

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/2014

THÈSE

Présentée par

CHERIF Hafsa

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Option: Microbiologie

THÈME

**Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par
inoculation avec *Bacillus sp.* et *Pantoea agglomerans* isolées de sols
arides**

Soutenue publiquement le/...../2014

DEVANT LE JURY

Président : Larous Larbi

Pr. UFA Sétif 1

Directeur : Ghoul Mostefa

Pr. UFA Sétif 1

Examineur: Hamidechi Mohamed Abdelhafid

Pr. UM Constantine 1

Examineur: Boudemagh Allaoueddine

MCA UM Constantine 1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie Appliquée Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, Université Ferhat Abbas –Setif1.

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Mr. Mostefa GHOUL**, Professeur de Microbiologie. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, et ses intérêts portés à ce sujet de recherche.*

*Mes remerciements les plus chaleureux au président du jury, **Mr Larbi LAROUS** Professeur de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université de Sétif d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury.*

*Je tiens à remercier également **Mr Mohamed Abdelhafid HAMIDECHI**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mentouri-Constantine, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Que **Mr Allaoueddine BOUDEMAGH**, Maître de Conférences classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mentouri-Constantine, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail.*

*Mes plus vifs remerciements vont à **Mr Abdellatif BOUDABOUS** Professeur de Microbiologie et Directeur du Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences El Manar- Tunis pour son accueil et son aide pour l'accomplissement de la partie biologie moléculaire.*

*Que mon collègue **Mr Bilal Yahiaoui** Maître de Conférences de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université de Sétif trouve ici l'expression de mes sentiments de gratitude et de fraternité.*

Je dédie ce travail à mon mari, mes parents et mes enfants en espérant qu'ils oublieront vite les heures soustraites à leur joie.

Résumé

L'étude relative à l'inoculation des graines de blé dur par *Bacillus* sp et *Pantoea agglomerans* en présence de sel est réalisée dans le but d'apprécier l'effet positif des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria) sur la vigueur et la productivité des cultures particulièrement lorsqu'elles sont soumises à un stress salin. L'efficacité des inocula bactériens est liée à la caractérisation de multiples activités PGP telles que la production de l'acide indole acétique (AIA), du cyanure d'hydrogène (HCN), des sidérophores, de l'ammoniac (NH_3), de la solubilisation des phosphates, de l'activité antifongique ainsi que de la capacité de synthétiser une ACC désaminase. Un total de 62 souches bactériennes (BG+ sporulés et BG-) sont isolées et sélectionnées à partir de trois sols rhizosphériques de régions arides et semi-arides. La majorité (>80%) des souches produisent du NH_3 . 75% des *Bacillus* inhibent trois souches fongiques et plus. 77% des BG- synthétisent des taux d'AIA $\geq 10\mu\text{g/ml}$. Seules six souches possèdent une ACC-désaminase. La capacité de solubilisation des phosphates par des souches de *Bacillus* (n=10) testées sur milieu NBRIP décline en présence de NaCl. Cette activité reste faible sous stress salin et même en présence d'osmoprotecteurs : glycine-bétaine et proline (1mM). Les deux souches les plus performantes retenues et identifiées par séquençage du gène de l'ARNr16S sont *Bacillus* sp. sch1 et *Pantoea agglomerans* lma2. Cette dernière possède un caractère halophile et exprime des activités PGP (production d'AIA de sidérophores et solubilisation des phosphates) élevées à des salinités comprises entre 100 et 400 mM de NaCl.

L'inoculation des graines de blé dur (variété Waha) par *Bacillus* sp. et/ou *P. agglomerans* sous contrainte saline (0, 100 et 200mM/NaCl) améliorent nettement ($P \leq 0,01$) les paramètres morphologiques de la plante (poids frais et secs des racines et des feuilles, de l'allongement racinaire et de l'élongation de la plante). Le poids sec des feuilles augmentent après inoculation par *Bacillus* sp. de 38% à 100mM et de 158% à 200 mM /NaCl. Les feuilles s'allongent de 27.31% pour *Bacillus* sp, 15.90% pour *P. agglomerans* et seulement 8.62% pour la co-inoculation. La synthèse de la chlorophylle est induite après inoculation quelle que soit la teneur en sel. L'accumulation de proline augmente à 200 mM/NaCl. Elle chute en présence de *P. agglomerans*. Les taux de Na^+ intracellulaires sont importants à 100 et 200 mM /NaCl. L'effet inhibiteur du sel sur l'absorption de K^+ est atténué en présence d'inoculum bactérien. L'interaction entre salinité et inoculation bactérienne est positivement significative. Cependant la co-inoculation n'est pas synergique. En définitive, *Bacillus* sp. et *P. agglomerans* constituent des bioinoculants efficaces dans la restauration de la croissance du blé dur en zones arides et salées.

Mots clé : *Bacillus*, *Pantoea agglomerans*, inoculation, PGPR, salinité.

ملخص

أجريت الدراسة على تلقيح بذور القمح القاسي من قبل *Bacillus sp* و *Pantoea agglomerans* في وجود الملح في أجل تقييم الأثر الإيجابي لتعزيز نمو النباتات (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria) على قوة و إنتاجية المحاصيل وخاصة عندما تتعرض لإجهاد الملح. وترتبط فعالية اللقاح البكتيري على تصنيف أنشطة PGP متعددة مثل إنتاج من حامض الأندول (AIA)، وسيانيد الهيدروجين (HCN)، والأمونيا (NH₃)، انحلالية الفوسفات، مضادة الفطريات وقدرة نشاط انزيم ACC deaminase. تم عزل مجموعه 62 سلالات بكتيرية (BG+ BG-) من ثلاثة تربة ريزوسفير من المناطق القاحلة وشبه القاحلة. يتم اختبارها لعدة أنشطة. معظم سلالات تنتج NH₃ (< 80 %). 75 % من البكتيريا BG+ تمنع نمو ثلاث سلالات فطرية او اكثر. 77 % من الكتيريا BG- تفرز معدل AIA $\geq 10\mu\text{g/ml}$. ستة سلالات فقط تحتوى على انزيم ACC deaminase. انحلالية الفوسفات للسلالات BG+ (ن = 10) على وسط NBRIP تتناقص في وجود كلوريد الصوديوم (NaCl). لا يبدو أن osmoprotection بمساهمة البيتين الجلايسين و البرولين (1 mM) لها الاستطاعة لاستعادة هذا النشاط تحت الضغط الملحي. السلالاتان الاكثر فعالية شخضت بطريقة التسلسل الجينى ل ARN16S هي *Bacillus sp. sch1* و *Pantoea agglomerans lma2*. من خصائص *Pantoea agglomerans* انها محبة للملوحة. لأنها تعرب عن الأنشطة PGP أفضل بين 100 و 400 ملي مول (mM) من NaCl.

تلقيح بذور القمح الصلب النوع الواحة ب *Bacillus sp* و / أو ب *Pantoea agglomerans* في وجود عدة تراكيز من الملح (0 و 100 و 200 mM) تحسن باحتمال $P \leq 0.01$ المعلمات المورفولوجية للنبات. يرتفع وزن الاوراق الجافة بعد التلقيح ب *Bacillus sp* الى 38% في تركيز 100 mM و إلى 158 % في 200 mM NaCl. طول النبات يرتفع إلى 27.31% في حالة التلقيح ب *Bacillus sp* ، إلى 15.90% في حالة التلقيح ب *Pantoea agglomerans* والى 8.62 % فقط عند استعمال اللقاحين. تحفيز افراز الكلوروفيل بعد التلقيح يكون على جميع مستويات الملوحة و تكون زيادة تراكم البرولين عند 200 mM. ولكن في وجود *Pantoea agglomerans* لا يبدو ان هذا الحمض الامينى يتراكم. المعدلات ل Na+ داخل الخلايا عند 100 و 200 mM هامة. ينقص أثر الملح المانع لامتنصاص K + في وجود اللقاح البكتيري. التفاعل بين الملوحة و التلقيح مهم. ومع ذلك كان التلقيح المزدوج غير تآزرى. *Bacillus sp* و *Pantoea agglomerans* يشكلان لقاحين فعالين لاستعادة نمو القمح الصلب في المناطق القاحلة و المالحة.

كلمات مفاتيح: *Bacillus sp*، *Pantoea agglomerans*، الملوحة، اللقاح البكتيري، PGPR

Abstract

The study on the inoculation of wheat durum seeds by *Bacillus* sp and *Pantoea agglomerans* in the presence of salt is carried out in order to assess the positive impact of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR , Plant Growth Promoting Rhizobacteria) on vigor and crop productivity especially when subjected to salt stress. The effectiveness of the bacterial inoculum is related to the characterization of multiple PGP activities such as the production indole acetic acid (IAA) , hydrogen cyanide (HCN) , siderophores , ammonia (NH₃) , of phosphate solubilization , the antifungal activity as well as the capacity to synthesize an ACC deaminase. A total of 62 bacterial strains (BG- and BG+ sporulated) were isolated and selected from three rhizosphere of arid and semi -arid soils. The majority (> 80 %) strains produce NH₃. 75% of *Bacillus* inhibit three fungal strains and more. 77% of BG-synthesize AIA at rate $\geq 10\mu\text{g/ml}$. Only six strains possess ACC deaminase. The ability of phosphate solubilization by *Bacillus* strains (n = 10) tested on NBRIP medium decrease in the presence of NaCl. This activity remains low in salt stress and even in presence of osmoprotecteurs : glycine betaine and proline (1 mM). The two most powerful strains selected and identified by sequencing the 16S rRNA gene are *Bacillus* sp. SCH1 and *Pantoea agglomerans* lma2 . The latter has an halophilic character and expresses PGP activities (production of siderophores AIA and phosphate solubilization) high at salinities between 100 and 400 mM NaCl.

The seeds inoculation of durum wheat variety Waha by *Bacillus* sp and/or *P. agglomerans* under salt stress (0, 100 and 200 mM /NaCl) improves significantly ($P \leq 0.01$) morphological parameters of the plant (fresh and dry weight of roots and leaves, root elongation and the plant elongation). Leaf dry weight increase after inoculation with *Bacillus* sp. To 38% at 100 mM and to 158 % at 200 mM /NaCl . The leaves are growing from 27.31 % with *Bacillus* sp., 15.90 % with *P. agglomerans* and only 8.62 % for the co-inoculation. The chlorophyll synthesis is induced after inoculation regardless of the salt content. The accumulation of proline increases to 200 mM / NaCl. It falls in the presence of *P. agglomerans*. Rates of intracellular Na⁺ are important at 100 and 200 mM / NaCl . The inhibitor effect of salt on the K⁺ absorption is reduced in presence of bacterial inoculum . The interaction between salinity and bacterial inoculation is significant. However the co-inoculation is not synergistic . Ultimately, *Bacillus* sp and *P. agglomerans* bioinoculants are effective in restoring growth of durum wheat in arid and saline areas .

Key words: *Bacillus* sp., *Pantoea agglomerans*, inoculation, salinity, PGPR.

Liste des principales abréviations

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

C_E : Conductivité électrique

ddNTP : di désoxy Nucléotide Tri-Phosphate

dNTP : désoxy Nucléotide Tri-Phosphate

DO : densité optique

dS : déciSiemens

EM: Ecart Moyen

F: Fischer test

GB: Glycine Bétaine

mM: milliMolaire

mS : milliSiemens

P: Proline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PTC: phosphates tricalcique

rpm: rotation par minute

ROS : Reactive Oxygen Species

Liste des Figures

- Fig. 1: Promotion de la croissance des plantes par les PGPR**
- Fig. 2: Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates**
- Fig. 3: Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale**
- Fig. 4: Mécanisme d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stress abiotiques**
- Fig. 5: Fonctions biologiques des sidérophores**
- Fig. 6: Les différentes phases du phénomène d'induction de la résistance chez les plantes par les rhizobactéries.**
- Fig. 7: Augmentation de la tolérance et la survie des plantes induite par les PGPR en milieu salin**
- Fig. 8: Bacille à Gram+ sporulé (A :D13) Bacille à Gram- (B : B5)**
- Fig. 9: Colonie muqueuse de *Bacillus* (C :D13) colonie pigmentée de BG- (D : B5)**
- Fig. 10: Fréquence des activités PGP des *Bacillus***
- Fig. 11: Fréquence des activités PGP des bactéries à Gram-**
- Fig. 12: Production d'AIA par les souches de *Bacillus* sur milieu WS**
- Fig. 13: Production d'AIA par les souches à Gram- sur milieu WS**
- Fig. 14: Solubilisation des phosphates sur milieu PVK par les souches de *Bacillus***
- Fig. 15: Solubilisation des phosphates sur bouillon PVK par les souches à Gram-**
- Fig. 16: Halo de transparence autour de la colonie**
- Fig.17:Production des sidérophores sur milieu au CAS liquide par les souches de *Bacillus***
- Fig. 18: Production des sidérophores sur milieu au CAS liquide par les souches à Gram-**
- Fig. 19: Halo orange autour de la colonie**
- Fig. 20: Pourcentage d'inhibition des souches bactériennes envers les différentes souches fongiques**
- Fig. 21: Zone d'inhibition autour des colonies de *Bacillus* actifs contre *P. infestans*(PI) et *F. solani* (FS).**

- Fig. 22:** Nombre de souches fongiques sensibles aux *Bacillus*
- Fig. 23:** Nombre de souches fongiques sensibles aux bactéries à Gram-
- Fig. 24:** ACP des activités générées par les souches de *Bacillus*
- Fig. 25:** ACP des activités générées par les bactéries à Gram-
- Fig. 26:** Arbres phylogénétiques basés sur une comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des souches et de certaines souches phylogénétiquement proches (souches validement publiées). L'arbre est réalisé par la méthode de neighbor-joining. Les nombres sur l'arbre indiquent+ les pourcentages des dérivés de 1000 réplifications (a) D13et (b) B5.
- Fig. 27:** Effet du pH sur la croissance de *P. agglomerans* lma2.
- Fig. 28:** Effet de la température sur la croissance de *P. agglomerans* lma2.
- Fig. 29:** Effet du sel sur la croissance de *P. agglomerans* lma2.
- Fig. 30:** Solubilisation des phosphates par *P. agglomerans* en présence de sel
- Fig. 31:** Production de sidérophores par *P. agglomerans* en présence de sel.
- Fig. 32:** Production d'AIA par *P. agglomerans* en présence de NaCl
- Fig. 33:** Solubilisation du phosphate par *Bacillus* sur milieu solide PVK et NBRIP.
- Fig. 34:** Taux de phosphates solubilisé exprimé en P_2O_5 dans les milieux liquides
- Fig. 35:** Valeurs de pH des trois milieux liquides
- Fig. 36:** Solubilisation du phosphate par D1 et D13 en présence de proline et de glycine bêtaïne sous différentes concentrations de NaCl.
- Fig. 37:** Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la matière fraîche et sèche foliaire (mg) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl.
- Fig. 38:** Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la matière fraîche et sèche racinaire (mg) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl
- Fig. 39:** Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la hauteur de la plante et sur la longueur racinaire (cm) du blé dur avant et après exposition à 0, 100 et 200 mM de NaCl
- Fig. 40:** Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la hauteur de la plante et sur la longueur racinaire à 200mM de NaCl

Fig. 41: Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur contenu foliaire en chlorophylles a,b et totale (mg /g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl

Fig. 42: Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur contenu foliaire en proline (µg /g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl

Fig. 43: Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur contenu foliaire et racinaire en Na^+ (mg/g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl

Fig. 44: Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur contenu foliaire et racinaire en K^+ (mg/g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl

Liste des Tableaux

Tab. 1: Classification de *Pantoea agglomerans*

Tab. 2: Evolution du genre *Bacillus* (1986-2004)

Tab.3: Position taxonomique des bactéries Gram-positives, aérobies et formant des endospores (AEFB) selon le séquençage du gène de l'ARNr 16S et le nombre d'espèces alloué à chaque genre (Taxonomic Outline of Bergey's Manual, 2004).

Tab. 4: Diversité des souches bactériennes identifiées comme inducteurs de la résistance systémique chez les plantes et la diversité des pathosystèmes dans lesquels l'ISR est impliquée.

Tab. 5: Détermination des paramètres physico-chimiques des sols

Tab. 6: Examen microscopique des souches de *Bacillus*.

Tab. 7: Examen microscopique des bactéries fixatrices d'azote

Tab. 8: Analyse de la variance de la production de l'AIA par les souches de *Bacillus*

Tab. 9: Analyse de la variance de la production de l'AIA par les souches à Gram-

Tab.10: Analyse de la variance de la solubilisation des phosphates par les souches de *Bacillus*

Tab.11: Analyse de la variance de la solubilisation des phosphates par les souches Gram-

Tab.12: Analyse de la variance de la production des sidérophores par les souches de *Bacillus*

Tab.13: Analyse de la variance de la production des sidérophores par les souches à Gram-

Tab.14: Analyse de la variance de l'effet du sol sur la production de l' AIA, des sidérophores (SID), la solubilisation des phosphates (P_2O_5) et l'activité antifongique (A.AF) par *Bacillus*

Tab.15: Analyse de la variance de l'effet du sol sur la production de l' AIA, des sidérophores (SID), sur la solubilisation des phosphates (P_2O_5) et l'activité antifongique (A.AF) par les Gram-

Tab.16: Caractérisation biochimique

Tab.17: Activités de *P.agglomerans*

Tab.18: Corrélation entre les activités de *P. agglomerans* lma2

Tab.19: Compositions des milieux de culture.

Tab.20: Solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sur milieu solide par les souches de *Bacillus* (n=10).

Tab.21: Analyse de la variance de la solubilisation du PTC dans les milieux liquides.

Tab.22: Solubilisation du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dans les milieux liquides par les souches de *Bacillus*.

Tab. 23: Analyse de la variance du pH dans les trois milieux.

Tab. 24: Valeurs de pH des trois milieux

Tab.25 : Analyse de la corrélation entre la concentration de P soluble et le pH des milieux.

Tab.26 : Corrélation entre la solubilisation du PTC dans le milieu solide et liquide

Tab.27: Effet des concentrations de sel sur la solubilisation de P sur NBRIP

Tab.28: Taux de phosphore solubilisé par les souches de *Bacillus* en fonction de la salinité.

Tab.29 : Analyse de la variance du pH sous les conditions salines.

Tab.30: Valeurs du pH du milieu NBRIP aux différentes concentrations de NaCl

Tab.31: Corrélation entre le P soluble et le pH du milieu sous stress salin

Tab.32: Osmoprotection de la proline et de la glycine-bétaine sur les *Bacillus*

Tab.33: Effet de la glycine-bétaine et la proline sur le pH du milieu à différentes concentrations de NaCl.

Tab.34: Corrélation entre le P soluble et le pH du milieu présence de sel et d'osmoprotecteurs.

Tab.35: Analyse de la variance des carrés moyens des résultats des poids frais et sec foliaires et racinaires , de la hauteur de la plante et de longueur des racines

Tab.36: Analyse de la variance des carrés moyens des résultats des chlorophylles (a, b, a+b) et de la proline

Tab. 37: Analyse de la variance des carrés moyens des résultats des teneurs en Na^+ et K^+ foliaire et racinaire

Sommaire

Introduction	1
Revue bibliographique	3
I - Stress abiotiques	3
II- Effet néfaste de la salinité sur les cultures agricoles	4
III- Différentes stratégies d'amélioration des cultures contre le stress salin	5
IV- Diversité microbienne du sol	6
1- La rhizosphère	6
2- Les rhizobactéries	8
3- Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes	9
V- Diversité taxonomique des PGPR	9
1- Alphaproteobacteria	10
2- Betaproteobacteria	10
3- Actinobacteria	10
4- Gammaproteobacteria	11
4-1 <i>Pantoea agglomerans</i>	11
- Définition et caractères généraux	11
- Habitat et écologie	11
5- Firmicutes	13
5-1 <i>Bacillus</i>	13
- Taxonomie	13
- Caractères bactériologiques	18
- Caractères physiologiques	18
- Ecologie des <i>Bacillus</i>	18
VI- Mécanismes d'action des PGPR	19
1- Biofertilisation	20
1-1- Fixation d'azote	20
1-2- Solubilisation du Phosphate	22
2- Phytostimulation	24
2-1- Production d'hormones de croissance	24
- Acide indole acétique (AIA)	24
- Cytokinines et gibbérellines	26
- Rôle de l'éthylène	27
2-2- Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	27
3 - Biocontrôle	29
3-1- Compétition pour l'espace et les nutriments	29
3-2- Compétition pour le fer et la production de sidérophores	30
3-3- Antibiose et parasitisme	32
3-4- Composés volatiles	33
3-5 - Résistance Systémique Induite (ISR)	33
3-5- 1-Les déterminants bactériens de l'ISR	36
- Les composants de la surface des cellules	37
- Les sidérophores	37
- Les antibiotiques	37
VII- Effets des PGPR sur la croissance végétale	38
1- Rendement et composantes du rendement	38
2- Germination et émergence	39

3- Enracinement des boutures-----	39
4- Absorption des nutriments-----	40
5- Effets bénéfiques des PGPR (s) en milieu salin-----	40
6- Effet des facteurs écologiques sur la performance des PGPR-----	41
VIII- Mécanismes de tolérance des PGPR au stress salin-----	42
1- Les solutes compatibles : un moyen de réponse au stress osmotique-----	42
2- Osmoprotection ou osmotolérance-----	43
3- Autres moyens de réponse au stress osmotique -----	45
3-1- L'ACC désaminase-----	45
3-2- Exopolysaccharides-----	46
3-3- Activité antioxydante-----	46
Matériel et Méthodes-----	47
I-Localisation des sites de prélèvement-----	47
II-Prélèvement des échantillons -----	49
III- Analyses physico-chimiques des sols-----	49
1- Mesure du pH et de la conductivité électrique (C _E)-----	49
2- Détermination de la matière organique-----	49
3- Détermination du carbone organique -----	49
4- Dosage du calcaire total-----	49
IV- Résultats et discussions-----	50
A- Isolement et caractérisation des PGPR-----	52
I-Introduction-----	52
II-Matériel et méthodes -----	52
1-Isolement des bactéries-----	52
- La flore à Gram+ sporulée : <i>Bacillus</i> -----	52
- La flore à Gram- fixatrice d'azote-----	53
2-Mesure des activités PGPR-----	53
2-1 -Fixation d'azote-----	53
2-2- Production de NH ₃ -----	53
2-3- Production d'HCN -----	53
2-4- Solubilisation des phosphates -----	53
2-5- Production d'Acide Indole Acétique (AIA) -----	54
2-6- Production de sidérophores-----	54
2-7- Activité antifongique-----	55
2-8- Production d'ACC-désaminase -----	56
2-9- Analyse statistique-----	56
3-Caractérisation des souches bactériennes-----	57
3-1- Identification moléculaire-----	57
3-1-1- Extraction de l'ADN-----	57
3-1-2- Dosage de l'ADN -----	58
3-1-3- Amplification par PCR-----	58
3-1-4- Electrophorèse sur gel d'agarose-----	59
3- 1-5 – Séquençage-----	59
3-1-6- Analyse phylogénétique-----	59
III- Résultats-----	60
1- Isolement et caractérisation des souches isolées-----	60
1-1- Caractérisation morphologique-----	60
2 - Activités PGP-----	62
2-1- Production d'acide indole acétique (AIA)-----	64

2-2-Solubilisation des phosphates-----	66
2-3-Production de sidérophores-----	68
2-4-Activité antifongique-----	70
3- Effet du sol sur les activités PGP-----	73
4- Analyse en composantes principales (ACP)-----	74
5- Identification moléculaire -----	76
IV- Discussion-----	78
B- Isolement et caractérisation d'une rhizobactérie améliorant la	
croissance des plantes : <i>Pantoea agglomerans</i> lma2-----	83
I-Introduction-----	83
II-Matériel et Méthodes-----	83
1- Souche bactérienne-----	83
2- Caractérisation phénotypique-----	83
2-1- Caractérisation métabolique-----	83
2-2-Effet du sel, du pH et de la température sur la croissance de <i>P. agglomerans</i>	84
3-Mesure des activités PGP -----	84
4-Effet du sel sur les activités PGPR-----	84
5- Analyse statistique-----	85
III-Résultats -----	85
1- Identification de la souche-----	85
2-Caractérisation biochimique -----	85
3-Caractérisation physiologique-----	87
3-1-Effet du pH -----	87
3-2- Effet de la température-----	87
3-3- Effet du sel -----	88
4-Activités PGP -----	89
4-1-Fixation d'azote, production de NH ₃ et de HCN-----	89
4-2- Solubilisation du phosphate-----	89
4-3- Production des sidérophores-----	89
4-4- Production d'AIA-----	89
5- Effet du sel sur les activités PGP-----	90
6- Corrélation entre les activités de <i>P. agglomerans</i> lma2-----	93
IV- Discussion-----	93
C : Solubilisation des phosphates par <i>Bacillus</i> sous stress salin et en	
présence de molécules osmoprotectrices-----	96
I-Introduction -----	96
II- Matériels et méthodes-----	97
1- Souches bactériennes-----	97
1-1- Milieux de culture utilisés-----	97
2 -Test de solubilisation en milieu solide-----	98
3- Test de solubilisation en milieu liquide-----	98
4- Estimation de la solubilisation sous stress salin-----	99
5- Effet des osmoprotecteurs-----	99
6- Analyse statistique-----	99
III-Résultats-----	99
1- Solubilisation des phosphates -----	99
- Sur milieu solide-----	99
- Sur milieu liquide-----	100
2- Corrélation entre le pH et le P soluble-----	103

3- Comparaison entre la solubilisation du P dans le milieu liquide et solide-----	104
4- Effet du stress salin sur la solubilisation-----	104
5- Effet des osmoprotecteurs sur la solubilisation du P-----	106
IV-Discussion-----	108
D - Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morfo- biochimiques du blé en milieu salin-----	112
I –Matériel végétal-----	112
II- Inoculation bactérienne et conditions de croissance-----	112
III- Analyse des paramètres morfo- biochimiques des plantes-----	113
1-Paramètres morphologiques-----	113
2- Paramètres biochimiques-----	113
2-1- Mesure de la chlorophylle-----	113
2-2- Contenu en Na ⁺ et K ⁺ des feuilles et des racines -----	113
2-2-Dosage de la proline-----	114
2-3- Analyse statistique-----	114
IV- Résultats-----	114
141-Paramètres morphologiques-----	114
2- Chlorophylle-----	120
3- Proline-----	122
4- Contenu en Na ⁺ en K ⁺ dans les racines et les feuilles-----	122
V- Discussion-----	126
Conclusion-----	131
Références bibliographiques-----	134
Annexe	

Introduction

La croissance des plantes est fortement influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. La salinité est l'un des facteurs majeurs limitant la productivité des plantes et par conséquent la production agricole. Dans le monde, 340 millions d'ha de surfaces agricoles sont affectées par la salinité soit 23% des terres cultivées (Cheverry, 1995) dont 3,2 millions d'ha en Algérie (Hamdy, 1999). Cette salinisation est surtout rencontrée dans les zones arides et semi-arides du pays. Elle conduit à l'appauvrissement des sols en matières organiques et à l'accumulation d'ions toxiques. Par conséquent, les terres agricoles productives sont détériorées. D'un autre côté, l'accroissement de la population a augmenté la demande pour les produits agricoles. Ceci n'a pas seulement menacé la suffisance des ressources alimentaires disponibles, mais aussi a nécessité l'exploitation de terres marginales cultivées.

Si les variétés de blé capables de donner des rendements élevés sur les sols modérément affectés par la salinité pourraient être améliorés, les productivités de ces terres seraient multipliées. Dans ce cas, il est urgent de développer des techniques appropriées pour une meilleure capacité de production des céréales dans les endroits inefficacement cultivés ou non cultivés.

Diverses recherches, visant à développer les approches technologiques consistant à modifier le sol salé par des mesures de remise en état ou à l'adoption des approches biotiques par l'utilisation des cultures végétales tolérantes au sel, ne sont pas une démarche facile et économique pour une agriculture durable.

L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Les microorganismes rhizosphériques, en général, exercent sur les plantes divers effets influençant leur développement (Kloepper et Beauchamp, 1992; Glick, 1995). Ils peuvent également améliorer leur compétitivité et leurs réponses aux facteurs de stress externes. Ainsi, l'inoculation des plantes stressées par des souches PGPR atténue le stress salin (Ashraf *et al.*, 2008 ; Saharan et Nehra, 2011). En conséquence, la croissance des micro-organismes halotolérants, associés aux racines des plantes peuvent conduire à une meilleure fertilité des sols salins (Hallman *et al.*, 1997).

Le nombre d'espèces bactériennes identifiées comme PGPR a augmenté récemment en raison de nombreuses études portant sur une plus large gamme d'espèces végétales sur les progrès

réalisés en matière de taxonomie bactérienne ainsi que sur les progrès développés dans la compréhension des différents mécanismes d'action de ces rhizobactéries. À l'heure actuelle, les PGPR incluent des taxons bactériens très divers (Ashraf *et al.*, 2008). Un nombre très important de bactéries incluant des espèces de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus* et *Serratia* ont montré une capacité d'améliorer la croissance de la plante (Kloepper et Beauchamp, 1992; Glick, 1995). *Bacillus* et *Pantoea* sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ces rhizobactéries ont la capacité de produire de nombreux métabolites et sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler au laboratoire (Raaijmakers *et al.*, 2002). De plus, les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes aux changements des conditions environnementales. (Cavaglieri *et al.*, 2005).

Les PGPR utilisées comme biofertilisant et/ou antagoniste contre les phytopathogènes constituent une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides. Toutefois, la capacité de ces bactéries de coloniser les racines et de survivre dans le sol est souvent limitée (Normander et Prosser, 2000). La sélection et l'utilisation des PGPR devrait tenir compte de l'adaptation de l'inoculant à une plante et à un écosystème particulier. L'élaboration de mesures efficaces pour les inoculants microbiens demeure un défi scientifique majeur (Richardson, 2001). En outre, la sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale. (Cattelan *et al.*, 1999). Ces propriétés sont le plus souvent la production d'auxines, la fixation d'azote, l'antagonisme phytopathogène, la cyanogénèse (HCN), la solubilisation du phosphate, la production des sidérophores et l'activité ACC désaminase (Cattelan *et al.*, 1999).

Les objectifs de cette étude ont donc naturellement découlé de ces acquis; évaluer les potentialités ayant trait à la croissance des plantes des rhizobactéries isolées de différents sols semi-arides, arides et/ou salins, caractériser les souches les plus performantes sélectionnées et tenter de les identifier par une approche biochimique et phylogénétique. Il s'agit principalement dans cette thématique d'estimer les effets de l'inoculation par ces souches sous stress salin sur les paramètres morpho-biochimiques et sur l'équilibre ionique chez la variété de blé dur Waha.

Revue bibliographique

De nombreux facteurs entraînent une baisse de la productivité des cultures conduisant à l'insécurité alimentaire en particulier dans les pays en voie de développement. Parmi ces facteurs, la disponibilité des terres agricoles, les ressources en eau douce, une faible activité économique dans le secteur agricole et l'incessante croissance des stress biotiques et abiotiques. Il est généralement admis que les stress abiotiques sont considérés comme la principale cause de la chute du rendement agricole (Boyer, 1982; Rehman *et al.*, 2005; Munns et Tester, 2008; Reynolds et Tuberosa, 2008). Les pertes potentielles de rendement sont estimées à 17% dues à la sécheresse, 20% à la salinité, 40% à la température élevée, 15% à la basse température et 8% à d'autres facteurs (Rehman *et al.*, 2005; Ashraf *et al.*, 2008).

I - Stress abiotiques

La sécheresse et la salinité sont deux stress abiotiques majeurs qui influent sur différents aspects de la vie humaine d'une population dont la santé humaine et la productivité agricole. Selon les rapports de l'ONU, les changements climatiques ont augmenté la fréquence et l'intensité de la pénurie d'eau dans les zones sub-tropicales d'Asie et d'Afrique. Il est attendu, si la situation persiste, que d'ici 2025, 1,8 milliard de personnes vivront dans des régions où la pénurie d'eau est absolue. Comme la pénurie d'eau, la forte concentration de sels solubles est une autre menace pour les vies humaines. Le problème de la salinité existe depuis longtemps. L'augmentation de la sécheresse et la salinité entraîne une baisse de la productivité agricole et cause la dégradation des terres arables. À l'heure actuelle, l'étendue des terres affectées par la salinité à travers le monde ne cesse d'augmenter (Schwabele *et al.*, 2006) et constitue une entrave majeure et grave pour la production agricole (Munns et Tester, 2008) en particulier dans les zones arides et semi-arides. Selon une estimation de la FAO en 2008 plus de 6 % des terres de la planète sont touchés par la salinité. En outre, sur 230 millions d'hectares de terres irriguées, 45 millions d'hectares (environ 20%) en sont affectés. Cependant, l'intensité du stress de la salinité varie d'un endroit à l'autre. En général, la salinité des terres arides a été classée en trois types différents: faible salinité (C_e 2-4 dS / m), salinité modérée (C_e 4-8 dS / m) et salinité élevée ($C_e > 8$ dS/m) (Rogers *et al.*, 2005). Selon le type de source à partir de laquelle le sol est devenu salin, la salinité peut être classée en salinisation primaire et secondaire :

- La salinisation primaire ou naturelle est due à l'altération des minéraux et des sols issus de roches mères salines
- La salinisation secondaire est causée par l'interférence humaine : l'irrigation , la déforestation , le surpâturage ou la culture intensive (Ashraf, 1994).

II- Effet néfaste de la salinité sur les cultures agricoles

Le chlorure de sodium (NaCl) est le sel le plus soluble et le plus abondamment libéré lors de la salinité naturelle, une proportion importante des terres agricoles récemment cultivées est devenue saline à cause des activités humaines (Abolfazl *et al.*, 2009). L'utilisation répétée d'intrants externes détruit le biote et réduit la valeur nutritive du sol, ce qui entraîne la salinisation. La salinité du sol inhibe la croissance et le développement des plantes et aboutit finalement à entraver l'économie agricole des pays en voie de développement. Les effets néfastes les plus communs de la salinité sont le stress osmotique, la toxicité par Na et Cl, la production d'éthylène et la plasmolyse provoquant chez les glycophytes une perte de la turgescence, une réduction de la croissance donnant des feuilles petites, une taille courte, une sénescence précoce, une diminution de la capacité photosynthétique suite à la fermeture partielle des stomates (Drew *et al.*, 1992), des changements respiratoires, une perte de l'intégrité cellulaire, une nécrose des tissus et même la mort de la plante (Cheeseman, 1988). Les plantes souffrant de stress salin présentent des altérations de leur homéostasie, principalement en raison de la réduction du potentiel osmotique et ionique et une distribution inadéquate provoquant un déséquilibre nutritionnel. De plus, différents dommages oxydatifs et ioniques chez les plantes sont le résultat de la salinisation. L'absorption de la lumière du soleil conduit à la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) principalement dans le chloroplaste soit par photoréduction de l'O₂ pour former la dismutase ou par l'interaction du triplet excité de la chlorophylle pour former de l'oxygène singulet excité (Asada, 2000). Les ROS sont très réactifs et peuvent causer des dommages considérables aux membranes, aux protéines, et à l'ADN. Le rôle du stress salin dans l'induction de dommages oxydatifs a été largement étudié (Stepien et Klobus, 2005). Les symptômes de la carence en calcium sont communs lorsque le rapport Na/Cl est élevé dans la solution du sol. La concentration en sel dans les feuilles âgées entraîne la sénescence précoce des feuilles et un retard de croissance en augmentant la production de l'acide abscissique (ABA) et de l'éthylène (Kefu *et al.*, 1991; Munns, 2002). Le taux optimum ou seuil de tolérance de la salinité de la plupart des cultures agricoles a été jugée à 40 mM (pour les glycophytes), mais cette tolérance pourrait être augmentée par l'emploi de méthodes biologiques.

III- Différentes stratégies d'amélioration des cultures contre le stress salin

De nombreuses stratégies peuvent être adoptées pour faire face à la salinité. Les deux importantes développées sont les approches technologique et biotique (Epstein *et al.*, 1980; Ashraf, 1994) :

L'approche technologique consiste à modifier le sol salé par des mesures de remise en état et par des pratiques permettant aux plantes de se développer et de produire un rendement raisonnable. Cependant, ces méthodes sont coûteuses et ne sont pas toujours une solution convenable au problème de la salinité des sols.

L'adoption d'une approche biotique a été proposée pour contrer le problème (Epstein *et al.*, 1980). Cela a été possible pour deux raisons principales: (i) l'absorption et l'assimilation des nutriments minéraux, y compris Na^+ et Cl^- sont génétiquement contrôlées et peuvent être manipulées (Ashraf, 1994 ; Tester et Davenport, 2003; Flowers, 2004; Munns, 2005; Munns *et al.*, 2006), (ii) certaines plantes ont la capacité de se développer dans des conditions salines élevées (Greenway et Munns, 1980; Ashraf *et al.*, 2004; Flowers, 2004). L'approche biotique est prometteuse et considérable pour atténuer le problème de la salinité du sol. Par conséquent, il est très important de développer une méthode fiable, rapide, simple, pratique et économique d'évaluation pour le dépistage des génotypes tolérants au sel.

Bien que des travaux considérables ont été accomplis pour la réalisation de cet objectif par le biais d'élevage conventionnel, ces progrès ne sont pas satisfaisants en vue de la demande actuelle croissante de la productivité des cultures dans un environnement salin (Flowers, 2004). Le développement de plantes tolérantes au stress salin est très important pour répondre à la demande alimentaire croissante. Diverses recherches visant à développer des cultures tolérantes au sel ne sont pas une démarche facile et économique pour une agriculture durable, alors que l'inoculation microbienne pour diminuer le stress salin est une meilleure option (Hartmond *et al.*, 1987).

L'utilisation des microorganismes comme inocula dans l'agriculture est l'approche la plus prometteuse afin d'améliorer la production et le rendement dans les régions touchées par la salinité. La grande opportunité pour la recherche sur la tolérance à la salinité est la capacité d'utiliser les bactéries comme inoculant et d'attirer l'attention sur les stratégies futures de la recherche pour le développement d'une meilleure croissance des plantes en utilisant différentes bioformulations. Outre la bioformulation, la remise en état et l'amélioration de la fertilité des sites stressés est une autre visée à considérer. L'approche prometteuse pour s'attaquer au problème de la salinité des sols en utilisant les

microorganismes bénéfiques fera la plus grande contribution à l'économie agricole, si peu coûteuse et facile à utiliser.

IV- Diversité microbienne du sol

Le sol supporte une large proportion de la biodiversité terrestre. Il héberge en effet une grande diversité d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) dont la plupart sont responsables de processus de biotransformation et de transfert des éléments ou des composés. Cette diversité biologique est associée à une importante diversité fonctionnelle et à une grande complexité des interactions écologiques. Ainsi de nombreux processus se déroulant dans le sol sont assurés par des organismes très variés (bactéries, champignons, protozoaires, racines, faune). Les organismes du sol affectent aussi la productivité végétale, que ce soit de manière directe ou indirecte (modifications des cycles du carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites et pathogènes). La distribution dans le temps et dans l'espace des processus biologiques n'est ni aléatoire, ni homogène. Les activités des organismes du sol sont concentrées dans des sites généralement associés à la disponibilité en substrats carbonés. C'est ainsi que les habitats microbiens sont associés aux fractions organiques, aux agrégats, à la litière en décomposition, au sol influencé par les vers de terre et au contact étroit des racines (rhizosphère) (Lynch, 1990).

IV-1 La rhizosphère

La rhizosphère est le volume de sol influencé par les racines. On distingue en général le **rhizoplan** qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence. Elle est le lieu des échanges entre sol, racines, microorganismes et faune associés. Ces échanges, intenses, se traduisent par des flux bidirectionnels d'eau et de nutriments (Lynch, 1990). La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance. Dans la rhizosphère jusqu'à 30 % des composés photosynthétisés par la plante sont remis à la disposition des microorganismes qui y vivent par le biais d'un phénomène appelé exsudation racinaire. Ces exsudats racinaires incluent une grande quantité d'acides organiques et de sucres ainsi que des composés organiques complexes. Ils sont transformés en biomasse microbienne ou réoxydés en CO₂. La richesse de la rhizosphère en sucres, en amino-acides, en acides organiques, en isoflavonoides, en régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante, rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries (Paul et Clark, 1996).

La rhizosphère est un environnement écologique remarquable colonisé par de nombreux micro-organismes. Les communautés distinctes des micro-organismes sont associées aux systèmes racinaires de toutes les plantes supérieures (Khalid *et al.*, 2006). Ces êtres vivants sont requis dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère (Germida *et al.*, 1998). Par ailleurs, la communauté microbienne joue un rôle notable dans l'amélioration et la stabilisation de la structure du sol. Plusieurs études ont montré que l'agrégation et la stabilité d'un sol dépendent de sa nature et de sa teneur en matière organique (Elustondo *et al.*, 1990). La matière organique produite par les racines a un effet direct sur la stabilisation des agrégats du sol et indirect sur la stimulation des activités microbiennes de la rhizosphère (Angers et Mehuys, 1989). Les communautés microbiennes jouent aussi un rôle significatif dans l'état de santé des plantes, certaines sont nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certaines ne semblent avoir aucun effet. De nombreuses interactions, bénéfiques (symbioses) ou non, voire délétères (pathogénie) sont observées entre plantes, bactéries et champignons du sol. Parmi les interactions bénéfiques aux plantes, on peut citer les symbioses fixatrices d'azote, les associations avec les bactéries promotrices de croissance ou de santé (phénomène de suppression de maladie), ou les interactions avec les champignons mycorhizogènes. Les effets délétères sont souvent liés à l'action de bactéries ou champignons pathogènes. Ils peuvent aussi être liés à des phénomènes de parasitisme végétal qui conduisent à l'impossibilité pour certains végétaux d'occuper le même espace de sol (effet d'inhibition de croissance de l'un des deux sur l'autre). Les protozoaires et nématodes qui se nourrissent sur des bactéries sont aussi concentrés autour des racines. Ainsi, la plupart des cycles des nutriments et des phénomènes de prédation se déroule dans la zone immédiatement adjacente aux racines, siège d'une activité métabolique intense (Dommergues, 1978). Cet environnement particulier incluant autant des micro-organismes bénéfiques que pathogènes exerce une influence importante sur la croissance et le rendement des cultures végétales (Hinsinger, 1998). La diversité et la prédominance de la population microbienne de la rhizosphère dépendent d'un certain nombre de facteurs abiotiques et biotiques prévalant dans une niche écologique particulière. D'une façon générale, la structure des racines et la composition des exsudats racinaires changent durant le développement de la plante et sous l'effet des conditions environnementales telles que la disponibilité de l'eau et la température. Par conséquent, la dynamique de la population microbienne rhizosphérique peut aussi changer. En effet, les plantes, grâce à l'émission des signaux spécifiques, exercent une pression sélective qui tend généralement à réduire la diversité microbienne et à favoriser des espèces ou des souches particulières (Bertrand *et al.*, 2000). En outre, la compétition entre les

microorganismes pour les nutriments, la colonisation des sites, la production des antibiotiques et des bactériocines contribuent à cette dynamique microbienne dans la rhizosphère.

IV-2 Les rhizobactéries

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol. On compte les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues (Paul et Clark, 1996). Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne $6 \cdot 10^8$ cellules par gramme de sol et un poids de 10000 kg/ha équivalant à 5% du poids sec des composés organiques du sol. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). Si la plante libère des composés organiques, à l'inverse elle prélève de l'eau et des éléments minéraux indispensables à son métabolisme. Les échanges entre la plante et le sol sont influencés par les rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont élevées. Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère. Les rhizobactéries utilisent en effet de nombreux substrats provenant de la plante: les cellules corticales et épidermales des racines qui se détachent, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, etc. (Campbell et Greaves, 1990). L'abondance des bactéries dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et d'éléments nutritifs (Glick, 1995).

Les microorganismes rhizosphériques incluent les symbiotes (*Rhizobia*, actinobactéries et champignons mycorhiziens) et les saprophytes libres. Les microorganismes rhizosphériques en général, et les bactéries diazotrophiques en particulier, exercent sur les plantes divers effets. Par ailleurs, l'association des bactéries avec les racines a des influences importantes sur la santé de la plante, la productivité et la qualité du sol (Konate, 2007). La colonisation des racines par les bactéries est observée depuis longtemps, mais seulement dernièrement, son importance pour la croissance et le développement des plantes est devenu clair (Glick, 1995). La quantité et la composition des exsudats racinaires conditionnent également la nature des activités bactériennes. Ces activités résultent de la synthèse de métabolites tels que les antibiotiques, sidérophores, substances de croissance, acide cyanhydrique, lipopolysaccharides (Voisard *et al.*, 1989; Van Peer *et al.*, 1991). Cette influence se manifeste par une modification de la croissance de la plante et de la fréquence des infections fongiques de la racine (Kloepper, 1993).

Ces rhizobactéries sont considérées comme des concurrents microbiens efficaces dans la zone racinaire. L'effet visible des associations plante-microbe sur la croissance de plantes peut être positif, neutre, ou négatif. Certaines bactéries inhibent la croissance alors que d'autres la stimulent. Ces dernières sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR) (Kloepper *et al.*, 1989; Zahir *et al.*, 2004). Au cours des dernières décennies, un nombre très important de bactéries ont montré une capacité d'améliorer la croissance de la plante (Kloepper, 1992 ; Glick, 1995).

IV-3 Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les rhizobactéries connues sous le terme PGPR stimulent directement la croissance de plantes en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Elles stimulent indirectement la croissance des végétaux par leur effet antagoniste sur la microflore néfaste, en transformant les métabolites toxiques et en stimulant la nodulation des légumineuses par les *Rhizobia*. L'établissement de l'association PGPR-plante est primordiale pour l'expression des effets bénéfiques. Les rhizobactéries sont les bactéries ayant la capacité de coloniser les racines de façon intense. Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp. fluorescents (Hallmann *et al.*, 1997).

Plusieurs études sur la relation PGPR/amélioration de l'absorption des nutriments ont conclu que l'application des inoculations bactériennes améliorent considérablement l'absorption du N, P, et K. En outre, le processus d'inoculation avec *Azospirillum* et *Bacillus* spp. a montré une nette accumulation de ces minéraux dans les tissus de la plante (Amir *et al.*, 2005). Selon Dursun *et al.* (2008) *Burkholderia gladii*, *P. putida*, *B. subtilis*, *B. megaterium* ont donné des teneurs élevées en minéraux en particulier N, K, P, Zn, Fe, Mn, Na, Ca, et Mg dans les feuilles de la roquette (*Eruca sativa*) par rapport au témoin.

V- Diversité taxonomique des PGPR

Au cours des dernières années, le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative, principalement puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des

PGPR ont été suffisamment étudiés. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants: Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002). Actuellement, de nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers (Kloepper, 1992) :

V-1 Alphaproteobacteria

Les PGPR appartenant à cette classe sont les *Rhizobia* d'abord classés par leur capacité à fixer l'azote et à noduler les plantes. Ces souches peuvent se comporter comme PGPR quand elles colonisent les racines des plantes non légumineuses dans une relation non spécifique. En effet, le genre *Rhizobium* contient également des souches PGPR qui plus tard ont été considérées comme de nouveaux genres : *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* (Sawada *et al.*, 2003). Le genre *Gluconacetobacter* de la famille des Acetobacteraceae composé de bactéries endophytes obligatoires colonise les racines, la tige et les feuilles de la canne à sucre (Tejera *et al.*, 2003). Les espèces du genre *Azospirillum* décrites dans la famille de Rhodospirillaceae sont considérées comme promoteurs de la croissance des plantes. Les souches appartenant à ce genre se produisent sous forme de cellules libres dans le sol ou associées aux racines, tiges, feuilles et graines principalement des céréales et des graminées fourragères (Baldani *et al.*, 2005) .

V-2 Betaproteobacteria

Dans la famille Burkholderiaceae, le genre *Burkholderia* forme un groupe monophylétique qui contient diverses espèces ayant des propriétés physiologiques et écologiques variées, elles sont isolées à partir des sols et des plantes. Quelques souches ont la capacité de fixer de façon symbiotique l'azote. *Ralstonia* est un genre également attribué à la famille des Burkholderiaceae. Il est, comme le genre *Burkholderia*, omniprésent (Moulin *et al.*, 2001).

V-3 Actinobacteria

Le genre *Frankia* est fixateur symbiotique d'azote. Cette capacité est une caractéristique du genre. Ces bactéries sont associées à des plantes actinorhiziennes pionnier de la colonisation des sols pauvres ou perturbés. D'autres Actinobacteria sont également des promoteurs de croissance des plantes mais ne participent pas à la symbiose. Ils appartiennent aux genres

Arthrobacter, *Micrococcus* (Gray et Smith, 2005), *Curtobacterium* (Barriuso *et al.*, 2005) et *Streptomyces* (Siddiqui et Mahmood, 1999).

V-4 Gammaproteobacteria

Dans la famille des Pseudomonadaceae, le genre *Azotobacter* est composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes principalement à cause de sa capacité de fixer l'azote et ne pas noduler les plantes (Sturz et Christie, 2003). De plus, *Pseudomonas* est le genre le plus abondant dans la rhizosphère parmi les bactéries à Gram-négatif du sol, et l'activité PGPR de certaines de ces souches est connue depuis de nombreuses années, résultant d'une large connaissance des mécanismes impliqués. Par contre, les genres inclus dans la famille des Enterobacteriaceae assurant la fonction de PGPR sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* et *Serratia* (Garrity, 2005).

V-4-1 *Pantoea agglomerans*

- Définition et caractères généraux

Pantoea gen. nov découvert par Gavini *et al.* en 1989. *Pantoea* (pan. toe'a. Gr. adj. *Pantoiōs*) signifie de diverses sources. *Pantoea agglomerans* anciennement appelé *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1888), *Erwinia herbicola* (Löhnis, 1911) ou *Erwinia milletiae* (Kawakami et Yoshida, 1920) est une bactérie à Gram négatif (Tab. 1). Elle se présente sous forme de bacilles droits mesurant 0,5 à 1,0µm de large et de 1,0 à 3,0µm de long. La plupart des souches sont mobiles à flagelles péritriches. La température optimale de croissance est de 30°C. Les colonies sur gélose nutritive sont lisses, translucides, plus ou moins convexes avec bord entier et peuvent être pigmentées en jaune. Elle est anaérobie facultative, à oxydase négative. Le D-glucose et d'autres hydrates de carbone sont catabolisés avec production d'acides, mais pas de gaz. La teneur en GC est de 55 à 60 %. Costa *et al.* (2002) ont étudié les besoins biologiques de la souche *P. agglomerans* et ont pu définir sa capacité de croissance en fonction de la disponibilité de l'eau (de 0,95 à 0,96), de la température (1 à 42 °C) et du pH (5 à 8,6).

- Habitat et écologie

Pantoea agglomerans se trouve communément dans diverses niches écologiques. Elle est ubiquiste dans la nature et est présente naturellement sur les arbres fruitiers. Cette bactérie est considérée comme épiphyte des végétaux. Elle est retrouvée dans plusieurs parties de la plante hôte, notamment dans la phyllosphère de *Rosa rugosa* (Hashidoki *et al.*, 2002), des

feuilles de légumes (Brocklehurst *et al.*, 1987) et d'herbes (Golec *et al.*, 2004), sur la tige des patates douces (Asis et Adachi, 2003), sur les graines de sarrasin commun et dans la rhizosphère du colza oléagineux (Berg *et al.*, 2002). Elle est aussi endophyte des racines et des tiges de riz et possède un potentiel pour le contrôle des maladies des plants de riz et pour la promotion de la croissance de la plante (Adhikari *et al.*, 2001). *P. agglomerans* est également une importante bactérie de nucléation de la glace. Une protéine cryoprotectrice a été purifiée et identifiée par Koda *et al.* (2001) à partir de *P. agglomerans* IFO12686. D'un autre côté, *P. agglomerans*, isolée de la rhizosphère du blé (*Triticum durum*), joue un rôle important dans la régulation de la teneur en eau (excédent ou déficit) en améliorant l'agrégation du sol (Amellal *et al.*, 1998). Selon Nunes *et al.* (2002) *P. agglomerans* CPA-2 exerce une excellente protection contre les maladies causées par *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer* infectant les poires et les pommes. Les souches de *P. agglomerans* sont efficaces contre les bactérioses comme la brûlure du noyau basal de l'orge (Braun-Kiewnieck *et al.*, 2000) et des maladies fongiques après la récolte des fruits à pépins (Nunes *et al.*, 2002). Le mode d'action principal semble être l'exclusion compétitive. Une fois appliquée sur les arbres, *P. agglomerans* est capable de se reproduire sur les fleurs pendant plusieurs jours, colonisant ainsi l'arbre et occupant les sites qui seraient autrement colonisés par le pathogène responsable du feu bactérien (*Erwinia amylovora*). Cette souche produit également deux antibiotiques, l'herbicoline O et I qui pourraient contribuer à l'effet protecteur. Par ailleurs, chez certaines souches les rapports indiquent également la contribution de différents antibiotiques comme les pantocines (Ishimaru *et al.*, 1988) la phénazine et d'autres composés inconnus (Pusey *et al.*, 2008).

Plusieurs souches de *P. agglomerans* sont disponibles dans le commerce comme agents de lutte biologique contre le feu bactérien du pommier et du poirier dû à *Erwinia amylovora* (Pusey *et al.*, 2008).

Tab. 1 : Classification de *Pantoea agglomerans*.

<u>Classification</u>	
Domaine:	<u>Bacteria</u>
Phylum:	<u>Proteobacteria</u>
Classe:	<u>Gammaproteobacteria</u>
Ordre:	<u>Enterobacteriales</u>
Famille:	<u>Enterobacteriaceae</u>
Genre:	<i>Pantoea</i> Gavini <i>et al.</i> , 1989
Espèce-type : <i>Pantoea agglomerans</i>	
<u>Espèces</u>	
<u><i>P. agglomerans</i></u>	
<u><i>P. ananatis</i></u>	
<u><i>P. citrea</i></u>	
<u><i>P. dispersa</i></u>	
<u><i>P. punctata</i></u>	
<u><i>P. stewartii</i></u>	
<u><i>P. terrea</i></u>	

V-5 Firmicutes

Parmi les bactéries telluriques à Gram positif, les *Bacillus* sont les types les plus communs et les plus prédominants, ils représentent 95% de la flore isolée.

V-5-1 *Bacillus*

- **Taxonomie** : ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores. Depuis la découverte de la bactérie (1913), la possession d'une spore a été utilisée comme une clé dans la classification. Les caractéristiques distinctives entre les membres du genre *Bacillus* et les autres bacilles sporulant sont la nature aérobie stricte ou facultative, la forme bacillaire et la production de catalase. Le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables.

Les premières tentatives de classification des espèces de *Bacillus* sont fondées sur deux caractéristiques: la croissance aérobie et la formation d'endospores. De deux espèces formant des endospores, *Bacillus anthracis* et *B. subtilis*, le genre a atteint 146 espèces dans la

cinquième édition du Bergey's Manuel (Bergey *et al.*, 1939). Ce nombre est, cependant, limité à 22 espèces bien définies dans la huitième édition du Bergey's (Buchanan et Gibbons, 1974). Par la suite, le nombre de nouvelles espèces a augmenté régulièrement grâce à l'application de méthodes variées et efficaces pour l'enrichissement et l'isolement tenant compte de la diversité physiologique et des besoins nutritionnels et culturels de ces organismes et au développement de nouvelles méthodes plus sophistiquées pour la caractérisation et l'identification des souches bactériennes, en particulier sur le plan génétique telle que l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S.

Dans le Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (1ère éd., 1986), la teneur en G + C des espèces connues de *Bacillus* varie de 32 à 69%. Cette variabilité, ainsi que des tests d'hybridation d'ADN, ont révélé l'hétérogénéité génétique au niveau des genre et même d'une espèce à l'autre. Il y avait parfois de profondes différences du contenu G + C à l'intérieur des souches d'une même espèce. Ainsi, l'analyse des séquences des ARNr 16S de 51 espèces permettait à Ash *et al.* (1991) de caractériser cinq groupes phylogénétiques. La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant 3 espèces acidophiles et thermophiles. Ultérieurement, ont été proposés et validement publiés plusieurs genres qui rassemblent au moins une espèce initialement incluse dans le genre *Bacillus*. Dans la deuxième édition du Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (2ed, 2004), 37 nouveaux genres avec *Bacillus* sont inclus dans l'ordre des Bacillales et la famille des Bacillaceae (Tab. 2).

L'approche phylogénétique de la taxonomie du *Bacillus* réalisée par l'analyse du séquençage des oligonucléotides des molécules d'ARNr 16S a révélé que les relations phylogénétiques des espèces de *Bacillus* ont une certaine parenté avec des espèces non sporulées, telles que *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. De plus, certains anciens membres du genre sont réunis en nouvelles familles, les Acyclobacillaceae, Paenibacillaceae et Planococcaceae (Tab. 3). Dans l'actuelle édition du Bergey's Manuel (2^e ed, 2004) plus de 200 espèces de AEFB allouées à environ 25 genres sont validement publiés.

Tab. 2 : Evolution du genre *Bacillus* (1986-2004) (Govindasamy *et al.*, 2010).

Bergey's manual of systematic bacteriology (1st ed., 1986)	Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed., 2004)
<i>Bacillus acidocalderius</i>	<i>Acyclobacillus acidocalderius</i>
<i>Bacillus agri</i>	<i>Brevibacillus agri</i>
<i>Bacillus alginolyticus</i>	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>
<i>Bacillus amylolyticus</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
<i>Bacillus alvei</i>	<i>Paenibacillus alvei</i>
<i>Bacillus azotofixans</i>	<i>Paenibacillus azotofixans</i>
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Sporosarcina globisporus</i>
<i>Bacillus larvae</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>
<i>Bacillus laterosporus</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
<i>Bacillus lentimorbus</i>	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>
<i>Bacillus macerans</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Bacillus popilliae</i>	<i>Paenibacillus popilliae</i>
<i>Bacillus psychrophilus</i>	<i>Sporosarcina psychrophilia</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus thermodenitrificans</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>

La taxonomie du genre *Bacillus* est constituée de deux groupes d'organismes usuellement appelé le groupe *B. subtilis* et le groupe *B. cereus* :

- Les espèces de groupe *B. subtilis* sont étroitement liées et donc pas facilement discernables et inclus les deux sous-espèces de *B. subtilis* (*B. subtilis* subsp. *subtilis* et de *B. subtilis* subsp. *spizizenii*), *pumilus*, *licheniformis*, *amyloliquefaciens*, *mojavensis*, *sorensis* et *vallismortis* (Claus et Berkeley, 1986).
- Les espèces du groupe *B. cereus* comprennent des espèces étroitement apparentées telles que *B. cereus*, *thuringiensis*, *mycoides*, et *pseudomycoides*. L'espèce *B. weihenstephanensis* semble composée de souches de *B. mycoides* et *cereus* (Jackson *et al.*, 1999).

Le genre *Paenibacillus* est créé par Ash *et al.* (1993) pour former l'ancien «Groupe 3» du genre *Bacillus*. Il comprend plus de 30 espèces anaérobies facultatives et formant des endospores, neutrophiles, hétérotrophes, à flagelles péritriches, bacilles à Gram positif à faible % GC. Des analyses comparatives des séquences d'ARNr 16S ont révélé que l'ARNr du «Groupe 3» représente un groupe phylogénétiquement distinct. Le taxon contient diverses espèces telles que *B. alvei*, *amyolyticus*, *azotofixans*, *gordonae*, *larvei*, *macerans*, *macquariensis*, *pabuli*, *polymyxa*, *pulvifaciens*, et *validus* (Ash *et al.*, 1993). Phénotypiquement, les espèces de ce groupe réagissent faiblement avec la coloration de Gram et apparaissent à Gram négatif même pour les cultures jeunes. Elles se différencient en spores ellipsoïdales qui gonflent nettement la cellule mère.

Le genre *Bacillus* dont *B. subtilis* est l'espèce-type est un organisme et un modèle établi pour les recherches sur les bactéries à Gram-positif. Récemment, son génome fut complètement séquencé et il représente le premier génome publié d'une bactérie vivant dans le sol (Kunst *et al.*, 1997).

Tab. 3 : Position taxonomique des bactéries Gram-positives, aérobies et formant des endospores (AEFB) selon le séquençage du gène de l'ARNr 16S et le nombre d'espèces alloué à chaque genre (Taxonomic Outline of Bergey's Manual, 2004).

Position systématique	Genres (nbre)	Espèces /subsp. (nbre)
Domaine: Bacteria		
Phylum BXII: Firmicutes phy nov		
Classe III: Bacilli		
Ordre I: Bacillales		
Famille I: Bacillaceae	17	
genre: <i>Bacillus</i>		88/2
Famille II: Alicyclobacillaceae	3	
genre: <i>Alicyclobacillus</i>		8/2
Famille III: Caryophanaceae	1	
genre: <i>Caryophanaon</i>		1
Famille IV: Listeraceae	2	
genre: <i>Listera</i>		1
Famille V: Paenibacillaceae	7	
genre: <i>Paenibacillus</i>		45/2
Famille VI: Planococcaceae	5	
genre: <i>Planococcus</i>		1
Famille VII: Sporolactobacillaceae	2	
genre: <i>Sporolactobacillus</i>		3
Famille VIII: Staphylococcaceae	5	
genre: <i>Staphylococcus</i>		2
Famille X: Thermoactinomycetaceae	1	
genre: <i>Thermoactinomyces</i>		6
Famille X: Turicibacteraceae	1	
genre: <i>Turicibacter</i>		1

- Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (Holt *et al.*, 1994)

- Caractères physiologiques

Les caractères physiologiques des *Bacillus* sont impressionnants. Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires, produisent aussi des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. A cause de cette variabilité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes (Holt *et al.*, 1994).

- Ecologie des *Bacillus*

Dans le sol, les *Bacillus* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Pseudomonas* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, ils présentent une diversité de capacités physiologiques qui leur permet de vivre dans une large variété d'habitats tels que l'eau de mer, les profondeurs de la mer, les sédiments (Andrea *et al.*, 2008), les marais, les sources d'eau, les aliments, les fourrages, les composts, les volailles, ainsi que de nombreux habitats extrêmes tels que les sables du désert, les sources chaudes et les sols de l'Arctique, bien que quelques espèces soient pathogènes pour des mammifères (*B. anthracis*) et des insectes (*B. sphaericus* et *thuringiensis*).

L'habitat primaire du genre *Bacillus* est le sol et la rhizosphère particulièrement les systèmes racinaires des plantes. Ils font partie de la flore zymogène du sol et sont retrouvés dans les

épiphytes ou les endophytes des plantes, et la rhizosphère de diverses plantes cultivées comprenant le blé, le maïs, le sorgho, la canne à sucre, l'orge, et des arbres forestiers tels que le pin et le sapin. (Holl et Chanway, 1992). De multiples espèces de *Bacillus* et de *Paenibacillus* peuvent être aisément cultivées et en grande partie des sols et de la rhizosphère. Le taux cultivable de ces bactéries s'étend généralement de log3 à log6 cellules par gramme de sol rhizosphérique, tandis que le sol compte un taux excédant ceux obtenus à partir de la rhizosphère (Mahaffee et Kloepper, 1997 ; Seldin *et al.*, 1998). Une variété d'espèces peuvent être isolées du sol et de la rhizosphère (Seldin *et al.*, 1998), mais peu de travaux ont été effectués pour indiquer l'espèce la plus isolée. La plupart des espèces sont globalement distribuées et répandues surtout les espèces *B. subtilis* et *B. cereus* reconnues pour leur lutte contre les pathogènes des plantes (Stabb *et al.*, 1994). En effet, *B. subtilis* est isolé à partir de la rhizosphère de nombreuses espèces végétales à une concentration aussi élevée que 10^7 par gramme de sol (Wipat et Harwood, 1999).

Récemment, les séquences ribosomales amplifiées des échantillons environnementaux sont utilisées pour la caractérisation et la distribution relative des espèces de *Bacillus* et de *Paenibacillus spp.* entre les sols et les tissus végétaux. De façon générale, la composition des communautés bactériennes est variable selon le type de sol (Garbeva *et al.*, 2003). Cependant, l'importance d'une telle variation peut être relativement minime pour les espèces de ces deux genres. Les techniques moléculaires utilisées pour étudier la diversité ont montré que la majorité des bactéries Gram-positives de différents types de sol, sont des *Bacillus*. De ce fait ils sont capables de survivre pendant de longues périodes sous des conditions environnementales défavorables (Garbeva *et al.*, 2003).

VI- Mécanismes d'action des PGPR

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les PGPR dont les modes d'action sont directs ou indirects, bien que la différence entre les deux n'est pas toujours évidente. Les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement leur métabolisme. Ces mécanismes (Fig. 1) pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes sont :

- 1- La solubilisation des phosphates, la fixation de l'azote et les minéraux nutritifs, rendant ces aliments disponibles pour la plante.

- 2- La production de phytohormones telles que l'acide d'indole-3-acetic (IAA)
- 3- La répression des microorganismes pathogènes du sol (par la production du cyanure d'hydrogène, de sidérophores, d'antibiotiques, et/ou de la concurrence pour les nutriments) (Gupta *et al.*, 2000). De plus, les PGPR peuvent contribuer dans l'amélioration de la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques (la salinité, la sécheresse et à la toxicité des métaux lourds)

Sur la base de leur activités Somers *et al.* (2004) ont classé les PGPR comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), rhizoremédiateurs (dégradants les polluants organiques) et biopesticides (lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques).

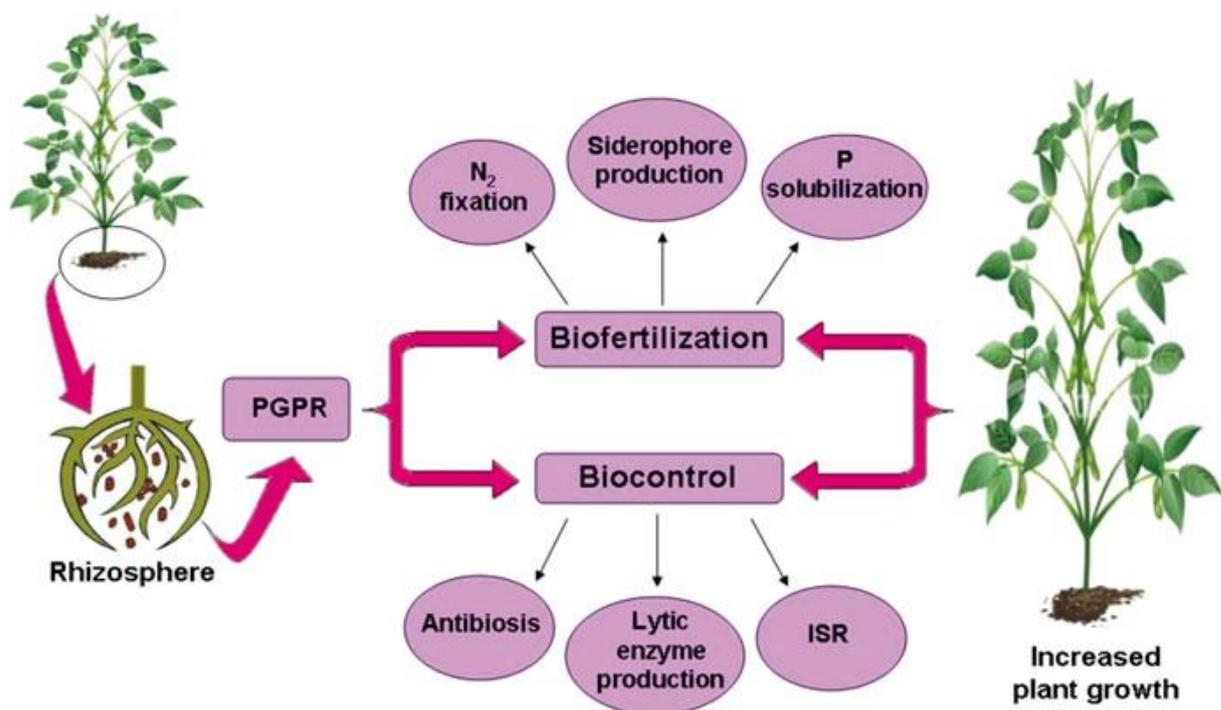


Fig. 1 : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Khan *et al.*, 2009).

VI-1 Biofertilisation

VI-1- 1 Fixation d'azote

La fixation biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne. L'azote est un aliment essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes.

L'utilisation de bio-engrais tels que les bactéries fixatrices d'azote peut accroître la productivité et constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production. Ainsi, Figueiredo *et al.* (2008) ont rapporté que, au cours des deux dernières décennies, l'utilisation de PGPR pour le développement durable de l'environnement et de l'agriculture a considérablement augmenté dans plusieurs régions du monde. Les micro-organismes prennent de l'importance dans l'agriculture en favorisant la circulation des éléments nutritifs (Sahin *et al.*, 2004; Orhan *et al.*, 2006). L'un des avantages des bactéries diazotrophes est de fournir aux plantes l'azote en échange du carbone libéré comme exsudats racinaires. Toutefois, la disponibilité du carbone comme source d'énergie est requise pour la fixation intensive de l'azote. Ceci impose à ces diazotrophes de vivre près des plantes soit dans la rhizosphère, le rhizoplan ou comme endophytes.

Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (Graham, 1988). La fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique (Saxena et Tilak, 1998). Les bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère sont de plus en plus utilisées dans les cultures des non légumineuses comme la betterave sucrière, la canne à sucre, le riz, le maïs, et le blé (Dobereiner, 1997; Hecht-Buchholz, 1998; Sahin *et al.*, 2004). Parmi les bactéries fixatrices d'azote non-symbiotiques les plus importantes appartiennent à plusieurs espèces : *Azoarcus* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*. *Azospirillum* est le représentant des PGPR, ses capacités ont été évaluées dans des expériences à travers le monde (Burdman *et al.*, 2000; Dobbelaere *et al.*, 2003; Vessey 2003; Lucy *et al.*, 2004; Ramirez et Mellado 2005). De plus, des espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus* (Glick *et al.*, 1994a; Alam *et al.*, 2001; Cakmakci *et al.*, 2001; Kokalis-Burelle *et al.*, 2002), et d'autres bactéries endophytiques telles que *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia* et *Stenotrophomonas*, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs ces dernières années en raison de leur association avec des cultures importantes et leur potentiel à améliorer la croissance des plantes (Chélius et Triplett, 2000; Verma *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2003; Ramirez et Mellado, 2005). En outre, l'inoculation réduit de façon significative le besoin de beaucoup d'espèces végétales en fertilisant azoté, dans de nombreuses expériences menées dans les serres et sur terrain (Bashan et Levanony, 1990; Bashan et Holguin, 1997; Bashan *et al.*, 2004).

VI-1-2 Solubilisation du Phosphate

L'amélioration de la fertilité du sol est l'une des stratégies les plus communes pour augmenter la production agricole. En plus de la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates est également importante. Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologiquement disponible (Ezawa *et al.*, 2002). Même dans les sols riches la plupart du phosphore n'est pas disponible pour les plantes, une grande quantité se trouve sous forme insoluble. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). Les micro-organismes permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités (Kucey *et al.*, 1989; Pradhan et Sukla, 2005). La capacité de quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture (Sharma *et al.*, 2007)(Fig. 2).

Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. Les acides gluconique et 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. Les acides glycolique, oxalique, malonique et succinique, ont également été identifiés. Certaines souches sont capables de produire en plus des mélanges d'acides lactique, isovalérique, isobutyrique et acétique. La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduisent à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique. La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases (Kumar et Narula 1999; Whitelaw, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas spp.* (Subbarao, 1988 ; Kucey *et al.*, 1989). *B. megaterium*, *polymyxa*, *circulans*, *coagulans*, *subtilis*, *sircalmous* sont les plus performantes (Podile et Kishore, 2006) dans la solubilisation des phosphates. Celle-ci permet à *B. megaterium*, par exemple, d'améliorer le nombre et le poids sec de nodules, le rendement des composants, la disponibilité et l'absorption des nutriments des cultures du soja (Son *et al.*, 2006 ; Sharma *et al.*, 2007) . Ainsi, la co-inoculation de *Bacillus spp* avec d'autres souches PGPR réduit la

demande de phosphore par 50 % sans affecter le rendement du maïs (Yazdani *et al.*, 2009). L'inoculation par *B. megaterium* solubilisant les phosphates améliore les rendements de la canne à sucre de 12,6 % (Sundara *et al.*, 2002). Les PSB sont communes dans la rhizosphère des plantes cultivées, et quelques exemples d'association bénéfiques comprennent *B. megaterium* et les pois chiches (Elkoca *et al.*, 2008), *B. licheniformis*, *B. megaterium* et le blé et les épinards (Cakmakci *et al.*, 2007), *Pantoea agglomerans* et la tomate (Kim *et al.*, 1998), *Pseudomonas chlororaphis*, *P. putida* et le soja (Cattelan *et al.*, 1999), *Avena sativa* et les souches PGPR isolées de la rhizosphère de fourrage (Wenxing *et al.*, 2008), *Serratia marcescens*, *Pseudomonas sp.*, et le maïs (Hameeda *et al.*, 2008).

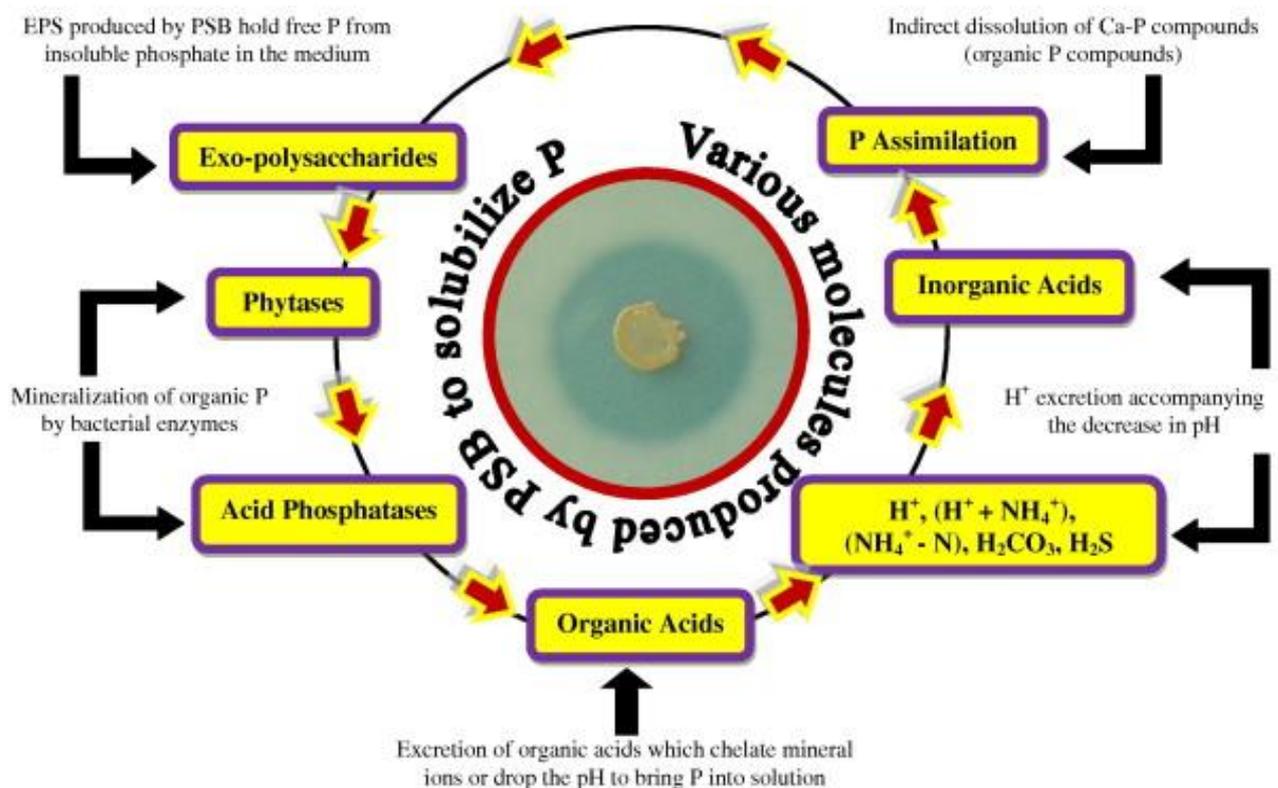


Fig. 2: Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates (Khan *et al.*, 2009)

VI- 2 Phytostimulation

VI- 2-1 Production d'hormones de croissance

Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaires, la différenciation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones. De nombreuses phytohormones sont produites par les PGPR. Bien que le rôle de la biosynthèse de ces phytohormones par ces micro-organismes ne soit pas entièrement expliquée, il est à noter que les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden 1995 ; Glick, 1995; Lucy *et al.*, 2004).

Les régulateurs de croissance des végétaux sont les substances qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations et modifient ou contrôlent un ou plusieurs événements spécifiques du métabolisme d'une plante. Les hormones végétales sont des messagers chimiques affectant la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent que l'utilisation des hormones en tant que molécules signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres micro-organismes (Spaepen *et al.*, 2007) (Fig.3).

- Acide indole acétique (AIA) :

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008). Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. Les poids des tiges et des racines des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (Narula *et al.*, 2006).

Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Une grande proportion (80%) de bactéries colonisant la rhizosphère le synthétise, les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices (Loper et Schroth, 1986). Toutefois, l'amélioration de la croissance des plantes par la colonisation racinaire avec des espèces de *Bacillus et Paenibacillus* productrices d'AIA est bien connue (Kloepper *et al.*, 2004 ; Idris *et al.*, 2007).

La biosynthèse de l'AIA est affectée par plusieurs facteurs environnementaux. En particulier, il y a une augmentation de sa production dans des conditions de pH élevé et en présence de plus grandes quantités de tryptophane (Spaepen *et al.*, 2009). L'AIA est généralement produit sous forme de métabolite secondaire par les PGPR en utilisant les substrats riches exsudés par les racines des plantes. L'AIA et ses analogues actifs dans la plupart des plantes sont synthétisés à partir du tryptophane principal précurseur. Les exsudats des racines sont la source principale du tryptophane dans le sol (Spaepen *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, six voies de biosynthèse ont été identifiées dont cinq dépendent du tryptophane et une en est indépendante. Cette voie dépend de la présence d'indole-3-glycérolphosphate. Chez les plantes, la plupart de l'AIA se trouve sous une forme conjuguée ce qui permet son stockage et empêche sa dégradation (Spaepen *et al.*, 2007).

La capacité de biosynthèse de l'auxine peut être utilisée comme un outil pour le dépistage des souches PGPR efficaces (Khalid *et al.*, 2004). En particulier, la production de l'AIA semble être une propriété de la promotion de la croissance de la plante la plus répandue parmi les PGPR.

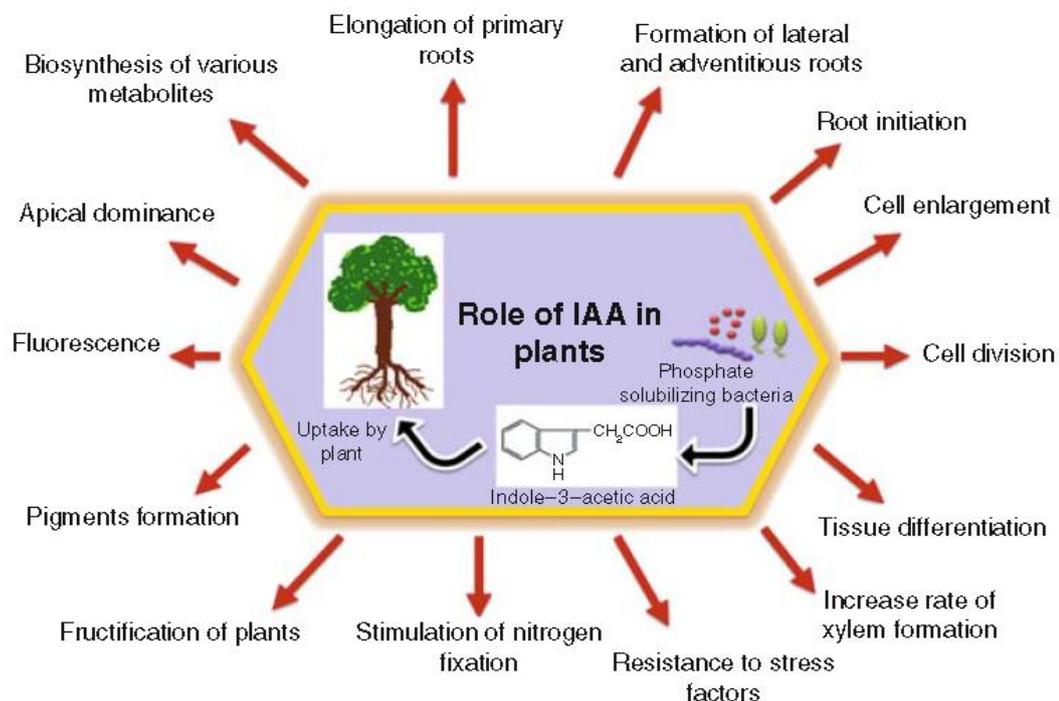


Fig. 3 : Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan *et al.*, 2009).

- Cytokinines et gibbérellines

Les **cytokinines** sont des aminopurines N6-substituées qui jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Salisbury et Ross, 1992). En outre, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansine, protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes et facilitant l'expansion de la cellule végétale et provoquant sa turgescence, ceci a un impact à la fois sur la taille et la forme des cellules (Downes *et al.*, 2001).

Le gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse des cytokinines a été initialement caractérisée chez *Agrobacterium tumefaciens* (Nester *et al.*, 1984) et ensuite chez les bactéries méthylophiles et méthanotrophes (Ivanova *et al.*, 2001). Depuis, de nombreuses PGPR y compris *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. sont productrices de cette hormone (Nieto et Frankenberger 1989; Timmusk *et al.*, 1999).

L'inoculation de graines avec des bactéries productrices de cytokinines conduit généralement à augmenter le contenu en cytokinines chez les plantes influençant ainsi simultanément la croissance et le développement des plantes (Arkhipova *et al.*, 2005). Divers stress environnementaux peuvent aussi engendrer l'accumulation des taux élevés de cytokinines végétale (Arkhipova *et al.*, 2007). Une corrélation positive est observée chez plusieurs espèces de légumineuses entre le taux de cytokinines chez les plantes et la capacité de *Rhizobium* de former des nodules sur les racines (Yahalom *et al.*, 1990; Hirsch et Fang, 1994).

Les **gibbérellines** sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries ; ce sont des acides diterpéniques constitués de résidus isopréniques. Un nombre important (136) de gibbérellines différentes sont identifiées et caractérisées (MacMillan, 2002). Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (MacMillan, 2002). Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini *et al.*, 2004). La capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérellines a été initialement décrite chez *A. brasilense* (Tien *et al.*, 1979) et *Rhizobium* (Williams et

Sicardi de Mallorca, 1982) puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Mitter *et al.*, 2002; Tsakelova *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2009). La promotion de la croissance des plantes par les PGPR productrices de gibbérellines est rapportée par plusieurs travaux et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux (Atzhorn *et al.*, 1988; Gutierrez-Manero *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2009).

- Rôle de l'éthylène

L'éthylène gazeux produit de manière endogène par les plantes a plusieurs effets sur leur développement et agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante (Ecker, 1995). L'éthylène est impliqué dans beaucoup de processus physiologiques, comme la germination de la graine, la différenciation de tissus, la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons, le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la sénescence d'organe, la maturation de fruit et l'abscission de la feuille et du fruit (Frankenberger et Arshad, 1995). A des concentrations élevées, l'éthylène affecte négativement de nombreuses étapes physiologiques des plantes. Une augmentation de la production d'éthylène agissant comme hormone sensitive stimule la maturation des fruits et le vieillissement des fleurs. Ces symptômes sont associés à une perte de la chlorophylle des feuilles, une dégradation des protéines et des ARN et une perte de pigmentation des fleurs (Oldroyd *et al.*, 2001; VanLoon *et al.*, 2006). De plus, l'éthylène, à forte concentration, empêche le développement des nodules de la luzerne (*Medicago sativa*) (Glick *et al.*, 2007) et des pois (*Pisum sativum*) (Cheng *et al.*, 2008) et affaiblit la défense de la plante contre des pathogènes (Wang *et al.*, 2000).

VI-2-2 Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

Au cours des dernières années, un nouveau mécanisme de promotion de la croissance des plantes impliquant l'éthylène est proposé (Burdman *et al.*, 2000). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène et favoriserait un allongement des racines. Les PGPR produisant cette enzyme soulageraient ainsi la plante de plusieurs stress causés par des infections, l'absorption de métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse (Glick *et al.*, 1998).

Le rôle de l'ACC désaminase chez les PGPR est actuellement bien établi. Elle intervient dans la régulation de l'éthylène chez les plantes. Les PGPR s'attachent aux racines et métabolisent les exsudats racinaires tels que le tryptophane et le transforment en auxines particulièrement en AIA. Cet AIA rhizobactérien ainsi que l'AIA endogène de la plante peuvent induire l'activité de l'ACC-synthase qui produit de l'ACC (Penrose et Glick, 2001). Une partie de l'ACC de la plante est excrétée et dégradée par l'ACC-désaminase des rhizobactéries en ammoniacque et α -cétobutyrate, composés rapidement métabolisés par les bactéries (Holguin et Glick, 2001) par conséquent la diminution de l'ACC entraîne l'abaissement du taux d'éthylène dans la plante (Fig. 4).

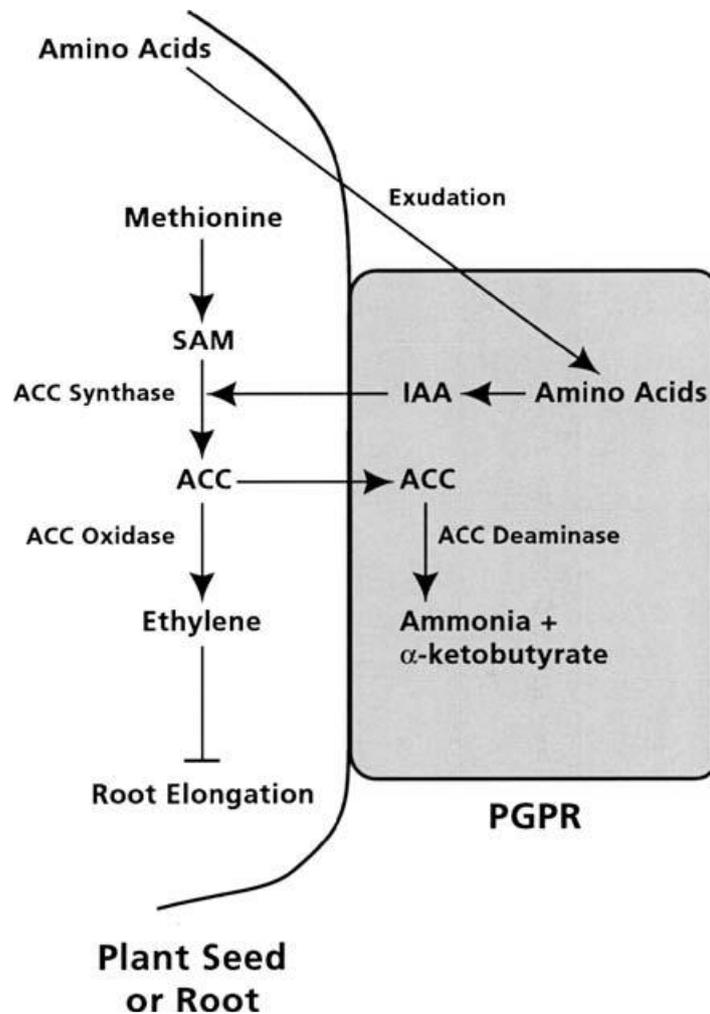


Fig. 4 : Mécanisme d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stress abiotiques (Glick *et al.*, 1998).

VI-3 Biocontrôle

Les micro-organismes, principalement les bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Agrobacterium* (Haas et Defago, 2005). De nombreuses recherches ont concerné *Bacillus* et *Pseudomonas* qui sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ces rhizobactéries ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques (Raaijmakers *et al.*, 2002). Les modes d'action des agents microbiens dans le **biocontrôle** ne sont pas toujours bien connus et peuvent varier pour un micro-organisme donné en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles.

VI-3-1 Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est, dans certains cas, pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale (Reyes *et al.*, 2004). L'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie fut beaucoup discutée. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique et être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre *et al.*, 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren *et al.*, 2001; Gupta, 2003).

La capacité d'une bactérie à inhiber un agent pathogène fongique semble dépendre de l'application d'un inoculum élevé de l'agent de lutte biologique par rapport à l'agent pathogène. Pour rendre cette approche pratique, il est nécessaire de sélectionner ou de développer des souches qui peuvent être appliquées en faible nombre, mais se multiplier rapidement suite à la diffusion dans l'environnement (Stephens *et al.*, 1993).

Un autre aspect important de la compétitivité d'une PGPR est sa capacité à persister et à proliférer. Cependant, il est souvent difficile de prédire le comportement d'une PGPR dans l'environnement. La persistance d'une bactérie dans le sol peut être influencée par un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques, notamment la composition du sol (Bashan *et al.*, 1995), la température (Chiarini *et al.*, 1994 ; Sun *et al.*, 1995) et la présence de prédateurs (Glick, 1995).

Les souches capables d'utiliser une source inhabituelle de carbone ou d'azote telle que l'ACC ou un composé xénobiotique (un herbicide ou un pesticide) devrait proliférer et persister longtemps dans les sols contenant ces composés inhabituels. Ainsi, la capacité de certaines PGPR hydrolysant l'ACC, un composé se trouvant naturellement dans les exsudats racinaires, peut fournir à ces souches un avantage concurrentiel par rapport aux autres microorganismes de la rhizosphère (Jacobson *et al.*, 1994; Glick *et al.*, 1994a, 1994b, 1995).

Une illustration de l'effet de la compétition pour l'espace concerne la lutte biologique contre le pathogène *Ceratocytis paradoxa* responsable de la maladie de la pourriture noire sur les fruits d'ananas. La maladie a seulement été réduite dans les fruits prétraités avec l'eau de lavage contenant la levure *Pichia guilliermondii*. Ce traitement permet de réduire la germination des spores, la longueur des germes et le poids sec du pathogène *C. paradoxa*. Le mode d'action de *P. guilliermondii* serait basé sur la compétition pour l'espace et les nutriments car aucun effet antagonisme de cette levure n'a été observé lorsqu'elle est appliquée après inoculation du pathogène (Reyes *et al.*, 2004).

VI-3-2- Compétition pour le fer et la production de sidérophores

Un cas particulier de compétition pour les nutriments concerne la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des composés s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère et les rendent ainsi indisponibles pour le champignon pathogène entraînant une diminution de sa croissance.

Bien que le fer soit l'un des minéraux les plus abondants sur terre. Dans le sol, il est indisponible pour l'assimilation directe par les microorganismes car l'ion ferrique (Fe^{+3}), forme prédominante dans la nature, est peu soluble (Neilands *et al.*, 1987). La quantité de fer soluble dans le sol est beaucoup trop faible soit environ 10^{-18}M à pH 7,4, pour assurer la croissance microbienne, les microorganismes du sol sécrètent des molécules de faible poids moléculaire (~ 400-1000 daltons) appelés sidérophores qui lient le Fe^{+3} avec une très forte affinité ($K_d = 10^{-20}$ à 10^{-50}) (Castignetti et Smarrelli, 1986) et le transportent vers la cellule microbienne où il est repris par l'intermédiaire d'un récepteur cellulaire puis utilisé durant la

croissance microbienne (Neilands et Leong, 1986; Briat, 1992). Les bactéries synthétisant les sidérophores lient le complexe fer-sidérophore à l'aide d'un récepteur spécifique situé sur la membrane cellulaire externe de la bactérie (O'Sullivan et O'Gara, 1991). Bien que, les champignons phytopathogènes synthétisent également des sidérophores, ceux-ci ont généralement une plus faible affinité pour le fer par rapport à ceux produits par les PGPR (Schippers *et al.*, 1987).

Contrairement aux phytopathogènes microbiens, les plantes ne sont généralement pas lésées par l'épuisement du fer dans le sol. La plupart des plantes peuvent croître à des concentrations de fer beaucoup plus faibles (environ 1000 fois) (O'Sullivan et O'Gara, 1991). En outre, un certain nombre de plantes ont des mécanismes pour lier le complexe fer-sidérophore bactérien, le transportent à travers la plante puis le libèrent sous sa forme réduite utilisable (Bar-Ness *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). La capacité des sidérophores d'agir comme agents efficaces dépend de la plante cultivée, du phytopathogène spécifique à supprimer, de la composition du sol, de la bactérie productrice, et de l'affinité du sidérophore spécifique pour le fer. Ainsi, même si une PGPR est un agent efficace suppresseur du pathogène dans des conditions contrôlées, son comportement sur le terrain est extrêmement difficile à prédire. Malgré cela, cette mise en garde suppose que la capacité des bactéries produisant des sidérophores inhibant les organismes phytopathogènes est un trait important qui pourrait avoir un impact agronomique important.

Les bactéries capables de synthétiser des sidérophores sont : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* (Ahmad *et al.*, 2008). Les bactéries ayant un grand pouvoir de chélation du fer peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres microorganismes de la rhizosphère (Ongena *et al.*, 2002).

D'autre part, bien que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l'activité des PGPR, elle est rarement essentielle dans le bio-contrôle (Ongena *et al.*, 2000; Meziane *et al.*, 2005). Un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température, la source de carbone) influence leur production (Duffy et Défago, 1999).

De plus, étant donné que les sidérophores soient principalement spécifiques du fer, ils peuvent aussi complexer d'autres métaux lourds pour atténuer leur toxicité ou posséder d'autres fonctions biologiques (Fig. 5) (Khan *et al.*, 2009).

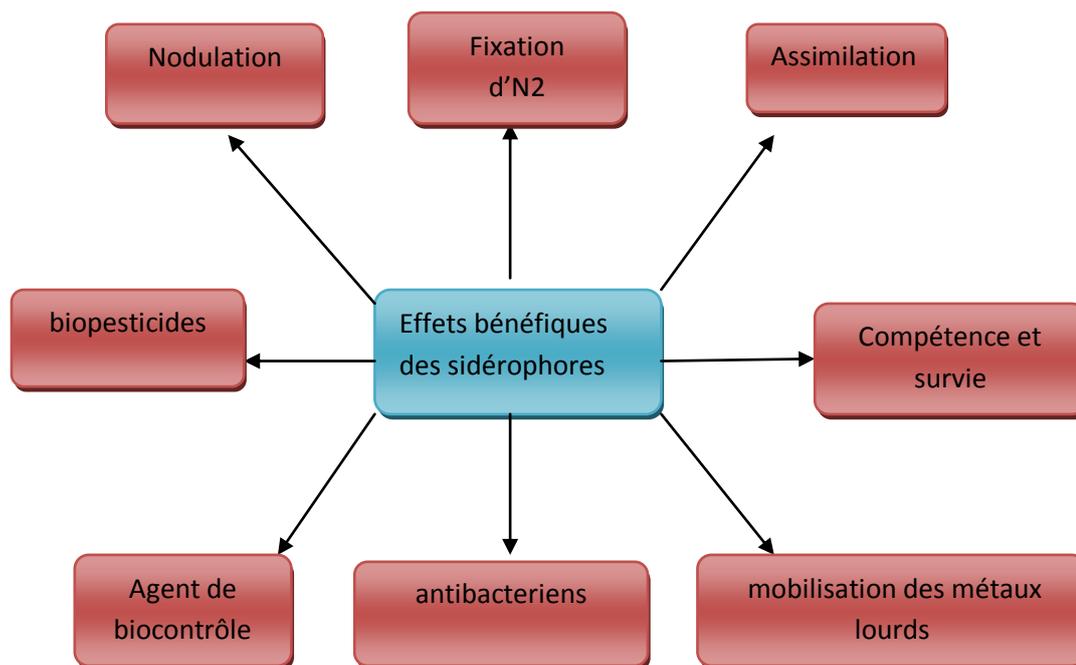


Fig . 5: Fonctions biologiques des sidérophores (Khan *et al.*, 2009)

VI-3-3 Antibiose et parasitisme

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène *via* la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Plusieurs facteurs i) abiotiques (l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote, et des micro-éléments), ii) biotiques (la plante hôte, le pathogène, la microflore indigène, et la densité de cellules de la souche productrice) et iii) physiologiques tels que le quorum-sensing sont identifiés comme ayant une influence sur la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle (Dong *et al.*, 2002). De même, certaines souches de lutte biologique peuvent produire des enzymes telles que chitinase, glucanase, protéase et lipase pouvant lyser les cellules fongiques (Chet et Inbar, 1994). En outre, trois différentes souches de *Pantoea agglomerans* sont antagonistes aux pathogènes fongiques y compris *Rhizoctonia solani* (Chernin *et al.*, 1995). Ces bactéries ont atténué sensiblement les dommages aux plantes de coton suite à une infection par *Rhizoctonia solani*. De plus, les enzymes de biocontrôle

identifiées dans la lyse des cellules fongiques y compris les chitinases et les glucanases sont codées par un seul gène. Les souches de *B. subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple: la zwittermycine-A, la kanosamine (Peypoux *et al.*, 1999), des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine (Peypoux *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2007) et encore des enzymes hydrolytiques (β -1,3-glucanase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Leelasuphakul *et al.*, 2006). Le rôle de ces lipopeptides et l'effet protecteur de *B. subtilis* contre la fonte des semis des plantes d'haricot provoquée par *Pythium ultimum* (Ongena *et al.*, 2005) et contre la moisissure grise de la pomme après la récolte est démontré (Touré *et al.*, 2004).

VI-3-4 Composés volatiles

Selon Howell *et al.* (1988), l'inhibition de *Pythium* par *Enterobacter cloacae* dans des boîtes de Pétri cloisonnées serait dû à des substances volatiles. L'ammoniac est l'agent inhibiteur identifié. Il est produit comme un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie.

Un autre métabolite secondaire produit par certaines rhizobactéries est l'acide cyanhydrique (HCN). Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes, y compris les bactéries par la voie de décarboxylation oxydative en utilisant la glycine, le glutamate ou la méthionine comme précurseurs (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986). Son rôle est d'éviter la prédation ou la compétition. L'HCN joue un rôle dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes (Heydari *et al.*, 2008). La production de HCN est une activité commune chez *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphérique (Ahmad *et al.*, 2008).

D'autres composés volatiles, le 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).

VI-3-5 - Résistance Systémique Induite (ISR)

Lors du phénomène appelé « résistance systémique induite » (ISR), des rhizobactéries non pathogènes peuvent conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique.

Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par le microorganisme bénéficiaire. Ce phénomène fait appel séquentiellement à la reconnaissance par l'hôte d'éliciteurs produits par l'agent inducteur, à

l'émission d'un signal requis pour propager l'état induit de manière systémique et à l'expression de mécanismes de défense *sensu stricto* qui permettent de limiter la pénétration du pathogène dans les tissus de la plante.

Les événements moléculaires associés à l'ISR sont de mieux en mieux connus. Ainsi, la transmission du signal émis suite à la perception de l'agent infectieux repose sur différentes voies dans lesquelles l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène jouent un rôle crucial (Glazebrook *et al.*, 2003). Cependant, ces voies s'interpénètrent et agissent avec d'autres mécanismes pour former un réseau de régulation modulable permettant à la plante d'initier une réponse défensive spécifique en fonction de la nature du pathogène, qu'il soit virus, bactérie, champignon, insecte ou nématode (De Vos *et al.*, 2005).

L'expression phénotypique du phénomène de l'ISR peut être divisée en quatre étapes principales (Fig. 6). Ces étapes sont :

- 1- La perception par la plante des molécules bactériennes responsables de l'élicitation du phénomène,
- 2- La transmission du signal nécessaire à la systémisation du phénomène dans la plante,
- 3- La mise en alerte de la plante au niveau systémique qui, dans la plupart des cas, n'est pas accompagnée de modifications majeures de l'activité transcriptionnelle avant l'attaque du pathogène
- 4- L'expression du ou des mécanisme(s) de défense *sensu stricto* induits permettant de limiter voire inhiber la pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte végétal.

Le survol de la littérature de ces dernières années illustre la diversité des microorganismes non pathogènes capables d'induire l'ISR. Le nombre d'espèces décrites comme inductrices de l'ISR a augmenté rapidement au cours des dernières années (Tab. 4). Il inclut des bactéries Gram-positives et en particulier des bacilles comme *Paenibacillus polymyxa*, *B. pumilus*, *mycoides*, *subtilis*, *amyloliquefaciens*, *pasteurii*, *thuringiensis* ou *cereus* (Kloepper *et al.*, 2004). Plusieurs espèces Gram-négatives sont également intensivement étudiées dans le contexte de la lutte biologique basée sur l'induction de la résistance parmi lesquelles certaines entérobactéries telles que *Serratia* (*S. marcesens*, *S. plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans*. La plupart de ces bactéries vivent librement dans la rhizosphère mais d'autres telle que *Rhizobium elti* peut également pénétrer dans les espaces intercellulaires des tissus racinaires et donc se comporter comme endophytes (Benhamou *et al.*, 2000).

Tab. 4. Diversité des souches bactériennes identifiées comme inducteurs de la résistance systémique chez les plantes et la diversité des pathosystèmes dans lesquels l'ISR est impliquée (Van Loon et Bakker, 2005).

Espèces	Plante hôte/pathogène(s)
<i>1- Gram-négatives</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (souche WCS417)	Cacahuète/ <i>Fusarium</i> ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Fusarium</i> , <i>Pseudomonas</i> ; Tomate/ <i>Fusarium</i> ; Radis/ <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pseudomonas</i>
<i>P. aeruginosa</i> (souche TNSK2)	Haricot/ <i>Botrytis</i> , <i>Colletotrichum</i> ; Tomate/ <i>Botrytis</i> ; Tabac/virus de la mosaïque
<i>Serratia marcescens</i> (souche 90-166)	Concombre/ <i>Colletotrichum</i> , <i>Pseudomonas</i> ; Tabac/ <i>Peronospora</i> ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i> ; Concombre/coléoptère ; Pin/ <i>Cronartium</i> ; Tomate/virus de la mosaïque
<i>S. plymuthica</i>	Tomate/ <i>Fusarium</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	Tabac/ <i>Phytophthora</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pommier/ <i>Erwinia</i>
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Tomate/cucumovirus
<i>Flavomonas oryzihabitans</i>	Concombre/coléoptère
<i>Rhizobium elti</i>	Pomme de terre/nématode
<i>Agrobact. radiobacter</i>	Pomme de terre/nématode
<i>2- Gram-positives</i>	
<i>Bacillus. pumilus</i> (souche SE34)	Tabac/ <i>Peronospora</i> ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i> ; Concombre/coléoptère ; Tomate/virus de la mosaïque ; Pin/ <i>Cronartium</i> ; Pois/ <i>Fusarium</i> ; Tomate/ <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i>
<i>B. amyloliquifaciens</i> (souche IN937)	Tomate/virus de la mosaïque ; Concombre/coléoptère ; <i>Arabidopsis</i> / <i>Erwinia</i>
<i>B. thuringiensis</i>	Café/ <i>Hemileia</i>
<i>B. mycoides</i>	Betterave sucrière/ <i>Cercospora</i>
<i>B. pasteurii</i>	Tabac/ <i>Peronospora</i>
<i>B. sphaericus</i>	Pomme de terre/nématode
<i>B. cereus</i>	Poivre/nématode
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Erwinia</i>

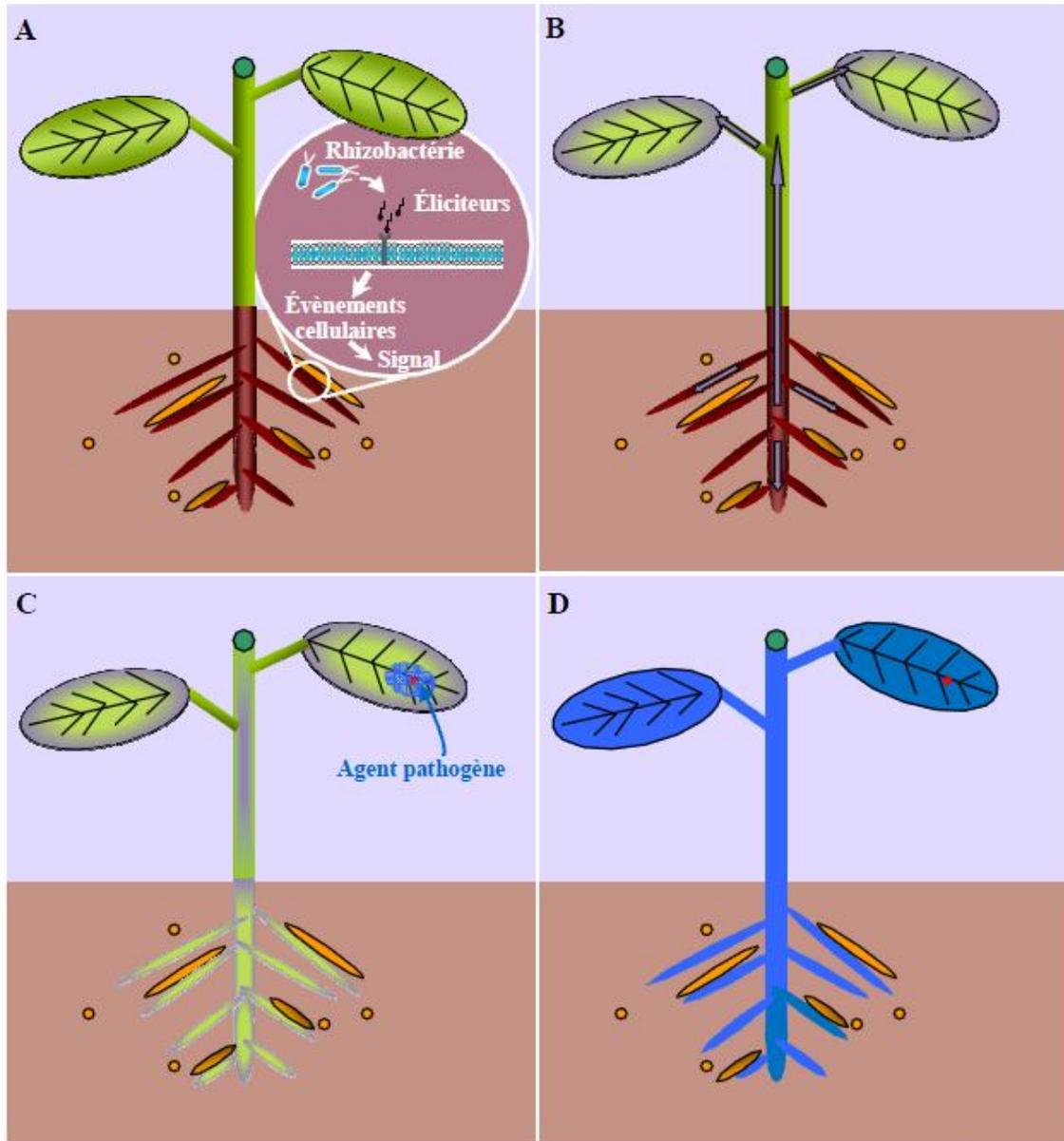


Fig. 6 : Les différentes phases du phénomène d'induction de la résistance chez les plantes par les rhizobactéries. La perception de la bactérie par l'hôte végétal via un(des) éliciteur(s) moléculaire(s) est la première étape (A). Suite à ce dialogue moléculaire, il y a émission d'un signal à travers toute la plante menant à un état « induit » systémique alors que la bactérie inductrice ne migre pas (B). Cet état induit n'est que peu perceptible d'un point de vue moléculaire mais permet à la plante de réagir rapidement et de limiter une infection ultérieure d'abord localement autour du site d'attaque (C). Il s'en suit une réaction systémique menant à un renforcement de tous les organes qui permet une certaine résistance vis-à-vis d'une agression future (D).

VI-3-5 -1 Les déterminants bactériens de l'ISR

Les éliciteurs produits par les PGPR et impliqués dans l'ISR sont moins bien connus, mais les recherches menées ces dernières années ont permis d'identifier plusieurs molécules bactériennes jouant ce rôle (Bakker *et al.*, 2007).

- Les composants de la surface des cellules

Les flagelles bactériens sont nécessaires pour la mobilité et l'adhérence des bactéries sur les racines et par conséquent ils sont importants pour une colonisation efficace (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Il a été récemment démontré que la flagelline (protéine du filament flagellaire des Eubacteria) des rhizobactéries peut agir comme éliciteur de résistance systémique (Meziane *et al.*, 2005).

Le pouvoir éliciteur des lipopolysaccharides (LPS) des PGPR varie avec la plante hôte. Par exemple, *P. putida* WCS358 est capable d'induire l'ISR via le LPS chez plusieurs plantes telles que le haricot, la tomate mais pas chez le radis et *Arabidopsis* (Meziane *et al.*, 2005).

- Les sidérophores

Les sidérophores produits par les PGPR dans des conditions de carence en fer, peuvent déclencher l'ISR chez certaines plantes. Les pyoverdines (aussi appelées pseudobactines) et la pyochéline sont des sidérophores synthétisés pour lesquels une activité élicitrice de l'ISR a été démontrée (Bakker *et al.*, 2007 ; Meziane *et al.*, 2005).

- Les antibiotiques

Certains composés synthétisés par les PGPR et isolés à l'origine pour leur activité antifongique sont également inducteurs de l'ISR. Ainsi, un rôle dans l'induction de l'ISR de la pyocyanine a été rapporté lors du traitement de plantes de tomate par *P. aeruginosa* 7NSK2 (Audenaert *et al.*, 2002). D'autre part, certaines bactéries à Gram positif telles que *Bacillus spp.* ont démontré leur capacité à stimuler des mécanismes de défense chez la plante, mais le plus souvent la nature de leur déterminant provoquant l'ISR n'est pas connue (Kloepper *et al.*, 2004). Jusqu'à récemment, les composés volatiles organiques, et plus particulièrement le 2,3-butendiol, étaient les seuls déterminants de l'ISR connus chez *Bacillus* (Ping et Boland, 2004).

VII- Effets des PGPR sur la croissance végétale

Depuis les dernières décennies, la réponse des cultures végétales à l'inoculation par des PGPR est étudiée dans de nombreuses expériences menées à travers le monde dans les champs et sous serres. Sur la base des données obtenues, il est évident que l'inoculation a entraîné des augmentations significatives des rendements de différentes cultures, sous différentes conditions. Elles peuvent affecter la croissance et le rendement d'une large gamme de cultures telles que les céréales ou les légumes. Les traitements avec les PGPR augmentent le pourcentage de germination, la vigueur des plantules, l'émergence, le développement des racines et des tiges, la biomasse totale des plantes, le poids des semences, la floraison précoce et les rendements de fruits et des graines (Van Loon *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

VII - 1 Rendement et composantes du rendement

L'augmentation et la qualité de la productivité agricole sont indispensables. Les applications des PGPR sont les pratiques les plus fiables offrant de meilleurs rendements des cultures agricoles. Les souches *Pseudomonas* BA-8 et *Bacillus* OSU-142 appliquées sur les feuilles et les fleurs des pommiers ont considérablement amélioré le rendement de la superficie de la section transversale du tronc (de 13,3 à 118,5%), le poids des fruits (4,2 à 7,5%), la longueur des tiges (de 20,8 à 30,1 %), et le diamètre des tiges (9,0 à 19,8%) par rapport au témoin (Pirlak *et al.*, 2007). Ainsi, les combinaisons *Bacillus* M3 et/ou OSU-142 et/ou *Microbacterium* FS01 ont le potentiel d'accroître le rendement et la croissance des pommiers. En outre, *Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 et M3 ont également donné un effet bénéfique sur la longueur, le rendement des cultures et la qualité des fruits d'abricot, de cerise et de framboise (Esitken *et al.*, 2005 ; Orhan *et al.*, 2006). Le poids moyen des fruits de tomate par plante traitée avec *Rhodopseudomonas* sp KL9 (82,7 g) est supérieur par rapport au témoin non inoculé. La teneur en lycopène dans la tomate mûre a augmenté de 48,3% avec l'application de *Rhodopseudomonas* sp. KL9 (Lee *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que *Burkholderia gladii* BA-7, *Pseudomonas* BA-8, et *Bacillus* OSU-142 ont un grand potentiel pour accroître les paramètres de croissance des plantes de *Eruca sativa* (Dursun *et al.*, 2008). Les espèces efficaces de *Bacillus*, comme OSU-142, RC07 et M-13, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *P. putida* RC06 et RC04 et *Rhodobacter capsulatus* peuvent être utilisées dans l'agriculture biologique et durable. Plusieurs études ont clairement démontré le potentiel de ces bactéries dans la croissance et le rendement des plantes (De Freitas, 2000; Herman *et al.*, 2008).

VII- 2 Germination et émergence

Les PGPR sont en mesure d'exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes telles que l'augmentation du taux de germination des graines. De nombreux travaux ont prouvé que l'utilisation des PGPR telles que *Azospirillum* spp (Rodriguez *et al.*, 2001), *Hafnia alvei* P3 (Vargas *et al.*, 2001), *Pseudomonas* PMZ2 ou avec *B. japonicum* (Zaidi, 2003), *Azotobacter chroococcum* C2 (Basavaraju *et al.*, 2002) et *Azotobacter* sp. 17 et 20 (Reyes *et al.*, 2008) ont donné une meilleure germination des graines de tomates, de poivre, de laitue, du radis, du maïs et des plants de soja. Bien que les études mentionnées sur l'effet des souches bactériennes sur la germination des différentes espèces végétales aient été menées dans des conditions optimales, Kaymak *et al.* (2009) ont suggéré que *Agrobacterium rubi* A16, *Burkholderia gladii* BA7, *P. putida* BA8, *B. subtilis* BA142, *B. megaterium* M3 appliquées sous stress salin pourrait procurer un pourcentage de germination plus élevé.

De plus, les PGPR peuvent être employées contre des agents pathogènes. Ainsi, différents souches telles que *B. pumilus*, *subtilis*, *amyloliquefaciens* et *Brevibacillus brevis* ont servi à traiter des semences afin de supprimer les maladies causées par des champignons phytopathogènes. Ces souches augmentant la germination et la vigueur des plantules à des taux très élevés ont réduit l'incidence de la mycoflore des semences (Begum *et al.*, 2003). Selon Araujo (2008), l'inoculation des semences avec *B. subtilis* est une technologie prometteuse pour le traitement des semences.

VII- 3 Enracinement des boutures

Plusieurs facteurs physiologiques et environnementaux influencent la formation des racines, les traitements exogènes des boutures étant particulièrement importants (Couvillon, 1998). Les producteurs ont tenté de stimuler l'enracinement en appliquant diverses substances chimiques comme régulateurs de croissance. Cependant, l'utilisation de produits chimiques peuvent causer des problèmes environnementaux et augmenter les coûts de la production. Les problèmes écologiques ont suscité l'intérêt des pratiques agricoles durables respectant l'environnement (Salantur *et al.*, 2005). Par conséquent, l'utilisation de PGPR peut palier à ces problèmes liés à l'environnement (Kaymak *et al.*, 2008). Elles appartiennent à plusieurs genres (*Agrobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Alcaligenes*) et induisent la formation de racines et la croissance des boutures (Bassil *et al.*, 1991; Hatta *et al.*, 1996; Rinallo *et al.*, 1999). Plus récemment, les PGPR comme *A. rubi*, *B. subtilis*, *B. gladii*, *P. putida*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *P. polymyxa*, et *Comamonas acidovorans* sont efficacement utilisées permettant d'obtenir des pourcentages élevés d'enracinement des kiwis

(Ercisli *et al.*, 2003), de la vigne (Kose *et al.*, 2003), des roses (Ercisli *et al.*, 2004), de la pistache (Orhan *et al.*, 2006), du thé (*Camellia sinensis* var. *Sinensis*) (Erturk *et al.*, 2008) et de la menthe (*Mentha piperita* L.) (Kaymak *et al.*, 2008).

VII- 4 Absorption des nutriments

Les plantes vivantes nécessitent 16 éléments essentiels pour survivre. Trois d'entre eux (carbone, hydrogène, et oxygène) proviennent essentiellement de l'air et de l'eau. Le reste sont normalement absorbés par les racines des plantes. Chacun de ces éléments essentiels a au moins un rôle spécifiquement défini dans la croissance des plantes (Swaidar *et al.*, 1992; Decateau, 2000). Les PGPR sont considérées comme une composante pour le maintien de la nutrition adéquate des plantes. Les PGPR pourraient favoriser l'absorption des nutriments, réduire ainsi la nécessité de l'apport d'engrais et prévenir l'accumulation de nitrates et de phosphates dans les sols agricoles (Yang *et al.*, 2009). Le phosphore et l'azote sont les nutriments majeur-clé limitant la croissance des plantes. (Kumar et Narula, 1999; Sundara *et al.*, 2002; Podile et Kishore, 2006). En outre, certaines PGPR améliorent l'absorption de ces éléments nutritifs en favorisant le développement des racines (Mantelin et Touraine, 2004) par la production de phytohormones (Kloepper *et al.*, 2007). Un autre processus par lequel les PGPR facilitent l'absorption des ions minéraux est la stimulation de l'ATPase, la pompe à protons (Mantelin et Touraine, 2004).

VII-5 Effets bénéfiques des PGPR en milieu salin

L'intérêt pour les bio-engrais a augmenté et permet de réduire considérablement l'utilisation d'engrais chimiques et de pesticides qui contribuent souvent à la pollution des écosystèmes terrestres et aquatiques. L'approche développée pour atténuer le stress du sel chez les plantes consiste au traitement des semences et des plantes par des PGPR. Les plantes en milieu salin ou lors d'un déséquilibre ionique deviennent plus vulnérables aux maladies causées par des champignons pathogènes. L'utilisation d'antagonistes microbiens spécifiques stimule davantage la croissance des plantes dans les écosystèmes dégradés (Paul et Nair, 2008). Le développement d'une souche microbienne tolérante au stress associée aux racines des cultures peut conduire également à l'amélioration de la fertilité des sols salins (Mayak *et al.*, 2004). Actuellement, 20 produits de lutte biologique à base de souches de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, et *Agrobacterium* sont commercialisés (Copping, 2004; Chebotar *et al.*, 2000; Lugtenberg et Kamilova, 2004). Il existe également de nombreux travaux justifiant l'utilisation de microorganismes bénéfiques dans l'amélioration de la résistance des plantes

aux stress environnementaux néfastes, par exemple, la sécheresse, les sels, la carence en éléments nutritifs, et les contaminations par les métaux lourds (Kloepper *et al.*, 1980 ; Lifshitz *et al.*, 1987; Kloepper et Beauchamp, 1992; Okon *et al.*, 1998 ; Lugtenberg *et al.*, 2001; Glick *et al.*, 2007).

Comprendre l'intégration des souches bactériennes dans la rhizosphère et les mécanismes de leurs interactions constituent un élément clé de l'amélioration et la stimulation de la croissance des plantes. Cependant, les interactions entre ces bactéries ne sont pas encore bien élucidés dans les applications sur le terrain dans différents environnements. Une étude cohérente des fonctions et des mécanismes par lesquels les bactéries peuvent favoriser la croissance des plantes dans des environnements stressants (par exemple, dans la région aride) est nécessaire pour comprendre les interactions plantes-microorganismes et développer de nouvelles technologies agricoles susceptibles d'améliorer l'écologie des sols et le développement des plantes (Egamberdieva, 2012).

VII-6 Effet des facteurs écologiques sur la performance des PGPR

De nombreux facteurs pourraient affecter les communautés microbiennes dans la rhizosphère et il est probable que les différents sols, les variétés et les conditions climatiques influenceront les performances des PGPR (Sorensen, 1997). L'environnement abiotique est toutefois reconnu comme le principal critère de détermination de l'efficacité des PGPR. Selon Latour *et al.* (1996), les types de sol sont le facteur dominant responsable de la diversité des populations bactériennes associées aux racines des plantes. Les souches *P. alcaligenes*, *B. polymyxa* et *B. amyloliquefaciens* ont augmenté de façon significative le poids sec des feuilles et des racines (20-42%) et de l'absorption de N, P et K du pois, du blé et du maïs dans le sol serozem (sol gris semi-désertique) mieux que dans les sols limoneux sableux. Selon de nombreuses études, les souches bactériennes isolées de sable limoneux augmentent la longueur des tiges et des racines et le poids sec des plantes de petits pois, de blé, et de maïs de 45% par rapport au témoin (Egamberdiyeva et Höflich, 2001). Les souches bactériennes ont un meilleur effet sur la croissance et l'absorption des nutriments des plantes dans le sol salin déficient en éléments nutritifs que dans le sol relativement riche. Selon Paula *et al.* (1992), l'ampleur de la réponse de la plante à une inoculation microbienne peut être considérablement affectée par l'état du sol. L'augmentation du rendement des plantes après inoculation se fait généralement dans des situations climatiques idéales, mais les plus grands avantages sont obtenus lorsque les cultures sont sous conditions stressantes (Lazarovits et Norwak, 1997). Des résultats similaires sont rapportés par Defreitas et Germida (1992) qui en faible fertilité

des sols, *Pseudomonas* améliore considérablement la croissance des plantes. Une telle inoculation pourrait compenser la carence en nutriments et améliorer le développement de la plante à travers la production de régulateurs de croissance stimulant le développement des racines et aboutissant à une meilleure absorption de l'eau et des nutriments du sol (Kloepper et Beauchamp, 1992; Wu *et al.*, 2005).

VIII- Mécanismes de tolérance des PGPR au stress salin

VIII-1 Les solutés compatibles : un moyen de réponse au stress osmotique

Les micro-organismes réagissent au stress osmotique essentiellement par accumulation de solutés. Ces solutés souvent désignés comme solutés compatibles peuvent être accumulés à des niveaux élevés par synthèse de novo ou par absorption à partir du milieu sans interférence avec les processus cellulaires vitaux. Ces molécules osmotiquement actives conservent la pression de turgescence positive nécessaire à la division cellulaire. Les solutés élaborés par des micro-organismes pour l'osmoadaptation impliquent un afflux d'ions à partir du milieu environnant ou l'accumulation de molécules organiques de faible poids moléculaire pour équilibrer la pression osmotique externe qui autrement pourrait conduire à la perte de la turgescence cellulaire, la déshydratation et la mort (Curatti *et al.*, 1998).

Parmi les ions, K^+ est le cation majeur accumulé, il contribue à la fois à l'équilibre osmotique à travers la membrane et la stabilisation de la pression de turgescence cellulaire. Chez de nombreuses bactéries, il augmente rapidement avec la salinité du milieu de croissance. Toutefois, la charge entrante de K^+ n'est pas compensée par l'accumulation de Cl^- comme il est généralement admis (Müller et Oren, 2003). La neutralisation de K^+ est effectuée par l'accumulation de quelques anions (contre-ion) principalement acides des acides organiques et dérivés, tels que les α -glutamate ou ses isomères, qui peuvent être synthétisés ou captés à partir du milieu. La combinaison de l'accumulation de K^+ et le glutamate semble être une réponse adéquate à de faibles niveaux de stress salin (Curatti *et al.*, 1998). A des salinités supérieures, des solutés compatibles supplémentaires sont nécessaires pour équilibrer la pression osmotique et le milieu intracellulaire.

Quand le stress devient plus important la cellule fait appel à des solutés compatibles organiques de faible poids moléculaire. L'accumulation de ces solutés, dans des limites intrinsèques, est une réponse très répandue dans le monde microbien. La diversité des solutés compatibles est grande mais se limite à quelques grandes catégories de produits chimiques, qui sont généralement des acides aminés ou leurs dérivés, et des hydrates de carbone ou leurs

dérivés. Certains sont largement répandus dans la nature tandis que d'autres semblent être exclusivement présents dans des groupes spécifiques d'organismes (Galinski, 1995). Ces solutés sont des acides aminés (par exemple, le glutamate et la proline), des dérivés d'acide aminé (peptides et acides aminés N-acétylés), les amines quaternaires (par exemple, la glycine-bétaïne et la carnitine), les sucres (par exemple, le saccharose et le tréhalose), et les tétrahydropyrimidines (ectoïnes) (Galinski et Truper, 1994).

VIII-2 Osmoprotection ou osmotolérance

Pour survivre sous contraintes osmotiques, les cellules doivent s'adapter en accumulant des solutés spécifiques dans des conditions hyperosmotiques et de les relarguer dans des conditions hypoosmotiques. En fait, ces solutés se sont avérés d'efficaces stabilisateurs d'enzymes, offrant une protection non seulement contre une forte teneur en sel, mais aussi contre les hautes températures, le gel-dégel, la sécheresse et la stress oxydatif (Yancey *et al.*, 1982). Dans le milieu naturel, les solutés compatibles peuvent être libérés lors de la mort d'organismes ou lors des processus d'efflux, ce qui rend ces composés accessibles à d'autres qui les utilisent pour l'osmoadaptation ou comme source de carbone (Poolman et Glaasker, 1998). Dans certains cas, les systèmes d'absorption sont cruciaux pour les micro-organismes ne disposant pas de moyens pour synthétiser les solutés compatibles appropriés. En outre, une dilution soudaine de l'environnement par les pluies ou des inondations déclenche la libération de ces solutés (Poolman et Glaasker, 1998). Il est donc fréquent de trouver des systèmes de transport à haute affinité chez les micro-organismes qui utilisent ces composés, car ils leur permettent de gérer adéquatement et rapidement les niveaux intracellulaires en solutés compatibles (Kempf et Bremer, 1998).

Les composés compatibles accumulés peuvent être libérés dans l'environnement et repris ensuite *via* un processus de transport actif, par d'autres organismes (plantes) soumis à un stress osmotique (Miller et Wood, 1996). Ces composés organiques absorbés et accumulés sont appelés osmoprotecteurs. Ainsi, dans les milieux naturels, le concept d'osmoprotecteur suppose un cycle écologique dans lequel les solutés compatibles sont ballottés par les producteurs aux consommateurs lésés par un changement brusque de la pression osmotique de leur milieu. La glycine bêtaïne (GB) fournit une preuve substantielle pour soutenir ce concept. La GB est synthétisée par quelques micro-organismes et est activement transportée et accumulée en tant qu'osmoprotecteur par une grande variété de cellules (Csonka et Hanson, 1991). Il est généralement admis qu'un osmoprotecteur doit s'accumuler durablement dans la cellule pour être efficace. Ce concept a été établi sur la base des études des membres de la famille des entérobactéries et plusieurs bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif qui

accumulent la plupart des osmoprotecteurs connus à ce jour, y compris la GB et l'ectoïne (Ghoul *et al.*, 1990 ; Talibart *et al.*, 1997). Ces solutés exogènes stimulent fortement la croissance bactérienne dans des environnements hyperosmotiques (Kempf et Bremer, 1998). Par exemple, La GB et le 3 diméthylsulfoniopropionate (DMSP) fonctionnent comme osmoprotecteurs exogènes chez de nombreuses espèces bactériennes (Pichereau *et al.* , 1998). Il en est de même pour la proline et l'ectoïne (acide carboxylique 1,4,5,6 -tétrahydro-2 -méthyl-4 -pyrimidine) (Bernard *et al.*, 1993). La GB et la proline sont des osmoprotecteurs très efficaces parce que de nombreuses bactéries les accumulent rapidement en grandes quantités par des osmoporters spécifiques qui sont soit induits ou activés dans des environnements hyperosmotiques (Kempf et Bremer, 1998). L'ectoïne est un soluté compatible synthétisé de novo par de nombreuses bactéries halotolérantes. Il agit comme un puissant osmoprotecteur pour *Escherichia coli* et *S. meliloti* (Talibart *et al.*, 1997). Le saccharose est également un puissant osmoprotecteur pour *S. meliloti* dans les milieux où l'osmolarité est inhibitrice. Plusieurs osmolytes organiques présents dans l'environnement fonctionnent également comme osmoprotecteurs bactériens. Diverses espèces d'*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, et *Rhizobium* ont la capacité d'osmoprotection dans des environnements salins.

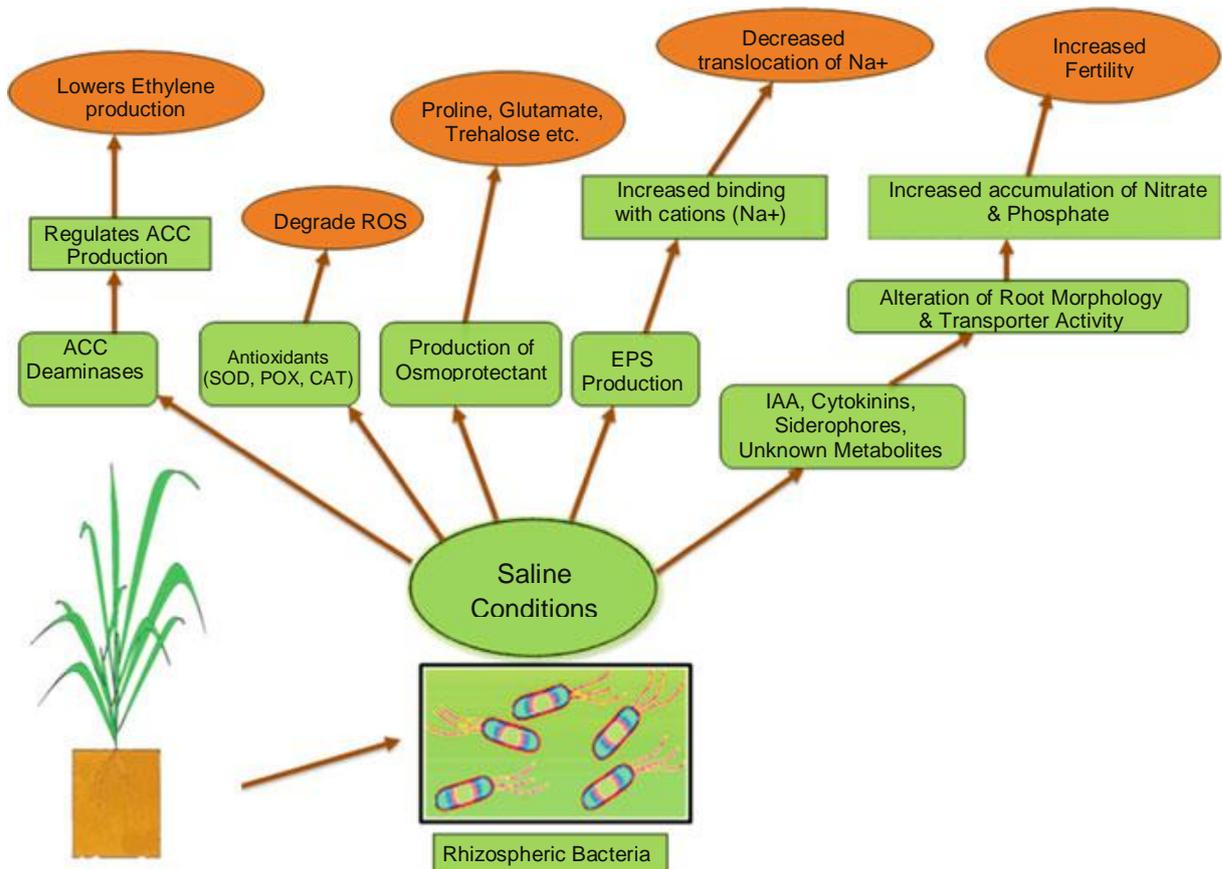


Fig. 7 : Augmentation de la tolérance et la survie des plantes induite par les PGPR en milieu salin (Ashraf *et al.*, 2008)

VIII-3 Autres moyens de réponse au stress osmotique

En plus de l'accumulation d'osmoprotecteurs, il existe d'autres mécanismes par lesquels les bactéries peuvent faire face au stress :

VIII-3-1 L'ACC désaminase

En réponse à des contraintes comme la salinité, la sécheresse et la température, les PGPR produisant une ACC désaminase stimulent la croissance des plantes par la régulation de la production massive d'éthylène. La bactérie réduit la production d'éthylène dans les plants après exposition à des concentrations croissantes de sel. Cependant, la teneur en sodium de la plante n'a pas diminué alors que l'absorption de phosphore et de potassium a été légèrement augmentée, ce qui a contribué en partie à l'activation des processus impliqués dans la réduction de l'effet néfaste du sel. La bactérie a également augmenté l'efficacité de l'utilisation de l'eau en milieu salin et a atténué la suppression de la photosynthèse. Récemment, plusieurs études ont rapporté que *P. fluorescens* contenant l'ACC désaminase améliore la résistance des plantes aux solutions salines et procure un rendement accru par

rapport à celles inoculées avec des souches de *Pseudomonas* dépourvues de l'ACC désaminase (Cheng *et al.*, 2007 ; Saravanakumar et Samiyappan, 2007).

VIII-3-2 Exopolysaccharides

Les souches PGPR produisent des exopolysaccharides bactériens (EPS) qui se lient aux cations Na^+ et notamment diminuent sa teneur contribuant ainsi à atténuer le stress salin chez les végétaux (Ashraf *et al.*, 2004). La teneur en Na^+ du soja cultivé dans des conditions salines diminue grâce à l'inoculation par des souches productrices d'EPS. L'inoculation non seulement réduit la concentration de Na^+ et de Cl^- chez le maïs, mais également induit une augmentation marquée et progressive de la concentration en N, P, et K sous contrainte de la salinité. Selon Vivas *et al.* (2003) les concentrations en N, P, et K dans la laitue inoculée par *Bacillus* sp. dans des conditions de stress augmentent d'environ 5, 70 et 50%, respectivement. Les EPS bactériens jouent un rôle important dans l'agrégation et l'adhérence du sol. Les souches PGPR productrices d'EPS induisent une tolérance à la salinité du sol et favorisent la croissance des plants de soja (Bezzate *et al.*, 2000) et limitent l'absorption de Na^+ par les racines de blé (Ashraf *et al.*, 2004). Les EPS bactériens protègeraient les bactéries de la dessiccation en modifiant leur microenvironnement (Roberson et Firestone, 1992). D'autre part, l'accumulation du poly- β -hydroxy butyrate (PHB) dans les cellules de *Rhizobium* intervient comme une stratégie de protection prise dans des conditions salines élevées (Arora *et al.*, 2006).

VIII-3-3 Activité antioxydante

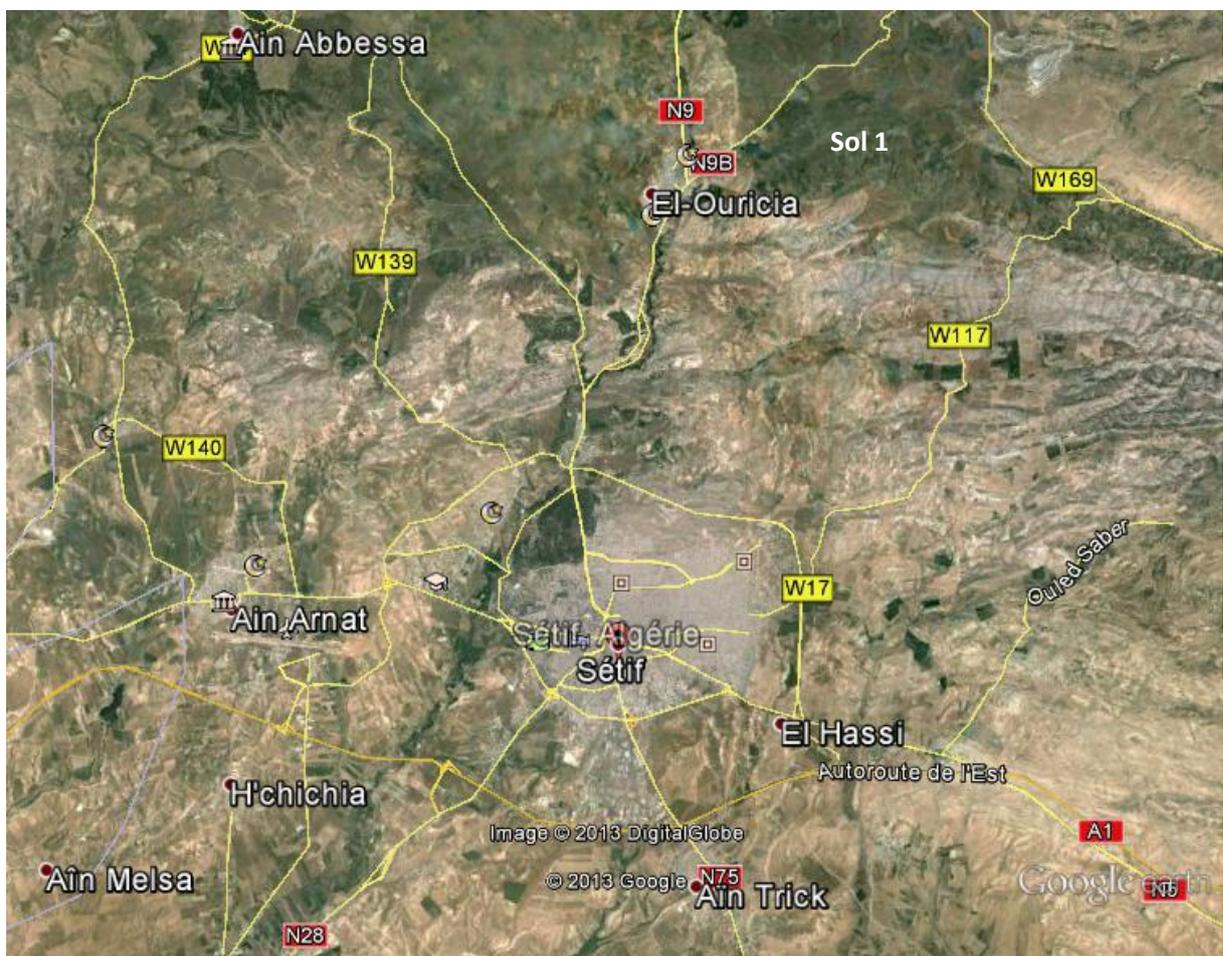
Dans des conditions salines, la génération des substances réactives à l'oxygène (ROS) tels que les radicaux superoxyde (O_2^- et OH^-), et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) modifie l'activité antioxydante. Les ROS provoquent des dommages oxydatifs à des biomolécules telles que les lipides et les protéines et conduisent finalement à la mort de la plante (Del Rio *et al.*, 2003). Les PGPR, exemple *Serratia proteamaculans* et *Rhizobium leguminosarum*, produisent des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la peroxydase (POX) et la catalase (CAT) et des antioxydants non enzymatique tels que l'ascorbate, le glutathion, et l' α -tocophérol (Han et Lee, 2005). Pour comprendre l'action protectrice des antioxydants contre le stress salin, des plants de laitue sont traités avec des souches PGPR et le niveau de l'activité anti-oxydante est mesuré. Selon Lee et Lee, (2000), l'activité SOD augmente sous stress salin et aride (Fig. 7).

Matériel et Méthodes

I- Localisation des sites de prélèvement

Les échantillons de sol sont collectés stérilement de la rhizosphère du blé ou de l'orge de trois régions différentes :

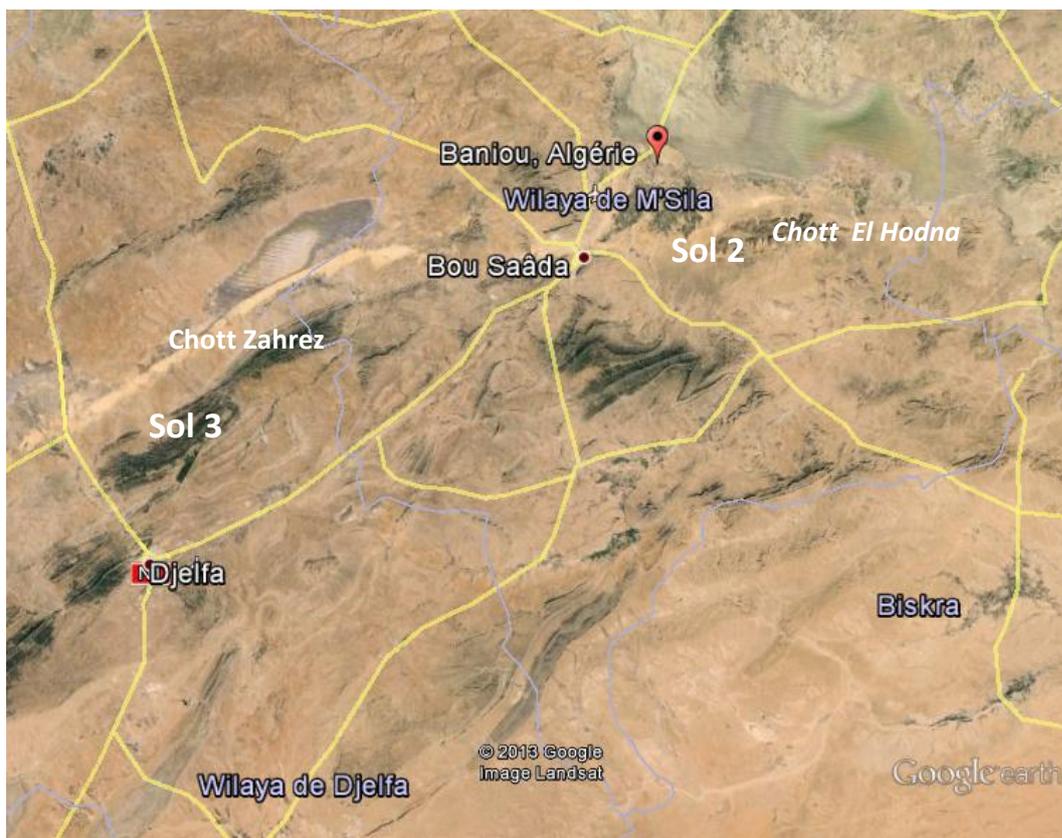
Sol 1 : situé au Nord de Sétif au niveau de l'axe routier Ouricia – Ain El Kebira , près d'une retenue collinaire. Ce plan d'eau sert à l'irrigation agricole. Le sol est de couleur noire, peu ou pas calcaire, argileux et vertique.



Sol 2 : situé en zone aride (région de Bou-saada; Sud Algérien) localisé dans la plaine au Sud du Hodna. Celle-ci se caractérise par la nature sableuse de ses sols d'où son nom de Rmel. Elle s'étale d'Ain Diss jusqu'à Guelalia. La plaine étale sa platitude presque parfaite, tantôt des monticules de sable se forment autour des principales touffes de végétations. Dans l'ensemble elle est parcourue par un cordon dunaire d'Ouest en Est qui forme de véritables dunes appelés « Zbara ». Le Rmel est parcouru par trois oueds ; l'Oued Bou-saâda et Maitar

dont les eaux n'arrivent à la sebkha qu'en période de crue, et l'Oued Mcif qui n'est pérenne qu'à son entrée à la sebkha en inféro-flux. Les crues de ces oueds inondent les Daya et les Madher et leurs eaux sont employées en inondations dirigées. Leurs sols sont sablo-argileux bruns et bruns rouges qui permettent leur mise en culture.

Sol 3 : situé aussi en zone aride dans la région de Djelfa (Sud Algérien) à une vingtaine de km de chott Zahrez. Le Chott et la Sebkha sont une vaste dépression endoréique faisant partie des grands chotts des hautes plaines steppiques algériennes, là où convergent les eaux provenant de l'Atlas Saharien au Sud et l'Atlas Tellien au Nord. Il s'agit d'une dépression peu profonde due à une topographie favorisant l'accumulation des eaux provenant de plusieurs affluents (Oueds Mellah, Zoubia et Hadja). Les terres entourant ce plan d'eau salées sont utilisées pour les cultures céréalières principalement de l'orge. Le sol est de couleur marron clair de texture limono-sablonneuse. Les franges non cultivées sont occupées par des halophytes .



II-Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sols sont prélevés à partir des champs cultivés de blé ou d'orge. Chaque échantillon composé de plantules et de sol rhizosphérique est recueilli dans des récipients stériles. Ces derniers sont gardés au frais et transportés au laboratoire.

III- Analyses physico-chimiques des sols

III-1 Mesure du pH et de la conductivité électrique (C_E)

La qualité physico-chimique du sol est importante à connaître car elle conditionne la diversité de la microflore tellurique. Dans ce cas, le pH et la conductivité électrique sont deux paramètres à déterminer du fait de leur influence sur la composition de la communauté microbienne tellurique.

La mesure du pH consiste à homogénéiser 10 g de sol dans 25 ml d'eau distillée. Après agitation, à l'aide d'un homogénéiseur pendant 15 minutes et décantation le pH du surnageant est déterminé. La C_E permet de déterminer la salinité d'un sol. Elle s'effectue à partir de l'extrait du sol dilué au 1/5 dans l'eau distillée en homogénéisant 10g de sol/ 50 ml H₂O. Après agitation (30mn) et décantation, la C_E de l'extrait est mesurée à l'aide d'un salinomètre (Hanna H1 9032). Les résultats sont exprimés en mS/cm.

III-2 Détermination de la matière organique

La « perte au feu » permet de mesurer directement la matière organique dans le sol. Les échantillons sont placés pendant une nuit (16h) dans un four à moufle à 375°C. La différence de poids après calcination donne le taux de matière organique.

III-3 Détermination du carbone organique

Cette méthode permet le dosage direct du carbone organique par colorimétrie après oxydation de la matière organique par le bichromate de potassium en excès en milieu sulfurique et à 135°C. En effet, la quantité de chrome III⁺ formée est proportionnelle à la teneur en carbone organique présente dans le sol.

III- 4 Dosage du calcaire total

Cette technique est basée sur la réaction caractérisée du carbonate de calcium anhydre (CaCO₃) avec du HCl (6N). Le dosage du calcaire total est réalisé à l'aide du Calcimètre de Bernard (Baize , 2000).

IV- Résultats et discussion

IV-1 Analyse du sol

Les résultats des valeurs de pH et de la C_E sont résumés dans le tableau 5. Les trois sols sont considérés modérément alcalin à alcalin (pH variant de 7.9 à 9), tandis que la CE est élevée pour les sols des régions arides ($C_E > 3\text{mS/cm}$) et faible pour le sol fertile ($C_E = 1.3\text{mS/cm}$).

Tab.5 : Détermination des paramètres physico-chimiques des sols

Echantillon	pH	C_E (mS/cm)	CaCO ₃ (%)	Carbone (%)	Mat org (%)
Sol 1	7.99	1.3	8.00	1.95	3.35
Sol 2	9.00	3.57	22.00	0.39	0.68
Sol 3	8.00	3.01	28.00	0.5	0.86

Les sols 2 et 3 sont fortement calcaires par contre le sol 1 est peu calcaire. De plus, les taux de matière organique ou de carbone total témoignent de la nature et de la localisation des sols. Il est clair que les sols 2 et 3 situés en régions arides sont pauvres en matière organiques.

La variation des valeurs de pH est la conséquence de la nature géomorphologique des sols et des conditions climatiques. Les valeurs élevées du pH sont fréquemment corrélatives de difficulté d'assimilabilité par les plantes de certains éléments qui leurs sont indispensables (phosphore, zinc, manganèse, cuivre et fer) (Gros, 1979). La valeur du pH détermine les comportements physiques (stabilité de la structure...), chimiques (fonctionnement de la C_E , assimilabilité du phosphore, biodisponibilité des oligo-éléments et micro-éléments...) et biologiques (humification et minéralisation des matières organiques) du sol. Le meilleur compromis est obtenu, suivant les cultures, pour des sols neutres, peu acides ou peu basiques. Le pH permet également d'estimer la quantité d'ions H^+ présents dans le sol et le taux de saturation. De plus, la texture d'un sol a une incidence directe sur sa teneur en nutriments, son humidité et sa capacité de drainage. Les sols argileux sont plutôt fertiles, mais sont souvent mouillés et mal drainés. Les sols sableux se drainent facilement mais ils ont tendance à être secs et infertiles. Le sol 1 représente une région riche en matière organique peu calcaire par conséquent le pH est neutre à légèrement alcalin.

La présence de calcaire confère au sol des caractéristiques spécifiques en terme de comportement physique et chimique et influe sur son activité biologique. Son absence totale a pour conséquence une acidification progressive, plus ou moins rapide suivant le contexte pédoclimatique, qu'il est nécessaire de compenser par des apports réguliers d'amendements basiques. Au-delà de 5% de calcaire total, les réserves naturelles de calcium et leur libération progressive par dissolution sous l'effet des précipitations et de l'activité chimique et biologique du sol rend inutile le retour au chaulage sur le très long terme. Les 2 autres sols étudiés sont considérés comme alcalin. Les accumulations calcaires et l'aridité du climat font augmenter le pH. Dans beaucoup de cas, les carences en oligo-éléments sont dues à un pH du sol trop faible (sol acide) ou plus fréquemment un pH trop élevé (sol alcalin). Ce dernier entraîne la formation d'hydroxydes insolubles (Rogers *et al.*, 2005).

La mesure de la conductivité électrique reflète la minéralisation des sols. Elle est rigoureusement proportionnelle à la salinité. Les sols dont le C_E est supérieure à 4mS/cm sont considérés comme salins. A la base de ces normes, le sol 1 est non salin (1.3mS/cm). Par contre, les sols des régions arides, dont la valeur de la C_E permet de conclure qu'ils sont salins (Rogers *et al.*, 2005).

A- Isolement et caractérisation des PGPR

I- Introduction

Les PGPR exercent sur les plantes divers effets bénéfiques. Elles influencent la croissance des plantes par divers mécanismes directs ou indirects. Elles présentent, généralement, plus de deux ou trois activités agissant d'une manière synergique (Joseph et *al.*, 2007; Yasmin et *al.*, 2007). De nombreuses bactéries incluant des espèces de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus* et *Serratia* ont une capacité d'améliorer la croissance de la plante (Kloepper et Beauchamp, 1992; et Glick, 1995). Toutefois, la sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale. Par conséquent, cette partie a pour objectif la perspective d'une sélection des isolats présentant le plus fort potentiel PGP et leur identification par approche moléculaire.

II- Matériel et méthodes

II- 1- Isolement des bactéries

L'isolement des bactéries rhizosphériques se fait par prélèvement de 1g de sol adhérent fortement aux racines après avoir secouer les racines des plantes pour éliminer l'excès de sol. Chaque échantillon extrait est additionné à 10ml d'eau distillée stérile et agité pendant 30mn. Il servira ensuite à ensemencer deux milieux différents permettant d'isoler deux flores différentes à savoir :

- La flore à Gram+ sporulée : *Bacillus*

Pour la sélection du genre *Bacillus* uniquement, un prétraitement thermique (10mn à 80°C) est réalisé, afin de sélectionner les spores bactériennes et d'éliminer toutes les formes végétatives (Vinter, 1987). L'isolement des bactéries est effectué sur gélose nutritive (GN) à 30°/48h. Les différentes colonies sont repiquées plusieurs fois pour l'obtention de cultures pures. Les souches de *Bacillus* sont vérifiées par la coloration de Gram et par la formation de l'endospore. Un total de 40 souches est recueilli et réparti comme suit : 20 souches du sol 1, 11 souches du sol 2 et 09 souches du sol 3.

- La flore à Gram- fixatrice d'azote

L'isolement des bactéries fixatrices d'azote est réalisé sur milieu exempt d'azote : le milieu au sel de Winogradsky (WS) (Holt *et al.*, 1994) (Annexe1), incubé à 30°C /48h. Les colonies caractéristiques sont repiquées pour l'obtention de cultures pures. Les 22 souches sélectionnées sont vérifiées par la coloration de Gram et réparties comme suit : 9 souches du sol 1, 9 du sol 2 et 4 du sol 3.

II- 2 Mesure des activités PGPR

Un screening des activités PGP de l'ensemble des souches dans le but de sélectionner les souches les plus performantes est effectué :

II-2-1 Fixation d'azote

La fixation d'azote moléculaire est testée sur milieu solide exempt d'azote. Le milieu WS au sel est ensemencé par stries à partir des cultures bactériennes et incubé à 30°C/48h. Toute croissance sur ce milieu traduit la capacité des bactéries à fixer l'azote.

II-2-2 Production de NH₃

La production de NH₃ est testée sur eau peptonée. Elle est inoculée avec 100 µl de la culture bactérienne (Cappuccino et Sherman, 1992) incubée à 30°C/48h. L'addition de 0.5 ml du réactif de Nessler donnant une couleur jaune à marron indique la production de NH₃.

II-2-3 Production d'HCN

La capacité des souches à produire de l'acide cyanhydrique est effectuée selon la méthode de Lorck (1948) sur milieu HCN solide (Annexe 2) ensemencé par une anse de la culture. Du papier Whatman de 90 mm de diamètre imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) est déposé à l'intérieur du couvercle de la boîte. Celle-ci est scellée avec du papier parafilm et incubée à 30°C/4 jours. Le développement d'une couleur orange à rouge indique la production d'HCN.

II-2-4 Solubilisation des phosphates

La méthode décrite par Gaur (1990) permet d'évaluer la capacité de solubilisation des phosphates sur milieu Pikovskaya (PVK) (Annexe 3) contenant du Ca₃(PO₄)₂ comme source de phosphate (Pikovskaya, 1948)

- ***Solubilisation des phosphates sur milieu solide***

Un volume de 2µl de chaque culture bactérienne de 24h est déposé à la surface du milieu PVK puis incubé à 30°C/7jours. Le diamètre du halo autour de la colonie est ensuite mesuré.

- ***Solubilisation des phosphates en milieu liquide***

Le milieu PVK liquide estensemencé par 100µl de chaque culture bactérienne de 24h. L'incubation est effectuée à 30°C/4jours. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm/15 min. La quantité de phosphate soluble est mesurée par la méthode colorimétrique de Olsen (Olsen et Sommers, 1982). Pour ceci à 1ml du surnageant sont ajoutés 10ml d'acide chloromolybdique (12mM) et 1ml de chlorure d'étain SnCl₂ (5 mM). Ce volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. La présence d'une couleur bleue indique la production de phosphates solubles. La concentration du phosphate est déterminée par la mesure de la DO à 610nm. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution de KH₂PO₄ (Sigma).

II-2-5 Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production de l'acide indole acétique est testée sur milieu Dworkin et Foster (1958) (DF) (Annexe 4) auquel est ajouté du tryptophane (1g /l) pour la production de l'AIA (Penrose et Glick, 2003). Le milieu estensemencé par 100 µl des cultures bactériennes, par incubation à 30°C/ 3jours. Le dosage colorimétrique est réalisé selon la méthode de Loper et Scroth (1986). Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm/ 20min. 1ml du surnageant est mélangé à 2ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorhydrique 35% et 1ml de FeCl₃ 0.5 M) et quelques gouttes d'acide ortho-phosphorique. La DO est mesurée à 530nm. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle 0 à 10⁻⁵ M d'AIA (Sigma).

II-2-6 Production de sidérophores

La production de sidérophores est testée en milieu Chrome Azurol S (CAS) (Annexe 5) sous ses formes solide et liquide (Shwyn et Neilands, 1987).

- ***Production de sidérophores sur milieu liquide***

Le milieu King B liquide, étant donné sa composition exempte de fer, est préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores. Le milieu estensemencé par 100 µl des cultures et incubé à 30°C / 3jours. Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm /20min puis 500 µl du surnageant sont mélangés à 500 µl de la solution CAS incubé 30 min à l'obscurité. La

couleur virera du bleu à l'orange selon le taux de production des sidérophores. La DO est mesurée par spectrophotométrie à 630nm .

Le pourcentage des sidérophores est calculé selon la formule suivante (Gokarn, 2010) :

$$\text{St-Se/St} \times 100$$

St : DO de la solution CAS de couleur bleue intense (témoin).

Se :DO de la solution de l'échantillon de couleur moins bleue à orange selon l'intensité de production.

- ***Production de sidérophores sur milieu solide***

La production des sidérophores sur milieu solide est effectuée sur milieu King B solide ensemencé par un spot de 2 µl de la culture bactérienne et incubé à 30°C/48h. Après croissance, 15 ml de la gélose au CAS à 45°C (solution CAS + 0.9% agarose) sont coulés sur la culture bactérienne. Après contact de quelques heures, un changement de couleur du bleu à l'orange apparait autour de la colonie productrice des sidérophores. Le changement de couleur est dû au transfert des ions ferriques du CAS vers les sidérophores. Le calcul du rapport (diamètre du halo/ le diamètre de la colonie bactérienne) permet de comparer les différences de production entre les souches bactériennes.

II-2-7 Activité antifongique

La détermination de l'antagonisme des bactéries est effectuée *in vitro* sur milieu Potato-Dextrose- Agar (PDA). Les souches bactériennes sont testées pour leur capacité à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes : *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* fsp. *Albedinis*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerae* et *Fusarium solani*. Elles proviennent d'une collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie-Université Ferhat Abbas-Sétif1). Un disque de gélose de 6mm de diamètre de la culture de chaque champignon est déposé sur la gélose PDA en boîte de Pétri. 2µl de chaque culture bactérienne de 10⁸UFC/ml sont ensemencés en spot à 3 cm de la souche fongique. Un témoin négatif de la souche fongique est testé en absence de bactéries. Les boîtes sont incubées à 25°C/4 jours. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule décrite par Kumar et *al.* (2002).

$$1-(a/b) \times 100\%$$

a: distance entre le champignon et la souche bactérienne,

b: distance entre le champignon et le bord de la boîte témoin.

II-2-8 Production d'ACC-désaminase

L'existence d'une ACC désaminase est déterminée par la capacité des souches bactériennes à utiliser l'ACC comme seule source d'azote. Selon la méthode décrite par Jacobson et *al.* (1994), les souches bactériennes cultivées en présence de deux sources d'azote, l'ACC et le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et une source minérale le sulfate de magnésium $(\text{MgSO}_4)7\text{H}_2\text{O}$ sont comparées selon leur taux de croissance.

Le milieu minimum au sel de DF (Dworkin et Foster, 1958) utilisé est réparti dans une microplaque à 96 puits à raison de 122 μl par puits. 15 μl d'une solution de $\text{MgSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) sont ajoutés dans les lignes 3, 6, 9, et 12 de la microplaque, 15 μl de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (0.1 M) dans les lignes 2, 5, 8, et 11 et 15 μl de la solution d'ACC (3.0 mM) dans les lignes 1, 4, 7, et 10. Les cultures bactériennes sont incubées dans le TSB au $\frac{1}{2}$ (bouillon trypticase soja) 24h/30°C. Ces cultures sont diluées au 1/10 dans du MgSO_4 et 22 μl de chaque dilution servent à inoculer un puits de chaque trois lignes successives. Le témoin négatif est inoculé par 22 μl de MgSO_4 . La densité optique à 600nm est mesurée après 0, 24, 48, 72, et 96 heures. Les valeurs des DO sont comparées. L'activité ACC désaminase est positive pour les souches ayant une DO supérieure à celle de la solution de $\text{MgSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$ se traduisant par une utilisation de l'ACC comme source de carbone.

II-2-9 Analyse statistique

L'analyse statistique est effectuée sur les effets du sol et de la souche bactérienne sur les résultats quantitatifs de la production de l'AIA et des sidérophores, sur la solubilisation du phosphate et sur l'activité antifongique. Le logiciel Assistat 7,6 Béta développé par Pr. Francisco de Assis (Department of Agricultura Engineering of the Center of Technology and Natural Resources of the Federal University of Campina Grande City, Brazil) a été utilisé pour augmenter la précision des procédures de l'ANOVA. Le test de Tukey est utilisé pour comparer les moyennes pour ces expériences chaque fois que le F calculé était significatif.

L'analyse en Composantes Principales (ACP) est une analyse multivariée permettant d'établir une relation entre plusieurs variables et définir le comportement d'individus vis-à-vis de ces variables. Cette méthode est réalisée dans le but de mettre en évidence les souches les plus actives et de procéder au choix des souches les plus performantes en se basant sur la mesure de leurs capacités PGP. L'ACP est réalisée par le logiciel Past (Paleontological statistic) version 2.07 f édité par Oyvind Hammer (Natural History Museum- University of Oslo- Suède). Les composantes retenues sont la production d'acide indole acétique et des sidérophores, la solubilisation des phosphates et l'activité antifongique.

II-3 Caractérisation des souches bactériennes

Une souche de chaque groupe ayant les meilleures activités PGP est sélectionnée selon les scores des ACP. Les deux souches sont identifiées selon l'aspect macroscopique (aspect de la colonie sur milieu solide, forme, pigmentation et consistance), la coloration de Gram, la mobilité, les tests d'oxydase, de catalase et de nitrate réductase. Ces tests sont suivis par une identification biochimique en utilisant une galerie API20E (bioMérieux) (notamment pour la souche à Gram-) (voir partie B). L'identification moléculaire par le séquençage du gène de l'ARNr 16S est réalisée pour déterminer avec fiabilité l'appartenance à une espèce.

II-3-1 Identification moléculaire

L'identification moléculaire des souches a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie et Molécules Bioactives, Université El-Manar Tunis-Tunisie. Elle se base sur l'amplification et le séquençage des gènes de l'ARNr 16S.

La détermination génétique de l'espèce se base sur l'étude des gènes des ARN ribosomiques notamment le gène de l'ARNr 16S. Cette séquence d'ADN très conservée au sein des espèces (plus de 99%) donne un degré de similitude entre deux organismes indiquant ainsi leur parenté relative. La procédure consiste à amplifier le gène, en présence d'une amorce reconnaissant la région sur l'ADN, qui par la suite est séquencée. Les séquences sont comparées avec des bases de données de séquences de nucléotides déjà connues existant dans des banques internationales de données telles que EMBL (European Molecular Biology Laboratory) et GenBank (NCBI :National Center Biology Information -USA).

II-3-1-1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN bactérien est une étape primordiale avant toute manipulation génétique. L'ADN bactérien chromosomique est extrait par chauffage à 100°C dans un tampon Tris-EDTA (TE) (1mM de Tris-HCl et EDTA 10mM pH 7,4). Quelques colonies d'une culture pure sont introduites dans un tube Eppendorf stérile contenant 180 µl de tampon TE stérile. La suspension est agitée puis chauffée à 100°C dans un bain sec pendant 10mn, elle est ensuite placée dans un bain de glace pendant 10mn ; le choc thermique permet la lyse cellulaire. La suspension est centrifugée à 12000 rpm à 4°C/10mn. Le surnageant est récupéré stérilement dans un autre tube Eppendorf. Les surnageants sont gardés à 4°C pendant une nuit pour permettre l'élimination de l'ARN par lyse.

II-3-1-2 Dosage de l'ADN

Un dosage est nécessaire pour déterminer la qualité, la quantité et la pureté de l'ADN dans les échantillons. Il est effectué à l'aide d'un Spectrophotomètre UV (Nanodrop Thermoscientifique Applied Biosystem). 1µl de chaque surnageant est déposé dans une cellule de l'appareil et la lecture de la DO se fait par un balayage de 230 à 280nm. Le rapport 260/280 (indiquant la contamination par les protéines) doit être compris entre 1,7 et 1,9 et le rapport 260/230 (indiquant la contamination par les autres constituants), doit être ≤ 1 . La quantité d'ADN doit être supérieure ou égale à 300 ng/µl.

II-3-1-3 Amplification par PCR

La PCR permet l'amplification spécifique d'un fragment de l'ADN cible en présence d'oligonucléotides codant cette région d'intérêt. Le principe de la PCR consiste en la répétition d'un cycle triphasique :

-dénaturation de l'ADN à amplifier, hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible et enfin, élongation des amorces par l'activité d'une ADN polymérase en présence de dNTP. La *Taq* ADN polymérase possède une activité terminal-transférase qui a pour effet l'ajout d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. La PCR est réalisée dans un thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) après addition des réactifs suivants :

Préparation du mélange

- dNTP (Fermentas) 0,25µl,
- MgCl₂ tampon (Fermentas) 4µl,
- Taq-polymérase (Fermentas) 0,22µl,
- ADN de l'échantillon 1µl,
- Amorces spécifiques du gène à amplifier : 0,3µl (de chaque),
- H₂O (eau ultra pure stérile) qsp 25µl (volume final par échantillon).

Les amorces varient selon le gène d'intérêt à amplifier. Dans ce cas l'amorce spécifique est 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 1496R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') (InvitroGen) .

L'amplification de l'ADN se déroule comme suit : après une première phase de dénaturation (5mn à 94°C), 35 cycles comprenant chacun trois étapes de variation de température :

- dénaturation de 45 s à 94°C ,
- hybridation de 1mn à 55°C,
- élongation de 2mn à 72°C.

A la fin du dernier cycle, une incubation de 7 mn à 72°C permet d'achever les synthèses de l'ADN en cours. Un refroidissement de 10 mn est réalisé à 14°C (Young et *al.*, 1991). La réaction PCR nécessite un témoin positif (ADN d'une souche de collection de référence amplifiée selon le même protocole), un témoin négatif (réactifs sans ADN).

II-3-1-4 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose à 1.5% (p/v) contenant quelques gouttes d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 mg/l). La migration se fait pendant 20mn à 100V. Le gel est visualisé sous lumière UV et photographié avec un système de capture digital (Gel Doc, Bio-Rad).

II-3- 1-5 Séquençage

Le produit de l'amplification du gène de l'ARNr 16S est séquencé. Une purification des fragments d'ADN amplifiés est effectuée au préalable par un traitement enzymatique (exonuclease I et Shrimp phosphatase alcaline SAP) dégradant les amorces et les dNTP restants. Par la suite, les échantillons sont réamplifiés et marqués en utilisant un kit de marquage «Big Dye Terminator Cycle Sequencing » (Applied Biosystems). Le milieu réactionnel est composé : de Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués par un composé fluorescent « dye », d'une amorce reverse fraîchement préparée à une concentration de 25µM, d'un tampon de dilution (200mM Tris pH9, 5mM MgCl₂) et de l'eau ultrapure.

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

II-3-1-6 Analyse phylogénétique :

Les séquences partielles de l'ARNr 16S des souches obtenues sont comparées avec les séquences des ARNr 16S disponibles par la recherche des BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), dans le National Center of Biotechnology Information- USA (NCBI) data-base. L'alignement multiple des séquences est réalisé en utilisant le ClustalW

version 1.8. Le dendrogramme phylogénétique est analysé par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel Mega 5 (5.05) (Tamura *et al.*, 2011).

III- Résultats

III-1 Isolement et caractérisation des souches isolées

III-1-1 Caractérisation morphologique

Les souches de *Bacillus* isolées sont au nombre de 40 et sont désignées comme suit :

- 20 souches du sol 1 (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B10, B14, B15, B16, B17, B18, B19, B21, B23, B25, B27 et B28),
- 11 souches du sol 2 (Ba1, Ba5, Ba6, Ba7, Ba8, Ba9, Ba11, Ba12, Ba13, Ba14 et Ba15)
- 9 souches du sol 3 (D1, D4, D5, D6, D7, D10, D11, D12 et D13).

L'examen micromorphologique révèle des souches de forme bacillaire et à Gram positif. La taille varie entre 2 et 10 μm de long et 0.5 à 2 μm de large. La plupart ont des bords parallèles et des extrémités rondes ou tronquées. La majorité des souches possèdent une spore ovoidale, subterminale, déformante ou non, quelques unes, une spore centrale déformante. Les colonies sont le plus souvent de grandes tailles muqueuses ou rugueuses (Tab. 6, Fig. 8A et 9C).

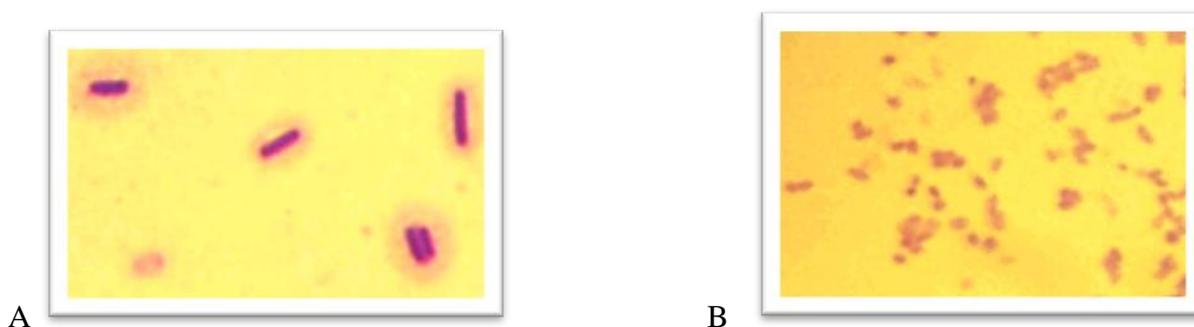


Fig. 8: Bacille à Gram+ sporulé (A :D13) Bacille à Gram- (B : B5)



Fig. 9: Colonie muqueuse de BG+ (C :D13) colonie pigmentée de BG- (D : B5)

Tab. 6: Examen microscopique des souches de *Bacillus*.

Souche	Forme	Gram	Taille(µm)		Position de la spore
			L	l	
D1	bacille	+	4-5	2	Subterminale non déformante
D4	bacille	+	6	1,5	Subterminale non déformante
D5	bacille	+	4-5	1.2	Subterminale non déformante
D6	bacille	+	5	1.2	Centrale non déformante
D7	bacille	+	3-4	0.9	Subterminale déformante
D10	bacille	+	3-5	1	Subterminale non déformante
D11	bacille	+	3	0.7	Subterminale déformante
D12	bacille	+	3	1	Centrale déformante
D13	bacille	+	4-7	1.7	Subterminal non déformante
B1	bacille	+	2-4	0.7	Centrale déformante
B2	bacille	+	3-4	0.6	Subterminale déformante
B3	bacille	+	3-4	1	Subterminale non déformante
B4	bacille	+	4-7	1.5	Subterminale non déformante
B5	bacille	+	3-5	1	Subterminale non déformante
B6	bacille	+	4-6	0.8	Subterminale déformante
B7	bacille	+	3-5	0.9	Subterminale non déformante
B8	bacille	+	2-4	0.7	Subterminale déformante
B10	bacille	+	2.5	0.6	Centrale déformante
B14	bacille	+	2-3	0.5	Subterminale déformante
B15	bacille	+	3-6	1	Subterminale déformante
B16	bacille	+	3-4	0.7	Subterminale déformante
B17	bacille	+	4-7	2	Centrale déformante
B18	bacille	+	2-5	1.5	Subterminale déformante
B19	bacille	+	2.5	0.6	Centrale non déformante
B21	bacille	+	2.5	1.5	Centrale déformante
B23	bacille	+	2.5	1	Centrale déformante
B25	bacille	+	2.5	1	Centrale déformante
B27	bacille	+	2.5	1	Centrale déformante
B28	bacille	+	2.5	1.5	Subterminale non déformante
Ba1	bacille	+	3-5	0.8	Subterminale déformante
Ba5	bacille	+	2	0.5	Centrale déformante
Ba6	bacille	+	4-6	2	Subterminale non déformante
Ba7	bacille	+	4-6	1	Subterminale déformante
Ba8	bacille	+	3-4	0.7	Subterminale déformante
Ba9	bacille	+	7-10	2	Subterminale déformante
Ba11	bacille	+	2.5	0.6	Centrale déformante
Ba12	bacille	+	3-5	1	Subterminale déformante
Ba13	bacille	+	3-4	0.7	Subterminale déformante
Ba14	bacille	+	3-4	0.9	Subterminale déformante
Ba15	bacille	+	3-5	0.8	Subterminale déformante

Longueur (L), largeur (l) du bacille.

Les bactéries à Gram- isolées sont au nombre de 22 désignées comme suit :

- 9 souches du sol 1 (O1, O2, O3, O4, O6, O8, O9, O10 et O11),
- 9 souches du sol 2 (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B9, B10 et B12)
- 4 souches du sol 3 (D1, D2, D3 et D5).

Les souches sont sous forme de bacilles et à Gram négatif. Leurs tailles varient entre 2 et 7 μm de long entre 0.5 à 2 μm de large (Tab. 7). Les colonies plus ou moins grandes ont un aspect muqueux et pigmenté (Fig. 8B et 9D).

Tab. 7 : Examen microscopique des bactéries fixatrices d'azote

Souche	Forme	Gram	Taille(μm)	
			L	l
D1	bacille	-	4-5	2
D2	bacille	-	7	1,5
D3	bacille	-	4-5	1.2
D5	bacille	-	7	1.5
B1	bacille	-	3-4	0.9
B2	bacille	-	3	0.7
B3	bacille	-	3	1
B4	bacille	-	4-7	1.7
B5	bacille	-	3-5	1
B6	bacille	-	2-4	0.7
B9	bacille	-	3-4	0.6
O	bacille	-	4-7	1.5
B11	bacille	-	3-5	1
O1	bacille	-	4-6	0.8
O2	bacille	-	2-4	0.7
O3	bacille	-	2.5	0.6
O4	bacille	-	2-3	0.5
O6	bacille	-	3-6	1
O8	bacille	-	3-4	0.7
O9	bacille	-	4-7	2
O10	bacille	-	2-5	1.5
O11	bacille	-	2.5	0.6

Longueur (L), largeur (l) du bacille.

III-2 Activités PGP

Les réponses des bactéries isolées aux différents tests inhérents à la promotion de la croissance végétale permettent la mise en évidence des potentialités naturelles de chaque souche. S'agissant dans cette partie de déterminer les propriétés ayant des effets bénéfiques

directs sur les plantes par l'apport d'éléments nutritifs ou indirects par la protection contre les phytopathogènes.

Les activités PGP directs des *Bacillus* (Fig. 10) sont la production de NH₃ existant chez la majorité des souches (85%) à des taux plus au moins intenses selon le virage de la couleur du jaune à l'orange après addition du réactif de Nessler. La capacité de solubiliser les phosphates sur milieu PVK liquide à un taux supérieur ou égal à 10µg/ml concerne 50% des souches et 17.5% produisent un taux similaire d'AIA sur milieu WS additionné de tryptophane. La fixation d'azote est évaluée par la croissance des bactéries sur milieu exempt d'azote. Cette capacité est trouvée chez la moitié des souches.

Les activités PGP indirectes sont représentées principalement par les résultats de l'inhibition de la croissance des souches fongiques. Un taux de 75% des *Bacillus* ont la performance d'inhiber trois souches fongiques et plus. Par contre, 55% ont la capacité de produire un taux supérieur à 10% de sidérophores sur milieu au CAS liquide. Les résultats affichent un taux relativement faible (17.5%) de souches productrices de composés volatiles; l'HCN. Deux souches seulement (Ba5 et B10) possèdent une ACC désaminase (Annexe 6).

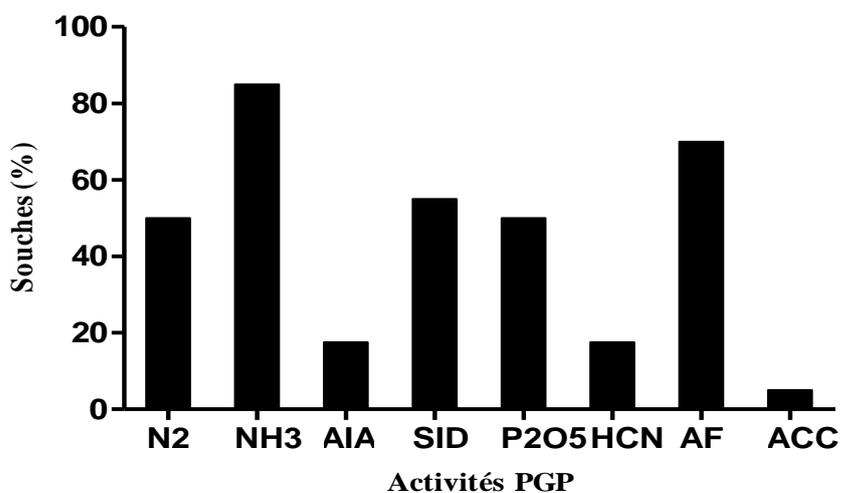


Fig. 10 : Fréquence des activités PGP des *Bacillus*

Concernant les bactéries à Gram-, fixatrices d'azote isolées sur milieu WS exempt d'azote, un nombre important (86,36%) de souches sont productrices de NH₃. Ces bactéries sont aussi caractérisées par une capacité appréciable de production de phytohormones : 77% des souches synthétisent des quantités d'AIA supérieures ou égales à 10µg/ml. Un taux supérieur à 10% de sidérophores est libéré par 68% des souches. Environ la moitié (54,54%) solubilisent les phosphates à un taux de 10µg/ml et plus. L'activité antifongique envers au moins trois

champignons affiche un taux de 54%. Par contre, 2 souches (B12 et O4) produisent du HCN et quatre (O4, O10, B5 et B3) possèdent une ACC désaminase (Fig.11) (Annexe7).

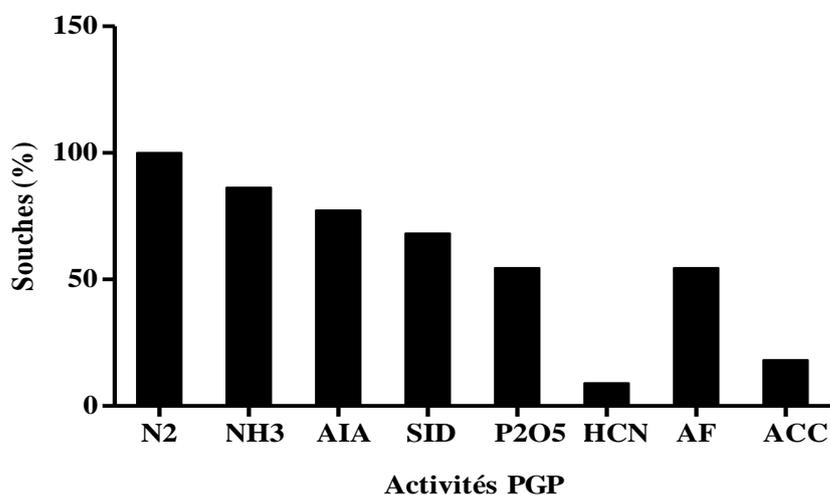


Fig. 11 : Fréquence des activités PGP des bactéries à Gram-

III-2-1 Production d'acide indole acétique (AIA)

Selon les données obtenues sur la capacité de production de l'AIA testée sur milieu WS additionné de tryptophane (1g/l) les souches de *Bacillus* synthétisent des taux très variés. Ces variations s'étendent de 1,58 µg/ml (Ba15) à 25,41µg/ml (Ba14). Les quatre souches ayant le maximum sont dans l'ordre la Ba14 (25,41 µg/ml), D13 (21.75µg/ml), Ba6 (15.08 µg/ml) et D10 (12.55µg/ml) (Fig. 12). L'analyse de la variance révèle un effet significatif à $P < 0.01$ (Tab.8) de la production de l'AIA.

Tab. 8 : Analyse de la variance de la production de l'AIA par les souches de *Bacillus*

Source de variation	Degré de liberté	CM	F
Souches	39	44.19116	547.6489 **
Erreur	40	0.08069	

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

CM : Carrés moyens

F : test de Fischer

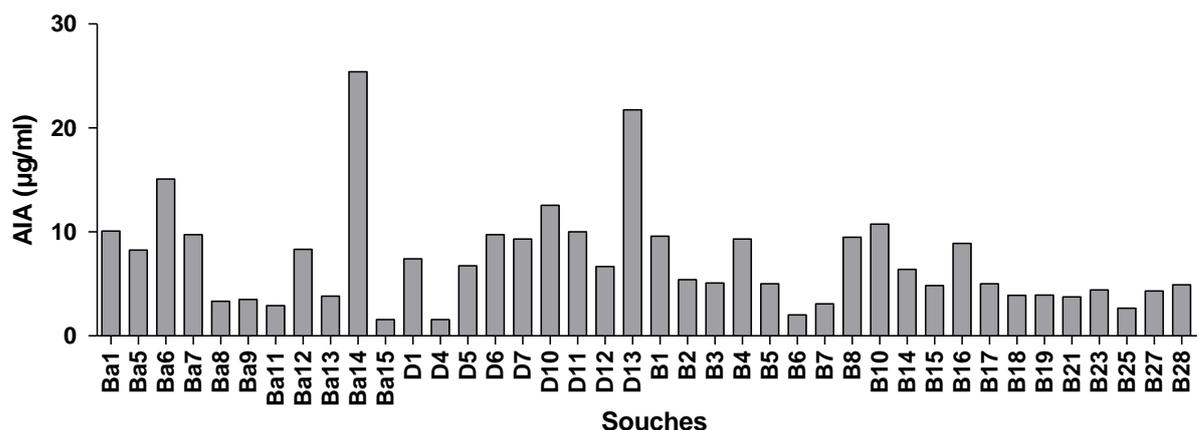


Fig. 12 : Production d'AIA par les souches de *Bacillus* sur milieu WS

La capacité de production de l'AIA des bactéries à Gram- testée sur milieu WS diffère selon la souche ($P < 0.01$) (Tab. 9). Le maximum est observé chez la souche B6 (203.33 µg/ml). Les souches du sol 2 sont les plus performantes (Fig. 13).

Tab. 9 : Analyse de la variance de la production de l'AIA par les souches à Gram-

Source de variation	Degré de liberté	CM	F
Souches	21	6893.80752	8355.4168 **
Erreur	22	0.82507	

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

CM : Carrés moyens

F : test de Fischer

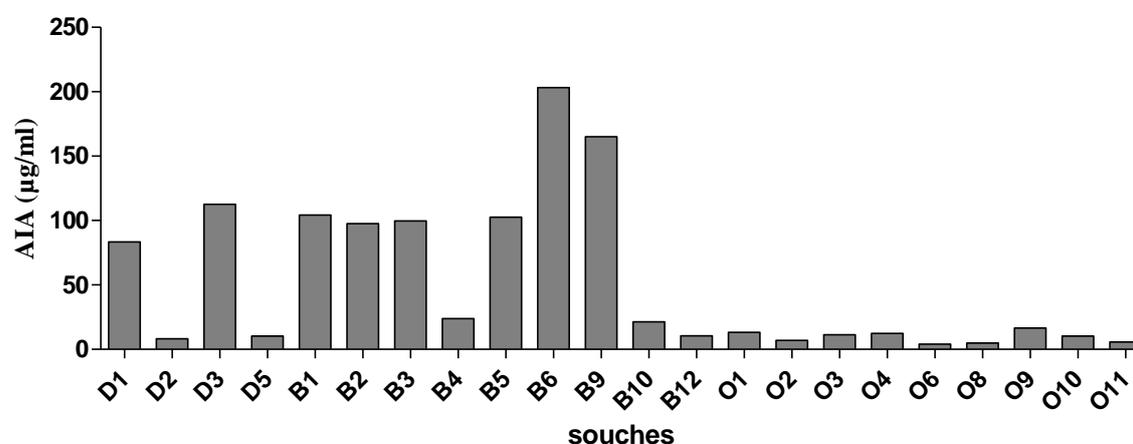


Fig. 13 : Production d'AIA par les souches à Gram- sur milieu WS

III-2-2 Solubilisation des phosphates

La quantité de P_2O_5 produite par *Bacillus* varie de 0 à 16.65 $\mu\text{g/ml}$. Un effet très significatif ($P < 0.01$) de solubilisation des phosphates sur milieu PVK liquide existe (Tab. 10). La concentration maximale de P_2O_5 soluble est observée chez la D13 (16.65 $\mu\text{g/ml}$) la B14 (15.09 $\mu\text{g/ml}$) et la D6 (15.05 $\mu\text{g/ml}$) (Fig.14).

La solubilisation des phosphates sur milieu solide, révélée par un halo de transparence autour de la colonie après 7 jours d'incubation à 30°C, est réalisée par seulement trois souches où le diamètre de la Ba5 atteint 16mm suivi de la D6 (8mm) et de la D13 (5mm) (Annexe 6).

Tab. 10: Analyse de la variance de la solubilisation des phosphates par les souches de *Bacillus*

Source de variation	Degré de liberté	CM	F
Souches	39	71.66687	573.2833 **
Erreur	40	0.12501	

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

CM : Carrés moyens

F : test de Fischer

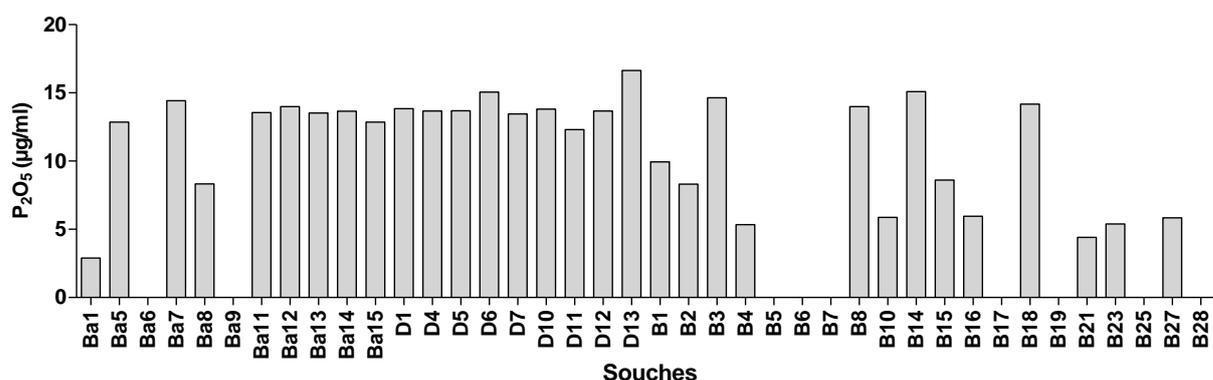


Fig. 14 : Solubilisation des phosphates sur milieu PVK par les souches de *Bacillus*

La capacité de solubilisation des phosphates par les souches bactériennes à Gram- n'est pas significative selon l'analyse de la variance (Tab. 11). La majorité d'entre elles ont des taux de productions analogues situés entre 10 et 15 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.15). Sur milieu solide les diamètres de solubilisation sont : B2 (2mm), B5 (10mm), O2 (7mm) et O8 (6mm) (Annexe7) (Fig. 16).

Tab. 11 : Analyse de la variance de la solubilisation des phosphates par les souches à Gram-.

Source de variation	Degré de liberté	CM	F
Souches	21	16.81831	0.9905 ns
Erreur	22	16.98014	

Ns : Non significative à un niveau supérieur de 5 % de probabilité ($p > 0.05$)

CM : Carrés moyens

F : test de Fischer

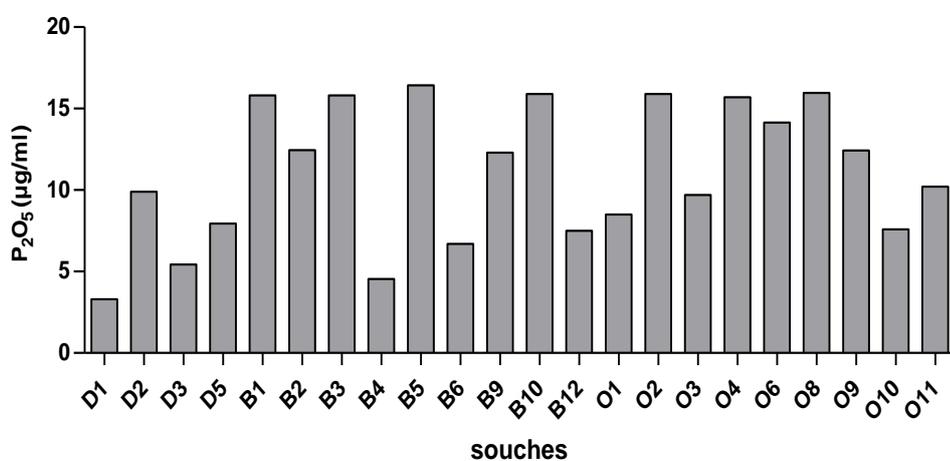


Fig. 15: Solubilisation des phosphates sur bouillon PVK par les souches à Gram-



Fig. 16 : Halo de transparence autour de la colonie

III-2-3 Production de sidérophores

L'estimation quantitative de la production des sidérophores par les souches de *Bacillus* est significativement variable ($P < 0.01$) (Tab. 12). En effet, la production varie de 1.28 à 55.6%. La souche la plus performante est la Ba5 (55,6%) suivent la B25 (53,05%), la Ba11(51,51%) et enfin la D11(43,5%) (Fig. 17). En revanche, sur milieu solide, un halo orange exprimant la production de sidérophores est remarquée chez certaines souches Ba5, Ba11, B1, B25 et D13 (Annexe 6).

Tab. 12 : Analyse de la variance de la production des sidérophores par les souches de *Bacillus*

Source de variation	Degré de liberté	CM	F
Souches	39	377.47086	14768.0304 **
Erreur	40	0.02556	

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

CM : Carrés moyens

F : test de Fischer

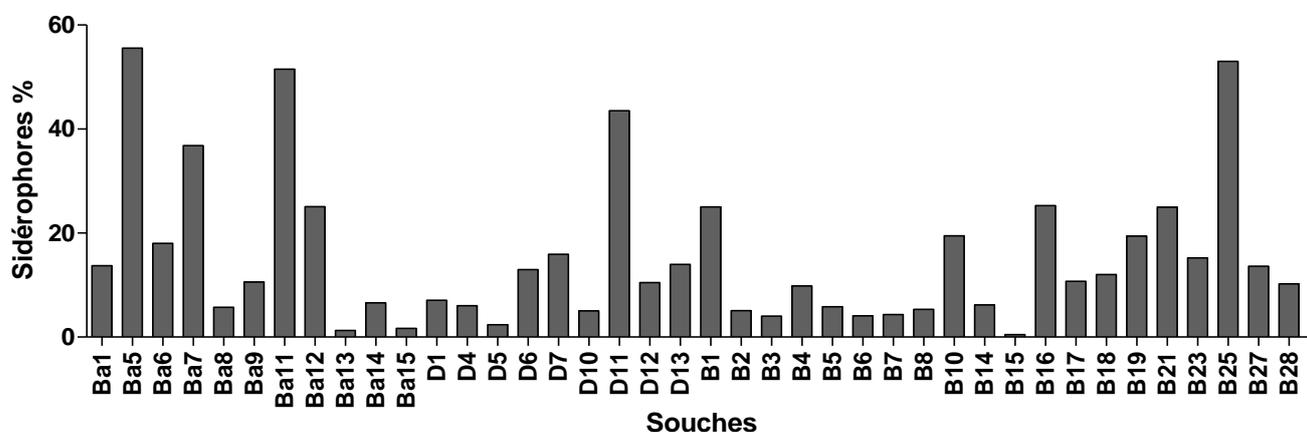


Fig. 17 : Production des sidérophores sur milieu au CAS liquide par les souches de *Bacillus*

Les souches bactériennes à Gram- produisent les sidérophores à des quantités significativement variables selon l'analyse statistique ($P < 0.01$) (Tab. 13). La production varie de 3.20 à 51.3 %. Les meilleures taux sont mentionnés pour la B3 (51,3%) , la O4 (50,36%),

la B5(46,36%) et la O2 (40,96%) (Fig. 18). Des résultats légèrement différents sont affichés sur milieu solide, un halo orange exprimant la production de sidérophores est observé autour de la O4 (38mm), la B3(33mm), la O2 (32mm) et la B5 (30mm) (Fig. 19) (Annexe 7).

Tab. 13 : Analyse de la variance de la production des sidérophores par les souches à Gram-

Source de variation	Degré de liberté	CM	F
Souches	21	387.45422	7.3792 **
Erreur	22	0.82507	

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

CM : Carrés moyens

F : test de Fischer

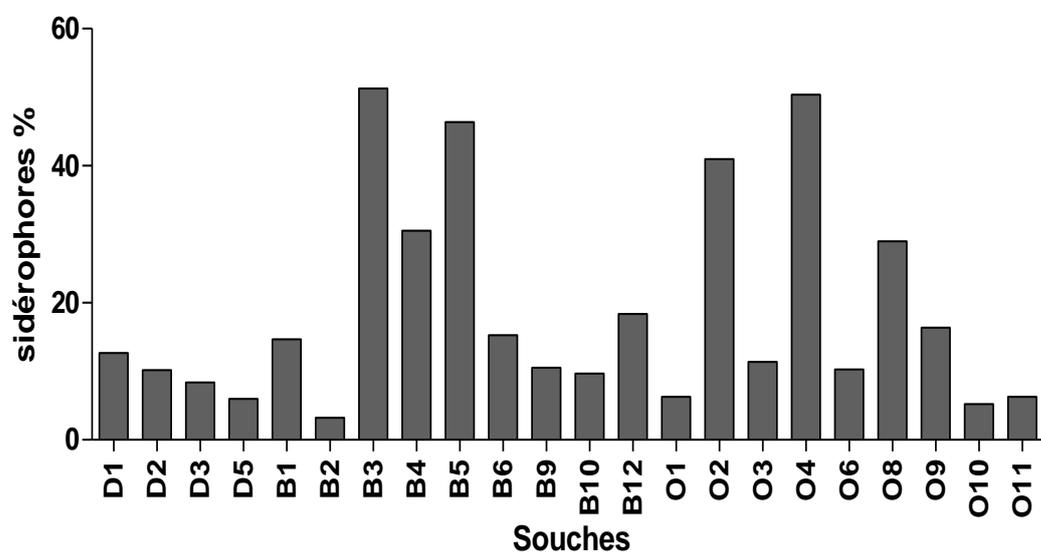


Fig. 18 : Production des sidérophores sur milieu au CAS liquide par les souches à Gram-

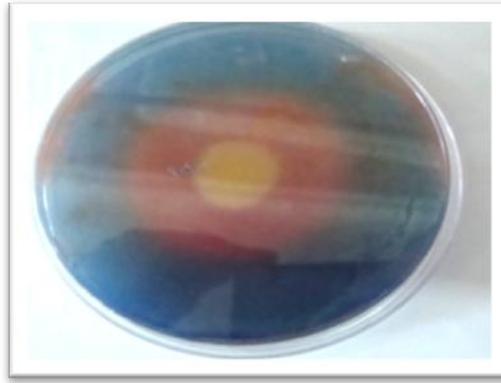


Fig. 19 : Halo orange autour de la colonie

III-2-4 Activité antifongique

L'activité antifongique des bactéries isolées testée sur milieu PDA envers six champignons connus pour leur pouvoir phytopathogène : *Aspergillus niger* (AN) , *Fusarium oxysporum* fsp. *Albedinis* (FOA), *Alternaria alternata* (ALT), *Phytophthora infestans* (PI), *Botrytis cinerea* (B) et *Fusarium solani* (FS) a fourni les résultats suivants :

Les souches de *Bacillus* sont plus actives comparées aux bactéries à Gram- (75% et 54% respectivement). Les champignons les plus sensibles aux métabolites bactériens sont *A. alternata* et *P. infestans* avec un pourcentage élevé de souches actives sur ces deux phytopathogènes , 67.5% et 62.5% pour les *Bacillus* et 59% et 68.18% pour la flore Gram- respectivement. Toutefois, des taux d'inhibition plus faibles des bactéries à Gram- sont notés envers *A. niger*, *F. oxysporum* fsp. *Albedinis* et *B. cinerea* (Fig. 20).

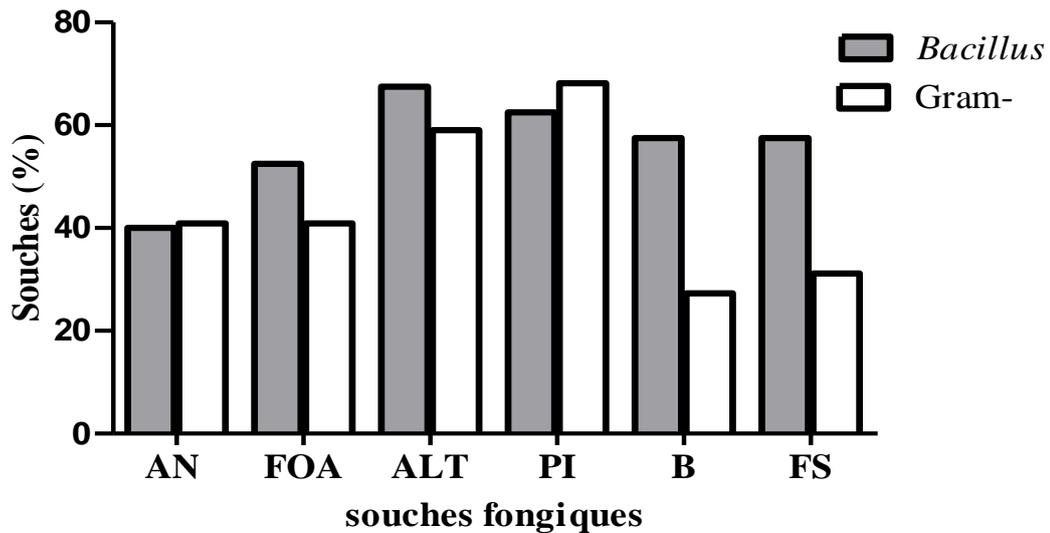


Fig. 20: Pourcentage d'inhibition des souches bactériennes envers les différentes souches fongiques

Quant à l'activité antifongique de chaque souche, la majorité des *Bacillus* ont au moins une action inhibitrice envers une souche fongique et plus. Quatre d'entre elles (Ba7, Ba11, D13 et B16) inhibent la croissance de la totalité (n=6) des champignons et 10 autres sont antagonistes envers cinq. Seules 15 souches sont efficaces contre *A. alternata*. L'antagonisme envers *P. infestans* est induit par les souches D1 et B1. *A. niger* est inhibé par un nombre de 12 souches les plus actives sont B8, B10, B21 et B23 (isolées d'un même sol). Par contre, D6, Ba8 et B4 ne manifestent aucune activité antifongique (Fig. 21, 22) (Annexe 6).



Fig. 21 : Zone d'inhibition autour des colonies de *Bacillus* actifs contre *P. infestans*(PI) et *F. solani* (FS).

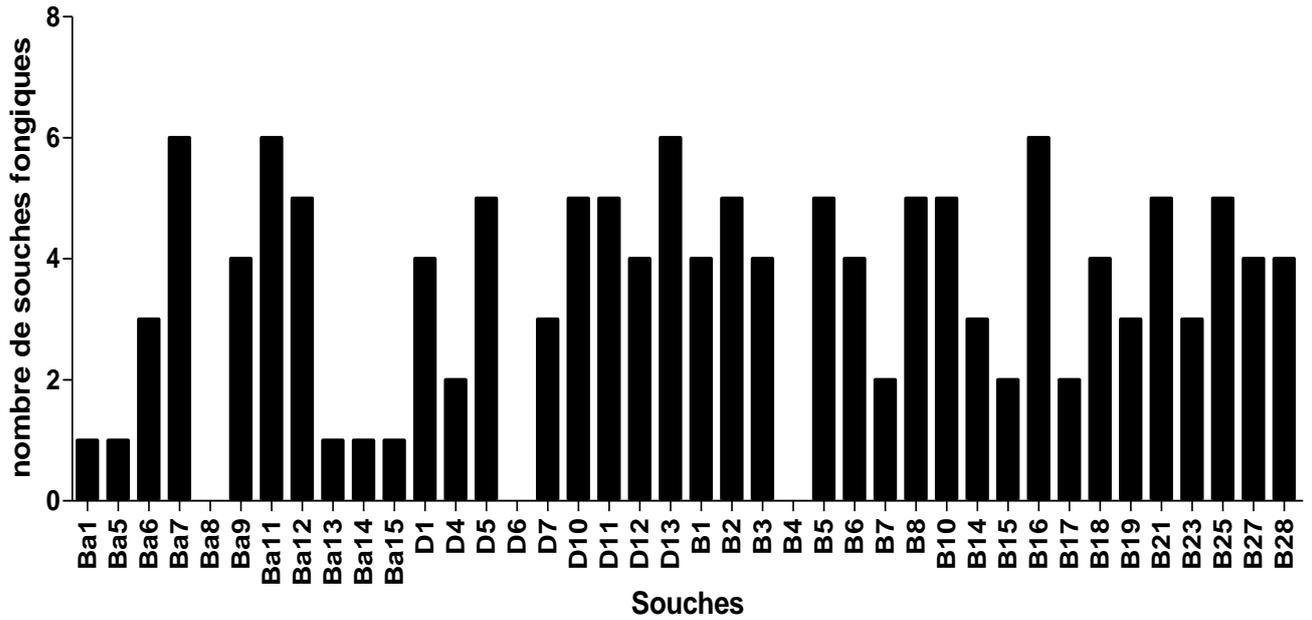


Fig. 22 : Nombre de souches fongiques sensibles aux *Bacillus*

Le nombre de souches à Gram – inhibant au moins une souche fongique est élevé. Par contre seule la moitié des souches est capable d’inhiber la croissance de trois champignons. D’autre part, la souche B5 a une activité envers l’ensemble des champignons et deux (B10 et O6) sont efficaces contre cinq phytopathogènes. Enfin, B2 et O1 semblent ne produire aucun métabolite antifongique (Fig. 23) (Annexe7).

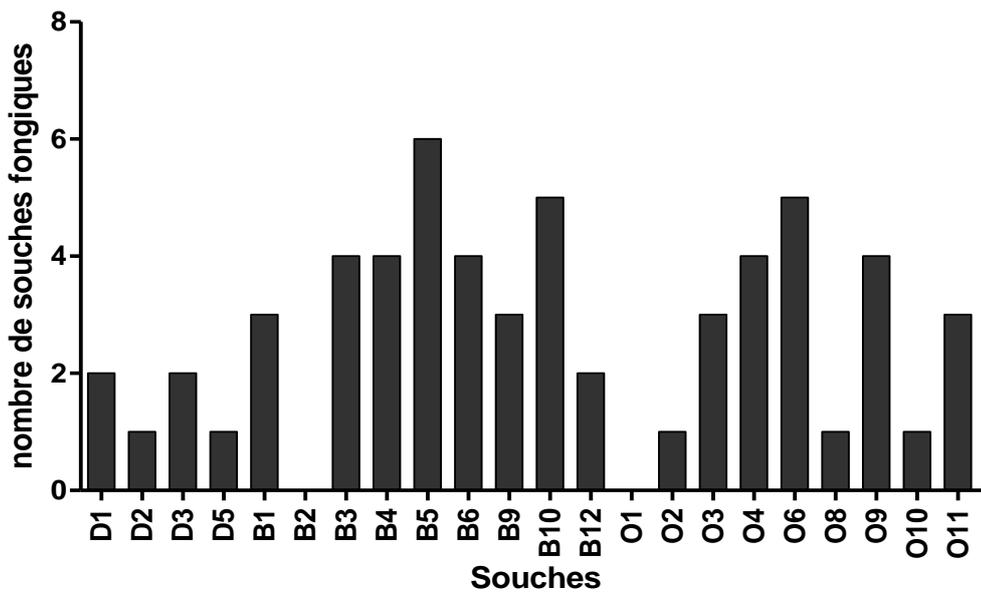


Fig. 23 : Nombre de souches fongiques sensibles aux bactéries à Gram-

III-3 Effet du sol sur les activités PGP

Compte tenu de la nature des sols de prélèvement et de la variation de leurs caractéristiques physico-chimiques, il s'est avéré nécessaire d'apprécier le comportement des souches selon leur site natif. L'analyse de la variance de l'effet du sol sur les activités PGP permet d'affirmer que le sol a un effet positif sur la solubilisation des phosphates (significatif à $p < 0.01$) (Tab. 14) pour les bactéries à Gram+ sporulées. En effet, la quantité de P_2O_5 produites par les souches isolées du sol 3 est optimale et varie entre 12.30 et 16.65 $\mu\text{g/ml}$.

Tab. 14 : Analyse de la variance de l'effet du sol sur la production de l' AIA, des sidérophores (SID), la solubilisation des phosphates (P_2O_5) et l'activité antifongique (AF) par *Bacillus*

Source de variation	DL	SID	P_2O_5	AIA	AF
Sol	2	1.9973 ns	8.4762 **	2.4382 ns	1.5775 ns
Erreur	37	181.23095	24.95331	23.06680	3.18516

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

Ns : non significatif

DL : degré de liberté

Dans le cas de la flore à Gram- , le sol a un effet sur la production de l'AIA. L'analyse de la variance est significative à $p < 0.01$ (Tab 15), les souches produisent un taux d'auxines sensiblement élevé au niveau du sol 2.

Tab. 15 : Analyse de la variance de l'effet du sol sur la production de l' AIA, des sidérophores (SID), la solubilisation des phosphates (P_2O_5) et l'activité antifongique (AF) par les Gram-

Source de variation	DL	SID	P_2O_5	AIA	AAF
Sol	2	0.9894 ns	3.2751 ns	6.8087 **	2.1766 ns
Erreur	19	237.68497	14.84359	2251.63053	2.60234

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

Ns : non significatif

DL : degré de liberté

III-4 Analyse en composantes principales (ACP)

Sur la base des résultats obtenus et dans le but de sélectionner des souches performantes, l'ACP est utilisée pour comparer les activités PGP exprimées par les différentes souches (Fig. 24). L'ACP, entre les activités (AIA, sidérophores, solubilisation des phosphates et activité antifongique) et les souches, révèle de nombreuses observations :

- Selon la matrice obtenue, une variabilité existe entre la première et la deuxième composantes principale (CP1, CP2) de 55,95 et 26,37% respectivement.
- L'analyse des données met en évidence une corrélation positive entre l'activité antifongique et les productions de sidérophores et d'AIA d'un côté et la solubilisation des phosphates de l'autre (axes proches ou confondus)

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

- Le premier est représenté par les souches simultanément productrices d'AIA et solubilisant les phosphates.
- Le second comporte des souches exclusivement phytoprotectrices ayant un large spectre d'activité antifongique et produisant des quantités appréciables de sidérophores.
- Enfin, le dernier groupe, situé à l'opposé des axes des activités, comporte des souches ayant un profil variable majoritairement faible.

Au final, les souches Ba14 et D13 sont similaires, la Ba14 a une activité plutôt phytostimulatrice par la production d'AIA et la solubilisation des phosphates. Par contre, la D13 semble posséder toutes les activités PGP en étant proches des différents axes et du cercle de corrélation (Fig. 24).

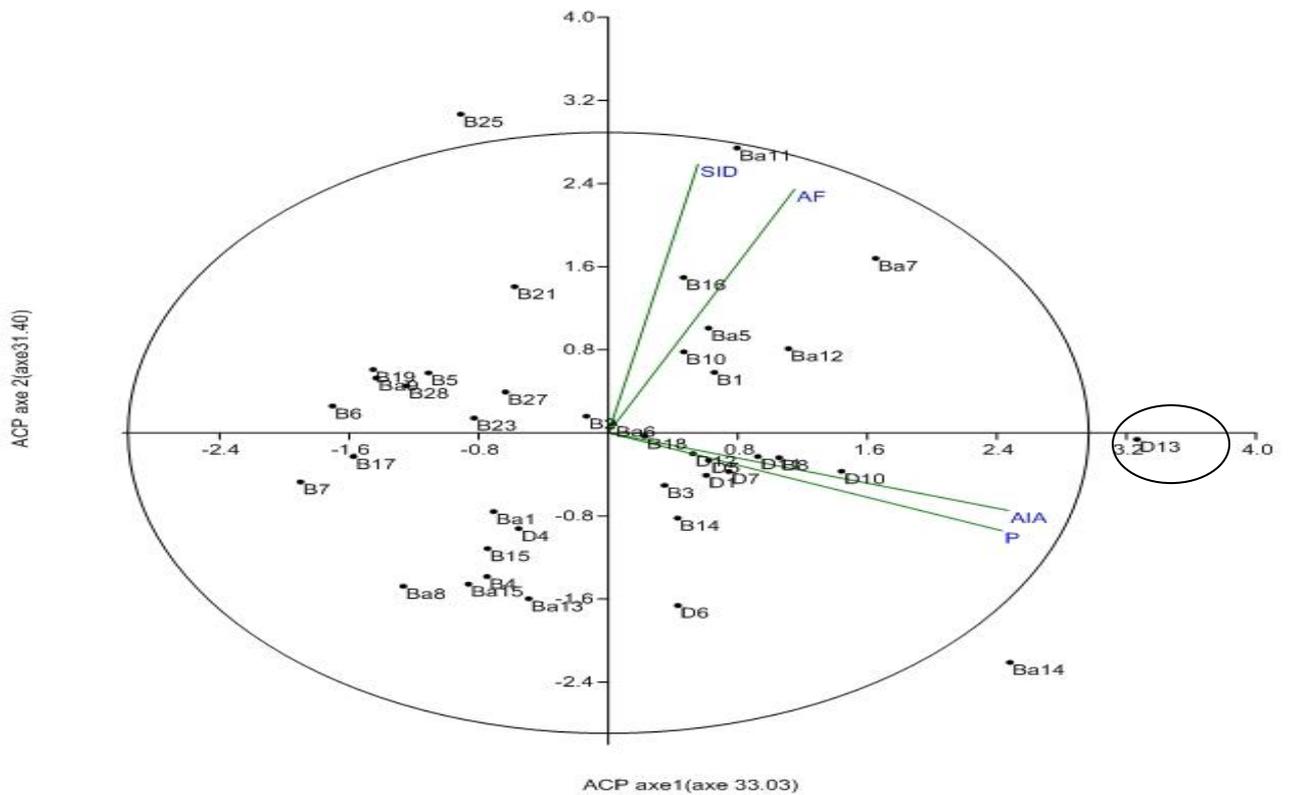


Fig 24: ACP des activités générées par les souches de *Bacillus*

Concernant le comportement et les activités des souches à Gram-, une corrélation existe entre la production de sidérophores, la solubilisation des phosphates et l'activité antifongique d'une part et la production d'AIA d'autre part. Il n'y a aucune corrélation apparente entre les deux capacités de biofertilisation (solubilisation des phosphates) et de phytostimulation (synthèse d'AIA) (axes éloignés).

Selon l'analyse de CP1 et de la CP2, les souches B5, B3 et O4 sont les meilleures avec des taux de production appréciables. La B5 est la plus performante étant située proche du cercle de corrélation. L'analyse détermine également un groupe composé des souches O2 et O8 ayant le meilleur taux de solubilisation (position proche de l'axe des P) par rapport aux souches O9, O6 et B10 qui solubilisent moins de phosphate tricalcique mais produisent une quantité appréciable de sidérophores. Par contre, les autres souches possèdent seulement une ou deux activités PGP tel est le cas des B9, B1 et B4. Le reste représente les souches les plus faiblement actives (Fig. 25).

Selon les résultats des deux ACP, la D13 et la B5 sont les souches les plus performantes parmi les bactéries du genre *Bacillus* et celles à Gram- respectivement.

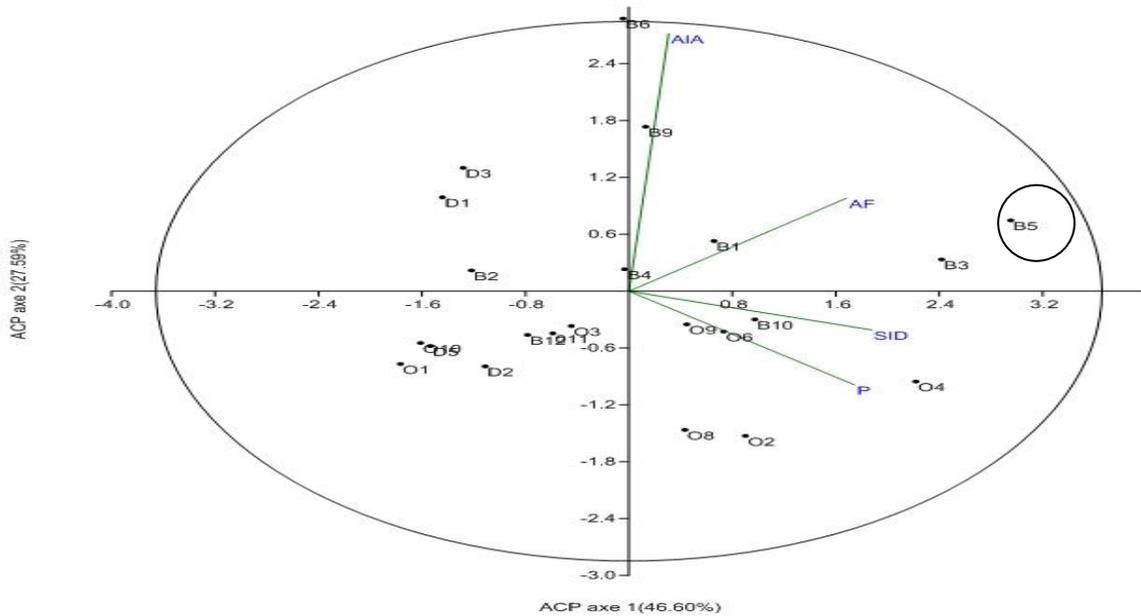
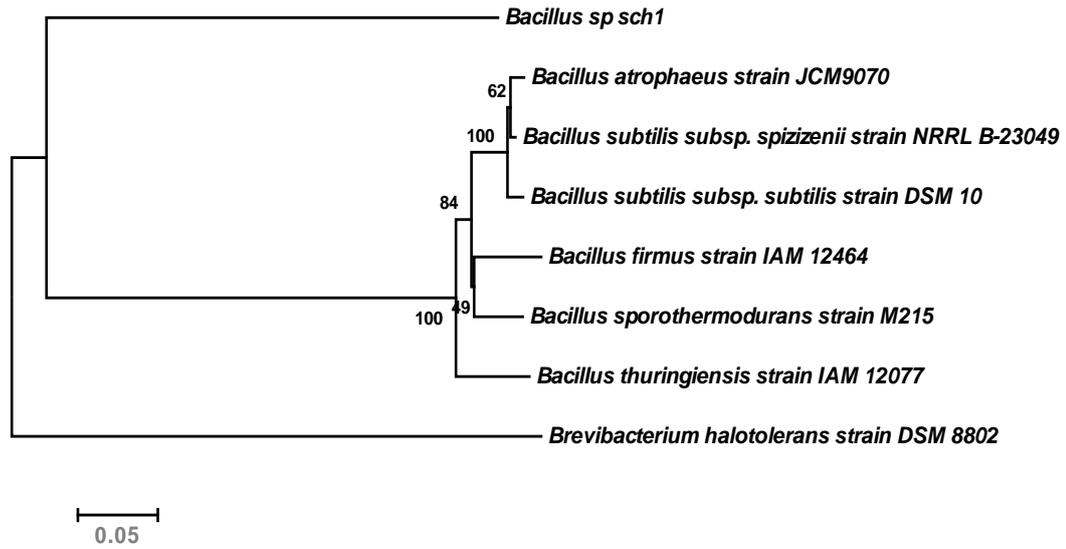


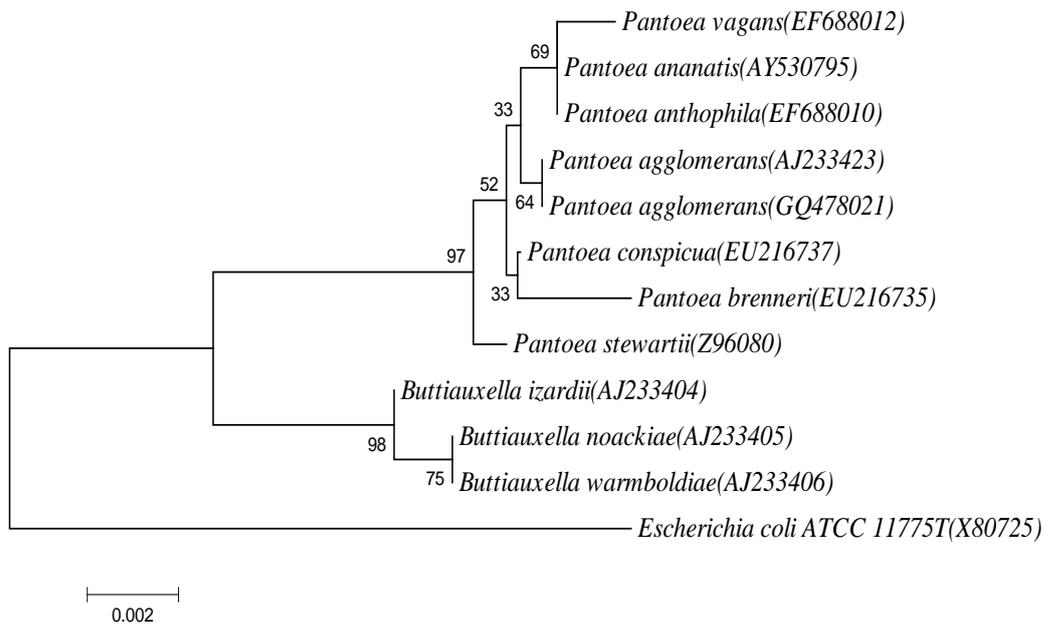
Fig. 25: ACP des activités générées par les bactéries à Gram-

III- 5 Identification moléculaire

Les deux souches sélectionnées par les scores de l'ACP sont identifiées par séquençage de l'ADNr 16S. Les arbres phylogénétiques (Fig. 26) basés sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S de la D13 et de la B5 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. La D13 est apparentée (à 100%) aux espèces de *Bacillus* et est identifiée sous le nom de *Bacillus* sp. Sch1(numéro d'accèsion GQ478020). Par contre la B5 présente une homologie de 64% avec l'espèce *Pantoea agglomerans* et est identifiée en tant que *Pantoea agglomerans* lma2 (numéro d'accèsion GQ478021).



(a)



(b)

Fig. 26: Arbres phylogénétiques basés sur une comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des souches et de certaines souches phylogénétiquement proches (souches validement publiées). L'arbre est réalisé par la méthode de neighbor-joining. Les nombres sur l'arbre indiquent les pourcentages des dérivés de 1000 répliques. (a) D13 (b) B5.

IV- Discussion

Les souches de *Bacillus* (n=40) et les Gram- (n=22) isolées de la rhizosphère du blé et de l'orge représentent une fraction importante de la communauté microbienne du sol. La diversité dans la rhizosphère implique que la compétence est une caractéristique de souche pas seulement d'espèce ou de genre. Plusieurs études révèlent que les *Bacillus* sont abondants dans la rhizosphère du blé (Milus et Rothrock 1993; Maplestone et Campbell, 1989). Toutefois, leur dominance se trouve dans les régions salées. La capacité de sporulation de ce genre bactérien favorise d'une part l'ubiquité et d'autre part la survie dans des environnements très divers. Les bactéries à Gram négatif se trouvent communément dans diverses niches écologiques. La majorité des genres appartenant à la famille des Enterobacteriaceae sont ubiquistes et présents naturellement sur les plantes (Francis *et al.*, 2000). La faculté des bactéries isolées de vivre dans les milieux aérobies et de se comporter aussi comme des anaérobies facultatives est une caractéristique de ces souches. Survivre et évoluer dans des milieux à faible concentration en oxygène est un réel avantage dans la rhizosphère, la disponibilité de l'oxygène peut fluctuer au cours du temps et s'atténuer (Nakano et Hulett, 1997). Une autre raison de l'intérêt de ces bactéries est la diversité de leurs modes d'action, elles peuvent afficher presque tous les mécanismes de lutte biologique, de biostimulation et de biofertilisation (Francis *et al.*, 2000).

Une propriété importante des PGPR influençant directement la croissance des plantes est la fixation d'azote. Elle est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel la plante bénéficie de l'association microbienne. L'un des avantages que fournissent les bactéries diazotrophes aux plantes est l'azote fixé en échange du carbone libéré comme exsudats racinaires. Cette activité liée à l'existence du gène *nif H* est présente chez l'ensemble des bactéries à Gram-. Toutefois, seule 50% des souches de *Bacillus* sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Selon Guemori-Athmani *et al.* (2000), cette capacité mesurée par l'activité de la nitrogénase existe chez *Bacillus* et *Peaenibacillus* isolés du sol algérien. De nombreux rapports sont disponibles sur l'application des diazotrophes libres, y compris *Bacillus* spp., pour un rendement accru de diverses cultures (Ding *et al.*, 2005).

L'alimentation minérale en phosphate est également une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Plusieurs souches de *Bacillus* (Ba5, Ba7, D6, D13, B14 et B18) et des Gram- (B1, B3, B5, B10, O2, O4 et O8) isolées sur milieu PVK additionné de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilisent les phosphates à des taux appréciables. Elles peuvent être considérées comme des biofertilisants car ces bactéries sont capables de libérer une quantité de P supérieure à celle nécessaire à leur métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus (Klopper *et*

al., 1989). La nature du sol a un impact sur la performance des souches et l'analyse statistique montre que les *Bacillus* isolés du sol 3 (région Djelfa) étant donné sa richesse en calcaire sont les plus productrices. Parmi les communautés bactériennes du sol, les souches de *Pseudomonas*, de *Bacilli* et de *Rhizobia* endosymbiotiques ont été décrits comme agents de solubilisation efficaces. Cependant, les *Bacillus* (*B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. sp1*) sont les plus performants (Illmer et Schinner 1992; Wani *et al.* 2007). De plus, la solubilisation du P est un caractère très commun chez les *Pseudomonas* et certains Enterobacteriaceae dont *P. agglomerans* (Sulbaran *et al.*, 2008).

Les micro-organismes libèrent le P par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétion de H⁺. Par conséquent, le P peut être libéré par la substitution des protons ou sa complexation avec le Ca²⁺ (Illmer et Schinner, 1995). Ainsi lors de la solubilisation, les bactéries acidifient l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose. Ce processus conduit à la libération de différents acides organiques (lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique). Cependant, ces composés sont libérés difficilement dans le milieu solide contrairement au milieu liquide (Nautiyal, 1999). La conséquence de ce phénomène se manifeste par la non-apparition du halo de transparence autour des colonies des souches solubilisant efficacement les phosphates sur bouillon PVK.

La synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est le plus efficace, est une faculté très commune chez les bactéries. Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2010). L'AIA est synthétisé par certaines souches de *Bacillus* : Ba1, Ba6, Ba14, D10, D13 et B10 à des valeurs allant de 10 à 30 µg/ml. Alors que, le reste des souches libèrent des taux très faibles. Par contre, les bactéries Gram- synthétisent des quantités plus élevées atteignant plus de 200 µg/ml (B6). Cette performance est notée surtout pour les souches du sol 2. Les bactéries sécrétant une grande quantité d'auxine soit l'AIA et l'acétamide indole (IAM) dans le sol causent une augmentation maximale de la croissance et le rendement des récoltes (Khalid *et al.*, 2004). La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Miraza *et al.*, 2001).

La capacité de coloniser les racines et la résistance aux antibiotiques sont d'autres paramètres nécessaires pour dépister les souches efficaces (Siddiqui *et al.*, 2005). Les principaux mécanismes par lesquels les agents microbiens de lutte biologique peuvent contrôler d'autres

micro-organismes sont la concurrence directe pour l'espace et les nutriments, l'antibiose ou la production de toxines, la prédation ou le parasitisme et la résistance induite de l'hôte (Compant *et al.*, 2005). La plupart des agents microbiens présentent un seul de ces mécanismes, alors que certains peuvent en utiliser plusieurs. Les bases moléculaires de l'activité de contrôle biologique sont diverses. Plusieurs voies biochimiques et de régulation des gènes sont impliquées dans les différents processus qui aboutissent au contrôle des pathogènes. L'activité antifongique est plus élevée chez le genre *Bacillus*, 75% des souches ont une activité envers 3 champignons et plus. 4 souches sont inhibitrices de six champignons, il s'agit de la BA11, Ba7, D13 et B16 par rapport, aux bactéries à Gram- où une seule souche possède un spectre d'activité aussi large, il s'agit de la B5. Les *Bacillus* sont connus pour leur activité antifongique importante, ils produisent une variété de métabolites puissants et des enzymes hydrolytiques (Rahman *et al.* 2007). Ce genre a plusieurs espèces bactériennes qui excrètent des lipopeptides actifs (Ongera *et al.*, 2005). L'activité biologique de ces composés est surtout liée à leur effet sur les lipides de la membrane cellulaire où ils peuvent favoriser selon la concentration, la formation de pores irréversible dans la double couche de phospholipides. Ces peptides antifongiques inhibent la croissance d'un grand nombre de champignons, y compris *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, les bactéries et les oomycètes (Munimbazi et Bullerman, 1998). Les espèces de *Bacillus* comme *amyloliquefaciens*, *subtilis*, *cereus*, *licheniformis*, *megaterium*, *mycoides* et *pumilus* sont connues comme de puissants producteurs de molécules antibiotiques très efficaces. *B. subtilis* a une moyenne de 4 à 5 % de son génome consacré à la synthèse d'antibiotiques avec un potentiel de production de plus d'une vingtaine de composés antimicrobiens structuralement divers (Stein *et al.*, 2005). Il est aussi largement utilisé en lutte biologique comme un agent de biocontrôle puissant (Knaak *et al.*, 2007).

Les substances volatiles sont également impliquées dans la suppression de différents agents pathogènes. Selon Howell *et al.* (1988), l'ammoniac produit comme intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie est un agent inhibiteur des phytopathogènes. La production de NH₃ est très fréquente chez les souches isolées. Ce taux est comparable à ceux mentionnés par plusieurs travaux (Joseph *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2008). Un autre métabolite secondaire synthétisé par certaines rhizobactéries est l'acide cyanhydrique. Bien que ce composé soit un inhibiteur métabolique général, il est excrété comme moyen d'éviter la prédation ou la compétition (Heydari *et al.*, 2008). Toutefois, la majorité des souches isolées ne possèdent pas la capacité de produire de l'HCN. Ceci peut être expliqué par l'absence des gènes (*hcn*) responsables de la production de ce

métabolite (Laville *et al.*, 1998) , ou bien de celle d'un précurseur adéquat utilisé. En plus de la glycine comme précurseur, d'autres composés peuvent être utilisés tels que le glutamate ou la méthionine (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986).

La production des sidérophores influence la croissance des plantes en liant le fer sous sa forme disponible : Fe³⁺ (Whipps, 2001). Par ces fonctions les sidérophores procurent une protection des plantes contre plusieurs maladies fongiques ou bactériennes (Siddiqui, 2006). Ces composés inhibent la croissance des champignons phytopathogènes (Ramette *et al.*, 2003). La majorité des souches isolées produisent des sidérophores à des taux très variables. Les souches de *Bacillus* les plus performantes sont Ba5 (55,6%), B25(53,05%), Ba11(51,51%), D11(43,5%) et celles à Gram- sont B 3 (51, 3%), O4(50,36%), B5(46,36%) et O2(40,96%). La capacité de production intrinsèque de la souche est sous l'influence des facteurs environnementaux (Valdebinito *et al.* 2006). Plusieurs facteurs agissent sur la synthèse des sidérophores : le pH, la teneur en fer et les formes d'ions de fer , la présence d'oligo-éléments et une quantité suffisante de C , N, et P (Duffy et Defago 1999). Cependant, sur milieu solide la production est beaucoup moins appréciée que sur milieu liquide. Ceci serait dû à l'inhibition de la croissance des bactéries par les composants du milieu de culture ou à la nature du sidérophore produit (Gangwar et Kaur, 2009).

La présence de l'ACC désaminase chez quatre souches de *Bacillus* (B21 , D4 , B10 et B25) et des Gram- (O4, O10, B5 et B3) est utilisée comme un outil pour la sélection des rhizobactéries dans la promotion de la croissance des plantes sous différentes conditions environnementales. En effet, cette enzyme en réduisant les concentrations de l'éthylène endogène soulage la plante de plusieurs stress causés par les infections, la toxicité des métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse, l'exposition aux métaux, les contaminants organiques et la prédation des insectes (Glick *et al.*, 1998).

L'impact des mécanismes par lesquels les microorganismes fournissent un composé ou des éléments nutritifs à la plante varie considérablement selon la composition du sol. Les résultats de cette étude montrent aussi que les activités PGP des bactéries sont hétérogènes; certaines souches possèdent des capacités remarquables aussi bien phytostimulatrices que biofertilisantes. En effet, la solubilisation des phosphates et la production simultanée de l'AIA a été démontrée (Weller et Thomashow, 1994). Alors que d'autres sont dotées exclusivement d'un pouvoir de biocontrôle (activité antifongique). D'autre part, la production de sidérophores est l'un des mécanismes utilisé dans la solubilisation des phosphates lorsque le phosphore est lié au fer (Dastager *et al.*, 2010). Selon de nombreux auteurs, une corrélation existe entre ces différentes activités (Mehta *et al.*, 2010) .

La sélection de souches bactériennes efficaces est d'une importance primordiale pour la croissance des plantes. Ainsi les PGPR ont des effets faiblement mesurables lorsque celles-ci sont cultivées dans un sol riche et dans des conditions optimales (Penrose et Glick, 2003). L'isolement des bactéries des sols suppressifs de pathogènes favorisent la sélection de souches efficaces (Cook et Baker, 1983) et doit être réalisé à partir du même environnement dans lequel elles seront utilisées (Weller et Thomashow, 1994). Ainsi le choix des souches D13 et B5 respectivement du genre *Bacillus* et des Gram- exhibant les meilleures activités selon l'analyse de l'ACP est effectué dans le but d'obtenir des inoculants ayant un effet synergique et maximal des facultés PGP. L'identification moléculaire par le séquençage du gène de l'ARNr16S a permis l'affiliation phylogénétique de la souche D13 à l'intérieur du genre *Bacillus* par comparaison aux séquences d'espèces proches. L'arbre phylogénétique confirme sa parenté avec les espèces de *Bacillus* et est déposée dans GenBank sous le nom de *Bacillus* sp. sch1 sous le numéro d'accèsion GQ 478020. La séquence de la souche B5, après alignement avec des espèces proches, assigne une parenté de 64% avec l'espèce *Pantoea agglomerans*. Sa séquence est soumissionnée à GenBank sous le nom de *Pantoea agglomerans* lma2 (numéro d'accèsion GQ 478021).

B- Isolement et caractérisation d'une rhizobactérie améliorant la croissance des plantes : *Pantoea agglomerans* lma2

I-Introduction

La salinité est l'un des facteurs majeurs limitant la productivité des plantes et par conséquent la production agricole. L'utilisation de PGPR comme inoculum dans l'agriculture est l'approche la plus prometteuses pour améliorer la production et le rendement dans les régions touchées par la salinité. Ainsi, l'inoculation des plantes stressées par des souches PGPR atténue le stress salin (Ashraf *et al.*, 2008 ; Sahran et Nehra, 2011). Les rhizobactéries isolées des sols salins sont capables de croître à différents niveaux de salinité (Tripathi *et al.*, 1998). En conséquence, la croissance des micro-organismes halotolérants, associés aux racines des plantes conduirait à une meilleure fertilité des sols salins (Hallman *et al.*, 1997). La sélection et l'utilisation des PGPR devrait tenir compte de l'adaptation de l'inoculant à une plante et à un écosystème particulier. En outre, la sélection d'une souche efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale (Cattelan *et al.*, 1999). Dans ce contexte, l'évaluation de la performance de la rhizobactérie choisie : *Pantoea agglomerans* est testée. Elle consiste à déterminer ses propriétés métaboliques et physiologiques et à mesurer ses capacités PGP sous stress salin dans le but d'élaborer un biofertilisant efficace.

II- Matériel et Méthodes

II-1 Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée est choisie parmi la flore à Gram- fixatrice d'azote comme modèle répondant à notre objectif étant donné sa tolérance au sel. Elle provient de la rhizosphère du blé du sol aride de la région de Bou-saâda (sol 2 décrit précédemment). Elle est identifiée selon les aspects macroscopique et microscopique, les tests d'oxydase, de catalase et de nitrate réductase, par l'utilisation d'une galerie API20E et un séquençage du gène de l'ARNr16S.

II-2 Caractérisation phénotypique

II-2-1 Caractérisation métabolique

Pour réaliser un screening métabolique de la souche plusieurs sources de carbone sont utilisées. Les monosaccharides (D- glucose, D- galactose, D-fructose , D-xylose, , D-ribose, raffinose, D-mannose, D-fucose et L-sorbose), les disaccharides (lactose, maltose, tréhalose,

lévulose et cellobiose) et les dérivés de sucre (glycérol, D-mannitol, dulcitol, adonitol, D-sorbitol, salicine et dextrine, citrate) sont évalués sur milieu minimum au sel (Brown et Dilworth, 1975) (Annexe 8). Les polysaccharides (amidon et esculine), les lipides (lécithine, tributyrine, Tween 20 et 80), les protéines (caséine, gélatine), et les acides organiques (L(-) malique, L(+) lactique, L(+) tartrique, succinique et maléique) sont évalués sur milieux correspondants utilisant les méthodes standards. La croissance sur KCN est déterminée sur milieu contenant 0.1 ml de cyanure de potassium à 5% (Cappuccino et Sherman, 1992) (Annexe 9).

II-2-2 Effet du sel, du pH et de la température sur la croissance de *P. agglomerans*

La tolérance au sel est évaluée sur bouillon nutritif (BN) (Fluka) en présence de concentrations croissantes de NaCl allant de 0 jusqu'à 1M. L'effet du pH est testé sur le même milieu ajusté à différentes valeurs de pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 pour évaluer la capacité de la souche à croître sur une large gamme de pH. Les milieux sontensemencés par 100 µl d'une culture jeune de *P. agglomerans* et incubés à 30°C/48h sous agitation.

La capacité à croître sous différentes températures est effectuée sur milieu BNensemencé par 100 µl de la culture bactérienne de la souche testée et incubé à 4, 30, 37, 40 et 44°C/48h. Dans les deux cas, la croissance est mesurée à 600 nm et les expériences sont réalisées en triplicata.

II-3 Mesure des activités PGP

La souche sélectionnée est testée pour les différentes activités : la production de NH₃, HCN, d'AIA, de sidérophores et la solubilisation des phosphates selon les méthodes décrites auparavant (Partie A).

II- 4 Effet du sel sur les activités PGP

La souche est testée pour sa capacité de solubiliser les phosphates, à produire les sidérophores et l'AIA sous stress salin. Les milieux correspondants (PVK, CAS et DF) sont additionnés de concentrations croissantes de NaCl (de 0 jusqu'à 1000mM),ensemencés par 100µl de la culture et incubés à 30°C. La durée d'incubation varie selon l'activité testée : 7 jours pour la solubilisation des phosphates, 48h pour la production d'AIA et 24 h pour la production des sidérophores. L'estimation quantitative pour chaque test est déterminée selon les méthodes décrites auparavant. Les expériences sont effectuées en triplicata.

II-5 Analyse statistique

Les résultats sont présentés graphiquement par l'utilisation du logiciel GraphPadPrism 5 Demo. L'analyse de la corrélation est réalisée par le programme Assisat 7,6 Béta développé par Pr. Franciscode Assis (Department of Agricultura Engineering of the Center of Technology and Natural Resources of the Federal University of Campina Grande City, Brazil)

III- Résultats

III-1 Identification de la souche

La souche isolée cultive sur gélose nutritive (GN) après 24h à 30°C. Les colonies obtenues sont rondes lisses à bord régulier plus au moins plates de diamètre inférieur à 1 mm et produisent un pigment jaune. L'examen microscopique révèle des bacilles à Gram négatif droits, à bouts arrondis de 3 à 5µm de long et 0.5 à 1µm de large. Ils se présentent isolés ou groupés par deux. La souche est mobile et asporulée. Elle est catalase+, oxydase-, nitrate-réductase+ (à l'état N₂), anaérobie facultative, fermente le glucose sans production de gaz. Ces caractères orientent vers la famille des Enterobacteriaceae. Son identification est confirmée par galerie biochimique API20E (Biomérieux) et le résultat obtenu attribue l'appartenance à l'espèce : *Pantoea agglomerans*. Selon l'analyse de la sequence partielle de l'ADNr 16S, la souche *Pantoea agglomerans* lma2 (numéro d'accession : GQ 478021) est placée dans le groupe du genre *Pantoea* avec une similarité de 97% (Fig. 26, Partie A).

III-2 Caractérisation biochimique

La souche *P. agglomerans* lma2 catabolise plusieurs sources de carbone : les sucres (D-fructose, D-galactose, D-xylose, D-ribose, D-mannose, maltose, tréhalose, levulose, cellobiose, glycerol, D-mannitol, dulcitol, adonitol, salicine, dextrine, citrate et esculine), les lipides (lécithine, tributyrine et tween 80) les protéines (gélatine, caséine) et les acides organiques (malique, lactique et maléique) et peut croitre sur KCN (Tab. 16).

Tab.16 : Caractérisation biochimique :

Caractères biochimiques	Souche isolée
Mobilité	+
Production de pigment jaune	+
Catalase	+
Oxydase	-
Nitrate reductase (N ₂)	+
Production de gaz	-
Production d'indole	-
Production de H ₂ S	-
Réaction de VP	+
ADH	-
LDC	-
ODC	-
TDA	-
β-galactosidase	+
Uréase	-
Croissance sur KCN	+
Utilisation de : Citrate	+
L(-)Malate	+
L(+)Lactate	+
L(+)Tartrate	-
Succinate	-
Maleiate	+
Hydrolyse de : Lecithin	+
Tween 20	-
Tween80	+
Tributyryne	+
Caséine	+
Gélatine	+
Amidon	-
Esculine	+
Production d'acide du:	
D- galactose	+
D- Fructose	+
D- Ribose	+
Raffinose	-
Fucose	-
L-Sorbose	-
D-xylose	+
D-Mannose	+
Lactose	-
Maltose	+
Trehalose	+
Levulose	+
D- Cellobiose	+
Glycerol	+
Dulcitol	+
Adonitol	+
Dextrine	+
D-Mannitol	+
Salicine	+
D-Sorbitol	-

+ : test positif, - : test négatif.

III-3 Caractérisation physiologique

III-3-1 Effet du pH

P. agglomerans lma2 se développe sur une large gamme de pH allant de 4 à 8. A la neutralité (pH=7), l'optimum est atteint. Par contre, l'inhibition de la croissance est visible aux pH alcalins (9 et 10) (Fig.27).

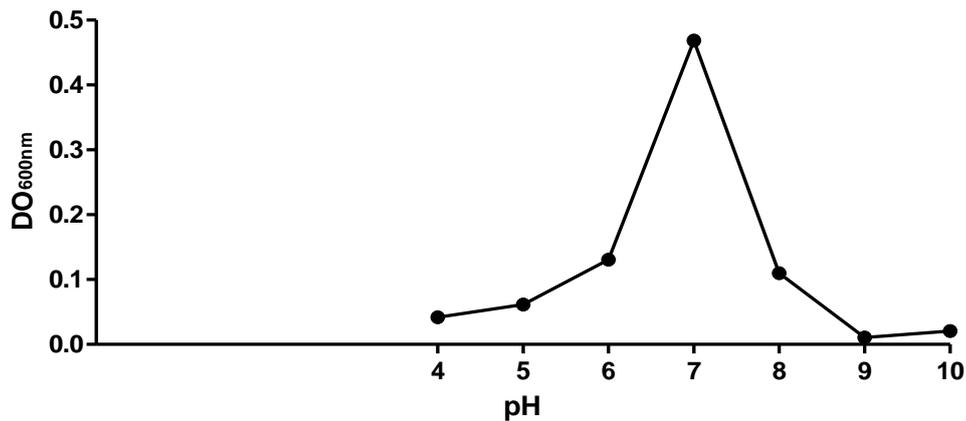


Fig. 27: Effet du pH sur la croissance de *P. agglomerans* lma2.

III-3-2 Effet de la température

La croissance de *P. agglomerans* lma2 est constatée aux différentes températures testées. Elle est optimale à 30°C mais réduite à 37°C. Aux températures extrêmes (4, 41 et 44 °C), la souche conserve un taux de croissance appréciable mais faible (Fig. 28).

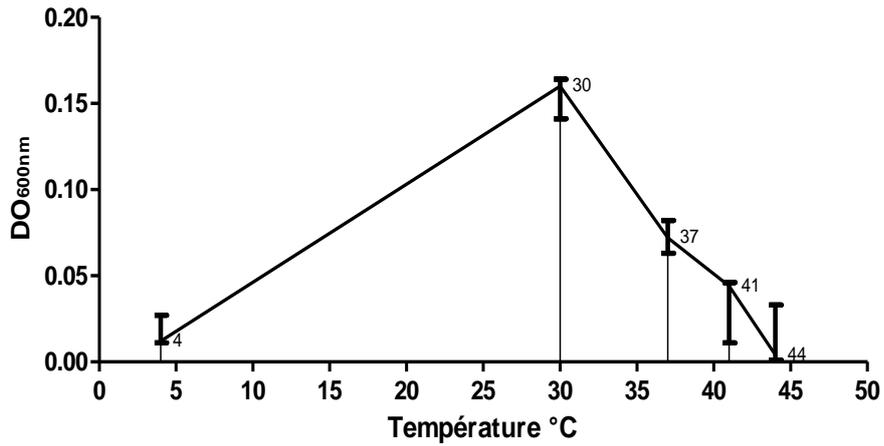


Fig. 28 : Effet de la température sur la croissance de *P. agglomerans lma2*.

III-3-3 Effet du sel

La croissance de la souche sur bouillon nutritif appréciée par la mesure du trouble à des concentrations de sel allant de 0 à 1000 mM révèle une bonne capacité de tolérance au sel jusqu'à 1M avec des taux élevés à 100, 200 et 300 mM de NaCl (Fig. 29).

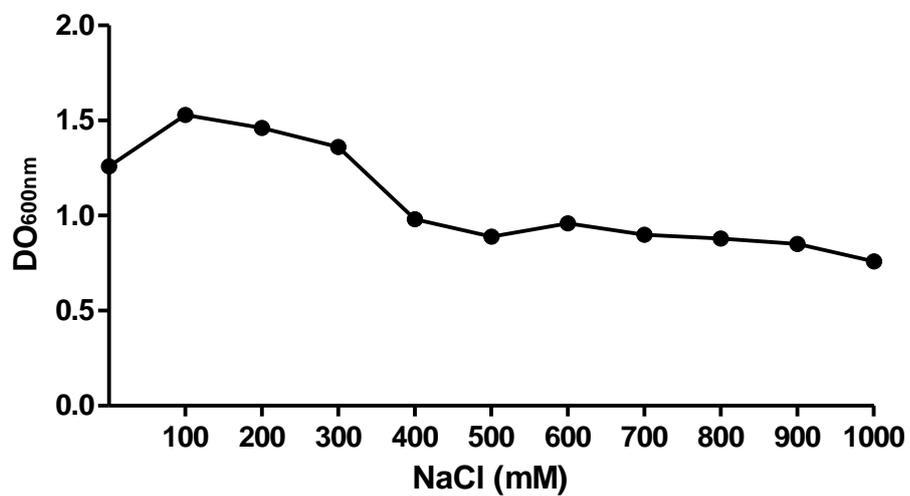


Fig. 29 : Effet du sel sur la croissance de *P. agglomerans lma2*.

III-4 Activités PGP

III-4-1 Fixation d'azote, production de NH₃ et de HCN

Etant donné sa capacité de croître sur milieu exempt d'azote (milieu WS), *P. agglomerans* lma2 est fixatrice d'azote. Cette souche développe une couleur jaune –marron après addition du réactif de Nessler après 4 jours d'incubation sur eau peptonée indiquant une production intense de NH₃. Par contre l'activité cyanogène est absente, la couleur jaune du papier filtre reste inchangée au bout de 4 jours à 30°C (Tab. 17).

III-4-2 Solubilisation du phosphate

Pantoea agglomerans lma2, testée pour sa capacité à solubiliser le phosphate tricalcique (Ca₃PO₄) sur milieu de PVK solide, produit une zone claire autour de la colonie de 10 mm de diamètre. L'estimation quantitative du phosphate soluble sur milieu PVK liquide est de 809.19 µg/ml (Tab. 17).

III-4-3 Production des sidérophores

La synthèse des sidérophores par *P. agglomerans* lma2 sur milieu CAS solide est caractérisée par un halo orange (Ø= 5 cm) autour de la colonie. Le pourcentage de production sur milieu CAS liquide est calculé par la différence des DO à 630 nm entre l'échantillon et le témoin. La couleur a viré du bleu (témoin) à l'orange plus au moins intense selon le taux de production. Il atteint 4.195% (Tab. 17).

III-4-4 Production d'AIA

L'AIA est formé à partir d'un précurseur le tryptophane. La production de l'AIA par la souche testée atteint un maximum de 147 µg/ml (Tab. 17).

Tab. 17: Activités PGP de *Pantoea agglomerans*

Activité	Sur milieu liquide
Fixation d'azote	+
Production de NH ₃	+
Production de HCN	-
Production d'AIA	147 µg/ml
Production des sidérophores	4,195% (5cm)
Solubilisation du phosphate	809,19 µg/ml (10mm)

() valeur sur milieu solide

III-5 Effet du sel sur les activités PGP

En présence de concentrations croissantes de NaCl (de 0 jusqu'à 1M), les quantités de P solubilisées par *P. agglomerans* Ima2 varient entre 583,90 à 1061,49 µg/ml. Cette capacité est élevée en présence de sel à partir de 100 mM jusqu'à 800 mM comparée au témoin sans sel, avec un maximum à 300 mM atteignant un taux de 1061,49µg/ml. Le taux de phosphate soluble diminue mais reste toujours appréciable à 900 et 1000 mM de NaCl mesurant 721,6 µg/ml et 583,90 µg/ml respectivement (Fig.30).

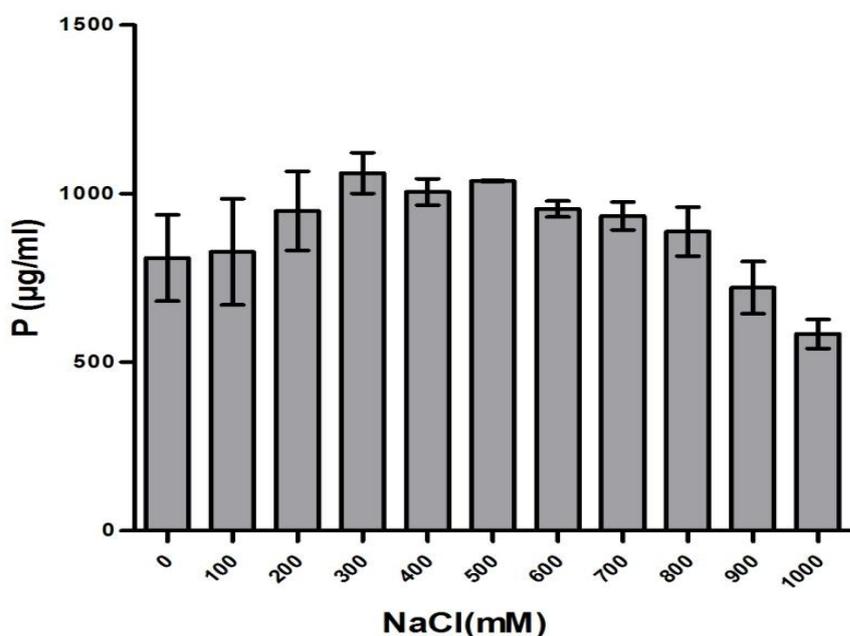


Fig 30 : Solubilisation des phosphates par *P. agglomerans* en présence de sel

La production de sidérophores est augmentée en présence de sel comparée au témoin sans sel (4,195%). Elle est de 12,01% à 100 mM, de 8,16% à 900 mM et de 18.32% (maximum) à 300 mM . A une teneur de NaCl, 1M, le taux diminue (2,165%) (Fig. 31).

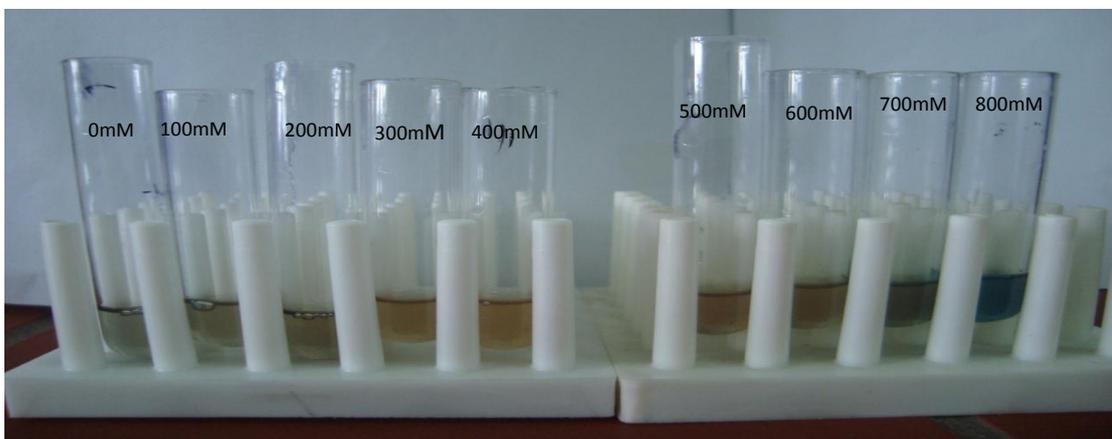
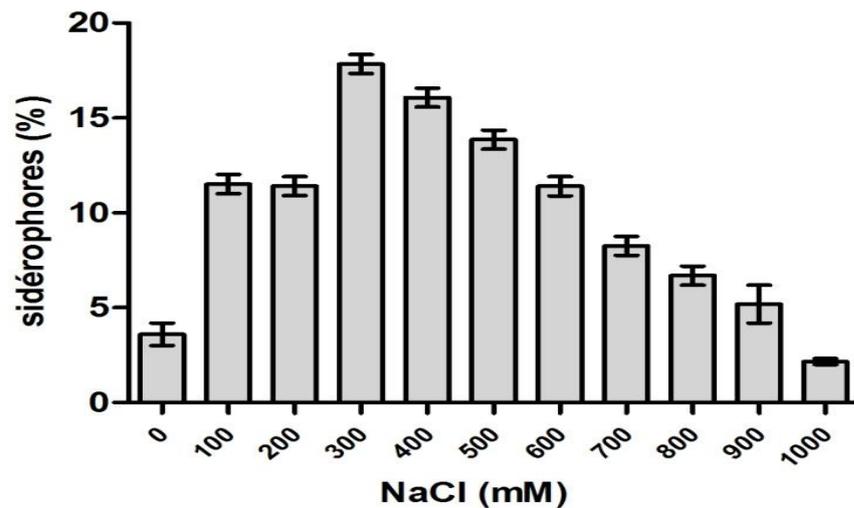


Fig. 31 : Production de sidérophores par *P. agglomerans* en présence de sel. L'intensité de la couleur orange est proportionnelle à la concentration des sidérophores.

La capacité de production de l'AIA par *P. agglomerans* lma2 est également améliorée en présence de NaCl. Le maximum est noté à 200 mM (161 µg/ml). Elle chute à partir de 400 mM et devient très faible aux fortes concentrations fortes (700,800,900,1000 mM de NaCl) (Fig. 32).

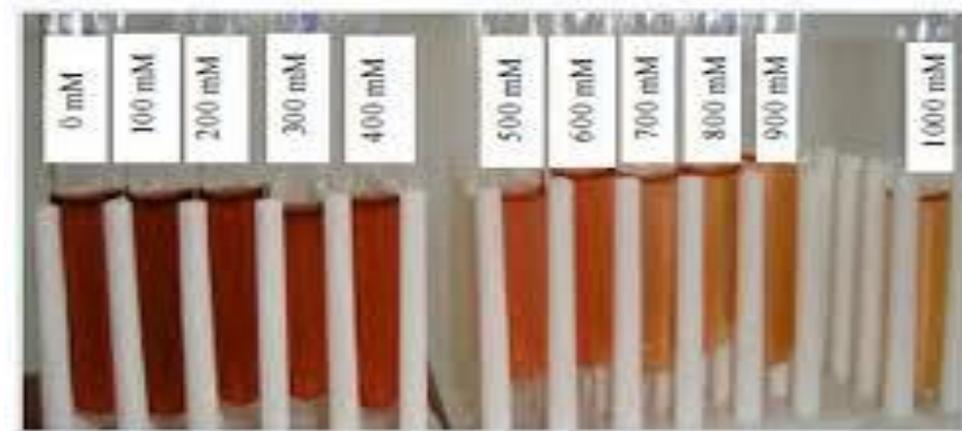
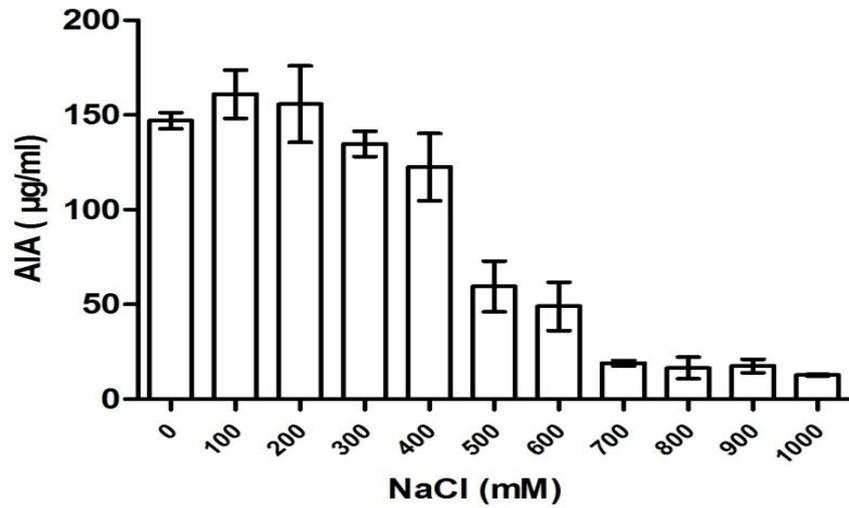


Fig 32 : Production d'AIA par *P. agglomerans* en présence de NaCl. L'intensité de la couleur rose est proportionnelle à la concentration de l'AIA

III-6 Corrélation entre les activités de *P. agglomerans* lma2

Une corrélation significative ($p < 0.01$ et $p < 0.05$) existe entre les différentes activités PGP de *P. agglomerans* lma2 (Tab. 18).

Tab. 18 : Corrélation entre les activités de *P. agglomerans* lma2

Corrélation	Coefficient de corrélation r	P
P x AAI	0,4218	*
P x S	0,8267	**
AAI x S	0,4632	*

** Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0,01$)

*Significative à un niveau de 5% de probabilité ($0,01 \leq p < 0,05$)

IV- Discussion

Pour promouvoir la croissance des plantes dans des conditions salines, l'utilisation directe de bactéries halophiles a reçu un intérêt considérable. Ces bactéries favorisant la croissance de plantes et tolérantes au sel sont des bactéries vivant librement dans le sol. Leur densité et leur activité sont très influencées par les conditions du sol (Borneman *et al.*, 1996).

La souche sélectionnée est *Pantoea agglomerans* selon l'identification biochimique et l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr16S. Cette souche est capable de fixer l'azote grâce à l'existence du gène *nifH* (Ding *et al.*, 2005) et dégrade une variété de substances carbonées. Les souches diazotrophes varient beaucoup quant à l'utilisation des sources de carbone. Ces souches rhizosphériques sont capables de dégrader une large variété de nutriments (Misko et Germida, 2002). Ces caractéristiques peuvent être utilisées non seulement pour étudier le profil métabolique des souches mais aussi pour comprendre leur capacité de compétition et de survie dans l'environnement racinaire (Giongo *et al.*, 2010). *P. agglomerans* est retrouvée communément dans diverses niches écologiques. Elle est ubiquiste dans la nature et est présente naturellement sur les arbres fruitiers. L'ubiquité et la diversité des habitats occupés par cette bactérie sont la preuve de son adaptation dans les diverses conditions environnementales. Cette bactérie est considérée comme épiphyte et endophyte des végétaux et possède un potentiel pour le contrôle des maladies des plantes (Francis *et al.*, 2000).

P. agglomerans lma 2 est isolée de la rhizosphère du blé d'un sol affecté par la salinité. En plus de ses capacités métaboliques son profil physiologique est aussi intéressant. Elle est

mésophile, mais sa croissance à 41° C contrairement à la souche-type *P. agglomerans* ATCC 27155 (Gavini *et al.*, 1989) expliquerait sa présence en régions arides. La température est l'un des facteurs les plus importants qui régit la physiologie et la croissance des microorganismes (Rahman *et al.*, 2006). L'aptitude de la souche à croître sur une large gamme de pH témoigne de sa capacité de survie. Ceci est en concordance avec les travaux de Costa *et al.* (2002) sur *P. agglomerans* CPA-2 capable de se développer à pH 5 jusqu'à 8.6. La croissance *P. agglomerans* lma 2 augmentant à des concentrations de NaCl comprises entre 100 et 400 mM atteste d'une forte tolérance au sel. Ce dernier est un facteur indispensable à la croissance. La salinité des sols joue un rôle prééminent dans le processus de sélection microbienne (Borneman *et al.*, 1996). Les bactéries isolées des environnements arides ou salins sont capables de survivre à des concentrations salines inhibitrices par rapport à celles isolées d'habitats non salins (Tripathi *et al.*, 1998).

Les rhizobactéries favorisent la croissance des plantes par plusieurs mécanismes. Les effets bénéfiques de ces bactéries sont principalement attribués à leur capacité à solubiliser le phosphate pour convertir les phosphates en une forme soluble permettant l'augmentation des rendements des plantes. La solubilisation du P est un caractère très commun chez *P. agglomerans*. La quantité de P solubilisé sur milieu PVK additionné de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ est élevée. Selon Sulbaran *et al.* (2008), *P. agglomerans* MMB051 solubilise une quantité de P importante ($95,75 \pm 2,94 \mu\text{g/l}$) dans le milieu contenant du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Compte tenu de l'adaptation aux conditions environnementales extrêmes, telles que la salinité, *P. agglomerans* lma2 testée en présence de sel manifeste une capacité élevée de solubilisation indiquant la résistance de cette souche à la salinité. Ces résultats sont en concordance avec ceux mentionnés par Son *et al.* (2006), indiquant que *P. agglomerans* R-42 produit $900 \mu\text{g/l}$ de phosphates solubles dans des conditions optimales. Par contre, cette souche résiste aux concentrations de sel (1-5% de NaCl) et solubilise le P à des taux plus élevés.

D'autre part, *P. agglomerans* lma 2 est très efficace dans la production d'AIA. Le taux de production atteint le maximum ($161 \mu\text{g/ml}$) à 300 mM de NaCl. Ce comportement serait dû à la capacité d'adaptation de la souche au stress osmotique. En effet, il est bien établi que l'environnement stressant favorise le développement des meilleures bactéries productrices (Banerjee *et al.*, 2010).

Comme la plupart des Enterobacteriaceae, *P. agglomerans* lma2 est caractérisée par une excrétion importante de sidérophores (Gangwar et Kaur, 2009). Elle est très efficace dans la

synthèse de sidérophores sous stress salin et présente également le même profil de croissance et d'adaptation à la salinité observé pour les autres activités.

Il existe une corrélation significative entre la production d'AIA, de sidérophores et la solubilisation des phosphates en présence de sel. La performance des PGPR serait une synergie et une combinaison de plusieurs réponses physiologiques (Ahmad *et al.*, 2008). De plus, l'amélioration des activités PGP à des concentrations de NaCl comprises entre 100 et 400 mM indique clairement le caractère halophile de cette souche. Ces constatations laissent supposer que la souche *P. agglomerans* lma2 pourrait constituer un biofertilisant efficace pour la croissance des plantes en zones arides et salines.

C : Solubilisation des phosphates par *Bacillus* sous stress salin et en présence de molécules osmoprotectrices

I-Introduction

L'amélioration de la fertilité des sols est l'une des stratégies courantes pour accroître la production agricole. Le phosphore (P) est un macro-élément essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais également un élément nutritif important limitant cette croissance. Les engrais chimiques sont la principale stratégie de la disponibilité du P dans les sols agricoles. Environ 75 à 90% d'engrais ajoutés sont précipités par des complexes de fer, d'aluminium et de calcium présents dans les sols (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Turan *et al.*, 2006). Les sols agricoles des régions arides et semi-arides sont principalement calcaires. A des niveaux élevés de calcium échangeable, le P soluble réagit avec le CaCO_3 , précipite et forme des minéraux de Ca-P insolubles (Lindsay *et al.*, 1989). L'accumulation sous cette forme est un problème crucial pour l'agriculture. L'utilisation des micro-organismes de la rhizosphère est le meilleur moyen biologique pour améliorer la solubilisation du phosphate dans le sol et fournir des quantités suffisantes pour la nutrition des plantes (Pradhan et Sukla 2005; Singh *et al.*, 2011). La capacité de certains micro-organismes à transformer le phosphate insoluble sous une forme accessible est une caractéristique fondamentale pour les PGPR (Kucey *et al.*, 1989). De nombreuses espèces microbiennes en sont capables, parmi elles, les *Bacillus* ont une activité importante.

La capacité des microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) est souvent testée sur un milieu contenant du phosphate de calcium comme seule source de phosphates. De nombreux milieux sont recommandés pour ce type d'étude tels que le milieu Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948), le PVK au bleu de bromophénol (BBP) et le milieu Phosphate de l'Institut National de Recherche en Botanique (National Botanical Research Institute Phosphate: NBRIP) (Nautiyal, 1999). Tous les milieux décrits après 1948 sont des dérivés du PVK, la source de carbone et/ ou d'azote et/ou de phosphate ou de sels changent.

Plusieurs chercheurs ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (Hedley *et al.*, 1990; Hinsinger, 2001). Par leurs actions sur les composés minéraux, les MSP abaissent le pH du sol, cet abaissement est dû à plusieurs facteurs tels que: la libération d'ions H^+ , la production de substances chélatrices ou d'acides organiques. Toutefois, la production de ces derniers est le principal mécanisme.

La performance des MSP est fortement influencée par les conditions environnementales telle que la salinité des sols arides et semi-arides (Kumar et Narula, 1999). Dans les milieux salins, le besoin d'équilibrer la pression osmotique intra et extracellulaire s'impose. Cet ajustement osmotique est obtenu en augmentant la concentration à l'intérieur de la cellule par l'accumulation de solutés compatibles (Ventosa *et al.*, 1998). Parmi ces solutés, la proline et la glycine bêtaïne sont des substrats de choix accumulés pour faire face à ce stress (Kempf et Bremer, 1998) .

L'objectif de cette partie est de chercher un milieu sensible et efficace comme outil de dépistage des *Bacillus* solubilisant les phosphates, de déterminer l'effet du sel sur la capacité de la solubilisation et enfin de tenter de restaurer cette activité par l'apport de molécules osmoprotectrices: proline et glycine-bêtaïne.

II- Matériels et méthodes

II-1 Souches bactériennes

Les souches de *Bacillus* utilisées (n=10) sont choisies parmi les meilleures souches solubilisant les phosphates (voir partie A) issues des trois sols et désignées comme suit:

- Sol 1 : 3 souches (B8, B14, B18),
- Sol 2 : 4 souches (Ba5, Ba7, Ba11, Ba12)
- Sol 3 : 3 souches (D1, D6, D13) .

II-1-1 Milieux de culture utilisés

La capacité de solubilisation du phosphate tricalcique (PTC) par les *Bacillus* est testée sur trois milieux différents (Tab.19) :

- Le milieu Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948),
- le milieu National Botanical Research Institutes's growth medium (NBRIP) (Nautiyal ,1999)
- le milieu LB (Luria-Bertani).

Il existe une similitude de composition chimique entre le PVK et le NBRIP. Ils partagent les composants fondamentaux en sels. Le PVK contient plus de micronutriments et a une plus forte concentration de sel. Le milieu LB n'est pas un milieu standard pour l'isolement des MSP mais largement utilisé pour la culture de *Bacillus*. De plus, il contient la même source de carbone, le glucose comme le PVK et le NBRIP (Tab.19).

Tab. 19 : Compositions des milieux de culture.

Composants du milieu	Quantité (g l ⁻¹)		
	PVK	NBRIP	LB
Glucose	10	20	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	5	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0.1	—
NaCl	0.2	—	10
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.1	0.25	—
MgCl ₂ -6H ₂ O	—	10	—
KCl	0.2	0.2	—
Extrait de levure	0.5	0.1	5
MnSO ₄ -H ₂ O	0.002	—	—
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.002	—	—
Tryptone	—	—	10
Agar*	15	15	15
pH	7.0±0.2	7.0±0.2	7.0±0.2

PVK, le milieu de Pikovskaya; **NBRIP**, le milieu de National Botanical Research Institute phosphate; **LB** milieu de Luria-Bertani.

*pour les milieux solides.

II-2 Test de solubilisation en milieu solide

La capacité de solubilisation des PTC des bactéries isolées est testée selon la méthode décrite par Nautiyal (1999). 10µl de la culture de chaque souche sont déposés en spot à la surface du milieu solide. La capacité de solubilisation est évaluée par la formation d'un halo transparent autour de la colonie. Après 10 jours d'incubation, le diamètre du halo de solubilisation est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total.

II-3 Test de solubilisation en milieu liquide

Pour une estimation quantitative du phosphore solubilisé, 100 µl d'une culture jeune de chaque isolat sont inoculés dans des tubes contenant 10 ml de milieu NBRIP, PVK et LB liquides. Les milieux inoculés sont incubés à 30°C /10 jours. Les cultures sont centrifugées à 3000 rpm pendant 20 minutes. La quantité du P soluble est mesurée dans le surnageant par la méthode colorimétrique de Olsen (Olsen et Sommers, 1982).

II-4 Estimation de la solubilisation sous stress salin

Afin de sélectionner les souches les plus actives sous conditions salines, la capacité de solubilisation des différents isolats est testée en utilisant le bouillon NBRIP additionné de concentrations croissantes de NaCl (0%, 2%, 4%, 6% et 8%). Les milieux inoculés par 100 µl d'une culture jeune de chaque isolat sont incubés à 30°C/5 jours. Trois répétitions sont réalisées. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 20 min. Le P soluble est déterminé par la méthode colorimétrique sur le surnageant.

II-5 Effet des osmoprotecteurs

Il s'agit de déterminer l'effet des osmoprotecteurs; proline et glycine bêtaïne, sur la restauration ou l'amélioration de la capacité de solubilisation des *Bacillus* en présence de sel. Deux souches (D1 et D13) donnant les meilleurs taux de phosphate soluble en présence de sel sont utilisées pour ce test. Le milieu NBRIP aux différentes concentrations de sels (0%, 2%, 4%, 6% et 8%) est additionné de proline ou de glycine bêtaïne à la concentration finale de 1mM. Ce milieu inoculé par 100µl d'une culture jeune est incubé à 30°C/5 jours. Le NBRIP est ensuite centrifugé et le P soluble du surnageant est évalué (Olsen et Sommers, 1982). Le pH du filtrat est déterminé dans chaque cas.

II-6 Analyse statistique

Les résultats sont présentés graphiquement par l'utilisation du logiciel GraphPad Prism 5 demo. Toutes les expériences sont réalisées en triplicata. Les valeurs moyennes et les écart-type sont reportés sur les figures et les tableaux. L'analyse de la variance (ANOVA) des données est utilisée pour comparer les valeurs moyennes en utilisant le test Tuckey à la probabilité de 5%. La corrélation des données est effectuée par analyse de la régression. Tous les calculs statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel Assisat version 7.5 bêta.

III-Résultats

III-1 Solubilisation des phosphates

- Sur milieu solide

La solubilisation du PTC est révélée par l'apparition d'un halo de transparence autour de la colonie après 10 jours d'incubation à 30°C. L'efficacité des souches de *Bacillus* dépend étroitement de la nature du milieu. La solubilisation du PTC est quasi-totale sur PVK où les

souches présentent des halos de transparence appréciables essentiellement la Ba7 et la Ba11. 80% des souches utilisent le PTC sur NBRIP, les diamètres sont toutefois plus faibles. Sur milieu LB, aucune souche n'est active (Tab. 20) (Fig. 33).

Tab. 20: Solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sur milieux de culture solides par les souches de *Bacillus* (n=10).

Milieu	Halo (mm)	Nombre de souches à halo transparent	
	Intervalle	Moyenne	
PVK	01-09	3,7	10
NBRIP	01-05	1,65	08
LB	/	00	00

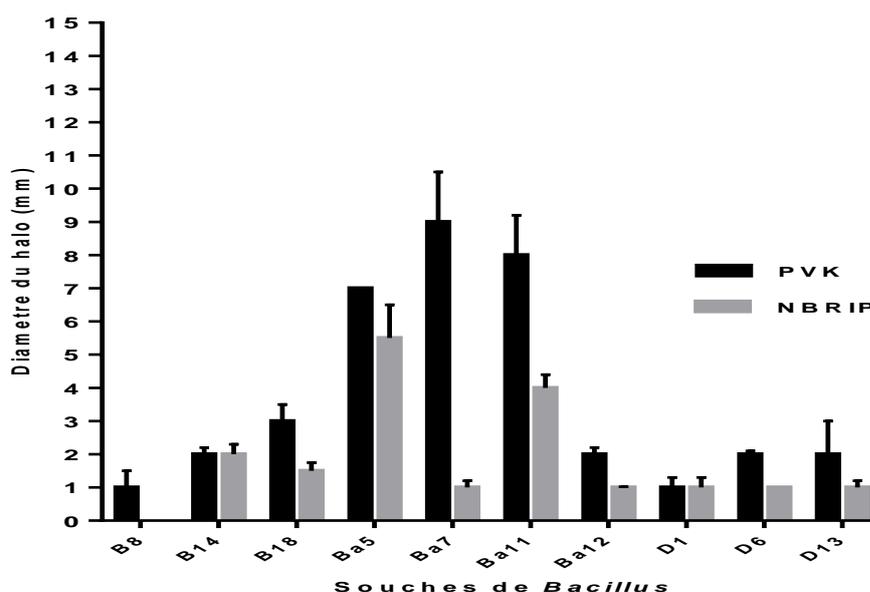


Fig. 33: Solubilisation du phosphate par *Bacillus* sur milieux solides PVK et NBRIP.

- Sur milieu liquide

L'analyse de la variance atteste des effets significatifs à $p < 0,01$ du milieu et de la souche (Tab. 21). La solubilisation du PTC sur PVK et NBRIP est similaire et meilleure que sur LB (Tab.22). La quantité de phosphate solubilisée par les différentes souches varie de 15.15 à 177.68 $\mu\text{g/ml}$ pour l'ensemble des milieux (Fig. 34). L'optimum est observé chez les

souches D13 et D1 avec des teneurs appréciables de 177.68 µg/ml et 171.56 µg/ml sur PVK et de 146.57 µg/ml et 173.28 µg/ml sur NBRIP. En revanche, sur LB, les résultats sont différents, la concentration maximale de phosphate soluble appartient à la souche B14 (83.97 µg/ml) suivie par Ba12 (79.82 µg/ml) et D13 (79.42 µg/ml). Les concentrations minimales sont notées chez la D6 (63.07 µg/ml) sur milieu PVK, la B14 (49.99 µg/ml) sur NBRIP et la Ba7 (15.15 µg/ml) sur LB.

Tab. 21 : Analyse de la variance de la solubilisation du PTC sur milieux liquides.

Sources de variation	Degré de liberté (DL)	Somme des carrées (SS)	Somme des moyennes (SM)	Test F
Milieux (M)	2	38562.15553	19281.07777	33.7160 **
Souches (S)	9	61459.11010	6828.79001	9.3673 **
Interaction (M)X(S)	18	48900.57034	2716.69835	3.7266 **
Erreur	54	39366.22691	729.00420	

** Significatif au seuil de probabilité de P<0.01.

Tab.22 : Solubilisation du Ca₃(PO₄)₂ sur milieux liquides par les souches de *Bacillus*.

Le milieu liquide	concentration de P soluble des isolats	
	intervalle	Moyenne
PVK	49-241	100.58270 a
NBRIP	40-211	94.80977 a
LB	11-112	54.07153 b

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (p> 0,05) selon le test de Tukey.

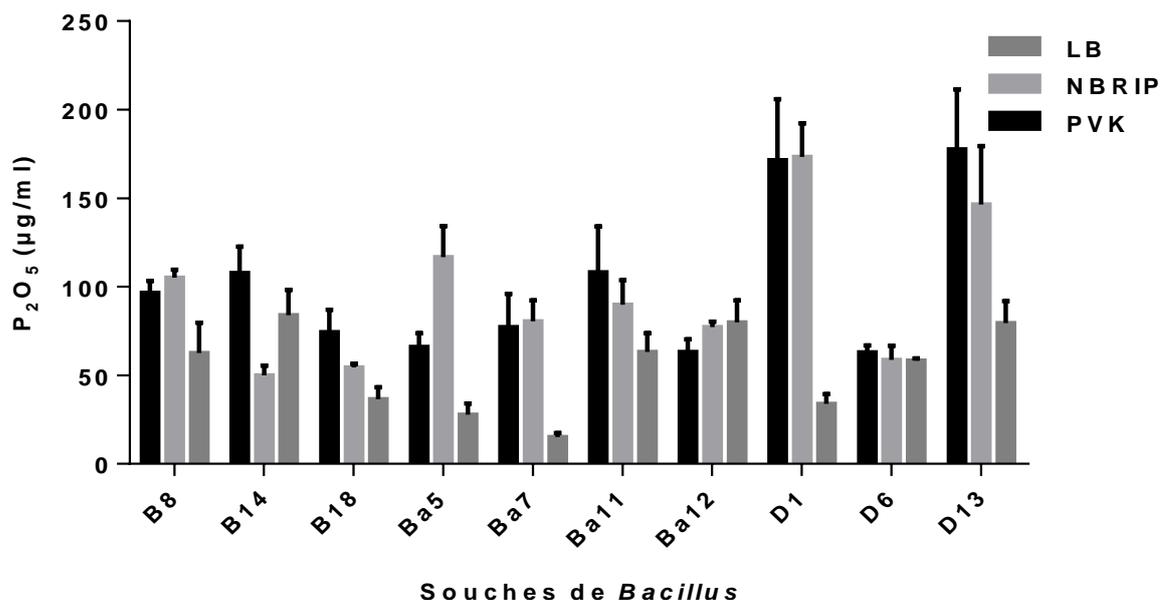


Fig. 34: Taux de phosphate solubilisé exprimé en P₂O₅ sur milieux liquides

La solubilisation du PTC s'accompagne d'une diminution du pH après dix jours d'incubation observée chez l'ensemble des souches et sur les trois milieux. L'analyse de la variance met en évidence l'effet significatif du pH du milieu et ce, en fonction des souches (Tab. 23). La baisse du pH en milieux PVK et NBRIP est sensiblement la même (Tab. 24). Tandis que celle du LB diffère. Les valeurs de pH pour l'ensemble des souches et pour les trois milieux varient de 4.59 à 6.54. Sur PVK et NBRIP la plus faible valeur est déterminée chez la souche Ba5 (4.72 et 4.59 respectivement). Le pH le plus élevé est observé chez la Ba12 (5.78) sur PVK, la D1 (5.80) sur NBRIP et la Ba5 (6.54) sur LB (Fig. 35).

Tab. 23: Analyse de la variance du pH dans les trois milieux.

Sources de variation	Degré de liberté (DL)	Somme des carrées (SS)	Somme des moyennes (SM)	Test F
Milieux (M)	2	3.55271	1.77636	12.3486 **
Souches (S)	9	2.95978	0.32886	5.6302 **
Int. MxS	18	3.59542	0.19975	3.4197 **
Erreur	81	4.73130	0.05841	

** Significatif au seuil de probabilité de P < 0.01.

Tab. 24: Valeurs de pH des trois milieux.

Milieu liquide	pH	
	intervalle	Moyenne
PVK	4.72-5.78	5.17425b
NBRIP	4.59-5.80	5.17575b
LB	4.85-6.54	5.54a

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) selon le test de Tukey.

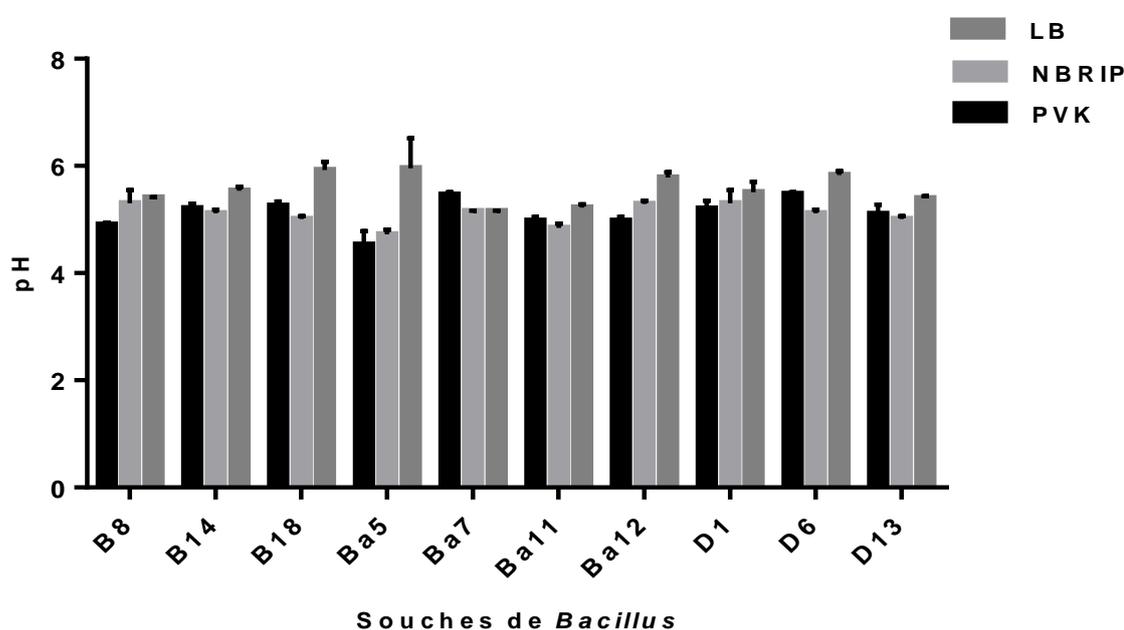


Fig. 35 : Valeurs de pH des trois milieux liquides

III-2 Corrélation entre le pH et le P soluble

L'analyse des résultats effectués entre la quantité de P solubilisé et le pH du milieu révèle une corrélation négative ($r = -0.4113$) pour le PVK, positive ($r = 0.3683$) pour le NBRIP et non significative pour le LB (Tab. 25). En effet, l'analyse de la corrélation montre que plus le pH du milieu est bas plus le P est solubilisé.

Tab.25 : Analyse de la corrélation entre la concentration de P soluble et le pH des milieux.

Milieu	Coefficient de corrélation	
	r	P
PVK	-0.4113*	(0.01 =< p <0.05)
NBRIP	0.3683*	(0.01 =< p <0.05)
LB	0.0983 ns	(p >= 0.05)

analyse de la régression de la concentration du P et du pH des milieux.

* Significative au seuil de 0.05.

ns non-significative au seuil de 0.05.

III-3-Comparaison entre la solubilisation du P dans le milieu liquide et solide

L'analyse de la corrélation entre la solubilisation du P sur PVK solide et liquide (Tab. 26) est non significative. La souche Ba7, la plus efficace sur milieu solide, est classée en sixième position sur milieu liquide. De plus, la D13, ayant une zone claire de 2 mm de diamètre, atteint le maximum de solubilisation sur milieu liquide. A l'inverse, dans le NBRIP, la relation est significative. Les souches qui solubilisent le PTC sur milieu solide deviennent plus efficaces sur milieu liquide. Cependant, la relation n'existe pas entre le LB liquide et solide du fait que les souches n'ont montré aucune zone transparente sur le LB solide.

Tab. 26 : Corrélation entre la solubilisation du PTC dans le milieu solide et liquide.

Corrélation	Coefficient de corrélation
PVK	0.0424 ns
NBRIP	0.3683*
LB	/

* Significative au seuil de 0.05.

ns Non-significative au seuil de probabilité de 0.05.

III-4 Effet du stress salin sur la solubilisation

L'ensemble des souches sont testées sur milieu NBRIP en présence de concentrations croissantes de sel (0, 2, 4, 6, et 8%) incubées à 30°C/5 jours. L'analyse de la variance met en évidence l'effet significatif du sel et une variabilité de la capacité à solubiliser le P

(Tab.27). Toutes les souches présentent une diminution du taux de solubilisation à la teneur maximale en NaCl usitée (8%). En absence de NaCl, les souches D1 et D13 sont les plus performantes (121.84 µg/ml et 112.83 µg/ml respectivement). Leur efficacité diminue, cependant, avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Ba11 et Ba5 manifestent une capacité de solubilisation élevée à 2% de NaCl (88.50 µg/ml et 78.73 µg/ml respectivement). La production de P soluble par la B18 augmente sensiblement à 4% de NaCl (51.47 µg/ml). Il en est de même pour la Ba7 (75.80 µg/ml) à 6% de sel. Les souches D6, B14 et Ba12 donnent une quantité très faible de P soluble qui diminue aussi avec les niveaux élevés de la salinité (Tab. 28).

Tab. 27: Effet des concentrations de sel sur la solubilisation de P sur NBRIP

La source de variation	D.L	S.C	S.M	Le test F
Salinité (S1)	4	39192.47649	9798.11912	127.7139 **
Souches (S)	9	28740.76307	3193.41812	50.2937 **
Int. S1xS	36	44669.14691	1240.80964	19.5417 **
Erreur	90	5714.58166	63.49535	

** Significatif au seuil de probabilité de 0.01.

La solubilisation, en milieu liquide, est toujours accompagnée d'une baisse de pH du milieu. L'analyse de la variance indique aussi un effet significatif ($P < 0.01$) dans l'abaissement du pH de milieu pour l'ensemble des souches (Tab. 29).

Tab. 29 : Analyse de la variance du pH sous les conditions salines.

La source de variation	D.L	S.C	S.M	Le test F
Salinité (S1)	4	8.36057	2.09014	84.3207 **
Souches (S)	9	15.45133	1.71681	30.7874 **
Int. S1xS	36	9.50120	0.26392	4.7329 **
Erreur	90	5.01872	0.05576	

** Significatif au seuil de probabilité de 0.01.

Tab. 28: Taux de phosphore solubilisé par les souches de *Bacillus* en fonction de la salinité.

Souches										
NaCl	B8	B14	B18	Ba5	Ba7	Ba11	Ba12	D1	D6	D13
0%	44.08±12.43 _{aCDE}	24.37± 2,67 _{abE}	50.08± 0.61 _{bcCD}	64.75 ±4.06 _{aBC}	51.91 ±4.02 _{bc}	76.00 ±2.84 _{abB}	29.28± 1.45 _{aDE}	121.84 ±2.83 _{aA}	26.10 ±5.90 _{aE}	112.83 ±4.63 _{aA}
2%	58.77± 9.07 _{aCD}	26.15± 1.88 _{abE}	65.02±4.67 _{abBCD}	78.73 ±5.67 _{aABC}	57.38 ± 2.79 _{bd}	88.50± 1.86 _{aA}	31.78± 2.97 _{aE}	86.68 ±3.06_{ba}	20.99±1.05 _{abF}	81.89 ±3.47_{baB}
4%	51.47± 5.40 _{aBC}	31.94±2.44 _{aCD}	78.54 ±16.93_{aA}	65.99± 5.99 _{aAB}	75.80 ±8.57 _{aA}	65.89 ±3.18 _{baB}	35.26± 0.92 _{aCD}	27.28 ±2.75 _{cd}	20.39±1.15 _{abD}	37.08 ±1.81 _{cd}
6%	20.59 ±2.37 _{bBC}	9.69±0.31 _{abBC}	37.95 ±4.31 _{cAB}	26.63± 0.49 _{bABC}	45.67 ±1.31 _{ba}	17.97 ±2.76 _{cBC}	32.96±2.15 _{aABC}	18.37 ±1.91 _{cBC}	16.54±3.21 _{abC}	31.38±5.07 _{cABC}
8%	12.08 ±1.87 _{bc}	8.17 ±1.43 _{bc}	38.35 ±1.91 _{cAB}	22.72± 0.23 _{bABC}	43.50 ±1.10 _{ba}	12.88 ±1.30 _{cC}	22.00 ±5.57 _{aBC}	11.27 ±1.74 _{cc}	6.81 ±1.23 _{bc}	10.14 ±5.19 _{dc}

Valeurs moyennes de pH ± the SD. Moyennes ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement selon le test de Tukey (p>0.05)

En absence de NaCl, le pH du milieu varie de 4,69 à 6,23, il est sensiblement acide pour les souches Ba5 , D1 et D13 et proche de la neutralité pour les autres souches. A des concentrations salines croissantes, le pH augmente atteignant la valeur maximale (pH=6) pour la quasi-totalité des souches (Tab. 30).

En plus, une corrélation négative significative ($r = -0.6758$) au seuil de 0.01 est observée entre la solubilisation de PTC et la diminution de pH du milieu (Tab. 31).

Tab. 31: Corrélation entre le P soluble et le pH du milieu sous stress salin.

Corrélation	r	significative
P x pH	-0.6758	**

III-5- Effet des osmoprotecteurs sur la solubilisation du P .

Les souches D1 et D13 sont retenues pour l'étude de leurs éventuelles réponses aux osmoprotecteurs puisqu'elles présentent les meilleurs taux de solubilisation et une prédisposition de résistance à la salinité à 2%. Ces souches sont utilisées pour tester l'effet de l'apport exogène des osmoprotecteurs (P et GB) sur la restauration de l'activité de solubilisation des phosphates. Après incubation (30°C/5j), l'activité des souches D1 et D13 sur milieu NBRIP est largement affectée par l'apport de NaCl. Toutefois, l'addition de proline et glycine bétaine (1mM) au milieu NBRIP ne permet pas de lever ou d'atténuer l'effet du stress salin sur la production des phosphates solubles (Tab. 32, Fig. 36) et sur le pH du milieu (Tab. 33).

Tab. 30: Valeurs du pH du milieu NBRIP aux différentes concentrations de NaCl

Souches										
NaCl	B8	B14	B18	Ba5	Ba7	Ba11	Ba12	D1	D6	D13
0%	5.56±0.18 ^{bcBC}	6.23±0.35 ^{abA}	5.56±0.29 ^{bBC}	4.63±0.66 ^{bE}	5.17±0.09 ^{bCDE}	5.30±0.56 ^{bCD}	6.01±0.07 ^{aAB}	4.91±0.17 ^{bDE}	5.95±0.09 ^{aAB}	4.69±0.26 ^{bDE}
2%	5.40±0.31 ^{cABC}	6.02±0.05 ^{abA}	5.90±0.16 ^{abA}	4.73±0.12 ^{bD}	5.15±0.06 ^{bCD}	5.27±0.61 ^{bBCD}	5.82±0.08 ^{aAB}	5.72±0.04 ^{aABC}	5.99±0.03 ^{aA}	4.72±0.73 ^{bD}
4%	5.48±0.13 ^{cBC}	5.89±0.10 ^{bAB}	6.32±0.04 ^{aA}	4.78±0.03 ^{bD}	5.22±0.11 ^{abCD}	6.06±0.02 ^{aAB}	5.55±0.16 ^{aBC}	6.06±0.06 ^{aAB}	6.10±0.06 ^{aAB}	5.70±0.29 ^{aABC}
6%	6.04±0.05 ^{abA}	6.14±0.07 ^{abA}	6.13±0.01 ^{aA}	5.61±0.06 ^{aAB}	5.14±0.08 ^{bB}	6.05±0.01 ^{aA}	5.77±0.18 ^{aAB}	6.00±0.05 ^{aA}	6.13±0.12 ^{aA}	5.64±0.34 ^{aAB}
8%	6.26±0.11 ^{aAB}	6.41±0.01 ^{aA}	6.07±0.10 ^{abAB}	6.07±0.01 ^{aAB}	5.72±0.38 ^{aB}	5.99±0.05 ^{aAB}	5.95±0.51 ^{aAB}	5.97±0.08 ^{aAB}	6.04±0.2 ^{aAB}	5.80±0.2 ^{aAB}

Valeurs moyennes de pH ± the SD. Moyennes ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement selon le test de Tukey (p>0.05)

Tab. 32 : Osmoprotection de la proline et de la glycine-bétaine sur la solubilisation des phosphates par *Bacillus*

Sources de variation	D.L	S.C	S.M	F
Salinité (S1)	4	1295.57324	323.89331	36.5502 **
Traitement (T)	2	195.01056	195.01056	6.5712 ns
Interaction (S1xT)	8	180.45726	45.11432	1.5202 ns
Souches (S)	1	155.70916	155.70916	6.7520 *
Int S1xS	4	876.97242	219.24310	9.5070 **
Int TxS	2	8.91136	8.91136	0.3864 ns
Int S1xTxS	8	149.67207	37.41802	1.6225 ns
Erreur	15	230.61280	23.06128	

**Significative à 1% ($p < .01$). * Significative à 5%. ns Non-significative à P5%

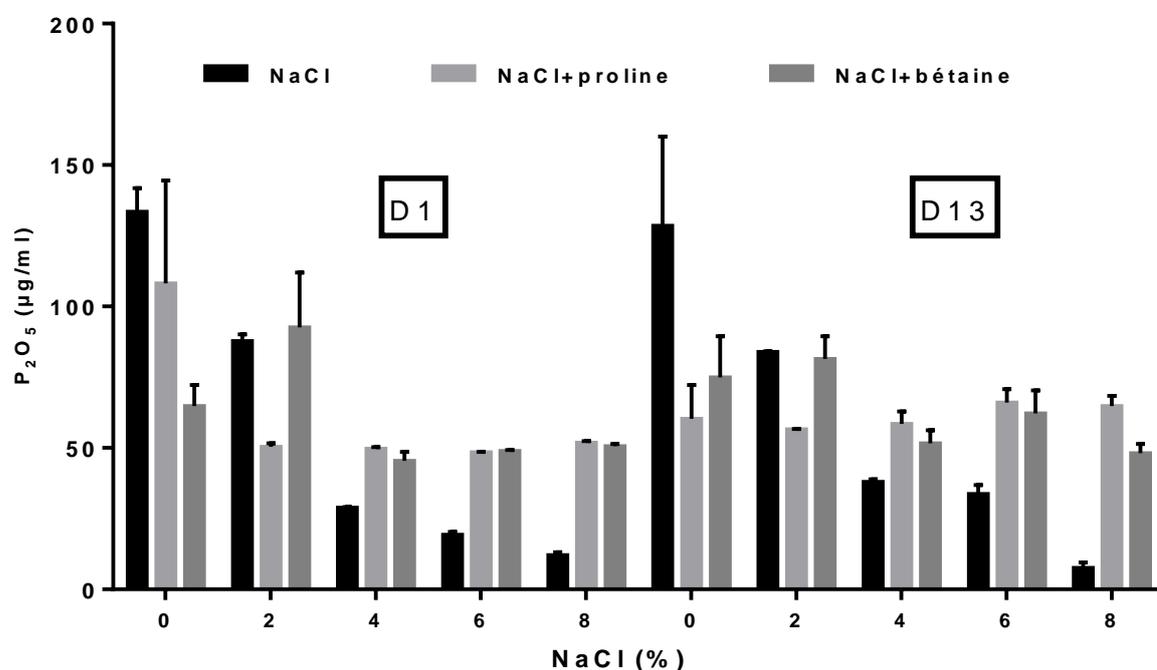


Fig. 36: Solubilisation du phosphate par D1 et D13 en présence de proline et de glycine bétaine sous différentes concentrations de NaCl.

Tab. 33 : Effet de la glycine-bétaine et de la proline sur le pH du milieu à différentes concentrations de NaCl.

Source de variation	D.L	S.C	S.M	Le test F
Salinité (S1)	4	1.07006	0.26752	10.4970 *
Traitement (T)	2	0.17689	0.17689	2.3565 ns
Int. (S1xT)	4	0.83449	0.20862	2.7792 ns
Souches (S)	1	0.06241	0.06241	6.1397 *
Int S1 x S	4	0.06777	0.01694	1.6666 ns
Int T x S	1	0.00841	0.00841	0.8273 ns
Int S1xTx S	4	0.12056	0.03014	2.9652 ns
Erreur	10	0.10165	0.01017	

* Significative à 5%. ns Non-significative à p 5%

De plus, une corrélation négative non significative ($r = -0.2900$) est constatée entre le pH du milieu et la capacité de solubilisation du PTC en présence de sel et d'osmoprotecteurs (Tab. 34).

Tab. 34: Corrélation entre le P soluble et le pH du milieu présence de sel et d'osmoprotecteurs.

Corrélation	r	Significative
pH x P	-0.2900	ns

IV-Discussion

De par leur propriétés intrinsèques, les *Bacillus* possèdent plusieurs mécanismes ayant des effets bénéfiques sur les plantes. L'une des principales activités améliorant la croissance des végétaux est l'alimentation minérale en phosphate. Les espèces de *Bacillus* (*polymyxa*, *subtilis*, *B. sp1*) sont parmi les communautés bactériennes les plus performantes dans la solubilisation (Illmer et Schinner 1992; Wani *et al.* 2007)

L'étude comparative des trois milieux utilisés atteste de la performance du PVK et NBRIP solides et liquides. Ils ont une efficacité de solubilisation équivalente et meilleure par rapport au milieu LB. Le choix du milieu retenu pour l'étude de la solubilisation du

phosphate dépend de l'espèce isolée. Les milieux NBRIP et PVK solides ont montré des résultats similaires. Toutefois, le bouillon NBRIP a été plus efficace par rapport au PVK liquide. Ceci classe le NBRIP liquide meilleur milieu pour l'identification de la plupart des MSP (Nautiyal *et al.*, 2000).

Lors de la solubilisation du phosphate, les bactéries acidifient le milieu par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétion de H^+ . Par conséquent, le P peut être libéré par la substitution des protons ou par la complexation du Ca^{2+} (Fox *et al.*, 1990; Illmer et Schinner, 1992; Whitelaw *et al.*, 1999; Whitelaw, 2000; Takeda et Knight, 2006). Le type d'acide produit dépend du micro-organisme. Il est établi que les souches de *Bacillus* libèrent l'oxalate, 2- cétoglutarate et le succinate (Banik and Dey 1983). D'autres souches de *Bacillus atrophaeus*, *amyloliquefaciens* et *licheniformis* solubilisent le phosphate par la production d'acides organiques volatiles (acétate, isobutyrate, isovalérate et valérate) et non volatiles (lactate, fumarate et succinate) (Vazquez *et al.*, 2000).

Concernant la chute du pH, elle est probablement associée à l'excrétion de H^+ ou la production d'acides organiques par les souches de *Bacillus*. L'acidification du milieu est importante dans la solubilisation du PTC, elle est observée dans les trois milieux liquides PVK, NBRIP et LB. Le pH diminue surtout dans le milieu NBRIP où l'on assiste à la quantité maximale de P soluble. Il existe donc une corrélation significative entre pH et solubilisation de P. Ces résultats sont constatés par Kumar et Narula (1999) et Whitelaw (2000). L'absence d'une corrélation entre la concentration de P soluble et le pH dans le LB suggère que la solubilisation des PTC n'est vraisemblablement pas attribuable uniquement à l'excrétion de H^+ et la production d'acides organiques (Altomare, 1999). Il est probable qu'il existe un autre mécanisme de solubilisation (Kim *et al.*, 1997). De plus le milieu LB contient une grande concentration d'extrait de levure qui pourrait exercer un effet tampon (Nautiyal, 1999).

Les milieux liquides offrent la meilleure détection de la solubilisation du PTC que les milieux solides. Comme l'attestent les performances de la plupart des souches de *Bacillus*, la diffusion des acides produits est aisée en comparaison avec les milieux solides où la circulation des molécules est limitée. Ainsi, les souches sur milieux solides peuvent ne pas utiliser la même voie métabolique que celle utilisée sur milieux liquides. La dégradation des substrats varie d'un isolat à l'autre en raison de la variabilité génétique. L'utilisation d'une source de carbone par un organisme dépend de son système enzymatique (Brock *et al.*, 1994).

L'absence de corrélation entre le PVK et LB liquide et solide révèle une différence dans la capacité de solubiliser le PTC. La solubilisation sur milieu solide ne serait pas une technique

fiable par rapport au milieu liquide (Nautiyal, 1999). La relation significative existant entre les deux textures du milieu NBRIP indique que les souches formant un halo sur milieu solide solubilisent mieux sur milieu liquide. Ce résultat est similaire à ceux d'Edi-Premono *et al.* (1996) et Kumar et Narula (1999). Cette propriété détectée par la formation d'une zone claire constitue une procédure facile à réaliser. Les milieux solides peuvent être adaptés à un examen préliminaire. La disponibilité des nutriments en milieu solide est en quelque sorte restreinte en raison de la disponibilité en eau. Parallèlement les micro-organismes dans le sol se trouvent dans des conditions identiques de disponibilité des éléments nutritifs en raison des propriétés du sol. Les milieux solides reflètent de plus près les conditions du sol. Les milieux liquides sont plutôt utiles dans le dosage et l'étude des mécanismes de solubilisation. Le degré d'halotolérance des souches de *Bacillus* cultivées sur milieu NBRIP est variable. Nos résultats révèlent une capacité, même minime, de solubilisation du PTC jusqu'à 8 % de NaCl chez l'ensemble des souches. Elle est maximale à 2% de NaCl pour les souches D1 et D13. Au delà de 4%, l'activité des souches est inversement proportionnelle à la concentration de sel. Cependant, certaines souches présentent une amélioration de la solubilisation en présence de sel à 2% pour les souches B8, Ba5 et Ba11 et à 4% pour la Ba12, la B14, la B18 et la Ba7. Des résultats similaires sont rapportés par Kim *et al.* (1997) et Kang *et al.* (2002) où la solubilisation de phosphate est améliorée en présence de 1% de NaCl. Une étude similaire portant sur un nombre de 57 souches de *Bacillus* révèle que 18 d'entre elles sont actives en présence de 5% de NaCl, tandis que 2 autres perdent cette capacité en absence de NaCl (Johri *et al.*, 1999). La souche *Bacillus* sp. TRB16 est maximale en présence de 2.5% NaCl (Banerjee *et al.*, 2010). Selon, Rosado *et al.* (1998) la solubilisation peut être réalisée en présence de 10% de NaCl. Une tendance générale à la baisse de l'activité après augmentation de la concentration de NaCl est néanmoins constatée. Deux explications sont avancées : le sel affecte négativement la croissance et la prolifération cellulaire entraînant une perte de l'efficacité de la solubilisation ou les ions Cl⁻ séquestrent ou neutralisent les protons ou les acides produits dans le milieu. La tolérance des souches de *Bacillus* au sel est un caractère propre à chaque souche. En effet, l'environnement de prélèvement stressant (salinité, pH élevé), favorise le développement de bactéries performantes. Il est convenu que le stress est un inducteur de l'activité des espèces bactériennes (Banarjee *et al.*, 2010).

Les bactéries doivent en permanence adapter leur physiologie aux fluctuations des facteurs physico-chimiques du milieu environnant. Les mécanismes adaptatifs mis en œuvre incluent l'accumulation des osmoprotecteurs. La plupart des espèces de *Bacillus* ont la capacité

d'accumuler sous des conditions stressantes la proline (Whatmore *et al.*, 1990) ou la glycine bétaine (Kappes *et al.*, 1996). La capacité de solubilisation des deux souches D1 et D13 n'est pas restaurée ou améliorée par l'apport exogène des molécules osmoprotectrices. Ceci s'expliquerait par la déficience de leur système enzymatique nécessaire pour le transport et l'accumulation des osmoprotecteurs. De plus, les bactéries en présence de sel peuvent accumuler les osmolytes pour ajuster la pression osmotique interne et assurer la stabilité de certaines protéines actives aux dépens d'autres activités enzymatiques perdues à cause de l'altération de leurs propriétés électrostatiques (Arakawa and Timasheff, 1985). Les approches protéomiques ont montré que l'adaptation au stress est accompagnée d'un profond changement du métabolisme cellulaire (spécialement la glycolyse) (Barth *et al.*, 2000; Marceau *et al.*, 2002; Prasad *et al.*, 2003).

D - Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpho- biochimiques du blé en milieu salin.

Le but de ce test est d'apprécier les effets de l'inoculation par *Bacillus* sp sch1 et/ou par *Pantoea agglomerans* lma2 sur la croissance des graines de blé sous stress salin.

I –Matériel végétal

Les graines d'une variété locale de blé dur Waha (*Triticum durum* L.c.v Waha) sont utilisées. Elles ont été fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) de Sétif – Algérie.

II- Inoculation bactérienne et conditions de croissance

Les deux souches bactériennes *Bacillus* sp sch1(B) et *Pantoea agglomerans* lma2 (P) sont cultivées à 30°C/ 48 h sur bouillon nutritif. Les cultures sont centrifugées (12000rpm/10mn) et rincées deux fois dans du PBS puis ajustées à une densité voisine de 10^8 bactéries/ml pour chaque souche.

D'un autre côté, les graines de blé de la variété Waha sont stérilisées en surface avec une solution d'hypochlorite de sodium (2%) pendant 30 mn et rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont laissées à germer sur du papier filtre placé au fond de boîtes de Pétri contenant 15ml d'eau distillée stérile à 20°C/ 48 h à l'obscurité. L'inoculation se fait après immersion des graines dans la suspension bactérienne pendant 30mn. Les graines non inoculées (témoin) sont immergées dans de l'eau distillée stérile.

Des pots en plastique ($\Phi=10$ cm) dont la surface interne est désinfectée à l'alcool sont remplis de 200g de sable ordinaire préalablement lavé abondamment à l'eau de robinet et stérilisé à l'autoclave 120°C/ 1h durant 3 jours successifs. 20ml de solution d'Hoagland (Annexe 10) au $\frac{1}{2}$ sont ajoutés dans chaque pot. Les pots sont ensuite divisés en 3 groupes et chaque groupe est subdivisé en 4 sous groupes. Les 3 groupes représentent les concentrations de NaCl utilisées (Contrôle, 100et 200mM). Les 4 sous groupes indiquent le type de traitement (Témoin, P, B, P+B).

- 1- Témoin (Contrôle, 100 et 200mM)
- 2- P (Contrôle, 100 et 200mM)
- 3- B (Contrôle, 100 et 200mM)
- 4- B+P (Contrôle, 100 et 200mM)

Les graines traitées sont semées à raison d'une graine par pot à une profondeur de 1cm de la surface. L'expérience est réalisée en triplicata. Elle a été conduite pendant 45 jours dans une chambre de croissance (phytotron) avec une moyenne de températures diurnes/nocturnes de 26° C et 16° C respectivement et une photopériode 16 h d'éclairage de 2100 lux. L'humidité du sol est ajusté et maintenue constante durant l'expérience par arrosage avec de l'eau distillée stérile.

III- Analyse des paramètres morpho- biochimiques des plantes

III-1 Paramètres morphologiques

Au stade 4 à 5 feuilles les plantes sont récoltées et lavées à l'eau distillée. Les racines et les feuilles sont séparées. Leurs tailles et leurs poids frais et secs (après 72h à 65°C) sont déterminés.

III-2 Paramètres biochimiques

III-2-1 Dosage de la chlorophylle

Les chlorophylles a et b sont déterminées selon la méthode de Arnon (Arnon, 1949). 0,5g des feuilles de chaque échantillon sont découpées en petits segments de 0,5cm et homogénéisés dans 80% d'acétone à - 10°C. L'extrait est centrifugé à 14000xg/5mn et l'absorbance du surnageant est lue à 663 et 645 nm pour déterminer les chlorophylles a et b respectivement.

Ch a (mg/l) = 12,41 DO (663) - 2,59 DO(645).

Ch b (mg/l) = 22,9 DO(645) – 4,68 DO(663).

Ch t = Ch a + Ch b

Ch a: concentration en chlorophylle a.

Ch b: concentration en chlorophylle b.

Ch t: concentration en chlorophylle totale

III-2-2 Contenu en Na⁺ et K⁺ des feuilles et des racines

Les concentrations de Na⁺ et K⁺ foliaires et racinaires sont déterminées par spectrophotométrie de flamme (Jenwah) après digestion de la matière sèche (0,1g de feuilles et 0,05g de racines) dans 10 ml de H₂SO₄ à 98% et 3ml de H₂O₂ à 30% pendant 5h selon la méthode de Skoog *et al* (2000).

III-2-3 Dosage de la proline

Les échantillons des feuilles et des racines fraîches sont conservés au dessous de -15°C avant analyse. L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par Naidu (1998). 500mg de feuilles sont placés dans des tubes de centrifugation contenant 5ml d'un mélange méthanol: chloroforme: eau (60: 25: 15 par volume). Les tubes scellés sont chauffés à 60°C dans un bain-marie pendant 2 h puis centrifugés à $10000 \times g/10\text{mn}$.

La teneur en proline est déterminée par une méthode rapide développée par Singh *et al.* (1973) qui consiste à introduire dans un tube de 10ml, 1ml de surnageant, 4ml de solution de ninhydrine et 4ml d'acide acétique glacial puis compléter par de l'eau distillée. Ce mélange est chauffé à 90°C au bain-marie pendant 45mn et refroidi à la température ambiante. L'absorbance est lue à 520 nm .

III-2-4 Analyse statistique

L'ensemble des résultats ont été soumis à l'analyse de la variance (ANOVA) multifactorielle à l'aide du logiciel Assistat 7.6 Beta développé par Pr. Francisco de Assis (Department of Agricultura Engineering of the Center of Technology and Natural Resources of the Federal University of Campina Grande City, Brazil). Chaque résultat est la moyenne de trois répétitions.

IV- Résultats

IV-1 Paramètres morphologiques

L'analyse de la variance des poids frais et secs des racines et des feuilles, de l'allongement racinaire et de la hauteur de la plante montre que la salinité réduit significativement ces différents paramètres de croissance ($P \leq 0,01$) et que l'effet de l'inoculation est bénéfique (Tab.35).

L'inoculation par B, P et B+P augmente la masse pondérale fraîche à tous les niveaux de salinité (100 et 200 mM) de 74.44%, 46.70% et 8.66% respectivement. Les poids secs des feuilles donnent un meilleur résultat après inoculation par B de 38% à 100 mM et de 158% , 37% et 108% après inoculation par B, P et B+P à 200 mM de NaCl respectivement. Alors qu'en absence de sel le traitement est sans effet (Fig. 37).

La mesure des poids frais et secs des racines fait ressortir un effet positif visible de l'inoculation par B, P et B+P en présence et en absence de sel. De plus, la masse sèche et

fraiche racinaire en présence de B à 100 et 200mM de NaCl est améliorée de 2.5 et de 0.5 fois par rapport à la masse du témoin (Fig. 38).

L'autre aspect morphologique de l'effet de l'inoculation se manifeste par une élévation de la taille de la plante, racinaire et foliaire, à tous les niveaux de salinité. Dans ce cas, la souche B est plus performante que la souche P seule ou leur association B+P (Fig. 39, 40). Les longueurs foliaires affichent un accroissement de 27.31% pour B, 15.90% pour P et seulement 8.62% pour l'association B+P. Cependant, le développement racinaire est stimulé par l'inoculation bactérienne dans les trois cas (B, P et B+P) où l'on assiste à un rehaussement de la longueur de 64.70%, 50.94% et 31.29% respectivement.

Tab. 35 : Analyse de la variance des carrés moyens des résultats des poids frais et sec foliaires et racinaires , de la hauteur de la plante et de longueur des racines

Source de variation	dl	Poids frais des feuilles	Poids frais des racines	Poids sec des feuilles	Poids sec des racines	Hauteur de la plante	Longueur des racines
Salinité(S)	2	6231000**	54160**	183300**	26570 **	45.62**	97.77**
Inoculation(I)	3	73420**	18700**	39540**	6651**	0.6786 **	74.53**
Interaction (SxI)	6	20600ns	5592*	4004 ns	466.2 *	4.312 ns	32.73ns
Erreur	18	10350	1846	2044	133.4	2.323	46.14

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

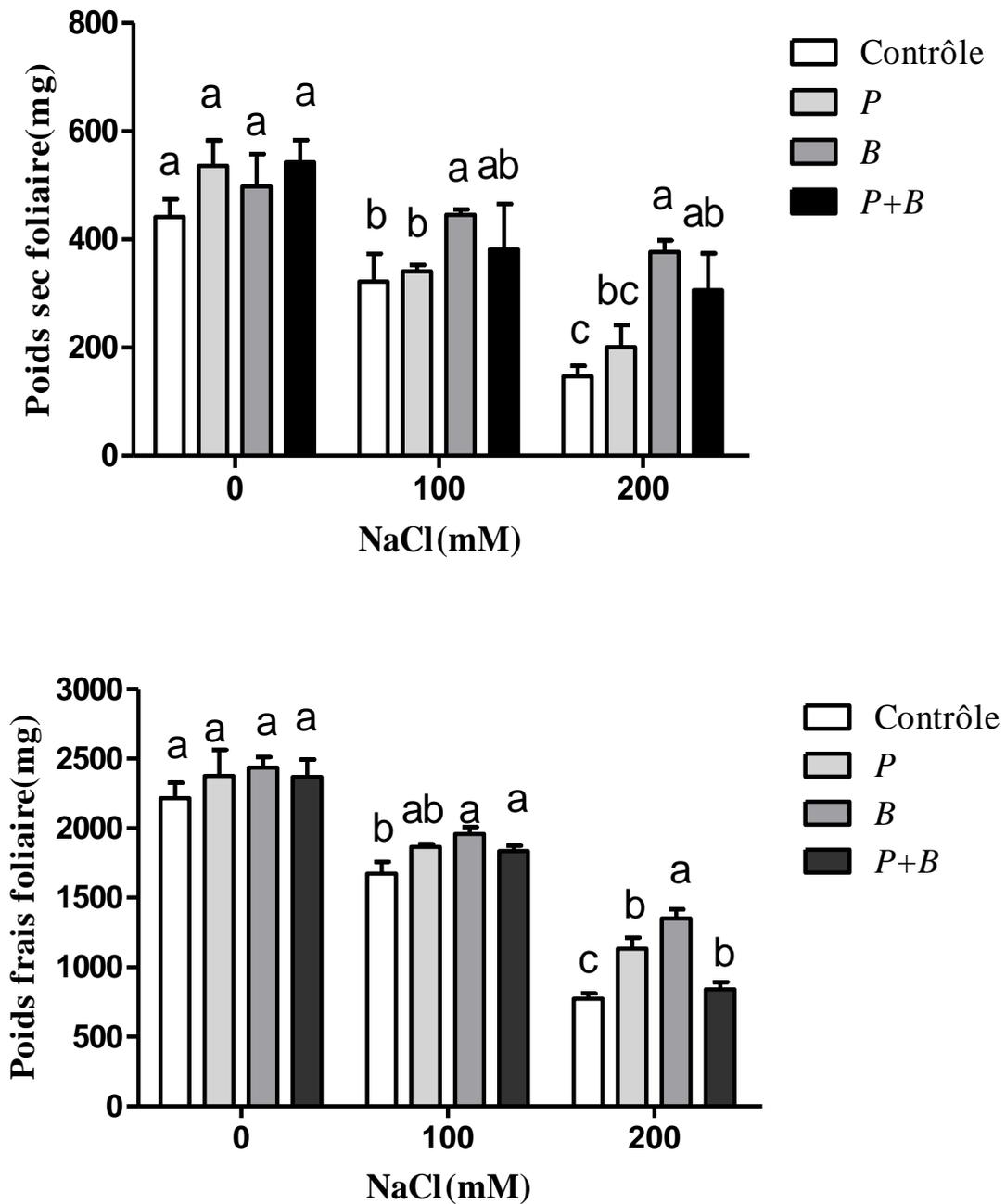


Fig.37 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la matière fraîche et sèche foliaire (mg) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl. Les effets des concentrations salines correspondant à chaque traitement et ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

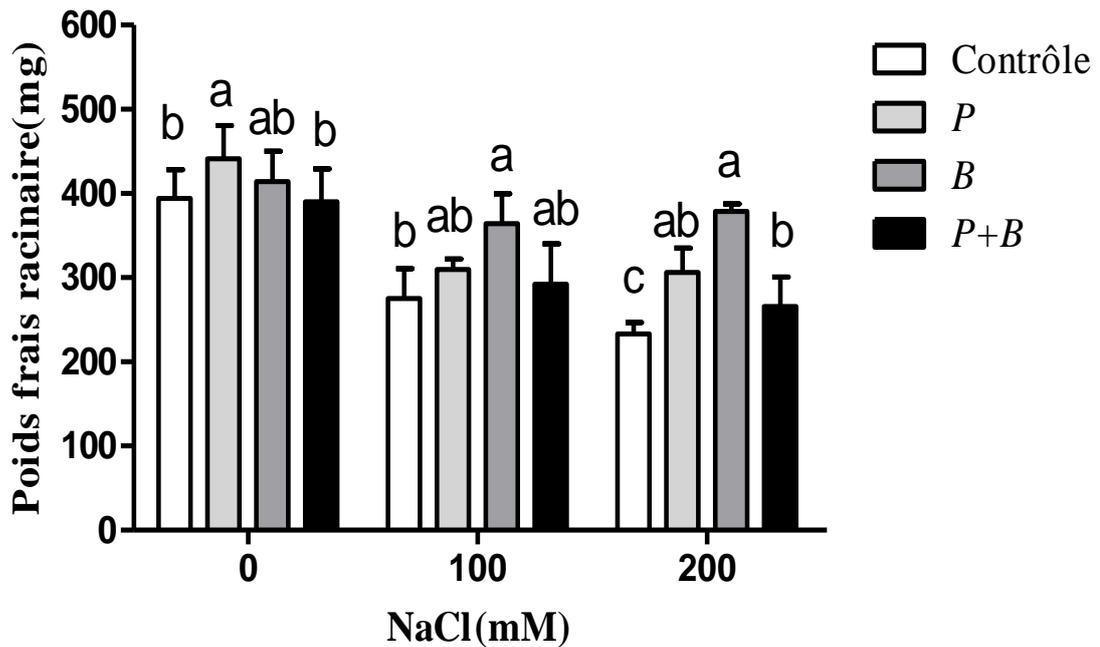
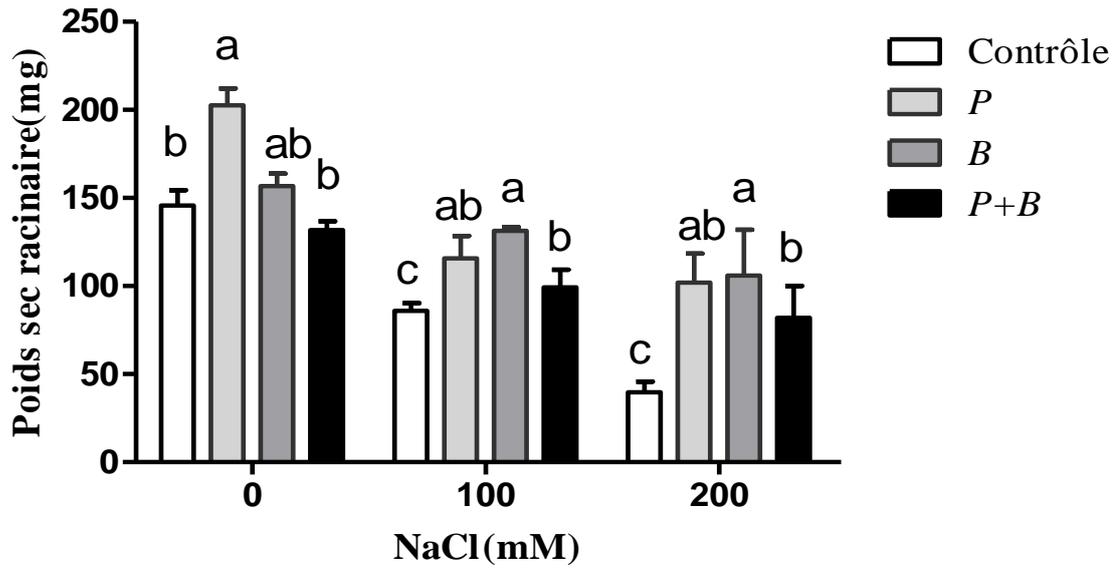


Fig.38 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la matière fraîche et sèche racinaire (mg) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl. Les effets des concentrations salines correspondant à chaque traitement et ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

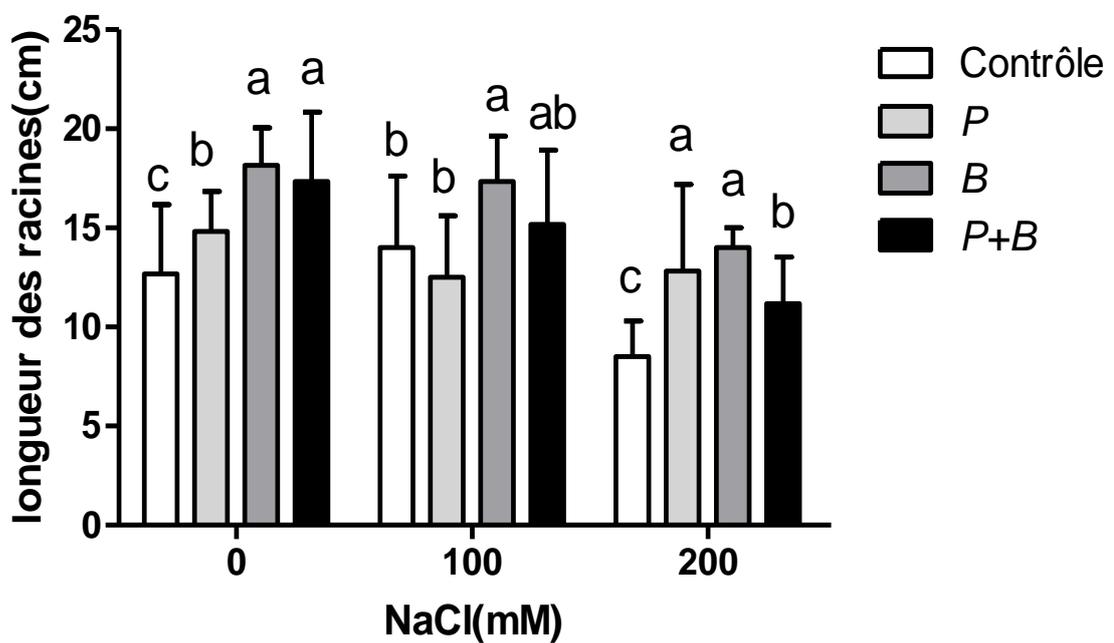
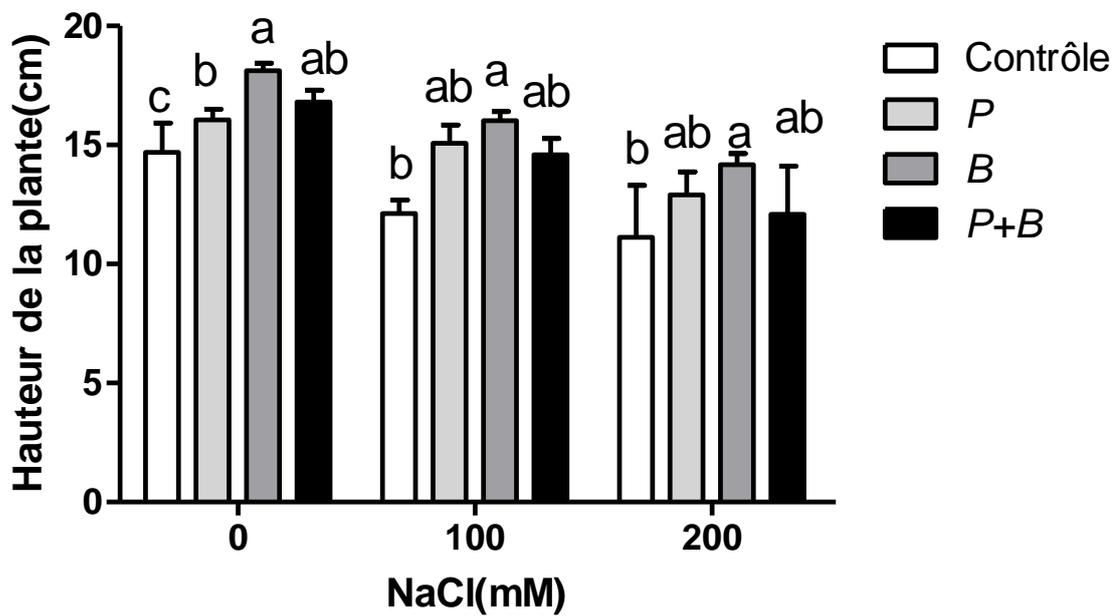


Fig.39 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la hauteur de la plante et sur la longueur racinaire (cm) du blé dur avant et après exposition à 0, 100 et 200 mM de NaCl. Les effets des concentrations salines correspondant à chaque traitement et ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

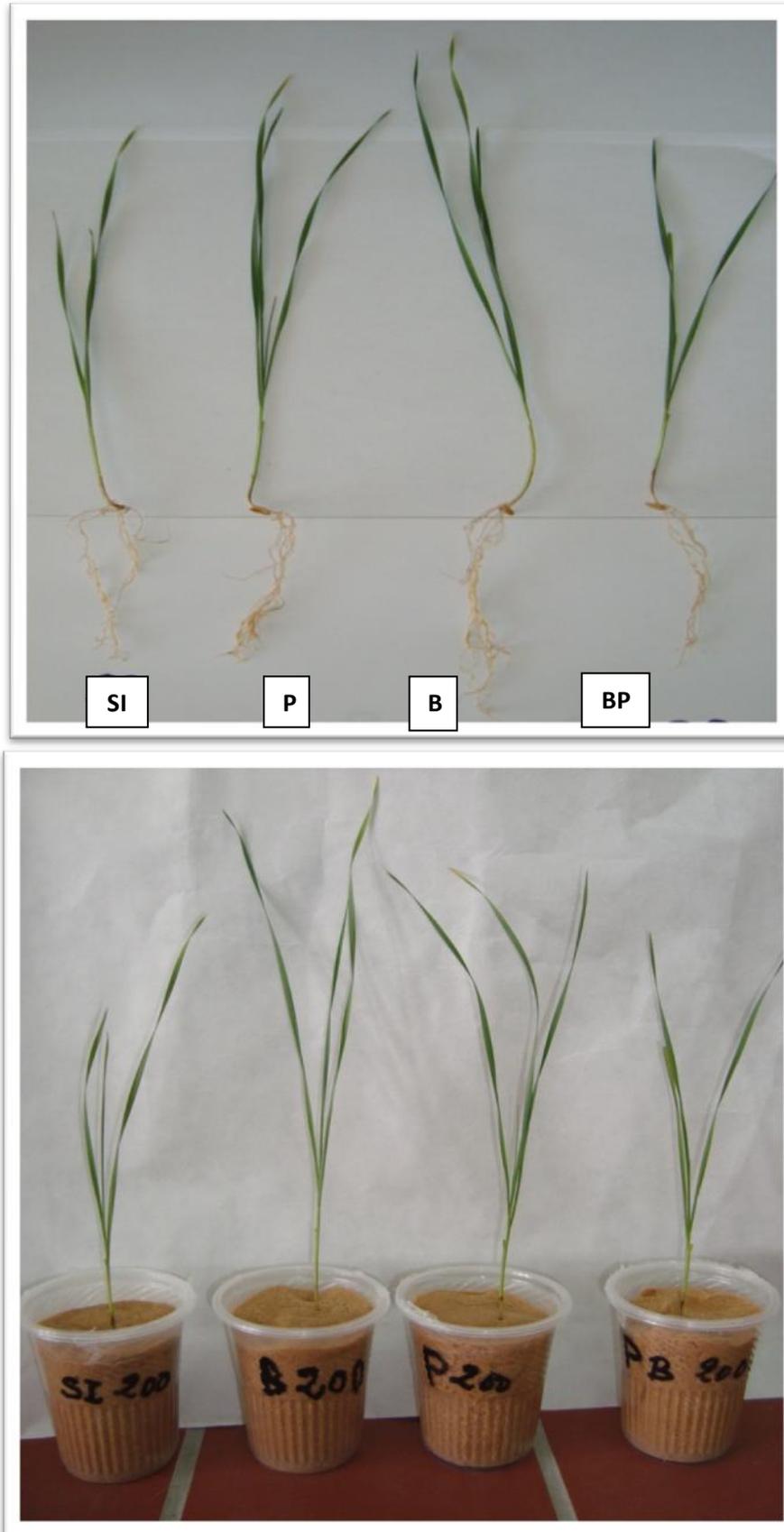


Fig.40 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur la longueur racinaire et sur la hauteur de la plante à 200mM de NaCl

IV-2 Chlorophylle

La salinité entraîne des réductions notoires des teneurs en chlorophylle a , b et totale ($p < 0,01$) (Tab.36, Fig.41). Les traitements par *P. agglomerans* et *Bacillus sp.* améliorent les teneurs en chlorophylle a, b et totale à tous les niveaux de salinité.

Tab.36 : Analyse de la variance des carrés moyens des résultats des chlorophylles (a, b, a+b) et de la proline

Source de variation	dl	Chlorophylle A (mg/g de poids frais)	Chlorophylle B(mg/g de poids frais)	Chlorophylle Totale(mg/g de poids frais)	Proline (µg/g de poids frais)
Salinité(S)	2	2644 *	17180 **	33290 **	229.6**
Inoculation(I)	3	8919 **	75590 **	127300**	21.29**
Interaction (SxI)	6	7234**	7928 **	12440**	30.37**
Erreur	18	398.5	420.8	701.7	0.3836

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

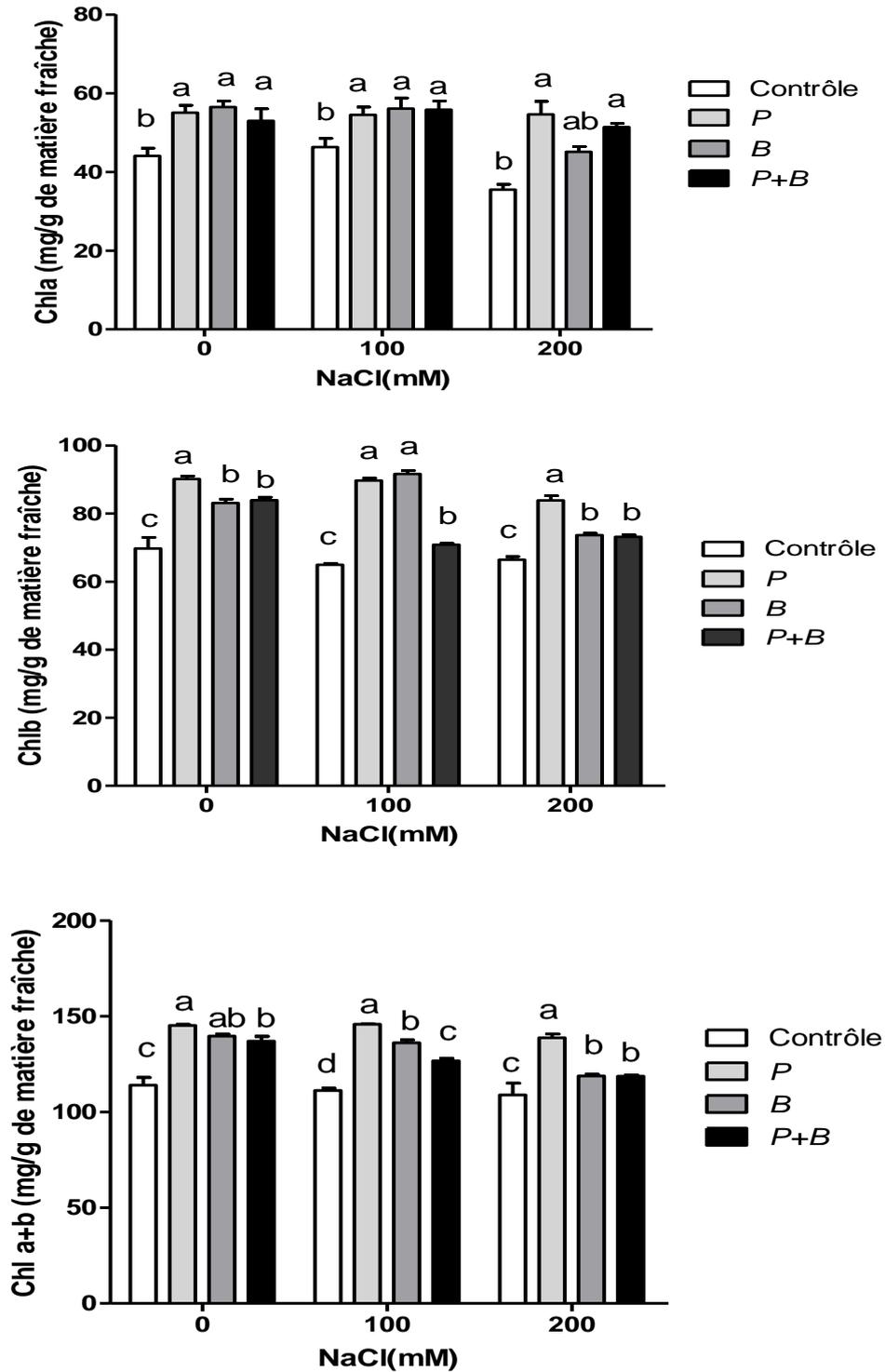


Fig.41 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur le contenu foliaire en chlorophylles a,b et totale (mg /g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl. Les effets des concentrations salines correspondant à chaque traitement et ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes selon le test de Tukey (p <0,05).

IV-3 Proline

L'analyse de la teneur en proline foliaire révèle que la salinité stimule sa synthèse intracellulaire. Celle-ci est maximale à 200 mM de NaCl. L'inoculation entraîne une diminution de sa teneur foliaire sous l'effet du stress salin (Tab.36 Fig. 42). Cet effet est net surtout en présence de *P. agglomerans*. En absence de sel, l'inoculation est inefficace.

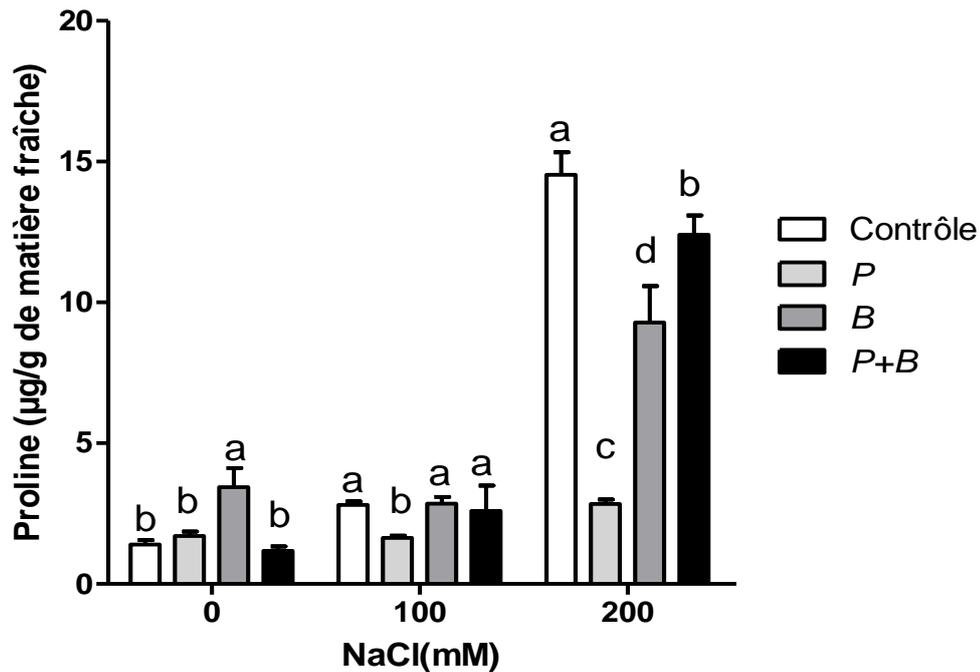


Fig.42 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur le contenu foliaire en proline (µg /g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl. Les effets des concentrations salines correspondant à chaque traitement et ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes selon le test de Tukey (p <0,01).

IV-4 Contenu en Na⁺ et K⁺ dans les racines et les feuilles

La salinité accélère l'accumulation des ions Na⁺ dans les feuilles et les racines chez les plants de blé ($P \leq 0,01$) (Tab.37 Fig.43). Celle-ci est proportionnelle au degré de salinité du milieu. L'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp réduit l'accumulation de Na⁺.

Les ions K⁺ diminuent fortement dans les racines et les feuilles suite au stress salin du milieu (Tab.37, Fig.44). Cette diminution est moins prononcée pour les échantillons inoculés .

Tab. 37 : Analyse de la variance des carrés moyens des résultats des teneurs en Na⁺ et K⁺ foliaire et racinaire

Source de variation	dl	Na ⁺ foliaire(mg/g de poids sec)	K ⁺ foliaire(mg/g de poids sec)	Na ⁺ racinaire(mg/g de poids sec)	K ⁺ racinaire(mg/g de poids sec)
Salinité(S)	2	2233 **	96.42 **	3635 **	30.83**
Inoculation(I)	3	58.83 **	2.838 **	77.95 **	12.91**
Interaction (SxI)	6	65.83**	1.856 *	64.45**	1.245*
Erreur	18	2.284	0.3155	3.792	0.4135

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

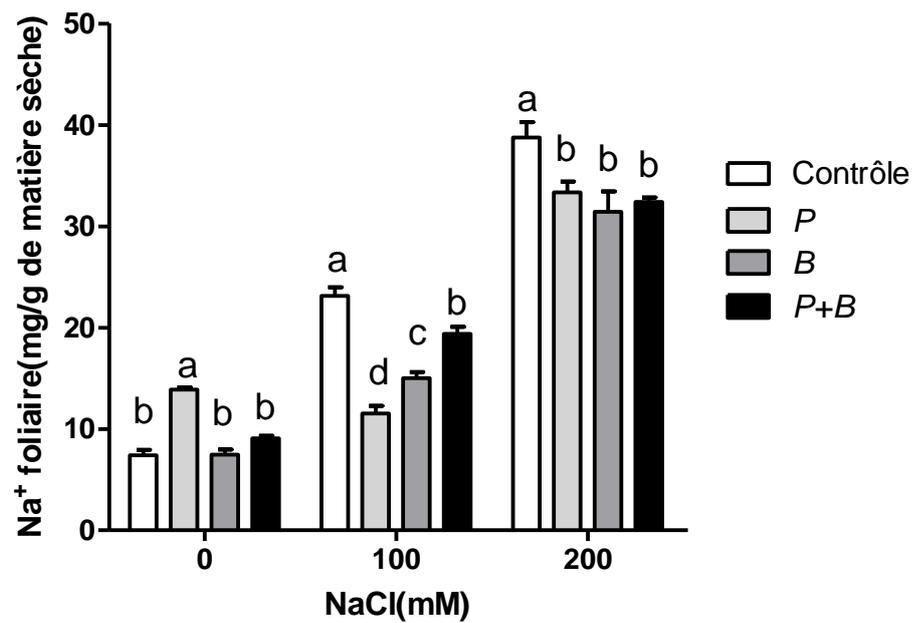
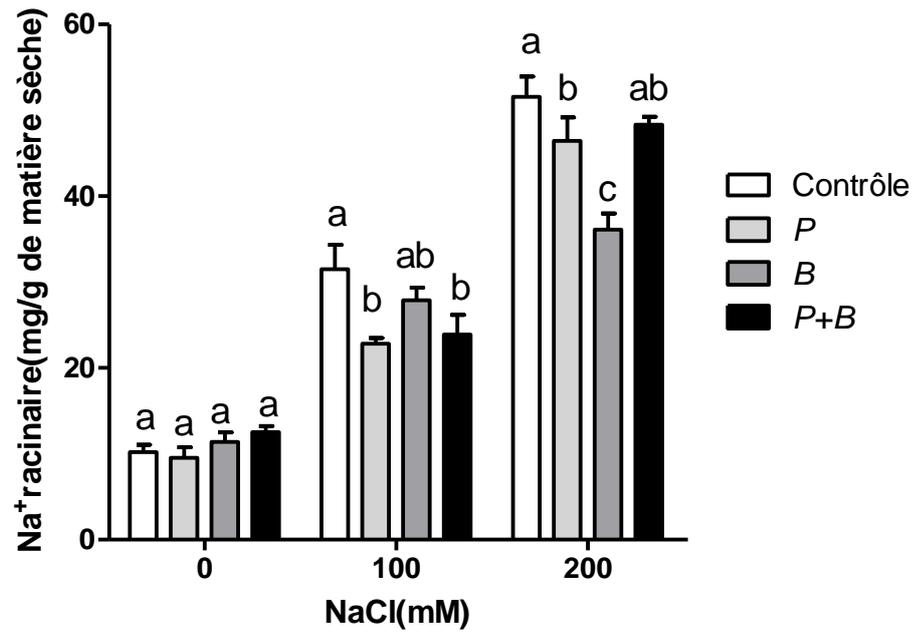


Fig.43 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur le contenu foliaire et racinaire en Na⁺ (mg/g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl. Les effets des concentrations salines correspondant à chaque traitement et ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes selon le test de Tukey (p <0,01).

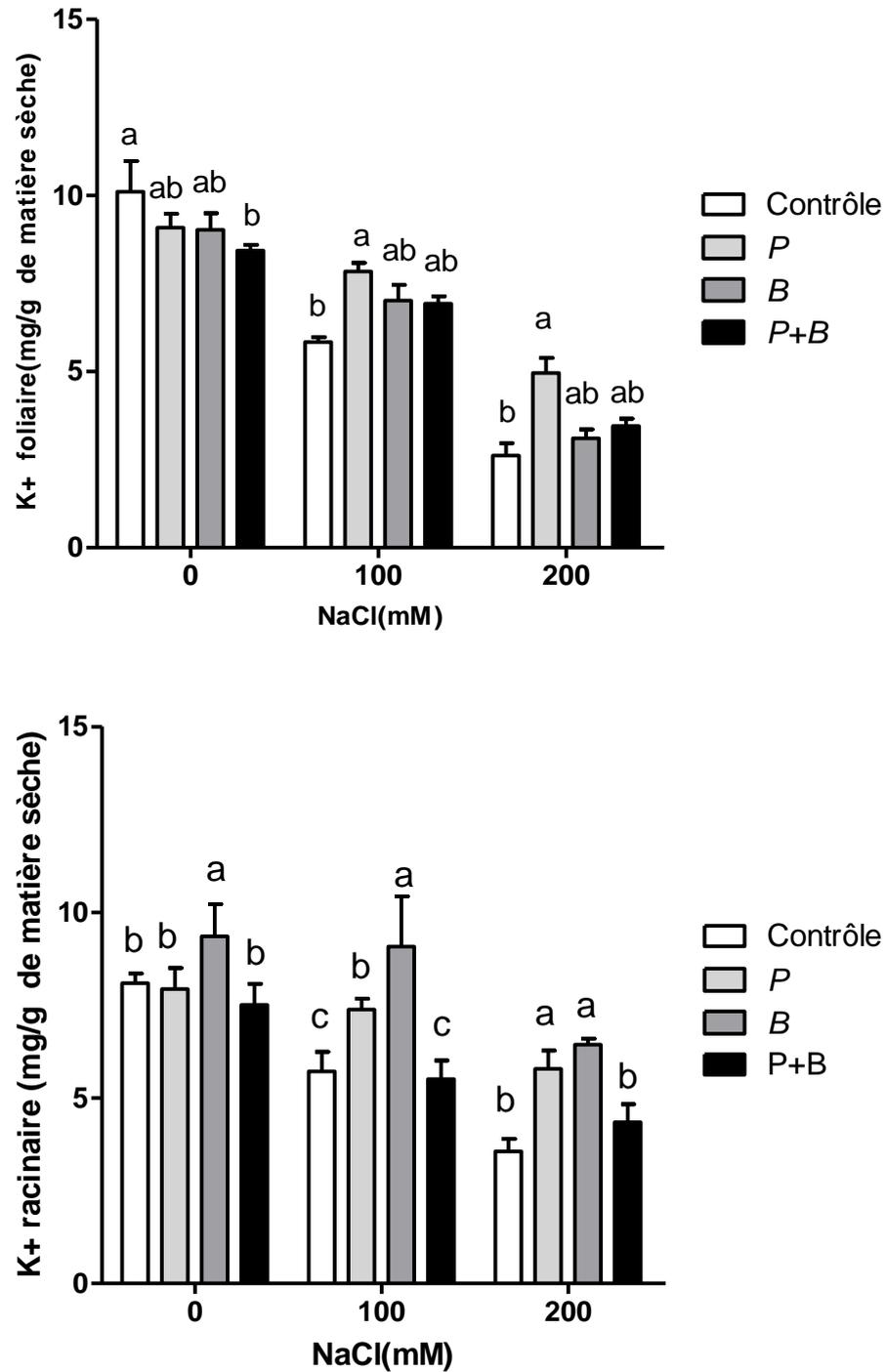


Fig.44 : Effet de l'inoculation par *P. agglomerans* et/ou *Bacillus* sp. sur le contenu foliaire et racinaire en K⁺ (mg/g de matière fraîche) du blé dur avant et après exposition à 0 ,100 et 200 mM de NaCl. Les effets des concentrations salines correspondant à chaque traitement et ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes selon le test de Tukey (p <0,01).

V- Discussion

L'analyse de la croissance du blé dur en milieu hydroponique révèle que le stress salin conduit à une diminution considérable de la longueur des racines, de la hauteur de la plante et des poids frais et secs des feuilles et des racines. Ces constatations sont comparables à celles enregistrées chez de nombreuses plantes (Hernandez *et al.*, 1995; Ali Dinar *et al.*, 1999). Environ 80 % de la réduction de la croissance à forte salinité peut être attribuée à la réduction de l'expansion de la surface foliaire (Marcelis et Hooijdonk, 1999). La salinité diminue la croissance des glycophytes en modifiant aussi l'équilibre hydrique et ionique au niveau des tissus (Greenway et Munns, 1980). Au niveau des feuilles, ce phénomène est associé à une baisse de la turgescence suite à une diminution du gradient de potentiel hydrique entre la plante et le milieu (Levigneron *et al.*, 1995). Les effets de la salinité sur la croissance des plantes sont attribués à d'autres facteurs dont une augmentation de la rigidité de la paroi cellulaire, probablement à cause d'une modification de sa structure ou une diminution de son extensibilité, d'une réduction du taux de production de nouvelles cellules (Kinraide et Parker, 1990) et/ou à la toxicité des ions Na^+ et Cl^- , d'une carence nutritionnelle ainsi qu'à des déséquilibres minéraux (Van Volkenburgh et Boyer, 1985).

Le stress salin a aussi un effet délétère sur les paramètres biochimiques se traduisant par une diminution de la concentration en chlorophylle (Abel-Ghaffar *et al.*, 1982; Del Zoppo *et al.*, 1999) suite à l'affaiblissement des complexes protéines-lipides (Gunes *et al.*, 1996) et par conséquent à la réduction de l'interception de la lumière, à une augmentation de l'activité de la chlorophyllase et à la synthèse de composés azotés tels la proline qui consomme une grande quantité d'azote (De la Rosa et Maiti, 1995). La salinité réduit aussi la biosynthèse de pigments photosynthétiques et entraîne des modifications dans l'intégrité et la composition des membranes des chloroplastes.

La compartimentation des ions entre les organes (racines/parties aériennes), les tissus (épiderme/mésophylle) ou encore entre les compartiments cellulaires (vacuole/cytoplasme) est l'un des mécanismes d'adaptation à la contrainte saline. Généralement, chez les plantes tolérantes (contrairement aux plantes sensibles), l'ion Na^+ est bien réparti dans la vacuole (Cheeseman, 1988). L'ajustement osmotique implique l'accumulation d'ions minéraux (K^+ , Cl^- , Na^+) et/ou de solutés organiques comme la proline, la glycine-bétaine, les sucres, les acides organiques, etc. (Morgan, 1984).

Les concentrations en proline des feuilles augmentent et atteignent de teneurs remarquables chez la variété de blé dur Waha soumise au stress salin. La proline est évidemment l'acide aminé le plus largement accumulé par les plantes (McCue et Hanson, 1990).

Chez de nombreuses espèces végétales (céréales comprises), la présence de la proline à des concentrations élevées est l'une des manifestations des stress hydrique et salin (Benlaribi et Monneveux, 1988; Ali Dib *et al.*, 1992). La corrélation entre teneur en proline et concentration sodique confirme ainsi le rôle osmorégulateur remarquable joué par la proline permettant ainsi aux plantes de s'adapter aux conditions salines ou de les tolérer. (Levitt, 1980; Chowdhury *et al.*, 1993). D'autre part, il a été également signalé que des variétés de blé sensibles au sel accumulent des concentrations en proline significativement plus élevées que les variétés tolérantes (Lutts *et al.*, 1999; De Lacerda *et al.*, 2003). L'accumulation de cet osmolyte devrait éviter les effets néfastes de faible potentiel osmotique des cellules sans interférer avec la synthèse des protéines (Wyne Jones, 1981 ; Raggi, 1994). La proline jouerait plusieurs rôles physiologiques chez les plantes soumises au stress salin (l'osmorégulation, une source d'énergie, de carbone et d'azote et un signal de sénescence) (Aspinall et Palleg, 1981). L'augmentation de cet imino-acide chez le blé pourrait être associée à la déshydratation due au stress salin et hydrique (Karamanos *et al.*, 1983) entraînant une diminution de la production de la matière sèche et du contenu relatif en eau (Tatar et Gevrek, 2008). Son accumulation dans les tissus de la plante sous des conditions stressantes a été rapportée comme le résultat d'une diminution de sa dégradation suite à une inhibition de la proline déshydrogénase, d'une augmentation de sa biosynthèse par l'expression d'un gène codant la pyrroline – 5- carboxylate synthétase (Lutts *et al.*, 1999), d'une diminution de la synthèse ou de l'hydrolyse des protéines (Viégas et Silveira, 1999).

Le stress salin augmente aussi l'absorption de Na^+ par les racines et les feuilles chez la variété Waha (Gune *et al.*, 1996). Le sel provoque une migration de Na^+ dans les parties aériennes avec une plus forte accumulation dans les feuilles par rapport aux racines (Hassani *et al.* 2008). Les mécanismes de transport de Na^+ vers les feuilles et celui de son absorption racinaire paraissent être régulés séparément. Cependant, un gain de tolérance est observé chez les plantes ayant une meilleure capacité à remettre en circulation le sodium, ce qui protège les parties aériennes de l'envahissement salin (Levigneron *et al.*, 1995).

Sous l'effet de la salinité, les concentrations en K^+ diminuent dans les racines et les feuilles. Les mêmes constats ont été relevés chez des plants de tomate cultivés en présence de NaCl à 50 et à 100 mM (Heuer, 2003). L'effet inhibiteur du sel sur l'absorption de K^+ existe aussi chez le blé tendre et l'olivier (Ottow *et al.*, 2005). Ces observations seraient attribuées à une

interaction compétitive entre les ions Na^+ et le K^+ sur les sites d'absorption de la plante (Bernstein *et al.*, 1995). La réduction de la concentration de K^+ provoque une réduction de la croissance par la diminution de la capacité des plantes à avoir un effet sur l'ajustement osmotique et le maintien de la turgescence (Greenway et Munns, 1980).

L'inoculation des graines de blé dur par *P.agglomerans* lma2 et *Bacillus sp.* sch1 augmente les paramètres de croissance (hauteur de la plante, longueur des racines et poids frais et secs racinaires et foliaires) sous l'effet du stress salin. Le contenu en chlorophylles et la teneur en potassium sont améliorés tandis que les concentrations en proline et en sodium sont réduites. Ces résultats sont rapportés par de nombreux auteurs (Krieg et Holt, 1984; Nadeem *et al.*, 2006).

Selon Glick *et al.* (1998), l'utilisation des PGPR comme inoculants de graines de blé dans les sols salés améliore la hauteur des plantes, la longueur des racines, le rendement en grains ainsi que la teneur en chlorophylle et le rapport K^+/Na^+ . Le rôle de *P.agglomerans* lma2 et *Bacillus sp.* sch1 dans la production de substances favorisant la croissance et la résistance des plantes aux stress abiotiques et biotiques doit être également pris en considération. En effet, *P. agglomerans* lma2 est une souche « halophile » capable de produire des teneurs en AIA remarquables jusqu'à 600 mM de NaCl. Cette auxine stimule principalement la croissance racinaire (Salisbury, 1994) permettant à la plante de puiser les nutriments nécessaires à partir du sol, améliorant par là les capacités de nutrition et la croissance végétale (Gutierrez Manero *et al.*, 1996; Abdel-Hameed, 2004). *P.agglomerans* lma2 et *Bacillus sp.* sch1 fixent l'azote moléculaire et possèdent des capacités considérables de solubilisation des phosphates. Ces rhizobactéries améliorent indirectement la croissance des végétaux par leur effets antagonistes sur la microflore phytopathogène en transformant les métabolites toxiques. Elles ont aussi une activité antifongique contre plusieurs espèces de champignons grâce à leurs aptitudes de sécrétion des sidérophores et de composés organiques volatiles tels que l'acide cyanhydrique (HCN). Il a été établi que les exopolysaccharides (EPS) produits par des PGPR telles que *P.agglomerans* lma2 et *Bacillus sp.* sch1 se lient aux ions Na^+ et réduisent la concentration racinaire de cet ion et contribuent au maintien du film d'eau nécessaire à l'activité photosynthétique et à la croissance des plantes. (Geddie et Sutherland, 1993; Ashraf *et al.*, 2004; Han et Lee, 2005). *P.agglomerans* lma2 est capable de synthétiser une enzyme l'ACC désaminase. Shaharoon et *al.* (2006) ont rapporté une corrélation positive significative entre l'activité de l'ACC désaminase et l'élongation des racines du maïs en raison de l'inoculation par des bactéries productrices d'EPS. Selon de nombreux auteurs, les PGPR possédant cette enzyme ont un avantage sélectif sur les autres

bactéries durant les stress biotiques (Wang *et al.*, 2000) et abiotiques (Glick *et al.*, 1994a; Mayak *et al.*, 2004). Le mécanisme principal utilisé par les PGPR contenant l'ACC désaminase pour améliorer la croissance des plantes dans des conditions de stress salin ou autres sont l'abaissement du niveau de l'éthylène dans la plante par hydrolyse de l'ACC, un précurseur immédiat de la voie de biosynthèse de l'éthylène (Glick *et al.*, 1998). Ces PGPR utilisent l'ACC comme source d'azote se traduisant par une chute de la concentration racinaire de ce composé et entraînant ainsi la réduction du niveau de l'éthylène chez la plante. (Mayak *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2005; Zahir *et al.*, 2009).

Pour leur osmorégulation, les plantes soumises à un stress salin accumulent diverses molécules telles la proline, la glycine, la bétaine, etc, qui protègent l'activité enzymatique (Munns et Termaat, 1986), mais l'accumulation de la proline par les plantes a également été rapporté comme un signe de stress (Rai *et al.*, 2003). En outre, l'accumulation d'un soluté compatible est un procédé de consommation d'énergie, en plus des dépenses métaboliques existantes. La concentration de la proline dans les feuilles des plantes augmente avec la salinité mais l'inoculation avec une rhizobactérie contenant l'ACC désaminase diminue la teneur en proline. Ceci est le cas de la présente étude où un taux faible de proline est accumulé en présence de *P. agglomerans*. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Han et Lee (2005), où l'inoculation diminue de façon significative la teneur en proline de soja (*Glycine max* L.) croissant dans des conditions salines par rapport à un témoin non inoculé. L'inoculation par *Bacillus sp.* est nettement meilleure sur les paramètres morphologiques des plantes par rapport à celle par *P. agglomerans* ou la co-inoculation. Plusieurs études mettent en évidence l'effet bénéfique et très attrayant des *Bacillus* comme inoculants potentiels dans l'agriculture car ils produisent des spores très résistantes qui peuvent survivre pendant de longues périodes dans le sol (Nelson, 2004). L'application de *Bacillus* et/ou l'espèce *Paenibacillus* sur des graines ou des racines provoque une modification de la composition de la rhizosphère qui conduit à augmenter la croissance et le rendement de différentes cultures (Li et Alexander 1988; Vessey et Buss, 2002). L'inoculation par *B. cereus* améliore la nodulation et la levée des semis chez le haricot (Figueiredo *et al.*, 2008), le soja (Vessey et Buss, 2002) et le pois (Cooper et Long, 1994).

Le traitement des graines de blé par l'association des deux souches montrent plutôt un effet négatif par rapport à la mono-inoculation. De nombreux auteurs ont suggéré que les effets de la co-inoculation sur les plantes dépendent de la particularité des combinaisons utilisées (Azcon *et al.*, 1993; Barea *et al.*, 1998). Les interactions peuvent être très compatibles entraînant des effets positifs (Vivas *et al.*, 2006), ou moins compatibles ayant pour

conséquence des effets neutres (Edwards *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 2005), ou incompatibles et donnant un effet néfaste (Ravnskov *et al.*, 1999). De meilleurs résultats sont obtenus lors de mono-inoculations plutôt que les inoculations combinées (Vestberg *et al.*, 2004). La spécificité génotypique entre les inoculants et les espèces de plantes a aussi été rapportée (Chanway *et al.*, 1988). Le mécanisme par lequel les effets de ces génotypes spécifiques se produisent peuvent être liés à l'exsudation racinaire. Les rhizobactéries en sont largement dépendantes pour leur apport en nutriments organiques (Rovira, 1969). La variabilité génotypique conditionne la qualité et la quantité des exsudats racinaires solubles (Rovira et Davey, 1974; Curl et Truelove, 1986). Cette spécificité entre les plantes et les microorganismes peut donc résulter des différences génétiques entre les plantes hôtes qui affectent l'exsudation racinaire et donc la taille de la population bactérienne dans la rhizosphère. Néanmoins, une compatibilité entre certaines paires de PGPR a été observée et les résultats obtenus sont meilleurs pour des inoculations multiples plutôt que simples. Les compatibilités spécifiques entre les plantes hôtes et les micro-organismes sont associées à une symbiose permettant d'augmenter la contribution du processus de fixation biologique de l'azote. Les PGPR, en combinaison avec des Rhizobia efficaces, pourraient améliorer la croissance et la fixation de l'azote en induisant l'introduction de *Rhizobium* dans les nodules de la légumineuse (Tilak *et al.*, 2006). Selon Saravana-Kumar et Samiyappan (2007), *Bradyrhizobium* améliore la nodulation et la croissance des légumineuses en association. De même, *Rhizobium* co- inoculé avec *Pseudomonas* ou *Bacillus* améliore les feuilles des plants de haricot en poids sec, en azote et en phosphore par rapport à l'inoculation avec *Rhizobium* seul (Stajkovic *et al.*, 2011).

Conclusion

Cette étude relative au rôle des rhizobactéries dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur. En effet, leur utilisation rentre dans le contexte de la fertilisation des sols salins et arides et la stimulation de la croissance et des défenses naturelles des plantes dont la finalité est de réduire l'application de produits phytosanitaires, d'atténuer les effets inhibiteurs du sel et de restaurer la productivité des cultures en zones arides

La diversité des bactéries dans la rhizosphère du blé et de l'orge et la capacité dans la promotion de la croissance des plantes par divers mécanismes a porté sur 62 souches de bacilles sporulés à Gram+ (n=40) et bacilles à Gram- (n=22) et a mis en évidence :

La majorité des souches se sont avérées des biofertilisants par l'apport d'éléments nutritifs à la plante. Elles ont la capacité de fixer l'azote et de solubiliser les phosphates à des taux très élevés. Les meilleures concentrations d'AIA produites permettent de classer les souches comme d'excellents phytostimulateurs. Certaines sont également performantes dans la production des sidérophores, l'omniprésence de cette activité est signalée chez l'ensemble des souches isolées. Un autre aspect important est le biocontrôle des agents phytopathogènes, il confère à l'ensemble des souches l'inhibition d'au moins une souche fongique. Par contre, plusieurs sont efficaces envers toutes les souches fongiques testées. Un nombre restreint de souches possèdent l'ACC désaminase.

L'impact de la nature du sol sur la performance des souches vis-à-vis des différentes activités influe sur la solubilisation des phosphates pour les *Bacillus* et la production d'AIA pour les bacilles à Gram- ce qui permet de conclure que les souches isolées de sols arides sont meilleures.

Les souches les plus représentatives sélectionnées sur la base de leur performance multiple sont la D13 (Gram+ sporulée) et la B5 (Bacille Gram-). Selon la séquence du gène de l'ARNr16S, il s'agit de *Bacillus* sp. sch1 et *Pantoea agglomerans* lma2.

Dans le cadre de l'étude de la tolérance au sel, *P. agglomerans* s'est avérée halophile. Sa capacité de réponse aux activités PGP (solubilisation des phosphates, production d'AIA et de sidérophores) s'exprime mieux entre 100 et 400 mM de NaCl. Une corrélation significative existe entre ces différentes activités.

En revanche, le comportement des *Bacillus* lors de la solubilisation des phosphates sous stress salin indique une diminution progressive de cette faculté en fonction de la concentration

de sel. L'osmoprotection établie par la stratégie d'accumulation de solutés compatibles (glycine bétaine et proline) semble inefficace dans ce cas.

Les résultats expérimentaux sur la croissance végétale, obtenus en conditions contrôlées montrent que l'inoculation des graines par *Bacillus sp* et/ou *P. agglomerans* confère une diminution de la susceptibilité vis-à-vis du sel. Les deux souches améliorent significativement les paramètres morphologiques (taille et masse pondérale foliaire et racinaire) et biochimiques (synthèse de pigments chlorophylliens, contenu en Na⁺ et K⁺ et accumulation de proline) des plants de blé dur. Cependant, la présence de *P. agglomerans* entraînant une faible accumulation de proline renforce l'hypothèse que les bactéries possédant une ACC-désaminase sont des régulateurs de stress.

D'autre part, la divergence constatée dans les effets combinés de deux bactéries confirme la spécificité de l'interaction plante /PGPR. En raison de la relation complexe, il est parfois difficile de prédire l'issue de ces interactions par rapport à l'activité microbienne et la croissance des plantes. Ces observations suggèrent l'importance de la stratégie de développer des souches efficaces dont l'isolement doit être réalisé à partir du même environnement dans lequel elles seront utilisées.

L'étude de l'amélioration de la production céréalière dans les zones affectées par la salinité et l'aridité par l'utilisation de *Bacillus sp* ou *P. agglomerans* comme bioinoculant efficace est une approche possible et prometteuse.

Comme dans tout travail de recherche, des questions subsistent et de nouvelles perspectives s'ouvrent afin de compléter les connaissances sur l'implication des rhizobactéries comme inoculants dans la composante microbienne d'un sol salin et aride. La capacité de survie et de colonisation racinaire des souches et la conservation de leurs activités PGP dans cet écosystème doivent être élucidées.

Les résultats obtenus en laboratoire sur milieux hydroponiques méritent donc une expérimentation plus large en plein champ de sol affecté par la salinité et/ou l'aridité.

Ce travail a abouti à la production d'un important soucier de rhizobactéries des régions arides et semi-arides. Certaines souches améliorent la croissance et la santé des plantes, d'autres sont capables de produire différents métabolites. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de ces souches en réalisant d'autres tests physiologiques et métaboliques.

L'association type de sol/plante semble ainsi influencer la sélectivité de la plante parmi les bactéries telluriques. C'est l'avancement de la compréhension de ces types de communication entre les acteurs de la rhizosphère qui apportera une compréhension nouvelle du fonctionnement du sol, mais aussi le développement d'engrais biologiques efficaces

Finally, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) studies on the 16S rRNA transcripts of total bacterial communities attempt to link diversity of resident populations, their structure and soil functioning. The analysis of total rRNA or of specific functional genes would allow better identification of important ecological functions in the rhizosphere and estimate the involvement of microorganisms in these functions. By this bias, it becomes possible to identify the organism or the populations expressing a particular gene in an environment.

In the future, it is hoped that the understanding of the functioning of the rhizosphere brought by this type of studies will allow more precisely to identify the feedback effects on the plant induced by the activity of the rhizospheric microflora.

Références bibliographiques

Abdel-Hameed, A.M., S.H. Sarhan et H.Z. Abdel-Salam (2004). Evaluation of some organic acid as foliar application on growth, yield and some nutrient contents of wheat. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.*, **20**: 2476-2481.

Abdel-Ghaffar A.S., H.A. El-Attar, M.H. El-Halfawi et A.A. Abdel-Salam (1982). Effect of inoculation, nitrogen fertilizer, salinity and water stress on symbiotic N₂ –fixation by *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris*.pp:153-160. *In: Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture.* P.H. Graham, S.C. Harris (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical de Cali, Colombia.

Abolfazl, A., R.H. Zabihi, S. Movafegh et A.A.M Hossein (2009). The efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of two varieties of wheat in salinity condition. *Am. Eurasian J. Sustain. Agric.*, **3**: 824–828.

Adhikari, T.B., C.M. Joseph., G. Yang ., D.A. Phillips et L.M. Nelson(2001). Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can. J. Microbiol.***47**:916-924

Ahmad, F., I. Ahmad et M.S. Khan (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research*, **163** : 173-81.

Alam, M. S., Z. J.Cui, , T. Yamagishi, et R., Ishii (2001). Grain yield and related physiological characteristics of rice plants *Oryza sativa* L. inoculated with free-living rhizobacteria, *Plant Prod. Sci.* **4**:125–130.

Ali Dib, T., P. Monneveux, et J.L. Araus (1992). Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie*, **12**: 381-393.

Ali-Dinar, H.M., G. Ebert et P. Ludders (1999). Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L.) under salinity and different nitrogen supply. *Gartenbauwissenschaft*, **64**: 54-59.

Altomare, C., WA. Norvell, T. Björkman et GE. Harman (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7): 2926–2933.

Amellal, N., G. Burtin., F. Bartoli et T. Heulin. (1998). Colonization of wheat roots by EPS-producing *Pantoea agglomerans* and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3740-3747.

Amir, HG, ZH. Shamsuddin, MS. Halimi, M. Marziah et MF. Ramlan (2005). Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. *Commun Soil Sci Plant Anal* **36**:2059–2066.

Andrea, M.S., A.M. Boyd, S. Henrik, F. Jorg, NT. Kenneth, et JM. Terry (2008). Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *BioMed. Central* **4**:8.

Angers, D. A et G. R. Mehuys (1989). Effects of cropping on carbohydrate content and water stable aggregation of a clay soil. *Can. J. Soil Sci.* **69**: 373- 380.

Arakawa, T. et SN. Timasheff (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* **47**(3) : 411-414.

- Araujo, F.F. (2008).** Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras edesenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciênc. Agrotec.* **32**:456–462
- Arkhipova, T.N., E.A. Prinsen, S.U. Veselov, E.V. Martinenko, A.I. Melentiev et G.R. Kudoyarova (2007).** Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil.* **292**: 305–315.
- Arkhipova, T.N., S.U. Veselov, A.I. Melentiev, E.V. Martynenko et G.R. Kudoyarova (2005).** Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil.* **272**: 201–209.
- Arora, N.K., V. Singhal et D.K. Maheshwari (2006).** Salinity-induced accumulation of poly-b-hydroxyl butyrate in rhizobia indicating its role in cell protection. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**:603–606.
- Arnon, D.T. (1949).** Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**: 1-15.
- Asada, K. (2000).** The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phill Trans. R. Soc. Lond.* , **355**:1419-1431.
- Ash, C., J.A.E. Farrow, S. Wallbanks, et M.D. Collins (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit – ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**:202–206.
- Ash, C., F.G. Priest, and M.D. Collins (1993).** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test: proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Leeuwenhoek* **64**:253–260.
- Ashraf, M. (1994).** Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **13**: 17-42.
- 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.
- Ashraf, M., H.R. Athar, P.J.C. Harris et T.R. Kwon (2008).** Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv. Agron.* **97**: 45-110.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen., M.R. Ismail., M.A. Hoque., M.Z. Islam ., S.M. Shahidullah et S. Meon (2009).** Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol.*, **8** : 1247-1252.
- Asis, C. A et K. Adachi (2003).** Isolation of Endophytic Diazotroph *Pantoea agglomerans* and Nondiazotroph *Enterobacter asburiae* From Sweet Potato Stem in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**:19–23.
- Aspinall, D. et L.G Paleg (1981).** Proline accumulation: Physiological aspects.pp: 215-228. *In: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants.*Paleg, L.G. & Aspinall, D., (eds.). Sidney, Academic Press.
- Atzhorn, R., A. Crozier, C.T. Wheeler et G. Sandberg (1988).** Production of gibberellins and indole- 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* **175**:532–538

Audenaert, K., G.B. De Meyer et M.M. Höfte (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol.* **128**: 491–501.

Azcòn, R. (1993). Growth and nutrition of nodulated mycorrhizal and non-mycorrhizal *Hedysarum coronarium* as a result of treatment with fractions from a plant-growth promoting rhizobacteria, *Soil. Biol. Biochem.* **25**:1037-1042.

Baize, D. (2000). Guide des analyses en pédologie. INRA. France.

Bakker, P.A.H.M., C.M.J. Pieterse et L.C. van Loon (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* **97**:239-243.

Baldani, J.I., N.R. Krieg, V.L. Divan-Baldani, A. Hartmann et J. Döbereiner (2005) : In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, Springer- Verlag, Garrity, New York, Berlin, Heidelberg, pp. 7–26.

Banerjee, S., R. Palit., C. Sengupta et . D. Stranding (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. And *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. *Aus. j. crop sci.* **4**: 378-383.

Banik, S. et B.K. Dey (1983). Phosphate solubilizing potentiality of the microorganisms capable of utilizing aluminium phosphate as a sole phosphate source. *Zentralbl. Mikrobiol.* **138**:17–23.

Barea, J. M., G. Andrade, V. V. Bianciotto, D. Dowling, S. Lohrke, P. Bonfante, F. O'Gara et C. Azcon-Aguilar (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2304-2307.

Bar-Ness, E., Y. Hadar, Y. Chen, V. Romheld et H. Marschner (1992). Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. *Plant Physiol.* **100**: 451-456.

Barriuso, J., M. T. Pereyra, J. A. Lucas Garcia, M. Megias, F. J. Gutierrez Manero et B. Ramos (2005). Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microb. Ecol.*, **50**:82–89.

Barth S, M. Huhn, B. Matthey, A. Klimka, EA. Galinski et A. Engert (2000). Compatible-Solute-Supported Periplasmic Expression of Functional Recombinant Proteins under Stress Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (4): 1572-1579.

Basavaraju, O., A.R.M. Rao et T.H. Shankarappa (2002). Effect of *Azotobacter* inoculation and nitrogen levels on growth and yield of radish (*Raphanus sativus* L.). In: Proceedings of Microbial Technology for Sustainable Development and Productivity, (Ed., Rajak D.C.), Jabalpur, Biotechnology of Microbes and Sustainable Utilization, pp. 155-160

Bashan, Y. et G. Holguin (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Can. J. Microbiol.* **43**:103–121

Bashan, Y., G. Holguin et L.E. De-Bashan (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), *Can. J. Microbiol.* **50**:521-577.

Bashan, Y, et H. Levanony (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**:591–608

- Bashan, Y., M.E. Puente, M.N. Rodriguez-Mendoza, G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato et S. Pedrin (1995).** Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1938-1945
- Bassil, NV., WM. Proebsting, LW. Moore et DA. Lightfoot (1991).** Propagation of hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *Hort. Sci.* **26**:1058–1060.
- Begum, M., VR. Rai et S. Lokesh (2003).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seedborne fungal pathogens in okra. *Indian Phytopathol.* **56**:156–158.
- Benhamou, N, DL. Gagné et L. Quéré Dehbi (2000).** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopath.* **90**: 45–56.
- Benlaribi, M. et P. Monneveux, (1988).** Etude comparée du comportement en situation de déficit hydrique de deux variétés algériennes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) adaptées à la sécheresse. *C. R. Acad. Agri. France*, **74**: 73-83.
- Berg, G., N. Roskot., A. Steidle., L. Eberl., A. Zock et K. Smalla (2002).** Plant-dependent Genotypic and Phenotypic Diversity of Antagonistic Rhizobacteria Isolated from Different *Verticillium* Host Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3328–3338.
- Bergey, D.H., R.S. Breed, E.G.D. Murray et A.P. Hitchens (1939).** Bergey's manual of determinative bacteriology, 5th edn. *Williams and Wilkins, Baltimore*.
- Berggren, I., J. W. L. van Vuurde et A. M. Martensson (2001).** Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, *Appl. Soil Ecol.* **17**: 97-105.
- Bernard, T., M. Jebbar, Y. Rassouli, S. Himdi-Kabbab, J. Hamelin et C. Blanco (1993).** Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**: 129-138.
- Bernstein N., W.K. Silk et A. Läuchli (1995).** Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress: possible role of some mineral elements in growth inhibition. *Planta*, **196**: 699-705.
- Bertrand, H., C. Plassard, X. Pinochet, B. Touraine, P. Normand et J.C. Cleyet-Marel (2000).** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.*, **46**:229 – 236.
- Bezzate, S., S. Aymerich, R. Chambert, S. Czarnes, O. Berge et T. Heulin (2000).** Disruption of the *Bacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **2**:333-342
- Borneman, J., P. W. Skroch et K. M. O'Sullivan (1996).** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1935-1943.
- Bottini, R., F. Cassan et P. Picolli (2004).** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**:497–503.
- Boyer, J.S. (1982).** Plant productivity and environment. *Science*, **218**: 443-448.
- Braun-Kiewnick, A., B.J. Jacobsen et D.C. Sands (2000).** Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causative agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathol.* **90**:368-375.

- Briat, J.F. (1992).** Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 2475-2483.
- Brock, TD, MT. Madigan, JM. Martinko et J. Parker (1994).** Biology of Microorganisms, 7th ed. Prentice Hall, NJ, USA.
- Brocklehurst, T.F., C.M. Zaman-Wong et B.M. Lund (1987).** A Note on the Microbiology of Retail Packs of Prepared Salad Vegetables. *J. Appl. Bacteriol.* **63**:406–415.
- Brown, C.M. et M.J. Dilworth (1975).** Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, **86**: 39-48.
- Buchanan, R.E. et N.E. Gibbons (1974).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Burdman, S., E. Jurkevitch et Y. Okon (2000).** Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, *In: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.
- Cakmakci, R., F. Kantar et F. Sahin (2001).** Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **164**:527–531
- Cakmakci, R., M. Erat, U. Erdogan et MF. Donmez (2007).** The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **170**:288–295.
- Campbell, R., et M.P. Greaves (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere in The Rhizosphere (ed. J.M. Lynch), John Wiley & Sons, Ltd, Essex, pp. 11–34.
- Cappuccino, J. C. et N. Sherman (1992).** Microbiology: A Laboratory Manuel, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.
- Castignetti, D. et J.Jr. Smarrelli (1986).** Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS Lett.* **209**:147-151.
- Castric, PA. (1977).** Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **130** : 826-831.
- Cattelan, A.J., P.G. Hartel et J.J. Fuhrmann (1999).** Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **63**: 1670-1680.
- Cavaglieri, I., J. Orlando, M.I. Rodriguez, S. Chulze et M. Etcheverry (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the Maize root level. *Res. Microbiol.* **156**:748–754.
- Chanway, C.P., F. Holl et R. Turkington (1988).** Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant soil*, **106**: 281-284.
- Chebotar, V., A. Khotyanovich et A. Cazacov (2000)** EXTRASOL – a new multifunctional biopreparation for ecologically safe agriculture. *In: Kleeberg H, Zebitz ZPW (eds) Practice oriented results on use and production of neem ingredients and pheromones*. Druck & Graphic, Giessen, pp 127–134.
- Cheeseman, J. M. (1988).** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.*, **87**: 547-550.

- Chelius MK. et EW. Triplett (2000)** Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:783–787.
- Cheng, Z., E. Park et B. Glick (2007).** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can J. Microbiol.*, **53**(7):912–918.
- Cheng, Z., B.P. Duncker, B.J. McConkey et B.R. Glick (2008).** Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4. *Can. J. Microbiol.* **54**:128–136.
- Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran et I. Chet (1995).** Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1720-1726.
- Chet, I. et J. Inbar (1994).** Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **48**: 37-43.
- Cheverry, C. (1995).** Plant behaviour in saline environment. *Action d'eau* ,**4**, 49.
- Chiarini, L., A. Bevivino et S. Tabacchioni (1994).** Factors affecting the competitive ability in rhizosphere colonization of plant-growth promoting strains of *Burkholderia cepacia*. In *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*, M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen (eds.), pp. 204-206, CSIRO, Adelaide.
- Chowdhury, J.B., S. Jain et R.K. Jain (1993).** Biotechnological approaches for developing salt-tolerant crops. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, **2**: 1-7.
- Claus, D., et CW. Berkeley (1986).** The genus *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Sneath PHA (Ed). Williams, Wilkins, Baltimore. **34**: 1105-1139.
- Compant, S., S. Duffy, J. Nowak, C. Clement et E.A. Barka (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principales, mechanisms of action, and and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(9):4951-4959.
- Cook, R.J. et K.F. Baker (1983).** The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Am. Phytopathol. Soc.*, St. Paul.
- Cooper JB. et SR. Long (1994).** Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *Plant Cell* **6**, 215-225.
- Copping, LG. (2004).** The manual of biocontrol agents, 3rd edn. British Crop Protection council Publications, Alton, Hampshire, UK, 702p
- Costa, E., J. Usall, N. Teixidó, J. Delgado et I. Viñas (2002).** Water activity, temperature and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2, *Can. J. Microbiol.* **48**: 1082–1088.
- Costacurta, A., et J. Vanderleyden (1995).** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**:1–18.
- Couvillon, GA. (1998).** Rooting Responses to Different Treatments. *Acta Hort.* **227**: 187-196.
- Csonka, LN. et AD. Hanson (1991).** Procaryotic osmoregulation : genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45** : 569-606.

- Curatti, L., E. Folco, P. Desplats, G. Abratti, V. Limones, L. Herrera-Estrella et G. Salerno (1998).** Sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of the *spsA* gene and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 6776–6779.
- Curl, E. A. et B. Truelove (1986).** The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.
- Dastager, S.G., C.K. Deepa et A. Pandey (2010)** .Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.*, **27**: 259-265.
- De Freitas, JR. (2000).** Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticum aestivum* L., var. Norstar) inoculated with rhizobacteria. *Pedobiologia* **44**:97–104.
- De la-Rosa, I.M. et R.K. Maiti (1995).** Biochemical mechanism in glossy sorghum lines for resistance to salinity stress. *J. Plant Physiol.*, **146**:515–519.
- De Lacerda, C.F., J. Cambraia, M.A. Oliva, H.A. Ruiz et J.T. Prisco (2003).** Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environ. Exp. Bot.*, **49**: 107-120.
- De Vos M, VR. Van Oosten, RMP. van Poecke, JA. Van Pelt, MJ. Pozo, MJ. Mueller, AJ. Buchala, JP. Métraux, LC. Van Loon et M. Dicke (2005).** Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 923–937.
- Decateau, R. D. (2000).** Vegetable Crops. New Jersey, 464 pp.
- De Freitas, J.R. et J.J. Germida (1992).** Growth promotion of winter wheat by fluorescent Pseudomonads under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **24**: 1127-1135.
- Del Rio, L.A., F.J. Corpas, L.M. Sandalio, J.M. Palma et J.B. Barroso (2003).** Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life*, **55**:71–81.
- Del-Zoppo, M., L. Gallechi, A. Onnis, A. Pardossi et F. Saviozzi (1999).** Effect of salinity on water relations, sodium accumulation, chlorophyll content and proteolytic enzymes in wild Wheat. *Biologia Plantarum*, **8**: 97-104.
- Ding, Y., J. Wang, Y. Liu, et S. Chen (2005).** Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. Appl. Microbiol.* **99**:1271–1281.
- Dobbelaere, S, J. Vanderleyden et Y. Okon (2003).** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* **22**:107–149
- Dobereiner, J. (1997).** Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.* **29**:771–774.
- Dommergues, Y. (1978).** "Mycorrhizes et fixation d'azote". O.R.S.T.O.M. avril 1978.
- Dong H, AR. Gusti, Q. Zhang, J-L. Xu, L-H. Zhang (2002).** Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1754–1759.
- Dong Y, AL. Iniguez et EW. Triplett (2003).** Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* **257**:49–59
- Downes, BP., CR. Steinbaker, DN. Crowell (2001)** Expression and processing of a hormonally regulated b-expansin from soybean. *Plant Physiol* **126**:244–252

- Drew, A.P., K.L. Kavanagh et C.A. Maynard (1992).** Acclimatizing micropropagated black cherry by comparison with half-sib seedlings. *Physiologia Plantarum*, **86**: 459–64.
- Duffy, B.K. et G. Defago (1999).** Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2429–2438.
- Dursun, A., M. Ekinci et MF. Donmez (2008).** Effects of inoculation bacteria on chemical content, yield and growth in rocket (*Eruca vesicaria* subsp sativa). *Asian J Chem.* **20**:3197–3202
- Dworkin, M. et J. Foster (1958).** Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.*, **75**: 592-601.
- Ecker, J.R. (1995).** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, **268**:667-675.
- Edi-Premono, M, AM. Moawad et PLG. Vlek (1996).** Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones. J. Crop Sci.* **11**:13-23.
- Edwards, SG., JPW. Young et AH. Fitter (1998).** Interaction between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mossae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**:297–303.
- Egamberdieva, D. (2012).** *Pseudomonas chlororaphis*: A salt-tolerant bacterial inoculant for plant growth stimulation under saline soil conditions. *Acta Physiol. Plant*, **34**: 751–756.
- Egamberdiyeva, D. et G. Höflich (2001).** Influence of plant growth promoting bacteria on plant growth and nutrient uptake of cotton and wheat in different soils. In: W.J. Horst *et al.*, (eds.) Developments in plant and soil sciences. Plant Nutrition: Food security and sustainability of agro ecosystems through basic and applied research **92**:674-675.
- Egamberdieva, D. et Z. Kucharova (2009).** Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biol. Fert. Soils*, **45**: 563–571.
- Elkoca, E, F. Kantar et F. Sahin (2008).** Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *J. Plant Nutr.* **31**:157–171.
- Elustondo, J., DA. Anger., MR. Laverdière, et A. N'Dayegamiye (1990).** Etude comparative de l'agrégation et de la matière organique associée aux fractions granulométriques et sept sols sous culture de maïs en prairie. *Can. J. Soil Sci.* **70**: 395- 402.
- Epstein, E., JD. Norlyn, DW. Rush, R. Kingsbury, DB. Kelley et AF. Wrana (1980).** Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, **210**: 399–404.
- Ercisli, S., A. Esitken, R. Cangi et F. Sahin (2003).** Adventitious root formation of kiwifruit in relation to sampling date, IBA and *Agrobacterium rubi* inoculation. *Plant Growth Regul.* **41**:133–137.
- Ercisli, S., A. Esitken et F. Sahin (2004).** Exogenous IBA and inoculation with *Agrobacterium rubi* stimulate adventitious root formation on hardwood stem cuttings of two rose genotypes. *Hort. Sci.* **39**:533–534.
- Erturk, Y., S. Ercisli, R. Sekban, A. Haznedar et MF. Donmez (2008).** The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of tea (*Camellia sinensis* var. *Sinensis*) cuttings. *Roum. Biotechnol. Lett.* **13**:3747–3756

- Esitken, A, S. Ercisli, H. Karlidag et F. Sahin (2005).** Potential use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in organic apricot production. *In: Libek A., Kaufmane E., Sasnauskas A. (eds) International conference on environmentally friendly fruit growing. Tartu, Estonia, pp 90–97.*
- Ezawa, T., SE. Smith et FA. Smith (2002).** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, **244**: 221–230.
- Figueiredo, MVB., HA. Burity, CR. Martinez et CP. Chanway (2007).** Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**:1187–1193.
- Figueiredo, VB., HA. Burity, CR. Martinez et CP. Chanway (2008).** Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* **40**:182–188
- Flowers, T.J. (2004).** Improving Crop Salt Tolerance. *J. Exper. Botany*, **55**: 307-319.
- Fox, R., N.B. Comerford, et W.W. McFee (1990).** Phosphorus and aluminum release from a spodic horizon mediated by organic acids. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **54**:1763-1767.
- Francis, C.A., A.Y. Obratzon et B.M. Tebo (2000).** Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *P. agglomerans* SPI. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:543-548.
- Frankenberger, W.T.J., et M. Arshad (1995).** Phytohormones in soil. Microbial production and function. Marcel Dekker, New York, p 503.
- Galinski, E.A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 272–328.
- Galinski, E.A. et H.G. Trüper (1994).** Microbial behaviour in saltstressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**:95–108.
- Gangwar, M., et G. Kaur (2009).** Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and ryegrass. *Int. J. Microbiol.* **7** (Suppl 1).
- Garbeva, P., J. A. van Veen, et J. D. van Elsas (2003).** Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE, *Microbiol. Ecol.* **45**:302–316.
- Garrity, G.M. (2005).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1–1085.
- Gaur, A.C., (1990).** Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers. 1st Edn., Omega Scientific Publishers, New Delhi, India, ISBN: 81-85399-09-3.
- Gavini, F., J. Mergaert., A. Beji., C. Mielcarek., D. Izard., K. Kersters et J. De Ley. (1989).** Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 18888), Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen.nov.as *Pantoea agglomerans* comb.nov.and description of *Pantoea dispersa* sp.nov. *Int Syst Bacteriol.* **39**:337-345.
- Geddie, J.L. et I.W. Sutherland(1993).** Uptake of metals by bacterial polysaccharides. *J. Appl. Microbiol.*, **74**: 467-472.
- Germida, J .J., S. D. Siciliano, R. de Freitas et A. M. Seib (1998).** Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.*, **26**:43–50.

- Ghoul, M., T. Bernard et M. Cormier (1990).** Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 551-554.
- Giongo, A., A. Beneduzi, A. Ambrosini, L.K. Vargas, M.R. Stroschein, F.L. Eltz, M.H. Bodanese-Zanettini et L. Maria Pereira Passaglia (2010).** Isolation and Characterization of two plant growth –promoting from the rhizoplane of a legume (*lupines albescens*) in sandy soil. *R. Bras. Ci. Solo*, **34**:361-369 .
- Glazebrook J, W. Chen, B. Estes, H-S. Chang, C. Nawrath, J-P. Metraux, T. Zhu, F. Katagiri (2003)** .Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* **31**: 217–228.
- Glick, B.R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **41**: 109-117.
- Glick , B.R., C.B. Jacobson, M.M.K. Schwarze et J.J. Pasternak (1994a)** .1-Aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* **40**:911–915.
- Glick, B.R., C.B. Jacobson, M.M.K. Schwarze et J.J. Pasternak (1994b).** Does the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase play a role in plant growth promotion by *Pseudomonas putida* GR12–2 In: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD (eds) Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. CSIRO, Adelaide, pp 150–152.
- Glick, B.R., C.L. Patten., G. Holguin, et D.M. Penrose (1995).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College Press*, London.
- Glick., B.R., D.M. Penrose et L. Jiping (1998).** A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**:63–68.
- Glick, B.R., Z. Cheng, J. Czarny, et J. Duan (2007).** Promotion of plant growth by ACC-deaminase producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:329–339.
- Gokarn, K. (2010).** Siderophores and Pathogenicity of Microorganisms. *J. Biosci. Tech.* **1**: 127-134.
- Golec, M., C. Skórska, B. Backiewicz et J. Dutkiewicz (2004).** Immunologic Reactivity to Work-related Airborne Allergens in People Occupationally Exposed to Dust from Herbs. *Ann. Agri. Environ. Med.* **11**:121–127.
- Govindasamy, V., M. Senthilkumar, V. Magheshwaran, U. Kumar, P. Bose, V. Sharma, et K. Annapurna (2010).** Plant Growth and Health Promoting Bacteria, *Microbiol. Monographs* 1-346.
- Graham, P. H. (1988).** Principles and Application of Soil Microbiology, pp: 322–345.
- Gray, E. J., et D. L. Smith (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**:395-412.
- Greenway, H. et R. Munns (1980).** Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 149–190.
- Gros, A., (1979).** Engrais. Guide pratique de la fertilisation. 7ième édition. La Maison Rustique. Paris. France. pp 121-205.

- Guemori-Athmani, S., O. Berge, M. Bourrain, P. Mavingui, JM. Thiery, T. Bhatnagar et T. Heulin (2000).** Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* **36** :149–159.
- Günes, A, A. Inal et A. Alpaslan (1996).** Effect of salinity on stomatal resistance, proline and mineral composition of pepper. *J. Plant Nutr.*, **19**: 389-396.
- Gupta, S.S. (2003).** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**(3):219-227.
- Gupta, A., M. Gopal, and K.V. Tilak .2000.** Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian J Exp Biol* **38**:856–862.
- Gutiérrez Mañero, F.J., N. Acero, J.A. Lucas et A. Probanza (1996).** The influence of native rhizobacteria on European alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. II. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*, **182**: 67–74.
- Gutierrez-Manero, FJ., B. Ramos, A. Probanza, J. Mehouchi et M. Talon (2001).** The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant* **111**:206–211
- Gyaneshwar, P., GN. Kumar, LJ. Parekh et PS. Poole (2002).** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* **245**(1):83-93.
- Haas, D., et G. Défago (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Natra. Rev. Microb.* 1129.
- Hallman, J., A. Quadt-Hallman, W.F. Mahaffee et J.W. Kloepper (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, **43**: 895-914.
- Hamdy, A., (1999).** Saline irrigation assessment for a sustainable use saline irrigation. Halophyte Production and Utilization, *Project No. IC 18CT 96-0055*, pp: 152-226.
- Hameeda, B., G. Harini, OP. Rupela, SP. Wani et G. Reddy (2008).** Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* **163**:234–242.
- Han, H.S. et K.D. Lee (2005).** Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, **1**: 210-215.
- Hartmond, U., N.V. Schaesberg, J.H. Graham et J.P. Syverten (1987).** Salinity and flooding stress effects on mycorrhizal and nonmycorrhizal citrus rootstock seedlings. *Plant Soil*, **104**: 37–43.
- Hashidoki, Y., E. Itoh., K. Yokota., T. Yoshida et S. Tahara (2002).** Characterization of Five Phyllosphere Bacteria Isolated From *Rosa rugosa* Leaves, and Their Phenotypic and Metabolic Properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**:2474–2478.
- Hassani, M.E., M.R. Shariflou, M.C. Gianibelli et P.J. Sharp (2008).** Characterization of a ω -gliadin gene in *Triticum tauschii*. *J. Cereal. Sci.*, **47**:59–67.
- Hatta, M, CA. Beyl, S. Garton et AM. Diner (1996).** Induction of roots on jujube softwood cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Hort. Sci.* **71**:881–886
- Hecht-Buchholz, C. (1998)** The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixing bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonleguminous plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **161**:509–520.

- Hedley, M.J., A. Hussin et N.S. Bolan (1990).** New approaches to phosphorus fertilisation. Phosphorus requirements for sustainable agriculture in Asia and Oceania. *Proceed. Symp.* 6-10 March 1989: pp. 125-142.
- Herman, MAB., BA. Nault et CD. Smart (2008).** Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Prot.* **27**:996–1002.
- Hernández, J.A., E. Olmos, F.J. Corpas, F. Sevilla et L.A. del Río (1995).** Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Sci.*, **105**: 151–167.
- Heuer, B. (2003).** Influence of exogenous application of proline and glycine betaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant, Sci.*, **165**: 693-699.
- Heydari, S., P.R. Moghadam et S.M. Arab (2008).** Hydrogen Cyanide Production Ability by *Pseudomonas Fluorescence* Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. *Proceedings "Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development"*, Tropentag, Hohenheim.
- Hinsinger, P. (1998).** How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* ,**64**:225–265
- Hinsinger, P. (2001).** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil.* **237**:173–195.
- Hirsch, AM. et Y. Fang (1994).** Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol. Biol.* **26**: 5–9.
- Holguin, G., et B.R. Glick (2001).** Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.* **41**:281–288.
- Holl, FB. et CP. Chanway (1992).** Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.***38**: 303-308.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley et S.T. Williams (1994).** Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. pp: 518-537. 9th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore.
- 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* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathologia*, **78**:1075- 1078.
- Hugenholtz, P. (2002).** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* **3**, Reviews0003
- Idris, A.H., N. Labuschagne et L. Korsten (2007).** Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control.* **40**:97–106.
- Illmer, P., et F. Schinner (1992).** Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, **24**:389–395.
- Illmer, P. et F. Schinner (1995).** Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.*, **27**(3): 257-263.
- Ishimaru, C.A., E.J. Klos et R.R. Brubaker (1988).** Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopatology*.**78**:746-750.

- Ivanova, E.G., N.V. Doronina et Y.A. Trotsenko (2001).** Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiol.*, **70**: 392–397.
- Jackson ,P.J., K.K. Hill, M.T. Laker, L.O. Ticknor et P. Keim (1999).** Genetic comparison of *B. anthracis* and its close relatives using RFLP and PCR analysis. *J. Appl. Microbiol.* **87**:263–269.
- Jacobson, C. B., J. J.Pasternak, et B.R. Glick (1994).** Partial purification and characterization of ACC deaminase from the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12–2. *Can. J. Microbiol.*, **40**: 1019-1025.
- Jofre, E., A. Lagares et G. Mori (2004).** Disruption of d’TDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**(2):267-275.
- Johri JK, S. Surange et CS. Nautiyal (1999).** Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Curr. Microbiol.* **39**(2): 89-93.
- Joo, G.J., SM. Kang, M. Hamayun, Na. CI. Kim, DH. Shin et IJ. Lee (2009).** *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *J Microbiol.* **47**:167–171.
- Joseph, B., RR. Patra et R. Lawrence (2007).** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, **2**: 141-152.
- Kang, SC, CG. Ha, TG. Lee et DK. Maheshwari (2002).** Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. *Curr. Sci.* **82**: 439-441.
- Kappes, RM., B. Kempf et E. Bremer (1996).** Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178** (17): 5071–5079.
- Karamanos, A.J., J.B. Drossopoulos et C.A. Niavis (1983).** Free proline accumulation during development of two wheat cultivars with water stress. *J. Agric. Sci. Camb.*, **100**: 429- 439.
- Kaymak, HC., I. Guvenc, F. Yarali et MF. Donmez (2009).** The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turk J Agric Forest*, **33**:173–179
- Kaymak, HC., F. Yarali, I. Guvenc et MF. Donmez (2008)** The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. *Afr. J. Biotechnol.* **7**:4479–4483
- Kefu, Z., R. Munns et R.W. King (1991).** Abscisic acid levels in NaCl treated barley, cotton and saltbush. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**: 17- 24.
- 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.
- 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(8).
- Khalid, A., M. Arshad et Z.A. Zahir (2006).** Phytohormones: microbial production and applications. *In: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems.* (Eds.): N. Uphoff , A.S. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga and J. Thies. Taylor & Francis/CRC, Boca Raton, Florida. p. 207-220.

- Khan, M. S ., A. Zaidi., et M. Javed (2009).** Microbial Strategies for Crop Improvement. pp: 1-371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kim, KY., D. Jordan, GA. McDonald (1998).** *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilising bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biol. Biochem.* **30**:995–1003.
- Kinraide, T.B. et D.R. Parker (1990).** Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum to four dicotyledonous species. *Physiol. Plant*,**79**: 283-388.
- Kloepper, JW. (1992).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. *In*: FB Metting Jr, ed, *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc., New York, pp 255-274.
- Kloepper, J W. (1993).** Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, *In*: *Soil Microbial Ecology*, (Ed.) F.B. Jr., Metting . Marcel Dekker inc., N.Y. p. 255-273.
- Kloepper, JW. et C. J. Beauchamp (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1219–1232.
- Kloepper, JW., J. Leong, M. Teinteze et MN. Schroth (1980).** Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* **286**:885–886.
- Kloepper, JW., R. Litshitz et R.M. Zablotowicz (1989).** Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**:39–43.
- Kloepper, JW., CM. Ryn et S. Zhang (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. *Phytopathol.*, **94**: 1259-1266.
- Kloepper JW, A. Gutierrez-Estrada et A. McInroy (2007).** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* **53**:159–167.
- Knaak, N., A.A. Rohr, et L.M. Fiuza. 2007.**In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz. J. Microbiol.* **38**(3):526-530.
- Koda, N., T. Asaeda, , K. Yamade, , H. Kawahara et H. Obata, (2001).** A novel cryoprotective protein (CRP) with high activity from the ice-nucleating bacterium, *Pantoea agglomerans* IFO12686. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 888–894.
- Kokalis-Burelle, N., EN. Vavrina, EN. Roskopf et RA Shelby (2002).** Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil*, **238**:257–266.
- Konate , I. (2007) .** Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier(*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Université Mohammed V-Agdal Faculté des sciences, Rabat.
- Kose, C, M. Guleryuz, F. Sahn et I. Demirtas (2003).** Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting of grapevine rootstocks. *Acta Agrobot.* **56**:47–52.
- Krieg, N. R. et J. G. Holt, (1984).** Bergey's manual of determinative bacteriology, volume 1, Baltimore, The Williams and Wilkins Co.

- Kucey, R.M.N., H.H. Janzen et M.E. Legget (1989).** Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* **42**:199–228.
- Kumar, NR., V.T. Arasu et P. Gunasekaran (2002).** Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Sci.* **82**:1463–1466.
- Kumar, V. et N. Narula (1999).** Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils*, **28**(3):301-305
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G.V. Alloni, M. Azevedo, G. Bertero, P. Bessières, A. Bolotin et S. Borchert (1997).** The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249–256.
- Latour, X., T. Corberand, G. Laguerre, F. Allard et P. Lemanceau (1996).** The composition of fluorescent pseudomonad population associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449-2456.
- Laville, J., C. Blumer, C. Von Schroetter, V. Gaia, G. Delfago, C. Keel et D. Haas (1998).** Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.*, **180** : 3187- 3196.
- Lazarovits, G. et J. Norwak (1997).** Rhizobacteria for Improvement of Plant growth and Establishment. *Hort. Sci.* **32**:188-192.
- Lee, KJ., S. Kamala-Kannan, HS. Sub, CK. Seong et GW. Lee (2008).** Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annuum* L) using *Bacillus subtilis*. *World J. Microb. Biot.* **24**:1139–1145.
- Lee, DH. et CB. Lee (2000).** Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* **159**:75–85.
- Leelasuphakul, W., P. Sivanunsakul et S. Phongpaichit (2006).** Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* **38**:990-997.
- Levigneron, A., F.Lopez, G. Vansuyt, P. Berthomieu, P. Fourcroy et F. Casse-Delbart (1995).** Les plantes face au stress salin. *Cah. Agric.* **4**: 263–273.
- Levitt, J. (1980).** Responses of Plants to Environmental Stresses. Volume II, 2nd ed. Academic Press, New York, USA.
- Li, DM. et M. Alexander (1988).** Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant Soil* **108**:211–219.
- Lifshitz, R, JW. Kloepper, M. Kozlowski, C. Simonson, J. Carlso, EM. Tipping et I. Zaleska (1987)** Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* **33**:390–395.
- Lindsay, W.L., P.L.G. Vlek et S.H. Chien (1989).** Phosphate minerals. p1089-1130. *In*: J.B.Dixon and S.B. Weed (ed.) Minerals in soil environment. SSSA, Madison, WL, USA.
- Loper, JE et M.N. Scroth (1986).** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, **76**: 386-389.

- Lorck, H. (1948).** Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*: 142-146.
- Lucy M, E. Reed et BR. Glick (2004).** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **86**:1–25.
- Lugtenberg, BJJ., L Dekkers et GV. Bloemberg (2001).** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**:461–490
- Lugtenberg, BJJ. Et FD. Kamilova (2004).** Rhizosphere management: microbial manipulation for biocontrol. *In*: Goodman RM (ed) Encyclopedia of plant and crop science. Marcel Dekker, New York, pp 1098–1101.
- Lutts, S., V. Majerus et J.M. Kinet (1999).** NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol. Plant*, **105**: 450–458.
- Lynch, J.M. (1990).** The Rhizosphere. Lynch JM, (ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- MacMillan, J.(2002).** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* **20**, 387-442.
- Mahaffee, WF. et JW. Kloepper (1997).** Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbiol Ecol* **34**:210–223.
- Mantelin, S. et B. Touraine (2004).** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* **55**:27–34
- Maplestone, PA. et R. Campbell (1989).** Colonization of roots of wheat seedlings by bacilli proposed as biocontrol agents against takeall. *Soil Biol. Biochem.* **21**(4): 543-550.
- Marceau, A., M Zagorec et MC. Champomier-Verges (2002).** Analysis of *Lactobacillus sakei* adaptation to its environments by a proteomic approach. *Science des aliments*, **22**: 97-105.
- Marcelis, L.F.M. et J. Van Hooijdonk (1999).** Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, **215**: 57-64.
- Mayak, 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.
- McCue, K.F. et A.D. Hanson (1990).** Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.*, **8**: 358-362.
- Mehta, P., A. Chauhan, R. Mahajan, P. K. Mahajan et C. K. Shirko (2010).** Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. *Curr. Sci.* **98**(4): 538-542.
- Meziane, H., I. van der Sluis, LC. van Loon, M. Höfte et PAHM. Bakker (2005).** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**:177-185.
- Miller, K.J. et J.M. Wood (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**:101-136.
- Milus, EA et CS. Rothrock (1993).** Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Revue canadienne de microbiologie* **39**(3): 335-341.

- Miraza, M S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et KA. Malik (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, **237**:47–54.
- Misko, AL. et J. Germida (2002).** Taxonomic and functional diversity of Pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *Microbiol. Ecol.* **42**: 399-707.
- Mitter, N., AC. Srivastava, AS. Renu, AK. Sarbhoy et DK. Agarwal (2002).** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* **153**:187–193.
- Morgan, J.M. (1984).** Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 299-319.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, et C. Boivin-Masson (2001).** Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, **411**, 948–950.
- Müller, V. et A. Oren (2003).** Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles* **7**: 261-266.
- Munimbazi, C. et LB. Bullerman (1998).** Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* **84**:959-969.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell. Environ.*, **25**: 239-250.
- Munns, R (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist.*, **167**: 645–663.
- 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.
- Munns, R. et A. Termaat (1986).** Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**:143–160.
- Munns, R. et M. Tester (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59** : 651-681.
- Nadeem, S.M., Z.A. Zahir, M. Naveed, M. Arshad et S.M. Shahzad (2006).** Variation in growth and ion uptake of maize due to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria under salt stress. *Soil Environ.*, **25**(2): 78-84.
- Nagy, R, V. Karandashov, V. Chague, K.Kalinkevich, M.B.Tamasloukht, G. Xu et al. (2005)** .The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in asymbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant J.*, **42**: 236–250.
- Naidu, B.P., D.F. Cameron et S.V. Konduri (1998).** Improving drought tolerance of cotton by glycine betaine application and selection. *Proceedings of the Australian Agronomy Conference*, July 20-23, 1998, The Australian Society of Agronomy, Australia.
- Nakano, MM., et FM. Hulett (1997).** Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**:1-7.

- Narula, N., A. Deubel, W. Gans, RK. Behl et W. Merbach (2006).** Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ.*, **52**: 119–129.
- Nautiyal, CS. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**: 260-270.
- Nautiyal, CS, S. Bhadauria, P. Kumar, H. Lal, R. Mondal et D. Verma (2000).** Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**: 291-296.
- Neilands, JB., K. Konopka, B. Schwyn, M. Coy, , RT. Francis, BH. Paw (1987).** Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. *In: Iron Transport in Microbes, Plants and Animals.* Winkelmann, G., van der Helm, D., and Neilands, J.B. (eds). Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, pp. 3-33.
- Neilands, JB. et SA. Leong (1986).** Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, **37**: 187-208.
- Nelson, L.M. (2004).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online Crop Management , 10.1094/CM-2004-0301-05-RV.
- Nester, EW., MP. Gordon, RM. Amasino et MF. Yanofsky (1984).** Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**:387–413.
- Nieto KF. et WT. Frankenberger (1989).** Biosynthesis of Cytokinins in Soil. *Sci. Soc. Am. J.* **53** (3): 735-740.
- Normander, B. et JL. Prosser (2000).** Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Applied Environ. Microbiol.*, **66**: 4372-4377.
- Nunes, C., J. Usall, N. Teixido, E. Fons et I. Vinas (2002).** Post –harvest biological control by *Pantoea agglomerans*(CPA -2) on Golden Delicious apples. *J. Appl. Microbiol.* **92**:247-255.
- Okon, Y., GV. Bloemberg et BJJ. Lugtenberg (1998).** Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. *In: Altman A (ed) Agricultural biotechnology.* Marcel Dekker, New York
- Oldroyd, GE., EM. Engstrom, et SR. Long (2001).** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell.* **13**:1835–1849.
- Olsen, S.R., et L.E. Sommers (1982).** Phosphorus. pp: 403-430. *In: Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbial Properties.* Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), second ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Ongena, M., F. Daayf, P. Jacques, P. Thonart, N. Benhamou, , TC. Paulitz, et RR. Bélanger (2000).** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent Pseudomonads. *Plant Pathol.* **49**(4):523-530.
- Ongena, M., A. Giger, P. Jacques, J. Dommès et P. Thonart (2002).** Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Euro. J. Plant Pathol.*, **108**: 187-196.
- Ongena, M., P. Jacques, Y. Toure, , J. Destain, A. Jabrane et P. Thonart (2005).** Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**:29-38.

- Orhan, E, A. Esitken, S. Ercisli, M. Turan et F. Sahin (2006)** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hort* 111:38–43.
- O'Sullivan, D. J., & O'Gara, F. (1991)**. Regulation of iron assimilation: nucleotide sequence analysis of an iron-regulated promoter from a fluorescent pseudomonad. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 1-8.
- Ottow, E.A., M. Brinker, T. Teichmann, E. Bfritz et W. Kaiser et al. (2005)**. *Populus euphratica* displays apoplectics sodium accumulation, osmotic adjustment by decreases in calcium and soluble carbohydrates and develops leaf succulence under salt stress. *Plant Physiol.*, **139**: 1762-1772.
- Paul, E.A., et F.E. Clark (1996)**. Soil Microbiology and Biochemistry, 2nd Edition. Academic Press, New York.
- Paul EA, Clark FE (1989)** Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego, p 234.
- 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. Microbiol.* **48**(5):378–384.
- Paula, MA, S. Urquiaga, IO. Siqueira et J. Dobereiner (1992)**. Synergistic effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biol. Fertil. Soils*, **14**:61–66.
- Penrose, DM. (2000)** The role of ACC Deaminase in plant growth promotion. PhD Thesis, University of Water Loo, Canada.
- Penrose, D.M. et Glick BR. 2001**. Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can. J. Microbiol.* **47**:368–372.
- Penrose DM., Glick BR. (2003)** Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant* **118**:10–15.
- Persello-Cartieaux, L. F., Nussaume et C. Robaglia (2003)**. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* **26**:189-199.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin et J. Wallach (1999)**. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.* **51**:553-563.
- Piano, S., V. Neyrotti, Q. Migheli et M.L Gullino (1997)**. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* **11**(3):131-140.
- Pichereau V., J.A. Pocard, J. Hamelin, C. Blanco et T. Bernard (1998)**. Differential effects of dimethylsulfoniumpropionate, dimethylsulfonioacetate, and other S-methylated compounds on the growth of *Sinorhizobium meliloti* at low and high osmolarities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1420–1429.
- Pikovskaya, R.I. (1948)**. Mobilization of phosphorus in soil inconnection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya.* **17**: 362-370.
- Ping, L. et W. Boland (2004)**. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **9**:263-266.

- Pirlak, L., M. Turan, F. Sahin et A. Esitken (2007).** Floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to apples increases yield, growth, and nutrient element contents of leaves. *J. Sustain. Agric.* **30**:145–155.
- Podile, AR. et GK. Kishore (2006).** Plant growth-promoting rhizobacteria. *In: Gnanamanickam SS (ed) Plant-associated bacteria: rhizosphere bacteria.* Springer, Netherlands, pp 195–230
- Poolman B. et E. Glaasker (1998).** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**(2):397-407.
- Pradhan, N. et LB. Sukla (2005).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol.* **5**(10): 850-854.
- Prasad, J., P. McJarrow et P. Gopal (2003).** Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability of to drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2): 917-925.
- Pusey, PL., VO. Stockwell et DR. Rudell (2008).** Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **.98** :1136-1143.
- Raaijmakers, J.M., M.Vlami et J.T. de Souza (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 537-547.
- Raggi, V. (1994).** Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. *Physiol. Plant*, **91**: 427-434.
- Rahman, MS., T. Ano et M. Shoda (2007).** Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* **127**:503-507.
- Rahman, M., S. Mubassara.,S. Hoque et Z. Khan (2006).** Effect of Some Environmental Factors on the Growth of *Azospirillum* Species Isolated from Saline Soils of Satkhira District, Bangladesh. *Bangladesh J. Microbiol.* **23**: 145-148.
- Rai, S.P., R. Luthra et S. Kumar (2003).** Salt-tolerant mutants in glycophytic salinity response (GRS) genes in *Catharanthus roseus*. *Theor. Appl. Genet.* **106** : 221–230.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raghuchander, V. Prakasam et R. Samiyappan (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. Frapolli, G. Defago et Y. Moenne-Loccoz (2003).** Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcn* BC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **16**: 525-535.
- Ramirez, LEF., JC. Mellado (2005)** Bacterial biofertilizers. *In: Siddiqui ZA (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization.* Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 143–172.
- Ravnskov, S., J. Larsen, PA. Olsson et I. Jakobsen (1999).** Effects of various organic compounds on growth and phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* **141**:517–524.
- Rehman, S., PJC. Harris et M. Ashraf (2005).** Stress environments and their impact on crop production. *In: Ashraf M, Harris PJC (eds) Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches.* Haworth Press, New York, pp 3–18.

- Reyes, MEQ., KG. Rohrbach et RE. Paull (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **33(2)**:193-203.
- Reyes, I., L. Alvarez, H. El-Ayoubi et A. Valery (2008).** Selection and evaluation of growth promoting rhizobacteria on pepper and maize. *Bioagro.* **20**:37–48.
- Reynolds, M., et R. Tuberosa (2008).** Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opinion in Plant Biol.* **11**: 171-179.
- Richardson, AE. (2001):** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, **28**: 897-906.
- Rinallo, C., L. Mittempergher, G. Frugis et D. Mariotti (1999).** Clonal propagation in the genus *Ulmus*: improvement of rooting ability by *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *J. Hortic. Sci. Biotech.* **74**:502–506.
- Robertson, EB. et MK. Firestone (1992).** Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1284-1291.
- Rodriguez, MN., RD. Villalonga, RAJ. Castillo, AJL. Marques, LR. Gonzalez, SP. Llanes et FM. Peguero (2001).** Influence of application of a biofertilizer based on *Azospirillum* on germination of seed and production of vegetable crops. *Centro Agricola* **28**:38–41.
- Rogers ,ME., AD. Craig, R. Munns, TD. Colmer, PGH. Nichols, CV. Malcolm, EG. Barrett-Lennard, AJ. Brown, WS. Semple, PM. Evans, K. Cowley, SJ. Hughes, R. Snowball, SJ. Bennett, GC. Sweeney, BS. Dear et MA. Ewing (2005) .**The potential for developing fodder plants for the salt-affected areas of southern and eastern Australia: An overview. *Aust. J. Exp. Agr.* **45**:301–329.
- Rosado, AS., FS. de Azevedo, DW. da Cruz, JD. van Elsas and L. Seldin (1998).** Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. *J. Appl. Microbiol.* **84(2)** :216–226.
- Rovira, A. D. (1969).** Plant root exudates. *The Botanical Review*, **35**, 35-57.
- Rovira, A.D. et C.B. Davey (1974).** Biology of the rhizosphere. *In* : *The Plant Root and Its Environment*. Ed. E.W. Carson. Univ. Press Virginia, Charlottesville. pp 153-204.
- Russo, A., C. Felici, A. Toffanin, M. Goetz, C. Collados, J. Barea et al. (2005),** Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants, *Biol. Fert. Soils*, **41**: 301–309.
- Ryu, CM., MA. Farag, CH. Hu, MS. Reddy, HX. Wei, PW. Paré et JW. Kloepper (2003).** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 4927-4932.
- Ryu, R. et C.L. Patten. 2008.** Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4 TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Am. Soc. Microbiol.*, **19**: 1-35.
- Saharan, BS. et V. Nehra (2011).** Plant Growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sci. Med. Res.*, **21**.
- Sahin F, R. Cakmakci et F. Kantar (2004).** Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil*, **265**:123–129.

- Salantur A, A. Ozturk, S. Akten, F. Sahin et F. Donmez (2005).** Effect of inoculation with nonindigenous and indigenous Rhizobacteria of Erzurum (Turkey) origin on growth and yield of spring barley. *Plant Soil*, **275**:147–156.
- Salisbury, F.B. (1994).** The role of plant hormones. Marcel Dekker, (ed.). New York, USA.
- Salisbury, FB. et CW. Ross (1992).** Plant physiology. Wadsworth, Belmont, CA.
- Saravanakumar, D. et R. Samiyappan (2007).** ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J. Appl. Microbiol.*, **102**(5): 1283-1292.
- Sawada, H., L.D. Kuykendall et J.M. Young (2003).** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen fixing legume symbionts. *J. Gen. Applied Microbiol.*, **49**: 155-179.
- Saxena, A.K et KVBR. Tilak (1998).** Free-living nitrogen fixers: Its role in crop production. *In : Microbes for Health, Wealth and Sustainable Environment*, Malhotra Publ Co, *New Delhi*. Edited by Verma AK, 25–64.
- Schippers ,B., AW. Bakker et PAHM. Bakker (1987).** Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**:339-358.
- Schippers, B., AW. Bakker, R. Bakker et R. van Peer (1990).** Beneficial and deleterious effects of HCN-producing Pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant Soil*, **129**: 75- 83.
- Schwabele, KA., K. Iddo et KC. Knap (2006).** Drain water management for salinity mitigation in irrigated agriculture. *Am. J. Agric. Ecol.*, **88**: 133-140.
- Seldin, L., A. Soares Rosado, DW. da Cruz, A. Nobrega, JDE. van Elsas et M. Paiva (1998).** Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3860–3868.
- Shaharoon, B., M. Arshad et Z.A. Zahir (2006).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett. in Appl. Microbiol.* **42**: 155-159.
- Sharma, K., G. Dak, A. Agrawal, M. Bhatnagar et R. Sharma (2007).** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed sand seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, **1**: 61-63.
- Shwyn, B. et J.B. Neilands (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* **160**: 47-56.
- Siddiqui, Z. (2006).** PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, **111**-142.
- Siddiqui, IA., 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.
- Siddiqui, ZA. et I. Mahmood (1999)** Bioresource. *Technology*, **69**:167–179.
- Singh, T.N., D. Aspinall, L.G. Paleg et S.F. Bogges (1973).** Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**: 57-63.

- Singh, SM., LS. Yadav, SK. Singh, P. Singh, PN. Singh et R. Ravindra (2011).** Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus niger* strains. *Polar Research*, **30**:7283.
- Skoog, D.A, D.M. West, F.J. Holler et S.R. Crouch (2000).** Analytical chemistry: An Introduction. pp: 594-631. 7th Edn., Saunders College Publishing, Philadelphia, PA., USA.
- Somers E, J. Vanderleyden et M. Srinivasan (2004).** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* **304**:205–240.
- Son, TTN., CN. Diep et TTM. Giang (2006).** Effect of bradyrhizobia and phosphate solubilizing Bacteria application on Soybean inrotational system in the Mekong delta. *Omonrice* **14**:48–57.
- Sorensen, J. (1997)** The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. *In: van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH (eds) Modern soil ecology.* Marcel Dekker Inc., New York, pp 21–46.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden et R. Remans (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31** (4): 425-448.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden et Y. Okon (2009).** Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *In: van Loon LC (ed) Advances in botanical research*, vol 51. Academic, Burlington, pp 283–320.
- Stabb, EV., LM. Jacobson et J. Handelsman (1994).** Zwittermicin A producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4404–4412.
- Stajkovic, O., D. Declic, D. Josic, D. Kuzmanovic, N. Rasulic et Knezevic-Vukcevic (2011).** Improvement of common bean growth by co-inoculation with Rhizobium and plant growth promoting bacteria. *Roman Biotechnol. Lett.* **16**: 5915-5926.
- Stein, AC., M. Sortino, C. Avancini, S. Zacchino et G. von Poser (2005).** Ethnoveterinary medicine in the search of antimicrobial agents: Antifungal activity of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.*, **99**: 211-214.
- Stephens, KM., C. Roush, et EW. Nester (1995).** *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 protein requires a consensus nucleotide binding site for function in virulence. *J. Bacteriol.* **177**: 27-36.
- Stepien, P. et G. Klobus (2005).** Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiol. Plant.*: **125**, 31-40.
- Sturz, AV., BR. Christie et J. Nowak (2000).** Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**:1-30.
- Sturz, AV., et BR. Christie (2003).** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil Till. Res.*, **72**:107-123.
- Subbarao, NS. (1988).** Phosphate solubilizing micro-organism. *In: Biofertilizer in agriculture and forestry.* Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, pp 133–142.
- Sulbaran, M., E. Perez, M. Ball, A. Bahsas et L.A. Yarzabal (2008).** Characterization of the Mineral Phosphate Solubilizing Activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 Isolated from an Iron-Rich Soil in Southeastern Venezuela (Bolivar State). *Curr. Microbiol.* **58**:378-383.
- Sun, XJ., LM. Wang, Y. Zhang, L. Yenush, MG. Myers Jr, E Glasheen, WS. Lane, JH. Pierce et MF. White (1995).** Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature.* **377**(6545):173-7.
- Sundara, B., V. Natarajan et K. Hari (2002).** Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane yields. *Field Crops Res.* **77**:43–49.

Swaidner JM, GW. Ware et JP. McCollum (1992). Producing vegetable crops. Interstate Publishers Inc, Danville, IL.

Takeda, M et J.D. Knight (2006). Enhanced solubilization of rock phosphate by *Penicillium bilaiae* in pH-buffered solution culture. *Can. J. Microbiol.* **52**:1121-1129.

Talibart., R., M. Jebbar, K. Gouffi, V. Pichereau, G. Gouesbet , C. Blanco T. Bernard et JA. Pocard (1997). Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in salt-stressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4657–4663.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei et S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.

Tatar, O. et M.N. Gevrek (2008). Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. *Asian J. Plant Sci.*, **7**: 409-412.

Tejera, NA., E. Ortega, J. González-López et C. Lluch (2003). Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J. Appl. Microbiol.*, **95**: 528–535.

Tester, M., et R.J. Davenport (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.*, **91**: 503–527.

Tien, T.M, M.S. Gaskins et D.H. Hubbel (1979). Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Micro.*, **37**(5): 1016-1024.

Tilak, KVBR., N. Rauganayaki et C. Manoharachari (2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and Rhizobium on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Europ. J. Soil Sci.* **57**:67–71

Timmusk SNS., B. Nicander, U. Granhall et E. Tillberg (1999). Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* **31**:1847–1852.

Touré, Y., M. Ongena, P. Jacques , A. Guiro et P. Thonart (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* **96**:1151-1160.

Tripathi, A.K., B.M. Mishra et P. Tripathi (1998). Salinity stress responses in the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum* sp. *J. Biosci.*, **23**: 463-471.

Tsakelova, EA., SY. Klimova, TA. Cherdyntseva, et AI. Netrusov (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **42**:117–126

Turan, M., N. Ataoğlu et F. Şahun (2006). Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *J. Sus. Agri.* **28** (3) : 99-108.

Valdebinito, M., A.L Crumbliss., G. Winkelman et K. Hantke (2006). Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersinianbactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**:513-520.

Van Loon, LC. et PA. Bakker (2005). Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: Siddiqui Z.A., ed. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 39-66.

- Van Loon, LC., PA. Bakker et CM. Pieterse (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:453–483.
- Van Loon, LC., PBJ. Geraatset HJM. Linthorst (2006).** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **11**:184–190.
- Van Peer, R., G.J. Niemann et B. Schippers (1991).** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, **81**: 728–734.
- Van Volkenburgh, E. et J.S. Boyer (1985).** Inhibitory effects of water deficit on maize leaf elongation. *Plant Physiol.*, **77**:190-194.
- Vargas, DP, R. Ferrera-Cerrato, JJ. Almaraz-Suarez, AG. Gonzalez (2001).** Inoculation of plant growth-promoting bacteria in lettuce. *Terra* **19**:327–335.
- Vazquez, P., G. Holguin, , M. E. Puente, A. Lopez-Cortes et Y. Bashan (2000).** Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* **30**: 460-468.
- Ventosa, A., JJ. Nieto et A. Oren (1998).** Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(2): 504-544.
- Verma, SC., JK. Ladha et AK. Tripathi (2001).** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* **91**:127–141
- Vessey, J.K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, **255** : 571–586.
- Vessey, JK. et TJ. Buss (2002).** *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes. Controlled-environment studies. *Can. J. Plant Sci.* **2**: 282–290.
- Vestberg M, Kukkonen S, Saari K, Parikka P, Huttunen J, Tainio L, Devos N, et al. (2004).** Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Appl. Soil Ecol.* **27**: 243–258.
- Viégas, R.A. et J.A.G. Silveira (1999).** Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long-term exposure to NaCl-salinity. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **11**: 153-159.
- Vinter, V. (1987).** The effect of cysteine upon spore formation by *Bacillus megaterium*. *J. Appl. Bacteriol.* **3**: 325- 332.
- Vivas, A., B. Biro, E. Campos, J. M. Barea et R. Azcón (2003).** Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mossae*) and *Brevibacillus* sp. Isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environ. Pollut.*, **126**: 179-189.
- Vivas, A., A. Marulanda, J.M. Ruiz-Lozano, J.M. Barea et R. Azcon (2003).** Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant response to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* **13**: 249-256.
- Voisard, C, C. Keel, D Haas, et G. Defago (1989).** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO J.*, **8**: 351-358.
- Wang Y, HN. Brown, DE. Crowley et PJ. Szaniszlo (1993).** Evidence for direct utilization of a siderophore, ferroxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell. Environ.* **16**(5): 579–585.

- Wang, C., E. Knill, B.R. Glick et G. Défago (2000).** Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* **46**:898–907.
- Wang, W. X., B. Vinocur, O. Shoseyov et A. Altman, (2001).** Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort.*, **560**: 285- 292.
- Wani, P.A., M.S. Khan et A. Zaidi (2007).** Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **170**: 283-287.
- Weller, DM. et LS. Thomashow (1994).** Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. *In*: O’Gara F, Dowling DN, Boesten B (eds) Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. VCH Weinheim, Germany, pp 1–18.
- Wenxing, H., Y. Tuo, Shongyang et S. Lina (2008).** PGPR bio-fertilizers producing and its effect on *Avena sativa* growth and quality development. *Acta Pratac. Sinica*, **17**:75-84.
- Whatmore, AM., JA. Chudek, RH. Reed (1990).** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **136**(12): 2527-2535.
- Whipps, JM. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**:487–511.
- Whitelaw, MA. (2000)** Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* **69**:99–151.
- Williams, PM., M. Sicardi de Mallorca (1982) .** Abscisic acid and gibberellin-like substances in root nodule of *Glycine max*. *Plant Soil* **65**: 19-26.
- Wipat, A., et CR. Harwood (1999).** The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, *FEMS Microb. Ecol.* **28**:1-9.
- Wu, SC., ZH. Cao, ZG. Li, KC. Cheung et MH. Wong (2005).** Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. *Geoderma*, **125**: 155-166.
- Wyn Jones, R.G. (1981).** Salt Tolerance. pp: 271-291. *In*: Physiological Processes Limiting Plant Productivity, Johnson, C.B (Ed.). Butterworth Press, London, UK.
- Yahalom, E., Y. Okon et A. Dovrat (1990).** Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). *Can. J. Microbiol.* **36**: 10-14.
- Yancey, PH., ME. Clark, SC. Hand, RD. Bowlus et G. Somero (1982).** Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**:1212-1222.
- Yang, J, JW. Kloepper et CM. Ryu (2009).** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* **14**:1–4.
- Yasmin, F., O. Radziah, S. Mohd. Said et S. Kamaruzaman (2007).** Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweetpotato rhizosphere. *Biotechnol.*, **6**: 49-52.

Yazdani, M., MA. Bahmanyar, H. Pirdashti et M.A. Esmaili. 2009. Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of Corn (*Zea mays L.*). World Academy of Science, *Engin. Technol.*, **49**: 90-92.

Zahir, ZA, M.Arshad et WT. Frankenberger (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture.*Adv. Agron.*, **81**, 97-168.

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.

Zaidi, SFA. (2003) Biocontrol of *Fusarium oxysporium* by plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in soybean. *Ann. Agr. Res.* **24**:676–678.