* AF2), ou identique à la GB (ex : *P. aeruginosa* RB5). Pour le reste des bactéries, les 3 osmoprotecteurs atténuent l'effet stressant du sel avec la même ampleur.

À cette même valeur de contrainte saline, la supplémentation du milieu avec l'extrait d'*A. halimus* n'a porté aucun bénéfice aux bactéries, sauf à *P. aeruginosa* EH4.

À 800 mM, l'effet délétère de NaCl est remarquablement atténué par les différents O.P employés. Ainsi, la GB agit significativement ($P \leq 0.01$) sur *P. putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5 et EH4. La croissance de *P. fluorescens* RB13 est largement rétablie par la GB ($P \leq 0.001$).

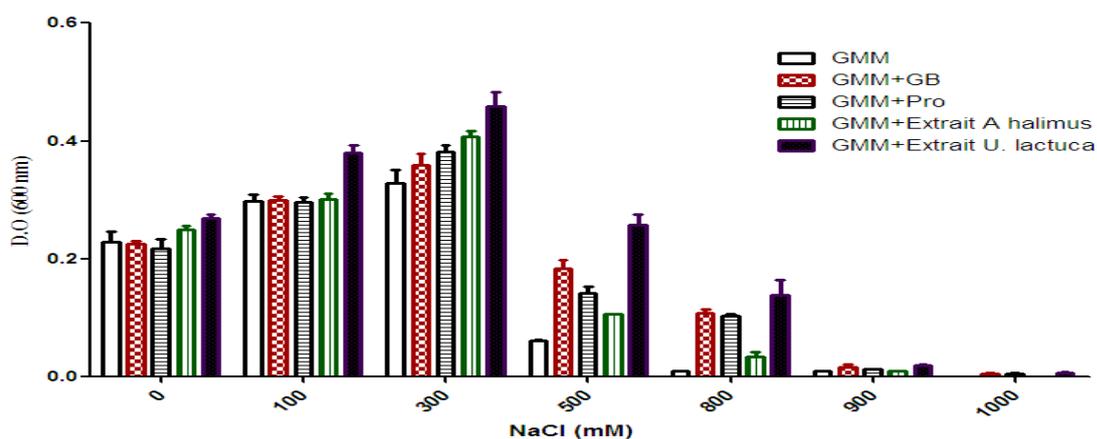
Dans la majorité des cas, la Pro « osmoprotège » les bactéries avec la même amplitude que la GB.

L'extrait de *U lactuca* présente le même pouvoir osmoprotecteur que les 2 molécules synthétiques. Dans le cas de *P. fluorescens* RB13, son rôle de restauration de la croissance est supérieur à celui de la Pro ($P \leq 0.01$).

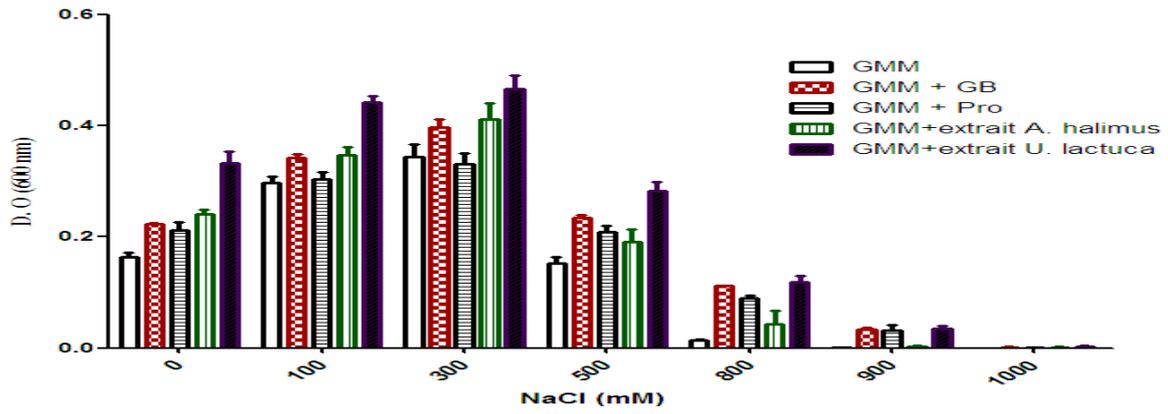
L'extrait de *A. halimus* ne permet pas aux bactéries de surmonter le stress de 800 mM, sauf pour la souche *P. aeruginosa* EH4.

Il est à noter, enfin, que *P. fluorescens* CHA0 est totalement inhibé par 800 mM, aucune molécule ne semble efficace.

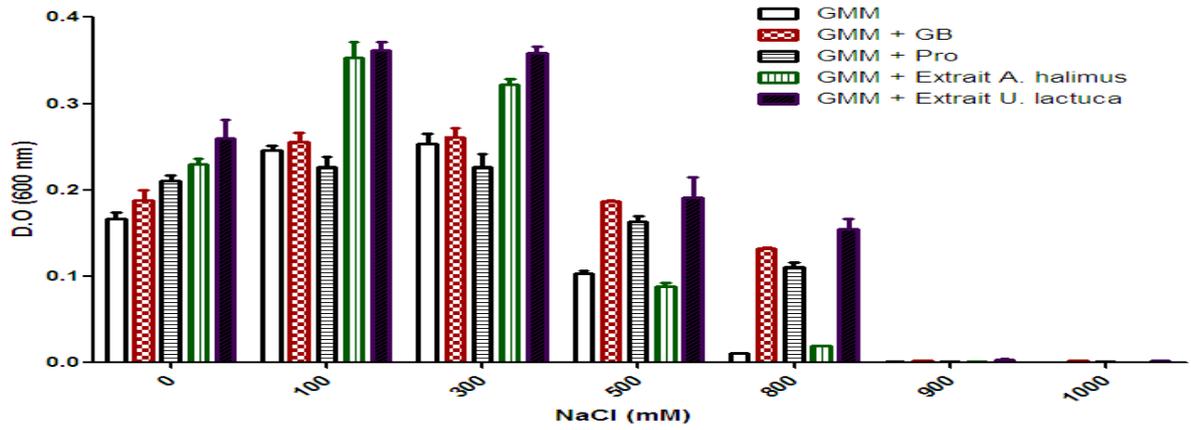
À 900 mM/ NaCl, *P. putida* AF2 est inhibé, les molécules osmoprotectrices testées n'ont aucun effet. Chez *P. fluorescens* RB13 et *P. aeruginosa* EH4, seule *U. lactuca* atténue considérablement le stress salin. L'extrait d'*A. halimus* n'assure aucun rôle à ce niveau de stress.



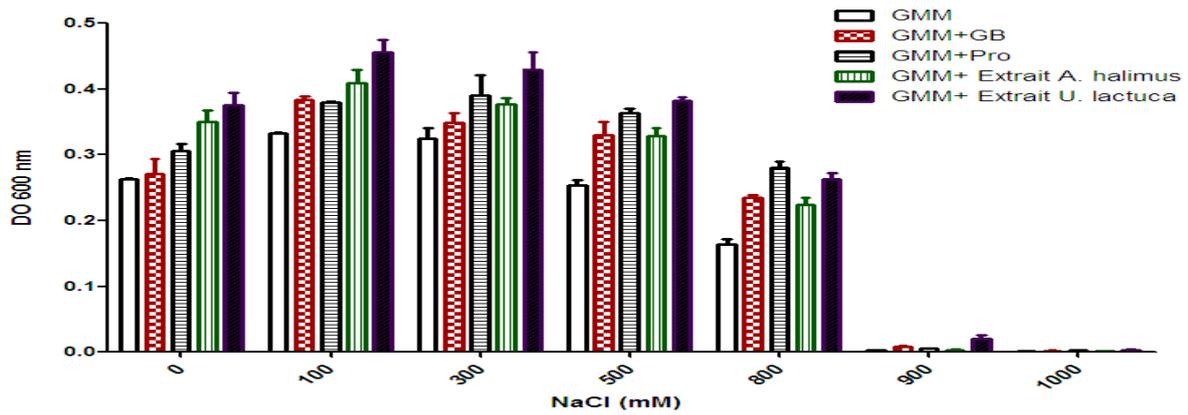
A)



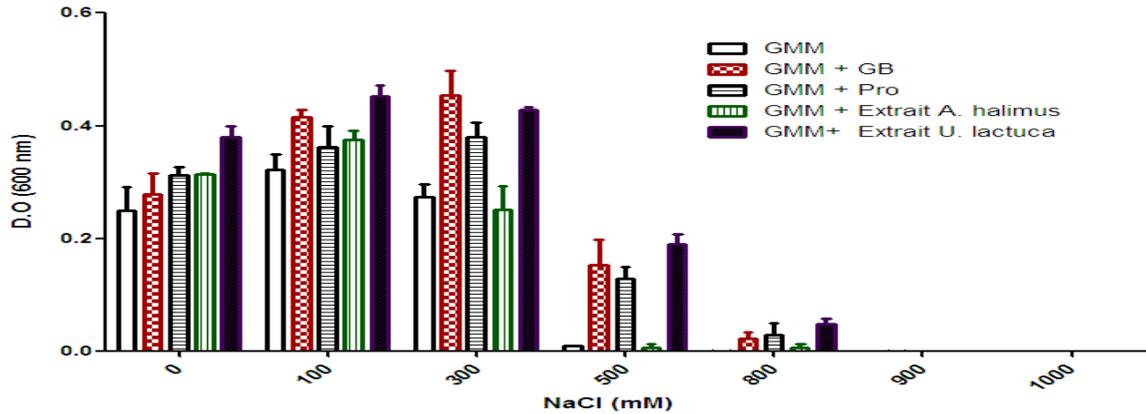
B)



C)



D)



E)

Fig. 34 : Effet de différentes concentrations de NaCl et d'osmoprotecteurs sur la croissance des 4 souches de *Pseudomonas* :

- A) : *P. putida* AF2
- B) : *P. aeruginosa* RB5.
- C) : *P. fluorescens* RB13
- D) : *P.aeruginosa* EH4
- E) : *P. fluorescens* CHA0

2-3 Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la germination du blé inoculé

L'effet combiné de 3 paramètres, le sel, les O.P et l'inoculation, sur la germination du blé dur (*Triticum durum* var. Mohamed ben Bachir) a été mis en évidence en suivant une analyse statistique des données par le test d'Anova.

2-3-1 Effet du sel et d'O.P sur le taux cumulé de germination

L'analyse de la variance du taux cumulé de germination du témoin non inoculé révèle une inhibition significative ($P \leq 0.01$) par le NaCl / 200 mM et très significative par 250 et 300 mM.

À 200 mM, la GB et l'extrait d'algue ont rétablit la germination de blé (Fig. 35). En présence de 300 mM, l'inhibition de la germination est totale, aucun O.P ne semble efficace (Fig. 36).

En revanche, l'extrait d'*A. halimus* est très inhibiteur.



Fig. 35 : Effet du NaCl/ 200 mM sur la germination du blé
(À droite blé co- inoculé, à gauche non inoculé)

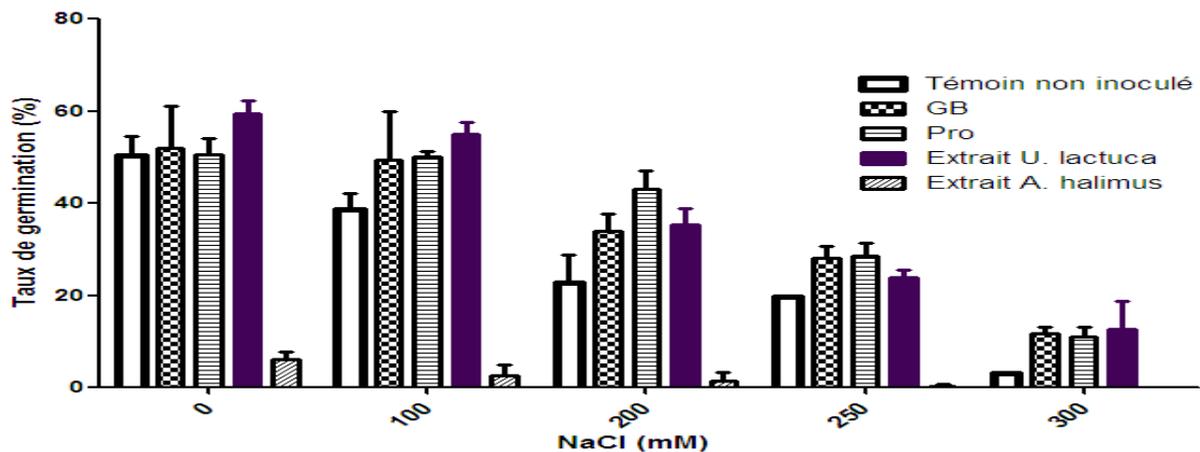


Fig. 36: Effets de différentes concentrations de NaCl et d'osmoprotecteurs sur le taux cumulé de germination du témoin non inoculé de blé dur

En absence de stress, l'inoculation par *P. fluorescens* RB13 a amélioré sensiblement ($P \leq 0.05$) le taux cumulé de germination. *P. fluorescens* CHA0 et la co-inoculation ont un effet presque identique ($P \leq 0.01$) (Fig. 37).

L'analyse de la variance fait ressortir une stimulation nette à 100 mM par la souche de référence et par les 2 souches co-inoculées, ($P \leq 0.05$) et ($P \leq 0.01$) respectivement.

À 200 mM/ NaCl, *P. fluorescens* CHA0 et la co-inoculation améliorent le rendement de germination qui se situe à des valeurs proches de celles du témoin sans sel.

À 250 mM/ NaCl, la co-inoculation restaure la germination aux même taux que le témoin.

À 300 mM/ NaCl, aucune souche n'est efficace.

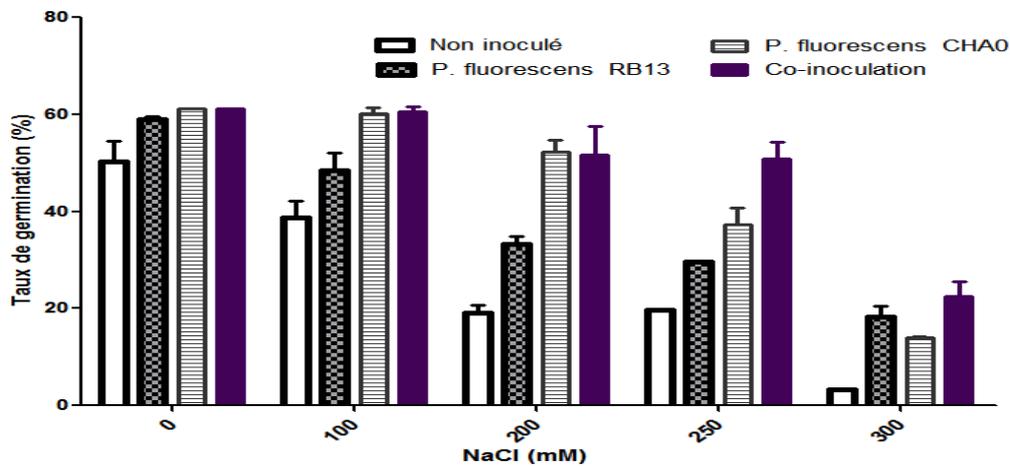


Fig. 37: Effets de l'inoculation sur le taux cumulé de germination de blé stressé par différentes concentrations de NaCl

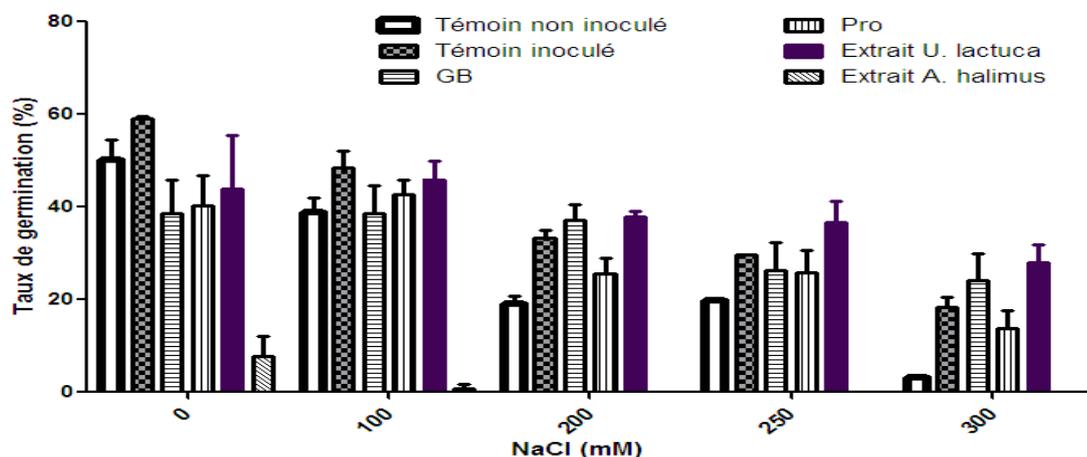
L'association bactérie-O.P permet de ressortir les observations suivantes en comparaison avec le témoin inoculé mais sans O.P :

- Au-delà de 200 mM de NaCl, les graines de blé ne s'adaptent pas au stress salin, l'apport exogène d'O.P synthétique et naturel (extrait aqueux de *U. lactuca*) a soutenu partiellement leur pouvoir germinatif (Fig. 38 A et B).

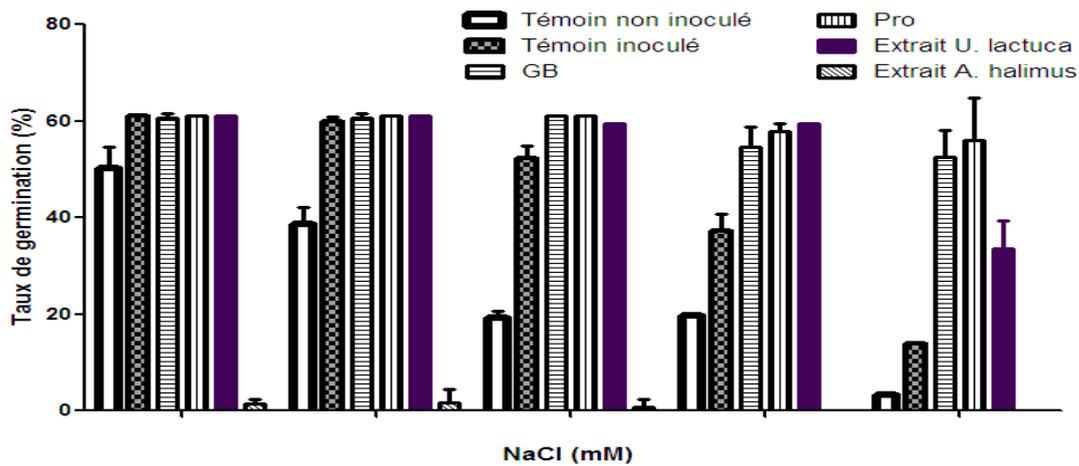
- En présence de 200 et de 300 mM/ NaCl, la co-inoculation du blé combinée à un apport d'O.P, a favorisé la germination de façon équivalente à celle du témoin (Fig. 38 C).

À toutes les teneurs salines testées, l'algue est aussi efficace que la GB et la Pro.

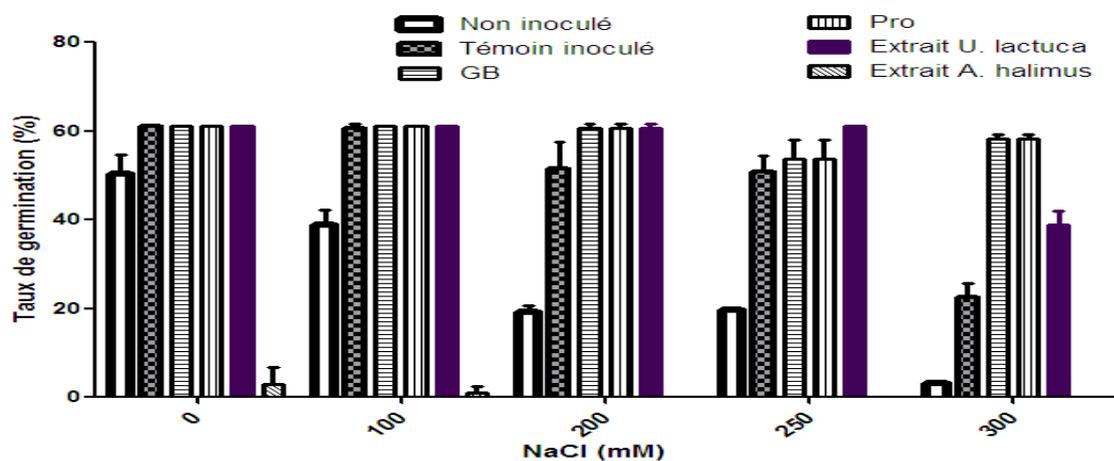
L'extrait aqueux de *A. halimus* exerce une inhibition prononcée de la germination.



A)



B)



C)

Fig. 38 : Effet du sel et d'OP sur le taux cumulé de germination de blé inoculé par les *Pseudomonas fluorescens* spp.

A) *P. fluorescens* RB13

B) *P. fluorescens* CHA0

C) A+B (Co-inoculation)

2-3-2 Effet du sel et d'OP sur le poids frais et sec du blé inoculé

Le poids frais du mélange végétal est fortement affecté par la salinité du milieu. Le poids frais des échantillons non inoculés révèle une chute sensible de leur poids frais à partir de 200 mM ; les O.P sont des stimulateurs assez nets (Fig. 39).

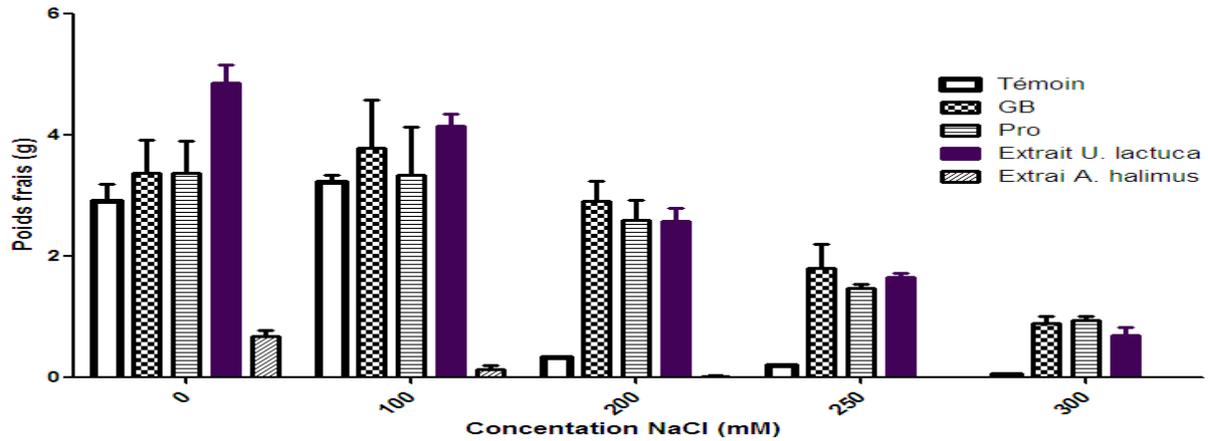


Fig. 39: Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais du blé non inoculé

L'inoculation par les souches de *Pseudomonas* restaure la germination du blé, se traduisant par une amélioration dans le poids frais. Ainsi, la co-inoculation des graines 2 augmente la biomasse végétale (poids frais) (Fig. 40).

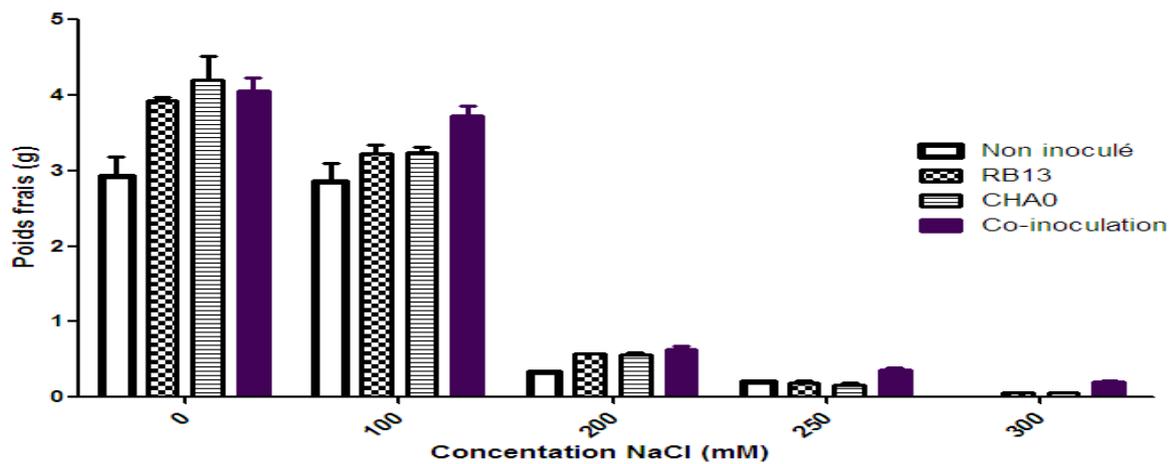
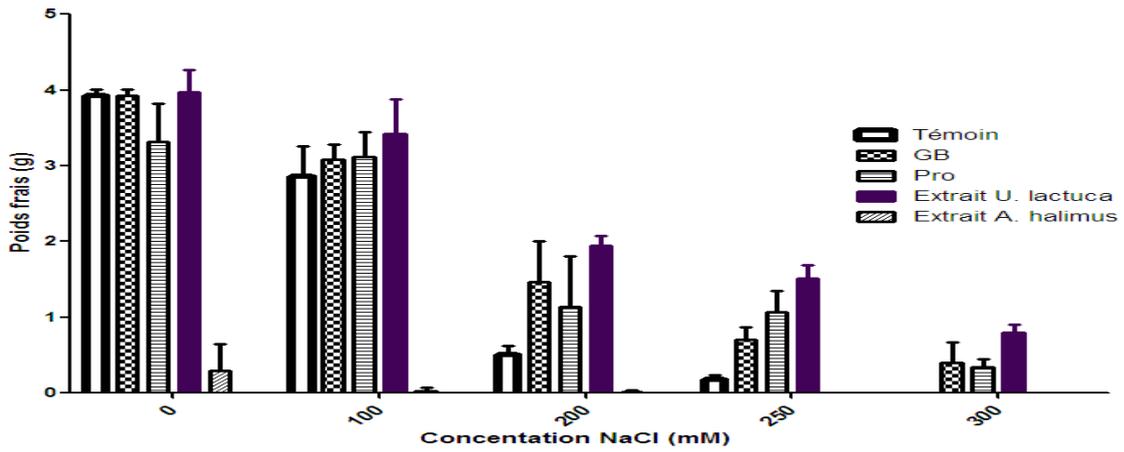
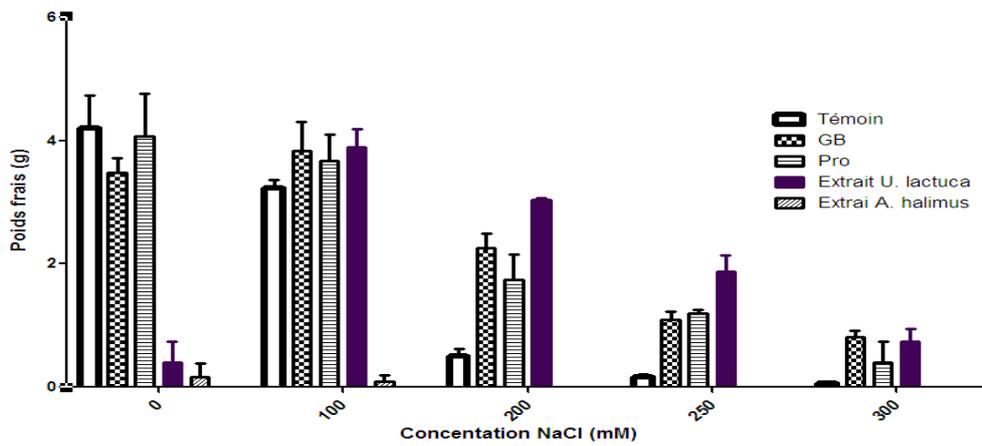


Fig. 40 : Effet de l'inoculation et du stress salin sur le poids frais du blé

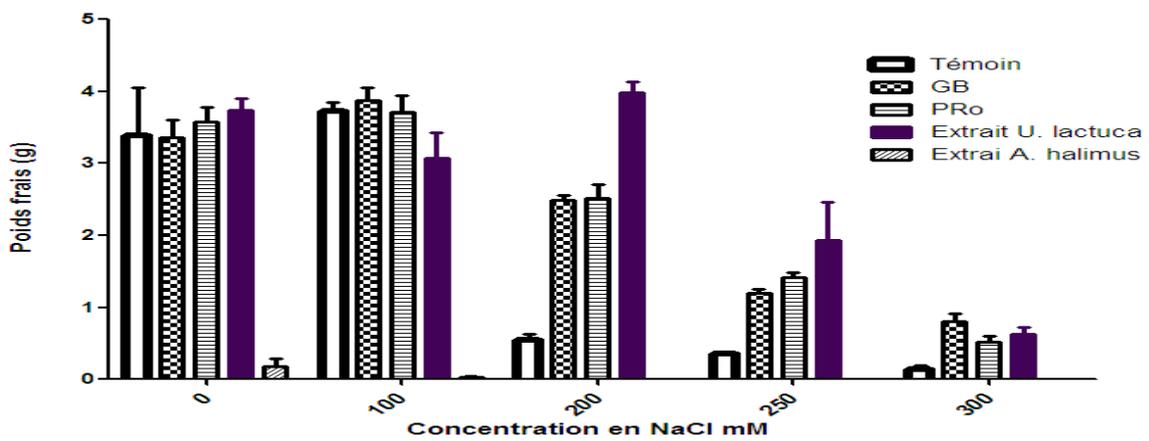
La combinaison de l'inoculation/ O.P améliore nettement le poids frais à partir de 200 mM/ NaCl. L'effet de l'extrait aqueux de *U. lactuca* est très marqué et est meilleur que celui de la GB et la Pro ($P \leq 0.001$) (Fig. 41).



A)



B)



C)

Fig. 41: Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais du blé inoculé par les *Pseudomonas fluorescens* spp. :

A: *P. fluorescens* RB1

B: *P. fluorescens* CHA0

C: A+B (co-inoculation)

Le poids sec des plantes est fortement affecté par le sel. L'effet inhibiteur est évident en présence de 100 mM. La co-inoculation renforce nettement la résistance des graines stressées même à 250 mM/ NaCl. À 300 mM, l'inhibition est totale (Fig. 42)

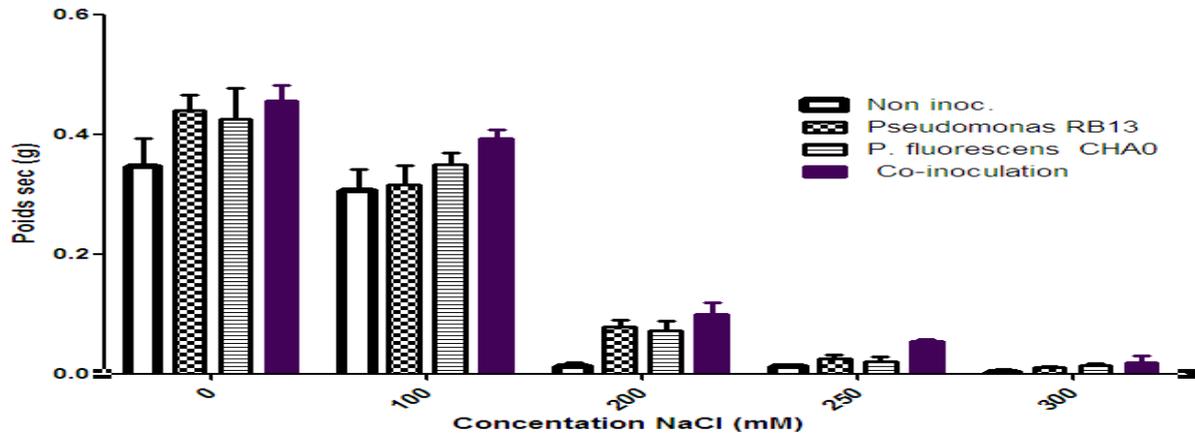
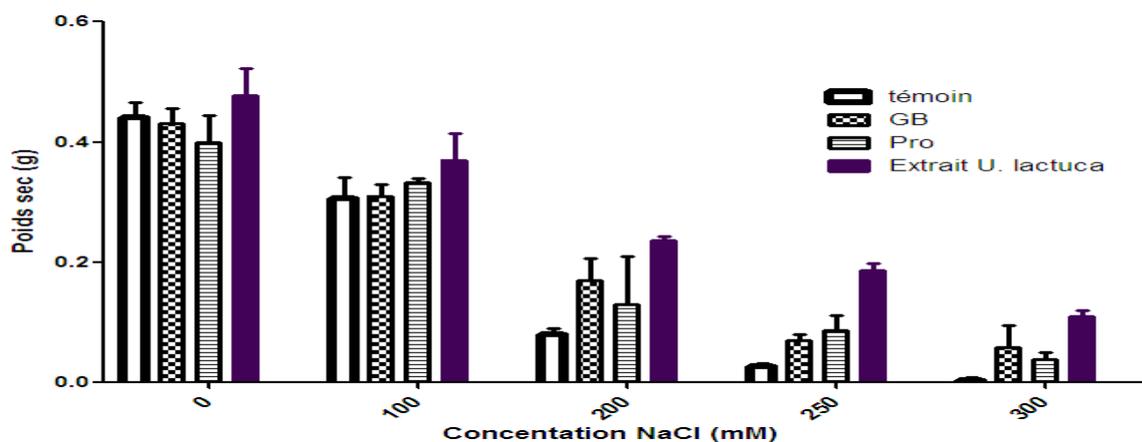
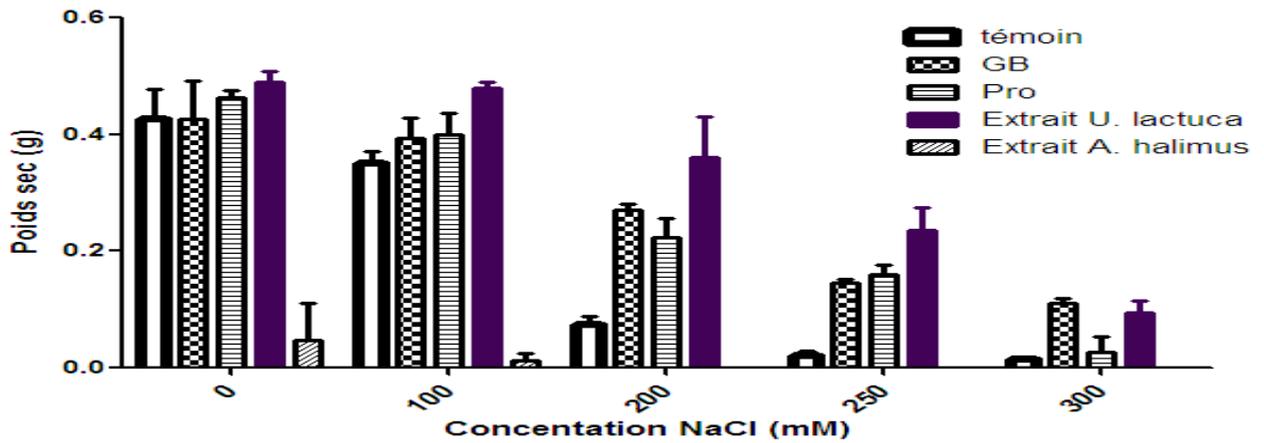


Fig. 42: Effet de l'inoculation sur le poids sec de blé stressé par NaCl

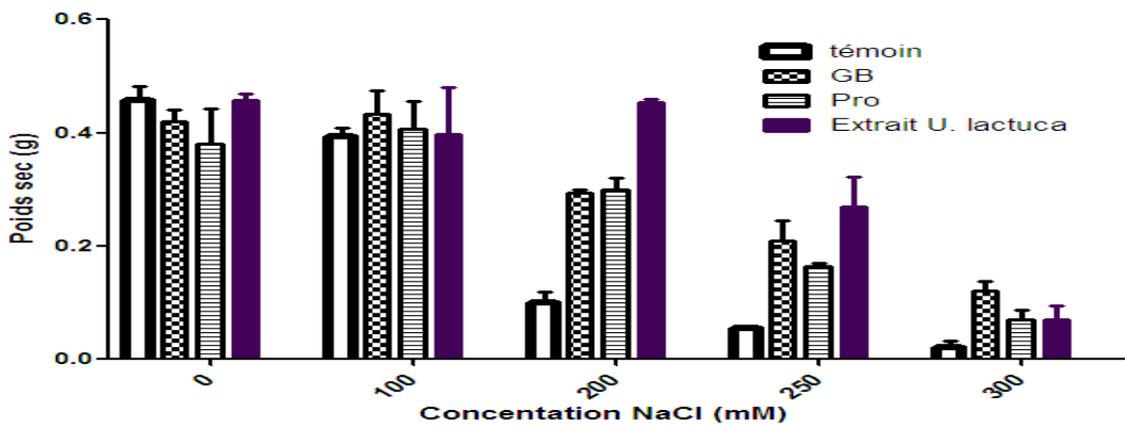
L'apport exogène de GB, de Pro et d'extrait de *U. lactuca* compense l'effet de sel sur la biomasse sèche par rapport aux résultats enregistrés en présence de 200 et 250 et 300 mM/ NaCl (Fig. 43 : A, B, C). Ces concentrations étant inhibitrices de la germination, les 3 O.P sont restaurateurs du poids sec ($P \leq 0.01$). Exceptionnellement et en présence de 200 mM, l'extrait de *U. lactuca* manifeste un grand pouvoir de restauration, équivalent à celui du témoin (0 mM) avec les graines inoculées avec *P. fluorescens* CHA0 et ceux co-inoculées (Fig. 43 : B et C).



A)



B)



C)

Fig. 43: Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le poids sec du blé inoculé par les *Pseudomonas fluorescents*

- A) *P. fluorescens* RB13
- B) *P. fluorescens* CHA0
- C) A+B (Co-inoculation)

2-4 Effet du sel, de la GB et de l'extrait de *U. lactuca* sur la germination du blé co-inoculé par *P. fluorescens* RB13 et *P. fluorescens* CHA0

Au terme de 15 jours de culture sur milieu MS dans des conditions contrôlées, le stade 2 à 3 feuilles est atteint (Fig. 44 et 45). Les feuilles sont alors lavées et légèrement essorées sur du papier filtre et soumises à l'étude des caractères morphologiques et biochimiques traduisant l'effet des traitements subis.

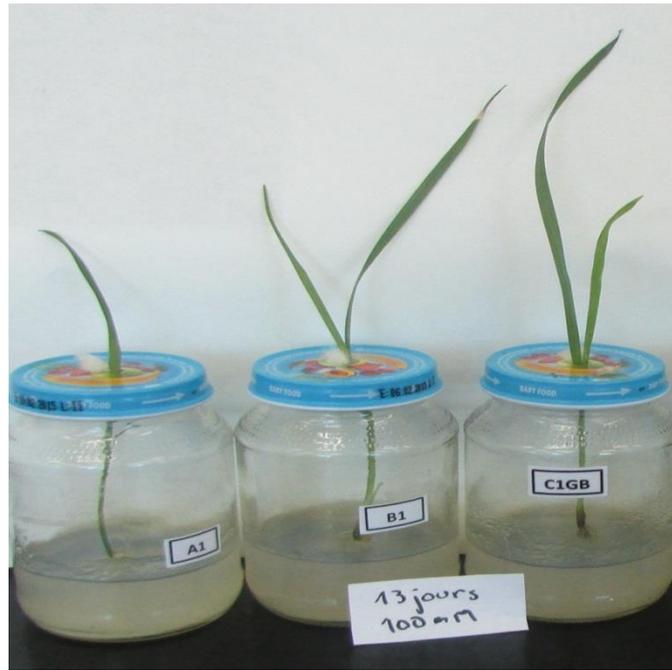


Fig. 44 : Germination du blé sur milieu MS à 100 mM / NaCl

- A1 : non inoculé**
- B1: co- inoculé**
- C1GB: Co- inoculé+ GB**

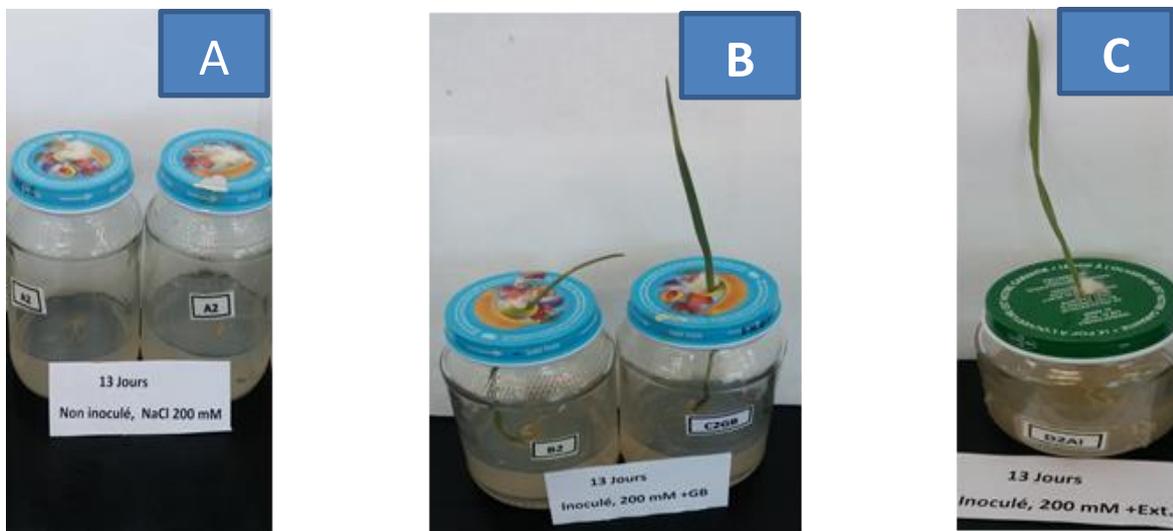


Fig. 45 : Germination du blé sur milieu MS à 200 mM / NaCl

- A : Non inoculé**
- B : Co-inoculé (à gauche) et co-inoculé + GB (à droite)**
- C : Co-inoculé + Extrait aqueux d'algue**

2-4-1 Caractères morphologiques

a- Partie aérienne

La longueur de la partie aérienne décline proportionnellement avec l'augmentation du stress salin (200 mM) (Fig. 46). La co-inoculation par *P. fluorescens* RB13 et CHA0 est bénéfique sur l'élongation de la plante en absence de NaCl ($P \leq 0.05$).

La concentration saline 100 mM inhibe fortement la croissance végétale du témoin non inoculé ($P \leq 0.01$), et modérément ($P \leq 0.05$) celle des graines co-inoculées. Seulement, à cette même contrainte, le lot inoculé est fortement stimulé ($P \leq 0.001$) par rapport au lot témoin. L'analyse de la variance dénote une reprise de l'élongation végétale au même niveau que le témoin en absence de stress salin.

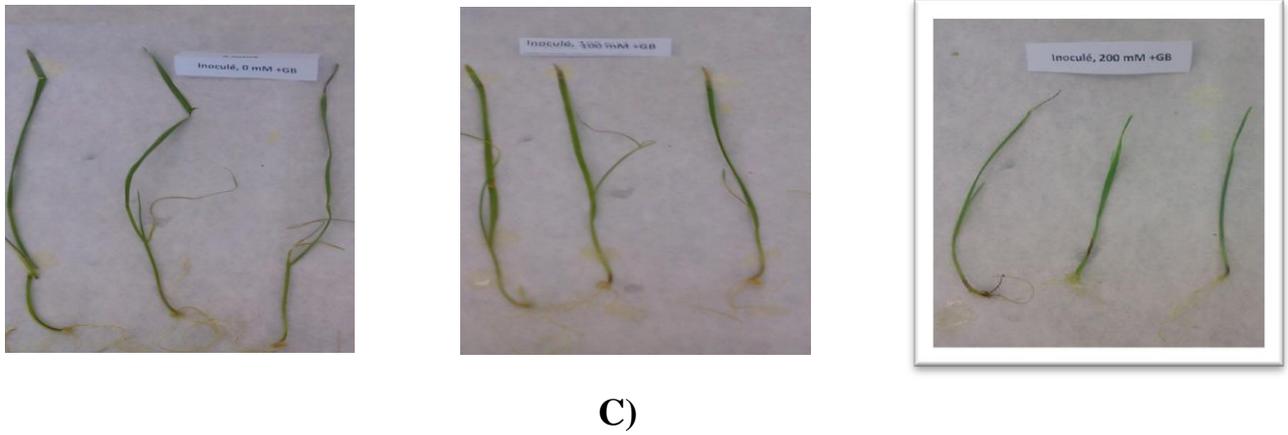
À 200 mM, les deux bactéries combinées n'ont pu surmonter l'effet délétère du NaCl.



(A)



(B)



C)

Fig. 46 : Effet du sel sur la longueur de la plante de blé :

- A) : Non inoculé
- B) : Co-inoculé
- C) : Co-inoculé + GB

Une restauration partielle notable ($P \leq 0.001$) de l'élongation est enregistrée, comparée au traitement 200 mM non inoculé (Fig. 47).

À 100 mM, l'apport d'O.P (synthétique ou naturel) améliore la croissance par rapport au témoin non inoculé ; l'effet marquant étant celui de l'extrait de *U. lactuca* ($P \leq 0.001$). Par rapport au traitement 100 mM combiné à une co- inoculation, les O.P ne présentent aucun effet.

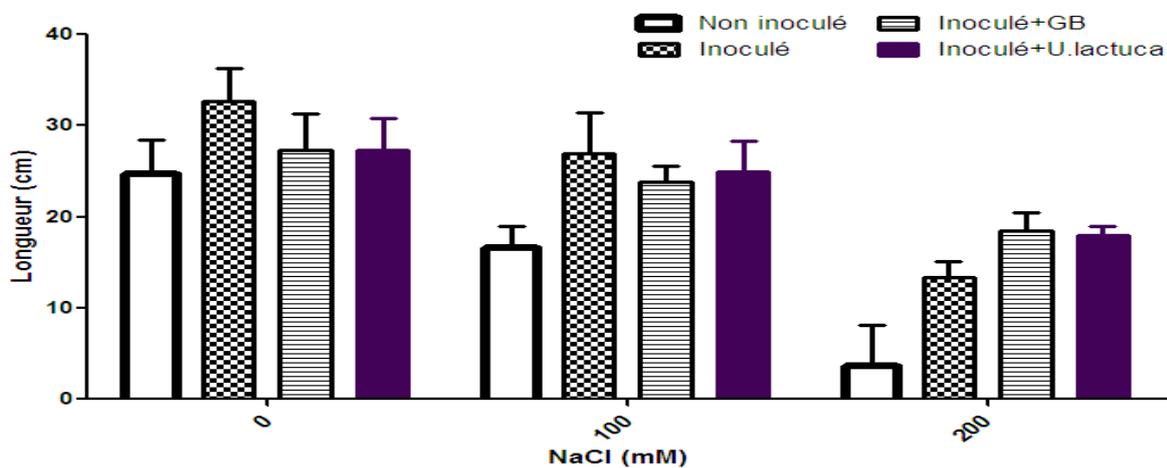


Fig. 47: Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur la longueur de la partie aérienne du blé co- inoculé.

En présence de la concentration saline inhibitrice (200 mM), une supplémentation du milieu MS de GB et d'extrait d'algue stimule le développement du blé ($P \leq 0.05$).

L'analyse de la variance relative à l'évaluation de la production de la biomasse fraîche et sèche a abouti aux constatations suivantes. Une amélioration de la croissance du blé co-inoculé par rapport au témoin non inoculé (0 mM/ NaCl) se traduit par un accroissement significatif ($P \leq 0.01$) du poids frais (Fig. 48) et très significatif ($P \leq 0.001$) du poids sec des feuilles (Fig. 49).

Le même constat est noté quand le milieu MS est additionné de NaCl /100 mM. Comparé au témoin non inoculé sans sel, la co-inoculation restaure la production de biomasse fraîche et sèche avec une différence non identique. Le même effet osmoprotecteur est assuré par la GB et l'extrait de *U. lactuca* dans le cas du poids frais. S'agissant du poids sec, un rôle notable ($P \leq 0.05$) est obtenu en présence de GB. L'extrait de *U. lactuca* atténue considérablement l'effet de NaCl.

Le stress imposé par 200 mM/ NaCl agit très fortement sur la production de biomasse végétale. Les lots de blé co-inoculés par les 2 souches de *Pseudomonas* ont permis un rétablissement du rendement aussi bien de la matière fraîche que sèche à une valeur équivalente à celles du lot non inoculé non tressé.

À 200 mM/ NaCl, aucune différence sensible n'est observée entre le lot inoculé et supplémenté d'O.P et le lot non inoculé en absence de sel.

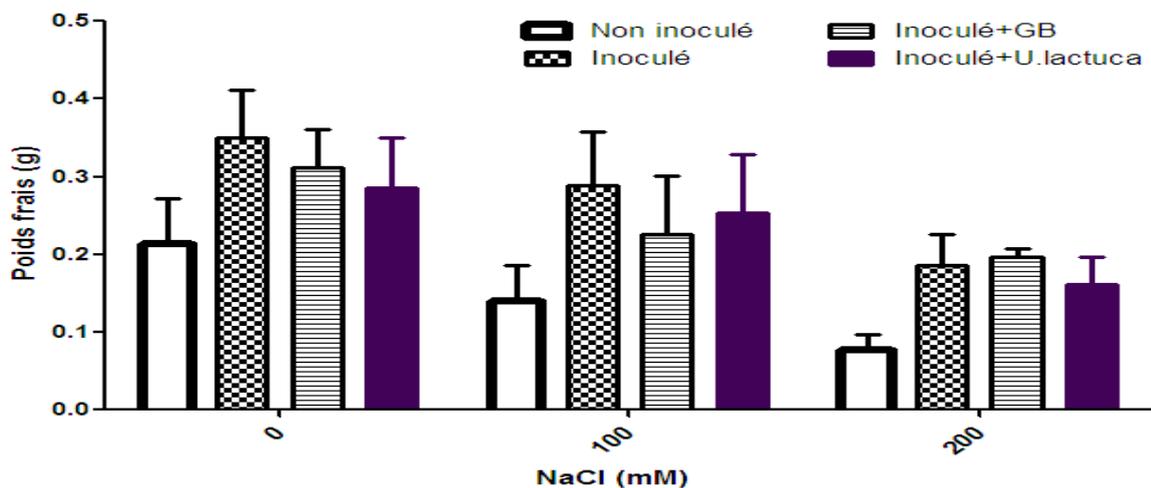


Fig. 48 : Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais du blé co-inoculé

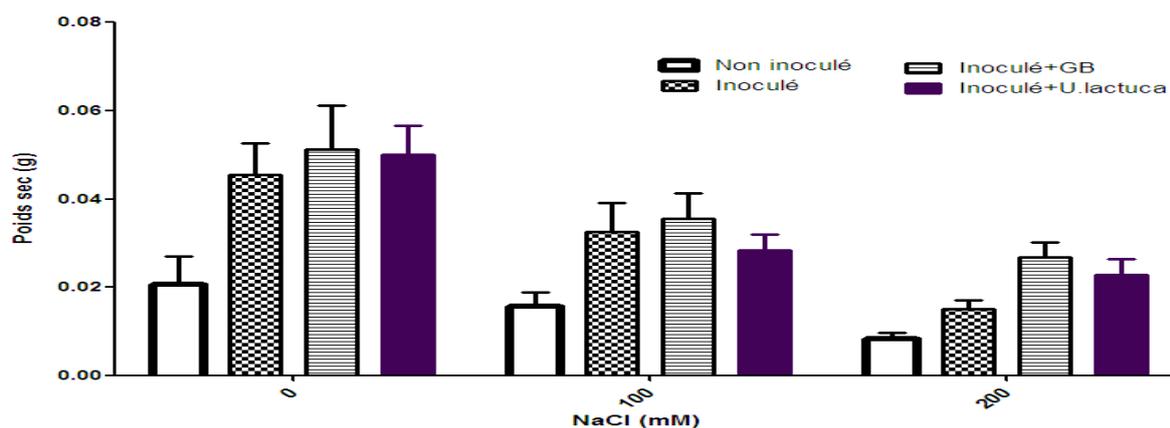


Fig. 49: Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids sec du blé co-inoculé

b- Partie racinaire

Le nombre de racines formées au cours des différents traitements est le premier paramètre étudié.

- En absence de sel, aucune différence significative n'est notée entre les différents lots (Fig.50).
- La concentration saline 100 mM n'inhiba pas la formation des racines. L'inoculation et les O.P sont sans effet.
- 200 mM/ NaCl réduit notablement ($P \leq 0.05$) le nombre de racines des graines non inoculées. En revanche, le lot de blé co-inoculé a un nombre de racines identique à celui du lot non inoculé à 0 mM. Aucune différence significative n'est notée entre le lot inoculé et celui supplémenté d'osmoprotecteurs (Fig. 50)

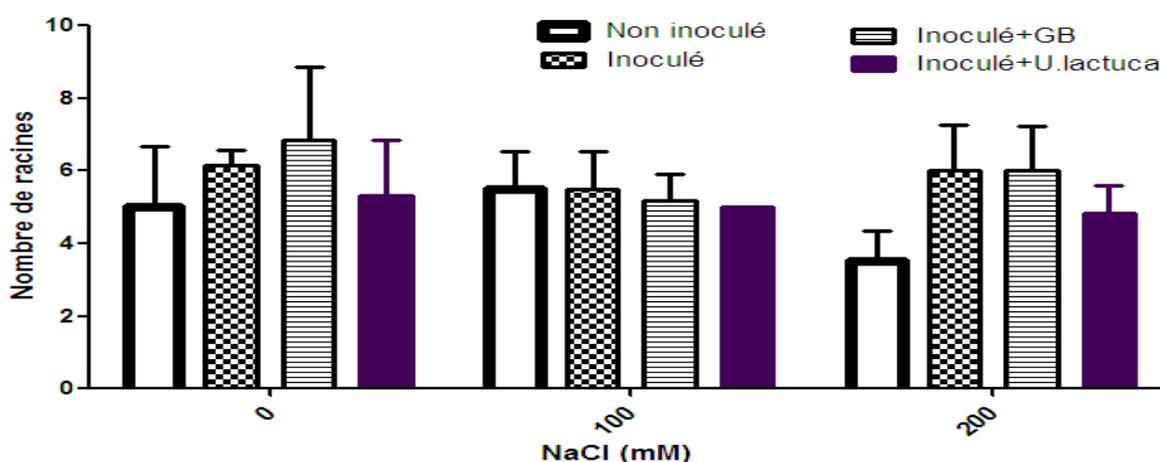


Fig. 50 : Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le nombre de racines de blé co-inoculé

Le stress salin agit de façon évidente sur la longueur des racines du blé. En effet, NaCl/ 100 mM est sans effet visible sur les graines non inoculées (Fig. 51), mais freine fortement l'élongation racinaire du lot co-inoculé ($P \leq 0.001$). Cependant, la longueur enregistrée est du même niveau que celui du lot non inoculé en absence de sel. Elle est plus importante que celle du groupe de blé non inoculé à 100 mM. À cette concentration, l'apport de GB et de *U. lactuca* exerce le même effet que le lot inoculé.

200 mM est fortement inhibitrice du développement racinaire ($P \leq 0.01$) aussi bien des graines non inoculées que celle inoculées. Toutefois, le lot traité avec les *Pseudomonas* a montré une tolérance significative ($P \leq 0.05$) par rapport à celui non inoculé. L'ajout d'O.P au lot inoculé donne des longueurs proches de ceux du lot non inoculé à 0 mM (Fig. 51).

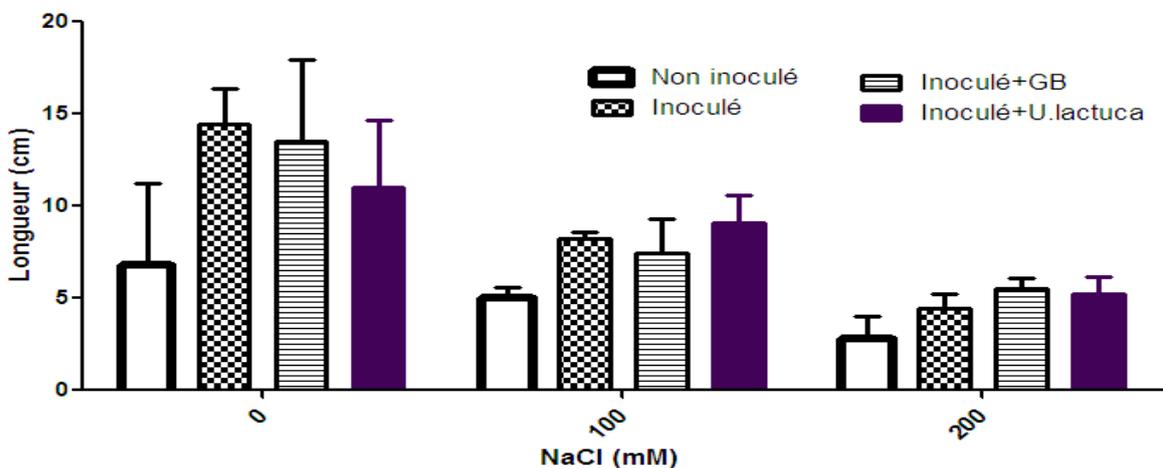


Fig. 51 : Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la longueur des racines de blé co-inoculé

Une diminution de poids frais des racines est constatée, elle dépend de l'intensité du stress imposé aux plantules de blé est noté (Fig. 52) :

- En absence de sel, le poids frais des racines du lot co-inoculé est nettement amélioré ($P \leq 0.001$) par rapport à celui non inoculé.
- Confronté à 100 mM de NaCl, les racines des graines non inoculés sont chétives ($P \leq 0.001$), tandis que celles inoculées conservent leur pouvoir de formation intact.

La co-inoculation associée à un apport d'O.P (GB et l'extrait de *U. lactuca*) augmente très fortement le rendement pondéral des racines en comparaison avec le groupe non inoculé.

- L'effet délétère de 200 mM/ NaCl sur le poids frais des racines, inoculé ou non, est très remarquable ($P \leq 0.001$). Aucune atténuation du stress n'est obtenue par tous les O.P utilisés (Fig. 52).

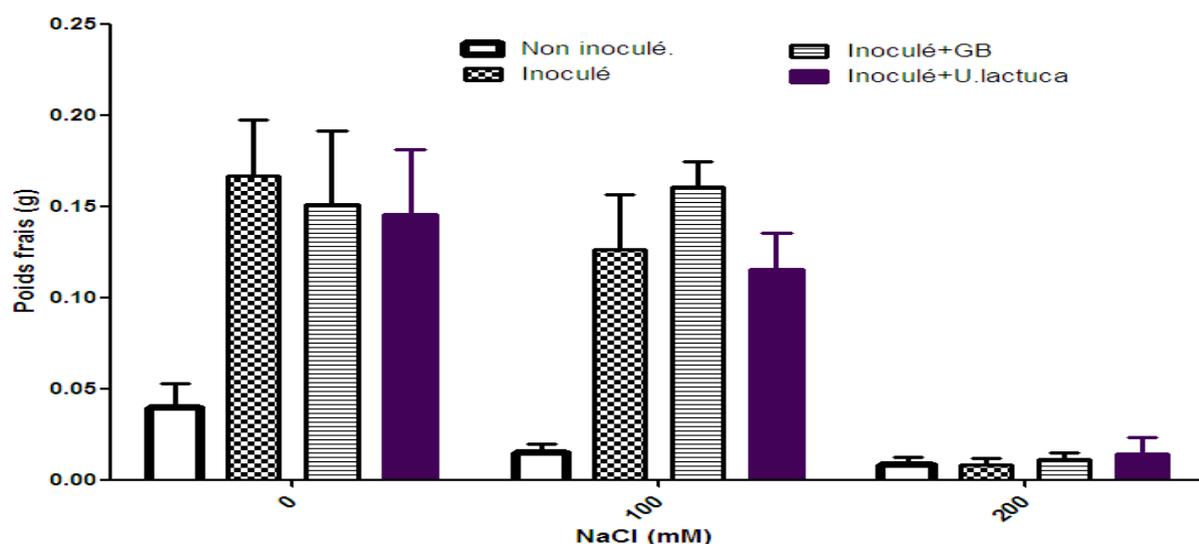


Fig. 52 : Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur le poids frais des racines de blé co-inoculé

2-4-2 Caractères biochimiques

a- Taux de proline

L'analyse de la variance concernant le contenu en proline des feuilles de blé a permis de constater un accroissement de l'accumulation de cet acide aminé en fonction de l'intensité de la contrainte osmotique (Fig. 53).

En absence de tout stress osmotique la proline est accumulée d'une façon équitable au sein des différents traitements.

La teneur en NaCl/ 100 mM stimule considérablement l'accumulation de proline chez le groupe des plantules issues de graines non inoculées ($P \leq 0.05$). En revanche, chez les feuilles de graines co-inoculées et/ou supplémentées d'O.P, le taux de production est inchangé.

À 200 mM/ NaCl, une accumulation importante de proline est observée dans toutes les feuilles stressées. Cependant, les échantillons issus de graines inoculées ainsi que ceux ayant germé sur milieu additionné de GB ou d'extrait de *U. lactuca*, manifestent une chute sensible ($P \leq 0.01$) par rapport au témoin non inoculé (Fig. 53).

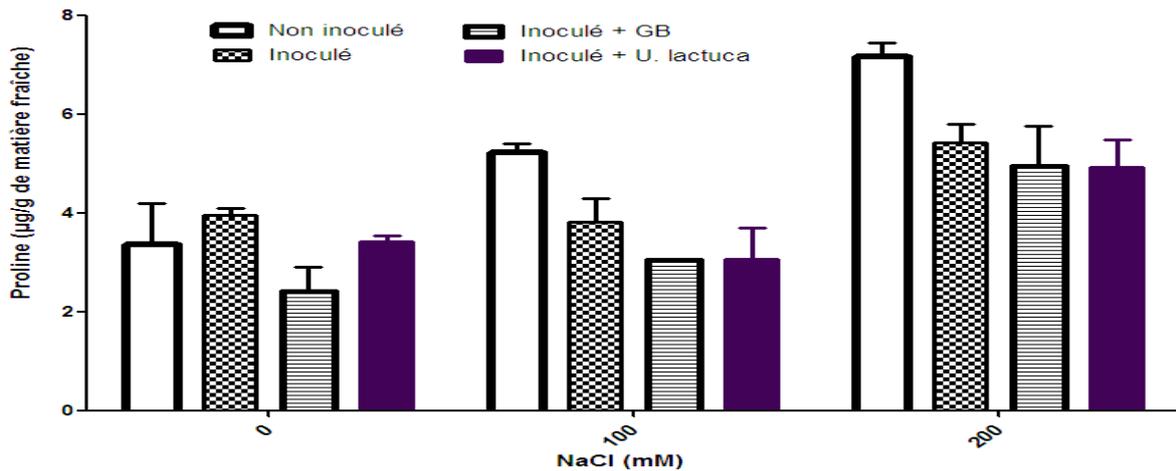
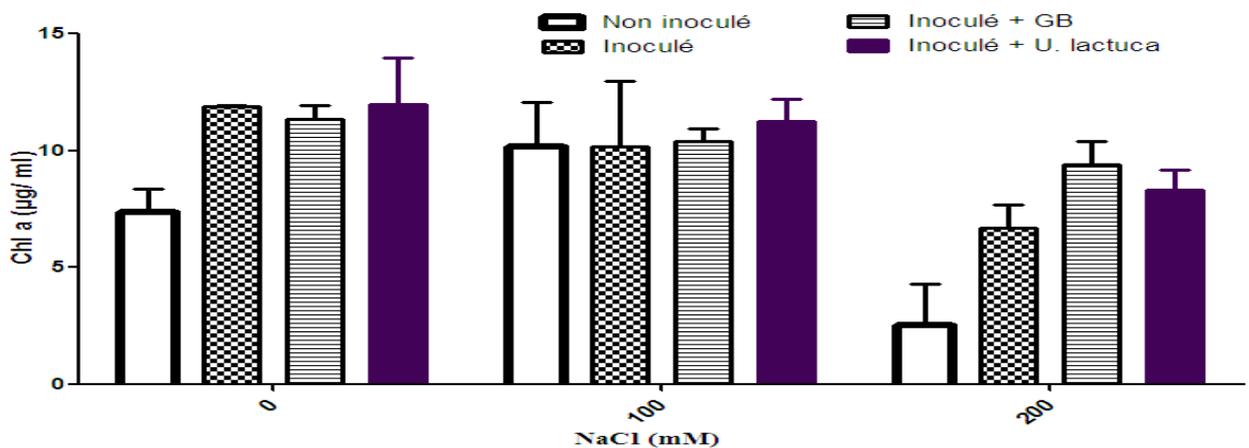


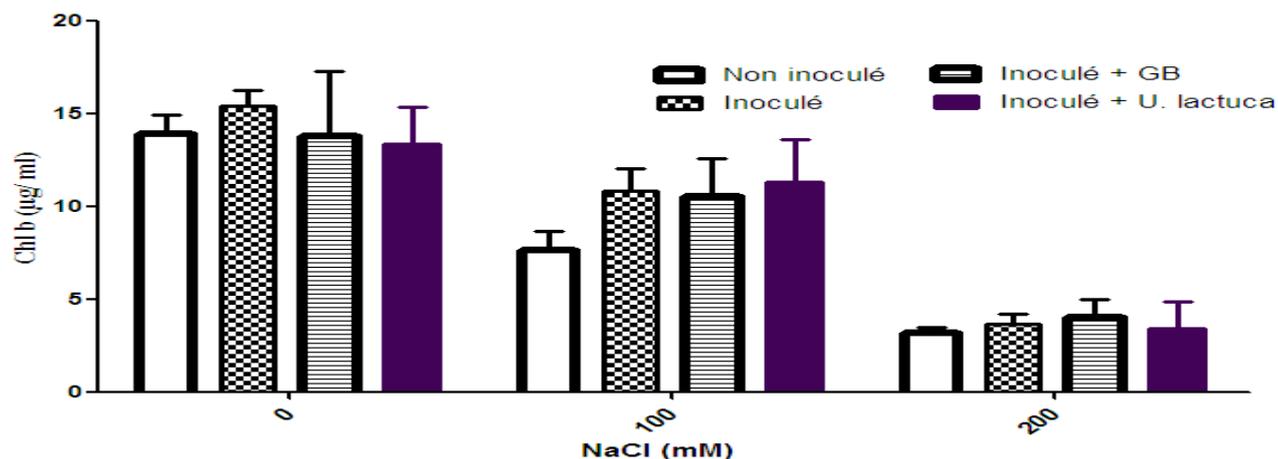
Fig. 53 : Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le contenu foliaire en proline endogène de blé dur co-inoculé

b- Taux de chlorophylle

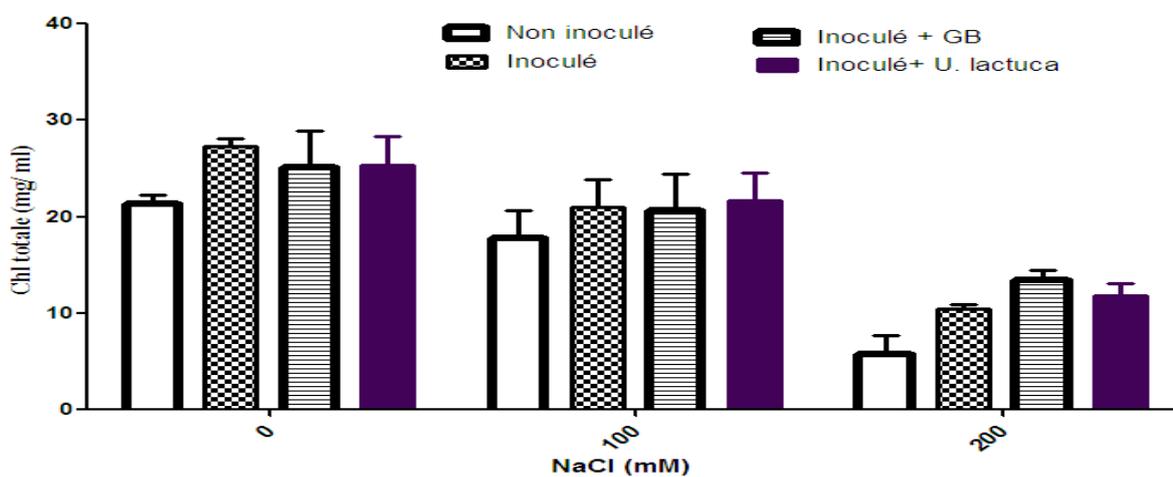
La chlorophylle (a, b et totale) est amplement affectée par la concentration saline NaCl/200 mM (Fig. 54). La co-inoculation par les 2 souches de *Pseudomonas* restaure remarquablement ($P \leq 0.05$) et ($P \leq 0.01$) la synthèse des chlorophylles a et totale, respectivement. Le traitement réunissant co-inoculation et O.P révèle une amélioration très importante ($P \leq 0.001$) de la production de chlorophylles (a et totale) après addition de GB. Le même résultat est obtenu ($P \leq 0.01$) en présence d'extraits de *U. lactuca* dans le milieu de germination. L'analyse de la variance montre une inhibition très nette des pigments chlorophylliens b du lot non inoculé et aucune réponse positive aux différents traitements n'est enregistrée. De même, cette chlorophylle est très fortement affectée ($P \leq 0.001$) par le NaCl/ 100 mM chez le lot non inoculé et d'un degré moindre ($P \leq 0.05$) chez celui inoculé.



A)



B)



C)

Fig. 54 : Effet de la co-inoculation sur le taux foliaire de chlorophylles en présence de sel et d'osmoprotecteurs.

A : chl a ; B : chl b ; C: Chl totale (a+b)

Par contre, les pigments caroténoïdes augmentent avec le stress salin. Ainsi, en présence de 200 mM/ NaCl, l'élaboration de ces derniers par le lot non inoculé est nettement stimulée ($P \leq 0.05$). La co-inoculation atténue considérablement l'effet néfaste du sel ($P \leq 0.05$) alors que l'addition d'extrait d'algue ou de GB renforce remarquablement ($P \leq 0.01$) le rôle des 2 bactéries (Fig. 55). Le NaCl/ 100 mM n'induit pas la production des caroténoïdes et aucune différence notable n'est enregistrée entre les traitements appliqués.

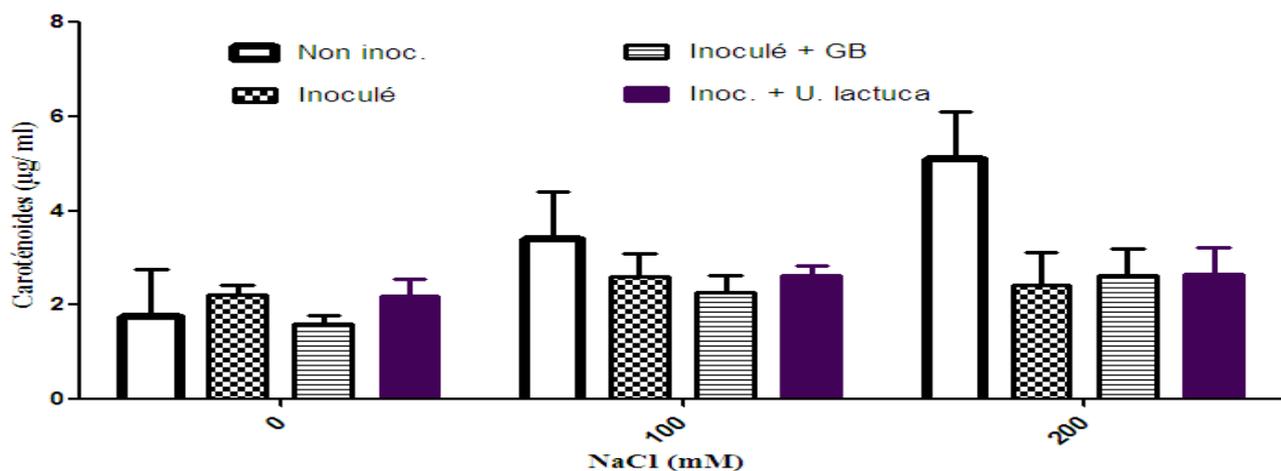


Fig. 55: Effet de sel et d'osmoprotecteurs sur le taux de caroténoïdes des feuilles de graines co-inoculées.

3- Discussion

3-1 Halotolérance des *Pseudomonas fluorescents* en présence d'O.P

L'étude de l'effet osmoprotecteur des molécules synthétiques et extraits naturels est réalisée sur milieu minimum contenant une source unique de carbone (glucose) en quantité précise. En effet, un milieu complexe augmente l'halotolérance de nombreuses espèces bactériennes (Ghoul, 1990), l'extrait de levure, par exemple contient de la GB (Empadinhas et da Costa, 2008).

La GB est testée à une concentration très faible dans le milieu minimum (1 mM). C'est la teneur utilisée par la quasi-totalité des chercheurs, bien qu'un effet maximal soit observé avec des concentrations de 20 µM chez *P. aeruginosa* (D'Souza-Ault *et al.*, 1993) ou avec des teneurs de l'ordre du nanomolaire chez *E. coli* (taux réellement trouvés dans la nature) (Cosquer *et al.*, 1999).

La cultivabilité chez la majorité des souches testées décline déjà à 500 mM. La souche *P. fluorescens* CHA0 est particulièrement totalement inhibée. Les 2 *P. aeruginosa* résistent à ce taux de salinité, ceci pourrait être lié à des facteurs proprement génétiques ; *P. aeruginosa* EH4 originaire de l'endosphère de l'halophyte *A. halimus* disposerait comme tout microorganisme halophile d'un cytoplasme « salin » équipé d'enzymes riches en acides aminés strictement dépendants des ions K⁺ ou Na⁺ pour leur activité (Empadinhas et da Costa, 2008). Les recherches menées par D'Souza-Ault *et al.* (1993) et par Masher *et al.* (2000) ont confirmé une inhibition de *P. aeruginosa* par une concentration de 700 mM.

En présence de NaCl/ 800 mM, toutes les espèces de *Pseudomonas* fluorescents sont complètement inhibées. Cette concentration est effectivement connue comme telle, en milieu pauvre, pour *E. coli* (Le Rudulier *et al.*, 1984), *S. typhimurium* (Csonka, 1989), *P. mendocina* (Pocard *et al.*, 1994).

L'apport exogène de GB (1 mM) à des situations stressantes de 500 mM rétablit la croissance des cellules de *P. putida* AF2 et de *P. fluorescens* RB13 au même niveau que celles du témoin (sans sel). À 800 mM, les cultures de *P. aeruginosa* RB5 et *P. aeruginosa* EH4 sont totalement réactivées. En effet, ce soluté compatible universel est accumulé préférentiellement par tous les microorganismes (Yancey, 2001) du fait de sa compatibilité avec les fonctions métaboliques même à de fortes concentrations ou de son transport énergétiquement moins exigeant que la synthèse *de novo* (Pocard *et al.*, 1994 ; Diby *et al.*, 2013). L'augmentation de l'halotolérance par la G.B a été notée chez *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* (Smith et Smith, 1989 ; D'Souza-Ault *et al.*, 1993), *E. coli* (Ghoul, 1990), *Bacillus* (Boch *et al.*, 1996), *Rhizobium* (Le Rudulier, 1983) et *Azospirillum* (Nabti *et al.*, 2007).

A de fortes concentrations salines, la GB ne restaure pas la croissance totale des cultures bactériennes testées, elle atténue uniquement leurs effets délétères. Cette observation concorde avec celle rapportée par Park *et al.* (1995) : une augmentation du taux de croissance de *Yersinia enterocolitica* après addition de G.B, qui reste, cependant, plus faible de moitié qu'en absence de stress. De même, chez *E. coli*, ce taux de restauration est seulement de 45% (Bessières, 1998).

Dans la présente étude aucune osmoprotection n'est ramenée par la G.B à 900 mM. Cette molécule atténue mais ne rétablit pas la croissance face au stress osmotique élevé (Gouebset *et al.*, 1992 ; Park *et al.*, 1995). Cette teneur saline est inhibitrice.

Avec des valeurs de NaCl non stressantes (100 et 300 mM), la GB n'est pas utilisée comme source de carbone, d'azote, d'énergie et d'osmoprotection. Il est bien évident que la G.B améliore la croissance des cellules stressées mais non pas de celles non stressées (D'Souza-Ault 1993; Ko *et al.*, 1994). En effet, et selon Smith *et al.* (1988), la GB ne peut être intégrée dans les composants cellulaires de *E. coli* et sert uniquement d'osmoprotecteur. Cependant cette molécule est utilisée par *Rhizobium meliloti* comme source de carbone et d'azote (Boncompagni *et al.*, 1997).

La proline peut être accumulée à des concentrations molaires et contribue à la stimulation de la croissance de plusieurs espèces bactériennes, telles *S. typhimurium* et *E.*

coli (Le Rudulier et Bouillard, 1983 ; Csonka, 1989). Notre étude met en évidence l'accumulation de la proline chez les *Pseudomonas* stressés ; notre résultat diffère, cependant de ceux d'autres chercheurs qui ne décèlent pas cette molécule chez les espèces de ce genre et particulièrement chez *P. mendocina* (Pocard et al., 1995 ; Miller et Wood, 1996). Cette variation pourrait être due à l'utilisation de milieux de culture et de souches différents. Les tests effectués par nos soins montrent une amélioration très importante de la croissance des souches de *Pseudomonas* même à des concentrations salines élevées, contrairement à ceux obtenus par Le Rudulier (1993) qui limite l'efficacité de la proline à des stress osmotiques modérés. De faibles concentrations (< 1 mM) augmentent la tolérance des bactéries à Gram négatif (Beumer et al., 1994).

Après avoir confirmé la présence des 2 molécules osmoprotectrices (GB et Pro) dans l'extrait hydro-alcoolique de *A. halimus* par CCM, ce dernier est additionné au milieu de culture à tous les niveaux de salinité. Aucun effet (inhibiteur ou stimulateur) n'est enregistré sur 99% des bactéries testées. Même si cette halophyte est connue pour sa capacité d'accumuler les deux molécules osmoprotectrices en réponse aux contraintes du sol salin (Walker et al., 2014), l'extrait de cette plante n'a pas assuré une protection des cellules au-delà de 300 mM. Ceci serait la conséquence de sa forte dilution dans le milieu (1/100^{ème}). En outre, il contiendrait déjà une teneur en ions Na⁺ et Cl⁻ séquestrés dans les vacuoles des cellules (Rhodes et Hanson, 1993 ; Walker et al., 2014). Il est fort possible que l'extrait véhiculerait des substances retardant l'efficacité attendue sur les souches bactériennes. Des alcaloïdes cytotoxiques, les isoflavonoides à activité antibactérienne, ainsi que des tanins (polyphenols), connus pour leur pouvoir à précipiter les protéines et d'inhiber la respiration bactérienne ont été décrits chez les plantes (Zhu et al., 1997).

La CCM a révélé la présence de GB dans l'extrait hydroalcoolique de *U. lactuca*, additionné au milieu de culture, il stimule remarquablement la cultivabilité des cellules stressées ou non. En effet, cette algue contient divers molécules d'intérêt tels les bétaines, les acides aminés, les protéines et le dimethylsulfoniopropionate (DMSP) (Ghoul, 1990 ; Ghoul et al., 1995). Son rôle osmoprotecteur est prouvé sur plusieurs espèces bactériennes : *E. coli* (Ghoul et al., 1995), *Salmonella thyphimurium* (Galinski, 1995), *Sinorhizobium meliloti* (Pichereau et al., 1998) et *Azospirillum brasilens* NH (Nabti et al., 2007) . Ainsi le rôle de *U. lactuca* est équivalent à celui de la GB dans la restauration de 60 % des souches soumises à la contrainte de 800 mM/ NaCl, au même niveau que les témoins (en absence de sel).

3-2 Effet de l'inoculation et des osmoprotecteurs sur la germination du blé inoculé sous stress salin

La germination est un stade critique dans le cycle de développement des végétaux (Misra *et al.*, 2004), elle conditionne l'installation de la plante et sa production ultérieure (Tremblin et Binet, 1984). C'est une phase transitoire entre le stade graine sèche et l'apparition de la radicule. Elle débute avec l'imbibition des tissus, suivie d'une forte reprise de l'activité métabolique (Bewley, 1997). La plupart des plantes sont sensibles à la salinité durant leurs phases de germination et de levée (Rehman *et al.*, 2000). D'après Ayres et Westcot (1994), le blé tolère modérément le sel, sa production est réduite de moitié (50 %) à une salinité du sol équivalente à 13 dS/m, à 20 dS/m la perte est maximale (0%).

La vitesse de germination des graines de blé Mohamed Ben Bachir est ralentie à partir de NaCl/ 100 mM et est davantage inhibée à 250 et 300 mM. En effet, à des teneurs élevées, le sel, toxique, affecte la viabilité des graines en réduisant l'utilisation des réserves des semences (Munns, 2002) et en modifiant l'activité des enzymes du métabolisme des acides nucléiques (Gomes-Filho *et al.*, 2008). L'inhibition serait essentiellement de nature osmotique : le sel empêche l'imbibition des semences (Katembe *et al.*, 1998) suite à une diminution de l'afflux d'eau nécessaire au déroulement des réactions métaboliques impliquées dans le processus de germination (Greenway et Munns, 1980). Le ralentissement de la vitesse de germination pourrait être attribué au temps nécessaire aux graines pour déclencher les mécanismes nécessaires pour ajuster leur pression osmotique (Jaouadi *et al.*, 2010).

Dans la présente étude, il semble qu'à des teneurs salines élevées (200, 250 et 300 mM), l'absence de germination est due à la toxicité liée à l'accumulation des ions Na⁺ dans l'embryon (Guerrier, 1983). Cette situation conduit à une inhibition osmotique (Bliss *et al.*, 1986) avec pour conséquence une modification du métabolisme protéique (Dantas *et al.*, 2007) et une utilisation limitée des réserves de semences (Othman *et al.*, 2006). Une perturbation de l'équilibre hormonal est également évoquée (Khan et Rizvi, 1994); la production d'auxines et de gibberellines est fortement inhibée, réduisant le pourcentage de germination (Werner et Finkelstein, 1995).

Les résultats obtenus confirment ceux d'études antérieures mettant en évidence l'action dépressif du sel sur la capacité germinative des graines de blé (Ben Naceur, 2001 ; Gholamin et Khayatnezhad, 2011 ; Mahmoodzadeh *et al.*, 2013 ; Mrani Alaoui *et al.*, 2013). Ces auteurs notent un faible pourcentage de germination à 160 mM/ NaCl et l'arrêt du développement après quelques jours.

L'effet négatif de NaCl sur la germination se répercute sur le développement de la plante au cours des 11 jours de croissance. Selon Zhu *et al.* (2004), la salinité engendre un retard de germination et affecte négativement la longueur de la coléoptile et le développement du système racinaire. La conséquence est une mauvaise levée des plantules.

Sous stress salin, la racicule est plus sensible que la coléoptile, ce qui corrobore les observations de Radhouane (2008).

De plus, la réponse à la salinité diffère selon le stade de développement de la plante testée. Ainsi, pour le blé, les stades de germination et d'émergence sont les plus affectées, une salinité du sol comprise entre 14 et 16 dS/ m déclenche une chute de 50 % de la levée des plantules (Ayres et Westcot, 1994). Cette constatation est confirmée par Radhouane (2008), la longueur de la coléoptile et de la racicule influe sur celle de la plante, une courte coléoptile est caractéristique d'une population à courte paille.

Pour évaluer l'impact de l'inoculation sur la germination du blé, deux souches : *P. fluorescens* RB13 et CHA0 sont utilisées. Ce choix est basé sur 3 caractéristiques principaux : la non pathogénicité, l'activité promotrice de la croissance végétale à travers la synthèse de biomolécules efficaces et enfin l'halotolérance. En effet, les espèces de *P. aeruginosa* sont omises de cette sélection vue leur pathogénicité probable. Les 2 bactéries retenues sont légèrement stimulées par 300 mM/ NaCl. À 500 mM, la souche RB13 voit sa croissance chuter considérablement pour être complètement inhibée au-delà de cette teneur, alors que la prolifération de CHA0 est totalement affectée à cette valeur. Oren (2006) qualifie comme « légèrement halophiles » les bactéries croissant mieux dans des milieux contenant 200 à 500 mM de sel, tout en mentionnant l'existence de microorganismes halotolérants ne nécessitant pas de fortes concentrations pour leur survie, mais sont capables de subsister à de fortes quantités. Une fois inoculées à des semences cultivées dans un sol salé : > 4 dS/ m ~ 36 mM (Bui, 2013), elles supportent un tel stress.

L'inoculation préalable des graines de blé avec ces 2 souches, avant leur exposition au stress salin, a fourni des résultats positifs quant à l'amélioration de pourcentage et du taux cumulé de germination. Le même résultat est obtenu par Abbaspoor *et al.* (2009) en utilisant *P. fluorescens* 153 et *putida* 108. De même Nabti *et al.* (2010) et Silini *et al.* (2012) arrivent aux mêmes observations suite à la bactérisation du blé sous stress salin par *Azospirillum brasilense* NH et *Azotobacter vineladii*, respectivement. Selon Yao *et al.* (2010), l'inoculation du coton avec *P. putida* Rs-198 stabilise effectivement le stade germination. La combinaison des 2 souches est plus performante. En plus de leur halotolérance, elles sont douées de capacités stimulatrices de la germination déjà prouvées par nos soins. Ce rôle important des 2

bactéries dans la restauration de la germination des semences sous stress salin serait dû à la synthèse de phytohormones : gibberellines et auxines.

Effectivement, les bactéries utilisées élaborent des quantités importantes d'AIA et en particulier *P. fluorescens* CHA0. Dans des conditions salines, la production de ce phytostimulateur est seulement réduite. Cette constatation existe chez *P. fluorescens* (Egamberdieva, 2012), *A. brasilense* (Nabti *et al.*, 2007) et *Azotobacter vinelandii* (Silini *et al.*, 2012).

De même, les inocula producteurs de l'AIA, gibberellines et cytokinines pourraient approvisionner la graine en ces hormones, responsables de la germination et améliorer le rendement des graines.

La libération d'exopolysaccharides, une stratégie de capture des ions Na^+ , est détectée chez plusieurs espèces PGPR capables d'aider les plantes à surmonter le stress. Selon Ashraf *et al.* (2004), l'inoculation de blé par des espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas* productrices de cette molécule stimulent la germination et réduisent l'absorption des Na^+ par les graines.

L'apport exogène d'O.P : GB, Pro (5 mM) et l'extrait aqueux de *U. lactuca* a stimulé fortement la germination des semences de blé, inoculées ou non, et a amélioré leur taux de germination cumulé.

Le traitement des semences de blé avec la GB est un moyen hautement bénéfique lors de son application au cours de nos expériences. Dans la littérature scientifique, l'application de ce soluté compatible est limitée aux stades post-germinatifs des plantes. Plusieurs recherches attestent de l'effet positif de son application exogène sur la croissance et le rendement final de la plante (Yang et Lu, 2005). Suite à la pulvérisation des feuilles par la GB, cette dernière est transférée aux autres organes pour stimuler l'halotolérance de la plante (Mäkela *et al.*, 1998). Cependant, la concentration de GB adéquate pour une bonne protection reste à déterminer pour chaque espèce et selon le stade de développement de la plante : 0.5 M présente un effet délétère sur le riz, par contre la présence de 0.1 mM dans la solution nutritive réduit le taux de Na^+ et améliore sa croissance (Lutts, 2000). Dans la présente étude, 5 mM de GB est une concentration suffisante pour une amélioration notable de la germination de blé, résultat en accord avec celui de Silini *et al.* (2012). Au champ, l'application la plus efficace utilisée est le traitement des semences à un taux de 1,1 kg GB / ha (Ashraf et Foolad, 2007).

Le traitement des semences par la proline stimule efficacement la germination au même titre que la GB. Cette constatation existe, par exemple, chez la luzerne à 10 mM (Ehsanpour et Fatahian, 2003) et le riz à 1 mM (Xavier *et al.*, 2011). De même Lone *et al.* (1998) rapportent

une chute d'accumulation de Na^+ et Cl^- et une croissance optimale chez l'embryon d'orge suite à un apport exogène en proline intervenant dans la stabilise la membrane plasmique (Mansour, 1998).

L'utilisation d'extrait de l'algue *U. lactuca* (2%) comme source d'osmoprotection naturelle restaure sensiblement la germination du blé, inoculé ou non, sous stress salin allant jusqu'à 250 mM de NaCl. Ce résultat rejoint celui obtenu par Ibrahim *et al.* (2014) suite à l'utilisation d'un extrait aqueux à 10%. La teneur adoptée au cours de la présente étude, est suffisante pour protéger considérablement la phase initiale de croissance.

Selon l'analyse biochimique réalisée par Ibrahim *et al.* (2014), *U. lactuca* est une source de diverses molécules dont l'acide ascorbique (0.146 mg/ g), GB (1.146 m/ g), Pro (0.78 mg/ g) et le glutathion (0.071 mg/ g) requis pour l'induction d'enzymes antioxydantes responsables de l'atténuation du stress oxydatif engendré par la salinité (Hemida *et al.*, 2014). De plus, cette algue est connue comme étant une excellente source de composés bioactifs tels que les acides gras essentiels, vitamines, acides aminés, minéraux et d'autres substances favorisant la croissance des plantes (Ibrahim *et al.*, 2014).

L'extrait de l'halophyte *A. halimus* a, néanmoins inhibé très fortement la germination même en absence de stress. Ceci pourrait être lié à la nature de préparation de l'extrait. Cette halophyte adopte aussi comme moyen de détoxification l'accumulation des ions Na^+ (et d'autres anions) dans ses tissus en les stockant dans la vacuole (Walker *et al.*, 2014). La valeur de la conductivité électrique de l'extrait (2,30 mS/ cm) est soustraite lors de la préparation de chaque concentration saline. Toutefois l'inhibition quasi-totale de la germination a eu lieu même à 0 mM. Cette halophyte était choisie car elle est connue par une accumulation cytoplasmique notable de solutés compatibles spécialement la GB et la Pro (Walker, 2014) ; donnée confirmée par une CCM avant application.

L'impact de 2 paramètres, à savoir co-inoculation et O.P (GB, Pro et extrait de *U. lactuca*) a donné lieu à une amélioration importante de la germination par rapport aux lots non inoculé et inoculé avec une seule souche. Les deux souches *P. fluorescens* RB13 et CHA0 agissent en synergie aboutissant à un résultat bénéfique pour la graine stressée.

L'effet du sel sur les paramètres physiologiques et biochimiques du blé est déterminé, *in vitro*, sur milieu hydroponique enrichi en macro- et microéléments.

Même si les graines testées soient en stade post-germinatif, elles supportent mal l'action délétère de 200 mM/ NaCl et arrêtent leur croissance au stade épicotyle, résultat en

conformité avec celui de El Sharkawi et Springuel (1979). Tous les caractères morphologiques sont alors atteints.

La croissance de la partie aérienne et racinaire, ainsi que le nombre de feuilles et de racines, sont négativement affectés par la salinité, une réduction du nombre et de la longueur de ces 2 parties est alors observée. Ceci serait le résultat d'une atteinte au niveau cellulaire. Le nombre de divisions, étant ralenti et totalement inhibé à 200 mM/ NaCl, conduit à une sorte de tubérisation ou lignification du système racinaire permettant à la plante une entrée en vie ralentie, en attendant que les conditions redeviennent favorables (Fraser *et al.*, 1990). Les études menées par Termaat *et al.* (1985) sur le blé et l'orge attribuent ce phénomène de réduction de la longueur de la partie aérienne à une synthèse importante au niveau racinaire, de certains régulateurs de croissance notamment l'acide abscissique et une réduction des cytokinines (Fahad *et al.*, 2015).

Le nombre et la longueur des racines chutent considérablement à 200 mM/ NaCl. Cette constatation est rapportée par les recherches de Suhayda *et al.* (1992) notant une diminution de l'élongation du système racinaire chez l'orge à des concentrations élevées de NaCl (100 à 200 mM), conséquence d'une accélération préférée de la croissance de la partie aérienne afin de déclencher le processus photosynthétique. Celui-ci fournira l'énergie nécessaire au bon déroulement des stades ultérieurs du développement végétal (Bayoumi *et al.*, 2008).

La production de biomasse, exprimée en termes de poids frais et sec des 2 parties aérienne et racinaire, est largement affectée par le degré de salinité du milieu, spécialement à 200 mM/ NaCl. Une inhibition de l'absorption du potassium et du calcium et de leur transport vers les parties aériennes seraient la cause principale de cette chute (Zhu 2003 ; Munns *et al.*, 2006). Selon Demidchik et Tester (2002), le calcium est nécessaire pour le rétablissement du rapport K^+ / Na^+ ce qui favorise la tolérance des plantes à la salinité (Qiu *et al.*, 2002). Un apport exogène de cet élément dans le milieu de culture augmente l'halotolérance des plantes (Delian *et al.*, 2014). De plus l'accumulation des ions Na^+ et Cl^- dans les feuilles est une cause principale de sensibilité « ionique » des variétés de blé dur (Watson *et al.*, 2001).

Ainsi, la réduction de la croissance est une stratégie adaptative des plantes aux stress abiotiques, permettant à la plante de minimiser ses dépenses énergétiques pour faire face au déséquilibre entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme avant que les dommages ne soient irréversibles (Zhu, 2003).

La production de proline compte parmi les paramètres biochimiques étudiés chez les plantes lors d'un stress abiotique. Après 15 jours de croissance sur milieu MS, la production

de proline chez les jeunes plantules est induite, essentiellement à 200 mM/ NaCl. Ce constat est similaire dans plusieurs travaux sur le blé tels que Sabry *et al.* (1995) et Tahri *et al.* (1998).

L'accumulation cytoplasmique de cet osmolyte synthétisé *de novo* restaure la turgescence et protège les structures des macromolécules et la membrane cellulaire contre la dénaturation (Le Rudulier, 2005). Elle joue un rôle évident dans le piégeage des radicaux libres induits par le stress (Ashraf et Foolad, 2007). D'après Roosen *et al.* (1998), l'accumulation de cet imino-acide en réponse au stress est la conséquence d'une diminution de la synthèse protéique et d'une reconversion du glutamate en proline.

Le dosage de la chlorophylle dans les feuilles des jeunes plantules est un autre critère important qui rend visible la conséquence de l'exposition au sel pendant 11 jours. Les résultats visualisent une atteinte du processus photosynthétique. À 100 mM, la chl a n'est pas affectée, une chute importante existe en présence de 200 mM, par contre la chl b chute très significativement ($P \leq 0.001$) à partir 100 mM, résultat analogue à ceux de Amirjani (2011). La chlorophylle totale baisse fortement ($P \leq 0.001$) quand la teneur de NaCl est maximale.

En effet, les études montrent une atteinte de la structure des chloroplastes dans des conditions de stress entraînant une désorganisation des systèmes granaires et lamellaires (Keiper *et al.*, 1990 ; Ben Khaled *et al.* (2003). La perméabilité des membranes thylakoïdiennes aux ions Na^+ et Cl^- est faible ce qui permettrait le maintien d'une certaine capacité photosynthétique sous la contrainte saline (Flowers et Yeo, 1995). L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS), tel que l'ion superoxyde activé dans les tissus, favoriserait l'oxydation des lipides membranaires (Hernandez *et al.*, 1995).

Suite à la génération de radicaux libres dans les chloroplastes, les caroténoïdes prennent le relais. Il s'agit de pigments jaunes protégeant la chlorophylle des phénomènes d'oxydation causés par les espèces radicalaires (Sandmann *et al.*, 2006), en plus de leur intervention dans l'acte photosynthétique.

Le dosage des pigments caroténoïdes permet de déceler une augmentation de la synthèse en fonction de la salinité, le taux maximal étant enregistré à 200 mM. En effet, sous l'action néfaste du sel engendrant une accumulation d'espèces radicalaires et une dégradation membranaire, la non pigmentation chlorophyllienne laisse apparaître une étape transitoire de feuilles colorées en jaune du fait de la présence des caroténoïdes et de xanthophylle (Los et Murata, 2004).

En général, il est noté une corrélation négative avec le sel (Murray et Freeman, 1997 ; Saha *et al.*, 2010), cependant une augmentation significative ($P \leq 0.05$) à 200 mM est enregistrée au

cours de la présente étude. Ceci serait lié à la variété de blé utilisé et au stade de la croissance végétale concerné par le dosage en ce moment précis. Au cours de la durée de croissance (15 jours), le taux de caroténoïdes n'est pas totalement affecté, l'absence de ces pigments dans les feuilles plus âgées désorganiserait l'appareil photosynthétique et causerait une sénescence des feuilles.

La production de caroténoïdes par la variété Mohamed Ben Bachir serait- il alors un autre moyen de résistance au stress ?

La co-inoculation du blé avec les 2 souches de *P. fluorescens* RB13 et CHAO a donné lieu à une atténuation du stress imposé sur les caractères morpho-physiologiques, à savoir : nombre de feuilles, longueur, poids frais et sec de la partie aérienne, d'une part et nombre, longueur et poids frais des racines d'autre part. Les taux de proline, de chlorophylle et de caroténoïdes des feuilles sont positivement ajustés.

L'avantage de l'inoculation des semences par des PGPR est largement abordé par la littérature scientifique. Les espèces fluorescentes de *Pseudomonas* ont attiré beaucoup l'attention vue leur grande capacité de favoriser la croissance des plantes sous des conditions défavorables. L'inoculation des graines de blé par *P. putida*, *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens* sous stress salin a amélioré la hauteur des plantules, la longueur de la racine, le rendement des graines, le taux de chlorophylle et le rapport K^+ / Na^+ (Nadeem *et al.*, 2007, 2009 ; Zahir *et al.*, 2009). La majorité des espèces testées produisent des teneurs considérables d'AIA (Glick, 1995). Ainsi, les bactéries rhizosphériques supplémentent la plante en cette auxine et participeraient au maintien de la croissance racinaire et foliaire (Glick, 1995). D'après les travaux de Egamberdieva (2009), la bactérisation du blé par des *Pseudomonas* à 200 mM/ NaCl a augmenté de 40% la longueur des racines et de 52% celle des tiges. Les 2 souches utilisées dans cette étude produisent des quantités importantes de cette auxine : 50,95 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (*P. fluorescens* RB13) et 88,37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CHAO), alors que de faibles quantités de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-12} M suffisent pour la croissance primaire des racines (Neuwley et Pilet, 1991)

Chez les plantes, l'éthylène est parmi les hormones dont la production est stimulée par le stress salin (Glick, 2005). Les bactéries disposant d'une enzyme ACC désaminase scindent le précurseur de l'éthylène (ACC) et par conséquent abaissent le taux d'éthylène chez les plantes affectées par le sel (Glick, 2005) telles que les tomates, poivre et haricot (Mâyak *et al.*, 2004 ; Nadeem *et al.*, 2009). L'inoculation du blé par *P. putida* et *fluorescens* possédant une ACC désaminase rétablit toutes les caractéristiques d'un développement normal à savoir :

un rapport K^+ / Na^+ élevé, un taux faible de proline mais élevé de chlorophylle (Nadeem *et al.*, 2010).

La salinité du sol réduit significativement l'absorption des éléments minéraux, en particulier le phosphore (P) suite à la précipitation des ions phosphates liés aux Ca^{+2} . Ils deviennent alors inaccessibles aux plantes (Grattan et Grieve 1999). Les bactéries rhizosphériques peuvent récupérer ces formes en les solubilisant et les rendant de nouveau disponibles à la plante même à des teneurs salines élevées (60 g/l) (Son *et al.*, 2006, Upadhyay *et al.*, 2012). Cependant Cherif- Silini *et al.* (2013) ont confirmé une diminution notable de cette activité au-delà de 4% de NaCl dans le milieu de culture. *In vitro*, *P. fluorescens* RB13 et CHA0 utilisés comme inocula solubilisent 187,9 et 50.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement (Arif *et al.*, 2015). Cette activité serait conservée dans le milieu de germination (MS) contenant l'élément en question, ce qui aurait contribué efficacement à la levée de l'inhibition et la stimulation de la croissance des plantules.

La colonisation de la plante soumise aux contraintes salines par des rhizobactéries actives est un atout non négligeable. Par la synthèse d'exopolysaccharides (EPS), les bactéries adhèrent à la plante et se lient aux ions, dont les Na^+ , ce qui atténue le stress ionique (Ashraf *et al.*, 2006). En effet, l'inoculation des semences par des espèces de *Pseudomonas* productrices d'EPS optimisent tous les paramètres étudiés chez le blé (Ashraf *et al.*, 2006), le tournesol (Sandhaya *et al.*, 2009) et le maïs (Nemat *et al.*, 2012).

L'amélioration des paramètres morfo-biochimiques des plantules de blé est probablement la conséquence de la capacité de nos inocula à accumuler des osmolytes ou à les synthétiser à partir des composants du milieu MS. Effectivement, sous l'impact d'une pression osmotique du milieu, les bactéries accumulent des solutés compatibles (sucres ou acides aminés) pour surmonter le stress, comme exemple, citons *P. fluorescens* MSP-393 capable de produire divers osmolytes tels que l'alanine, la glycine et l'acide glutamique (Paul et Nair, 2008).

Notons, enfin, que les rhizobactéries sont plus halotolérantes que les bactéries du sol (non rhizosphériques), du fait que la pression osmotique est plus accentuée dans la rhizosphère suite à l'épuisement de l'eau par les racines (Tripathi *et al.*, 1998).

L'apport exogène d'O.P, en l'occurrence la GB et l'extrait de *U. lactuca* a favorisé une restauration de la croissance végétale avec des valeurs équivalentes ou légèrement supérieures à celle de l'inoculation. Selon la littérature, il n'existe pas de travaux combinant entre inoculation sous stress salin et apport exogène d'O.P synthétiques ou naturels. Cependant, une meilleure germination du blé et un bon rendement sont enregistrés par Nabti *et al.* (2010) et

Silini (2013), en conséquence à une bactérisation des graines par *Azospirillum brasilens* et *Azotobacter vinelandii* et une addition d'O.P (GB, proline ou extrait de *U. lactuca*). Les taux de proline, de chlorophylle et de sucres sont considérablement rétablis.

4- Conclusion

La germination est un critère important ayant des répercussions sur la croissance ultérieure et le rendement.

Le milieu MS utilisé pour la croissance des plantes et l'étude des pararamètres morpho-biochimiques s'est révélé adéquat pour la germination et la croissance du blé

Les résultats de la présente étude montrent une action négative du sel sur la germination du blé dur variété Mohamed Ben Bachir. *In vitro*, le nombre et la longueur des racines et des feuilles chutent drastiquement à 200 mM/ NaCl. Les biomasses (fraîche et sèche) de ces deux parties de la plante sont affectées de la même façon. Le système photosynthétique à travers toutes ses composantes (chl a, chl b et caroténoïdes) n'est pas épargné de cette action délétère du sel.

La co- inoculation du blé associée à un apport exogène d'O.P naturel a donné des résultats encourageants, pouvant être développées et appliqués *in vivo* (sur champs) pour une mise en place d'une agriculture durable dans les régions affectées par le sel.

Conclusion générale et perspectives

Les microorganismes, par leur diversité, leur activité et leur abondance jouent un rôle primordial dans l'équilibre des écosystèmes. L'évaluation de la charge bactérienne de 2 écosystèmes différents, fertile et salin, a révélé une richesse des rhizosphères des plantes (blé et halophyte) par rapport aux sols dépourvus de végétation. Malgré le stress imposé par le sol salin, l'endosphère de l'halophyte abrite un nombre considérable de bactéries à Gram-fluorescents.

Les isolats maintenus sont testés pour leurs pouvoir promoteur de la croissance végétale ont pour la plupart manifesté des activités phytostimulantes à travers la synthèse d'AIA et / ou biofertilisante par la capacité de solubilisation des phosphates. Le caractère de biocontrôle est traduit par l'inhibition de phytopathogènes suite à la production d'HCN et / ou de sidérophores.

Les souches de *Pseudomonas* fluorescents tolèrent des teneurs en sel proches de celles d'un sol salin. Elles répondant positivement à un apport exogène d'osmoprotecteurs synthétiques (GB et Pro) et naturels (extraits de *U. lactuca* et de *A. halimus*).

Au-delà de 200 mM/ NaCl la germination est significativement affectée avec des taux réduits et des biomasses faibles. L'analyse de la variance montre un impact meilleur de la co-inoculation par rapport à l'utilisation de chaque souche à part. La supplémentation d'O.P renforce l'effet de l'inoculation sauf l'extrait de l'halophyte *A. halimus* qui s'est montré inhibiteur de la germination, ce qui incite à revoir la manière de sa préparation.

Les résultats dégagés de l'étude *in vitro* permettent une compréhension de l'effet du sel sur les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques du blé, variable selon le niveau de salinité. La longueur des racines, de la partie aérienne, ainsi que leurs poids frais et sec attestent l'effet négatif du stress sur ces différents paramètres de croissance. Les teneurs de proline et de chlorophylle dans les feuilles sont considérablement atteintes en présence de 200 mM/ NaCl.

Malgré l'effet dépressif du sel, la variété Mohamed ben Bachir co-inoculée par *P. fluorescens* RB13 et CHA0 en présence ou en absence d'osmoprotecteurs (GB, Pro et l'extrait aqueux de *U. lactuca*) montre une certaine tolérance du stress salin et ce jusqu'à un seuil critique (100 mM).

Les résultats de cette étude encouragent le passage vers une « **bio**-agriculture » saine et bénéfique à la santé humaine et à l'économie nationale. L'exploitation de bactéries rhizosphériques comme agents de biofertilisation et de biocontrôle s'impose comme une

alternative aux produits chimiques (fertilisants ou pesticides) tant nuisibles pour l'environnement que pour la santé publique. Dans les régions affectées par la salinité, un recours aux osmoprotecteurs naturels pour renforcer les inocula bactériens serait d'un grand intérêt économique.

Les résultats prometteurs de l'inoculation du blé par des souches locales incitent à :

- **Poursuivre la recherche de spécimens bactériens tolérants aux stress abiotiques (sécheresse, salinité) à partir d'écosystèmes extrêmes (sebkha, désert, zones arides, ...)**
- **Évaluer l'effet de stress sur les différentes activités PGPR des souches avant leur inoculation**
- **Procéder à la co-inoculation avec des genres bactériens différents (2 ou plus)**
- **Tester l'effet de l'inoculation et des osmoprotecteurs sur d'autres variétés de blé utilisés en Algérie**
- **Mettre au point d'autres techniques simples et fiables d'extraction des molécules osmoprotectrices à partir des halophytes.**
- **Faire un scanning de plantes halophytes et d'algues marines présentes sur le territoire Algérien pour tirer profit de notre patrimoine biologique**

Enfin, Le passage à des essais sur champs est une obligation pour la confirmation de données reçues *in vitro*.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbaspoor, A., H. R. Zabihi, S. Movafegh et M. H. A. Asl. 2009.** The efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of two varieties of wheat in salinity condition. *Am. Euras. J. Sust. Agric.*, **3**:824- 828.
- Ahemad, M. et M. Kibret. 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: *Current perspective J. King Saud Univer. Science*, **26**: 1-20.
- Ahmad F, I. Ahmad et M. S. Khan. 2005.** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, **29**: 29- 34.
- Ahmad F., I. Ahmad et M. S. Khan. 2008.** Screening of free-living rhizobacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.*, **163**:173-181.
- Ahmad, M., Z. A. Zahir, F. Nazli, F. Akram, M. Arshad et M. Khalid. 2013.** Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Braz. J. Microbiol.*, **44**: 1341- 1348.
- Alami, Y., W. Achouak, C. Marol et T. Heulin.2000.** Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide producing *Rhizobium* sp strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3393- 3398.
- Allu, S., N. P. Kumar et A. V. Audipudi. 2014.** Isolation, Biochemical and PGP characterization of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chilli red fruit antagonistic against chilli anthracnose disease. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **3**: 318-329.
- Amirjani, M. R. 2011.** Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *Int. J. Bot.* **7**:73- 81.
- Anne, P. 1945.** Sur le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann. Agron.*, **2**: 161-172.
- Antoun, H. et J. W. Kloepper. 2001.** Plant growth promoting rhizobacteria. pp. 1477–1480. *In*: Brenner S., J. H. Miller (Eds). *Encyclopedia of Genetics*. Academic; New York: 2001.
- Anzai, Y., H. Kim, J. Y. Park, H. Wakabayashi et H. Oyaizu. 2000.** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 1563–1589
- Arif, F, A Silini, H. Cherif-Silini et M. Ghouli. 2015.** Plant growth promoting and antagonistic traits of indigenous fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from wheat rhizosphere and *A. halimus* endosphere. *E. S. J.*, **11**: 129- 148.
- Ashraf, M. et M. R. Foolad. 2007.** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.*, **59**: 206- 216.
- Ashraf, M., S. Hasnain et O. Berge. 2006.** Effect of exo-polysaccharides producing bacterial inoculation on growth of roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown in a salt-affected soil. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, **3** : 43-51.
- Ashraf, M., S. Hasnain, O. Berge et T. Mahmood. 2004.** Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol Fertil Soils*, **40**: 157- 162.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith et K. Struhl. 1989.** *Current Protocols in molecular biology*. John Wiley (ed.), New York.
- Awad, N. M., A. Sh. Turkey, M. T. Abdelhamid, M. Attia. 2012.** Ameliorate of environmental salt stress on the growth of *Zea mays* L. plants by exopolysaccharides producing bacteria. *J. Appl. Sci. Res.*, **8**: 2034-2044.

- Ayers, R. S. et D. W. Westcot. 1994.** Water quality for agriculture, irrigation and drainage. F. A. O irrigation and drainage Bull., **29**.
- Bais, H. P., R. Fall et J. M Vivanco. 2004.** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.*, **134** : 307–319.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy et J. M. Vivanco. 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**:233–266.
- Bakker A. W. et P. Schippers. 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and Pseudomonas spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.*, **19**: 451- 457.
- Bar-Ness, E., Y. Chen, Y. Hadar, H. Marschner et V. Römheld. 1991.** Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot Plants. *Plant and Soil*, **130**: 231-241.
- Bayoumi, T. Y., H. Manal et E. M. Metwali. 2008.** Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *Afr. J. biotechnol.*, **14**: 2341- 2352.
- Becker, D., R. Stanke, I. Fendrik, W.B. Frommer, J. Vanderleyden, W.M. Kaiser et R Hedrich. 2002.** Expression of the NH_4^+ -transporter gene LEAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N_2 - fixing bacteria. *Planta*, **215**: 424-429.
- Ben Khaled, L., A. Morte Gomez, M. Honrubia et A. Oihabi. 2003.** Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé avec *Rhizobium*. *Agronomie*, **23** : 571- 580.
- Ben Naceur M., C. Rahmoune, H. Sdiri, M. L. Meddahi, M. Selmi. 2001.** Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains de quelques variétés maghrébines de blé. *Sécheresse*, **12**: 167-74.
- Bernard, T., J. A. Pocard, B. Perroud et D. Le Rudulier. 1986.** Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.*, **143**: 359- 364.
- Bessieres, M. A. 1998.** Solutés compatibles des halophytes littorales : production et possibilité de transfert vers les procaryotes associés. Thèse de Doctorat. Université de Rennes I, France.
- Bewley J. D. 1997.** Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, **9**: 1055 – 1066.
- Beyler, M., C. keel, P. Mixhaux et D. Haas. 1999.** Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **28**: 225 – 233.
- Bharucha, U., P. Kamlesh et U. B. Trivedi. 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.*, **3**: 215–221.
- Bhattacharyya, P. N. et D. K. Jha. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**: 1327–1350. *Curr. Microbiol.*, **56**: 140- 144.
- Bliss, R. D., K. A. Platt-Alloia et W. W Thomson. 1986.** The inhibition effect of NaCl on barley germination. *Plant Cell Environ.*, **9** : 727-733.

- Blumer, C. et D. Haas. 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, **173**: 170-177.
- Boch, J., B. Kempf, E. Bremer.(1994).** Osmoregulation in *Bacillus subtilis* : synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol.*, **176**: 5364-5371.
- Bohnert, H. J. et B. Shen. 1999.** Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae*, **78**: 237- 260.
- Boisvert, C. 1984.** La cuisine des plantes sauvages. pp. 302. Dargaud (ed.), Paris.
- Bonaterrea, A., J. Cabrefiga, J. Camps et E. Montensinos. 2007.** Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **61**: 185-195.
- Boncompagni, E., M. Østerås, MC. Poggi, et D. Le Rudulier. 1999.** Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2072- 2077.
- Bottini, R., F. Cassán et P. Piccoli. 2004.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**: 497–503.
- Bourgeois-Chaillou, P. F. Perez-Alfocea et G. Guerrier. 1991.** Evolution ontogénique de la tolerance au NaCl chez le soja : comparaison des réponses au sel à deux stades de développement et chez les calcs correspondants. *Can. J. Bot.*, **70**: 1346- 1356.
- Bowen, G. et A. Rovira. 1999.** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv.Agron.*, **66**, 1-102. *Can. J. Microbiol.*, **12**: 531-537.
- Brown, R. F. et D. G. Mayer. 1988.** Representing cumulative germination. 1. A critical analysis of single-value germination indices. *Annal. Bot.*, **61**: 117-125.
- Bui, E. N. 2013.** Soil salinity: A neglected factor in plant ecology and biogeography. *J. arid Environ.*, **92**: 14- 25.
- Buysens, S., K. Heungens, J. Poppe et M. Hofte. 1996.** Involvement of pyochelin and pyoverdin in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 865-871.
- Cappuccino J. G. et N. Sherman. 1992.** Biochemical activities of microorganisms. *In: Microbiology, A Laboratory Manual*, third Ed. The Benjamin / Cummings Pub. Co., pp. 125–179. California, USA.
- Castric, P. A. 1975.** Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, **21** :613-18.
- Ceuwford, D. L., J. M. Lynch, J. M. WHIPPS et M. A. OUSLEY. 1993.** Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3899-3905.
- Chen, X. H., A. Koumoutsi, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Süßmuth, J. Piel et R. Borriss. 2009.** Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.*, **140**: 27-37.

- Chen, Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W. A. Lai et C.C. Young. 2006.** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.*, **34**: 33- 41.
- Cherif-Silini H., A. Silini, M. Ghoul, B. Yahiaoui et F. Arif. 2013.** Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **7** : 4562-4571.
- Chin-A-Woeng, T. F., G. V. Bloemberg, I. H. Mulders, L. C. Dekkers et B. J. Lugtenberg . 2000.** Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **13**:1340- 1345.
- Côme, D. 1982.** Germination. In Mazliak, P. Croissance et développement. Physiologie végétal II. pp : 129- 225. Collection Méthodes, Harman, Paris.
- Compant, S., H. Kaplan, A. Sessitsch, J. Nowak, E. Ait Barka et C. Clément. 2008.** Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**: 84- 93.
- Cornelis, P. 2010.** Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**: 1637-1645.
- Cosquer, A., V. Pichereau, J. A. Pocard, J. Minet et T. Bernard. 1999.** Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65** : 3304- 3311.
- Couillerot, O., C. Prigent-Combaret, J. Caballero-Mellado et Y. Moëgne-Loccoz. 2009.** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, **48**: 505- 512.
- Csonka, L. N. 1989.** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, **53**: 121- 147.
- Csonka, L. N. et A. D. Hanson. 1991.** Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology. *Ann. Rev. Microbiol.*, **45**: 569- 606.
- Curl, E.A. et B. Truelove. 1986.** The rhizosphere. 288 pp. Springer-Verlag (Ed.). Berlin.
- D'souza-Ault, M. R., L. T. Smith et G. M. Smith. 1993.** Roles of acetylglutaminyglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** : 473- 478.
- Dantas, B. F, L. de Sa Ribeiro, C. A. Aragao. 2007.** Germination, initial growth and cotyledon protein content of bean cultivars under salinity stress. *Rev. Bras. Sementes*, **29**: 106- 110.
- Davet, P. 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. pp. 19- 20. INRA (Ed.), Paris.
- Debez, A., W. Chaibi et S. Bouzid. 2001.** Effet du NaCl et de régulateurs de croissance sur la germination d'*Atriplex halimus* L. Cahiers d'études et de recherches francophones/ agriculture. **10** :135- 138.
- De Salamone, I. E. G., R. K Hynes et LM. Nelson. 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol.*, **47**:404–411.
- Delian, E., A. Chira, L. Bădulescu, L. Chira. 2014.** Calcium alleviates stress in plants: insight into regulatory mechanisms. *Agro Life Sci. J.*, **3**: 19- 28.

- Diby, Y. 2013.** Osmotic stress adaptations in rhizobacteria. *J. Basic microbial.*, **53**: 101- 110.
- Dubey, S. K . 1996.** Combined effect of Bradyrhizobium japonicum and phosphate-solubilizing *Pseudomonas striata* on nodulation, yield attributes and yield of rainfed soybean (*Glycine max*) under different sources of phosphorus in Vertisols. *Ind. J. Microbiol.*, **33**:61- 65.
- Duijff, B. J., J. W. Meijer, P. A. H. M. Bakker et B. Schippers. 1993.** Siderophore mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Neth. J. Plant Pathol.*, **99**: 277–289.
- Dunne, C., J. J. Crowley, Y. Moenne-Loccoz, D. N. Dowling, F. J. De Bruijin et F. O’Gara. 1997.** Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology*, **143**: 3921-3931.
- Durand, L. M. C. et G. R. Knusden. 2002.** Sampling microbes from the rhizosphere and phyllosphere, pp. 516- 526. *In* Hurst, C. J., R. L. Crawford, G. R. Knusden, M. J. Mc Inerney and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington.
- Egamberdieva, D. 2009.** Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiol Plant*, **31**: 861- 864.
- Egamberdieva, D. 2012.** Pseudomonas chlororaphis: a salt-tolerant bacterial inoculant for plant growth stimulation under saline soil conditions. *Acta Physiol. Plant*, **34**: 751- 756.
- Ehsanpour, A. A. et N. Fatahian. 2003.** Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, **73**: 53-56.
- El-Sharkawi, H. M. et I. Springuel. 1979.** Germination of same crop plant seeds under salinity stress. *Seed Sci. Technol.*, **7**: 27- 37.
- Empadinhas, N. et MS. da Costa. 2008.** Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.*, **11** : 151-61.
- Euzéby, J.P. 2008.** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- Fahad, S., S. Hussain, A. Bano, S. Saud, S. Hassan, D. Shan, F. A. Khan, F. Khan, Y. Chen, C. Wu, M. A. Tabassum, M. X. Chun, M. Afzal, A. Jan, M. T. Jan et J. Huang. 2015.** Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**: 4907- 4921.
- Fenice, M., L. Selbman, F. Federici et N. Vassilev. 2000.** Application of encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresource Technol.*, **73**: 157-162.
- Forchetti, G., O. Masciarelli, S. Alemano D. Alvarez et G. Abdala. 2007.** Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**:1145–1152.
- Fowler, J. L. 1991.** Interaction of salinity and temperature on the germination of crame. *Agron. J.* **83**: 169- 172.
- Flowers, T. J. et T. D. Colmer. 2015.** Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Ann. Bot.*, **115**: 327- 331.
- Flowers, T. J., R. Munns et T. D. Colmer. 2015.** Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Ann. Bot.*, **115**: 419- 431.

- Fraser T. E., K. W. Silk et T. L. Rost. 1990.** Effect of low water potential on cortical cell length in growing region of maize roots. *Plant Physiol.*, **93**: 648- 651.
- Fukaki, H., Y. Okushima, M. Tasaka. 2007.** Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, **256**: 111–137.
- Galinski, E. A. 1995.** Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.*, **37**: 273- 328.
- Galinski, E. A. et H. G. Trüper. 1994.** Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS microbiol. Rev.*, **15**: 95- 108.
- Gerhardson, B. 2002.** Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.*, **20**: 338–343.
- Gholamin, R. et M. Khayatnezhad. 2011.** The Effects of water and salt stresses on germination in two bread wheat genotypes. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**: 17805-17811
- Ghoul, M. 1990.** Halotolérance de *Escherichia coli*: effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de Doctorat. Université de Rennes1. France.
- Ghoul, M., J. Minet, T. Bernard, E. Dupray et M. Cormier. 1995.** Marine macroalgae as a source for osmoprotection for *Escherichia coli*. *Microbiol. Ecol.*, **30**: 171-181.
- Ghoul, M., M. Pommepeuy, A. Moillo-Batt et M. Cormier. 1989.** Effect of Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone on *Escherichia coli* Halotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1040-1043.
- Glenn, E., J. J. Brown et E. Blumwald. 1999.** Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **18**: 227- 255.
- Glick, B. R., B. Todorovic, J. Czarny, Z. Cheng, J. Duan et B. McConkey. 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **26**: 227–242.
- Glick, B. R., C. Liu, S. Ghosh et E. B. Dumbrof. 1997.** Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biol. Biochem.*, **29**: 1233-1239.
- Glick, B. R. 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**:109– 117.
- Glick, B. R. 2005.** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbio. Lett.*, **251**: 1- 7.
- Gobat, J-M., M. Aragno et W. Matthey. 2004.** The living soil. Fundamentals of soil science and soil biology. pp: 82- 85. Science Publishers (Ed.), U.S. A.
- Gomes-Filho, E., C. R. F. Machado Lima, J. H. Costa, A. C. da Silva, M. da Guia Silva Lima, C. F. de Lacerda et J. T. Prisco. 2008.** Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. *Plant Cell Rep.*, **27**: 147- 157.
- Gordon, S. A. et R. P. Weber. 1951.** Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.*, **26**:192–195.
- Goswami, D., H. Vaghela, S. Parmar, P. Dhandhukia et J. N. Thakker. 2013.** Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas* spp. strain OG isolated from marine water. *J. Plant Inter.*, **8**: 281- 290.
- Gouesbet, G, C. Blanco, J. Hamelin et T. Bernard. 1992.** Osmotic adjustment in *Brevibacterium ammoniagenes*: pipecolic acid accumulation at elevated osmolalities. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 959-965

- Gould, W. D., C. Hagedorn, T. R. Bardinelli et R. M. Zablutowicz. 1985.** New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 28- 32.
- Grattan, S. R. et C. M. Grieve. 1992.** Mineral acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **38**: 275- 300.
- Grattan, S.R. et C.M. Grieve. 1999.** Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci. Hortic.*, **78**: 149- 190.
- Gray T. R. G. et S. T. Williams. 1971.** Microbial productivity in soil. pp: 225. *In: Microbes and Biological productivity.* Hughes,D.E. et A. H. Rose (Eds.). Cambridge, University Press, London.
- Greenway, H. et R. Munns. 1980.** Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **31**: 149- 190.
- Guerrier, G. 1984.** Relation entre la tolérance ou la sensibilité à la salinité lors de la germination des semences et les composantes de la nutrition en sodium. *Biol. Planta*, **26**: 22-28.
- Guiry, M. D. et G. M. Guiry. 2012.** *Algaebase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Haas, D. et G. Défago. 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**: 307- 319.
- Hamilton III, E. W. et S. A. Heckathorn. 2001.** Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol.* **126**: 1266- 1274.
- Hammer, P. E., D. S. Hill, S. T. Lam, K. H. Van Pée, et J. M. Ligon. 1997.** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 2147-2154.
- Hammer, P. E., W. Burd, S. D. Hill, J. M. Ligon et K. H. Van Pée. 1999.** Conservation of the pyrrolnitrin gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbio. Lett.*, **180**: 39-44
- Hanson, A. D., B. Rathinasabapathi, B. Chamberlin et D. A. Gage. 1991.** Comparative physiological evidence that β -alanine betaine and choline-O-sulfate act as compatible osmolytes in halophylitic *Limonium* species. *Plant Physiol.*, **97**: 1199- 1205.
- Hasegawa, P. M., R. A. Bressan, J. K. Zhu et H. J. Bohnert. 2000.** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**: 463- 499.
- Hardoim, P. R., L.S. van Overbeek et J.D. van Elsas. 2008.** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.*, **16**: 463–471.
- Hemida, K. A., R. M. Ali, W. M. Ibrahim et A. S.Makram. 2014.** Ameliorative role of some antioxidant compounds on physiological parameters and antioxidants response of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under salinity stress. *Life Sci. J.*, **11**: 324- 342.
- Hernandez, J. A., E. Olmos, F. J. Corpas, F. Sevilla et L. A. Del Rio. 1995.** Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.*, **105**: 151-167.

- Hernandez, J. A., M. A. Ferrer, A. Jimenez, A. R. Bacelo et F. Sevilla. 2001.** Antioxidant systems and O_2^- / H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.*, **127**: 817- 831.
- Holt, J. G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley et S.T. Williams. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 th Ed. Williams &Wilkins, Baltimore, MS, USA.
- Howell, C. R., R. C., Beier et R. D. Stipanovic, 1988.** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* pre- emergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology* **78**:1075-1078.
- Hunter-Cevera, J. C. et A. Belt. 1999.** Isolation of cultures, p. 3- 20. In Demain A. L. et J. E. Davies (ed.), Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press, Washington.
- Huybens, N., J. Mainil et D. Marlier. 2009.** Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Ann. Méd. Vét.*, **153** : 112-128.
- Ibrahim, W. M., R. M. Ali, K. A. Hemida et M. A. Sayed. 2014.** Role of *Ulva lactuca* extract in alleviation of salinity stress on wheat seedlings. *The Sci. World J.*, **1**- 11.
- Jaouadi, W., L. Hamrouni, N. Souayah et M. K. Larbi. 2010.** Étude de la germination des graines d'*Acacia tortilis* sous différentes contraintes abiotiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **14**: 643-652.
- Jenny, H. et K. Grossenbacher. 1963.** Root-soil boundary zones as seen in the electron microscope. *Proc. Soi Sci. Soc. Am.*, **27**: 273-277.
- Johnson, J. L. et E. J. Ordal. 1968.** Desoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *J. Bacteriol.*, **95**: 893–900.
- Joseph, B., R. Ranjan Patra et R. Lawrence. 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.* **1**: 141- 152.
- Josephson, K. L., C. P. Gebra et I. L. Pepper. 2000.** Cultural methods. pp: 213- 217. In Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba (ed.), Environmental microbiology. Academic Press, London.
- Jourdan, E. M. Ongena et P. Thonart. 2008.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc Environ* **12** : 437-449.
- Kadereit, G., E. V. Mavrodiev, E. H. Zacharias et A. P. Sukhorukov. 2010.** Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 photosynthesis. *Am. J. Bot.*, **97**: 1664- 1687.
- Kandowangko, N. Y., G. Suryatmana, N. Nurlaeny et R. D. M. Simanungkalit. 2009.** Proline and abscisic acid content in droughted corn plant inoculated with *Azospirillum* sp. and arbuscular mycorrhizae fungi. *J. Biosci.*, **16**: 15- 20.
- Kang, B. G., W.T. Kim, H. S. Yun et S. C. Chang. 2010.** Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnol. Rep.*, **4**: 179–183.
- Kang, B. R., K. Y. Yang, B. H. Cho, T. H. Han, I. S. Kim, M. C Lee, A. J Anderson et Y. C. Kim. 2006.** Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Curr. Microbiol.*, **52**:473–476.
- 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**: 61- 63.

- Katembe, W. J., I. A. Ungar et J. P. Mithell. 1998.** Effects of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (*Chenopodiaceae*). *Ann. Bot.*, **82**: 165 - 175.
- Keel, C. et G. Défago. 1997.** Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. p. 27- 47. In A. C. Gange, V. K. Brown (Eds.), *Multitrophic interactions in terrestrial system*. Blackwell Science, Oxford.
- Keiffer, C. H. et I. A. Ungar. 2002.** Germination and establishment of halophytes on birne-affected soils. *J. Appl. Ecol.*, **39**: 402- 415.
- Keiper, F. J., D. M. Chen et F. L. De Filippis. 1998.** Respiratory, photosynthetic and ultrastructural changes accompanying salt adaptation in culture of *Eucalyptus microcorys*. *J. Plant Physiol.*, **152**: 564- 573.
- Kempf, B. et E. Bremer. 1998.** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, **170**: 319- 330.
- Kent, A. D. et E. W. Triplett. 2002.** Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Ann. Rev. Microbiol.*, **56**: 211- 236.
- Kerstens, K., W. Ludwig, M. Vancanneyt, P. Devos, M. Gillis et K.H. Schleifer. 1996.** Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Syst. Appl. Microbiol.*, **19**: 465-477.
- Kerstiens, G., W. Tych, M. F. Robinson et T. A. Mansfield. 2002.** Sodium-related partial stomatal closure and salt tolerance of *Aster tripolium*. *New Phytol.*, **153**: 509- 515.
- Kets, E. P. W., E. A. Galinski, M. De Wit, J. A. M. De Bont et H. J. Heipieper. 1996.** Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* **178**: 6665- 6670.
- Khalid, A., M. Arshad et Z. A. Zahir. 2004.** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl Microbiol.*, **96**: 473- 480.
- Khalid, A., M. Arshad et Z. A. Zahir. 2006.** Phytohormones: microbial production and applications. In: Uphoff N, A. S Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga et J. Thies (Eds). *Biological approaches to sustainable soil systems*. Taylor & Francis, Boca Raton, pp: 207-220
- Khan, M. A. et Y. Rizvi. 1994.** Effect of salinity, temperature and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. Stocksii. *Can. J. Bot.*, **72**: 475-479.
- Khan, M. A., I. A. Ungar et A. M. Showalter. 2000.** The effect of salinity on the growth, water status and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Sueda fruticosa* (L.) Forssk. *J. arid Environ.*, **45** : 73- 84.
- King, E. O., M. K. Ward et D. E. Raney. 1954.** Two simple media for the determination of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, **44**: 301-307.
- Kloepper, J.W. et M.N. Schroth, 1978.** Plant growth- promoting rhizobacteria on radishes. pp: 879- 882. In *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*.
- Kloepper J. W., R. Lifshitz et R. M. Zablotowicz. 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.*, **7**: 39-44.

- Kloepper, J. W., C.M. Ryu et S. Zhang. 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.*, **94** :1259–1266.
- Köhl, K. I. 1997.** The effect of NaCl on growth, dry matter allocation and ion uptake in salt marsh and inland populations of *Armeria maritima*. *New Phytol.*, **15**: 213- 225.
- Konnerup, D., L. Moir-Barnetson, O. Pedersen, E. J. Veneklaas, et T. D. Colmer. 2015.** Contrasting submergence tolerance in two species of stem-succulent halophytes is not determined by differences in stem internal oxygen dynamics. *Ann. Bot.*, **115**: 409- 418.
- Kumar, A., A. Kumar, S. Devi, S. Patil, C. Payal et S. Negi. 2012.** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Res. Sci. Technol.*, **4**: 01-05.
- Kumar, N. R., V. T. Arasu et P. Gunasekaran. 2002.** Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Sci.*, **82**: 1463-1466.
- Kurt, R. 1971.** Chromatographie sur couche mince. p. 398. Gauthier- Villards (ed.), Paris.
- Larsen, P. I., L. K. Sydnes, B. Landfald et A. R. Strøm. 1987.** Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic solutes: betaines, glutamic acid and trehalose. *Arch. Microbiol.*, **147**:1- 7.
- Laville, J., C. Voisard, C. Keel, M. Maurhofer, G. Défago et D. Haas. 1992.** Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **89**: 1562-1566.
- Lawton, J.H. et C. G Jones. 1995.** Linking species and ecosystems: organisms as ecosystems engineers. pp: 141- 150. In Jones C. G and J. H. Lawton (Eds), Linking species and ecosystems. Chapman and Hall. London.
- Le Houérou, H. N. 1993.** Salt-tolerant plants for the arid regions of the mediterranean isoclimatic zones, p. 403- 422. In Lieth, H. et A. AL Masoom (Eds.), Towards the rational use of high salinity tolerant plants, vol. 1. Kluwer Publishers, Netherlands.
- Le Rudulier, D. 2005.** Osmoregulation in rhizobia: The key role of compatible solutes. *Grain Leg.*, **42**: 18 - 19.
- Le Rudulier, D. et L. Bouillard. 1983.** Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 152- 159.
- Le Rudulier, D., A. R. Strøm, A. M. Dankbar, L. T. Smith et R. C. Valentine. 1984.** Molecular biology of osmoregulation. *Science*, **224**: 1064- 1068.
- Ledyard, K. M., E. F. DeLong et J. W. H. Dacey. 1993.** Characterization of a DMSP-degrading bacterial isolate from the Sargasso Sea. *Arch. Microbiol.*, **160**: 312- 318.
- Lone, M.I., J. S. H. Kueh, R. G. Wyn Jones et S. W. J. Bright. 1987.** Influence of proline and glycine betaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *J. Exp. Bot.*, **38**: 479- 490.
- Loper, J. E. et M. N. Schroth. 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopath.*, **76**: 386-389.
- Loper, J. E. et M. D. Henkels. 1999.** Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65** : 5357- 5363.

- Los, D. A. et N. Murata. 2004.** Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochem. Biophys. Acta*, **1666**: 142- 157.
- Lugtenberg B. et F. Kamilova. 2009.** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **63**: 541-556.
- Lutts, S., 2000.** Exogenous glycine betaine reduces sodium accumulation in salt-stressed rice plants. *Int. Rice Res. Notes*, **25**: 39- 40.
- Ma, J. F. 2005.** Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Crit. Rev. Plant Science*, **24**: 267-281.
- Mahmoodzadeh, H., F. M. Khorasani et H. Besharat. 2013.** Impact of salt stress on seed germination indices of five wheat cultivars. *Ann. bio. Res.*, **4**: 93- 96.
- Mäkelä, P., P. Peltonen-Sainio, K. Jokinen, E. Pehu, H. Setälä, R. Hinkkanen, et S. Somersalo. 1998.** Effect of foliar application of glycine betaine on stomatal conductance, abscisic acid and solute concentrations in leaves of salt- and drought-stressed tomato. *Aust. J. Plant Physiol.*, **25**: 655- 663.
- Mäkelä, P., R. Munns, T. D. Colmer et P. S. Pirjo. 2003.** Growth of tomato and an ABA-deficient mutant (*Sitiens*) under saline conditions. *Physiol. Plant.*, **117**: 58- 63.
- Manoharachary, C. et K.G. Mukerji. 2006.** Rhizosphere Biology – an Overview. pp: 3-8. *In: Microbial activity in the rhizosphere.* Mukerji, K. G., C. Manoharachary et J. Singh (Eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Mansour, M. M. F. 1998.** Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem.*, **36**: 767- 772.
- Marchl, N., J. L. Bourdon et C. L. Richard. 1982.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. pp. 117-118. Doin, Paris
- Marschner, P., C. H. Yang, R. Lieberei et D. E. Crowley. 2001.** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **33**:1437-1445.
- Mascher, F., C. Hase, Y. Moënné-locco et G. Défago. 2000.** The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66** : 1662-1667.
- Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas et G. Défago. 1995.** Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathol.*, **44**: 40- 50.
- Maurhofer, M., C. Reimann, P. Schmidli-Sacherer, S. Heeb, D. Haas et G. Défago. 1998.** Salicylic acid biosynthesis gene expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathol.* **88**: 678- 684.
- Mâyak, S., T. Tirosh et B. R. Glick. 2004.** Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.*, **166**: 525- 530.
- Mâyak, S., T. Tirosh et B. R. Glick. 2004.** Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.*, **42**: 565-572.

- McNeil, S. D., M. L. Nuccio et A. D. Hanson. 1999.** Betaines and related osmoprotectants : trargets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.*, **120**: 945- 949.
- Meade, H. M., S. R. Long, G. B. Ruvkun, S. E. Brown et F. M. Ausubel. 1982.** Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.*, **149**: 114-122.
- Mercado-Blanco, J. et P. A. H. M. Bakker. 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *A. VAN. LEEUW.*, **92**: 367–389.
- Meuwley, P. et P. E. Pilet. 1991.** Local treatment with indole-3-acetic acid induces differential growth responses in *Zea mays* L. roots. *Planta*, **185**: 58–64.
- Meyer, J. M. et M.A. Abdallah. 1978.** The fluorescent pigments of fluorescent *Pseudomonas*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen.Microbiol.*, **107**: 319- 328.
- Meyer, J. M., V. A. Geoffroy, N. Baida, L. Gardan, D. Izard, P. Lemanceau, W. Achouak et N. Palleroni. 2002.** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 2745–2753.
- Meyer, J.M., C. Gruffaz, V. Raharinosy, I. Bezverbnaya, M. Schafer et H. Budzikiewicz. 2008.** Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals*, **21**: 259–271.
- Minorsky, P. V. 2008.** On the inside. *Plant Physiol.*, **146**:323–324.
- Misra, N. et U. N. Dwivedi. 2004.** Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Sci.*, **166**: 1135- 1142.
- Monneveux, P. et M. Nemmar. 1986.** Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* desf.) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie*, **6** : 583- 590.
- Monneveux, D. 1997.** La génétique face aux problèmes de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse : espoirs et difficultés. *Cahiers Sécheresse*, **8** : 29- 37.
- Morel, R. 1989.** Les sols cultivés. Lavoisier (Ed.), Paris.
- Mrani Alaoui, M., L. El Jourmi, A. Ouarzane, S. Lazar, S. El Antri, M. Zahouily et A. Hmyene. 2013.** Effet du stress salin sur la germination et la croissance de six variétés marocaines de blé. *J. Mater. Environ. Sci.* **4** : 997-1004.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki., G. Horn et H. Erlich. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**: 263-273.
- Munns, R. 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**: 239- 250.
- Munns, R. et R. A. James. 2003.** Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil*, **253**: 201-218.
- Munns, R., R. A. James et A. Lauchli. 2006.** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, **57**: 1025-1043.
- Murashigue, T. et F. Skoog. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissus Cultures. *Physiol. Plantarum*, **15**:473- 497.

- Murray, E. D. et T. P. Freeman. 1974.** Effects of Moderate Water Deficit (Stress) on Wheat Seedling Growth and Plastid Pigment Development. *Physiol. Plantarum*, **31**: 262- 266.
- Murray, M. G. et W. F. Thompson. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, **8**: 4321–4325.
- Nabti E., M. Sahnoune , M. Ghoul, D. Fischer, A. Hofmann, M. Rothballer , M. Schmid et A. Hartmann. 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.
- Nabti, E., M. sahnoune, S. Adjrad, A. Van Dommelen, M. Ghoul, M. Schmid et A. Hartman. 2007.** A halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilens* strain from Algerian soil restores wheat growth under saline conditions. *Eng. Life. Sci.*, **7**: 354- 360.
- Nadeem S. M, Z. A. Zahir, M. Naveed, H. N. Asghar et M. Arshad. 2010.** Rhizobacteria capable of producing ACC-deaminase may mitigate the salt stress in wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **74**: 533–542.
- Nadeem S. M., Z. A. Zahir, M. Naveed et M. Arshad. 2007.** Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. *Can. J. Microbiol.*, **53**: 1141- 1149.
- Nadeem, S. M., Z. A. Zahir, M. Naveed et M. Arshad. 2009.** Rhizobacteria containing ACC deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Can. J. Microbiol.*, **55**: 1302–1309.
- Nadeem, S. M., Z. A. Zahir, M. Naveed et M. Arshad. 2009.** Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Can. J. Microbiol.*, **55**: 1302-1309.
- Nadeem, S. M., Z. A. Zahir, M. Naveed, H. N. Asghar, M. Arshad. 2010.** Rhizobacteria capable of producing ACC-deaminase may mitigate salt stress in wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **74**: 533- 542.
- Nakayama, H., K. Yoshida, H. Ono, Y. Murooka et A. Shinmyo. 2000.** Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata* confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, **122**: 1239- 1247.
- Nascimento, F. X., M. J. Rossi, C. R. F. S. Soares, B. J. McConkey et B. R. Glick. 2014.** New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance. *PLoS One* **9**: e99168.
- Nautiyal, C. S. 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**: 265- 270.
- Nemat, M. A., A. Sh. Turkey, M. T. Abdelhamid, et M. Attia. 2012.** Ameliorate of environmental salt stress on the growth of *Zea mays* L. plants by exopolysaccharides producing bacteria. *J. Appl. Sci. Res.*, **8**: 2034-2044.
- Nihorimbere, V. 2010.** Rhizosphere-driven lipopeptide production by different strains of *Bacillus spp.* as mechanism involved in biological control of plant pathogens. Thèse de Doctorat. Université de Liege.
- Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach., D. Haas et G. Défago. 2002.** Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 2229-2235.

- Ochatt, S. J., P. L. Marconi, S. Radice P. A. Arnozis et O. H. Caso. 1999.** *In vitro* recurrent selection of potato : production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell Tiss. Org.*, **55**: 1- 8.
- Olsen, R. A. et L. R. Bakken. 1987.** Viability of soil bacteria: optimization of plate counting technique and comparasion between total counts and plate counts within different size groups. *Microb. Ecol.*, **13**: 59-74.
- Olsen, S.R. et L.E. Sommers. 1982.** Phosphorus. pp. 403- 430. *In*: Page, A.L., R.H. Miller et D.R. Weeny (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2*, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin,
- Oren, A. 2006.** Life at high salt concentrations. pp: 263-282. *In*: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry, Volume 2*. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer et E. Stackebrandt (Eds). Springer, New York.
- O'Sullivan, D. J. et F. O'Gara. 1992.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, **56**: 662- 676.
- Othman, Y., G. Al-Karaki , A. R. Al-Tawaha et A. Al-Horani. 2006.** Variation in germination and ion uptake in barley genotypes under salinity conditions. *World J. Agric. Sci.*, **2**: 11- 15.
- Ownley, B. H., B. K. Duffy et D. M. Weller. 2003.** Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ Microbiol.*, **69**: 3333- 3343.
- Pal, R. B. et K. Gorkan. 2010.** Siderophores and pathogenicity of microorganisms. *J. Biosci. Tech.*, **1**: 127- 134.
- Palleroni, N. J. 1984.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. pp. 141–171 *In*: Krieg, N. R. et J. G. Holt. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA.
- Palleroni, N. J. 2005.** Genus I. *Pseudomonas*. pp. 323–379. *In*: Brenner, D.J., N. R. Krieg et J.T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York.
- Palleroni, N. J. 2009.** The genus *Pseudomonas*. pp: 231-242. *In*: *Practical handbook of microbiology*. Goldman, E. et L. H Green (Eds.). CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.
- Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou et M. Doudoroff. 1973.** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**, 333–339.
- Palleroni, N. J. 2008.** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. pp. 1- 18. *In*: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium,.
- Pansu, A. et J. Gautheyrou. 2003.** *Handbook of Soil analysis mineralogical, organic and inorganic methods*. pp: 551-608. Springer-verlag (Eds.), Berlin.
- Pansu, A. et J. Gautheyrou. 2006.** *Handbook of soil analysis mineralogical, organic and inorganic methods*. pp. 551-610. Springer (ed.). Berlin, New York.
- Parameshwara, G., L. G. Paleg, D. Aspinall et G. P. Jones. 1988.** Solute accumulation in alfalfa in response to environmental stress, p. 1014- 1021. *In* Sinha, S. K., P. V. Sane, S. C. Bhargava et P. K. Agrawal (Ed.), *Proceeding of International Congress of Plant Physiology*, Vol. 2, New Delhi, India.
- Parmar, N. et K. R. Dadarwal. 1999.** Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid like compounds by rhizobacteria. *J. Appl. Microbiol.*, **86**:36–44.

- Park, S., L. T. Smith et G. M. Smith. 1995.** Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** : 4378- 4381.
- Parks, G. E., M. A. Dietrich et K. S. Schumaker. 2002.** Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J. Exp. Bot.*, **53**: 1055- 1065.
- Patten, C. L. et B. R. Glick. 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, **42** : 207–220.
- Patten, C. L. et B. R. Glick. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Env. Microbiol.*, **68**: 3795-3801.
- Patten, C.L. et B. R. Glick. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Env. Microbiol.*, **68**: 3795- 3801.
- Paul, D. et S. Nair. 2008.** Stress adaptations in a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *J Basic Microbille.*, **48**: 378- 84.
- Payne, S M. 1994.** Detection, isolation and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.*, **235**: 329- 344.
- Peix, A., M. H. Ramírez-Bahena et E. Velázquez. 2009.** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.*, **9**: 1132–1147.
- Pepper, I. L., C. P. Gerba et R. M. Maier. 2000.** Environmental sample collection and processing, p. 177- 194. *In* Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba (ed.), *Environmental microbiology*. Academic Press, London.
- Percival, E. et R. H. McDowell. 1981.** Cell walls of algae and fungi, p. 299- 302. *In* Tanner, W. et F. A. Loewus (Ed.). *Plant carbohydrates II: Extracellular carbohydrates*. Springer verlag, Berlin.
- Pichereau, V., J. A. Pocard, J. Hamelin, C. Blanco et T. Bernard. 1998.** Differential effects of dimethylsulfoniopropionate, dimethyl-sulfonioacetate, and other S-methylated compounds on the growth of *Sinorhizobium meliloti* at low and high osmolarities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** : 1420-1429.
- Pocard, J. A., T. Bernard et D. Le Rudulier. 1991.** Translocation and metabolism of glycine betaine in nodulated alfalfa plants subjected to salt stress. *Physiol. Plant.*, **81**: 95- 102.
- Pocard, J. A., L. T. Smith, G. M. Smith et D. Le Rudulier. 1994.** A prominent role of glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bacteriol.*, **176**: 6877- 688.
- Powell, P. E, G. R. Cline, C. P. P., P. J. Szaniszlo.1980.** Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature*, **287**: 833-834
- Qiu, Q. S., Y. Guo, M. A. Dietrich, K. S. Schumaker et J. K. Zhu, 2002.** Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/ H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana* by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**: 8436- 8441.
- Quan, Z., J. Su, H. Jiang, X. Huang et Y. Xu. 2010.** Optimization of phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA*/*qscR*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18GQ harboring pME6032Phz using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86** :1761- 1773.
- Qurashi, A. W. et A. N. Sabri. 2012.** bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.*, 1183-1191

- Raaijmakers, J. M., M. Leeman, M. M. P. van Oorschot, I. V. Sluis, B. Schippers et P.A.H.M. Bakker. 1995.** Dose response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopath.*, **85**: 1075- 1081.
- Raaijmakers, J. M., R. E. Bonsall et D. M. Weller. 1999.** Effect of populations density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4- diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopatol.*, **89**: 470- 475
- Radhouane, L. 2008.** Corrélation entre le stade germination et le stade adulte en présence de stress hydrique chez quelques écotypes autochtones tunisiens de mil (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. *C. R. Biologies*, **331** : 623- 630.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam et R. Smayyappan. 2001.** Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop. Prot.* **20**:1–11.
- Ramette, A., M. Frapoli, G. Defago, and Y. Moenne-Loccoz. 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **16**: 525-535.
- Rehman, S., P. J. C. Harris, W. F. Bourne et J. Wilkin. 2000.** The relationship between ions, vigour and salinity tolerance of Acacia seeds. *Plant Soil*, **220**: 229- 233.
- Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier et H. Antoun. 2001.** Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol. Biochem.*, **33**: 1741-1747.
- Rhodes, D. et A. D. Hanson. 1993.** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 357–384.
- Ridge, E. H. et A. D. Rovira. 1971.** Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. *New phytol.*, **70**: 1017- 1026.
- Riefler, M., O. Novak, M. Strnad et T. Schmülling. 2006.** *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, **18**:40–54.
- Roosen, N. H. C. J., T. T. Thu, H. M. Iskader. et J. Jacobs. 1998.** Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **117**: 263- 271.
- Rovira, A. D., R. C. Foster et J. K. Martin. 1979.** Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere, pp: 1-4. In Harley, J. L. et R. S Russel (Eds.). The soil Root interface. Academic Press, London.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C.H. Hu, M. S. Reddy, H.X. Wei, P.W. Paré et J.W. Kloepper. 2003.** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 4927- 4932.
- Sabry, S. R. S., L. T. Smith et G. M. Smith. 1995.** Osmoregulation in spring wheat under drought and salinity stress. *J. Gen. & Breed.*, **49**: 55- 60.
- Saha, P., P. Chatterjee, A. K. Biswas. 2010.** NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian J. Exp. Biol.*, **48**:593- 600.
- Sahu, G. K. et S. S. Sindhu. 2011.** Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. *Res. J. Microbiol.*, **10**: 735- 749.

- Said, O., S. Fulder, K. Khalil, H. Azaizeh, E. Kassis et B. Saad. 2008.** Maintaining a physiological blood glucose level with 'Glucoselevel', a combination of four antidiabetes plants used in the traditional Arab herbal medicine. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **5**: 421- 428.
- Saitou, N. et M. Nei. 1987.** The neighbor-joining method: a new, method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**:406–425.
- Sakamoto, A. et N. Murata. 2002.** The role of glycine betaine in the protection of plants from stress : clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, **25**: 163- 171.
- Saleem, M., M. Arshad, S. Hussain et A. S. Bhatti. 2007.** Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Indian Microbiol. Biotechnol.*, **34** : 635–648.
- Sandhya, V., S. K. Z. Ali, M. Grover, G. Reddy et B. Venkateswarlu. 2009.** Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils*, **46**: 17- 26
- Sandmann, G., S. Römer et P. D. Fraser. 2006.** Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab. Eng.*, **8**: 291- 302.
- Sayyed, R., M.D. Badgajar, H.M. Sonawane, M. M. Mhaske et S.B. Chincholkar. 2005.** Production of microbial iron chellators (siderophores) by fluorescent *Pseudomonads*. *Indian J. Biotechnol.*, **4**: 484- 490.
- Schwyn, B. et J. B. Neilands. 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.*, **160**: 47-56.
- Sharifi-Tehrani, A., M. Zala, A. Natsch, Y. Moëne-Loccoz et G. Défago. 1998.** Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *Eur. J. Plant Pathol.*, **104**: 631- 643.
- Sharma, A. et B. N. Johri. 2003.** Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiol. Res.*, **158**: 77-81.
- Sharma, S. B., R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi et T. A. Gobi. 2013.** Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus*, **2**: 587.
- Shilev, S., E. D. Sancho et M. Benlloch-González. 2012.** Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. *J Environ Manage.*, **95**:S37–S41
- Siddiqui I. A., D. Haas et S. Heeb. 2005.** Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 5646–5649.
- Silini, A. 2013.** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de *Azotobacter* et sur la croissance du blé en milieu salin. Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas. Sétif, Algérie.
- Silini, A., H. Silini-Cherif et M. Ghouil. 2012.** Effect of *Azotobacter vinelandii* and compatible solutes on germination wheat seeds and root concentration of sodium and potassium under salt stress. *Pak. J. Biol. Sci.*, **15**: 132- 140.
- Silva, M., L. Vieira, A. P. Almeida et A. Kijjoo. 2013.** The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential applications. *Oceanography*, **1**: 101 – 106.

- Sindhu, S. S. et K. R. Dadarwal. 2001.** Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiol. Res.*, **156**: 353- 358.
- Sindhu, S. S., Y. S. Rakshiya et G. Sahu, 2009.** Biological control of soilborne pathogens with rhizosphere bacteria. *Pest Technol.*, **3**: 10-21.
- Sîrbu, R., C. Sava, D. L. Ghergic, N. A.F. Passy Mouïma. 2006.** Caracterisation de certains principes actifs de *ulva lactuca* et *ulva rigida* – algues vertes du littoral roumain de la mer noire. *Sci. Stud. Res.*, **VII**: 193-198.
- Smith, L. T. et G. M. Smith. 1989.** An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, **171**: 4714- 4717.
- Solomon, A., S. Beer, Y. Waisel, G. P. Jones et L. G. Paleg. 1994.** Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. *Physiol. Plant.* , **90**: 198- 204.
- Somers E., J. Vanderleyden et M. Srinivasan. 2004.** Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, **30**: 205-240.
- Son, H, J., G. T. Park, M. S Cha et M. S. Heo. 2006.** Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour Technol.*, **97**: 204- 210.
- Sood, C. R., S. V. Chanda et Y. D. Singh. 2002.** Effect of different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase activities of radish cotyledons. *Bulg. J. Plant Physiol.*, **28**: 46-56.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden et R. Remans. 2007.** Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**: 425–448.
- Sreedevi, B., S. Preethi et J. Pramoda Kumari. 2014.** Isolation, production and optimization of siderophore producing *Pseudomonas* from paddy soil. *Int. J. Pharm. Res. Sci.*, **02**: 71-88.
- Srivastava, A. K. et D. Schlessinger. 1991.** Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie*, **73**: 631-638.
- Suhayda, C. G., R. E. Redman, B. L. Harvy et A. L. Cipynwk. 1992.** Comparative response of salt cultivated and wild barley species to salinity stress and calcium supply. *Crop. Sci.*, **32** : 154-163.
- Sujatha, N. et K. Ammani. 2013.** Siderophore production by the isolates of fluorescent *Pseudomonads*. *Int. J. Cur. Res. Rev.* **5**: 1-7
- Sulpice, R., Y. Gibon, A. Bouchereau et F. Larher. 1998.** Exogenously supplied glycine betaine in spinach and rapeseed leaf discs : compatibility or non compatibility. *Pant Cell Environ.*, **21** : 1285-1292.
- Tabarsa, M., M. Rezaei, Z. Ramezanpour et J. RobertWaaland. 2012.** Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *J. Sci. Food Agric.*, **92**: 2500–2506.
- Tahri, E. H., A. Belabed et K. Sadki. 1998.** Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*). *Bull. Inst. Sci.*, **21** :81- 87.

- Tamura K., J. Dudley, M. Nei et S. Kumar. 2007.** MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, **24**:1596–1599.
- Termaat, A., J. B. Passora et R. Munns. 1985.** Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl affected wheat and barley. *Plant Physiol.*, **77**, 869- 872.
- Thomashow, L. S., R.F. Bonsall et D. M. Weller. 2002.** Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*, p. 638- 647. In Hurst, C. J., R. L. Crawford, G. R. Knusden, M. J. Mc Inerney et L. D. Stetzenbach (Eds.), *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington.
- Tien T.M., Gaskins M.H., Hubbell D.H., 1979.** Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 1016 - 1024.
- Tien, T. M., M. H. Gaskins et D. H. Hubbell. 1979.** Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 1016-1024.
- Tilak, K. V. B. R., N. Ranganayaki, K. K. Pal, R. De, A. K. Saxena, C. S. Nautiyal, S. Mittal, A. K. Tripathi, et B.N. Johri. 2005.** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.*, **89**: 136-150.
- Timmusk, S., K. Timmusk et L. Beher. 2013.** Rhizobacterial plant drought stress tolerance enhancement: towards sustainable water resource management and food security. *J. Food Sec.*, **1**: 6- 9.
- Timonin, M. I . 1966.** Rhizosphere effect of healthy and diseased lodgepole pine seedlings. *Can. J. Microbiol.*, **12**:531–537.
- Tourkya, B., T. Boubellouta, E. Dufour et F. Leriche. 2009.** Fluorescence Spectroscopy as a promising tool for a polyphasic approach to Pseudomonad Taxonomy. *Curr. Microbiol.*, **58**: 39 - 46.
- Tremblin G. et P. Binet. 1984.** Halophilie et résistance au sel chez *Haloplepis amplexicaulis* (vahl.) *Ung. Oecol. Plant*, **5**: 291- 293.
- Tripathi, A. K., S. C. Verma et E. Z Ron. 2002.** Molecular characterization of a salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. *Res Microb.*, **153**: 579- 584.
- Trivedi, P. et T. Sa. 2008.** *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr.Microbiol.*, **56**:140–144
- Troll, W. et J. Lindesly. 1955.** A photometric method for the determination of proline. *J. Biol. Chem.*, **215**: 655-660.
- Twisha, P. et P. B. Desai. 2014.** Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of *Gossypium species* in Monsoon. *Res. J. Recent. Sci.*, **3**: 42- 51.
- Upadhyay, S. K, J. S Singh, A. K Saxena et D. P. Singh. 2012.** Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biol.*, **14**: 605- 611.
- Van Alstyne, K. L., L. Koellermeier et T.A.Nelson. 2007.** Spatial variation in dimethylsulfoniopropionate (DMSP) production in *Ulva lactuca* (Chlorophyta) from the Northeast Pacific. *Mar Biol.*, **150**: 1127- 1135

- Vavilala, S. L. et J. S. D'Souza. 2015.** Algal Polysaccharides and Their Biological Applications, p. 413. *In* Kim, S. K. et K. Chojnacka (ed). Marine algae extracts: Processes products and applications. Wiley- VCH, Weinheim.
- Verma, J. P., J. Yadav, K. N. Tiwari, Lavakush et V. Singh. 2010.** Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *Int. J. Agr. Res.*, **5**: 954 – 983.
- Ventura, M., P. A. Gallet, E. Benizri et A. Guckert. 1998.** Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by a *Pseudomonas* strain in the rhizosphere of maize: implication of this compound in the biological control of *Fusarium graminearum*, p. 27- 31. *In*: Duffy, B., U. Rosenberger et G. Défago (Eds.), Molecular approaches in biological control, Vol. 21. Workshop proceedings, Delémont, Switzerland.
- Voisard, C., C. Keel, D. Haas et G. Défago. 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, **8**: 351- 358.
- Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghay-Marroof, S.M. Williams, B.P. Dancik et R.W. Allard. 1987.** Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 2097–2100.
- Walker, D. J., S. Lutts, M. Sánchez-García et E. Correal. 2014.** *Atriplex halimus* L.: its biology and uses. *J. Arid Environ.*, **100-101**: 111- 121.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje et J. R. Cole. 2007.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**: 5261-5267.
- Watanabe, S., K. Kojima, K. Y. Ide et S. Sasaki. 2000.** Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* *in vitro*. *Plant cell Tiss. Org.*, **63**: 199- 206.
- Watson, R., J. Pritchard et M. Malone. 2001.** Direct measurement of sodium and potassium in the transpiration stream of salt-excluding and non-excluding varieties of wheat. *J. Exp. Bot.*, **52**: 1837-1881.
- Weller, D. M., J. M. Raaijmakers, B. B. Gardener et L. S. Thomashow. 2002.** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**: 309- 348.
- Werner, J. E. et R. R Finkelstein. 1995.** Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol. Plant*, **93**: 659- 666.
- Wheeler, A. E., D. B. Oerther, N. Larsen, D. A. Stahl, et L. Raskin. 1996.** The Oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** : 3557-3559.
- Whipps, J. M. 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, **52**: 487-511.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, W. G. Weisburg, B. J. Paster, M. T. Madigan, V. J. Fowler, C. M. Hahn, P. Blanz, R. Gupta, K. H. Neelson et G. E. Fox. 1984.** The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.*, **5**: 315–326.
- Xavier D. S., R., V. Vinod, K. Timalata et O. F. Lim. 2011.** Role of Exogenous Proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. *J. Stress Physiol. Biochem.*, **7**: 157-174.
- Yancey, P. H. 2001.** Water stress, osmolytes and proteins. *Amer. Zool.*, **41**: 699 – 709.
- Yang, C. H. et D. E. Crowley. 2000.** Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 345- 351.

- Yang, J., J. W. Kloepper et C. M. Ryu. 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.*, **14**:1- 4.
- Yang, X. et C. Lu. 2005.** Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt-stressed maize plants. *Physiol. Plant.*, **124**: 343- 352.
- Yao, L., Z. Wu. Y. Zheng, I. Kaleem et C. Li. 2010.** Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *Eur. J. Soil Biol.*, **46**: 49- 54.
- Yasmin, H. et A. Bano. 2011.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock. *Pak. J. Bot.*, **43**: 1663- 1668.
- Yaxley, J. R., J. J. Ross, L. J. Sherriff et J. B. Reid. 2001.** Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiol.*, **125**: 627–633
- Yeo, A. 1998.** Molecular biology of salt tolerance in the context of whole- plant physiology. *J. Exp. Bot.*, **49**: 913- 929.
- Yuan, J., W. Raza, Q. Shen et Q. Huang. 2012.** Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**: 5942– 5944.
- Yuwono, T., D. Handayani et J. Soedarsono . 2005.** The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. *Aust. J. Agr. Res.*, **56**: 715-721.
- Yurekli, F., Z. B. Porgali et I. Turkan. 2004.** Variation in abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid and zeatin concentrations in two bean species subjected to salt stress. *Acta Biol. Cracov. Bot.*, **46**:201- 212.
- Zahir Z. A., M. Arshad et W. T. Frankenberger Jr. 2004.** Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.*, **81**: 97–168.
- Zahir Z. A., M. K. Shah, M. Naveed et M. J. Akhter. 2010.** Substrate- dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**:1288- 1294.
- Zahir, A. Z., U. Ghani, M. Naveed, S. M. Nadeem et H. N. Asghar. 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**: 415–424.
- Zhu, G. Y., J. M. Kinet, S. Lutts. 2004.** Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) F3 populations selected for salt resistance: Relationship between yield-related parameters and physiological properties. *Aust. J. Exp. Agric.*, **44**: 333- 342.
- Zhu, J. K. 2002.** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**: 247- 273.
- Zhu, J. K. 2003.** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**: 441- 445.

ANNEXES

Annexe 1

Extrait à froid de sol

Le sol séché à l'air est mélangé avec de l'eau de robinet (1 :1) la suspension est laissée à décanter pendant 2 h puis centrifugée (5,000 x g pendant 20 mn).

Annexe 2

Tampon phosphate (solution stock)

KH ₂ PO ₄	64 g
Na ₂ HPO ₄	36 g
Eau distillée	1000 ml

(pH 7). La solution est stérilisée par filtration (0,2 µm).

Annexe 3

Solution nutritive (Solution stock)

Citrate de sodium	10 g
Succinate de sodium	10 g
Glucose	10 g
Fructose	10 g
Xylose	10 g
Peptone	10 g
Extrait de levure	10 g
Eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à 7 et la solution est stérilisée par filtration (0,2 µm).

Annexe 4

Tampon phosphate

K ₂ HPO ₄	5,62 g
KH ₂ PO ₄	2,13 g
Eau distillée	1000 ml

La solution obtenue est 0,05 M à pH 7,0. Autoclaver (121°C, 15 min.).

Annexe 5

King B

Peptone de caséine		10 g
Peptone de viande		10 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O		1,5 g
K ₂ HPO ₄		1,5 g
Agar agar		12 g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

Annexe 6

King A

Peptone de gélatine		20 g
Glycerol		10 g
K ₂ SO ₄ ,		10 g
MgCl ₂		1.4
Agar agar		15
Eau distillée		1000

Annexe 7

Milieu Luria Bertani (LB) liquide

Tryptone		10 g
Extrait de levure		5 g
NaCl		5 g
Eau distillée	qsp	1000

Annexe 8

Réactif de Salkowski

1 ml de FeCl₃ à 0,5 M est mélangé avec 50 ml d'acide perchlorique 35% et quelques gouttes d'acide ortho-phosphorique

Annexe 9

Milieu CAS (Chrome azurol S)

1- HDTMA :

- Dissoudre 1,821 g HDTMA (Hexamethylammoniumbromure) dans 40 ml d'eau distillée
- Mettre 10 ml de HDTMA 10 mM dans une éprouvette et compléter à 50 ml (**Solution 1**)

2- CAS :

- dissoudre 2,7 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ dans 10 ml de HCl 10 mM.
- Dissoudre 1,2 g/l de Chrome azurol (CAS) dans 50 ml d'eau distillée.
- Mélanger les deux solutions pour obtenir une solution violette foncée (**Solution 2**)

3- Ajouter lentement sous agitation (**2**) à (**1**) : Solution de couleur bleu foncée.

4- Solution Pipes (tampon pH)

- Dissoudre 4,307 g de piperazine anhydre dans de l'eau et ajouter 6,25 ml de HCl 1,2 M
- Ajouter la solution tampon et continuer avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml

Annexe 10

Milieu liquide succinique (Succinic médium)

K_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
Acide succinique	4 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7

Annexe 11

Milieu NBRIP (Nautiyal, 1999)

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

Agar agar		15 g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

Annexe 12

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Extrait de pomme de terre		200 g
Glucose		20 g
Agar-agar		15 g
Eau distillée	q. s. p	1000 ml
pH final : 5,2		

Annexe 13

Milieu de trypticase soja

Peptone de caséine		15 g
Peptone de soja		5 g
NaCl		5 g
Agar agar		15g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

Annexe 14

Réactif de Dragendorff

Solution A ; Iodure de potassium à 30 % dans l'eau

Solution B : Carbonate de Bismuth à 8% dans HCl 2 N

Prélever 10 ml de A, les introduire dans une fiole de 200 ml

Ajouter goutte à goutte 10 ml de B ajuster à 200 ml avec HCl 1 N

Annexe 15

Milieu PBS (phosphate buffered saline)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0.24

Eau distillée 800 ml

Annexe 16

Milieu de germination : MS

Macroéléments	NH ₄ NO ₃	1,650 g
	KNO ₃	1,9 g
	CaCl ₂ -2 H ₂ O	0,44 g
	MgSO ₄ ,7 H ₂ O	0,37 g
	KH ₂ PO ₄	0,170 g
Microéléments	H ₃ BO ₃	6,2 mg
	MnSO ₄ ,7 H ₂ O	22,3 mg
	ZnSO ₄ ,7 H ₂ O	8,6 mg
	KI	0,83 mg
	Na ₂ MoO ₄ ,2 H ₂ O	0,25 mg
	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,025 mg
	CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,025 mg
Fer	FeSO ₄ 7 H ₂ O	2,78 g
Saccharose		30 g
Agar		7 g

Annexe 17

Milieu de germination « Seed-Germinating Agar »

Peptones	0.1 g
Extrait de levure	0.1 g
Glucose	10 g
Agar	15 g

PLANT GROWTH PROMOTING AND ANTAGONISTIC TRAITS OF INDIGENOUS FLUORESCENT *PSEUDOMONAS* SPP. ISOLATED FROM WHEAT RHIZOSPHERE AND A. *HALIMUS* ENDOSPHERE

Arif Fouzia
Silini Allaoua
Cherif-Silini Hafsa
Ghoul Mostefa

Laboratory of applied Microbiology, Faculty of Nature and Life sciences,
University of Ferhat Abbas, Setif 1, Setif, Algeria

Abstract

Fluorescent *Pseudomonas* spp. are an important group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). They increase the growth of their host plant directly or indirectly. In this study, 3 Fluorescent pseudomonads were isolated from the wheat rhizosphere and one from the endophyte of the halophyte *Atriplex halimus*. Based on biochemical, physiological reactions and 16S rRNA gene sequences, the isolates were identified as *Pseudomonas putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5, *P. fluorescens* RB13 and *P. aeruginosa* EH4. These strains and *P. fluorescens* CHA0 were screened for their PGPR activities. All the strains solubilized phosphate with a maximum of 187.9 µg / ml. *P. fluorescens* CHA0 produced a significant amount (88.37µg/ml) of IAA. The siderophores production by all the strains was proved and the percent of production varied from 38 to 46. The strains produced HCN, protease and amylase. Mycelial growth of *F. oxysporum* and *A. alternata* was strongly reduced in the presence of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp., with the inhibition rate varying between 25 to 38% and 17 to 27%, respectively. On the basis of excellent growth promoter, biocontrol activities, the fluorescent *Pseudomonas* spp. tested could be applied as inoculants of wheat for sustainable agriculture in salty soils.

Keywords: PGPR, Phosphate solubilization, siderophores, Indole acid acetic, HCN

Introduction

The rhizosphere, fraction of soil rich in root exudates, is occupied by various bacterial groups named rhizobacteria. *Pseudomonas* fluorescent spp. are among the most important plant growth-promoting bacteria (PGPR). The majority of the species of this group enhances plant growth by number of direct and indirect mechanisms (Glick *et al.*, 2007). Some species can be considered as biofertilization agents, they provide plants with required nutrients like fixed nitrogen, phosphorus and iron. About 20% of the fixed atmospheric nitrogen are attributed to the non-symbiotic bacteria, such as *Pseudomonas* (Sexana and Tilak, 1989). Phosphorus is also a limiting element for plants. They can only absorb the soluble forms provided by rhizobacteria, like fluorescent *Pseudomonas* spp., either *via* the mineralization of organic phosphate (by phosphatases), or *via* the solubilization of inorganic phosphate (by the effect of acids) (Lemenceau, 1992) Iron is another essential element for plant nutrition; however, it is slightly soluble in the soil solution (Verma *et al.*, 2010). In order to sequester iron, the microorganisms release siderophores (molecules with an exceptionally high affinity for Fe^{+3}). Consequently, they make this element available in the rhizosphere and contribute to the stimulation of the plant growth (Lemenceau 1992). Fluorescent *Pseudomonas* spp. can also produce plant growth regulators (phytohormons) involved effectively in elongation of plants (Patten and Glick, 2002) such as: auxins, gibberellic acid, cytokinins and ethylene. Indole acetic acid (IAA) is the most important group of Auxin, it affects both plant growth promotion and root nodulation (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Fluorescent *Pseudomonas* species occupy an important place as biological control agents. They produce a wide range of antifungal metabolites, which protect the plant against phytopathogens (Haas and Defago, 2005). Several mechanisms are solicited in this effect. The production of a variety of antibiotics is an essential characteristic of fluorescent pseudomonads. The best known are phenazine-1-carboxylic acid (Ownley *et al.*, 2003), 2 - 4 - diacetylphloroglucinol (Scharifi-Tehrani *et al.*, 1998), the pyoluteorin (Maurhofer *et al.*, 1995) and hydrogen cyanide (HCN) (Lemenceau, 1992). These species can control the growth of pathogens by competing for nutrients such as carbon (Lemanceau *et al.*, 1988) and iron chelated by siderophores, thus making it unavailable for other phytopathogens (Lemanceau *et al.*, 2009). Some biocontrol *Pseudomonas* produce lytic enzymes, which can lyse a part of cell walls of some phytopathogens fungi. The most known are: chitinases, cellulases, proteases, β -1,3 glucanases (Compant *et al.*, 2005). Some species may have a protective effect by stimulating inducible defence mechanisms that make the host plant less susceptible to a subsequent pathogen attack (Van Loon, 1998). In addition, PGPR may contribute to the improvement of the plant resistance to

biotic and abiotic stresses such as salinity, drought (Nadeem *et al.* , 2012; Ali *et al.* 2014), deficiency in nutrient elements (Sheng, 2005) and toxicity of heavy metals (Islam *et al.*, 2014).

In the context of improving the productivity of wheat in Algeria - especially in soils affected by salt and drought-, the use of Fluorescent *Pseudomonas* species as seed inoculants, could promote growth and increase the crop yield by alleviating salt stress on plants. For this purpose, indigenous bacteria isolated from wheat rhizosphere and the endosphere of the halophyte *Atriplex halimus* were screened for their plant growth promoting properties.

Materials and methods

Isolation of fluorescent *Pseudomonas* spp.

The study was conducted on 2 samples of soil, the first belongs to the rhizosphere of durum wheat (*Triticum durum*) (fertile soil: conductivity 486 $\mu\text{S}/\text{cm}$ at 20 ° C; pH 7.25), the second one is derived from the endophyte of the halophyte *Atriplex Halimus* (saline soil or Sebkha: conductivity: 4.09 mS/cm at 20°C; pH 7.30) (Fig.1). The roots were gently removed from soil on three different points and placed in plastic bags sterilized by UV and transported to the laboratory in a cooler and kept in the refrigerator (4 ° C) for later use.



Figure 1: Photo showing the appearance of *A. halimus*

For a selective isolation of fluorescent *Pseudomonas* species, the selective Gould's S₁ medium was used (Gould *et al.*, 1985). The medium contains (per liter): 18 g of agar, 10 g sucrose, 10 ml of Glycerol, 5 g of casamino acids, 1 g of NaHCO₃, 1 g MgSO₄, 7 H₂O, 2,3 g K₂HPO₄, 1.2 g sodium Lauroyl Sarcosine (SLS) ad 20 mg of trimethoprim. Sterile solution of trimethoprim (Millex filter, porosity 0, 22 μm) was added after autoclaving of the medium (121 ° C, 15 min) and cooling to 40 ° C. The final pH of the medium is 7.4 to 7.6; no adjustment was required.

To isolate the fluorescent *Pseudomonas* from the rhizosphere of wheat, non-rhizospheric soil was removed by shaking vigorously. Ten grams of soil strongly attached to the roots were stirred with 90 ml of sterile 0.05 M buffer phosphate (pH 7.0) for 30 minutes. Serial decimal dilutions were

made from this suspension in the same buffer. An aliquot of 0.1 ml of each dilution was spread on Gould's S1 medium.

The fluorescent *Pseudomonas* species colonizing the endophyte of the halophyte *Atriplex halimus* were isolated as described by Forchetti *et al.*, (2007). The rhizospheric soil was eliminated by washing with sterile distilled water. The roots were then surface disinfected with ethanol 70% for 1 min, then surface sterilized with 3 % sodium hypochlorite solution for 2 min. The roots were rinsed with sterilized distilled water, to eliminate all traces of disinfectant, then cut and added to sterile 0.05 M buffer phosphate and macerated with a sterile mortar and pestle. One gram of the homogenate was transferred in a tube containing 9 ml sterile 0.9% NaCl. From this solution, a series of decimal dilutions were made. A volume of 0.1 ml of each dilution was plated on Gould's S1 medium. After incubation at 23 °C for 3 days, the colonies with a green fluorescent pigmentation under UV light (366 nm) were picked up and purified on King B medium. Twenty isolates belonging to the rhizosphere of wheat and the endophyte of *Atriplex halimus* were maintained.

Biochemical and physiological tests

Determination of macroscopic, microscopic (Gram, cell morphology, mobility), enzymatic (oxidase, catalase, nitrate reductase) characters were carried in the first step. Different biochemical characters were highlighted in order to select isolates belonging to the genus *Pseudomonas* as described in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994). These preliminary tests have conducted to the choice of 3 isolates from the wheat rhizosphere of initially designated: 2, 5 and 13, and one isolate from the endophyte of *A. halimus* noted EH4.

Maintenance of isolates

To avoid any mutation in the genes, the isolates were kept at a temperature of 4 ° C in nutrient broth supplemented with 30% glycerol.

Screening of PGPR activities

All the isolates were screened for their PGPR activities. A reference strain: *Pseudomonas fluorescens* CHA0 was also tested. It was isolated from the rhizosphere of tobacco in soil resistant to disease rot roots in Switzerland (Keel and Défago, 1997). It was kindly provided by Professor Défago (Institute of plant sciences, Zurich, Switzerland). All the following tests were replicated three times

Phosphate solubilization

The ability of the isolates to solubilize the inorganic tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) was tested on National Botanical Research Institute's medium Phosphate (NBRIP) according to the method of Nautiyal (1999). A spot of 5 μl of the culture of each strain was deposited on the NBRIP medium. After incubation 28 ° C for 10 days, the diameter of clear zone (halo) surrounding the bacterial growth as well as the diameter of colony, were measured. The diameter of the solubilization halo was determined by subtracting the diameter of the colony from the total diameter. Quantitative estimation of phosphate solubilization was also carried out on NBRIP liquid medium inoculated with 100 μl of a culture of each isolate. Cultures were incubated for 10 days at 28 ° C with agitation and then centrifuged at 3000 rpm/min for 20 min. The amount of phosphate in the supernatant was estimated by the colorimetric method of Olsen and Sommers (1982). The absorbance of the resulting blue compound was measured at 620 nm, thereby expressing the concentration of phosphate soluble (P_2O_5). A standard calibration curve was performed with a solution of KH_2PO_4 .

Indole acetic acid (IAA) production

In order to demonstrate the production of IAA, a volume of 100 μl of each isolate was grown on 10 ml of liquid medium Luria Bertani supplemented with tryptophan (5 g/l). After 48 h of incubation at 30 ° C, bacterial solutions were centrifuged (5000 rpm/20 min). A volume of 1ml of each supernatant was mixed with 2 ml of the solution of Salkowski (50 ml, 35% of perchloric acid, 1 ml 0.5 M FeCl_3 solution). Development of a red color indicates the production of IAA (Gordon and Weber 1951). The amount of AIA in the supernatant was estimated by colorimetric method (Loper and Schroth, 1968). The optical density was measured at 530 nm after 30 min of incubation. A standard calibration curve was performed with a solution of AIA (Fluka) in a range 0 to 10^{-3} M.

Ammonia production

Production of ammonia (NH_3) by all the isolates was tested qualitatively as described by cappuccino and Sherman (1992). A volume of 100 μl of freshly grown cultures were inoculated in 10 ml of peptone water and incubated for 96 h at 30 ° C. Nessler reagent (500 μl) was added. The production of ammonia is then revealed by the appearance of a yellow or orange color.

Siderophore production

The production of siderophores by isolates was determined in chrome azurol agar (CAS) by the method of Schwyn and Neilands (1987).

For this, the King B medium was inoculated with spots of a fresh culture of each isolate. After incubation at 28 ° C for 24 h, the medium was covered with 15 ml of CAS agar. Subsequently to a short contact, siderophores producing bacteria form an orange halo on the blue-green medium (Schwyn and Neilands, 1987; Sahu and Sindhu, 2011) The diameter of siderophore production was estimated by subtracting the diameter of the colony of the total diameter (halo + colony). Quantitative analysis was performed according to the method described by Payne (1994) using iron free succinate medium (SM) (Meyer and Abdallah, 1978) consisting of (g/l): K₂HPO₄, 6.0; KH₂PO₄, 3.0; MgSO₄ 7H₂ O, 0.2; (NH₄)₂SO₄, 1; succinic acid 4.0, pH 7.0. It was inoculated with old cultures at the rate of 1 % (v/v) and incubated (30°C, 48 h) with constant shaking (150 rpm). After centrifugation of the cultures (5000 rpm / 20 mn), 500 µl of each supernatant were mixed with 500 µl of CAS solution and incubated (30 min, in the dark at room temperature). The color changed to orange according to the amount of produced siderophore. The absorbance of the resulting complex was measured at 630 nm against a blank containing 0.5 ml of uninoculated medium and 0.5 ml of CAS solution. Siderophores content was expressed in percentage according to formula proposed by Sayyed *et al.*, (2005):

$$\% \text{ siderophore units} = \frac{Ar-As}{As} \times 100$$

Where, Ar: absorbance of the

As: absorbance of the sample at 630 nm.

Production of hydrocyanic acid (HCN)

The method described by Bakker and Shippers (1987) was adopted to evaluate the ability of fluorescent *Pseudomonas* strains to produce hydrogen cyanide. Bacterial cultures were streaked on Trypticase soy agar supplemented with glycine (4.4 g/l). Inside the lids of the plates, a disc of Whatman filter paper previously immersed in 0.5% picric acid solution (in 2% sodium carbonate), was placed. Plates were then sealed with parafilm and incubated in an inverted position for 4 days at 28 ° C. Appearance of light brown to dark brown color indicated HCN production.

Hydrolytic enzymes

The antagonistic activity by elaboration of some bacterial enzymes such as protease and amylase was tested. Protease activity, shown by casein degradation, was determined in skim milk agar. Starch degradation was studied on starch agar. Bacteria were streaked onto the plates and incubate at 27 ° C for 5 days. Enzyme activity was identified by the development of a clearing zone (halo) around the colonies.

Antifungal activity

The antagonistic activity of selected *Pseudomonas* isolates against two phytopathogens: *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporium*, was tested. An agar disc of 3 mm diameter was cut from an actively growing (96 h) of fungal culture and placed in the center of the Petri plates containing Potato Dextrose Agar (PDA). A loopful of each actively growing fluorescent *Pseudomonas* isolates was spotted (5 μ l) in opposite to the fungal disc. Plates inoculated with fungal strain and without bacteria were used as control. After an incubation of 10 days at a temperature of 25 ° C or 28 ° C, the diameter of inhibition zone was recorded and the inhibition percentage was calculated according to the formula established by Kumar *et al.* (2002):

$$I = [(C-T)/C] \times 100. \text{ Where:}$$

I: Percent inhibition of the fungus tested

C: Radial growth of fungus in control plates (mm)

T: Radial growth of fungus on the plate inoculated with bacteria (mm).

Data analysis

All the Data concerning phosphate solubilization, siderophores and the AIA production were subjected to an analysis of variance by One way ANOVA (Turkey test) procedures to a value of $P \leq 0.05$ by using the software GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA). Each data was the mean of three replicates.

Molecular identification of strains

Molecular identification of the isolates (2, 5, 13 and EH4) was based on the amplification and sequencing of genes encoding 16S rRNA. The procedure consists of amplifying the gene in the presence of a primer recognizing the region on the DNA which is subsequently sequenced. The sequences obtained were compared with homologous sequences contained in the database computer international "GenBank" using Blast (Basic Local Alignment Search Tool) on the web site of Genbank "<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>" in order to accurately determine their phylogenetic affiliation. The results were expressed as a percentage of similarity of the strain to identify with related species, and in the form of phylogenetic trees that show the taxonomic position of each isolate. Sequences were submitted to the GenBank.

Results and discussion

Physiological, biochemical and molecular characterization

The Belonging of the 4 bacterial isolates to fluorescent *Pseudomonas* sp. was confirmed on the basis of cultural, morphological and biochemical tests as described in Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt *et*

al., 1994). A common characteristic of all the isolates was the production of pigments that fluoresce in short wavelength (254 nm). Microscopic observation reveals that all isolates are rods slightly curved gram negative and mobile. Oxidase and catalase tests are positive. All the isolates strains were aerobic strict with oxidation of glucose. They produced a thick veil on Luria Bertani or Trypticase soy broth. The smell of Jasmine was also a dominant feature. All strains liquefied gelatin and possessed a nitrate reductase. They were able also to use mannitol, arabinose, trehalose, glycerol, citrate as a carbon source. The characteristics studied are illustrated in table 1.

Table 1: Biochemical characterization of the isolates

Isolates	2	5	13	EH4	CHA0
Fluorescence on King B	+	+	+	+	+
Fluorescence on King A	-	+	-	+	-
Growth at 42 ° C	-	+	-	+	-
Growth at 4 ° C	+	-	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
aerobic	+	+	+	+	+
Gelatine hydrolysis	-	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-

+: Positive

-: Negative

Sequencing analysis

The alignment of the nucleotide sequences of strains chosen with genes encoding 16S rRNA databases showed a strong similarity with genes coding for the 16s RNA of the genus *Pseudomonas*. The isolates designated by the numbers 2, 5, 13, EH4 have been identified and named, respectively as: *Pseudomonas Putida* AF2, *Pseudomonas aeruginosa* RB5, *Pseudomonas fluorescens* RB13 and *Pseudomonas aeruginosa* EH4. They were submitted to GenBank under the accession no: KM592940, KM592942, KM592939 and KM592941, respectively.

Characteristics of plant growth promoter

Phosphate solubilization:

Isolates identified as fluorescent *Pseudomonas* spp. namely: *P. putida* AF2, *P. aeruginosa* BR5, *P. fluorescens* RB13, *P. aeruginosa* EH4 and the reference strain, *P. fluorescens* CHA0 were tested for their ability to

solubilize the inorganic phosphate on solid medium NBRIP containing tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ as the sole source of phosphorus. After an incubation for 10 days at 28°C , *P. putida* AF2 and *P. fluorescens* RB13 produced a clear zone around their colonies, reflecting a solubilization of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figure 2) with a halo of 15 and 13 mm, respectively. They seem to be the most effective (Figure 3). *P. aeruginosa* RB5 and *P. fluorescens* CHA0 moderately solubilized phosphate and the diameter of the halo was 4 and 2 mm, respectively. *P. aeruginosa* EH4 was unable to carry this activity. The amount of solubilized phosphate on liquid medium NBRIP varied with strains (Figure 4). *P. fluorescens* RB13 solubilized a significant amount (187.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Despite the absence of a halo of solubilization on solid medium, *P. aeruginosa* EH4 proved a significant activity; the quantity solubilized was 168.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$, statistically equivalent to that of *P. aeruginosa* RB5 (169.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$). *P. putida* has a moderate activity (108.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$) followed by *P. fluorescens* CHA0 (50.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$) thus demonstrating low phosphate solubilizing activity.

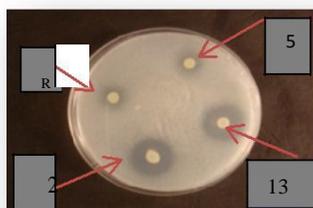


Figure 2: Areas of phosphate solubilization by fluorescent *Pseudomonas* spp.
 2: *P. putida* AF2; 5: *P. aeruginosa* RB5; 13: *P. fluorescens* RB13; R: *P. fluorescens* CHA0

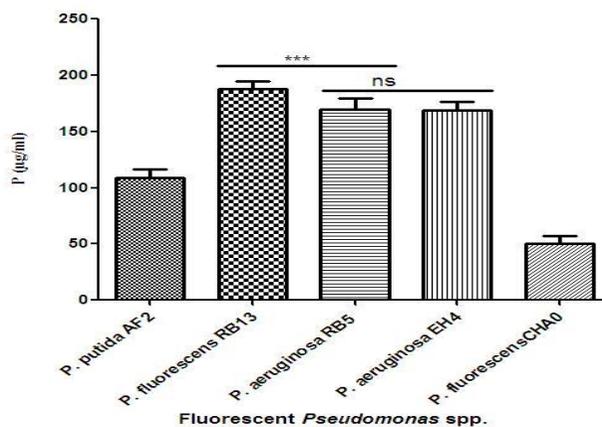


Figure 3: Phosphate solubilization of on liquid medium NBRIP by fluorescent *Pseudomonas* spp.

The results confirm clearly the ability of fluorescent *Pseudomonas* spp. to use $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ available in NBRIP medium. This reflects the same function carried out by these species in their natural habitat. Indeed, rhizobacteria can solubilize organic phosphorus of soil by the action of phosphatase, or inorganic phosphorus by the release of organic acids with low molecular weight (Kloepper *et al.*, 1989) such as citric acid (Reys *et al.*, 2001) and gluconic acid (Fenice *et al.*, 2000). The solubilized quantity is consistent with that obtained by Chen *et al.*, (2006): *Bacillus megaterium* (140.6 $\mu\text{g} / \text{ml}$), and *Rhodococcus erythropolis* (151.2 $\mu\text{g} / \text{ml}$). *P. fluorescens* isolated from Wheat rhizosphere solubilized phosphate in the range of 89-93 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Schoebitz *et al.*, 2013).

Despite the absence of a halo of solubilization around the colonies, *P. aeruginosa* EH4 could efficiently solubilize phosphorus in liquid medium (168.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$). This result supports the findings of Nautiyal (1999). In fact, organic acids secreted in order to solubilize phosphates circulate with difficulty on solid medium. Hence the choice of strains to be inoculated on the basis of the formation of a solubilizing halo on solid medium is not an evident criterion. It has been found by Cherif- silini *et al.*, (2013) that solid media NBRIP and Piskovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948) showed the same efficiency in detecting the solubilization of phosphates by *Bacillus* strains. However, the liquid medium NBRIP was 3 times more effective than PVK.

Production of IAA

After 48 h of incubation at 28 ° C, all strains tested produced IAA (Figure 4). Analysis of variance showed a significant difference in production ($p < 0.01$) between *P. fluorescens* CHA0 (88.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *P. fluorecens* RB13 (50.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and *P. aeruginosa* EH4 (36.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$). No significant difference was noted between the amounts produced by *P. putida* AF2 and *P. aeruginosa* RB5 (30.69 and 30.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively). The results show some similarities with those obtained by other researchers such as Ahmed *et al.* (2005) who reported that *Pseudomonas* isolate Ps₁ produced 53.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. It has been noted that IAA production by rhizobacteria vary among different species and strains, and it is influenced by culture condition, growth stage and substrate availability (Mirza *et al.*, 2001). The IAA, auxin produced by a large number of rhizobacteria (Patten and Glick, 2002), is considered as a product of L-tryptophan metabolism; a significant amounts were produced on a nutrient broth supplemented with 2 and 5 mg / ml of tryptophan (Bharucha *et al.*, 2013). The production of this hormone by strains of *Pseudomonas* is beneficial to plant growth and root elongation and low amounts (10^{-9} to 10^{-12} M) are needed for the primary growth of the roots (Patten and Glick, 2002). The rates obtained in this study are sufficient to stimulate plant growth. IAA stimulates stress tolerance in plant (Marulanda

et al., 2009), thus, Rhizobacteria producing IAA participate effectively in the adaptation of plant during osmotic stress by lowering their energy demand (Zahir *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2013). The studied strains could be used as bioremediation agents.

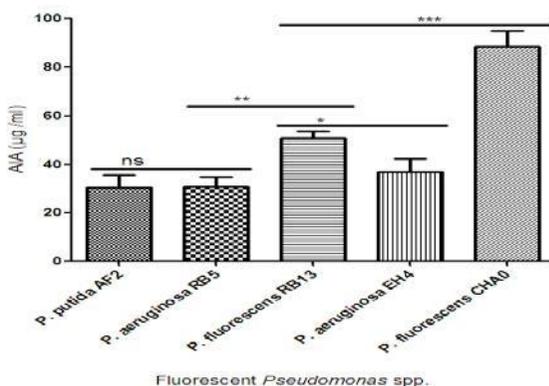


Figure 4: Production of IAA by fluorescent *Pseudomonas* spp.

Ammonia production

After addition of Nessler's reagent, a yellow-orange color has appeared, thus marking the production of NH_3 by all *Pseudomonas* strains tested. Ammonia production is considered as an important feature of rhizobacteria by improving indirectly the plant growth (Joseph *et al.*, 2007) and by ensuring a role in signaling during plant-rhizobacteria interaction (Becker *et al.*, 2002). It is well established that the ammonia released by bacteria accelerates the activity of glutamine synthetase (Sood *et al.*, 2002).

Siderophores production

Qualitatively, the 5 fluorescent *Pseudomonas* strains produced siderophores, they formed orange halos around the colonies (Figure 5). The diameter of the halo differs from one strain to another. It is maximum with *P. fluorescens* RB13 and *P. aeruginosa* EH4 (20 mm and 19 mm) respectively, followed by *P. aeruginosa* RB5 (16 mm). *P. putida* AF2 and *P. fluorescens* CHA0 gave the same value (12 mm). The presence of orange halo surrounding the colonies on CAS medium (blue) reflected the transfer of ferric ions from the medium to the siderophores (Schwyn and Neilands, 1987). The solid medium King B was favorable to the detection of siderophores production of by *Pseudomonas*.

On the liquid medium SM, the color of the complex bacterial supernatant - CAS solution turns from blue to orange depending on the rate of siderophores produced by each strain. Statistical analysis of data has shown a non-significant difference between the 5 strains tested. The % of production was as follow: *P. aeruginosa* EH4 (46), *P. fluorescens* RB13

(43), *P. putida* AF2 (42), *P. fluorescens* CHA0 (39), *P. aeruginosa* RB5 (38) (Figure 6). The liquid medium SM was favorable to the siderophores production; this observation was confirmed by Sharma and Johri (2003) and Sayyad *et al.*, (2005). They attributed an important role to succinate in increasing siderophore yields. The rate of production of siderophores is affected by the carbon source, trace elem 13 and the pH of the medium (Sharma and Johri, 2003).

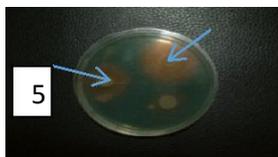


Figure 5: siderophores-production by: 13: *P. fluorescens* RB 3 and 5: *P. aeruginosa* RB5.

The Strains tested belong to the Pseudomonads known by their ability to produce siderophores such as pyoverdines and pseudobactines which gives a yellow-green color and fluorescence under UV light (Sharma and Johri, 2003). Due to their high affinity for ferric ions, siderophores chelate iron, making it inaccessible to the phytopathogenic microorganisms around the roots (Sreedevi *et al.*, 2014). Furthermore, they inhibit the spores germination of pathogenic fungi (Raaijmakers *et al.*, 1995) such as *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani* and *phytium aphanidermatum* (Sahu and Sindhu, 2011). The involvement of these compounds in plant growth promotion of wheat was also demonstrated. Sayyed *et al.*, 2005 have reported an increase in the rate of germination, in the root and shoot length of wheat inoculated with *Pseudomonas* strains producing siderophores. Thus these indigenous species could be exploited in agriculture to improve plant growth and to preserve plant health.

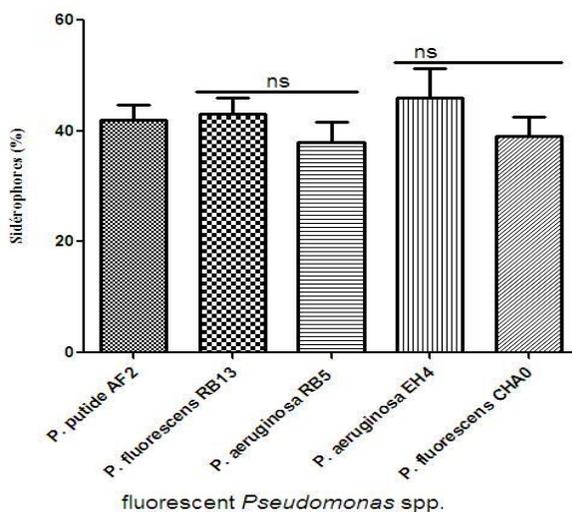


Figure 6: Siderophores production by *Pseudomonas* fluorescent spp. on liquid medium

Production of HCN

The appearance of light brown to dark brown color indicated HCN production by all the strains tested (Figure 7). Production was weak in *P. aeruginosa* RB5 and *P. aeruginosa* EH4 while it was strong in *P. putida* AF2, *P. fluorescens* RB13 and *P. fluorescens* CHA0. Variability of expression of genes (*hcnA*, *hcnB* and *hcnC*) would explain the difference in production of HCN between *Pseudomonas* strains tested (Ramette *et al.*, 2003). This variability allows the classification of bacteria into two groups: weak and strong producers. The enzyme HCN synthetase is a membrane flavoprotein which catalyses the formation of HCN and CO₂ from glycine (Ramette *et al.*, 2003). The production of HCN by *Pseudomonas* is involved in the suppression of various pathogens in particular fungi (Verma *et al.*, 1989). This volatile compound acts directly on cells by blocking the cytochrome c oxidase in the respiratory chain. It also contributes to the capture of some metal ions by forming complexes with them (Blumer and Haas, 2000) and can act as an inducer of plant resistance (Kumar *et al.*, 2012).



Fig. 7: Production of HCN by *P. fluorescens* CHA0 (in the left). In the right: a negative control

Production of hydrolytic enzymes

All fluorescent *Pseudomonas* strains tested have a protease and an amylase; they may be used as a biocontrol agent. Indirect mechanisms of action of PGPR involve the elimination of harmful microorganisms *via* the production of antibiotics or (and) lytic enzymes (Protease, amylase), HCN or catalase (Twisha and Desai, 2014). Dunne *et al.* (1997) have shown that the suppression of phytopathogenic fungus, *Pythium ultimum*, in the rhizosphere of sugar cane was due to the elaboration of extracellular protease by strains of *Stenotrophomonas maltophilia* W81. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 synthesizes an extracellular protease active against the phytopathogenic nematode *Meloidogyne incognita* (Siddiqui *et al.*, 2005). Bacterial strains possessing a catalase are assumed to be highly resistant to various environmental, mechanical and chemical stress (Kumar *et al.*, 2012).

Antifungal activity

After 10 days of incubation at 28 ° C, the antagonistic activity of the *Pseudomonas* strains toward 2 phytopathogenic fungi, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporium*, was checked. This action was revealed by the appearance of a zone of inhibition of the fungus growth around the bacterial

colony. All fluorescent *Pseudomonas* strains tested inhibited the growth of the 2 fungi; the inhibition rate varied according to the bacterial strain and the fungus.

Mycelial growth of *F. oxysporum* was strongly reduced in the presence of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* strains, compared with the uninoculated control (Figure 8) the higher percentage of Mycelial growth inhibition was observed with *P. putida* AF2 and *P. aeruginosa* RB5 38% strains. *P. fluorescens* CHA0 and *P. aeruginosa* EH4 represent the lowest antagonistic action (25%) (Figure 9)

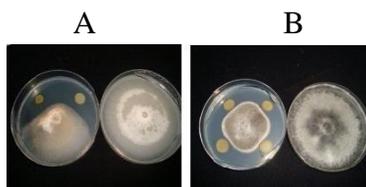


Figure 8: Antibiosis against *Fusarium oxysporium* (A) and *Alternaria alternata* (B)

Pseudomonas strains showed less inhibitory activity against *A. alternata* compared to that observed against *F. oxysporum* except *P. fluorescens* CHA0 that has similar potency against the 2 fungi. The highest antagonistic effect was recorded with *P. fluorescens* CHA0 (27%). The analysis of variance shows a non-significant difference concerning the antagonistic effect of the 4 remaining strains.

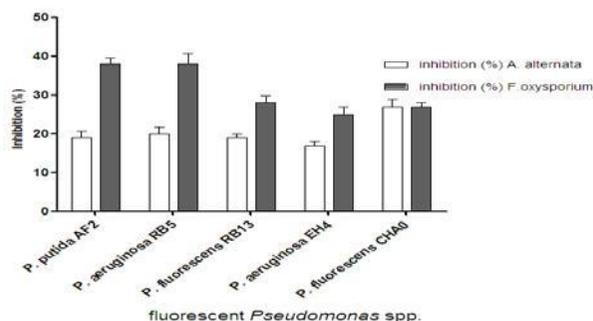


Figure 9: Inhibitory effect of fluorescent *Pseudomonas* spp. on *A. alternata* and *F. oxysporium*

Antifungal activity of fluorescent *Pseudomonas* against *F. oxysporum* and *A. alternata* strains could be strongly linked to the inhibitory substances such as siderophores, HCN and protease produced by the strains tested. The siderophore produced by *Pseudomonas* strains tested accentuate the iron deficiency in the vicinity of bacterial colonies, resulting in the inhibition of Mycelial growth. The production of HCN by the 5 strains tested contributes widely to the antagonistic effect. Yuan *et al.* (2012) noted that the volatile

compounds produced by the bacteria reduced the Mycelial growth and inhibited spore germination of *F. oxysporum*. The bacterial strains showed high activity against this fungus, although Notz *et al.*, (2002) reported that fusaric acid alters the gene responsible for the synthesis of 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) by *P. fluorescens* CHA0, in vitro and in the rhizosphere of wheat. The antagonistic effect may be due to the synthesis of other antibiotics such as acid carboxylic phenazine, the pyrrolnitrin and pyoluteorin (Haas and Defago, 2005). Variability in inhibition, observed between the strains, can be explained by the amount and effectiveness of the antibiotic produced.

Conclusion

On the basis of their excellent growth promoter (Phosphate solubilization, IAA and ammonia production) and their biocontrol activities (siderophores production, HCN, and antagonistic effect), the fluorescent *Pseudomonas* tested should be used as wheat inoculants to enhance growth and improve yield. They could be exploited as biofertilizer and as biocontrol agents to replace chemical fertilizers and fungicides that impair to human health. The use of the producing IAA strains is an efficient approach to alleviate osmotic stress imposed on plants in defined situations. They could be, therefore, exploited for sustainable agriculture in arid and salty soils.

References:

- Ahmad, F., I. Ahmad and M. S. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, 29: 29-34.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M. S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizobacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163:173-181.
- Ahmad, M., Z. A. Zahir, F. Nazli, F. Akram, M. Arshad and M. Khalid. 2013. Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Braz. J. Microbiol.*, 44: 1341-1348.
- Ali, S., T. C. Charles and B. R. Glick. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol. Biochem.* , 80:160-167.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M.R. Ismail, M.A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah, and S .Meon .2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afr. J. Biotechnol.*, 8:1247–1252.

Bakker A. W. and P. Schippers. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 451- 457.

Becker, D., R. Stanke, I. Fendrik, W.B. Frommer, J. Vanderleyden, W.M. Kaiser and R Hedrich, 2002. Expression of the NH_4^+ -transporter gene LEAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N_2 -fixing bacteria. *Planta*, 215: 424-429.

Bharucha, U., K. Patel and U. B. Trivedi. 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 :215–22

Blumer, C., and D. Haas. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173: 170-177.

Cappuccino J. G. and N. Sherman. 1992. Biochemical activities of microorganisms. *In: Microbiology, A Laboratory Manual*, third ed. The Benjamin / Cummings Pub. Co., pp. 125–179. California, USA.

Chen, Y.P., P. D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W.A. Lai and C.C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.*, 34: 33-41.

Cherif-Silini H., A. Silini, M. Ghoul, B. Yahiaoui and F. Arif. 2013. Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7 : 4562-4571.

Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, and E. Ait Barka. 2005. Use of plant growth - promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbio.*, 71: 4951–4959.

Dunne, C., J. J. Crowley, Y. Moenne-Loccoz, D. N. Dowling, F. J. De Bruijin and F. O’Gara. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology*, 143 : 3921-3931.

Fenice, M., L. Selbman, F. Federici, and N. Vassilev. 2000. Application Encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresource Technol.* 73: 157-162.

Forchetti G., O. Masciarelli, S. Alemano D. Alvarez and G. Abdala. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 1145–1152.

Glick BR, Z. Cheng, J. Czarny, Z. Cheng and J. Duan. 2007. Promotion of plant growth by ACCdeaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol.*, 119:329–39.

Gordon, S. A. and R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.*, 26:192–195.

- Gould, W. D., C. Hagedorn, T. R. Bardinelli and R. M. Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 28- 32.
- Haas, D., and G. Défago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 307-319.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Ed. Williams &Wilkins, Baltimore, MS, USA.
- Islam, F., Y. Tahira, A. Qasim, A. Shafaqat, A. Muhammad Saleem , H. Sabir and R. Hina. 2014. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. *Ecotox. Environ. Safe.*, 104: 285–293.
- Joseph, B., R. Ranjan Patra and R. Lawrence. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.* 1: 141- 152.
- Keel, C. and G. Défago. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens : mechanisms and ecological impact, p. 27- 47. In A. C. Gange, V. K. Brown (Eds.), *Multitrophic interactions in terrestrial system*. Blackwell Science, Oxford.
- Kloepper J. W., R. Lifshitz and R. M. Zablotowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnol.*, 7: 39-44.
- Kumar, A., A. Kumar, S. Devi, S. Patil, C. Payal and S. Negi. 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Res. Sci. Technol.*, 4: 01-05.
- Kumar, N. R., V. T. Arasu, and P. Gunasekaran. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Sci.*, 82: 1463-1466.
- Lemanceau, P., C. Alabouvette and Y. Couteaudier. 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies, XIV : modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, 8: 155-162.
- Lemenceau, P. 1992. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. Fluorescents. *Agronomie*, 12 : 413- 437. DOI: 10.1051/agro:19920601
- Lemanceau, P., D. Expert, F. Gaymard, P.A.H. M. Bakker and J.F. Briat. 2009. Role of iron in plant–microbe interactions. *Adv. Bot.Res.*, 51: 491-549.
- Loper, J. E. and M. N. Schroth. 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopath.*, 76: 386-389.

- Marulanda A, J. M. Barea, and R. Azcón. 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *J Plant Growth Regul.*, 28:115-124.
- Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas and G. Défago. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathol.*, 44: 40- 50.
- Meyer, J. M and M.A. Abdallah. 1978. The fluorescens pigments of fluorescent *Pseudomonas*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen.Microbiol.*, 107: 319- 328.
- Mirza, M. S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand and K. A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237:47-54.
- Nadeem S.M., B. Shaharoon, M. Arshad and D. E. Crowley. 2012. Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado trees in saline soils. *Appl. Soil Ecol.*, 62:147–54.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170: 265- 270.
- Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach., D. Haas and G. Défago. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2229–2235.
- Olsen, S.R. and L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. In: Page, A.L., R.H. Miller and D.R. Weeny (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2*, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 403–430.
- Owly, B., B. K. Duffy and D. M. Weller. 2003. Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine producing *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 3333- 3343.
- Patten, C.L. and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 3795-3801.
- Payne, S M. 1994. Detection, isolation and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.*, 235: 329- 344.
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 7:362–370.

- Raaijmakers, J.M., M. Leeman, M.M.P. van Oorschot, I.V. Sluis, B. Schippers and P.A.H.M. Bakker. 1995. Dose response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopath.*, 85: 1075-1081.
- Ramette, A., M. Frapolli, G. Defago, and Y. Moenne-Loccoz. 2003. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16: 525-535.
- Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier and H. Antoun. 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 1741-1747.
- Sahu, G. K. and S. S. Sindhu. 2011. Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. *Res. J. Microbiol.*, 10: 735- 749.
- Sayed, R., M.D. Badgajar, H.M. Sonawane, M.M. Mhaske and S.B. Chincholkar. 2005. Production of microbial iron chellators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. *Indian J. Biotechnol.*, 4: 484-490.
- Schoebitz, M., C. Ceballos, L. Ciampi. 2013. Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *J Soil Sci Plant Nutr.*, 13:1–10
- Sexanan A. K. and K. V. B. R. Tilak. 1998. Free living nitrogen fixers: their role in crop productivity. p. 25- 46. In A. Verma (ed.), *Microbes for health wealth and sustainable environment* Malhotra. Publishing house, New Delhi, India.
- Sharifi-Tehrani, A., M. Zala, A. Natsch, Y. Moënné-Loccoz and G. Défago. 1998. Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 631-643..
- Sharma, A. and B. N. Johri. 2003. Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiol. Res.*, 158: 77-81
- Sheng, X. F. 2005. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 1918-1922.
- Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* 160: 47-56.
- Siddiqui I. A., D. Haas and S. Heeb. 2005. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 5646–5649.
- Sindhu, S.S., Y. S. Rakshiya and G. Sahu, 2009. Biological control of soilborne pathogens with rhizosphere bacteria. *Pest Technol.*, 3: 10-21.

- Sood, C. R., S. V. Chanda and Y. D. Singh. 2002. Effect of different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase activities of radish cotyledons. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 28: 46-56.
- Sreedevi, B., S. Preethi and J. P. Kumari. 2014. Isolation, production and optimization of siderophore producing *Pseudomonas* from paddy soil. *Int. J. Pharm. Res. Sci.*, 02: 71-88.
- Twisha P. and P. B. Desai. 2014. Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of *Gossypium species* in Monsoon. *Res. J. Recent. Sci.*, 3 : 42- 51.
- Van Loon, L.C., P.A.H.M. Bakker and C.M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev Phytopathol.*, 36: 453-483.
- Verma, J. P., J. Yadav, K. N. Tiwari, Lavakush and V. Singh. 2010. Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on crop production. *Int. J. Agr. Res.*, 5: 954 – 983.
- Voisard, C., C. Keel, D. Haas and G. Défago. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 8: 351– 358.
- Yuan, J., W. Raza, Q. Shen, and Q. Huang. 2012. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Appl Environ. Microbiol.*, 78: 5942–5944.
- Zahir Z. A, M. K. Shah, M. Naveed and M. J. Akhter 2010. Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 1288-1294.

ملخص

بينت الدراسة البكتريولوجية لعينات تربة من نظامين بيئيين مختلفين (قمح *Triticum durum* ونبات ملحي *Atriplex halimus*) أن تراب المنطقة اللصيقة بالجزور غني في عدد البكتريات وأن endosphere النبات الملحي يحوي عددا معتبرا من الأنواع البكتيرية. تم عزل 23 نوعا بكتيريا سالبة الغرام تعطي وميضا وتتمتع بالخصائص الكيميائية الحيوية المشابهة لـ *Pseudomonas fluorescens*. تمت معاينة قدرتها على إنتاج عدد من الجزيئات الحيوية التي لها القدرة على تحفيز نمو النباتات (حامض الأندول AIA، والسيدوروفور Siderophores، والأمونيا) وكذا انحلالية الفوسفات. أغلب العينات تثبط نمو الفطريات الممرضة *Fusarium oxysporum* و *Alternaria alternata*، وتنتج سيانيد الهيدروجين وتمتلك إنزيم بروتياز. شُخصت أربع عينات بكتيرية بطريقة التسلسل الجيني لـ ARNr 16S على أنها

Pseudomonas putida AF2، *P. aeruginosa* RB5، *P. fluorescens* RB13، *P. aeruginosa* EH4. NaCl واسترجاع النمو عند إضافة جليسين بيتاين (glycine betaine) وبرولين (proline) (1 ميليومول). وكان مستخلص الطحلب *U. lactuca* أكثر فعالية من الجزينيتين الاصطناعيتين. بينما لم يمنح مستخلص النبتة الملحية أي حماية للبكتيريا المهجدة بالملح. في وجود 800 ميليومول كان التثبيط كليا في جميع الحالات. بينت عملية التلقيح الفردي أو المزدوج للقمح الصلب نوع محمد بن بشير بـ *P. fluorescens* CHA0 و *P. fluorescens* RB13، وبإضافة الجزيئات التي تحمي من الملوحة [جليسين بيتاين، برولين (5ميليومول) ومستخلص الطحلب (3%)]] تحت ظروف الإجهاد الأسموزي تحسنا معتبرا في نسبة الانتاش ووزن النبات. كان للتلقيح المزدوج تأثيرا تآزريا تمثل في تحسين المردود. أما التجربة التي أجريت في وسط إنتاش MS فبينت أن القمح الملقح بمزيج من البكتيريا والمجهد بتركيز 200 ميليومول أظهر نتائج جيدة من حيث الخصائص المورفولوجية والكيميائية. إن الجمع بين السلالتين البكتيريتين ومستخلص *U. lactuca* في تلقيح القمح مكن النبات من استعادة الخصائص التي تمت دراستها (الكتلة الحية، كمية البرولين، الكاروتين والكلوروفيل). إن هذه النتائج يمكن تطبيقها في تلقيح القمح بهذه السلالات النشطة والمقاومة للملوحة من نوع *P. Fluorescens* وبالاستعانة بالمستخلصات الطبيعية من *U. lactuca* يمكن استغلال الأراضي المنضرة بالملوحة من أجل زراعة مستدامة.

الكلمات المفتاحية: *A. halimus*، الكاروتين، الكلوروفيل، التلقيح المزدوج، Glycine betaine، *P. fluorescens*، PGPR، البرولين، ملوحة، *U. lactuca*، *T. durum*.

Résumé

La flore totale bactérienne et les *Pseudomonas* fluorescents de deux écosystèmes telluriques différents (blé et *Atriplex halimus*) sont évalués. Les numérations renseignent sur une richesse en bactéries des 2 rhizosphères. L'endosphère de *Atriplex halimus* abrite un nombre important d'espèces bactériennes. 23 isolats à Gram- présentant une fluorescence et des caractères biochimiques similaires à ceux des *Pseudomonas* fluorescents spp. sont retenus. Ils produisent des molécules bioactives stimulant la croissance végétale (acide indole acétique, sidérophores, ammoniac) et solubilisent les phosphates. La majorité exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de 2 champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata*, produit l'acide cyanhydrique et possède une protéase. Quatre souches sont identifiées comme *Pseudomonas putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5, *P. fluorescens* RB13 et *P. aeruginosa* EH4, par séquençage de l'ARNr 16S. Inhibées à 500 mM/ NaCl, la croissance des 4 souches est restaurée par un apport exogène de glycine bêtaïne et de Proline (1 mM). L'extrait de l'algue *U. lactuca* (au 1/ 100^{ème}) exerce un effet plus fort que les 2 molécules synthétiques. Tandis que celui de *A. halimus* n'apporte pas d'osmoprotection. En présence de 800 mM l'inhibition est totale quelles que soient les conditions. L'inoculation du blé dur Mohamed Ben Bachir par *P. fluorescens* RB13, *P. fluorescens* CHAO, isolément ou en culture mixte, en présence d'osmoprotecteurs [glycine bêtaïne, proline (5 mM) et extrait d'algue (3%)], augmente le taux cumulé de germination et la biomasse des plantes. La co-inoculation a un effet synergique évident par l'obtention d'un rendement maximal. *In vitro*, sur milieu de germination MS, les caractéristiques morpho-biochimiques sont significativement améliorées chez le blé co-inoculé et sous stress salin de 200 mM/ NaCl. L'effet synergique de la co-inoculation et de *U. lactuca* restaure considérablement les paramètres étudiés (biomasse, taux de proline, de chlorophylle et de caroténoïdes). Ces résultats sont en faveur d'une inoculation des graines de blé par des souches actives et halotolérantes de *P. fluorescens*. Une supplémentation en osmoprotecteurs naturels provenant de *U. lactuca* serait très bénéfique pour une agriculture durable dans les sols affectés par la salinité.

Mots clé : *A. halimus*, Caroténoïdes, Chlorophylle, Co-inoculation, Glycine bêtaïne, *P. fluorescens*, PGPR, Proline, Salinité, *T. durum*, *U. lactuca*.

Abstract

The total bacterial flora and fluorescent *Pseudomonas* of two different ecosystems (wheat and *Atriplex halimus*) was evaluated. The counts provided information on the abundance of bacteria in the 2 rhizospheres. The endosphere of *Atriplex halimus* contains a significant number of bacteria. 23 Gram- isolates exhibiting fluorescence and biochemical characteristics similar to those of fluorescent *Pseudomonas* spp. were retained. They produced bioactive molecules stimulating plant growth (indole acetic acid, sidérophores, ammonia) and they solubilized phosphates. Most exerted inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*, produced hydrogen cyanide and has a protease. Four strains were identified as *Pseudomonas putida* AF2, *P. aeruginosa* RB5, *P. fluorescens* RB13 and *P. aeruginosa* EH4 by sequencing the 16S rRNA gene. Inhibited by 500 mM/ NaCl, the growth of the strains 4 was restored by exogenous supply of glycine betaine and proline (1 mM). The extract of seaweed *U. lactuca* (1/100 th) exerted a stronger effect than the 2 synthetic molecules, while that of *A. halimus* showed no osmoprotection. Total inhibition was observed in the presence of 800 mM, no molecule could overcome stress. The seed inoculation of durum wheat variety Mohamed Ben Bachir with *P. fluorescens* RB13, *P. fluorescens* CHAO, singly or mixed culture, in the presence of osmoprotecteurs [glycine betaine, proline (5 mM) and seaweed extract (3%)], increased the cumulative rate of germination and plant biomass. The co-inoculation has a clear synergistic effect by obtaining maximum yield. *In vitro*, on MS germination medium, the morphological and biochemical characteristics were significantly improved with the co-inoculated wheat under an osmotic stress of 200 mM/ NaCl. The synergistic effect of co-inoculation and *U. lactuca* considerably restored the parameters studied (biomass, rate of proline, chlorophyll and carotenoids). These results are in favor of the inoculation of wheat seeds by active and halotolerant strains of *P. fluorescens*. Supplementation with natural osmoprotectant *U. lactuca* would be very beneficial for sustainable agriculture in the soils affected by salinity.

Keywords: *A. halimus*, carotenoids, Chlorophyll, Co-inoculation, Glycine betaine, *P. fluorescens*, PGPR, Proline, Salinity, *T. durum*, *U. lactuca*.