

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N° ...../SNV/2022

## THÈSE

Présentée par

**KERBAB Souhila**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

## THÈME

**Effets bénéfiques des bactéries halotolérantes isolées de la  
rhizosphère des halophytes sur la croissance du blé dur  
dans les sols salins**

Soutenue publiquement le **05/01/2022**

### DEVANT LE JURY

Président	<b>YAHIAOUI Bilal</b>	<b>MCA UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>CHERIF Hafsa</b>	<b>MCA UFA Sétif 1</b>
Co-directeur	<b>SILINI Allaoua</b>	<b>MCA UFA Sétif 1</b>
Examineurs	<b>HAMIDECHI Ma Abdelhafid</b>	<b>Pr UM Constantine 1</b>
	<b>KACEM CHAOUCH Nouredine</b>	<b>Pr UM Constantine 1</b>
	<b>KITOUNI Mahmoud</b>	<b>Pr UM Constantine 1</b>

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail :

A mon Père

Qui a œuvré pendant des années à notre bien être et qui a consenti de bien lourds efforts pour nous permettre de mener à bien nos études. Je tiens à lui témoigner ma profonde affection.

A ma Mère

Son soutien tout au long de mes études, sa bienveillance et ses conseils ont été très précieux, je tiens à lui témoigner ma profonde affection et reconnaissance.

A toute ma famille: Mouhammad, Abd El moumene, Nidhal, Iméne, Manel, Israa et Mounira.

A qui je témoigne ma profonde affection, toujours présent, ils m'ont toujours assisté et cru en moi.

A mes amies: Qui m'ont toujours entouré et soutenu.

A tous les miens.



## **Remerciements**

*Ce travail de thèse a été le labour de plusieurs années et je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Ce travail doctoral n'aurait jamais été une réussite sans le soutien d'un grand nombre de personnes que je tiens vivement à remercier, et qui m'ont encouragé à aller au bout de cette « grande aventure ».*

*J'exprime toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame **Hafsa CHERIF SILINI** qui a assuré le suivi scientifique de ce travail et qui m'a fait partager ses connaissances et son expérience. Je lui témoigne toute ma gratitude pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience, sa compréhension et ses encouragements. Fière de compter parmi vos étudiants, je suis sensible à la confiance que vous m'avez accordée, pour votre dévouement, votre persévérance et vos conseils avisés.*

*Une pensée chaleureuse pour mon co-encadreur de thèse Monsieur **Allaoua SILINI**, Maître de conférences de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université de Sétif. Vous étiez une source de motivation et de courage. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour vos remarques et critiques pertinentes et fructueuses.*

*Je tiens à remercier Monsieur **Bilal YAHIAOUI**, Maître de conférences de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université de Sétif, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.*

*Je tiens à remercier également Monsieur **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.*

*Je remercie également Monsieur **Mahmoud KITOUNI**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mentouri-Constantine, d'avoir bien voulu être examinateur de mon travail de thèse. Je lui assure mon dévouement et mon profond respect.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **Noureddine KACEM CHAOUCH**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mentouri-Constantine, pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à Monsieur **Lassaad BELBAHRI**, Professeur à la l'Université de Neuchâtel-Suisse, pour son aide précieuse et son soutien scientifique surtout pour l'accomplissement de la partie biologie moléculaire.*

*Je remercie beaucoup Madame **Manal ESHELLI**, du département des Sciences et Technologies alimentaires, Faculté d'agriculture, Université de Tripoli-Libye et Monsieur **Ali Chenari BOUKET**, du centre de recherche et d'enseignement sur les ressources agricoles et naturelles de l'Azarbaïdjan-Tabriz-Iran, pour leurs aides précieuses dans la réalisation des analyses statistiques.*

*Que ma collègue **Nour El Houda RABHI**, Maître de Conférences de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- centre Universitaire de Mila, trouve ici l'expression de mes sentiments de gratitude et de fraternité.*

*Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce modeste travail puisse être achevé.*

## **Production scientifique**

### **Publications :**

**Kerbab, S.**, Silini, A., Chenari Bouket, A., Cherif-Silini, H., Eshelli, M., El Houda Rabhi, N., & Belbahri, L. (2021). Mitigation of NaCl stress in wheat by rhizosphere engineering using salt habitat adapted PGPR halotolerant bacteria. *Applied Sciences*, *11*(3), 1034.

<https://doi.org/10.3390/app11031034>

### **Communications Internationales:**

**Kerbab, S.**, A. Silini, H. Cherif-Silini and M. Goul. 2013. Treatment of salt water and restoration of salt soils using natural osmoprotectant compounds from the halophyte (*Atriplex halimus*) in association with salt tolerant actinomycetes. Séminaire International: Eaux, Matériaux et Environnement. Sidi Bel Abbes, Algérie. 03-04 Déc.

**Kerbab, S.**, A. Silini, H. Cherif-Silini and M. Goul. 2014. Antifungal activity of salt-tolerant actinomycetes from Algerian sebkha soil. II<sup>ème</sup> congrès international de biotechnologie et valorisation des bio-ressources (BVBR). Tabarka, Tunisie. 18-20 Mar.

**Kerbab, S.**, A. Silini, H. Cherif-Silini and M. Goul. 2015. Solubilisation of inorganic phosphate by salt-tolerant actinomycetes from Algerian sebkha soil to use it us biofertilizers. I<sup>er</sup> Forum International sur les Biointrants. Oran, Algérie. 12-13 Mai.

**Kerbab, S.**, A. Silini, H. Cherif-Silini and M. Goul. 2015. Use of (*Atriplex halimus*) as natural osmoprotection for the restoration of arid and semi-arid lands. Symposium International: Société, Agro-Biotechnologie, Environnement et Développement Durable. Tiaret, Algérie. 27-29 Mai.

**Kerbab, S.**, A. Silini, H. Cherif-Silini and M. Goul. 2015. Restoration of antimicrobial activity of salt tolerant actinomycetes from Algerian sebkha soil using synthetique osmoprotection (glycine betaine) and natural osmoprotection (*Atriplex halimus*). Séminaire International des Biotechnologie. Constantine, Algérie. 19-20 Oct.

**Kerbab, S.**, A. Silini, H. Cherif-Silini and M. Goul. 2015. Use of actinomycetes from extreme environment (sebkha soil) us producers of indol acetic acid. 1<sup>st</sup> International Conference of Microbial Ecology. Sétif, Algérie. 12-14 Déc.



## ملخص

يوجد اهتمام كبير بتخفيف ملوحة التربة التي تحد من نمو النباتات وإنتاجيته. في هذه الدراسة، تم عزل تسعة وثمانين سلالة تم جمعها من ريزوسفير واندوسفير من نوعين من الهالوفيت (*Suaeda mollis*) و (*Salsola tetrandra*) من ثلاثة شطوط في الجزائر. تم فحصها لثتى الصفات التي تعزز نمو النباتات والنشاط المضاد للفطريات ومقاومة الظروف الفيزيائية والكيميائية المختلفة (NaCl و PEG و pH) لتقييم كفاءتها في تخفيف التوتر الملحي وتعزيز نمو *Arabidopsis thaliana* والقمح الصلب تحت ظروف إجهاد الملح. أخيراً تم اختيار ثلاث سلالات بكتيرية BR5 و OR15 و RB13 وتم تحديدها باسم *Bacillus atrophaeus*. تم استخدام السلالات البكتيرية (بشكل منفصل و موحد) في تلقيح *Arabidopsis thaliana* والقمح الصلب في مرحلة إنبات البذور تحت ظروف إجهاد الملح. وأشارت النتائج إلى أن تلقيح كل من نوعي النبات بالسلالات البكتيرية بشكل منفصل أو مجتمعة حسنت كثيراً معالم النمو.

استخدمت ثلاثة ترب ذات مستويات ملوحة مختلفة ( $S1 = 0.48$ ،  $S2 = 3.81$ ، و  $S3 = 2.80$  mS/cm) لدراسة آثار السلالات المختارة (BR5 و OR15 و RR13)، بشكل منفصل ومدمج) على عدة معالم نمو لنبات القمح. وقد ثبت أن التلقيح (لا سيما الاتحاد متعدد السلالات) هو النهج الأفضل لزيادة محتويات الكلوروفيل والكروتينويد مقارنة بالنباتات الشاهدة. ومع ذلك، انخفض محتوى البرولين، بيروكسيد الدهون، وأنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة بعد التلقيح ببكتيرييات تعزيز النمو النباتي (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria) الذي يمكن أن يخفف من الآثار السلبية لإجهاد الملح عن طريق الحد من أنواع الأكسجين التفاعلي (ROS). وأشارت هذه النتائج إلى أنه في ظل ظروف التربة المالحة، فإن سلالات PGPR المقاومة للملوحة تعد مترشحات واعدة كمخصبات حيوية في ظل ظروف إجهاد الملح.

**الكلمات المفتاحية:** PGPR; مقاومة الملوحة; *Arabidopsis thaliana*; القمح الصلب; هندسة الريزوسفير (AIA); حمض اندول الخليك).

## Résumé

Il existe un grand intérêt pour l'atténuation de la salinité du sol qui limite la croissance et la productivité des plantes. Dans cette étude, 98 souches sont isolées de la rhizosphère et de l'endosphère de deux espèces d'halophytes (*Suaeda mollis* et *Salsola tetrandra*) prélevées dans trois chotts en Algérie. Elles sont analysées pour divers caractères favorisant la croissance des plantes, l'activité antifongique et la tolérance aux différentes conditions physico-chimiques (pH, PEG et NaCl) pour évaluer leur efficacité dans l'atténuation du stress salin et l'amélioration de la croissance d'*Arabidopsis thaliana* et de blé dur dans des conditions de stress salin. Trois souches bactériennes BR5, OR15 et RB13 sont finalement sélectionnées et identifiées comme *Bacillus atrophaeus*. Les souches bactériennes (séparément et combinées) sont ensuite utilisées pour inoculer *Arabidopsis thaliana* et le blé dur dans des conditions de stress salin. Les souches bactériennes (séparément et combinées) sont ensuite utilisées pour inoculer l'*Arabidopsis thaliana* et le blé dur au stade de germination des semences dans des conditions de stress salin. Les résultats indiquent que l'inoculation des deux espèces de plantes avec les souches bactériennes séparément ou combinées améliorent considérablement les paramètres de croissance.

Trois sols présentant des niveaux de salinité différents ( $S1 = 0,48$ ,  $S2 = 3,81$  et  $S3 = 2,80$  mS/cm) sont utilisés pour étudier les effets de souches sélectionnées (BR5, OR15 et RB13, séparément et combinées) sur plusieurs paramètres de croissance des plantes de blé. L'inoculation (notamment le groupe multi souches) a prouvé une meilleure approche pour augmenter la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes par rapport aux plantes témoins. Cependant, la teneur en proline, la peroxydation lipidique et les activités des enzymes antioxydantes sont diminuées après inoculation avec les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes (PGPR) et qui peuvent atténuer les effets néfastes du stress salin en réduisant la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Ces résultats indiquent que dans les sols salins, les souches PGPR halotolérantes sont des candidats prometteurs comme biofertilisants.

**Mots clés:** bactéries favorisant la croissance des plantes; tolérance à la salinité; *Arabidopsis thaliana*; blé dur; ingénierie de la rhizosphère; acide indole acétique (AIA).

***Abstract***

There is a great interest in mitigating soil salinity that limits plant growth and productivity. In this study, 98 strains were isolated from the rhizosphere and endosphere of two halophyte species (*Suaeda mollis* and *Salsola tetrandra*) collected from three chotts in Algeria. They were screened for diverse plant growth-promoting traits, antifungal activity and tolerance to different physicochemical conditions (pH, PEG, and NaCl) to evaluate their efficiency in mitigating salt stress and enhancing the growth of *Arabidopsis thaliana* and durum wheat under NaCl-stress conditions. Three bacterial strains BR5, OR15, and RB13 were finally selected and identified as *Bacillus atropheus*. The Bacterial strains (separately and combined) were then used for inoculating *Arabidopsis thaliana* and durum wheat during the seed germination stage under NaCl stress conditions. Results indicated that inoculation of both plant spp. with the bacterial strains separately or combined considerably improved the growth parameters.

Three soils with different salinity levels (S1= 0.48, S2= 3.81, and S3= 2.80 mS/cm) were used to investigate the effects of selected strains (BR5, OR15, and RB13; separately and combined) on several growth parameters of wheat plants. The inoculation (notably the multi-strain consortium) proved a better approach to increase the chlorophyll and carotenoid contents as compared to control plants. However, proline content, lipid peroxidation, and activities of antioxidant enzymes decreased after inoculation with the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) that can attenuate the adverse effects of salt stress by reducing the reactive oxygen species (ROS) production. These results indicated that under saline soil conditions, halotolerant PGPR strains are promising candidates as biofertilizers under salt stress conditions.

**Keywords:** plant growth promoting bacteria; salinity tolerance; *Arabidopsis thaliana*; durum wheat; rhizosphere engineering; indole acetic acid (IAA).

***Liste des principales abréviations***

**AAB:** Acide abscisique

**ACC:** Amino-cyclopropane-1-carboxylate désaminase

**AG:** Acide gibberllique

**AIA:** Acide indole acétique

**AJ:** Acide jasmonique

**APX:** Ascorbate peroxydase

**ARDRA:** Amplified ribosomal DNA restriction analysis

**AS:** Acide salicylique

**AVG:** Aminoethoxyvinylglycine

**BFN:** Bactéries fixatrices d'azote

**CAS:** Chrome Azurol S agar

**CAT:** Catalase

**C<sub>e</sub>:** Conductivité électrique

**CK:** Cytokinine

**Cl:** Chlore

**CMC:** Carboxyméthylcellulose

**COVs:** Composés organiques volatiles

**DAPG:** 2,4-diacétylphloroglucinol

**dS:** DéciSiemens

**EDTA:** Acide éthylène-diamine-tétraacétique

**EPS:** Exopolysaccharides

**ET:** Ethylène

**GABA:** Acide gamma-aminobutyrique non protéique

**GB:** Gibbérelline

**GPX:** Guaiacol peroxydase

**GR:** Glutathione réductase

**GRI:** Germination rate index

**HCN:** Hydrogen cyanide

**HT-PGPR:** PGPR halotolérantes

**ISR:** Induction of systemic resistance

**IVLS:** Indice de vigueur de la longueur des semis

**IVPS:** Indice de vigueur de poids des semis

**MDA:** Malondialdéhyde

**Mha:** Mega hectare (ha x 10<sup>6</sup>)

**MOS:** Matière organique du sol

**mS:** MilliSiemens

**PBRs:** Plant bio-regulator

**PEG-8000:** polyéthylène glycol

**ROS:** Reactive oxygen species

**SAR:** Systemic acquired resistance

**SOD:** Superoxyde dismutase

**TSA:** Trypticase Soja Agar

## ***Liste des Figures***

- Fig. 1 : Distribution mondiale des sols salins et sodiques.**
- Fig. 2 : Effet de la salinité sur le développement des plantes.**
- Fig. 3 : Représentation schématique des mécanismes comparatifs utilisés par les halophytes et les glycophytes en milieu salin.**
- Fig. 4 : Utilisations potentielles des halophytes.**
- Fig. 5 : Différentes stratégies de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR).**
- Fig. 6 : Mécanismes de solubilisation des phosphates par les PGPR.**
- Fig. 7 : Voies biosynthétiques de l'auxine dépendante du tryptophane chez les plantes et les PGPR.**
- Fig. 8 : Mécanismes impliqués dans la modulation des composés organiques volatiles de la croissance des plantes.**
- Fig. 9 : Atténuation du stress salin chez les plantes par les HT-PGPR.**
- Fig. 10 : Représentation schématique de l'activité de l'ACC désaminase des PGPR lors de conditions de stress abiotique.**
- Fig. 11 : Genres bactériens des HT-PGPR identifiées à partir d'une méta-analyse à travers le monde (A) établie sur 42 expériences (B). Genres bactériens endophytes prédominants (C).**
- Fig. 12 : Effets favorisant la croissance des plantes par *B. subtilis*.**
- Fig. 13 : Localisation géographique de la Sebkhia Bazer Sakhra (Sétif).**
- Fig. 14 : Site de prélèvement à la Sebkhia de Bazer Sakhra (Sétif).**
- Fig. 15 : Localisation géographique du Chott Tinsilt (Oum El Bouaghi).**
- Fig. 16 : Site de prélèvement à Chott Tinsilt (Oum El Bouaghi).**
- Fig. 17 : Localisation géographique du Chott El Hodna (Baniou, M'sila).**
- Fig. 18 : Site du prélèvement à Chott El Hodna (Baniou, M'sila).**
- Fig. 19 : Halophytes utilisées pour l'isolement des bactéries rhizosphériques et endophytes.**
- Fig. 20 : Nombre de souches bactériennes isolées de différents compartiments du sol des trois sites de prélèvement.**
- Fig. 21 : Pourcentage des activités PGP des souches bactériennes.**
- Fig. 22 : Activités PGP des différentes bactéries de A) Sebkhia de Bazer Sakhra, de B) Oum El Bouaghi et de C) Baniou.**

**Fig. 23 :** Halo de solubilisation du phosphate (à gauche). Activité protéolytique d'une souche bactérienne (à droite).

**Fig. 24 :** Taux des bactéries productrices d'AIA en fonction du compartiment et du site d'isolement.

**Fig. 25 :** Production d'AIA par différentes souches bactériennes (Témoin à gauche).

**Fig. 26 :** Activité antifongique des souches bactériennes envers les champignons phytopathogènes.

**Fig. 27 :** Optimum de croissance des PGPR sous stress salin.

**Fig. 28 :** Optimum de croissance des PGPR sous différents pH.

**Fig. 29 :** Optimum de croissance des PGPR sous différentes températures.

**Fig. 30 :** Optimum de croissance des PGPR sous différentes concentrations de PEG<sub>8000</sub>.

**Fig. 31:** Colonies bactériennes de la souche BR5.

**Fig. 32 :** Arbre phylogénétique basé sur une comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des souches bactériennes et de certaines souches phylogénétiquement proches.

**Fig. 33 :** Effet *in vitro* des bactéries sur la croissance d'*Arabidopsis thaliana* sous différentes concentrations de NaCl.

**Fig. 34 :** Effet des bactéries sur (A) la longueur des racines (cm), (B) le poids frais des racines (mg) et (C) la surface des feuilles (cm<sup>2</sup>) sous différentes concentrations de NaCl.

**Fig. 35 :** Effet des bactéries sur les teneurs en (A) chlorophylle a, (B) chlorophylle b et (C) chlorophylle a+b (µg/g de poids frais) sous différentes concentrations de NaCl.

**Fig. 36 :** Effet des bactéries sur la croissance *in vitro* des semis de blé à des concentrations de NaCl de 0 et 150 mM.

**Fig. 37 :** Effet des bactéries sur (A) le taux de germination (%), (B) le pourcentage de germination final, (C) l'indice de vigueur de la longueur des semis et (D) l'indice de vigueur du poids des semis sous différentes concentrations de NaCl.

**Fig. 38 :** Evaluation *in vivo* des différentes bactéries sur les semis de blé et leurs systèmes racinaires dans les trois sols différents.

**Fig. 39 :** Effet des bactéries sur (A, B) la longueur (cm), (C, D) le poids frais (g), et (E, F) le poids sec, des racines et des tiges sous différentes concentrations de NaCl.

**Fig. 40 :** Effet des bactéries sur les teneurs en (A) chlorophylle a (µg/g PF), (B) chlorophylle b (µg/g PF), (C) chlorophylle a+b (µg/g PF) et (D) caroténoïdes (µg/g PF) sous différentes concentrations de NaCl.

**Fig. 41 :** Effet des bactéries sur (A, B) les sucres totaux (mg/g PF), (C, D) les protéines totales (mg/g PF), (E, F) la teneur en proline (µg/g PF) et (G, H) la teneur en MDA des racines et des tiges (µM/g PF) sous différentes concentrations de NaCl.

**Fig. 42 :** Effet des bactéries sur (A, B) la teneur en APX, (C, D) en GPX, (E, F) en SOD et (G, H) en CAT des racines et des tiges (U/mn/mg de protéine) sous différentes concentrations de NaCl dans 3 sols différents.

***Liste des Tableaux***

**Tab. 1 : Diversité microbienne des principaux groupes dans les sols rhizosphériques et non rhizosphériques.**

**Tab. 2 : Composés libérés par les racines des plantes dans le processus de rhizodéposition.**

**Tab. 3 : Différents sidérophores produits par les rhizobactéries.**

**Tab. 4 : Caractéristiques physico-chimiques des trois sols (S1, S2 et S3).**

**Tab. 5 : Caractérisation physico-chimique des sites de prélèvement.**

**Tab. 6 : Taux d'activité antifongique des bactéries envers les champignons phytopathogènes.**



***Table des matières***

<i>Dédicace</i> .....	I
<i>Remerciements</i> .....	II
<b>Production scientifique</b> .....	III
<i>ملخص</i> .....	IV
<i>Résumé</i> .....	IV
<i>Abstract</i> .....	VI
<i>Liste des principales abréviations</i> .....	VII
<i>Liste des Figures</i> .....	IX
<i>Liste des Tableaux</i> .....	XI
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue bibliographique</b> .....	3
<b>1- Salinité</b> .....	3
<b>2-Effets de la salinité sur la croissance et la physiologie des plantes</b> .....	4
<b>3- Tolérance des plantes à la salinité</b> .....	7
3-1- Les glycophytes .....	8
3-2- Les halophytes.....	9
<b>4- Communautés microbiennes du sol</b> .....	11
4-1- Rhizosphère.....	12
4-2- Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR: <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> ) .....	14
4-2-1-Biodisponibilité des éléments nutritifs .....	16
4-2-2- Modulation des niveaux des phytohormones .....	18
4-2-3- Activités de biocontrôle .....	20
<b>5-Stratégies de tolérance du microbiote associé aux halophytes</b> .....	22
<b>6- Potentiel des PGPR halotolérantes (HT- PGPR) dans la désalinisation</b> .....	23
6-1- Mécanismes et mode d'action des PGPR halotolérantes (HT-PGPR) .....	24
6-1-1-Osmoprotecteurs / Solutés compatibles.....	25

6-1-2- L'ACC désaminase .....	27
6-1-3- Exopolysaccharides.....	29
6-1-4- Composés organiques volatiles (COVs).....	30
6-1-5- Production d'hormones végétales.....	31
6-1-6- Activité antioxydante .....	32
7- Diversité des PGPR halotolérantes (HT-PGPR) .....	33
7-1- <i>Bacillus</i> spp. comme HT-PGPR.....	35
8- Application synergique des PGPR (Co-inoculation ou Consortium).....	37
Matériel et méthodes.....	40
A-Isolement des bactéries des sols salins et caractérisation de leurs activités PGP .....	40
1-Écosystèmes explorés .....	40
□ Sebkha de Bazer Sekhra (Sétif): (36.0505803_ N, 5.6805708_ E).....	40
□ Chott Tinsilt (Oum El Bouaghi): (35.8852354_ N, 6.4414962_ E).....	42
□ Chott El Hodna (Baniou, M'Sila): (35.479223_ N, 4.366587_ E) .....	43
2-Échantillonnage.....	44
3- Mesure du pH et de la conductivité électrique (Ce) des échantillons de sol .....	45
4- Isolement des bactéries .....	46
5- Mesure des activités PGP.....	46
5-1- Solubilisation des phosphates .....	46
5-2- Estimation quantitative de l'acide indole acétique.....	46
5-3- Production de cyanure d'hydrogène (HCN) .....	47
5-4- Production de Sidérophores .....	47
5-5- Production d'enzymes.....	47
5-6- Production de NH <sub>3</sub> .....	47
5-7- Fixation de l'azote .....	48
5-8- Activité antifongique.....	48
B- Sélection de PGPR tolérantes pour la promotion de la croissance des plantes <i>in vivo</i> .....	48
1- Croissance dans différentes conditions de sel, de PEG <sub>8000</sub> , de pH et de température .....	48
2- Identification moléculaire des PGPR tolérant le sel.....	48

2-1- Extraction de l'ADN bactérienne et amplification de l'ARNr 16S.....	49
2-2- Séquençage d'ADNr 16S et analyse phylogénétique .....	49
<b>C- Stimulation de la croissance des plantes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> par les souches bactériennes sélectionnées .....</b>	<b>50</b>
<b>1- Tests <i>in vitro</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>1-1 Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance d'<i>Arabidopsis thaliana</i> en milieu salin. ....</b>	<b>50</b>
1-1-1- Matériel végétal.....	50
1-1-2- Inoculation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> sur boîte de Pétri .....	50
1-1-3- Analyse des paramètres morpho- biochimiques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	51
1-1-3-1- Paramètres morphologiques.....	51
1-1-3-2- Paramètres biochimiques .....	51
<b>1-2 Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination des graines du blé en milieu salin. ....</b>	<b>51</b>
1-2-1- Matériel végétal .....	51
1-2-2- Inoculation des graines de blé dur Waha.....	51
<b>2- Test <i>in vivo</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>2-1- Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpho- biochimiques du blé dur en milieu salin.....</b>	<b>52</b>
<b>2-1-1- Inoculation bactérienne de blé dur Waha.....</b>	<b>52</b>
2-1-2- Dosage de la chlorophylle et des marqueurs biochimiques .....	53
2-1-2-1- Dosage des pigments photosynthétiques .....	53
2-1-2-2 Teneur totale en sucres solubles .....	53
2-1-2-3 Estimation du contenu de Proline .....	54
2-1-2-4 Teneur en protéines .....	54
2-1-2-5 Peroxydation lipidique.....	54
2-1-3- Essais enzymatiques antioxydants .....	54
2-1-3-1- Activité de la gaïacol peroxydase .....	54
2-1-3-2- Activité de l'ascorbate peroxydase .....	55
2-1-3-3 Dosage de l'enzyme catalase .....	55

D- Analyses statistiques.....	55
Résultats .....	56
A-Isolement des bactéries des sols salins et caractérisation de leurs activités PGP .....	56
1- Caractéristiques physico-chimiques des sites de prélèvement.....	56
2- Isolement des bactéries.....	56
3- Activités PGP des isolats .....	57
3-1- Activités PGP selon le site .....	58
4- Production d'AIA .....	61
5- Activité antifongique .....	62
B- Sélection de PGPR tolérantes pour la promotion de la croissance des plantes <i>in vivo</i> .....	64
1- Effets des paramètres de stress sur la croissance des PGPR.....	64
1-1- Effet du NaCl sur la croissance des PGPR.....	64
1-2- Effet du pH sur la croissance des PGPR .....	64
1-3- Effet de la température sur la croissance des PGPR .....	65
1-4- Effet du PEG <sub>8000</sub> sur la croissance des PGPR.....	66
2- Identification moléculaire .....	67
C- Stimulation de la croissance des plantes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> par les souches bactériennes sélectionnées .....	69
1- Tests <i>in vitro</i> .....	69
1-1- Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en milieu salin. ....	69
1-1-1 Paramètres morphologiques.....	69
1-1-2 Teneur en chlorophylle.....	72
1-2- Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination des graines de blé en milieu salin.....	73
1-2-1 Germination des graines de blé en présence de PGPR sous stress salin .....	73
2-Test <i>in vivo</i> .....	76
2-1- Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpho-biochimiques du blé dur en milieu salin. ....	76
2-1-1 Paramètres morphologiques.....	76

*Table des matières*

<b>2-1-2- Effets sur les pigments photosynthétiques et les marqueurs biochimiques.....</b>	<b>79</b>
<b>2-1-2-1- Teneur en chlorophylle.....</b>	<b>79</b>
<b>2-1-2-2 Teneur en sucres totaux solubles.....</b>	<b>81</b>
<b>2-1-2-3 Teneur en protéines.....</b>	<b>81</b>
<b>2-1-2-4 Estimation du contenu en proline.....</b>	<b>81</b>
<b>2-1-2-5 Peroxydation des lipides .....</b>	<b>81</b>
<b>2-1-3- Effets sur les activités des enzymes antioxydantes .....</b>	<b>83</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>85</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>97</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>99</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>125</b>

## **Introduction**

La salinité est un sérieux problème qui limite la croissance et la productivité des plantes, entrave l'économie agricole et entraîne une grave dégradation des terres dans de nombreux pays. Environ 900 millions d'ha, 20% des terres irriguées et 6% de la masse terrestre mondiale sont affectés par la salinité. De plus, selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (ONU), la salinisation des terres cultivables augmentera à l'avenir si des solutions efficaces ne sont pas appliquées (Kumar *et al.*, 2020). Les principaux facteurs d'augmentation de la salinité comprennent l'irrigation des terres cultivées avec de l'eau salée, de mauvaises pratiques culturales et de faibles précipitations. Près de 230 millions d'ha dans le monde sont irrigués. Cette pratique consomme environ 90 % de l'eau totale prélevée pour produire 36 % de l'alimentation mondiale (Rengasamy, 2006). On estime que des pratiques d'irrigation/drainage inappropriées affectent environ 50 % des zones irriguées mondiales, avec une augmentation annuelle pouvant atteindre 500000 ha. Ces faits représentent une grave menace pour la production alimentaire durable et pour nos ressources naturelles (Ondrasek *et al.*, 2009).

Les effets néfastes de la salinité sur la croissance et le développement des plantes comprennent le déficit en eau dans la plante, la toxicité ionique principalement par  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , la réduction de l'absorption de nutriments et/ou le transport vers la tige entraînant un déséquilibre nutritionnel (Cherif-Silini *et al.*, 2019), production et accumulation d'espèces réactives d'oxygène (ROS), génération d'éthylène et plasmolyse, perturbation de l'équilibre hormonal (Luchi *et al.*, 2013), altération du métabolisme des protéines (Dantas *et al.*, 2005) et inhibition de l'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme des acides nucléiques (Arbona *et al.*, 2005). Ces déséquilibres physiologiques limitent la germination des graines, la croissance des semis, la floraison et la nouaison en conséquence (Pegler *et al.*, 2018). Les stress biotiques, y compris les pathogènes, menacent également sérieusement la productivité des plantes et la qualité des fruits. Le traitement chimique, bien qu'il soit efficace pour limiter les infections nuisibles aux végétaux, est de plus en plus critiqué.

De nouvelles technologies agricoles sont nécessaires pour améliorer la production alimentaire dans les sols salins et arides. De nombreux scientifiques ont tenté de développer des cultures tolérantes au sel par l'amélioration des plantes, mais ces efforts ont connu un succès limité en raison de la complexité génétique et physiologique du caractère de tolérance au sel (Dwivedi *et al.*, 2010). Des mesures prometteuses pour améliorer la protection des plantes dans les sols salins sont l'utilisation d'inoculants microbiens, qui peuvent atténuer le stress salin, favoriser

la croissance des plantes (Lugtenberg *et al.*, 2013) et lutter contre les maladies (Pliego *et al.*, 2011). Les formulations à base de microorganismes, aussi appelées bioformulations, sont plus fortes que les produits chimiques synthétiques, car la formulation d'un seul microorganisme peut comporter des interactions directes avec des agents pathogènes, et de nombreux mécanismes participent à la suppression des maladies et à la promotion de la croissance des plantes (Rodrigo *et al.*, 2011).

L'intelligence de ces bioagents peut être déduite du fait qu'une souche particulière à proximité d'une plante est capable de contrôler la maladie sans produire d'effets durables sur le reste de la communauté microbienne ou d'autres organismes de l'écosystème (Singh *et al.*, 2017). L'ingénierie de la rhizosphère par l'utilisation de bactéries associées aux racines qui interagissent avec les plantes en atténuant le stress ouvre une nouvelle technologie de pointe pour combattre la salinité. De nombreuses études ont démontré que l'utilisation de microorganismes bénéfiques peut accroître la résistance d'une plante aux stress environnementaux négatifs, comme la sécheresse, la salinité, la carence en nutriments et la contamination par les métaux lourds. Ces inoculants contribuent au développement d'une agriculture durable dans des conditions de stress (Berg *et al.*, 2013). L'utilisation de bactéries qui favorisent la croissance des plantes comme biofertilisants est une méthode sûre et efficace pour accroître le rendement des cultures (Vejan *et al.*, 2016) et de nombreux genres bactériens tels que *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Serratia*, etc. ont été utilisés (Kumar *et al.*, 2017).

La présente étude vise à isoler des bactéries de la rhizosphère et de l'endosphère des halophytes (*Suaeda mollis* et *Salsola tetrandra*) et du sol non rhizosphérique environnant de trois Sebkhra (Bazer Sekhra, Tinssilt et Baniou). Les isolats bactériens sont évalués pour différents caractères favorisant la croissance des plantes et la tolérance aux différents stress abiotiques ; la température, le pH, la sécheresse et la salinité. Les bactéries sélectionnées sont ensuite utilisées comme bioinoculants et sont testées pour leur capacité à atténuer le stress salin chez *Arabidopsis thaliana* et le blé dur (*Triticum durum* cv. Waha).

## **Revue bibliographique**

### **1- Salinité**

La salinité est un énorme problème mondial. Les sols salins couvrent actuellement une surface importante du globe terrestre. On estime à plus de 900 millions d'ha la superficie des terres affectées par le sel dans le monde (**Fig. 1**), ce qui représente environ 6 % de la surface terrestre mondiale totale, soit environ 20 % de la superficie cultivée (Flowers, 2004). Sur les 230 millions d'ha de terres irriguées actuellement, 45 millions d'ha sont affectés par le sel (19,5%) et sur les 1500 millions d'ha de terres arides, 32 millions sont affectés par le sel à des degrés divers (2,1%) (Anonyme, 2008). On s'attend à ce que la salinisation accrue des terres cultivables entraîne une perte de 30 % au cours des 25 prochaines années et jusqu'à 50 % au milieu du XXI<sup>e</sup> siècle (Wang *et al.*, 2003).

La salinisation est un processus d'augmentation de la concentration totale en sels dissous (sodium, potassium, magnésium, calcium, chlorure, sulfate, carbonate) dans l'eau et le sol. Le sol est salin quand il contient un excès de sels solubles. En général, la salinité des sols est classée en trois types différents : faible salinité (Ce 2–4 dS/m), salinité modérée (Ce 4–8 dS/m) et salinité élevée (Ce > 8 dS/m) (Rogers *et al.*, 2005). Selon le type de source à partir de laquelle le sol est devenu salinisé, la salinité peut être catégorisée comme salinisation primaire et secondaire.

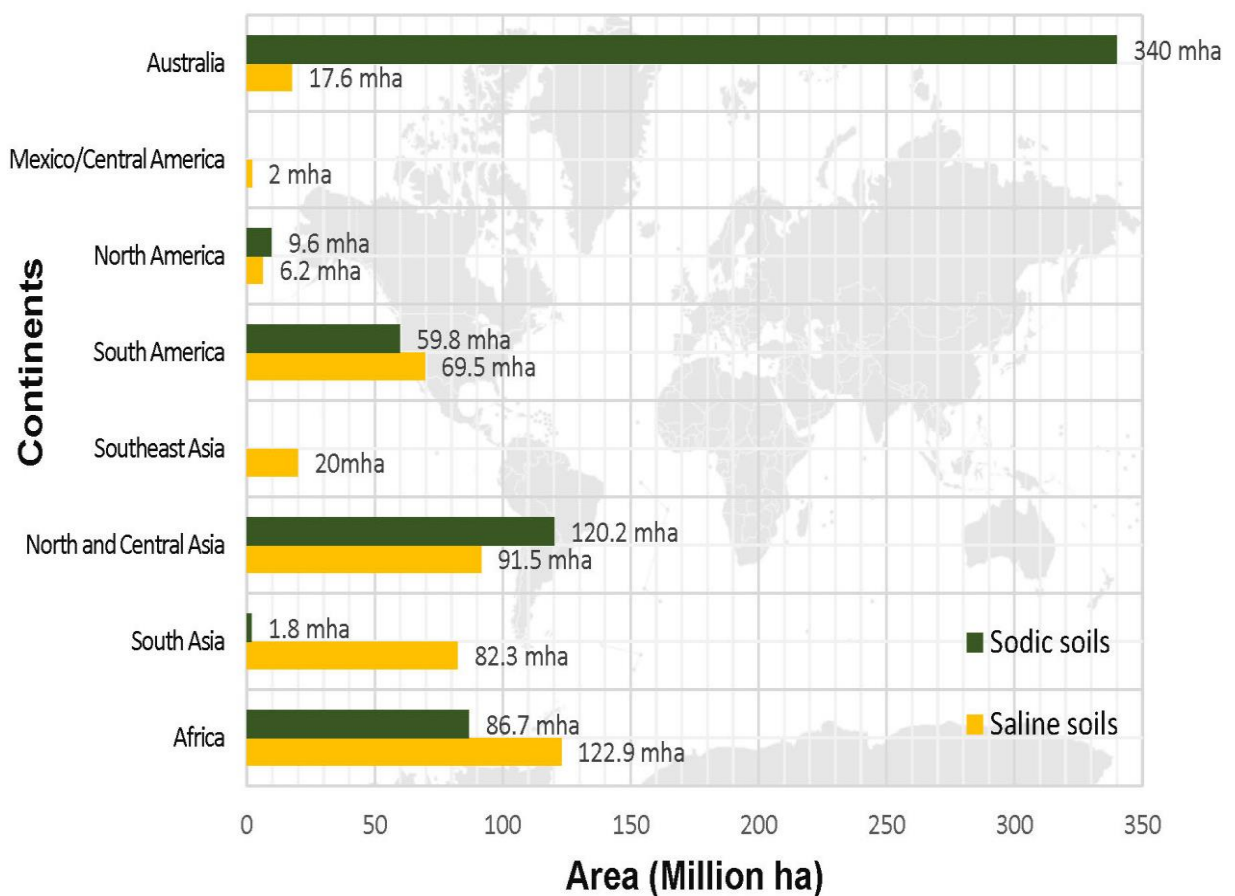
La salinité primaire résulte de l'accumulation de sels sur de longues périodes, dans le sol ou les eaux souterraines. Elle est causée par deux processus naturels. Le premier est l'altération des matériaux d'origine contenant des sels solubles. Les processus d'altération dégradent les roches et libèrent des sels solubles de divers types, principalement des chlorures de sodium, de calcium et de magnésium et, dans une moindre mesure, des sulfates et des carbonates. Le chlorure de sodium est le sel le plus soluble. Le deuxième processus est le dépôt de sel océanique transporté par le vent et la pluie (Rangasamy, 2002).

La salinité secondaire ou anthropique résulte d'activités humaines qui modifient l'équilibre hydrologique du sol entre les précipitations et l'eau utilisée par les cultures. Les causes les plus courantes sont (i) le défrichage et le remplacement de la végétation vivace par des cultures annuelles, et (ii) les systèmes d'irrigation utilisant de l'eau contenant des sels ou ayant un drainage insuffisant (Munns, 2009).

En pays désertique ou subdésertique, les Chotts sont des terres salées ou parfois des pâturages qui entourent une dépression fermée ou lac éphémère (Sebkha). Les Sebkhas, sont une dépression à fond plat, généralement inondable, où les sols salés limitent la végétation.



En Algérie, comme ailleurs dans le monde, les sols salés occupent de vastes superficies (3.2 millions d'hectares de la superficie totale). Près de 10-15 % de terres irriguées, sont concernées par ces problèmes. Les terres salinisées seront difficilement récupérables. La plupart de ces sols sont situés, en région aride et semi-aride. Les sols salés d'Algérie sont caractérisés, en général, par une conductivité électrique supérieure à 7dS/m et un pourcentage de sodium échangeable qui varie de 5 à 60 % de la CEC (capacité d'échange en cations). La salinité est observée dans les plaines et les vallées, aux abords des Chotts et de Sebkhass et dans le grand Sud.



**Fig. 1: Distribution mondiale des sols salins et sodiques (Anonyme, 2015).**

## **2-Effets de la salinité sur la croissance et la physiologie des plantes**

Due au stress abiotique, près de 82 % du rendement potentiel des cultures sont perdus chaque année, et la surface de terres cultivables productives disponibles continue de diminuer dans le monde entier (Hirt et Shinozaki, 2004). La salinité inhibe la croissance et la production des plantes et finit par entraver l'économie agricole des pays en développement. Les cultures irriguées entraînent une extension secondaire des terres salées, en particulier dans des régions

arides et semi-arides. En effet, le sel inhibe la croissance d'un grand nombre de plantes différentes (Chedly *et al.*, 2008). La salinité du sol affecte les plantes de trois façons. Le principal effet de l'augmentation de la concentration de sel dans le sol est l'incapacité des plantes à puiser l'eau du sol, même si le sol semble assez humide. En effet, la plante souffre d'une forme de sécheresse qui peut entraîner un retard de croissance et une diminution du rendement. Deuxièmement, certains sels, comme le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{Cl}^-$ , pénètrent dans le système végétal par l'eau et affectent les processus physiologiques de la plante, ce qui entraîne souvent une croissance réduite, la brûlure des feuilles et même la mort de la plante. Troisièmement, des quantités élevées d'ions tels que  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  affectent la disponibilité d'autres nutriments essentiels pour les plantes comme K, Mg, N ou P qui sont extrêmement importants pour la croissance des plantes (Tester et Davenport, 2003).

Les effets les plus courants de la salinité sur les plantes sont la perte de la turgescence, la réduction de la croissance entraînant des feuilles plus petites, une stature plus courte, une sénescence précoce, une diminution de la photosynthèse, des changements respiratoires, une perte d'intégrité cellulaire, une nécrose tissulaire (Achraf, 2004), un stress osmotique, une toxicité par  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , une production d'éthylène, une plasmolyse et un déséquilibre nutritionnel (Sairam et Tyagi, 2004). Ces changements physiologiques ont pour conséquence d'inhiber la germination des graines, la croissance et la vigueur des semis, la floraison et la nouaison (Bartels et Sunkar, 2005). La germination des semences et la croissance précoce des semis sont les stades de croissance les plus sensibles au sel car les racines des semis sont en contact direct avec le sol et sont touchées par de nombreux changements du sol (Rahman *et al.*, 2000).

Divers dommages oxydatifs et ioniques chez les plantes sont le résultat de la salinisation. L'abondance des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  peut entraîner une réduction de l'accessibilité et de l'absorption de certains éléments tels que N, P, K et Mg par la plante (Heidari et Jamshid, 2010). La salinité induit l'inhibition de la synthèse phytohormonale et la maturation des parois cellulaires (Xiong et Zhu, 2002). L'accumulation de concentrations élevées de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{Cl}^-$  dans les feuilles entraîne généralement la formation de lésions semblables à des brûlures qui endommagent les cellules dans les feuilles (Vijayan *et al.*, 2008). Les symptômes de carence en calcium sont fréquents lorsque le rapport Na/Cl est élevé dans l'eau du sol (Munns, 2002). Une fois absorbé, le  $\text{Na}^+$  peut être transloqué dans les feuilles dans le flux de la transpiration en mouvement rapide du xylème (Mayak *et al.*, 2004). Bien que le  $\text{Na}^+$  puisse retourner aux racines par le phloème, ce flux est minime, de sorte que les feuilles accumulent généralement des concentrations plus élevées de  $\text{Na}^+$  que les racines (Tester et Davenport,

2003). De plus, la plupart des cultures transfèrent peu de  $\text{Na}^+$  aux structures de reproduction ou de stockage telles que les graines, car ces organes sont alimentés principalement par le phloème. D'autre part, les tissus végétatifs sont fournis principalement par le flux de xylème et ont donc tendance à être plus élevés dans les niveaux de  $\text{Na}^+$ . La toxicité métabolique de  $\text{Na}^+$  est principalement attribuée à la compétition de  $\text{Na}^+$  avec  $\text{K}^+$  pour les sites de liaison essentiels au fonctionnement cellulaire (Blaha *et al.*, 2000). Les effets de la salinité donnent lieu à de nombreux autres effets tel le stress oxydatif qui est caractérisé par l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), potentiellement, dangereuses pour la membrane, les protéines, les enzymes et les acides nucléiques (Porcel *et al.*, 2012; Paul et Lad 2014). Une fois que la capacité des cellules est épuisée, les sels s'accumulent dans l'espace intercellulaire conduisant à la déshydratation et la mort cellulaire (White et Broadley, 2001) (**Fig. 2**).

Le stress induit par la salinité chez les plantes est en partie le résultat de la production d'éthylène (Shibli *et al.*, 2007). Par exemple, la production d'éthylène est stimulée de deux à dix fois chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum*) et d'*Arabidopsis* exposés au stress de la salinité (Hall et Smith, 1995). À cet égard, Kukreja *et al.* (2005) ont non seulement observé une augmentation de l'évolution de l'éthylène induite par la salinité chez le pois chiche (*Cicer arietinum*), mais aussi une augmentation de la teneur en 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), le précurseur immédiat de l'éthylène, et dans l'activité de l'enzyme ACC oxydase. De plus, la relation entre le stress de salinité et la production d'éthylène concordait avec l'observation selon laquelle l'aminooxyvinylglycine (AVG), un inhibiteur chimique de la biosynthèse de l'éthylène, atténue les réactions des plantes induites par la salinité (Etesami et Beattie, 2017).

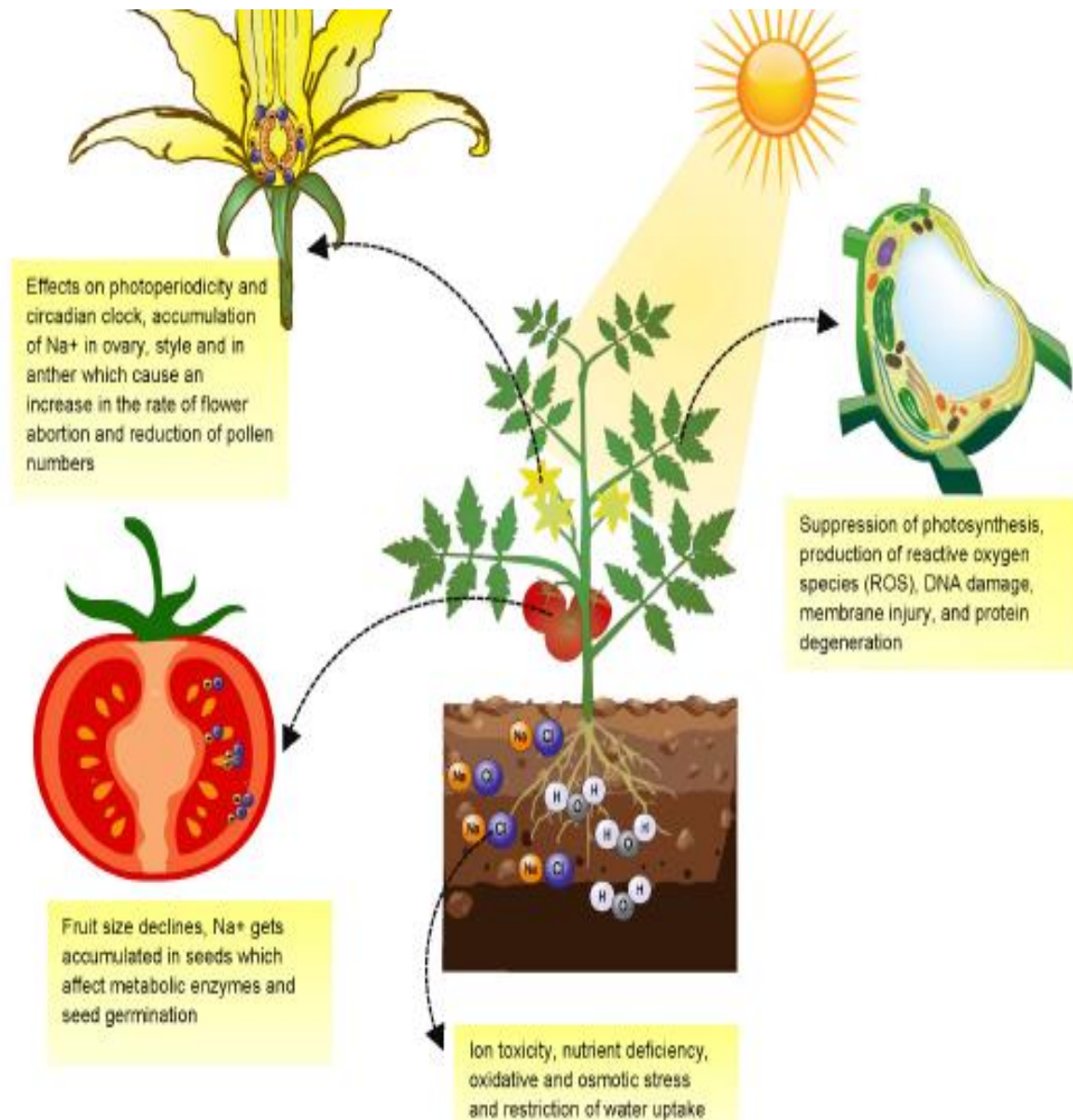


Fig. 2: Effet de la salinité sur le développement des plantes (Egamberdieva *et al.*, 2019).

### 3- Tolérance des plantes à la salinité

Les plantes répondent à la contrainte saline par de nombreux changements, révélant le caractère multifactoriel des mécanismes de tolérance et d'adaptation aux stress abiotiques. En conditions stressantes, les plantes peuvent réagir en mettant en œuvre des mécanismes, entre autres, physiologiques (Kylin et Quatrano, 1975; Parida et Das, 2005) et biochimiques (Brugnoli et Lauteri, 1991) impliquant une activité enzymatique (Chaffei *et al.*, 2004). Ainsi, par la synthèse de composés organiques jouant un rôle d'osmoprotecteurs (Rathinasabapathi *et al.*, 2000) ou de régulateurs osmotiques (EL-Shintinawy et Hassanein, 2001), le cytoplasme accumule des composés de petite masse moléculaire nommés solutés compatibles parce qu'ils

n'interfèrent pas avec les réactions normales biochimiques, en revanche ils remplacent l'eau dans les réactions chimiques. Ces solutés compatibles comprennent principalement la proline, la glycine bêtaïne, les sucres et les polyols (Parida et Das, 2005). Certaines espèces aussi bien les halophytes que les glycophytes utilisent le mécanisme d'exclusion des sels en excès (Alem et Amri, 2005) qui consiste à exclure le sodium du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Dans ce cas, les plantes limitent l'entrée des éléments salins et les rejettent dans le compartiment apoplasmique (Blumwald *et al.*, 2004; Munns, 2005). La compartimentation vacuolaire est un autre mécanisme qui consiste à évacuer du cytoplasme les ions  $\text{Na}^+$  en excès vers la vacuole afin d'éviter leur effet toxique et inhibiteur à l'encontre des processus enzymatiques (Flowers *et al.*, 1977). Elle est assurée par l'action d'un antiport vacuolaire sodium/proton ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) dont l'énergie est fournie par les pompes à protons ATPase  $\text{H}^+/\text{K}^+$  (Yamaguchi et Blumwald, 2006). Les plantes se défendent également par l'induction des activités de certaines enzymes antioxydantes comme la catalase (CAT), la glutathion S-transférase (GST) et la superoxyde dismutase (SOD) qui éliminent les ROS (Ksouri *et al.*, 2010).

Les plantes ont d'autres mécanismes adaptatifs pour réduire les dommages oxydatifs résultant du stress salin. En réponse à ce stress, la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est stimulée et entraîne la production de divers composés phénoliques qui ont un fort potentiel antioxydant. Dans ce cas, les composés polyphénoliques tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les proanthocyanidines et les anthocyanes jouent un rôle important dans la lutte contre les radicaux libres. L'activité anti-oxydante est principalement due à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et extincteurs à oxygène. De plus le stress abiotique, impose à la cellule végétale une série de changements adaptatifs pour maintenir la croissance, y compris la régulation à la hausse ou à la baisse de divers gènes. Dans ces conditions, les protéines régulatrices telles que les protéines à doigts de zinc  $\text{C}_2\text{H}_2$  ciblent directement les gènes liés au stress en aval pour activer ou inhiber leur expression. Ces protéines ciblent directement les gènes antioxydants associés au piégeage des ROS et peuvent conférer une tolérance au stress en augmentant la teneur en acide abscisique (ABA), en proline, en sucres solubles ou en chlorophylle, et en réduisant le taux de perte d'eau (Parida et Das, 2005).

### **3-1- Les glycophytes**

Les glycophytes englobent la majorité des cultures végétales. Elles sont des plantes apparemment dépourvues de bases génétiques pour une tolérance au sel (Glenn et Brown,

1999). Exposées à des conditions salines, ces plantes subissent des désordres nutritionnels (Grattan et Grieve, 1992). Cette sensibilité est due à leur incapacité d'éliminer efficacement les ions  $\text{Na}^+$  du cytoplasme (Parks *et al.*, 2002).

### **3-2- Les halophytes**

Les plantes qui terminent leur cycle de vie complet dans un habitat à forte teneur en sel (200 mM de NaCl) sont appelées halophytes ou plantes salées, où la survie des glycophytes est impossible. Les halophytes sont des plantes naturelles des milieux salés (Le Houérou, 1993), elles survivent en présence de fortes concentrations d'électrolytes dans leurs environnements (Flowers *et al.*, 1986; Köhl, 1997). Du point de vue écophysologique, différentes catégories d'halophytes existent (Le Houérou, 1993). Ils peuvent être classés comme halophytes obligatoires ou facultatifs sur la base de l'exigence de sel pour la croissance. L'halophyte obligatoire nécessite une supplémentation constante en sel pour une croissance optimale tandis que les facultatifs peuvent se développer dans des conditions salines ou non. Sur cette base, 350 espèces sont enregistrées comme des halophytes qui sont répartis en 20 ordres et 256 familles. Bien que les halophytes ne représentent que 1 % de la flore mondiale, ils sont de riches habitats, en réponse aux stress abiotiques et en répartition parmi les taxons des plantes à fleurs (Flowers *et al.*, 2010).

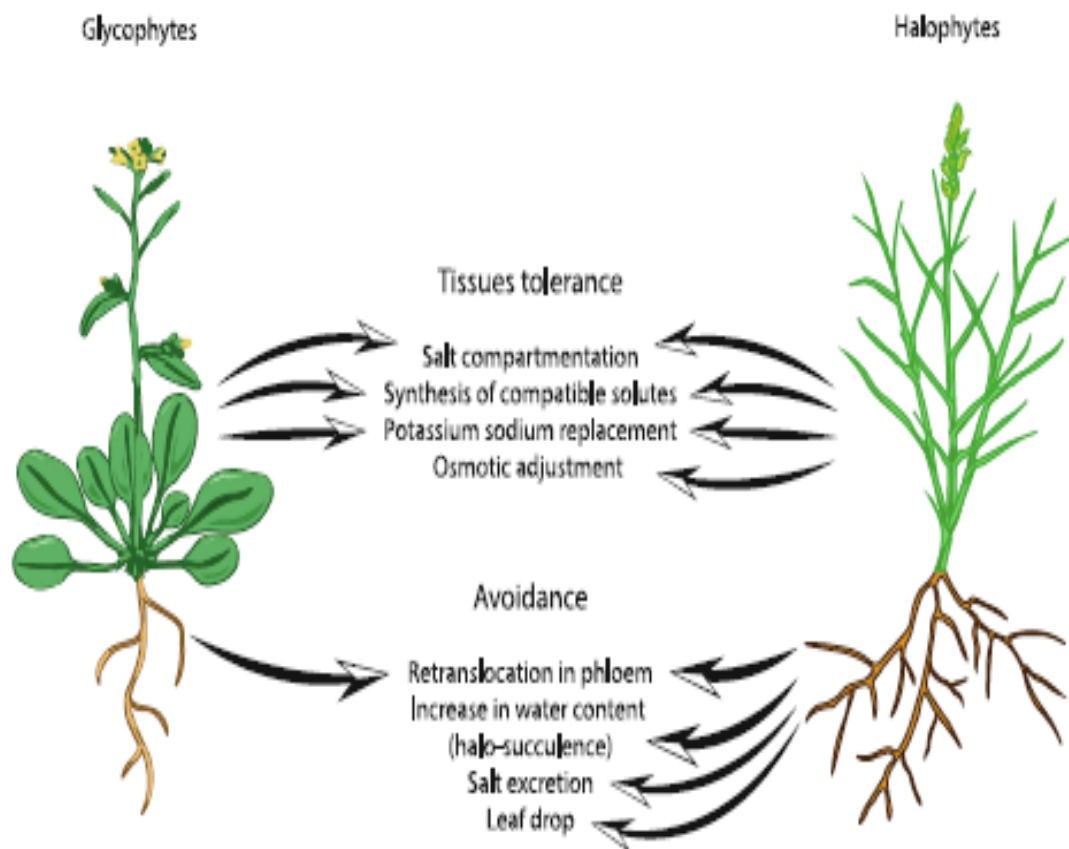
Les halophytes ont développé un large éventail de caractéristiques (morphologiques, physiologiques et biochimiques) qui leur permettent de survivre en assurant leur approvisionnement en eau tout en préservant leur métabolisme (Sharma *et al.*, 2016) (**Fig. 3**).

Dans les halophytes, l'endoderme et l'exoderme forment une barrière hydrophobe étanche qui régule et maintient l'écoulement des solutés dans le cytoplasme à travers la membrane plasmique. De plus, ils ont une racine primaire épaissie qui agit comme un puits pour la séquestration des ions  $\text{Na}^+$  afin d'éviter leur accumulation dans les racines latérales et les jeunes feuilles, protégeant ainsi les plantes du stress salin (Galvan-Ampuda et Testerink, 2011).

Les principaux mécanismes qui se produisent chez les plantes halophytes sont l'homéostasie ionique et la compartimentation, le transport et l'absorption des ions, la biosynthèse des osmoprotecteurs, les solutés compatibles, la synthèse de divers composés antioxydants et l'activation des enzymes antioxydantes, la modulation des hormones végétales comme l'AIA, l'acide jasmonique (AJ), la gibbérelline, l'éthylène et l'acide abscisique (ABA), les enzymes inductrices liées à leur biosynthèse (Gupta *et al.*, 2015) et la production de polyamines (Takahashi et Kakehi, 2009). En termes de régulation génique, les plantes halophytes

répondent au stress salin en régulant un grand nombre de gènes et de facteurs de transcription, et ceux-ci peuvent être regroupés dans les catégories fonctionnelles suivantes: gènes associés à la sénescence (par exemple, *sag*); des gènes de transport d'ions ou d'homéostasie (par exemple, des gènes *SOS*, *AtNHX1*); des chaperons moléculaires (par exemple, des gènes *HSP*); et les facteurs de transcription liés à la déshydratation (par exemple, DREB) (Gupta *et al.*, 2015).

Cependant, il est assez complexe de décrire un scénario universel de réponses racinaires à un stimulus externe, car il varie d'une espèce à l'autre ainsi qu'entre les différents stades de développement des racines. En conclusion, la capacité prononcée des racines à s'adapter à diverses conditions de stress externes est le résultat de leur plasticité racinaire importante (Riedelsberger et Blatt, 2017; Suralta *et al.*, 2018).

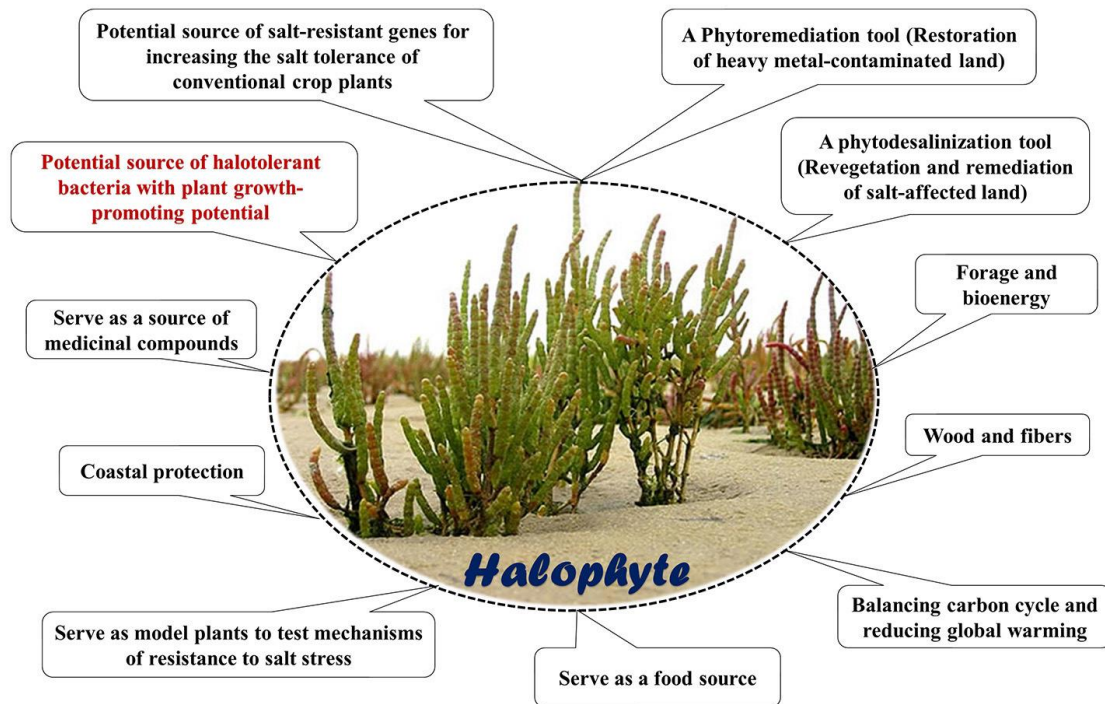


**Fig. 3: Représentation schématique des mécanismes comparatifs utilisés par les halophytes et les glycophytes en milieu salin (Sáenz-Mata *et al.*, 2016).**

L'utilisation d'halophytes et d'autres espèces tolérantes au sel permettrait la production de cultures dans ces zones. Les halophytes ont de nombreuses utilisations potentielles (**Fig. 4**): les gènes intéressants des halophytes peuvent être identifiés et utilisés comme candidats pour



améliorer la tolérance des glycophytes aux sels (Rigo *et al.*, 2016). La culture des halophytes est pratiquée pour désaliniser les sols dégradés et récupérer des produits à valeur ajoutée. De plus les halophytes peuvent être utilisés directement comme culture (Nikalje et Srivastava, 2017) et comme un réservoir pour isoler les PGPR halotolérantes (Himabindu *et al.*, 2016).



**Fig. 4: Utilisations potentielles des halophytes (Etesami et Beattie, 2018).**

#### **4- Communautés microbiennes du sol**

Les microorganismes du sol jouent un rôle clé dans les écosystèmes: ils stimulent les principaux processus biogéochimiques qui sont essentiels au fonctionnement de l'écosystème, notamment la minéralisation du carbone (C) en CO<sub>2</sub>, le cycle de l'azote (N), contribuent au maintien de la productivité des plantes et de la richesse des espèces sur terre. Les microorganismes du sol régulent la productivité des plantes par divers mécanismes. Les effets positifs des microorganismes sur la productivité des plantes sont plus fréquents dans les écosystèmes pauvres en nutriments où ils améliorent l'approvisionnement en nutriments limitant la croissance des plantes, tels que le N et les P. Dans de telles situations, jusqu'à 90 % des P et de N sont fournis par des champignons mycorhiziens et des bactéries fixatrices de N, soulignant leur importance dans la régulation de la productivité des plantes (Balsler *et al.*, 2002; Heijden *et al.*, 2008). Les communautés microbiennes jouent un rôle central dans le contrôle de la façon dont les écosystèmes terrestres réagissent aux changements climatiques



mondiaux. Les plantes réagissent généralement à un taux élevé de CO<sub>2</sub> par l'augmentation de la production de racines et l'exsudation (Korner, 2000). La majorité des microorganismes présents dans les sols sont considérés comme bénéfiques pour les plantes supérieures par une association directe avec les racines après dégradation de la matière organique présente dans le sol entraînant une augmentation de la disponibilité des éléments nutritifs (Ilyas et Bano, 2012).

#### **4-1- Rhizosphère**

En 1904, le terme « rhizosphère » a été donné par l'agronome et physiologiste végétal allemand Lorenz Hiltner. La rhizosphère est une zone autour de la surface des racines où l'activité biologique d'un microorganisme est la plus élevée en raison de la sécrétion d'une grande quantité de métabolites à partir de poils vivants ou de systèmes racinaires fibreux (Hiltner, 1904). La rhizosphère est une zone écologique vitale unique du sol qui est hautement enrichie en nutriments obtenus à partir de racines végétales par rhizodéposition à l'aide de rhizobactéries (Prashar *et al.*, 2013). La rhizosphère est classée en trois zones (Pinton *et al.*, 2001) :

1. L'endorhizosphère est l'espace intercellulaire entre le cortex et l'endoderme, dans lequel les microorganismes et les cations peuvent occuper « l'espace libre » entre les cellules (espace apoplasique) qui ne forment pas de structures symbiotiques (Dotaniya *et al.*, 2016).
2. Le rhizoplan est la zone médiane directement adjacente à la racine, y compris l'épiderme de la racine et le mucilage. Il se compose de l'épiderme, du cortex et de la couche polysaccharidique mucilagineuse.
3. L'ectorhizosphère est la zone la plus éloignée, qui s'étend du rhizoplan jusqu'au sol en vrac. Le volume du sol qui ne fait pas partie de la rhizosphère, c'est-à-dire qui n'est pas influencé par la racine, est appelé « sol en vrac » (Gobat *et al.*, 2004).

La longueur du sol de la rhizosphère peut varier de moins de 1 mm à plusieurs millimètres selon la présence d'exsudats radiculaires (Bringhurst *et al.*, 2001). Selon une estimation, le nombre de microorganismes dans la rhizosphère est de 19 à 32 fois supérieur à celui du sol en vrac environnant, c'est-à-dire exempt de racines (Chowdhury *et al.*, 2009). Environ 50 à 100 mg d'exsudats sont libérés par gramme de racine, ce qui est suffisant pour soutenir  $2 \times 10^{10}$  cellules bactériennes (**Tab. 1**). Bien qu'un grand nombre de populations microbiennes soient présentes dans la rhizosphère, seulement 7 à 15 % de la surface totale des racines sont généralement occupées par des cellules microbiennes (Pinton *et al.*, 2001).

**Tab. 1: Diversité microbienne des principaux groupes dans les sols rhizosphériques et non rhizosphériques (Giri *et al.*, 2005).**

Organism	Rhizosphere soil (microbes/g dry soil)	Nonrhizosphere soil (microbes/g dry soil)	R:S ratio
Bacteria	$1200 \times 10^6$	$53 \times 10^6$	23
Actinomycetes	$46 \times 10^6$	$7 \times 10^6$	7
Fungi	$12 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	12
Algae	$5 \times 10^3$	$27 \times 10^3$	0.2

Les changements chimiques qui se produisent à l'interface sol-racines ont une influence marquée sur les interactions microbiennes des plantes ainsi que sur la disponibilité et l'acquisition de nutriments. Le sol de la rhizosphère est un habitat favorable à la croissance microbienne qui exerce un impact potentiel sur la santé des plantes et la fertilité du sol (Podile et Kishore, 2006). Un certain nombre d'interactions importantes et intensives se produisent dans la rhizosphère entre les microorganismes, la plante et la microfaune du sol (Antoun et Prevost, 2005). Ces interactions sont fondées sur des échanges complexes entre les racines et les microorganismes, et la nature bénéfique, nuisible et neutre de ces relations est régulée par une signalisation moléculaire complexe (Dardanelli *et al.*, 2010). Les interactions bénéfiques peuvent influencer de manière significative la croissance et le développement des plantes et donc exercer une influence positive sur la production végétale. Les exsudats radiculaires contiennent une quantité suffisante de carbone et d'énergie qui est facilement disponible pour la croissance et le développement des cellules microbiennes (Somers *et al.*, 2004). Ces exsudats comprennent un certain nombre de composés organiques (**Tab. 2**), d'auxines, de vitamines, de sucres et de flavonoïdes (Dardanelli *et al.*, 2009). Les microorganismes utilisant ces composés comme aliments sont présents en forte concentration autour des racines (Glick *et al.*, 2007).

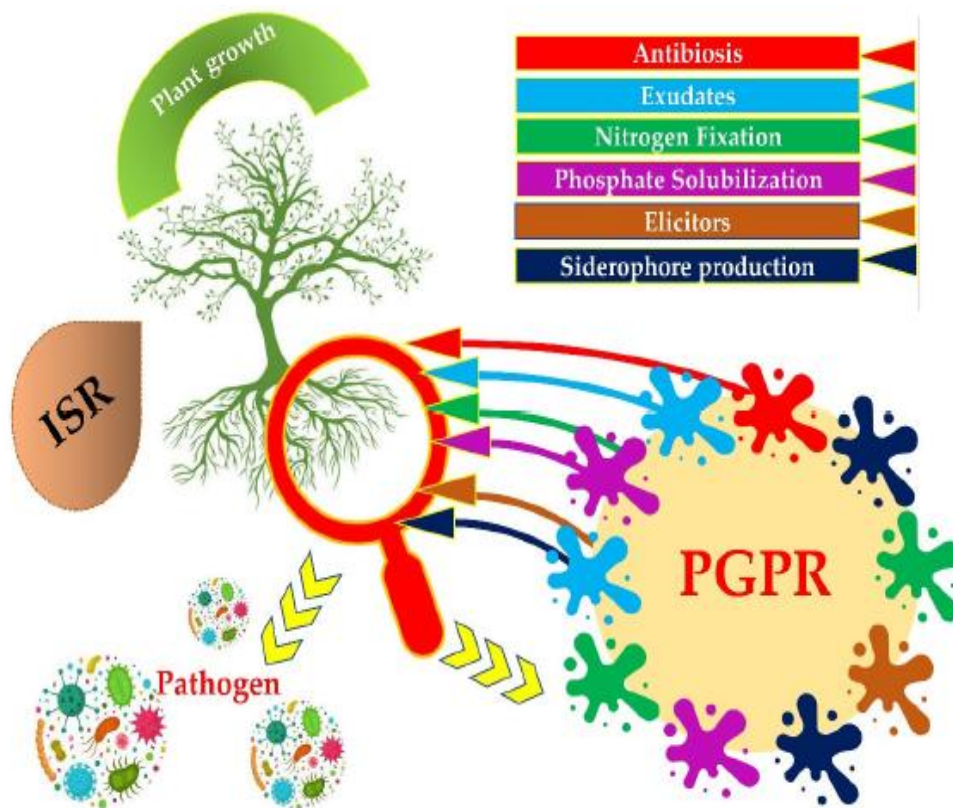
**Tab. 2: Composés libérés par les racines des plantes dans le processus de rhizodéposition (Giri *et al.*, 2005).**

Compound	Exudate components
Sugars	Glucose, fructose, sucrose, maltose, galactose, rhamnose, ribose, xylose, arabinose, raffinose, oligosaccharide
Amino compounds	Asparagine, $\alpha$ -alanine, glutamine, aspartic acid, leucine/isoleucine, serine, $\gamma$ -aminobutyric acid, glycine, cystine/cysteine, methionine, phenylalanine, tyrosine, threonine, lysine, proline, tryptophane, $\beta$ -alanine, arginine, homoserine, cystathionine
Organic acids	Tartaric, oxalic, citric, malic, propanoic, butyric, succinic, fumaric, glycolic, valeric, malonic
Fatty acids and sterols	Palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic acids, cholesterol, campesterol, stigmasterol, sitosterol
Growth factors	Biotin, thiamine, niacin, pantothenate, choline, inositol, pyridoxine, $\rho$ -aminobenzoic acid, <i>N</i> -methyl nicotinic acid
Nucleotides, flavonines and enzymes	Flavonine, adenine, guanine, uridine/cytidine, phosphatase, invertase, amylase, protease, polygalacturonase
Miscellaneous compounds	Auxins, scopoletin, fluorescent substances, hydrocyanic acid, glycosides, saponin (glucosides), organic phosphorus compounds, nematode-cyst or egg-hatching factors, nematode attractants, fungal mycelium growth stimulants and inhibitors, zoospore attractants

#### **4-2- Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*)**

Le microbiome végétal et les connaissances sur la dynamique et l'évolution des communautés microbiennes associées aux plantes sont actuellement un domaine en plein essor. Les études sur la composition et la diversité du microbiote de plusieurs plantes d'intérêt économique ont montré que l'association des bactéries avec les racines exerce des influences importantes sur la santé de la plante, la productivité et la qualité du sol (Vandenkoornhuysse *et al.*, 2015). La colonisation des racines par les bactéries est un phénomène connu depuis longtemps, mais actuellement, son importance pour la croissance et le développement des plantes est devenu plus attrayant. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les

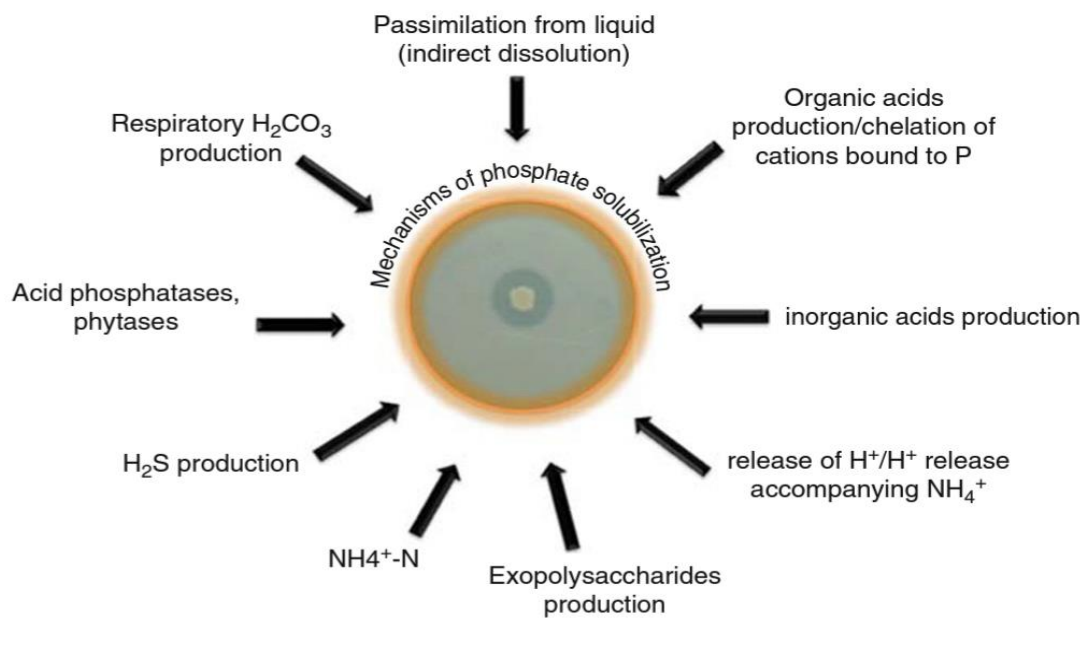
rhizobactéries. Dans cette zone, les plantes et les microorganismes interagissent, où les communications chimiques et l'échange de composés et de nutriments se produisent (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). En général, les bactéries hautement compétitives et promotrices sont celles qui arrivent à survivre et à coloniser avec succès les racines riches en éléments nutritifs. 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. 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). Ces bactéries qui, lorsqu'elles sont appliquées sur des semences, des surfaces végétales ou du sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur des plantes et favorisent leur croissance. Ces PGPR jouent un rôle particulier dans l'augmentation de l'absorption des nutriments, l'amélioration de la formation des racines et des tiges, l'amélioration de la germination des graines et la prévention et la résistance des plantes aux maladies (Timmusk *et al.*, 2017). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes par divers mécanismes (**Fig.5**) :



**Fig. 5: Différentes stratégies de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Cherif-Silini *et al.*, 2021).**

#### 4-2-1-Biodisponibilité des éléments nutritifs

Les PGPR utilisent différents mécanismes pour rendre certains éléments nutritifs disponibles aux plantes. Les bactéries fixatrices d'azote généralement classés en bactéries symbiotiques des légumineuses (par exemple, *Rhizobium*) et non légumineuses (par exemple, *Frankia*), et en bactéries non symbiotiques (vie libre, associative et endophytes) transforment le N<sub>2</sub> atmosphérique en ammoniac assimilable par les plantes en utilisant un système enzymatique complexe connu sous le nom de nitrogénase (Pii *et al.*, 2015). Les PGPR utilisent également des mécanismes pour solubiliser les complexes de phosphates (P) (Goswami *et al.*, 2016). Le mécanisme principal utilisé par les bactéries pour la solubilisation du phosphate inorganique est la production des composés minéraux tels que les ions hydroxyle, les protons, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et des acides organiques (y compris l'acide gluconique, l'acide α-cétobutyrique, l'acide 2-cétogluconique), qui réduisent le pH du sol pour libérer le P (**Fig. 6**). Pour minéraliser le P organique, les PGPR produisant des phosphatases (ex: la phytase, la phosphonoacétate hydrolase, la D-α-glycérophosphatase et la C-P lyase) stimulent l'hydrolyse des esters phosphoriques et convertissent le P organique en forme disponible pour les plantes (Ahmed *et al.*, 2020). Parmi les PGPR, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Enterobacter*, *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *Enterobacter* et *Pantoea* sont les solubilisants les plus puissants (Alori *et al.*, 2017).



**Fig. 6: Mécanismes de solubilisation des phosphates par les PGPR (Zaidi *et al.*, 2009).**

Les PGPR sont également capables de solubiliser des sources de potassium insolubles par la production et la sécrétion d'acides organiques (oxalate, succinate et citrate) dans la rhizosphère. Par conséquent ces bactéries améliorent la fertilité du sol et la biodisponibilité du potassium aux plantes (Figueiredo *et al.*, 2016). Les PGPR solubilisant le potassium tel qu'*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* sp. et *Pseudomonas* ont été rapportés (Liu *et al.*, 2012).

Un autre composant important, catalysant de nombreuses réactions métaboliques chez les plantes et nécessaire pour la production des phytohormones est le zinc (Zn). Par conséquent, la carence en Zn affecte gravement divers processus vitaux chez les plantes (Ahmed *et al.*, 2020). Les PGPR solubilisent le Zn en produisant différents acides organiques tels que l'acide 2-cétogluconique, acide 5 cétogluconique pour la mobilisation du Zn. D'autres mécanismes éventuellement impliqués dans la solubilisation du zinc comprennent la production des sidérophores et des protons (Kamran *et al.*, 2017).

Les PGPR peuvent sécréter des composés de faible poids moléculaire (500-1000 Da) chélatant les métaux avec une haute affinité appelés sidérophores. Le sidérophore chélate le fer et d'autres métaux à partir des phases minérales par la formation de complexe soluble sidérophore-métal qui se lie ensuite à des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule bactérienne pour être absorbé par un mécanisme de transport membranaire dépendant de l'énergie et pour le rendre disponible pour les plantes (Glick, 2012). Les bactéries productrices de sidérophores appartiennent habituellement au genre *Pseudomonas*, le plus commun étant *Pseudomonas fluorescens*, qui libère la pyochéline et la pyoverdine. Les bactéries de la rhizosphère libèrent ces composés pour accroître leur potentiel concurrentiel, puisque ces substances ont une activité antibiotique et améliorent la nutrition en fer de la plante (Glick, 2007). Les rhizobactéries productrices de sidérophores améliorent la santé des plantes à différents niveaux: elles améliorent la nutrition en fer, inhibent la croissance d'autres microorganismes avec la libération de leur molécule antibiotique et entravent la croissance des agents pathogènes en limitant le fer disponible pour le pathogène, généralement des champignons qui sont incapables d'absorber le complexe fer-sidérophore (Arora *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2001). Des organismes aussi divers que *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *E. coli* et de nombreux champignons produisent un large éventail de composés chélateurs de Fe (Zahir *et al.*, 2004). La production de sidérophores par les PGPR halotolérants isolés des halophytes a été rapportée ; cependant, la capacité de ces souches à augmenter la disponibilité du fer et d'autres micro-éléments, tels que Zn, Mn et Cu, pour les plantes n'est pas encore connue (Etesami and Beattie, 2018). Il existe actuellement plus de

500 sidérophores connus (**Tab. 3**); les structures chimiques de 270 de ces composés ont été déterminées. Les sidérophores sont généralement classés par les ligands utilisés pour chélater le Fe ferrique. Les principaux groupes de sidérophores comprennent les catécholates (phénolates), les hydroxamates et les carboxylates (p. ex., dérivés de l'acide citrique) (Cornelis, 2010).

**Tab. 3: Différents sidérophores produits par les rhizobactéries (Sahara et Nehra, 2011).**

Ligand group	Siderophore	Organism
Hydroxamates	Ferrichrome	<i>Ustilagospaerogena</i>
	Desferrioxamine B (deferoxamine)	<i>Streptomyces pilosus</i> and <i>S. coelicolor</i>
	Desferrioxamine E	<i>S. coelicolor</i>
	Fusarinine C	<i>F. roseum</i>
	Ornibactin	<i>Burkholderia cepacia</i>
	Ferribactin	<i>Ps. fluorescens</i>
	Gonobactin and nocobactin	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Catecholates (phenolates)	Enterobactin	<i>E. coli</i>
	Bacillibactin	<i>B. subtilis</i> and <i>B. anthracis</i>
	Vibriobactin	<i>Vibrio cholera</i>
	Parabactin	<i>Paracoccus denitrificans</i>
	Agrobactin	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Carboxylate (complexones)	Rhizobactin	<i>R. meliloti</i> strain DM4
	Staphyloferrin A	<i>Staphylococcus hyicus</i>
Mixed ligands	Azotobactin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Pseudobactin	<i>Pseudomonas putida</i>
	Pyoverdine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Yersiniabactin	<i>Yersinia pestis</i>

#### **4-2-2- Modulation des niveaux des phytohormones**

Les phytohormones et les régulateurs de croissance des plantes telles que les gibbérellines, les cytokinines, et les auxines sont des substances organiques qui, à de faibles concentrations (<1 mM), favorisent, la croissance et le développement des plantes (Etesami *et al.*, 2009). La production de ces phytohormones peut être induite par certaines PGPR. L'auxine est une phytohormone qui régule directement ou indirectement la plupart des processus végétaux. Elle déclenche un certain nombre de fonctions cellulaires allant de la différenciation des tissus vasculaires, l'initiation des racines latérales et adventives, la stimulation de la division cellulaire, l'élongation des tiges et des racines et l'orientation de la croissance des tiges en



réponse à la lumière (Etesami *et al.*, 2009). L'acide indole-3-acétique (AIA) est une phytohormone commune appartenant à la classe des auxines et quantitativement la plus produite par les PGPR (Fig. 7). Elle joue un rôle important dans la croissance et le développement des plantes car elle induit l'élongation et la division des cellules (Vurukonda *et al.*, 2018).

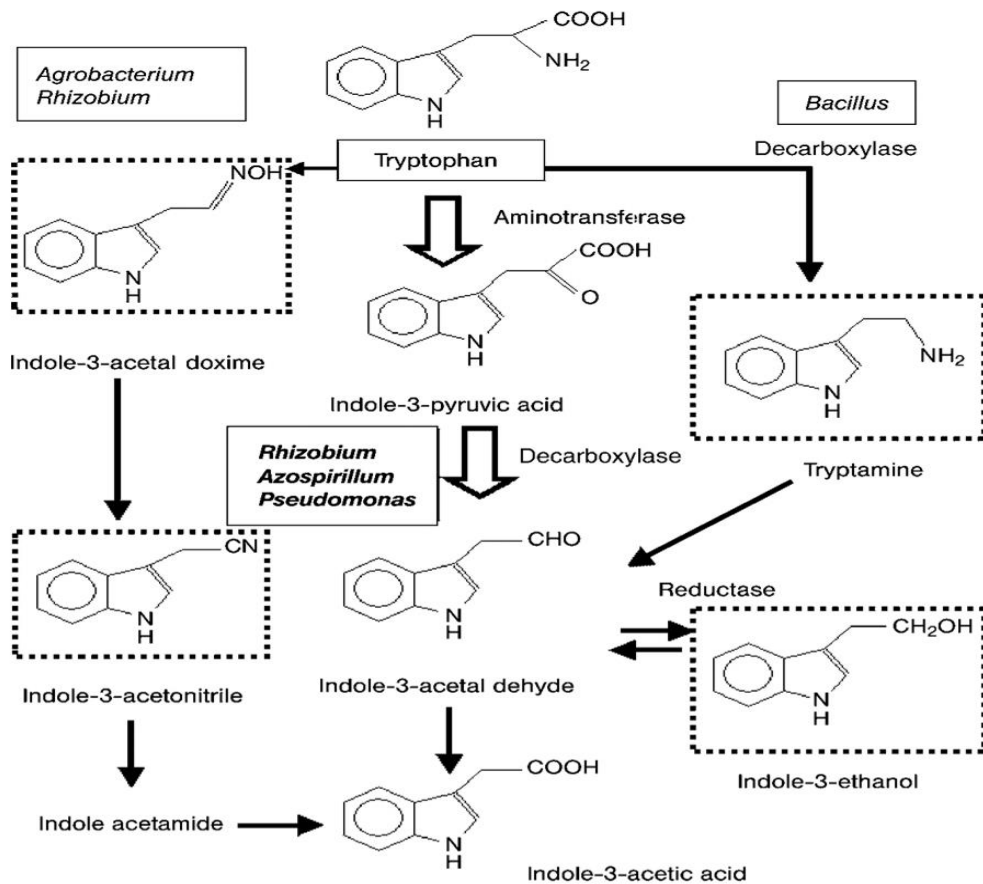


Fig. 7: Voies biosynthétiques de l'auxine dépendante du tryptophane chez les plantes et les PGPR (Solano *et al.*, 2008).

La cytokinine est une hormone dérivée de l'adénine impliquée dans la régulation de divers processus de développement des plantes tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la croissance des racines, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence. De nombreuses PGPR y compris *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. sont productrices de cette hormone (Miri *et al.*, 2016). Les gibbérellines sont un groupe d'hormones qui remplissent diverses fonctions dans l'organisme végétal. Les gibbérellines sont les principaux régulateurs de la formation des organes reproducteurs et de la maturation



des fruits et des graines viables. Elles sont synthétisées par des bactéries rhizosphériques, y compris les genres *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Flavobacterium* et *Xanthomonas* (Kong et Glick, 2017).

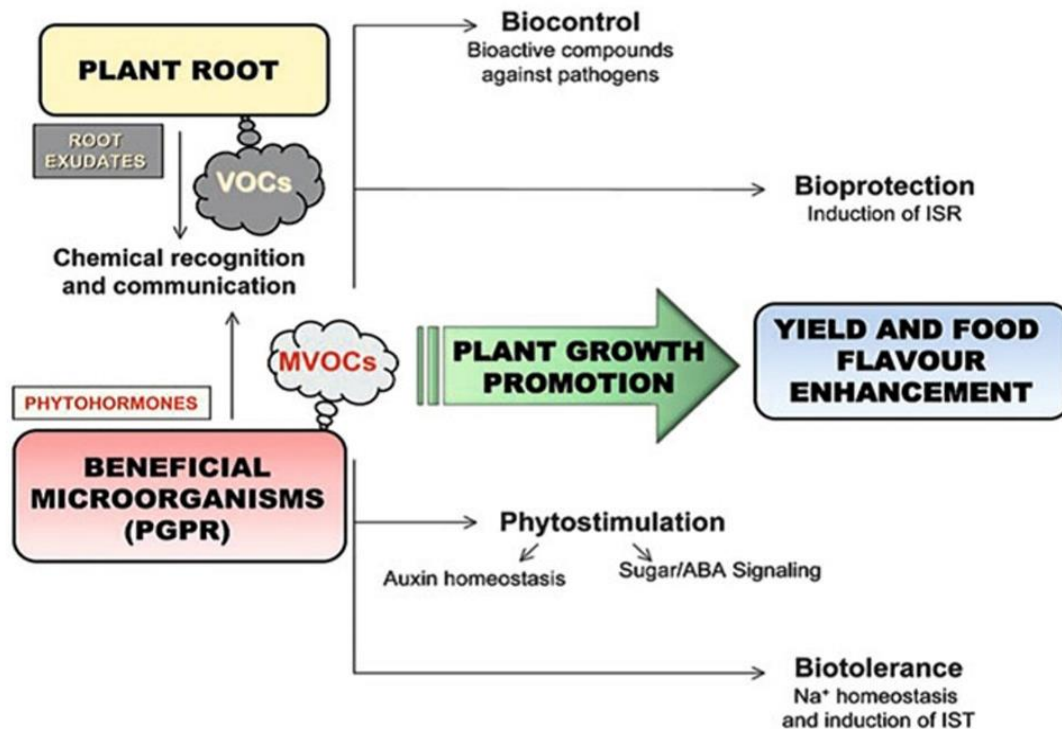
#### **4-2-3- Activités de biocontrôle**

L'utilisation d'antagonistes microbiens spécifiques stimule davantage la croissance des plantes dans les écosystèmes dégradés. Les PGPR utilisées comme des agents de lutte biologique contre les phytopathogènes synthétisent une variété de composés antibiotiques et antifongiques y compris les enzymes lytiques, les sidérophores, HCN etc... (Srivastava et Singh, 2017).

La production d'un ou de plusieurs antibiotiques est le mécanisme le plus important des PGPR, ce qui facilite l'antagonisme contre de nombreux phytopathogènes. Il existe plusieurs classes d'antibiotiques produites par les PGPR et liées au contrôle des maladies racinaires : 2,4 Diacetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid, phenazine-1-carboxamide, pyoluteorin, pyrrolnitrin, etc.,. Les *Bacillus* sont parmi les microorganismes les plus prédominants dans le sol et produisent environ 167 types d'antibiotiques différents (Pathak *et al.*, 2017). Les PGPR produisent également des métabolites contribuant à l'antibiose et au contrôle des agents phytopathogènes, utilisés comme systèmes de défense impliquant la production d'enzymes hydrolytiques telles que les chitinases, les glucanases, les protéases, les lipases et les cellulases. Ces enzymes digèrent ou déforment les composants de la paroi cellulaire fongiques des phytopathogènes. En plus des enzymes, les sidérophores produits par les PGPR sont considérés comme des agents de lutte biologique puisqu'ils empêchent certains phytopathogènes d'acquérir une quantité suffisante de fer, limitant ainsi leur capacité à proliférer (Gupta *et al.*, 2017; Numan *et al.*, 2018).

Le cyanure d'hydrogène est un composé antimicrobien volatile produit par des nombreuses espèces de rhizobactéries impliqués à large spectre dans le contrôle biologique des maladies des racines puisqu'ils empêchent la prolifération et le développement des micro-organismes pathogènes (Ali *et al.*, 2020). De nombreux genres bactériens tels que *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* et *Aeromonas* se sont révélés être des producteurs de HCN. L'HCN peut être produit au début de la phase stationnaire de croissance par plusieurs bactéries par voie de décarboxylation oxydative en utilisant la glycine, le glutamate ou la méthionine comme précurseurs (Agbodjato *et al.*, 2015). Outre l'HCN, la production d'ammoniac par les PGPR fournit de l'azote à la plante hôte et favorise l'allongement des racines et des tiges ainsi que leur biomasse (Marques *et al.*, 2010).

Les composés organiques volatiles (COV) sont des composés métaboliques gazeux de faible poids moléculaire. Ils jouent un rôle utile dans le contrôle des phytopathogènes en induisant une résistance systémique et en stimulant la croissance des plantes (**Fig. 8**) (Tahir *et al.*, 2017).



**Fig. 8: Mécanismes impliqués dans la modulation des composés organiques volatiles de la croissance des plantes (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).**

Des espèces bactériennes particulières de genres divers, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, et *Bacillus* spp produisent des COV. Les PGPR fournissent une stratégie alternative pour protéger les plantes contre les maladies via la résistance systémique induite (ISR) (Goswami *et al.*, 2016). Cette stratégie est généralement définie comme l'activation des mécanismes de défense latents chez les plantes avant une attaque de pathogène. Elle n'est pas spécifique contre un pathogène particulier, mais elle aide la plante à contrôler de nombreuses maladies (Gouda *et al.*, 2018). Cette « immunité » s'initie à la suite de la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par les PGPR. Ainsi, la transmission du signal émis à la suite de 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 (Ali *et al.*, 2020).

Ces effets bénéfiques des PGPR sont conditionnés par leur capacité de colonisation et de survie qui semblent être bien établies dans les conditions normales, mais qu'en est-il de l'application de ces PGPR dans les conditions extrêmes. La sélection de PGPR ayant la capacité de tolérance, la promotion de la croissance et la protection des plantes nécessite une autre stratégie de sélection. Dans ce cas les performances de ces bactéries seront définies d'abord par rapport à leur capacité d'adaptation aux stress surtout salin. Par conséquent, la nouvelle génération de PGPR doit être recherchée dans la rhizosphère de plantes adaptées aux conditions extrêmes salines et arides. L'exploitation du microbiote des sols salins et arides permettra la désalinisation l'augmentation des cultures sur les surfaces marginales répondant ainsi à un objectif ultime.

### **5-Stratégies de tolérance du microbiote associé aux halophytes**

Les microorganismes sont dits halotolérants lorsqu'ils sont capables de se développer sans sels, tout en tolérant des concentrations variables en sels. Au contraire, ils sont halophiles lorsqu'ils ne peuvent se développer qu'en présence de sels. Une propriété de base des halophiles est que le cytoplasme de ces micro-organismes soit iso-osmotique avec le milieu environnant. Les cellules pour garder une turgescence continue doivent maintenir leur pression osmotique intracellulaire plus haute que celle de leur environnement (Oren, 2008). La capacité d'un organisme à s'adapter aux changements de la pression osmotique externe (osmoadaptation) et le développement de mécanismes visant à atteindre cet objectif (osmoregulation) sont essentiels à sa survie (Csonka, 1989). Les bactéries halophiles se sont adaptées au cours de l'évolution (adaptation phénotypique et génotypique) à se développer de manière optimale dans les environnements hypersalins. Pour survivre et se multiplier ces bactéries adoptent certaines stratégies. La reconnaissance du déséquilibre osmotique par un osmosensor, qui peut être des macromolécules subissant des transitions conformationnelles en réponse à l'évolution des activités extracellulaire de l'eau ou résultant des changements dans la structure cellulaire. Ce mécanisme de régulation est composé de deux systèmes. Il s'agit d'un capteur protéique, qui détecte le signal et une protéine régulatrice qui se lie à l'ADN et contrôle l'expression des gènes. Le système de régulation des composants qui répondent aux changements osmotiques est le EnvZ/OmpR trouvé chez les Eubacteria (RoeBler et Muller, 2001). Le EnvZ est une histidine kinase transmembranaire qui surveille les modifications d'osmolarité des deux côtés de la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire du OmpR

(Bartlett et Roberts, 2000). L'accumulation des osmolytes ou des solutés compatibles en réponse à la différence de pression imposée, est réalisée pour atteindre un équilibre osmotique. Ainsi, les bactéries utilisant la stratégie des solutés organique peuvent tolérer des fluctuations de la salinité ambiante beaucoup mieux que les bactéries utilisant la stratégie du sel dans le cytoplasme. Toutefois, l'inconvénient de la synthèse des solutés organiques consomme plus d'énergie que l'accumulation de  $K^+$  (Roberts, 2000).

Les changements de l'activité de l'eau peuvent également avoir un effet profond sur la stabilisation des macromolécules. Les cellules répondent à des changements de pression osmotique avec des mécanismes visant à favoriser le pliage correct des protéines. Les bactéries halophiles modérées augmentent la quantité de charges négatives lors d'une augmentation de la concentration de sel dans leur milieu de croissance. Les bactéries halophiles ont des protéines intracellulaires ayant une proportion plus élevée d'acides aminés acides, et une proportion plus faible de résidus non polaires que les protéines habituelles. Au contraire, pour les bactéries halotolérantes les solutés organiques agissent comme osmoprotecteurs, ces solutés accumulés peuvent avoir des effets différents sur les protéines, leurs structures et leurs activités. Il n'est pas nécessaire de modifier un vaste groupe de protéines lorsque la concentration en sel de l'environnement change. Par conséquent, les bactéries halotolérantes peuvent tolérer les fluctuations de la salinité ambiante beaucoup mieux que les bactéries halophiles.

En outre, tous les microorganismes halophiles contiennent des mécanismes de transport puissants, généralement basés sur des antiports  $Na^+ / H^+$ , pour expulser les ions sodium de l'intérieur de la cellule (Oren, 2002). La majorité des fonctions responsables de la survie des bactéries halophiles et halotolérantes dans leur environnement sont codées par des mégaplasmides (Argandona *et al.*, 2005).

## **6- Potentiel des PGPR halotolérantes (HT- PGPR) dans la désalinisation**

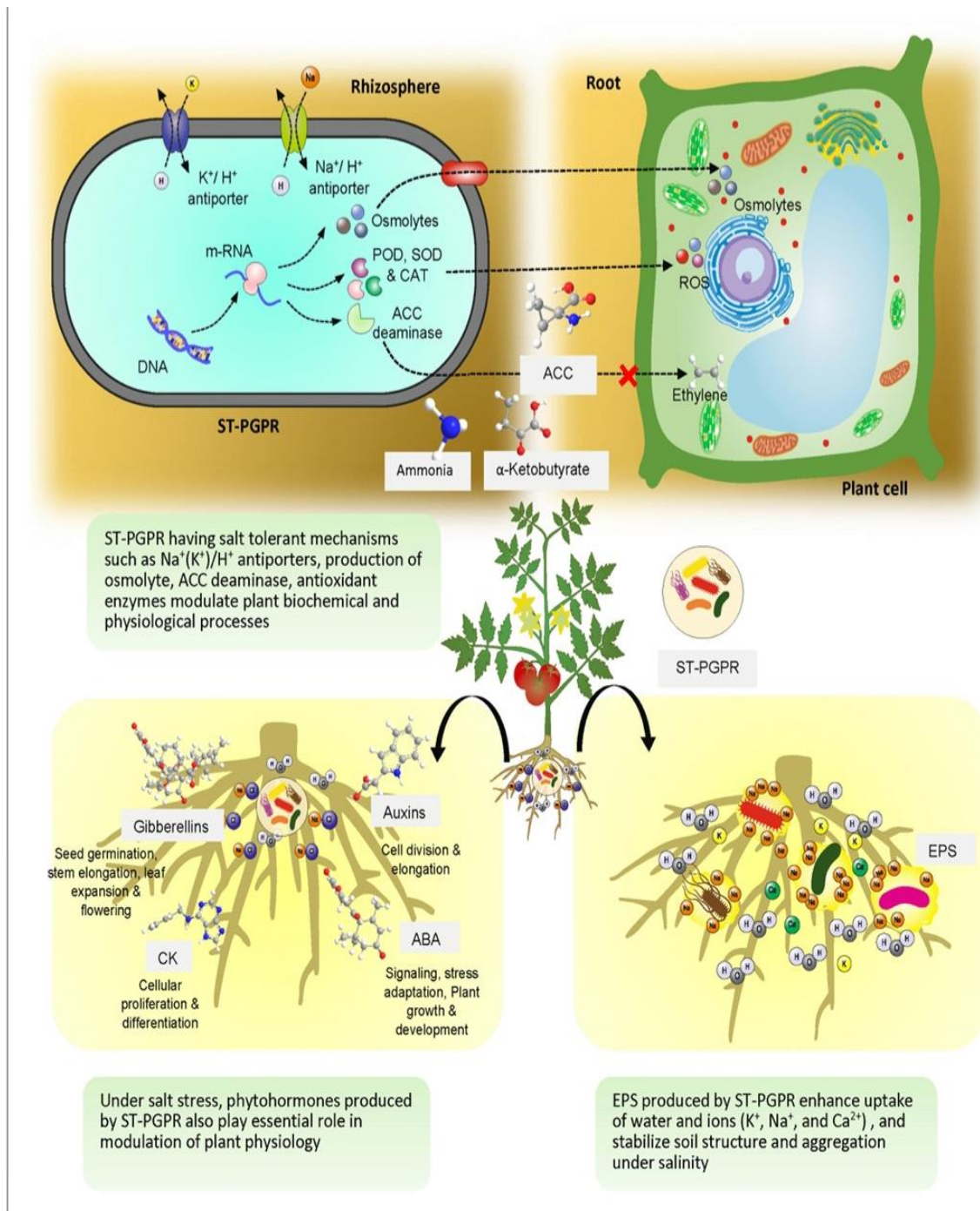
Le potentiel d'utilisation des espèces tolérantes au sel associées aux halophytes permettrait l'amélioration de la production agricole dans les régions arides et semi-arides du monde. La microflore associée aux plantes (phyllosphère, rhizosphère et endophyte) est reconnue pour l'amélioration de la capacité des plantes à résister aux stress environnementaux. Récemment, de nombreuses études ont documenté que la tolérance des plantes aux stress est attribuée partiellement ou totalement à leur microbiote associé (Benslama *et al.*, 2019). En raison de leur rôle actif dans la régulation d'une grande variété de réponses physiologiques végétales, les bactéries associées à des plantes hôtes provenant d'environnements extrêmes semblent être les alternatives biologiques les plus prometteuses dans le développement et l'amélioration de

la production végétale (Molina-Montenegro *et al.*, 2016; Orhan, 2016; Qin *et al.*, 2016). Cela pourrait être la conséquence, de la capacité d'adaptation naturelle de ces bactéries dans les environnements extrêmes (Saikkonen *et al.*, 1998) et également la pression de sélection de ces types d'écosystèmes qui imposent des réponses biologiques spécifiques lors de l'interactions plantes-microorganismes (Redman *et al.*, 2011). Les halophytes sont un réservoir pour isoler les PGPR halotolérantes (Etesami et Beattie, 2018).

Ces PGPR provenant de communautés bactériennes de la rhizosphère, de la phyllosphère, ou endophytes (résidant dans l'apoplasme ou le symplasme de la plante) sont définies comme celles capables de coloniser les tissus d'une grande variété d'espèces végétales (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006). Ces bactéries en dépit de leur capacité à promouvoir la croissance des plantes hôte par leurs mécanismes bénéfiques habituels, font face aux stress en adoptant d'autres moyens de réponse au stress osmotique.

#### **6-1- Mécanismes et mode d'action des PGPR halotolérantes (HT-PGPR)**

Les PGPR halotolérantes utilisent un ensemble de mécanismes qui participent directement ou indirectement à l'amélioration du stress salin chez les plantes cultivées (**Fig. 9**). Des études ont confirmé que les HT-PGPR produisent divers types de phytohormones, synthétisent l'ACC désaminase, produisent des composés secondaires tels que les exopolysaccharides et les osmolytes (proline, tréhalose et glycine bêtaïnes), régulent les systèmes de défense des plantes et activent les enzymes antioxydantes des plantes sous stress salin (Bharti *et al.*, 2016; Kasotia *et al.*, 2016).



**Fig. 9: Atténuation du stress salin chez les plantes par les HT-PGPR (Egamberdieva *et al.*, 2019).**

### 6-1-1-Osmoprotecteurs / Solutés compatibles

Pour s'acclimater dans des conditions salines, les HT-PGPR produisent des métabolites de faible poids moléculaire, connus sous le nom de composés osmoprotecteurs ou de solutés compatibles qui aident à minimiser le stress osmotique, à maintenir une pression de turgescence élevée et à égaliser l'efflux d'ions à travers la membrane plasmique chez les

plantes (Dodd et Perez-Alfocea, 2012). Ces composés contrôlent également l'ouverture des stomates, la conductance hydraulique et le taux de transpiration pour pallier le manque d'eau chez les plantes (Saghafi *et al.*, 2019). Les acides aminés et leurs dérivés (p. ex., proline, glutamate, glycine bêtaïne et éctoïne), les polyols (p. ex. glycérol, inositol, sorbitol et mannitol) et les sucres non réducteurs (p. ex., tréhalose) sont les principaux solutés compatibles produits par les HT-PGPR (Sleator et Hill, 2002).

Il est bien documenté que les HT-PGPR améliorent la production de la proline dans les plantes sous le stress salin (Abbas *et al.*, 2019). En réponse à différentes contraintes environnementales telles que la sécheresse, la salinité élevée et les métaux lourds, la proline peut agir comme antioxydant des espèces réactives à l'oxygène (ROS), réguler l'acidité cytosolique, ou stabiliser la structure des protéines (Krasensky et Jonak, 2012). La HT-PGPR *Bacillus fortis* SSB21, est capable d'augmenter les niveaux de proline avec une réduction de la peroxydation lipidique et des ROS (Yasin *et al.*, 2018). L'inoculation de *Paenibacillus yonginensis* DCY84T tolérante au sel sur les graines de ginseng a entraîné l'accumulation de sucres solubles totaux, de proline et de polyamines sous 300 mM de NaCl. Ce traitement a également amélioré la disponibilité des nutriments, la teneur en chlorophylle, la biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) et l'induction de gènes sensibles au stress chez les plantes sous stress salin (Sukweenadhi *et al.*, 2018).

La glycine bêtaïne (GB) est une autre classe de solutés compatibles connue pour diminuer les contraintes induites par la salinité chez les plantes en s'accumulant dans le cytosol, ce qui réduit le stress osmotique maintenant, ainsi, l'intégrité globale de la cellule végétale (Wutipraditkul *et al.*, 2015). La GB est un composé azoté qui existe à l'état zwitterionique et est connu pour s'accumuler naturellement lors des conditions de stress environnemental (Giri, 2011). Les plantes inoculées de *Acacia gerrardii* par *B. subtilis* BERA71 présentaient une teneur plus élevée en GB et autres osmolytes sous contraintes salines (Hashem *et al.*, 2016).

L'éctoïne (1,4,5,6-tetrahydro-2-méthyl-4-pyrimidinecarboxylic acide) est un autre osmolyte qui s'accumule dans le cytoplasme végétal sous stress salin (Masouleh, 2019). Chez les HT-PGPR, la quantité de formation d'éctoïne est directement proportionnelle à l'augmentation de la pression osmotique dans la cellule due à différents stress, y compris la salinité (Grammann *et al.*, 2002). L'éctoïne extraite d'une bactérie halophile *Chromohalobacter salexigens* KT989776 permet d'augmenter la germination des graines du lin, réduit l'accumulation de sodium et l'activité de la peroxydase et de la phénoloxidase des plantes (Elsakhawy *et al.*, 2019).

Le tréhalose est un osmolyte clé mais les plantes sont incapables de le synthétiser. Les HT-PGPR jouent un rôle important en produisant cet osmoprotecteur et en aidant les plantes sous stress salin. *Phaseolus vulagris*, lorsqu'il est inoculé avec *Rhizobium etli* capable de synthétiser le tréhalose, a montré une adaptation au stress osmotique, un nombre accru de nodules ainsi qu'une biomasse végétale plus élevée (Suárez *et al.*, 2008).

### **6-1-2- L'ACC désaminase**

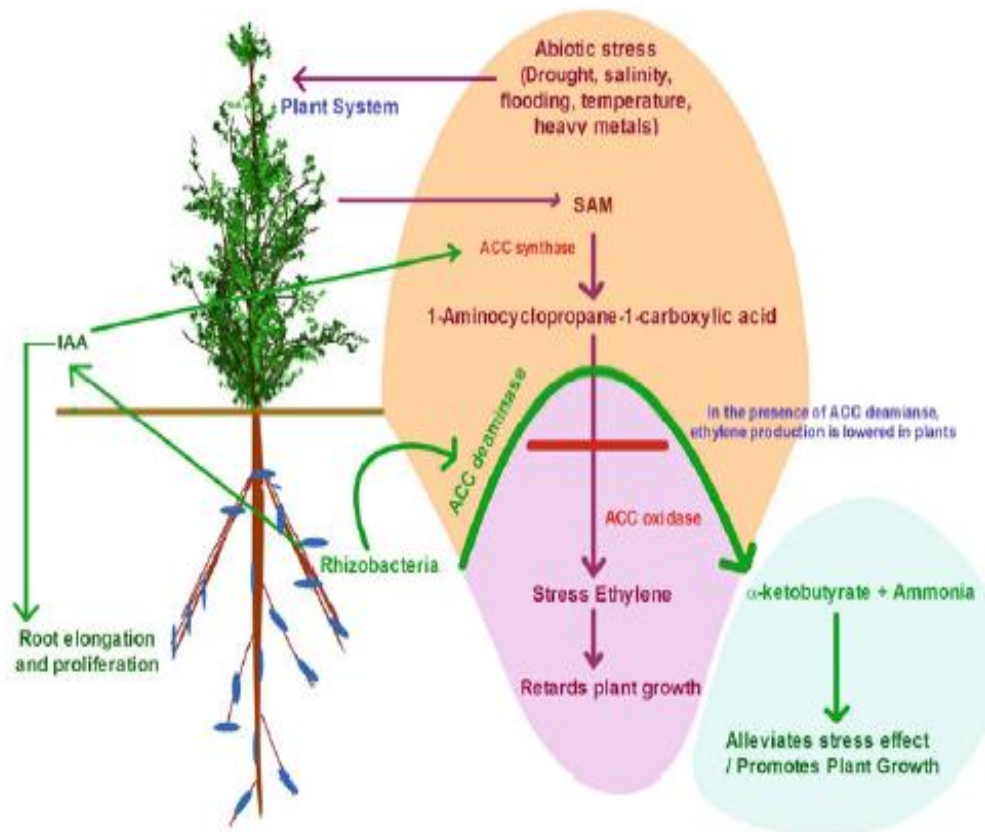
En réponse aux contraintes de la salinité, les PGPR produisant une ACC désaminase stimulent la croissance des plantes par la régulation de la production massive d'éthylène. La diminution de la teneur élevée en éthylène peut être réalisée par la dégradation de son précurseur direct, l'acide 1-Aminocyclopropane-1- carboxylique (ACC), à l'aide de l'ACC-désaminase en  $\alpha$ -cétobutyrate et en ammonium qui sont consommés par les bactéries comme sources d'azote et de carbone (Glick, 2014). Cette enzyme peut soulager les contraintes causées par plusieurs stress. La bactérie réduit la production d'éthylène dans les plantes après exposition à des concentrations croissantes de sel. Ce qui a contribué en partie à l'activation des processus impliqués dans la réduction de l'effet néfaste du sel par l'augmentation de l'absorption du phosphore et de potassium sans que la teneur en sodium de la plante n'a pas diminué. La bactérie a également augmenté l'efficacité de l'utilisation de l'eau en milieu salin. Il a été découvert que la HT-PGPR productrice d'ACC désaminase a des effets sur d'autres propriétés biochimiques des cellules végétales, notamment la stabilité de la membrane, la formation de solutés biocompatibles et la production de pigments photosynthétiques (Tiwari *et al.*, 2018). Les plantes inoculées avec des PGPR produisant de l'ACC désaminase présentent souvent une croissance racinaire prolongée, attribuée à des réductions de l'éthylène, et une résistance accrue au stress de salinité (Etesami et Beattie, 2017). Ces PGPR peuvent également influencer l'homéostasie de l'éthylène des plantes en modifiant l'expression des gènes codant pour les enzymes de synthèse de l'éthylène; ACC synthase et ACC oxydase (Tsukanova *et al.*, 2017). La présence de HT-PGPR abaisse considérablement le niveau d'éthylène en régulant à la baisse les gènes impliqués dans le stress des plantes induit par l'éthylène et régule à la hausse les gènes impliqués dans la croissance des plantes (Glick *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont rapporté l'expression de cette enzyme chez plusieurs rhizobactéries (ex: *Alcaligenes* spp., *Bacillus pumilus*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* spp., et *Variovorax paradoxus*). *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 cette enzyme (Cheng *et al.*, 2007; Saravanakumar et



Samiyappan, 2007). Elle est également exprimée chez *Brevibacterium*, *Gracilibacillus*, *Virgibacillus*, *Salinicoccus* et *Pseudomonas*, *Exiguobacterium* isolés de la rhizosphère et du phytoplan de *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk ont stimulé la croissance du maïs dans des conditions salines. Dans une autre étude, des souches bactériennes halotolérantes, *Brachybacterium saurashtrense* (JG-06), *Brevibacterium casei* (JG-08) et *Haererohalobacter* (JG-11), produisant l'ACC désaminase, ont amélioré la tolérance au sel des arachides cultivées dans des sols salins (Shukla *et al.*, 2012).

L'effet de l'ACC désaminase produite par les HT-PGPR sur la formation de nodules dans les cultures de légumineuses est également bien documenté (Ahmad *et al.*, 2011; Barnawal *et al.*, 2014). Dans le processus de nodulation, l'ACC désaminase joue un rôle essentiel pour améliorer la persistance des fils d'infection qui est négativement affectée par le niveau d'éthylène et ainsi aider à la formation de nodules dans des conditions salines (Nascimento *et al.*, 2016). L'inoculation de *Rhizobium* produisant l'ACC désaminase, réduit le niveau d'éthylène dans le sol. L'inoculation par ces bactéries favorise l'élongation des racines, la nodulation et l'absorption des minéraux (Glick, 2012; Gopalakrishnan *et al.*, 2015) (**Fig. 10**). En effet, on a constaté que les HT-PGPR productrices d'ACC désaminase isolées à partir d'halophytes atténuent le stress salin et augmentent la croissance des plantes tant pour les halophytes que pour les glycophytes sensibles à la salinité. Une attention considérable est accordée à ces HT-PGPR pour leur utilisation dans la promotion de la croissance des plantes dans des environnements salins (Ali *et al.*, 2014).



**Fig. 10: Représentation schématique de l'activité de l'ACC désaminase des PGPR lors de conditions de stress abiotique (Saravanakumar *et al.*, 2012).**

### 6-1-3- Exopolysaccharides

Les bactéries productrices d'exopolysaccharides (EPS) jouent un rôle crucial dans la croissance des plantes et la production agricole en maintenant le potentiel hydrique, en agrégeant les particules du sol, en assurant un contact entre les racines des plantes et les rhizobactéries et en protégeant l'hôte dans des conditions de stress (Noumavo *et al.*, 2016). Les EPS sont un complexe de polymères de haut poids moléculaire ( $PM \geq 10\ 000$ ) sécrétés par des bactéries en réponse à des contraintes environnementales (Nunkaew *et al.*, 2014). Les PGPR productrices des EPS peuvent améliorer la structure du sol en augmentant le volume des macropores du sol rhizosphérique ce qui entraîne une forte rétention de l'eau et une grande disponibilité de nutriments aux plantes. Les EPS peuvent, également, retenir les ions  $Na^+$  en diminuant sa teneur absorbée par les plantes et atténuer, par conséquent, l'effet du stress salin. La capacité des EPS à lier les cations est associée, principalement, aux groupements hydroxyle, sulfhydryle, carboxyle et phosphoryle (Nunkaew *et al.*, 2014). Les EPS bactériens jouent un rôle important dans l'agrégation et l'adhérence du sol. Les souches HT-PGPR productrices d'EPS induisent une tolérance à la salinité du sol et favorisent la

croissance des plantes et limitent l'absorption de  $\text{Na}^+$  par les racines (Ashraf *et al.*, 2004). Les EPS bactériens protégeraient les bactéries de la dessiccation en modifiant leur microenvironnement. Outre ces rôles définis, ces métabolites sont également liés au processus cellulaire de détection et de reconnaissance dans la rhizosphère, à la protection des plantes contre les phytopathogènes et comme source de carbone dans des conditions déficientes en nutriments (Mishra et Arora, 2018). L'inoculation non seulement réduit la concentration de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  chez la plante, mais induit également une augmentation marquée et progressive de la concentration en N, P, et K sous contrainte de la salinité. 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 (Vivas *et al.*, 2003). Certaines rhizobactéries y compris *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* sp., *Planococcus rifietoensis*, *Halomonas variabilis*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium* et *Paenibacillus* produisent des EPS et facilitent la formation de biofilm (Sáenz-Mata *et al.*, 2016). Les EPS produits par *Pseudomonas putida* GAP-P45 jouent un rôle positif dans la régulation de la teneur en eau et la diffusion de la source de carbone aux plantes, notamment, dans des conditions fluctuantes de stress (Sandhya *et al.*, 2010). Selon Tewari et Arora (2018), l'inoculation de *Pseudomonas* sp. produisant des EPS a amélioré le rendement de la culture du tournesol dans un champ très salin ( $\text{EC} > 10$  dS/m). Cette étude a également rapporté que l'inoculation par cette HT-PGPR a réduit l'incidence de la maladie de la pourriture du charbon de bois.

#### **6-1-4- Composés organiques volatiles (COVs)**

Lorsque les HT-PGPR sont exposées à des conditions de stress comme la salinité, elles sont capables de produire des COVs de faible poids moléculaire (moins de 300 Da) et de nature lipophile. Une vaste gamme de substances volatiles microbiennes ont été signalées et parmi elles, beaucoup sont reconnues pour leur potentiel dans l'amélioration de la santé des plantes (Kanchiswamy *et al.*, 2015). Leurs rôles dans la régulation de la motilité bactérienne, les interactions plantes-microbe, la modulation des facteurs de virulence, la biosynthèse des osmolytes comme la glycine bêtaïne, les phytohormones (auxines, cytokinines et gibbérellines) et les sidérophores ont également étudiés et rapportés (Sharifi et Ryu, 2018). Dans une étude récente, Tahir *et al.* (2017) ont montré que les COV l'albutérol et le 1,3 propanediol produits par *B. subtilis* SYST2 modulaient les niveaux d'hormones végétales l'expansine, l'auxine, la gibbérelline, la cytokinine et l'éthylène. La géosmine, le disulfide de diméthyle, le 2,3-butanediol et l'acétoïne sont les COV bactériens les plus étudiés qui aident aux processus de formation du sol, au compostage, à la nutrition sulfurique, à l'expansion cellulaire, à l'induction de la tolérance systémique et à la sécheresse chez les plantes (Meldau

*et al.*, 2013). Deux substances volatiles bactériennes, le 4-nitroguaiacol, et la quinoline produites par *Pseudomonas simiae* halotolérante ont induit la croissance du soja sous le stress salin de 150 mM de NaCl (Vaishnav *et al.*, 2016).

### **6-1-5- Production d'hormones végétales**

Les phytohormones produites par les HT-PGPR jouent un rôle essentiel dans la modulation de la physiologie des plantes sous stress salin (Egamberdieva et Kucharova, 2009). Les HT-PGPR produisent de l'AIA nécessaire à la division et à l'élongation cellulaire chez les plantes confrontées au stress salin. Il est également observé que l'inoculation par les HT-PGPR augmente l'absorption de minéraux, protège les plantes de la toxicité ionique et augmente la croissance des racines et des tiges dans des conditions salines. Des études ont confirmé que sous stress salin, la perte de rendement des cultures peut être minimisée par l'application de HT-PGPR productrices de phytohormones. Les HT-PGPR productrices d'AIA les plus connues sont *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Rahnella* (Egamberdieva *et al.*, 2008, 2018; Piccoli *et al.*, 2011; Abd\_Allah *et al.*, 2017).

Outre les auxines, d'autres phytohormones sont également signalées pour atténuer l'effet du stress salin chez les plantes. L'acide gibbérellique (AG) régule positivement la division et l'élongation cellulaires, l'hypocotyle et la croissance des tiges, ainsi que la taille des méristèmes des feuilles et des racines (Martínez *et al.*, 2016). La signalisation de l'AG est un facteur clé dans l'inhibition de la croissance des plantes sous stress, les PGPR peuvent influencer son niveau endogène dans les plantes. La production de cytokinines (CK) est également importante pour la prolifération et la différenciation cellulaires, et est signalée chez les espèces *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Azospirillum* et *Pseudomonas* tolérantes au sel (García de Salamone *et al.*, 2001; Karadeniz *et al.*, 2006; Naz *et al.*, 2009; TrParray *et al.*, 2016). L'ABA est également synthétisé par des souches de HT-PGPR, notamment *Proteus mirabilis*, *Bacillus megaterium*, *B. licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Achromobacter xylosoxidans* (Karadeniz *et al.*, 2006; Forchetti *et al.*, 2007; Salomon *et al.*, 2014). Il existe des rapports où les HT-PGPR sont connues pour produire plus d'un type de phytohormones. Patel et Saraf (2017) ont signalé que des souches bactériennes de *Pseudomonas stutzeri*, *stenotrophomonas maltophilia* et *P. putida* isolées de la rhizosphère de Coléus produisent de l'AIA, de l'AG et de la CK dans des conditions salines.

L'acide jasmonique (AJ) est également impliqué dans la résistance au stress abiotique (Ahmad *et al.*, 2016). Plusieurs PGPR endophytes synthétisent l'AJ et l'acide salicylique (AS). L'inoculation des plantes avec les souches PGPR *P. fluorescens* Pf4, *P. aeruginosa* Pag et *B. amyloliquefaciens* LJ02 a entraîné une augmentation des niveaux endogènes de l'AS dans

diverses plantes (Kang *et al.*, 2012; Shahzad *et al.*, 2016). Récemment, Tewari et Arora (2018) ont rapporté le rôle d'AS dans l'amélioration du stress salin. La régulation de ces voies métaboliques primaires dans les plantes pour se protéger contre les troubles induits par la salinité favorise la tolérance des cultures.

La régulation des hormones dans des conditions de stress est un phénomène complexe. Les niveaux hormonaux sont régulés à la hausse ou à la baisse par des facteurs environnementaux. L'accumulation d'ABA dans les plantes cultivées sous stress salin induit une fermeture stomatique pour réduire la perte d'eau et augmente la tolérance au sel par l'intermédiaire de gènes sensibles au stress (Herrera-Medina *et al.*, 2007), tandis que l'inoculation bactérienne diminue la synthèse de l'ABA induite par le stress et protège les plantes des effets du stress (Kang *et al.*, 2014).

#### **6-1-6- Activité antioxydante**

Dans des conditions salines, 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). L'atténuation de la dégradation oxydative par des enzymes antioxydantes médiée par le piégeage des ROS est un mécanisme important chez les plantes pour augmenter la tolérance à la salinité. Les bactéries modèrent l'état redox des plantes affectées par le sel en augmentant les antioxydants et les polyamines, ce qui se traduit par une efficacité photosynthétique amplifiée (Radhakrishnan et Baek, 2017). Les PGPR produisent des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la peroxydase (POX) et la catalase (CAT) et des antioxydants non enzymatiques tels que l'ascorbate, le glutathion, et l' $\alpha$ -tocophérol (Han et Lee, 2005). Les *Bacillus* spp. réduisent les effets toxiques de la salinité chez les plantes en inhibant la peroxydation lipidique (Han *et al.*, 2014). Hashem *et al.* (2015) ont prouvé que *B. subtilis* améliorerait la synthèse lipidique, en particulier celle des acides oléique, linoléique et linoléique, ainsi que des phospholipides, dans les plantes cultivées sous stress salin. Cette augmentation de la synthèse lipidique pourrait atténuer la peroxydation lipidique et le stress oxydatif dans les plantes. La production des ROS est contrôlée par des enzymes antioxydantes. Chez les plantes traitées par des bactéries, les activités de l'APX et de la SOD sont réduites, tandis que celles du nitrate réductase, du CAT et du POD sont améliorées (Jha et Subramanian, 2014). *Bacillus pumilus* associé aux racines de plantes de riz salinisées réduit l'activité de la caspase, une protéase appartenant à la famille des endopeptidases de la cystéine et impliquée dans la mort cellulaire programmée des plantes (Groten *et al.*, 2006). La réduction de l'activité de la caspase diminue la formation des ROS et

la mort cellulaire programmée et reprogramme l'action des antioxydants pour atteindre la tolérance végétale (Jha et Subramanian, 2014).

Des études des profils du transcriptome des tissus des feuilles d'*Arabidopsis* affectés par la salinité ont montré après inoculation par *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, une stimulation de la régulation positive des gènes associés à la photosynthèse, au piégeage des ROS, aux osmoprotecteurs tels que le tréhalose et la proline, à la translocation de Na<sup>+</sup> ainsi qu'à la signalisation de l'acide jasmonique, de l'auxine et de l'éthylène dans des conditions de stress salin (Liu *et al.*, 2017). L'expression des gènes antioxydants peut éventuellement être impliquée dans la régulation du niveau des ROS dans les plantes inoculées par des PGPR sous stress salin.

## **7- Diversité des PGPR halotolérantes (HT-PGPR)**

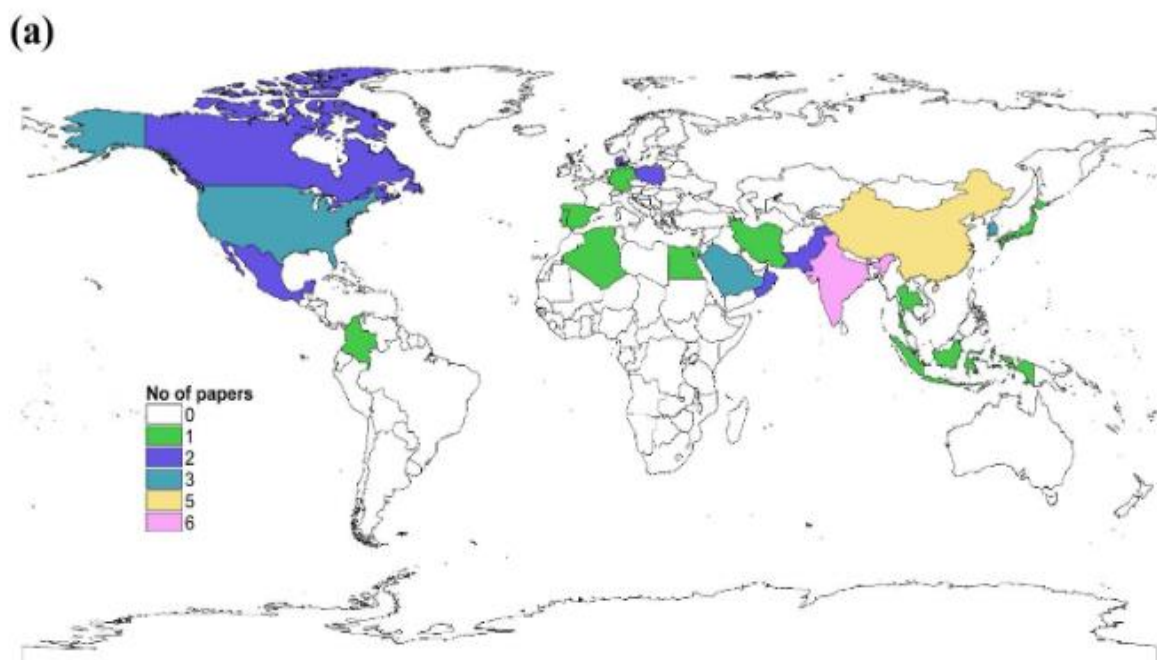
Récemment, à la suite de nombreuses études couvrant une plus large gamme d'espèces végétales et en raison des progrès réalisés dans la taxonomie bactérienne et des progrès dans la compréhension des différents mécanismes d'action des PGPR, le nombre d'espèces bactériennes identifiées comme PGPR a augmenté. Les HT-PGPR sont maintenant bien connues pour leur capacité à tolérer et à atténuer le stress salin chez diverses plantes. Plusieurs espèces de HT-PGPR appartenant aux genres suivants: *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Arhrobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Zhihengliuella*, *Variovorax*, *Microbacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Haererohalobacter*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, etc. sont rapportés pour atténuer le stress salin dans les cultures (Arora *et al.*, 2020).

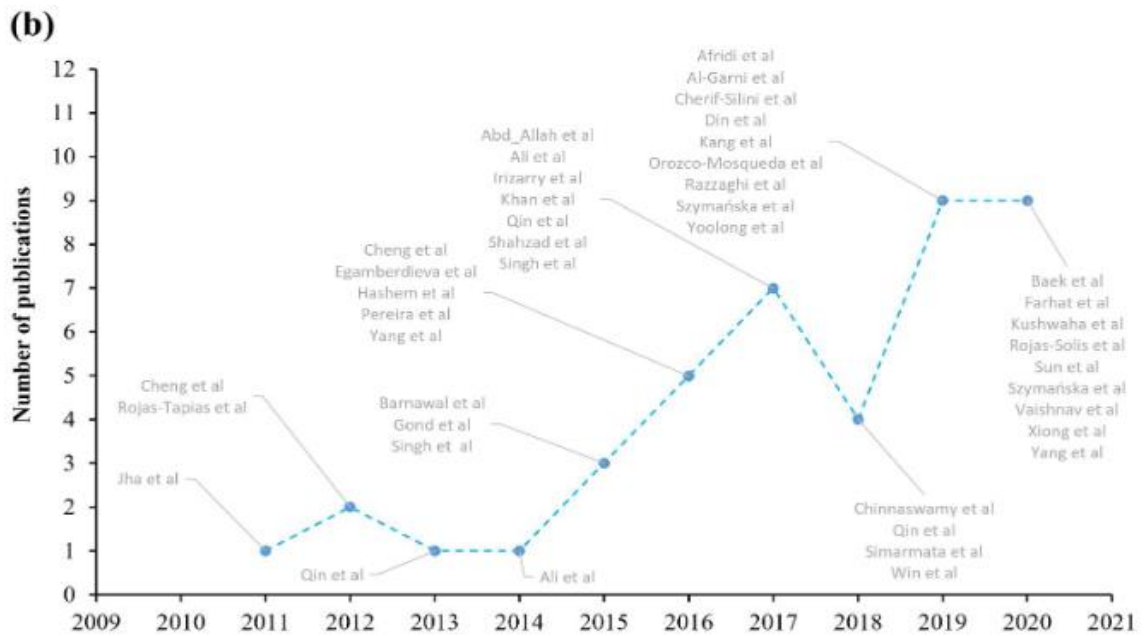
Un total de 24 genres bactériens, dont 15 Gram négatif et 9 Gram positif, sont identifiés à partir d'une méta-analyse extraite à partir de 42 expériences réparties à travers le monde (de 2011-2020) (**Fig. 11A, B**) sur des bactéries endophytes améliorant la croissance des plantes en milieu salin. Parmi les bactéries Gram-négatives, *Pseudomonas* et *Pantoea* sont les genres les plus représentés, tandis que *Bacillus* est le genre le plus représenté parmi les bactéries Gram-positives (Tufail *et al.*, 2021) (**Fig. 11C**).

Divers autres genres de HT-PGPR sont isolés à partir de plantes halophytes telles que *Rosa rugosa*, *Salicornia bigelovii*, *Halocnemum strobilaceum*, *Acacia* spp., *Sesuvium portulacastrum* et *Avicennia marina*, et d'une large variété d'habitats tels que les sols alcalino-salés, sols désertiques et sols salins. Beaucoup de ces bactéries halotolérantes ont montré une capacité à favoriser la croissance des plantes (Etesami et Beattie, 2018). Des bactéries

halotolérantes *Brevibacterium epidermidis*, *Micrococcus yunnanensis* et *Bacillus aryabhatai*, sont isolées de la rhizosphère de six halophytes naturels à proximité de la mer Jaune, en République de Corée (Siddikee *et al.*, 2010). *Brevibacillus borstenlensis*, *Pseudoalteromonas ruthenica* et *Halomonas sinaensis* sont isolées de *Halocnemum strobilaceum*, cultivant sur les sites côtiers du golfe Arabique.

Dans une étude de Nadeem *et al.* (2013), l'inoculation du blé par des HT-PGPR *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia ficaria* et *Pseudomonas fluorescens* dans des champs naturellement salins ( $C_e=15 \text{ dS.m}^{-1}$ ) entraînent une augmentation du pourcentage de germination. Dans une autre étude, l'inoculation de *Brassica juncea* cultivée sous stress salin ( $C_e = 12 \text{ dS m}^{-1}$ ) par *Pseudomonas argentinensis* HMM57 et *Pseudomonas azotoformans* JMM15 a entraîné une augmentation marquée du poids sec des racines, et des feuilles des plantes (Phour et Sindhu, 2020). Tiwari *et al.* (2011) ont également isolé des HT- PGPR en raison de leur capacité à tolérer 2 à 25% de NaCl; celles-ci comprennent *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas mondocina*, *Arthrobacter* sp., *Halomonas* sp., et *Nitrinicola lacisaponensis* avec des traits favorisant la croissance des plantes. Ramadoss *et al.* (2013) ont prouvé que le blé inoculé avec *Hallobacillus* sp. SL3 et *Bacillus halodenitrificans* PU62 a entraîné une augmentation de la longueur des racines de 90 % et du poids sec de 17,4 % sous le stress salin de 320 mM. Zhu *et al.* (2011) ont isolé une PGPR halotolérante à haute solubilisation du phosphate, *Kushneria* sp. YCWA18, provenant du sédiment salin de Daqiao sur la côte de la Chine qui a pu croître sur un milieu solide contenant 20% (p / v) de chlorure de sodium.





(C)

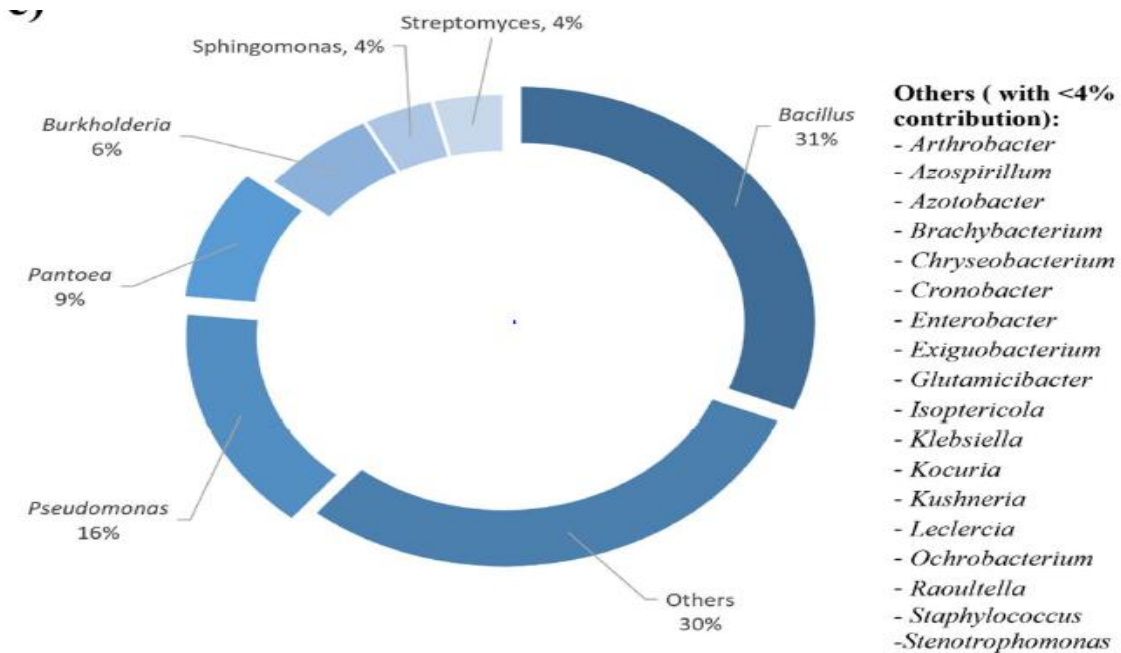


Fig. 11: Genres bactériens des HT-PGPR identifiées à partir d'une méta-analyse à travers le monde (A) établie sur 42 expériences (B). Genres bactériens endophytes prédominants (C) (Tufail *et al.*, 2021).

### 7-1- *Bacillus* spp. comme HT-PGPR

*Bacillus* est l'un des genres le plus abondant dans le sol. Il a été isolé à partir de la rhizosphère de diverses plantes (Earl *et al.*, 2008; Sivasakthi *et al.*, 2014). Il s'agit d'une bactérie non pathogène à Gram positif utilisée comme organisme modèle pour étudier, entre autres, la

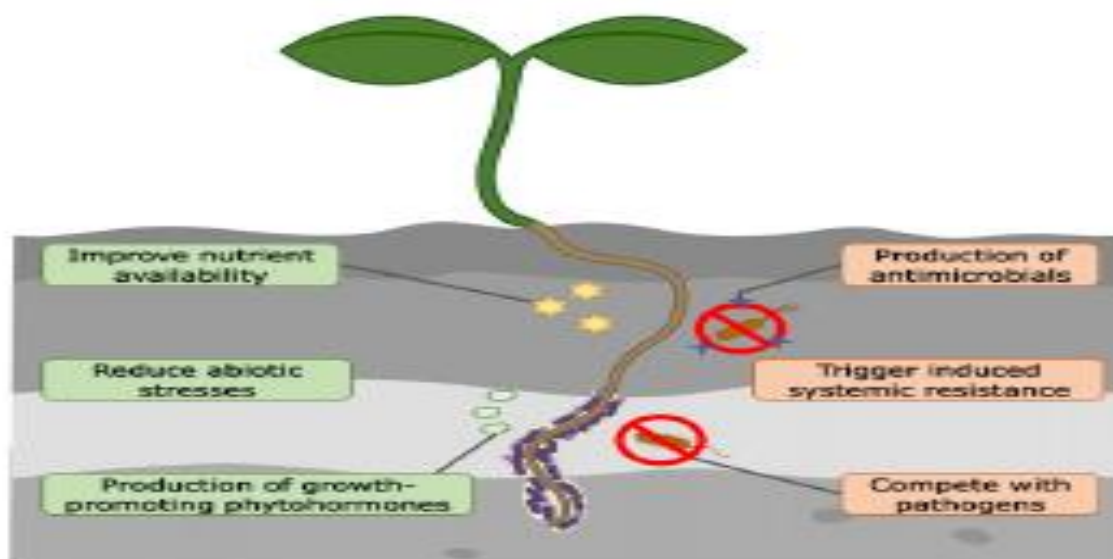


production de métabolites secondaires, la sporulation, le développement du biofilm et l'attachement aux racines des plantes (Kovács, 2019) (**Fig. 12**).

*Bacillus* spp. sont les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes les plus étudiées. Ce genre est capable à la fois de favoriser la croissance des plantes et de contrôler les agents pathogènes des plantes grâce à divers mécanismes, notamment l'amélioration de la disponibilité des nutriments et l'altération de l'homéostasie des phytohormones ainsi que la production d'antimicrobiens et le déclenchement d'une résistance systémique induite. La condition de l'application agricole est sa capacité de persister dans la rhizosphère. Une colonisation racinaire réussie dépend ainsi des caractéristiques bactériennes, y compris la motilité et la formation de biofilm, ainsi que d'une interaction de signal avec la plante. Outre ses divers avantages pour la santé des plantes, *Bacillus* par sa capacité à former des spores résilientes est en fait une cible très prometteuse pour une application agricole. Les spores sont très résistantes à divers stress abiotiques, tels que la sécheresse, la température ou la limitation des nutriments, ce qui facilite leur formulation pour une application en agriculture (Schisler *et al.*, 2004). Les propriétés bénéfiques de l'espèce *B. subtilis* sont déjà exploitées dans de nombreux produits biologiques actuellement disponibles, notamment Serenade®, Subtlex® et Cease® (Borriss, 2015).

De nombreuses expérimentations conduites par plusieurs auteurs ont révélé que l'inoculation par des souches sélectionnées de *Bacillus* pouvaient s'établir avec succès dans la rhizosphère exercer ses propriétés bénéfiques pour les plantes, notamment en favorisant directement leur croissance ainsi qu'en les protégeant contre les maladies (Blake *et al.*, 2021). De plus, l'inoculation microbienne qui comprend *Bacillus* spp. peut améliorer la croissance des plantes pendant le stress salin, ce qui est une approche écologique de l'agriculture durable (Hashem *et al.*, 2015). Les multiples caractéristiques favorisant la croissance des plantes de *Bacillus licheniformis* A2 atténuent les effets néfastes du stress salin et augmentent la croissance des plantes d'arachides stressées (Goswami *et al.*, 2014). L'association de *Bacillus* spp. avec les plantes modifie le métabolisme des plantes stressées en augmentant leur croissance. L'inoculation des semis de blé par *Bacillus insolitus* MAS17 et d'autres *Bacillus* spp. producteurs de EPS limitent le flux passif de Na<sup>+</sup> et atténuent les effets du stress salin (Ashraf *et al.*, 2004). Les *Bacillus* spp. réduisent les effets toxiques de la salinité chez les plantes en inhibant la peroxydation lipidique (Han *et al.*, 2014). *B. subtilis* RH-4 tolérant au sel améliore la germination des graines et la croissance des plantes en améliorant la synthèse des pigments photosynthétiques, des glucides, des protéines et des osmolytes, comme la proline, la glycine bêtaïne et la choline, dans les plantes de pois chiches affectées par le sel (Qurashi et Sabri,

2013). De même, *Bacillus* spp. peut produire des hormones végétales pour augmenter les concentrations d'AIA et d'AG, mais réduire la synthèse d'ABA dans les plantes cultivées sous stress salin (Mohamed et Gomaa, 2012). Dans une étude, la HT-PGPR *B. subtilis* a amélioré le rendement du blé d'environ 18 % dans les sols salins (Upadhyay et Singh, 2015). La recherche montre que l'application de HT-PGPR dans le riz peut augmenter la germination, favoriser la croissance des plantules, induire des enzymes antioxydantes contre les ROS, favoriser l'accumulation d'osmolytes et moduler l'expression des gènes liés au stress salin (Nautiyal *et al.*, 2013; Paul et Lade, 2014; Rima *et al.*, 2018; Sarkar *et al.*, 2018). L'effet de diverses HT-PGPR dans l'amélioration de la productivité du riz et du blé tolérants au sel cultivés sur des sols sodiques a été exploré par Damodaran *et al.* (2019) et ils ont découvert que *Lysinibacillus* sp. est le plus efficace pour atténuer l'effet indésirable de la salinité. De même, une recherche approfondie sur la diversité des HT-PGPR dans différentes zones agro-climatiques menée par Misra *et al.* (2017) a révélé que parmi tous, les *Bacillus* spp. ayant une ACC désaminase sont les plus dominants dans l'amélioration du stress salin et l'amélioration de la biomasse de riz.



**Fig. 12: Effets favorisant la croissance des plantes par *B. subtilis* (Blake *et al.*, 2021).**

## **8- Application synergique des PGPR (Co-inoculation ou Consortium)**

Dans certains cas, en particulier sur le terrain, des résultats incohérents sont obtenus avec des inocula uniques, bien que l'inoculation avec une PGPR se soit avérée utile pour améliorer la croissance des plantes (Lucy *et al.*, 2004; Smyth *et al.*, 2011). Ces bactéries bénéfiques peuvent également être utilisées efficacement avec d'autres micro-organismes pour favoriser leur croissance et leur rendement dans des conditions normales et de stress (Nadeem *et al.*, 2015).

L'utilisation de souches mixtes de PGPR fait l'objet d'une plus grande attention (Canaday, 2003). Le consortium microbien est un groupe d'espèces de micro-organismes qui agissent ensemble en tant que communauté. Dans un consortium, les organismes travaillent ensemble de manière complexe et synergique (Sudharani et al., 2014), pour obtenir de meilleurs résultats qu'une seule application bactérienne (Bashan et De Bashan, 2002). Chaque espèce bactérienne a des mécanismes différents de sorte que le consortium bactérien peut fournir simultanément divers mécanismes d'activités PGP, qui donne plus d'efficacité dans le contrôle des agents pathogènes et dans la biofertilisation.

L'efficacité de la co-inoculation de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* sp. pour l'amélioration de la croissance et l'acquisition de nutriments pour les lentilles a été démontrée. Bien que l'inoculation de la souche bactérienne seule eût un effet significatif sur la croissance, la nodulation et l'absorption des nutriments, la co-inoculation a enregistré une augmentation maximale de la nodulation, de la teneur en chlorophylle et de l'absorption totale de fer, d'azote et de phosphore. Cette étude indique la relation synergique entre les souches utile pour améliorer la croissance des plantes et suggère également l'utilisation de ces souches pour la production de bio-engrais (Mishra et al., 2011). Le rendement du consortium bactérien est plus efficace lorsqu'il est utilisé dans un environnement de stress. Un état de stress lié à la salinité a montré que la double inoculation améliorerait la croissance du blé en augmentant la teneur en sucre et en proline et en diminuant la teneur en sodium du blé inoculé (Upadhyay et al., 2011). Bien que l'inoculation unique se montre efficace pour diluer l'impact négatif de la salinité, le consortium bactérien est plus efficace pour induire la tolérance à la salinité chez le blé. Lorsque les plantes d'haricots ont été co-inoculées avec *Rhizobium* spp. et *Paenibacillus polymyxa*, la promotion de nodulation s'est avérée meilleure (Petersen et al., 1996). Ahmad et al. (2013) ont observé que la co-inoculation de *Pseudomonas* et de *Rhizobium phaseoli* permet l'amélioration de la croissance et la nodulation du haricot mungo sous le stress salin. Selon Bano et Fatima (2009), l'inoculation de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* favorise la croissance du maïs dans des conditions salines en augmentant la teneur en eau et en diminuant les fuites d'électrolytes des plantes inoculées. De plus Walker et al. (2012) ont rapporté que l'inoculation avec un consortium d'*Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* améliorerait l'architecture racinaire du maïs sous salinité. Une meilleure adaptabilité des PGPR aux conditions de stress est corrélée à une colonisation efficace des racines, à la solubilisation du phosphate et aux capacités de fixation de l'azote. D'après les résultats, il est clair que les plantes salinisées inoculées avec un consortium de souches tolérantes présentaient une teneur en eau relative plus élevée des feuilles. L'utilisation du consortium bactérien est également

très efficace pour promouvoir la croissance des plantes en les protégeant des maladies pathogènes. L'application combinée de *Sinorhizobium fredii* KCC5 et de *Pseudomonas fluorescens* LPK2 a réduit de façon significative la maladie du flétrissement (Gupta *et al.*, 2002). L'étude de Choure et Dubey (2012) a montré que le consortium de trois espèces bactériennes *P. fluorescens* LPK2, *S. fredii* KCC5 et *Azotobacter chroococcum* AZK2 inhibe la germination des conidies et des chlamydozoospores de *Fusarium udum* et réduit la flétrissure fusarienne. Un bon consortium de bactéries comprend des espèces bactériennes qui sont résistantes au stress environnemental, ont une activité enzymatique naturelle et une longue durée de conservation, et sont non pathogènes en plus d'avoir une bonne durabilité et une faisabilité économique (Choure et Dubey, 2012). Il est également important d'utiliser des partenaires qui sont compatibles les uns avec les autres. En outre, le type de plante peut également exercer une influence sur la performance de l'inoculation. Par exemple, la co-inoculation de *Pseudomonas putida* avec *Sinorhizobium meliloti* est plus efficace dans le cas du soja que dans le cas de la luzerne où *Bradyrhizobium japonicum* est plus efficace avec *P. putida* (Rosas *et al.*, 2006).

## Matériel et méthodes

### A-Isolement des bactéries des sols salins et caractérisation de leurs activités PGP

La salinité est l'un des principaux facteurs de stress abiotique limitant la croissance et la productivité des plantes. Les progrès actuels dans l'exploration de la diversité de la rhizosphère indiquent que les microorganismes du sol peuvent aider les cultures à résister plus efficacement aux stress abiotiques (Chakraborty *et al.*, 2013). Des mesures prometteuses pour améliorer la santé des plantes dans les sols salins sont l'utilisation d'inoculants microbiens issus d'environnement extrêmes et de plantes halophytes. La promotion de la croissance des plantes a confirmé leur application comme une stratégie fiable dans la gestion du système agricole durable. Ainsi les PGPR par leur capacité fonctionnelle et leur mécanisme jouent un rôle important en tant que modificateurs de la fertilité des sols et comme stimulateurs du développement des plantes (Barea *et al.*, 2002; Caravaca *et al.*, 2002). Dans cette étude on a isolé les bactéries des halophytes et des sols affectés par le sel afin d'évaluer les différents caractères PGP et de sélectionner les bactéries les plus actives et de tester leur effet sur la promotion de la croissance des plantes *in vitro*: par la germination des graines de blé et l'inoculation des semis d'*Arabidopsis thaliana* dans des boîtes de Pétri et *in vivo* par l'inoculation des graines de blé dans des pots cultivés.

#### 1-Écosystèmes explorés

Les échantillons ont été recueillis de trois régions différentes: Sebkhha de Bazer Sakhra (Sétif), Chott Tinsilt (Oum El Bouaghi) et Chott El Hodna à (Baniou, M'sila).

➤ **Sebkhha de Bazer Sekhra (Sétif): (36.0505803\_ N, 5.6805708\_ E)**

Le site est situé au sud de la ville d'El Eulma (9 km), du village d'El Melah (3 km) et de la commune de Bazer (**Fig. 13**). Il représente une dépression naturelle saline, permanente et fermée avec la plus haute altitude de la région de Sétif. L'Oued El Melah, alimenté par les eaux usées de la ville d'El Eulma et le village d'El Melah est permanent et coule en relief plat. Cet Oued (vallée) assure l'hydromorphie de la sebkhha en été. En hiver, et pendant les années pluvieuses le niveau d'eau peut atteindre 1,5 m. La Sebkhha est entourée de sols de différents types, mais les sols salins dominent avec environ 70 % (Anonym, 2004) (**Fig. 14**).



Fig. 13: Localisation géographique de la Sebkha Bazer Sakhra (Sétif) (Anonym, 2004).

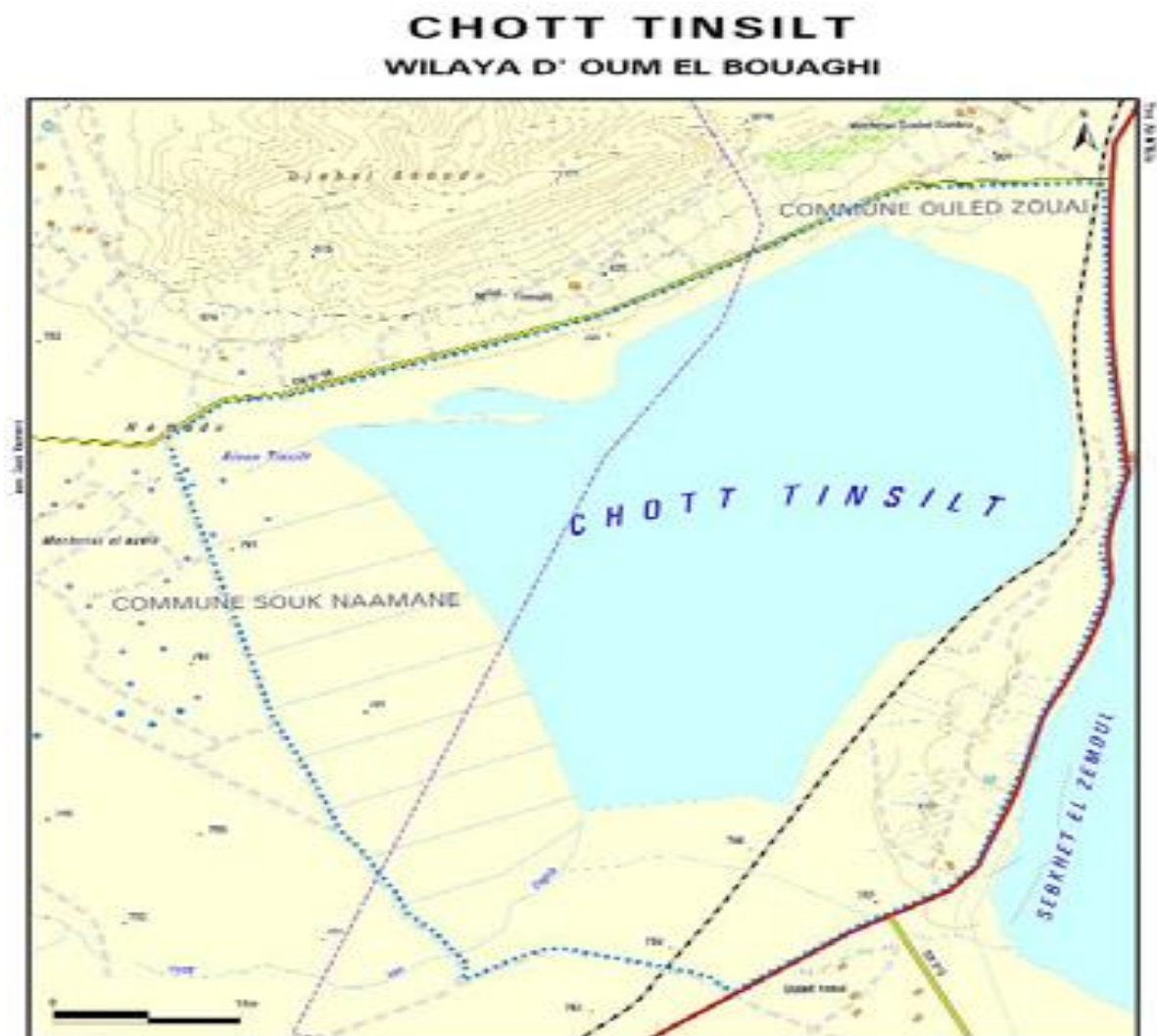


Fig. 14: Site de prélèvement à la Sebkha de Bazer sakhra (Sétif).



➤ **Chott Tinsilt (Oum El Bouaghi): (35.8852354\_ N, 6.4414962\_ E)**

Le site est situé à 5 km de la commune de Souk-Naâmane et à 17 km au Sud de la ville d'Aïn-M'lila, le long de la route nationale 3 desservant Constantine et Batna et de la voie ferrée Constantine-Biskra. Il fait partie de la Wilaya d'Oum El Bouaghi et de la Daïra de Souk Naâmane (**Fig. 15**). Le Chott fait partie des plaines montagneuses de la région de Constantine avec une profondeur qui varie régulièrement sans jamais dépasser 0,5 m. Il s'étend sur 4 km de long et 2,5 km de large; son alimentation se fait à travers l'eau de pluie, avec un apport important de sédiments, et les eaux usées de la ville de Souk Naamane. Composé d'un milieu humide et d'un autre généralement sec, il est entouré de végétation aquatique et d'une prairie humide couverte de végétation herbacée. En ce qui concerne le sol, il s'agit de sols sédimentaires quaternaires dominés par les argiles et le limon fin (Anonym, 2004) (**Fig. 16**).



**Fig. 15: Localisation géographique du Chott Tinsilt (Oum El Bouaghi) (Anonym, 2004).**



**Fig. 16: Site de prélèvement à Chott Tinsilt (Oum El Bouaghi).**

➤ **Chott El Hodna (Baniou, M'Sila): (35.479223\_N, 4.366587\_E)**

Le site chevauche deux wilaya, M'Sila, sur 1000 Km<sup>2</sup>, et Batna sur 100 Km<sup>2</sup>. Il se situe au Sud-Est de l'Algérie, occupe le centre de la cuvette du Hodna située à 40 km de la ville de M'sila, à 20 km au Sud-Ouest de la ville de Bou Saada et à 80 km au Sud-Est de la ville de Biskra (**Fig. 17**). Le Chott occupe la partie basse du centre du Bassin du Hodna, qui s'étend sur 220 Km de long et 90 Km de large. Hydrologiquement, c'est un bassin fermé de 26000 Km<sup>2</sup>. Le paysage végétal des hautes plaines steppiques fait partie du point de vue phytogéographique à la région Saharienne. Le Chott est une surface d'épandage des crues, de forme elliptique constituant une zone humide salée, sa surface inondée est variable, mais ne dépasse jamais 80.000 ha. Son alimentation est assurée par au moins 22 cours d'eau principaux, auxquels il faut ajouter des sources d'eau douce (Anonyme, 2005) (**Fig. 18**).





**Fig. 17: Localisation géographique du Chott El Hodna (Baniou, M'sila) (Anonyme, 2005).**

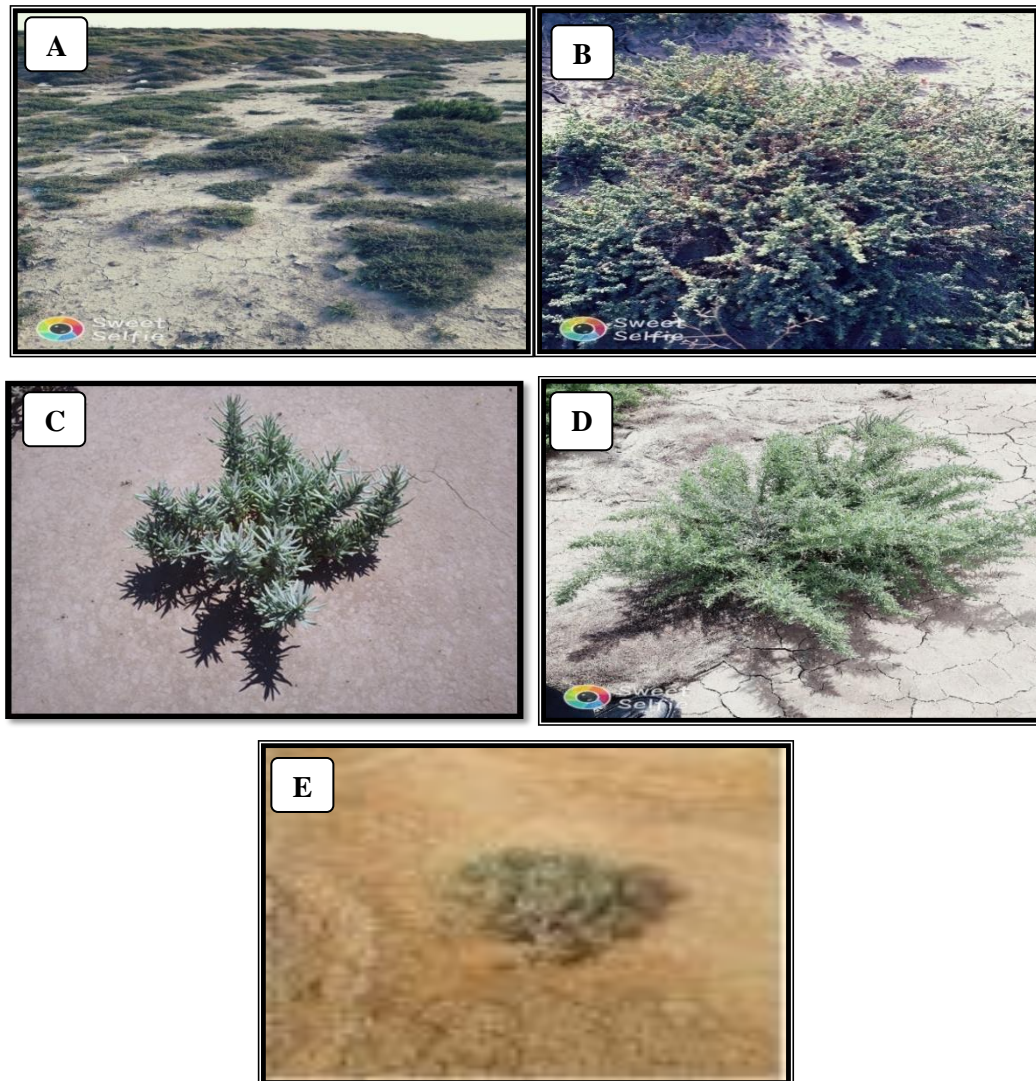


**Fig. 18: Site du prélèvement à Chott El Hodna (Baniou, M'sila).**

## 2-Échantillonnage

Plusieurs échantillons de sol sont prélevés à différents endroits de chacun des sols salins entourant les différentes Sebkhia au mois de juillet 2015. Ces échantillons ont servi à l'isolement de bactéries non rhizosphériques. Les cinq premiers centimètres de la surface du sol sont enlevés et à l'aide d'une spatule stérile, 100 à 150 g de sol sont recueillis dans des récipients stériles et transportés au laboratoire à 4°C. Selon, leur prédominance dans les

Sebkha, les halophytes *Suaeda mollis* (Sebkha Bazer Sakhra et Oum El-Bouaghi) et *Salsola tetrandra* (Chott El Hodna) (**Fig. 19**) sont choisies pour l'isolement des bactéries rhizosphériques et endophytes.



**Fig. 19:** Halophytes utilisées pour l'isolement des bactéries rhizosphériques et endophytes. *Suaeda mollis* (Sebkha Bazer Sakhra (A, B) et Oum El-Bouaghi (C, D)), et *Salsola tetrandra* (Chott El Hodna) (E).

### **3- Mesure du pH et de la conductivité électrique (Ce) des échantillons de sol**

La mesure du pH consiste à homogénéiser 10 g de sol dans 25 ml d'eau distillée. Après agitation, et décantation, le pH du surnageant est déterminé par un pH-mètre. La Ce est réalisée à partir de l'extrait du sol au 1/5. 10g de sol sont homogénéisés dans 50 ml d'eau distillée. Après agitation (30 mn) et décantation, la Ce de l'extrait est mesurée à l'aide d'un conductivimètre (Hanna H1 9032) et les résultats sont exprimés en mS/cm.

#### **4- Isolement des bactéries**

L'isolement des bactéries rhizosphériques se fait par prélèvement de 1g de sol adhérant fortement aux racines après avoir secouer les racines des plantes pour éliminer l'excès de sol. Chaque échantillon extrait est additionné à 10ml d'une solution stérile de NaCl (9 g/L) et agité pendant 30mn. Des dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) sont réalisées à partir de cette suspension. 0,1ml de chaque dilution est étalé à la surface du milieu Trypticase Soja Agar (TSA) (Annexe 1). L'isolement des bactéries endophytes est effectué après lavage des racines d'halophytes avec de l'eau du robinet pour éliminer le sol adhérent puis stérilisé par immersion dans l'éthanol à 70 % pendant 5 mn et dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 30 mn suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile. Pour vérifier l'efficacité de la désinfection des racines, l'eau de lavage finale est étalée sur une gélose nutritive et incubée à 30 °C pendant 48 h. Ensuite (1 g) des racines désinfectées en surface est broyé dans un mortier stérile puis ajoutée à 10mL d'une solution stérile de NaCl (9 g/L). Une dilution en série jusqu'à  $10^{-6}$  des échantillons est effectuée et 0,1ml de chaque dilution est étalé à la surface du milieu TSA. Pour l'isolement des bactéries non rhizosphérique 1g de sol non rhizosphérique (non affecté par les racines des halophytes) est additionné à 10 ml d'une solution stérile de NaCl (9 g/L) et agité pendant 30mn. Les échantillons sont dilués et ensemencés comme précédemment. Les boites sont ensuite incubées à  $28\pm 2$  °C pendant 24 à 48 h et les colonies présentant des différences morphologiques sont sélectionnées et étalées sur des milieux gélosés pour obtenir des colonies pures (Cherif-Silini *et al.*, 2019).

#### **5- Mesure des activités PGP**

##### **5-1- Solubilisation des phosphates**

La solubilisation des phosphates est testée sur milieu Pikovskaya (Annexe 2). Des spots (5 µl) sont déposés à la surface du milieu. Les boites sont incubées à  $28\pm 2$ °C pendant 7 jours et observées pour la formation de halos transparents autour des colonies bactériennes ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates (Gaur, 1990).

##### **5-2- Estimation quantitative de l'acide indole acétique**

La production d'acide indole-3-acétique (AIA) est évaluée quantitativement en cultivant les isolats bactériens dans le bouillon Luria-Bertani (LB) (Annexe 3) additionné de 2 mg/mL de tryptophane comme précurseur de l'AIA et incubé pendant 4 jours à  $28\pm 2$  °C (Loper et Scroth, 1986). La culture bactérienne est centrifugée à 3000 rpm/mn pendant 30 mn. Un volume de 2 ml de surnageant est mélangée avec 100 µl d'acide orthophosphorique et 4 ml de réactif de Salkowski (50 ml, 35 % d'acide perchlorique, solution de  $\text{FeCl}_3$  de 1 ml 0,5M). Le développement de la couleur rose indique la production d'AIA et l'absorbance est lue à 530

nm. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Annexe 4).

### **5-3- Production de cyanure d'hydrogène (HCN)**

La production d'acide cyanhydrique (HCN) est évaluée sur gélose nutritive additionnée de glycine (4,4g/l) (Lorck, 1948). Les cultures bactériennes sont ensemencées par stries sur la gélose en boîtes de Pétri. Du papier Whatman 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  $28\pm 2^\circ\text{C}$  /7 jours. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production d'HCN.

### **5-4- Production de Sidérophores**

Les souches sont testées pour la production de sidérophores en milieu Chrome Azurol S agar (CAS) (Annexe 5) (Shwyn et Neilands, 1987). Les bactéries sont ensemencées dans des conditions exemptes de fer sur gélose King B (Annexe 6), sous forme de spot (5  $\mu\text{l}$ ) à la surface du milieu qui est incubé à  $28\pm 2^\circ\text{C}$  / 24 à 48 h. Après incubation, le réactif CAS avec une gélose à 0,9 % est étalé en mince couche sur les colonies bactériennes ré-incubés à  $28\pm 2^\circ\text{C}$  / 24 à 48 h. Le développement du halo jaune-orange autour de la colonie bactérienne est considéré comme positif pour la production de sidérophores.

### **5-5- Production d'enzymes**

La production de protéase est évaluée sur la gélose au lait écrémé (Annexe 7), la chitinase sur la gélose à la chitine (Annexe 8), la cellulase sur la gélose à la carboxyméthylcellulose (CMC à 1%) et l'amylase sur la gélose à l'amidon à 1 % (Annexe 9). Tous ces milieux sont inoculés par des spots de 5 $\mu\text{l}$  d'une culture fraîche de chaque souche et incubés à  $28\pm 2^\circ\text{C}$  /2 jours. L'activité protéolytique et chitinolytique est détectée par la présence d'une zone claire autour des colonies bactériennes. Pour la cellulase et l'amylase, le développement de halos clairs autour des colonies après l'ajout d'une solution d'iode à 1%, respectivement, a été considéré comme une indication positive de l'activité de la cellulase ou de l'amylase (Mefteh *et al.*, 2019; Cherif-Silini *et al.*, 2019).

### **5-6- Production de $\text{NH}_3$**

La capacité des souches à produire de l'ammoniac est testée en ensemencant 100 $\mu\text{l}$  de cultures bactériennes fraîches dans 10 ml d'eau peptonée et incubé à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  / 4 jours. Le réactif de Nessler (0,5 ml) a été ajouté dans chaque tube et le développement d'une couleur jaune à brune était une indication positive de la production d'ammoniac (Cappuccino et Sherman, 1992).



### **5-7- Fixation de l'azote**

La fixation de l'azote est testée sur un milieu WS solide (Winogradsky) (Annexe 10) exempte d'azote. Les souches sont striées sur le milieu et incubées à  $28\pm 2$  °C/ 2 jours. La croissance des isolats sur ce milieu indique leur capacité à fixer l'azote (Silini, 2016).

### **5-8- Activité antifongique**

Les bactéries présentant les plus fortes activités en sidérophores et enzymes extracellulaires sont sélectionnées et utilisées pour le test d'activité antifongique contre des champignons phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*). Les agents pathogènes fongiques sont cultivés sur la gélose pomme de terre dextrose (PDA) (Annexe 11) et un disque d'agar (6 mm) de chaque agent pathogène fongique est placé au centre d'une gélose PDA. 2µl de chaque culture bactérienne dans le bouillon TSB sont ensemencés en spot à une distance de 4 cm de la souche fongique et incubées à  $28\pm 2$  °C pendant 5 à 6 jours. Un témoin négatif de la souche fongique est testé en absence de bactéries (Mefteh *et al.*, 2019). Le diamètre de la zone d'inhibition des champignons est mesuré et le pourcentage d'inhibition par rapport au témoin (sans bactéries) est évalué 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).

**B- Sélection de PGPR tolérantes pour la promotion de la croissance des plantes *in vivo*:** Sur la base des résultats obtenus, dix bactéries ayant les meilleures activités PGP, sont sélectionnées et sont testées pour leur tolérance à différents pH, température, PEG<sub>8000</sub> et salinité.

### **1- Croissance dans différentes conditions de sel, de PEG<sub>8000</sub>, de pH et de température**

Les 10 isolats sélectionnés sont cultivés sur bouillon LB dans des microplaques avec différentes valeurs de pH (4, 7, 9 et 11), des concentrations croissantes de NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 mM) et de PEG<sub>8000</sub> (0 %, 10 %, 20 %, 30 % et 40 %) pour imiter les différents niveaux de potentiel hydrique. Toutes les cultures bactériennes ont été incubées à  $28\pm 2$ °C pendant 2 jours. La croissance des souches est également testée à différentes températures (4, 30, 37, 40 et 45 °C) pendant 2 jours et la densité optique (D.O) est mesurée à 600 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque Bio Tek ELx800.

### **2- Identification moléculaire des PGPR tolérant le sel**

Les souches bactériennes (n=3) ayant les meilleures capacités de tolérance aux différents paramètres physico-chimiques sont identifiées. L'identification moléculaire est réalisée au

Laboratoire de biologie du sol de l'Université de Neuchâtel, en Suisse, basée sur l'amplification et le séquençage des gènes de l'ARNr 16S.

### **2-1- Extraction de l'ADN bactérienne et amplification de l'ARNr 16S**

Le kit UltraCleanR d'isolement d'ADN microbien (QIAGEN, Bâle, Suisse) est utilisé pour extraire l'ADN génomique des isolats bactériens. L'intégrité de l'ADN est vérifiée par une inspection visuelle de l'ADN après électrophorèse au moyen d'une analyse au gel d'agarose à 1,5 %, et la quantité est estimée au moyen de la quantification fluorométrique Qubit (Thermo Fisher, Suisse). L'identification moléculaire des isolats est effectuée par amplification de la région d'ARNr 16S à l'aide des amorces fD1 (50 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 30) et rP2 (50 ACGGCTACCTTGTTACGACTT 30) (Mlaik *et al.*, 2015). L'amplification par PCR est effectuée dans un volume final de 25 µL avec 2,5 µL 10 Ex-Taq tampon (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl), 2 µL mélange dNTP de 2,5 mM, 0,5 µM de fD1 et rP2, 1 unité d'ADN Taq polymérase (Promega, Dübendorf, Suisse) et 5 ng d'ADN génomique à l'aide d'un thermocycleur BiometraT-One (Labgene, Chatel-Saint-Denis, Suisse). Les conditions de cycle suivantes sont utilisées: étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 1 mn suivie de 35 cycles (dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 55°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 20 s et étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 mn) à l'aide d'un thermocycleur BiometraT-One (Labgene, Chatel-Saint-Denis, Suisse). Un kit de purification PCR de MinElute (Qiagen, Bâle, Suisse) est ensuite utilisé pour purifier les amplicons PCR résultants selon les spécifications du fabricant (Meftah *et al.*, 2019; Luchi *et al.*, 2013).

### **2-2- Séquençage d'ADNr 16S et analyse phylogénétique**

Le séquençage des amplicons PCR d'ADNr 16S purifiés est effectué dans les deux directions à l'aide d'un kit de séquençage de cycle BigDye™ Terminator v3.1 et d'amorces fD1 et rP2, comme décrit dans Slama *et al.* (2019). Les réactions de séquençage sont résolues en utilisant les installations ABI 3130 XL disponibles à l'iGE3 [Institut de génétique et de génomique de Genève, Centre médical de l'Université de Genève (CMU), Suisse]. Les séquences partielles sont générées par l'édition manuelle de fichiers de séquences brutes à l'aide de SeqMan™ (DNASTAR, Madison, WI, États-Unis). La séquence partielle est ensuite comparée à la base de données GenBank de NCBI (National Center of Biotechnology Information- USA (NCBI) pour identifier les espèces apparentées les plus proches. La position phylogénétique exacte des différents isolats BR5, OR15 et RB13 est également déterminée par une analyse phylogénétique des séquences des isolats avec leurs parents les plus proches extraits de GenBank. Brièvement, les séquences recueillies sont harmonisées à l'aide du programme d'alignement en ligne à séquences multiples MAFFT (Kato et Toh, 2008) et utilisées pour

générer des arbres phylogénétiques à partir de l'algorithme de la probabilité maximale (ML) (Felsenstein, 1981). MEGA v.6 (Tamura *et al.*, 2013) avec des distances évolutives calculées à l'aide du paramètre Kimura 2 (Kimura, 1980). La validité des branches dans les arbres résultants est évaluée par un rééchantillonnage bootstrap des ensembles de données avec 1000 répétitions.

## **C- Stimulation de la croissance des plantes *in vitro* et *in vivo* par les souches bactériennes sélectionnées**

Sur la base des résultats des performances de croissance bactérienne sous stress salin des dix isolats bactériens sélectionnés, trois bactéries sont en outre sélectionnées (BR5, OR15 et RB13) et considérées comme PGPR tolérantes au sel. Ces souches montrant des valeurs élevées de croissance, leurs effets bénéfiques sous stress salin sont évalués *in vitro* par germination de graines de blé et inoculation de plantules d'*Arabidopsis thaliana* en boîte de Pétri et *in vivo* par inoculation de plants de blé sur pots.

### **1- Tests *in vitro***

#### **1-1 Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance d'*Arabidopsis thaliana* en milieu salin.**

##### **1-1-1- Matériel végétal**

*Arabidopsis thaliana* est une plante de la famille des Brassicaceae (Crucifères) découverte au 16ème siècle par Johannes Thal. Elle est nommée aussi Arabette de Thalius. Elle est désignée comme organisme modèle en 1998. À l'heure actuelle *A. thaliana* est un organisme de référence, aussi bien, pour la recherche végétale que pour l'évolution, la génétique ou encore la recherche fondamentale. La séquence complète de son génome est désormais disponible ("*A. thaliana* genome" 2000; Initiative 2000). Le génome de 120 mégabases est organisé en cinq chromosomes et contient environ 20000 gènes.

##### **1-1-2- Inoculation d'*Arabidopsis thaliana* sur boîte de Pétri**

Les graines d'*A. thaliana* (écotype Col-0 /Rédei-L211-497) (graines LEHLE Round 203 Rock, TX 78680-2366 États-Unis) sont désinfectées en surface (2 mn dans l'éthanol à 70 %, 20 mn dans l'hypochlorite de sodium à 1 % et quatre lavages à l'eau distillée stérile) et placées sur des boîtes contenant le milieu Murashige–Skoog au ½ (milieu MS) (Annexe 12) additionné de 1,5 % de saccharose et 0,8 % d'agar (Cherif-Silini *et al.*, 2019). Les graines sont vernalisées pendant 3 jours à 4 °C, puis incubées dans une chambre de croissance (photopériode de 16 h de lumière/8 h d'obscurité et de 23±1 °C). Après 6 jours de croissance, les semis de taille similaire sont transférés sur un côté d'une boîte de Pétri (10 semis par

plaque) contenant de la gélose MS avec du NaCl 0, 50, 100 et 150 mM. Pour les traitements bactériens, 100 µL de suspensions de culture avec environ  $10^8$  à  $10^9$  UFC/ml ( $DO_{600} = 1$ ) sont appliqués sur le milieu MS à 4 cm sous les semis. Huit traitements sont appliqués (témoins, BR15, OR15, RB13, BR5+OR15, BR5+RB13, OR15+RB13 et BR5+OR15+RB13) à quatre concentrations de NaCl (0, 50, 100 et 150 mM). Les boîtes sont incubées pendant 14 jours ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16 h/8 h de lumière/obscurité).

### **1-1-3- Analyse des paramètres morpho- biochimiques d'*Arabidopsis thaliana***

#### **1-1-3-1- Paramètres morphologiques**

Après 14 jours, la croissance des plantules est évaluée en mesurant la surface totale des feuilles à l'aide d'un logiciel de photographie numérique et du traitement d'images (logiciel ImageJ 1.52v). Le poids frais des plantules et la longueur des racines sont également mesurés.

#### **1-1-3-2- Paramètres biochimiques**

Les teneurs en chlorophylle (chlorophylle a, b et totale (a+b)) sont mesurées. Les échantillons de feuilles fraîches (0,1 g) sont homogénéisés dans 1 mL d'acétone à 80 %, conservés à  $-20^\circ\text{C}$  pendant la nuit et centrifugés à 10000 rpm/10 mn. L'absorbance du surnageant est mesurée à 663 et 645 nm. La quantification est effectuée selon la procédure de Cherif-Silini *et al.* (2019).

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/g)} = (12.7A_{633} - 2.69A_{645}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/g)} = (22.9A_{645} - 4.68A_{633}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_{a+b} \text{ (mg/g)} = (20,21A_{645} + 8,02A_{663}) \times (V/1000 \times W)$$

V = le volume final du surnageant W = poids frais des feuilles

## **1-2 Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination des graines de blé en milieu salin.**

### **1-2-1- Matériel végétal**

Le cultivar de blé dur Waha (*Triticum durum* L.c.vWaha) fourni par l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C) de Sétif –Algérie est utilisé dans les expériences d'inoculation.

### **1-2-2- Inoculation des graines de blé dur Waha**

Les trois isolats sélectionnés BR5, OR15 et RB13 sont cultivés dans du bouillon TSB et incubés à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 2 jours. Les cultures sont centrifugées (12 000 rpm/mn) et rincées deux fois dans du PBS, puis ajustées à une densité de  $10^8$  UFC/mL. Les graines sont stérilisées en surface (5 mn dans de l'éthanol à 70 %, 30 mn dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % et 3 lavages subséquents dans de l'eau distillée stérile) (Cherif-Silini *et al.*, 2019). Trente graines sélectionnées sont incubées dans des suspensions bactériennes pendant 30 mn. Tel que décrit précédemment pour *A. thaliana*, huit traitements sont appliqués



(Témoin, BR15, OR15, RB13, BR5 + OR15, BR5 + RB13, OR15 + RB13 et BR5 + OR15 + RB13) sous deux concentrations de NaCl (0 et 150 mM). Les graines sont ensuite placées sur du papier Whatman N° 40 dans des boîtes de Petri de 9 cm contenant 10 ml d'eau distillée stérile ou une solution de NaCl à 150 mM. Les boîtes sont divisées en deux groupes (NaCl 0 et 150 mM) et huit sous-groupes selon le traitement bactérien en trois répétitions.

Les boîtes de Pétri sont incubées à l'obscurité à  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les graines germées sont dénombrées après 3, 6, 9 et 11 jours d'incubation. Lorsque la radicule mesure au moins 3 mm de longueur, les graines sont considérées germées. Quatre paramètres sont enregistrés dans cette expérience: le pourcentage de germination final (PGF), l'indice du taux de germination (ITG), l'indice de vigueur de la longueur du semis (IVLS) et l'indice de vigueur de poids des semis (IVPS). Le PGF est déterminé le 11<sup>em</sup> jour d'incubation, lorsqu'aucune autre graine n'est germée, à l'aide de l'équation :

- Pourcentage de germination final (PGF) = nombre de graines germées/nombre de graines totales  $\times 100$

- L'indice du taux de germination (ITG) =  $G3/3 + G6/6 + G9/9$

G3, G6 et G9 sont les pourcentages de germination  $\times 100$  à 3, 6 et 9 jours après le début de la germination.

- IVLS = Longueur des semis (cm)  $\times$  Germination (%)

- IVPS = Poids sec des semis (mg)  $\times$  Germination (%). Les paramètres IVLS et IVPS sont calculés selon la formule suggérée par Abdul-Baki et Anderson (1973).

## **2- Test *in vivo***

### **2-1- Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpho- biochimiques du blé dur en milieu salin.**

#### **2-1-1- Inoculation bactérienne de blé dur Waha**

Des expériences en pots sont menées selon un plan de blocs entièrement randomisé afin d'évaluer le potentiel des trois bactéries PGPR tolérantes au sel pour atténuer le stress salin chez le blé dur Waha (*Triticum durum*). Trois sols (S1, S2 et S3) présentant des caractéristiques physicochimiques différentes sont utilisés pour la croissance du blé (**Tab.4**). Les cultures des trois isolats sélectionnés et la stérilisation des graines de blé sont appliquées comme décrit ci-dessus. L'inoculation est effectuée après immersion des graines pendant 24 heures dans les suspensions bactériennes (BR15, OR15, RB13, BR5 + OR15, BR5 + RB13, OR15 + RB13 et BR5 + OR15 + RB13). Les graines non inoculées (témoins) sont immergées dans de l'eau distillée stérile. Les graines traitées sont semées à raison de dix graines par pot

(chacun contient environ 1 kg de sol) à une profondeur de 1 cm de la surface. Les expériences sont conçues avec trois groupes représentant le type de sol (S1, S2, S3) et huit traitements indiquant le type d'inoculum (témoin, + BR15, + OR15, + RB13, + BR5-OR15, + BR5-OR15, + BR5-RB13, + OR15-RB13) avec trois répétitions (72 pots au total). L'expérience est réalisée dans une chambre de croissance avec des températures moyennes jour/nuite de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  et  $16 \pm 2^\circ\text{C}$ , respectivement, et une photopériode de 16 h d'éclairage. L'humidité du sol est ajustée et maintenue constante pendant l'expérience en arrosant avec de l'eau. Après 45 jours de croissance, les plantes sont récoltées et lavées à l'eau. Les racines et les feuilles sont séparées. Les poids frais, les poids secs (après 72 h à  $65^\circ\text{C}$ ) et la longueur des racines et des feuilles sont déterminés.

**Tab. 4: Caractéristiques physico-chimiques des trois sols (S1, S2 et S3).**

	Location Site	EC (mS/cm)	pH
<b>Soil 1 (S1)</b>	Setif (fertile soil) ( $36.195889^\circ\text{ N}$ , $5.364722^\circ\text{ E}$ )	$0.48 \pm 0.034$	$8.075 \pm 0.055$
<b>Soil 2 (S2)</b>	Bazer Sakhra Sebkha (periphery of the sebkha) ( $36.071722^\circ\text{ N}$ , $5.675417^\circ\text{ E}$ )	$3.81 \pm 0.16$	$7.735 \pm 0.064$
<b>Soil 3 (S3)</b>	Bazer Sakhra Sebkha (Mechtat Zaabib:away from Sebkha)( $36.073579^\circ\text{ N}$ , $5.667538^\circ\text{ E}$ )	$2.8 \pm 0.045$	$7.885 \pm 0.015$

## 2-1-2- Dosage de la chlorophylle et des marqueurs biochimiques

### 2-1-2-1- Dosage des pigments photosynthétiques

Les pigments chlorophylliens (chlorophylle a, b, total (a + b) et caroténoïdes) sont évalués selon les procédures décrites ci-dessus. L'absorbance des extraits est mesurée à 663, 645 et 470 nm. La quantification est effectuée comme suit :

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/g)} = (12.7A_{633} - 2.69A_{645}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/g)} = (22.9A_{645} - 4.68A_{633}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_{a+b} \text{ (mg/g)} = (20,21A_{645} + 8,02A_{663}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Caroténoïdes (mg/g)} = ((1000A_{470} - 1,9\text{Chl}_a - 63,14\text{Chl}_b)/214) \times (V/1000 \times W)$$

V = volume final du surnageant; W = poids frais des feuilles.

### 2-1-2-2 Teneur totale en sucres solubles

Le matériel végétal (0,1 g) est extrait dans 3 mL d'éthanol à 80 % incubé à la température ambiante pendant 48 h, puis bouilli à  $80^\circ\text{C}$  jusqu'à évaporation. L'extrait est dilué par l'ajout de 20 mL d'eau distillée. Après centrifugation, les sucres solubles totaux du surnageant (2 mL) sont déterminés par la méthode de Dubois (Dubois *et al.*, 1956).

### **2-1-2-3 Estimation du contenu de Proline**

L'extraction de la proline à partir des feuilles et des racines est déterminée selon la méthode décrite par Carrillo *et al.* (2008). Les échantillons (50 mg) sont homogénéisés dans un mélange de 1 ml d'éthanol: eau (40:60 v/v) et conservés à 4 °C pendant la nuit, puis centrifugés à 14 000 rpm/5 mn. 500 µL de l'extrait sont ajoutés à 2 mL du mélange réactionnel (1 % de ninhydrine (p/v) dans l'acide acétique 60 %) et chauffé à 95 °C pendant 20 mn et centrifugé à 10 000 rpm/1 mn. L'absorbance est enregistrée à 520 nm et la concentration de proline est mesurée par comparaison à une courbe standard (Cherif-Silini *et al.*, 2019).

### **2-1-2-4 Teneur en protéines**

Les échantillons de racines et de feuilles congelés (0,25 g) sont broyés en poudre fine dans un mortier sous azote liquide, puis homogénéisés avec 5 mL de tampon phosphate (100 mM pH 7,5) contenant 1 mM d'EDTA et 0,01 % de Triton X-100. L'homogéinat est centrifugé à 15 000 rpm/15 mn à 4 °C pour produire un extrait enzymatique brut. La teneur en protéines solubles (mg/g) est estimée selon la technique de Lowry *et al.* (1951) en utilisant l'albumine sérique bovine comme étalon protéique.

### **2-1-2-5 Peroxydation lipidique**

La peroxydation lipidique est mesurée en quantifiant la production de malondialdéhyde (MDA) par réaction à l'acide thiobarbiturique. Le matériel végétal frais (0,2 g) (racines et feuilles) est homogénéisé à l'aide de 2 mL de TCA (0,1 % v/v). Après centrifugation à 10 000 rpm/ 15 mn à 4 °C, le surnageant est ajouté à 4 mL de TCA (20 %) mélangé au TBA (acide 2-thiobarbiturique, 0,5 %). Le mélange est ensuite incubé à 96 °C pendant 30 mn, puis transféré dans un bain de glace pour arrêter la réaction. Les tubes sont centrifugés à 10 000 rpm/15 mn, et l'absorbance du surnageant obtenu est mesurée à 532 nm. La concentration de MDA est calculée à l'aide du coefficient d'extinction de 155 mmol/L<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La concentration de la MDA est exprimée en µmolg<sup>-1</sup>PF (poids frais) (Rekik *et al.*, 2017).

### **2-1-3- Essais enzymatiques antioxydants**

#### **2-1-3-1- Activité du gaïacol peroxydase**

L'activité de l'enzyme gaïacol peroxydase (GPX) est réalisée en ajoutant 0,1 mL de l'extrait enzymatique à 3 mL du mélange réactionnel contenant du tampon phosphate (100 mM, pH 6,5), 15 mM de gaïacol et 0,05 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'évolution cinétique de l'absorbance à 470 nm est mesurée pendant 1 mn. L'activité GPX est calculée à l'aide du coefficient d'extinction (26,6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> à 470 nm). L'activité enzymatique (U/mn/mg de protéine) est calculée comme l'augmentation de l'absorbance (Rekik *et al.*, 2017).

### **2-1-3-2- Activité de l'ascorbate peroxydase**

L'ascorbate peroxydase (APX) est estimée en observant la diminution de l'absorbance due à l'acide ascorbique à 290 nm. Le mélange réactionnel (3 mL) contient le tampon phosphate (50 mM, pH 7), 0,25 mM d'acide ascorbique, 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 0,1 mL d'extrait enzymatique. La réaction commence par l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'oxydation de l'ascorbate est déterminée par une diminution de l'absorbance à 290 nm (coefficient d'extinction= 2,8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Une unité d'activité de l'APX (μmoles/mn/mg de protéines) est définie comme la quantité d'enzyme qui oxyde 1 μmol mn<sup>-1</sup> d'ascorbate (Rekik *et al.*, 2017).

### **2-1-3-3 Dosage de l'enzyme catalase**

Pour l'analyse de la catalase, 0,1 mL d'extrait est ajouté à un mélange réactionnel de 2 mL de tampon de phosphate (50 mM, pH 7), 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après addition de l'extrait, la diminution de l'absorbance est enregistrée à 240 nm (coefficient d'extinction de 0,036 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) à intervalles de 30 s pendant 2 mn. L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en U/mn/mg de protéines (Aebi, 1984).

### **2-1-3-4 Essai enzymatique du superoxyde dismutase**

Le mélange réactionnel (3 mL) contenant 13 mM de méthionine, 75 μM de chlorure de tétrazolium nitro-bleu (NBT), 0,1 mM d'EDTA, 50 mM de tampon phosphate (pH 7,5), 50 mM de carbonate sodique, 2 mM de riboflavine et 0,1 mL d'extrait d'enzyme sont placés sous lumière fluorescente pendant 15 mn. Un mélange réactionnel sans enzyme, ayant donné la couleur maximale, a servi de contrôle. La photo-réduction du NBT par la superoxyde est arrêtée en plaçant les tubes à l'obscurité. L'absorbance est enregistrée à 560 nm et l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) exprimée en U/mg de protéines est calculée comme une proportion entre l'absorbance observée en présence ou en absence de cette enzyme (Rekik *et al.*, 2017).

## **D- Analyses statistiques**

Les expériences sont effectuées en trois répétitions et les résultats sont exprimés en moyennes ± SD. L'analyse de la variance (ANOVA) unifactoriel et (ANOVA) multifactorielle sont utilisés pour trouver l'effet de différentes souches microbiennes dans différentes conditions de croissance par rapport à l'échantillon témoin. Le niveau de signification utilisé pour tous les tests statistiques est de 5 % (p <0,05) et le test de comparaison multiple de Tukey est utilisé lorsque des différences significatives sont identifiées dans chaque groupe. Différentes lettres sont incluses dans le haut de chaque colonne pour indiquer les différences entre les différents groupes. Toutes les statistiques sont effectuées à l'aide de GraphpadPrism 8.

## Résultats

### A-Isolement des bactéries des sols salins et caractérisation de leurs activités PGP

#### 1- Caractéristiques physico-chimiques des sites de prélèvement

Les mesures du Ce et du pH des sols sont mentionnées dans le **Tableau 5**. Comme les résultats l'indiquent, les sols présentent des valeurs de Ce élevées variant de 22,95 à 30,34 mS/cm justifiant d'un niveau de salinité élevée caractéristique des chotts et des pH légèrement alcalins.

**Tab. 5: Caractérisation physico-chimique des sites de prélèvement.**

Bacteria Sampling Site	Site	Halophytes	Electrical Conductivity (mS/cm)	pH
Bazer Sakhra Sebkh	Bazer Sakhra Chott (36.0505803° N, 5.6805708° E)	<i>Suaeda mollis</i>	30.34 ± 0.525	8.055 ± 0.015
Oum El Bouaghi Sebkh	Tinsilt Chott (35.8852354° N, 6.4414962° E)	<i>Suaeda mollis</i>	22.95 ± 0.145	7.99 ± 0.14
Baniou Sebkh	El Hodna Chott (35.479223° N, 4.366587° E)	<i>Salsola tetrandra</i>	25.56 ± 0.465	7.995 ± 0.014

#### 2- Isolement des bactéries

Un total de 98 souches différentes par la morphologie des colonies sont isolées à partir d'halophytes racinaires où elles prospèrent en tant qu'endophytes, dans le sol de la rhizosphère ainsi que dans le sol salé entourant les halophytes, dans trois sites affectés par le sel dans l'Est de l'Algérie (**Figs. 14, 16, 18, 19**). Les résultats ont montré que 27,55 % des isolats proviennent du sol salé, 44,89 % du sol de la rhizosphère et 27,55 % sont des endophytes racinaires. 21, 34 et 43 souches bactériennes sont isolées du Chott BazerSakhra (21,42 %), du Chott Tinsilt (34,69 %) et du Chott El Hodna (43,87 %), respectivement (**Fig. 20**).

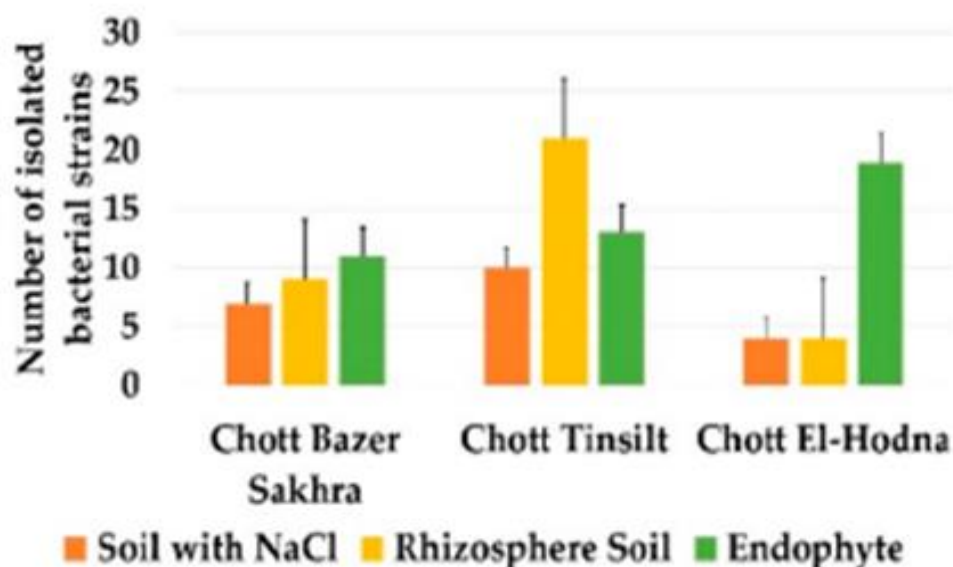


Fig. 20: Nombre de souches bactériennes isolées de différents compartiments du sol des trois sites de prélèvement.

### 3- Activités PGP des isolats

Les résultats des activités PGP des différentes souches sont présentés sur la figure 21. La solubilisation du phosphate est détectée dans 26 isolats (26,53 %). Les sidérophores sont produits par 47 isolats (47,95 %). Toutes les souches ont produit de l'AIA à des taux variables. La majorité des souches fixent de l'azote (73,46 %) et produisent de l'ammoniac (67,34 %). En revanche, seuls 24 isolats (24,48 %) ont produit de l'HCN. Les souches bactériennes sont également examinées pour leur potentiel enzymatique. La majorité (92,85 %) produit une amylase, un grand nombre de souches (61,22 %) a un potentiel chitinolytique, mais moins de la moitié des isolats produisent une protéase (36,73 %) et une cellulase (41,83 %) (Fig. 21).

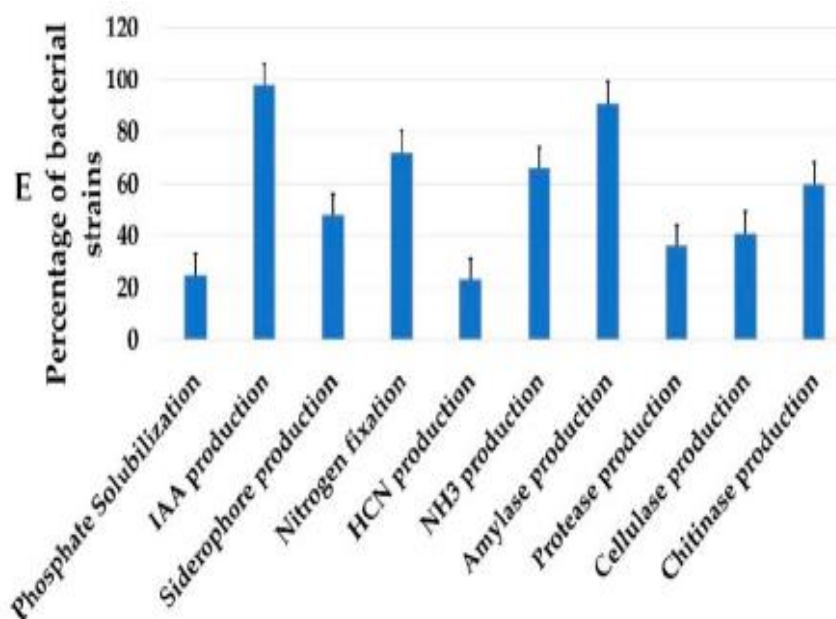


Fig. 21: Pourcentage des activités PGP des souches bactériennes.

### 3-1- Activités PGP selon le site

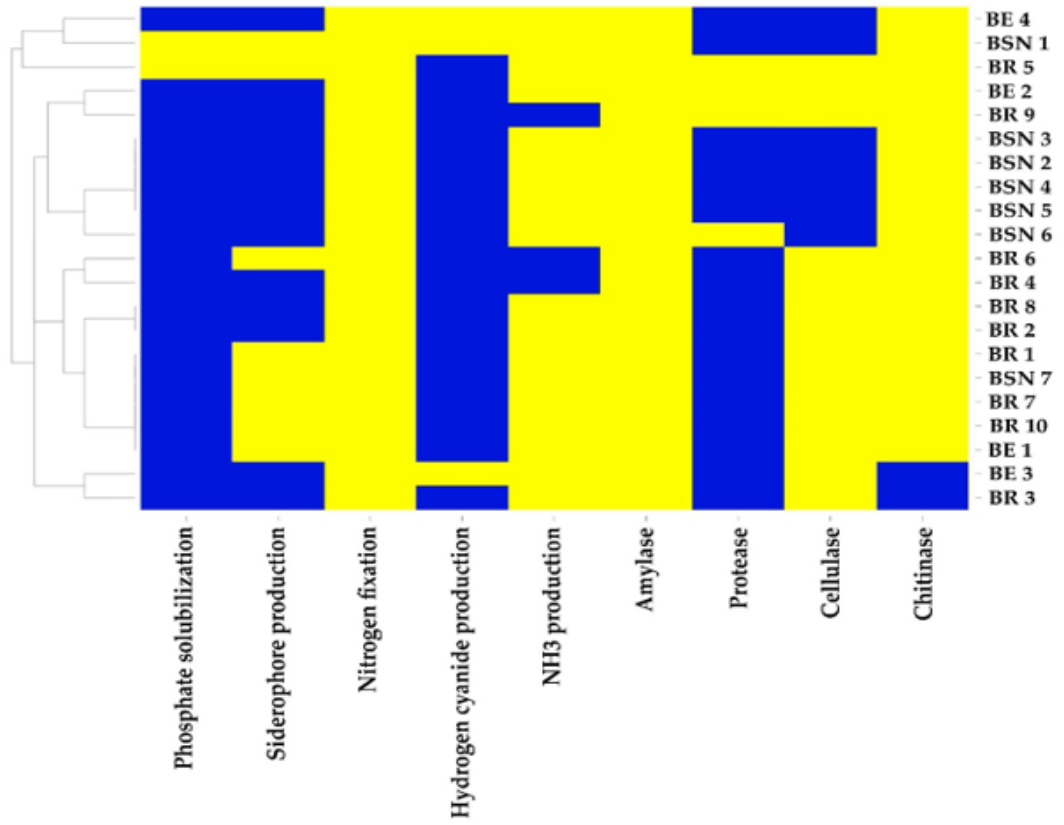
98 souches bactériennes sont isolées de trois sites différents (Sebkha de Bazer Sakhra, Oum El Bouaghi et Baniou) et testées pour plusieurs et différentes activités PGP.

Parmi les 21 souches isolées de la Sebkha de Bazer Sakhra, la totalité sont fixatrices d'azote (100%). L'activité enzymatique des souches est importante pour l'amylase (100%), la chitinase (90,47%) et la cellulase (66,66%). Toutefois l'activité protéolytique est très faible (4,76%). La production de NH<sub>3</sub> (80,95%) est une capacité très commune chez ces bactéries contrairement à la production d'HCN (14,89%). 38,09 % des souches produisent des sidérophores mais seules 9,52% solubilisent les phosphates (**Fig. 22 A**).

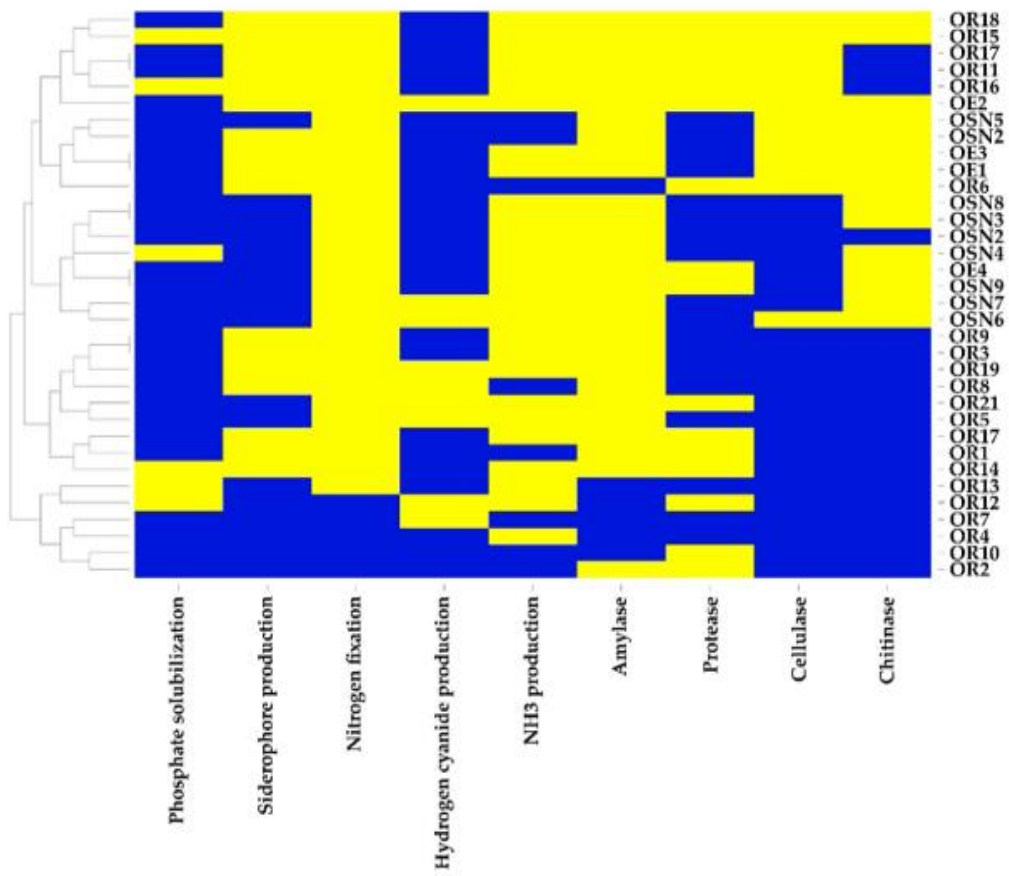
Les bactéries isolées du Chott de Oum El Bouaghi (n=34) montrent des taux appréciables dans la fixation d'azote (85,29%), la production d'amylase (82,35%), de NH<sub>3</sub> (61,90), de protéase (55,88%) et de chitinase (44,11%). L'activité cellulolytique semble faible par rapport au site précédent 35,29% des souches produisent la cellulase. La production de sidérophores et d'HCN existent chez 36,17% et 26,47% des souches respectivement. Cependant, seuls 14,70% sont capables de solubiliser les phosphates (**Fig. 22 B**).

Parmi les 43 souches isolées de Baniou 97,67% sont positives pour la production d'amylase, 65,11% pour la fixation d'azote, 62,79% pour la production de protéase, 53,48% pour la production de NH<sub>3</sub>, 48,93% pour la production des sidérophores, 44,18% pour la solubilisation des phosphates et 34,88% pour la cellulase. Le taux le plus faible est observé dans la production d'HCN (27,90%) (**Fig. 22 C, 23**).

A



B





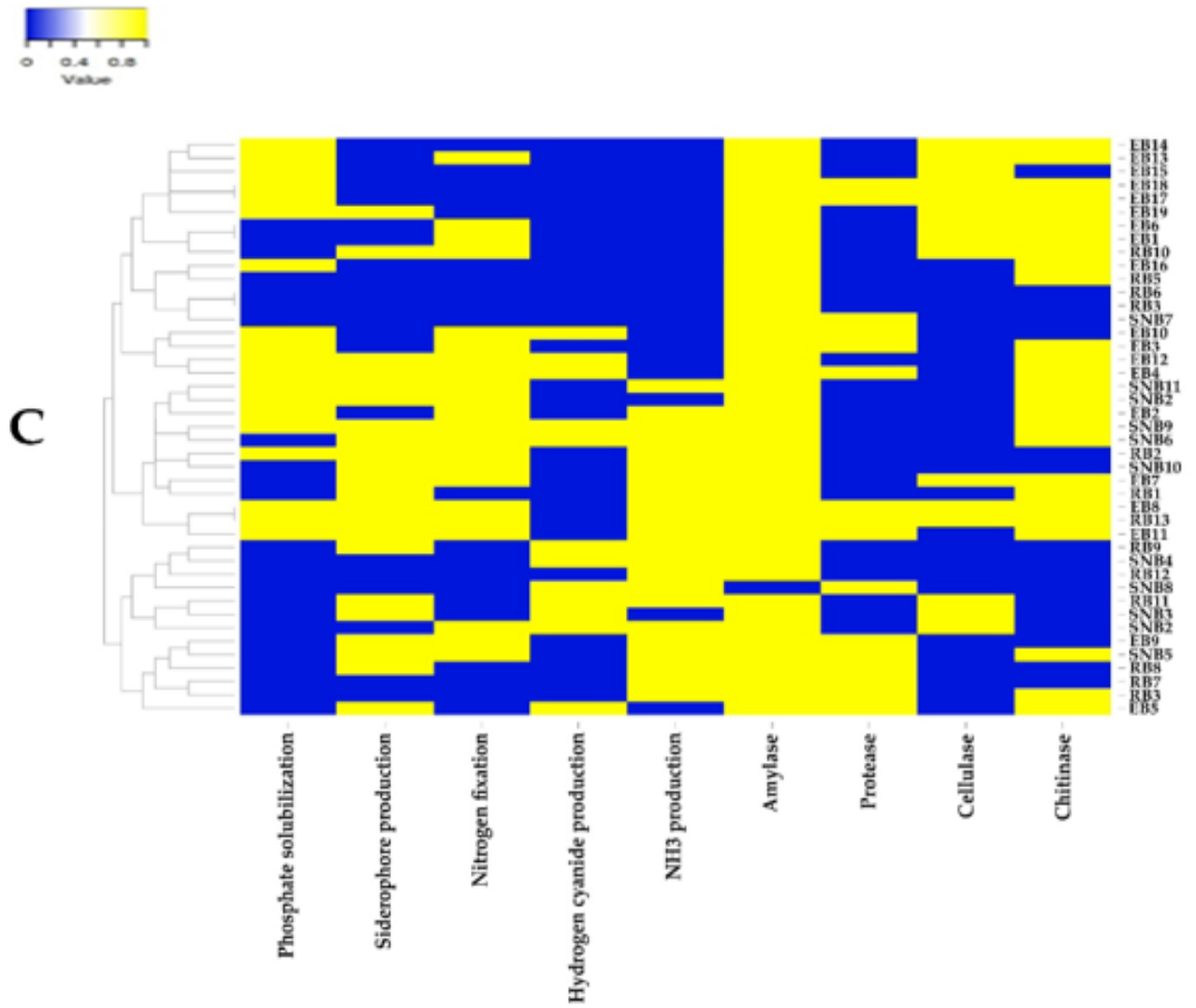


Fig. 22: Activités PGP des différentes bactéries de A) Sebkhya de Bazer Sakhra, de B) Oum El Bouaghi et de C) Baniou.

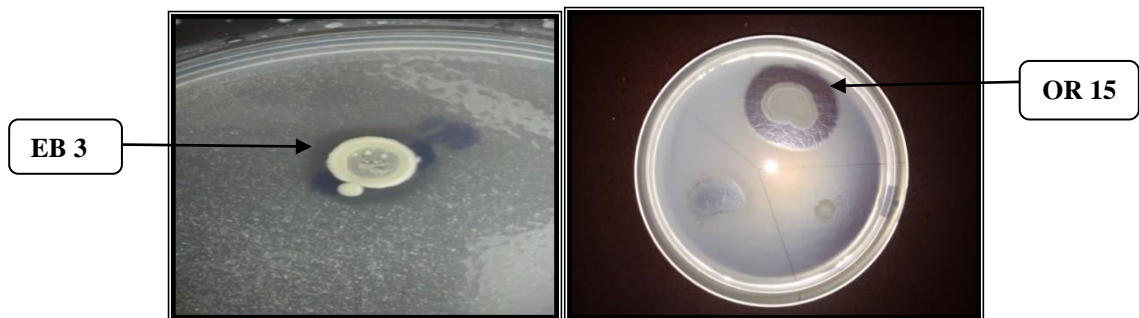
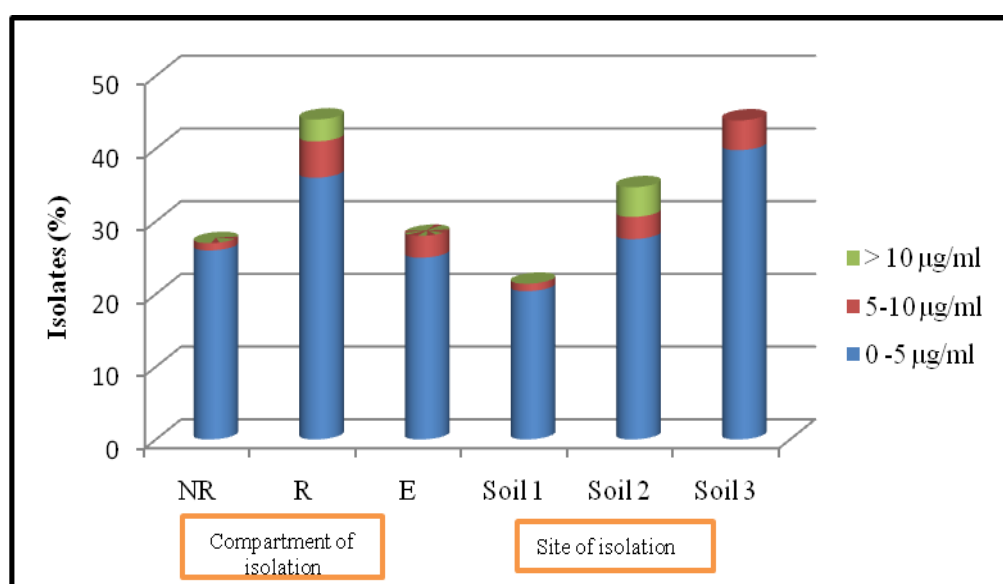


Fig. 23: Halo de solubilisation du phosphate (à gauche). Activité protéolytique d'une souche bactérienne (à droite).

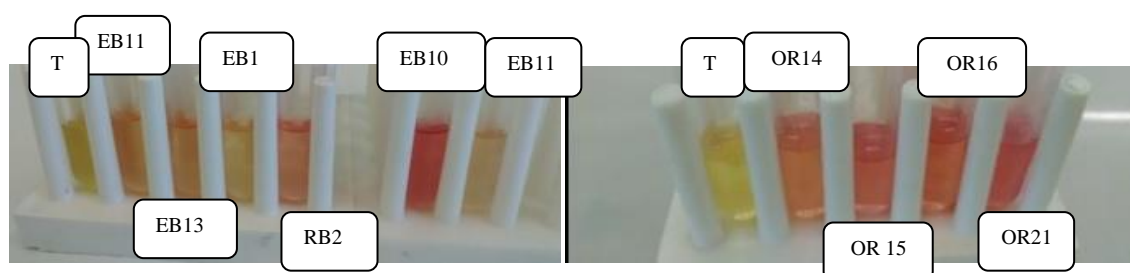
#### 4- Production d'AIA

La production d'AIA est estimée par le développement de la couleur rose après 3 jours d'incubation à 28 °C dans un bouillon Luria Bertani (LB) contenant du L-tryptophane. La production d'AIA existe chez toutes les souches avec des valeurs variant de 2,25µg/ml à 13,83µg/ml. La production la plus élevée est observée chez les isolats rhizosphériques d'Oum El Bouaghi OR16 (12,67 µg/ml), OR15 (13,83 µg/ml), ainsi que les souches de Baniou RB13 (6,935 µg/ml), RB2 (8,032 µg/ml), et la souche endophyte BE2 de Bazer (8,67 µg/ml) (**Fig. 24, 25, Annexe 13**).

Parmi les souches capables de produire des quantités d'AIA de 0-5 µg/ml, 26% et 36% et 25% sont des bactéries non rhizosphériques, rhizosphériques et endophytes respectivement. Toutefois, seulement 1% des isolats non rhizosphériques, rhizosphériques (5%) et 3% des endophytes synthétisent une quantité d'AIA entre 5-10 µg/ml. Seulement 3% des souches rhizosphériques sont capable de produire des taux > 10 µg/ml d'AIA (**Fig. 24**).



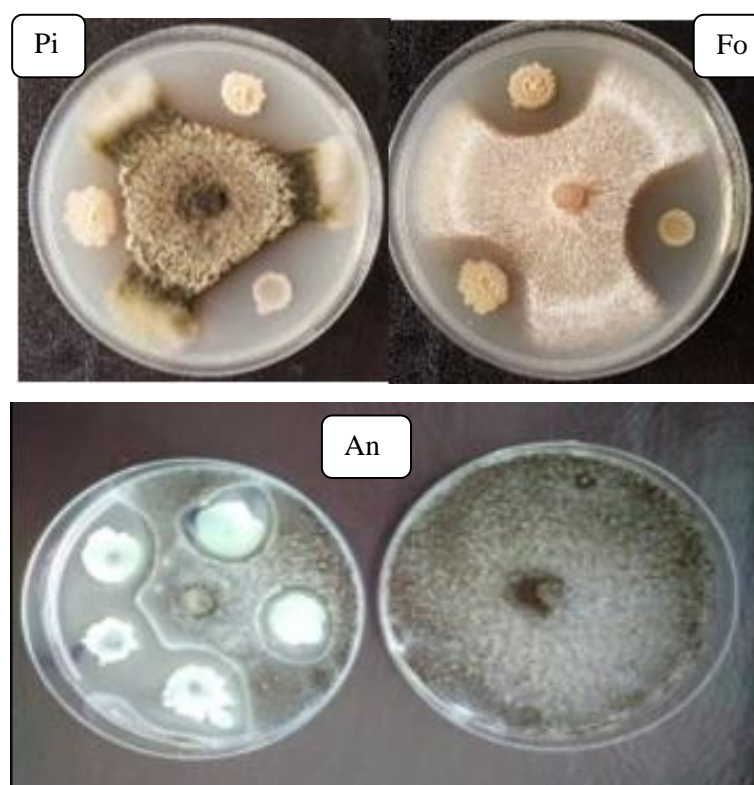
**Fig. 24: Taux des bactéries productrices d'AIA en fonction du compartiment et du site d'isolement.** NR: non rhizosphérique; R: rhizosphérique; E: endophyte.



**Fig. 25: Production d'AIA par différentes souches bactériennes (Témoin à gauche).**

### 5- Activité antifongique

Dans la présente étude, 40 isolats efficaces dans la production de sidérophores et d'enzymes sont testés pour l'activité antifongique. Toutes les souches testées contre des champignons phytopathogènes ont réussi à inhiber au moins une ou plusieurs souches fongiques (**Fig. 26, Tab. 6**). Dans l'ensemble, 55 % des isolats bactériens sont actifs sur l'ensemble des souches fongiques. Le champignon le plus sensible aux métabolites bactériens est l'*Aspergillus niger*, où 97,5 % des bactéries sont capable d'inhiber sa croissance à un taux pouvant atteindre 72,5 % (souche OE1). Plus de la moitié des souches (55%) sont actives vers les autres champignons, les souches les plus actives sont celles de la Sebkhha de Bazer Sakhra et Oum el Bouaghi. De plus, les taux d'inhibition ont atteint 73,5 % contre *Phytophthora infestans* (souche OR14) et 76 % contre *Botrytis cinerea* (souche BSN7). Cependant, l'activité des souches contre *Fusarium oxysporum* est plus faible et le meilleur taux d'inhibition est de 44% (BR6).



**Fig. 26: Activité antifongique des souches bactériennes envers les champignons phytopathogènes.** *Phytophthora infestans* (Pi), *Fusarium oxysporum* (Fo), *Aspergillus niger* (An).

**Tab. 6: Taux d'activité antifongique des bactéries envers les champignons phytopathogènes.**

Bacterial strains	Percentage of Inhibition			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BSN1	47±1.0	46±1.0	42.5±2.5	53.5±1.5
BSN7	45±0.0	59±1.0	43.5±1.5	76±1.0
BR1	55±0.0	71±1.0	40±0.0	61.5±1.5
BR5	61±1.0	72.5±2.5	36±1.0	61.5±1.5
BR6	61.5±1.5	62.5±2.5	44±1.0	63.5±1.5
BR7	54±1.0	66±1.0	33.5±1.5	56.5±1.5
BR10	53.5±1.5	60±0.0	33±1.5	56±1.0
BE1	ND	62.5±2.5	29±1.0	ND
OSN2	53.5±1.5	61.5±1.5	25±0.0	61±1.0
OR1	62.5±2.5	45±0.0	22.5±0.5	51±1.0
OR6	33.5±1.5	55±0.0	20±0.0	50±0.0
OR11	61±1.0	53.5±1.5	41±1.0	52.5±2.5
OR14	60±0.0	73.5±1.5	31±1.0	60±0.0
OR15	61±1.0	71±1.0	29±1.0	45±0.0
OR16	43.5±1.5	ND	26±1.0	43.5±1.5
OR17	51±1.0	61±1.0	31±1.0	60±0.0
OR18	61±1.0	ND	ND	ND
OR19	53.5±1.5	61±1.0	41±1.0	66±1.0
OE1	72.5±2.5	66±1.0	21±1.0	60±0.0
OE2	70±0.0	66±1.0	26±1.0	53.5±1.5
OE3	60±0.0	53.5±1.5	21±1.0	51±1.0
SNB2	31±1.0	ND	ND	ND
SNB3	61±1.0	ND	ND	ND
SNB5	41±1.0	ND	ND	ND
SNB6	35±0.0	ND	ND	ND
SNB9	45±0.0	ND	ND	ND
SNB11	41±1.0	ND	ND	ND
RB1	26.5±1.5	ND	ND	ND
RB8	31±1.0	ND	ND	ND
RB10	59±1.0	56±1.0	42.5±2.5	56±1.0
RB11	49±1.0	46.5±1.5	31±1.0	45±1.0
RB13	56±0.0	46.5±1.5	25.5±0.5	45±1.0
EB4	61±1.0	ND	ND	ND
EB5	48±1.0	ND	ND	ND
EB6	66±1.0	ND	ND	ND
EB8	60±0.0	ND	ND	ND
EB9	62.5±2.5	ND	ND	ND
EB11	56±1.0	ND	ND	ND
EB12	56±1.0	ND	ND	ND
EB19	45±0.0	ND	ND	ND

**ND: non détecté**

## B- Sélection de PGPR tolérantes pour la promotion de la croissance des plantes *in vivo*

### 1- Effets des paramètres de stress sur la croissance des PGPR

#### 1-1- Effet du NaCl sur la croissance des PGPR

Pour sélectionner les isolats tolérants à la salinité *in vitro*, on a effectué un dépistage dans des milieux de culture contenant différentes concentrations de NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 mM). L'effet de la salinité a réduit considérablement la croissance bactérienne des 10 souches (**Fig. 27**). En absence de NaCl, la croissance est optimale. Une diminution continue et significative de la densité bactérienne, inversement proportionnelle à l'augmentation des concentrations de NaCl est observée. Cependant, la majorité des souches se développent sensiblement à 600 mM.

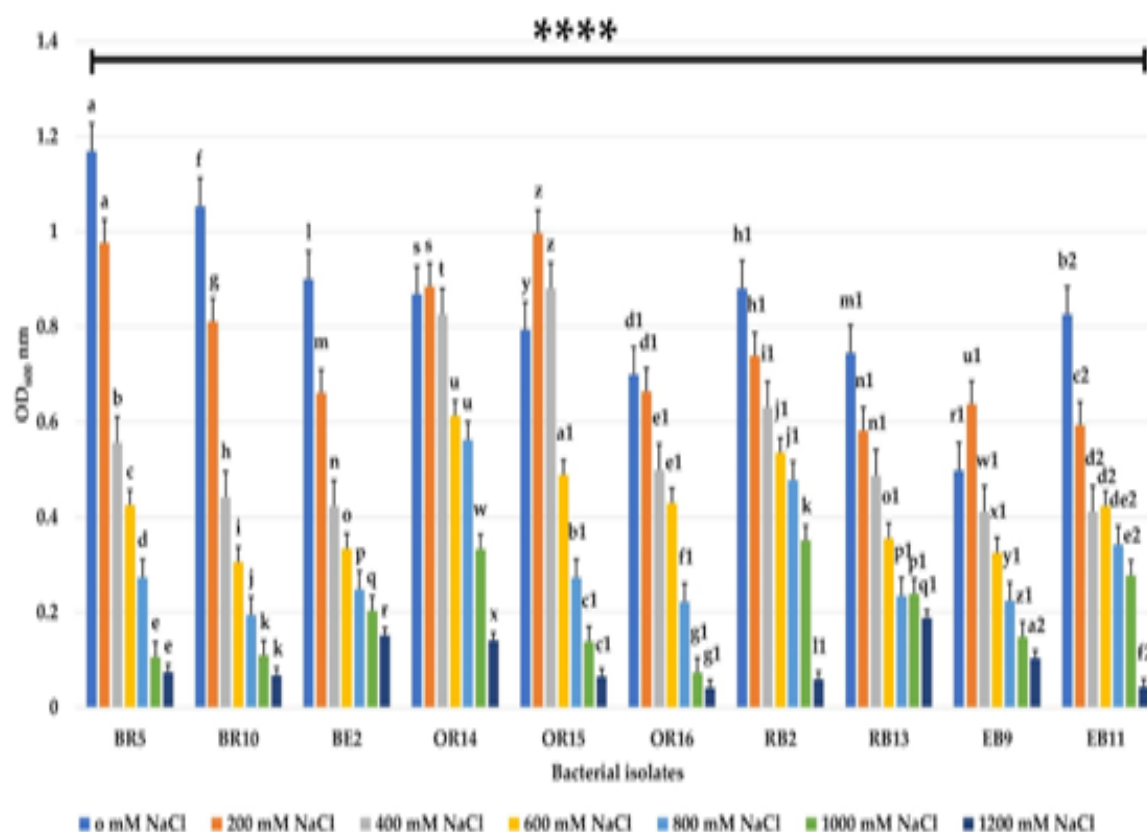


Fig. 27: Optimum de croissance des PGPR sous stress salin.

#### 1-2- Effet du pH sur la croissance des PGPR

Pour évaluer la tolérance des isolats au pH, différentes valeurs de pH (4, 7, 9 et 11) sont utilisées. Toutes les souches ont la capacité de croître à différents pH. Toutes les souches sont neutrophiles et ont une croissance optimale à pH 7. L'alcalinité et l'acidité du milieu ont

affecté négativement leur croissance. Cependant, certaines souches (BR5, OR14 et OR15) ont pu se développer remarquablement à pH 9. De plus, la majorité des souches tolèrent les milieux acides. D'autre part, une seule bactérie (BR5) tolère l'alcalinité et pousse à pH 11 (Fig. 28).

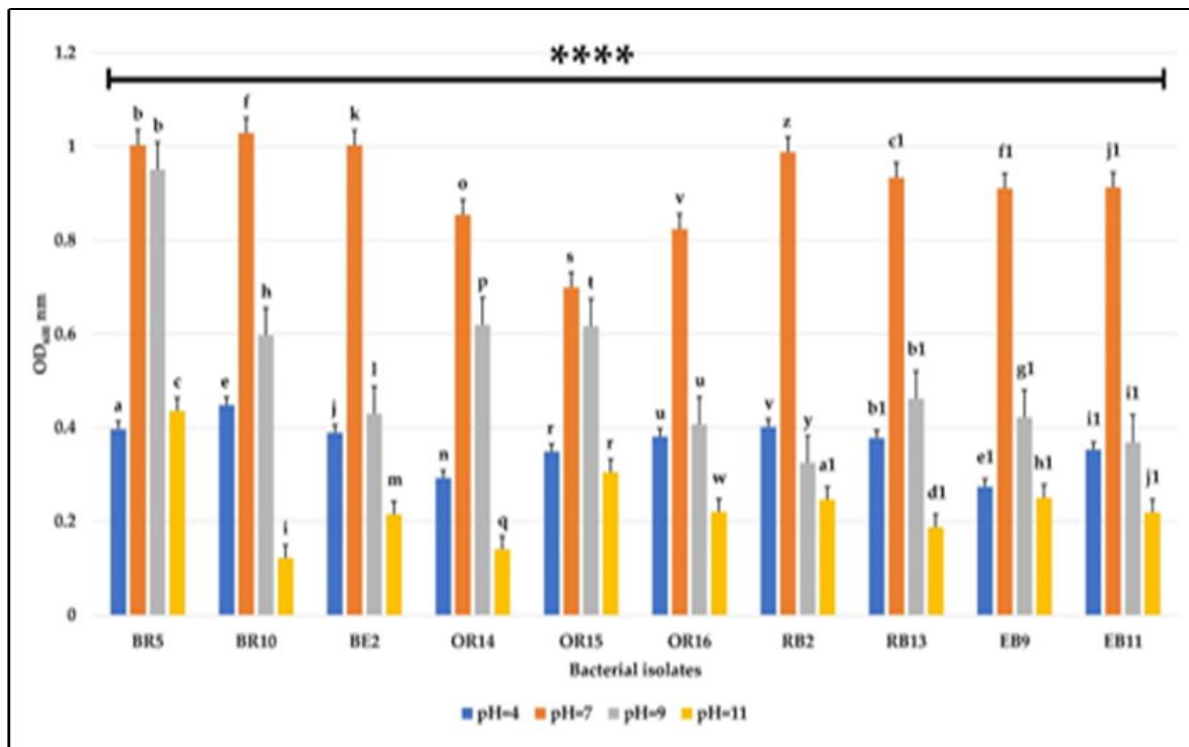


Fig. 28: Optimum de croissance des PGPR sous différents pH.

### 1-3- Effet de la température sur la croissance des PGPR

Différentes températures (4, 30, 37, 40 et 44 °C) sont utilisées pour tester la tolérance des isolats. Étant donné leur origine, toutes les souches sont mésophiles, la température de croissance optimale se situe entre 30 et 37°C. Certaines peuvent également être thermotolérantes (OR14 et OR15) et se développent à 40 °C (Fig. 29).

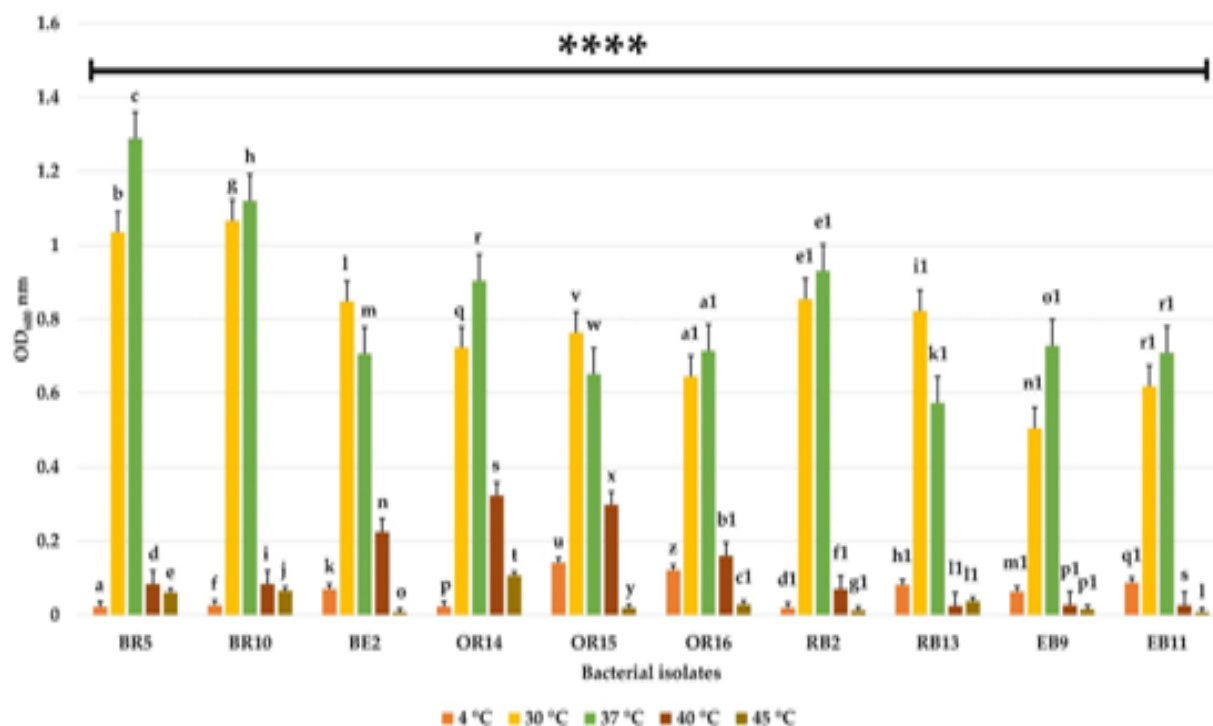


Fig. 29: Optimum de croissance des PGPR sous différentes températures.

#### 1-4- Effet du PEG<sub>8000</sub> sur la croissance des PGPR

L'effet osmotique généré par l'augmentation des concentrations de PEG<sub>8000</sub> dans le milieu affecte la croissance des souches bactériennes négativement. La majorité de ces souches sont osmotolérantes à des concentrations variant de 10 à 20 %. Seules deux souches isolées de sebkhia de Bazer Sakhra (BR5 et BR10) ont pu croître à des concentrations de 40 % (Fig. 30).

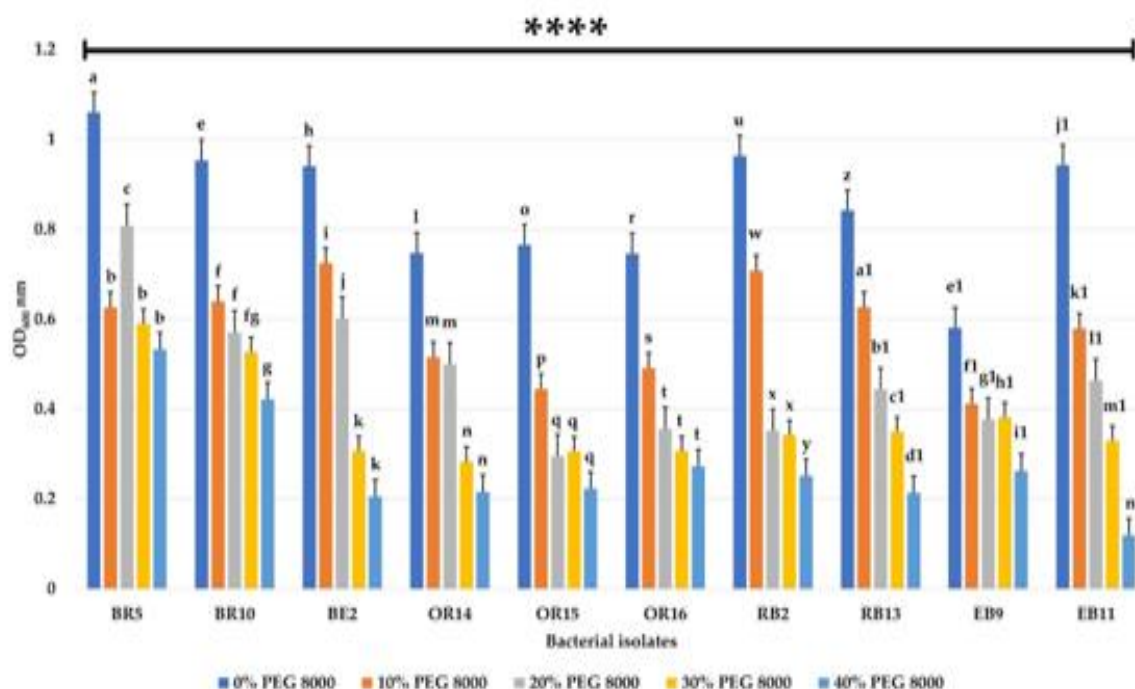


Fig. 30: Optimum de croissance des PGPR sous différentes concentrations de PEG<sub>8000</sub>.

## 2- Identification moléculaire

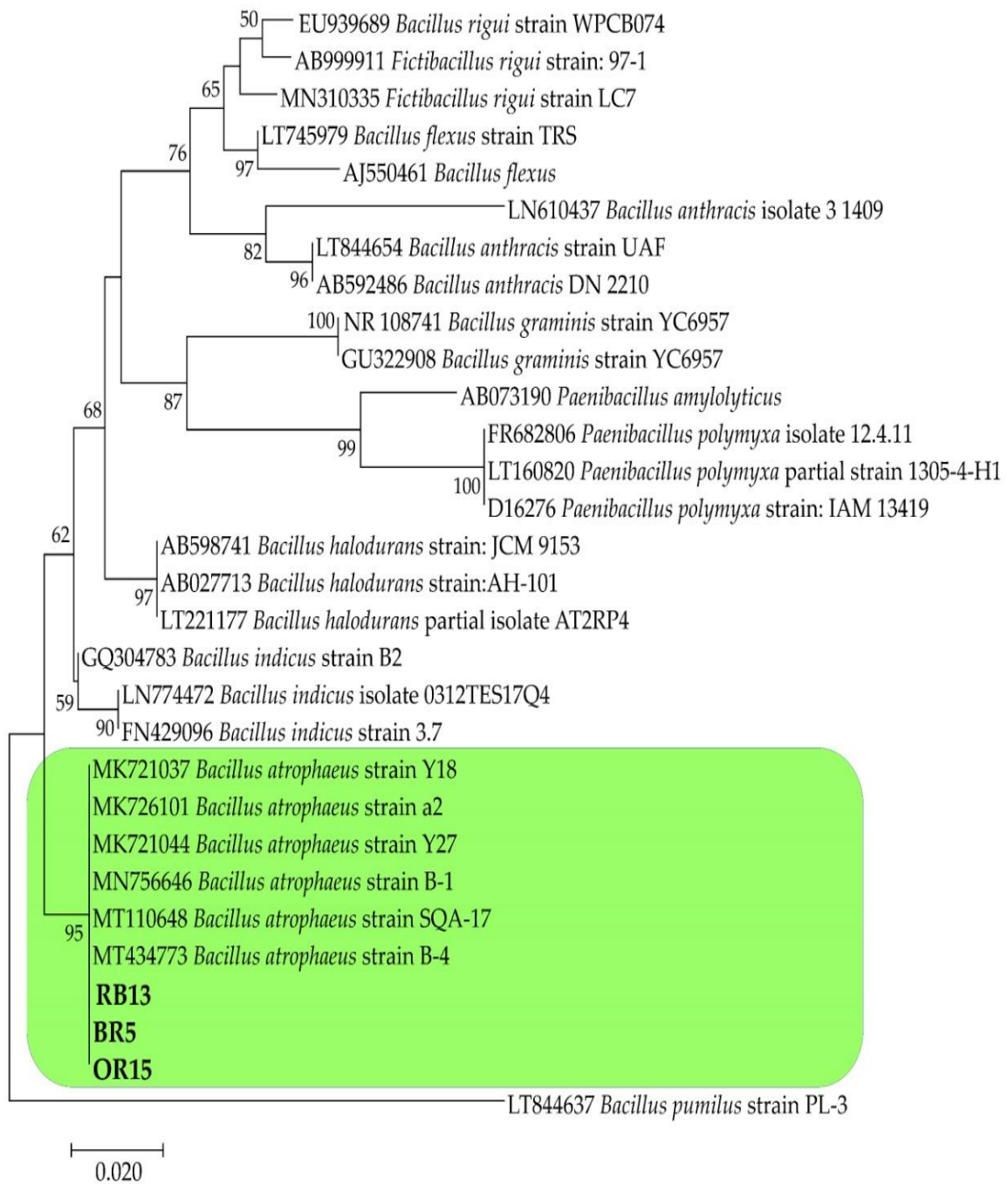
L'analyse de la séquence de l'ADNr16S des bactéries sélectionnées a révélé que les isolats RB13, BR5 et OR15 appartiennent à *Bacillus atrophaeus* (Fig. 31).



Fig. 31: Colonies bactériennes de la souche BR5.

L'arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S des souches BR5, OR15 et RB13 avec les séquences de souches proches permet de confirmer leur appartenance à *Bacillus atrophaeus* (Fig. 32). Leurs séquences sont soumises dans GenBank, avec une similarité de 95% avec l'espèce *Bacillus atrophaeus* et les numéros d'accès de RB13, BR5 et OR15 sont MT644481, MT644479 et MT644480 respectivement. La souche *Bacillus pumilus* Pl-3 est utilisée comme sous-groupe.





**Fig. 32: Arbre phylogénétique basé sur une comparaison de la séquence de l'ADNr 16S des souches bactériennes et de certaines souches phylogénétiquement proches. Les nombres sur l'arbre indiquent les pourcentages des dérivés de 1000 répliques.**

## C- Stimulation de la croissance des plantes *in vitro* et *in vivo* par les souches bactériennes sélectionnées

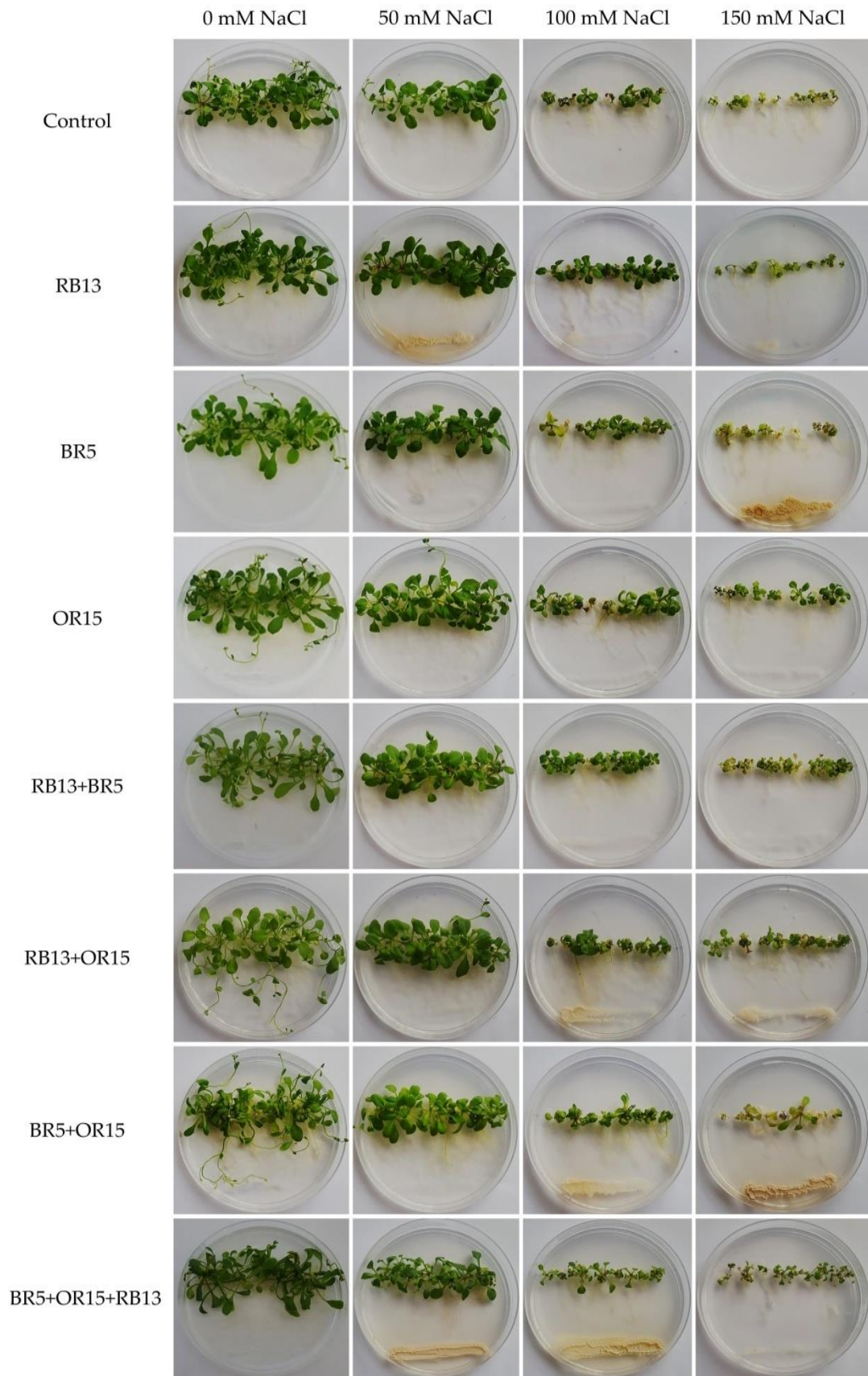
### 1- Tests *in vitro*

#### 1-1- Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance d'*Arabidopsis thaliana* en milieu salin.

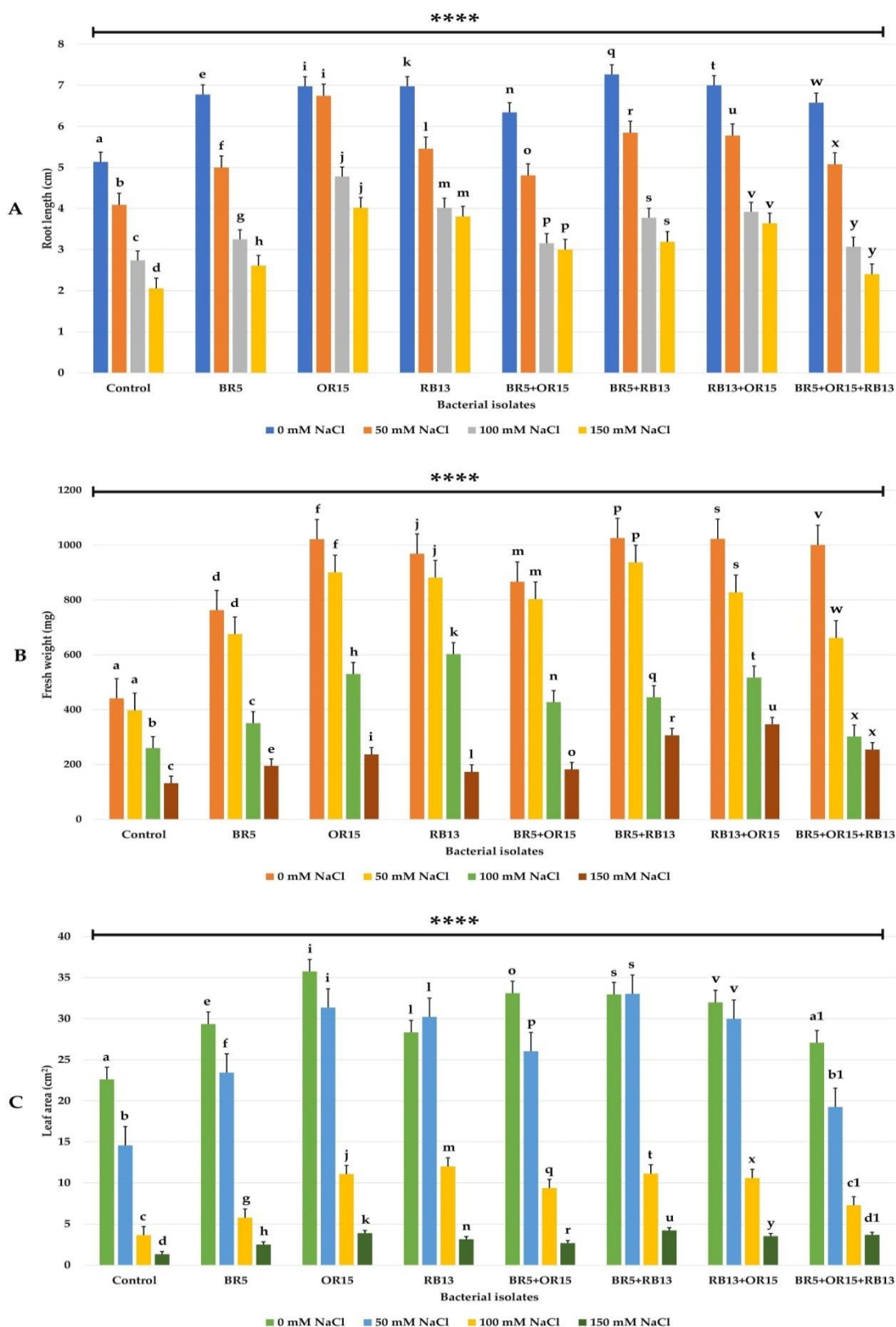
L'inoculation de la plante modèle *A. thaliana* avec les trois souches sélectionnées et leurs différentes combinaisons (BR15, OR15, RB13, BR5 + OR15, BR5 + RB13, OR15 + RB13 et BR5 + OR15 + RB13) est utilisée pour évaluer leur capacité à améliorer la croissance sous différentes concentrations de sel (0, 50, 100, 150 mM) (**Fig. 33**).

##### 1-1-1 Paramètres morphologiques

L'analyse des paramètres morphologiques des plantes, de la longueur des racines (**Fig. 34A**), du poids frais (**Fig. 34B**) et de la surface foliaire (**Fig. 34C**) a montré une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) de ces différents paramètres de croissance sous stress salin. L'inoculation de bactéries a considérablement amélioré la masse pondérale (**Fig. 34B**) et la surface foliaire d'*A. thaliana* (**Fig. 34C**) à de faibles concentrations de NaCl (0 et 50 mM). À des concentrations élevées de NaCl (100 et 150 mM), les différents paramètres morphologiques sont considérablement réduits. L'inoculation bactérienne a amélioré la partie aérienne des plantes (poids frais et surface foliaire) (**Fig. 34 B, C**). Alors que la longueur de la racine ne semble pas affectée par l'augmentation du sel (**Fig. 34 A**). L'analyse a montré que l'effet des bactéries est visible soit pour la mono inoculation, soit pour les différentes combinaisons. Cependant, une meilleure réponse est obtenue pour les souches OR15 et RB13 et leurs combinaisons (**Fig. 34 A–C**).



**Fig. 33: Effet *in vitro* des bactéries sur la croissance d'*Arabidopsis thaliana* sous différentes concentrations de NaCl.**

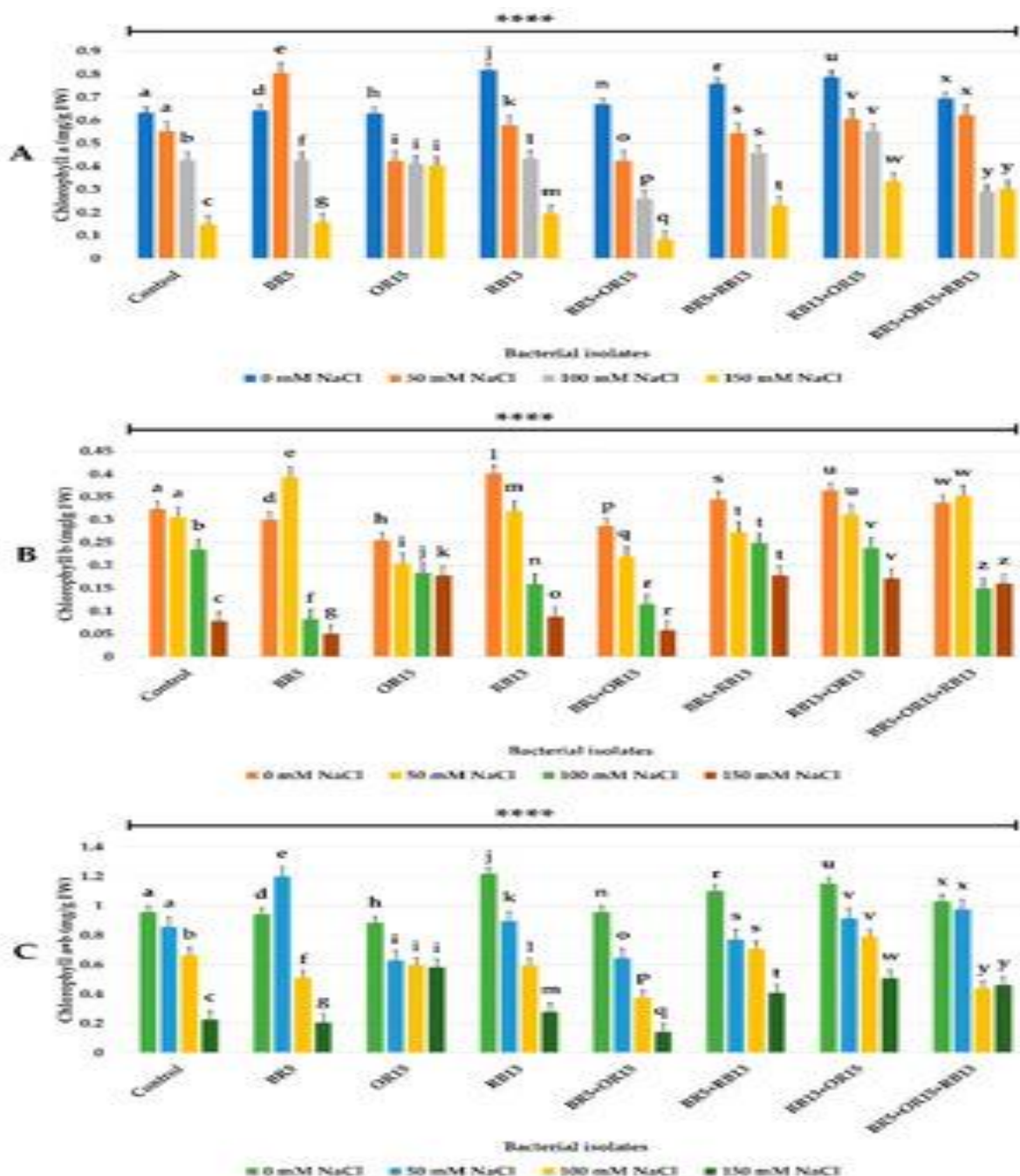


**Fig. 34: Effet des bactéries sur (A) la longueur des racines (cm), (B) le poids frais des racines (mg) et (C) la surface des feuilles (cm<sup>2</sup>) sous différentes concentrations de NaCl.** Les données représentent une moyenne ± erreur standard. Les barres dans chaque groupe avec des lettres différentes sont significativement différentes à p 0,05. \*\*\*\* indique les écarts significatifs à p < 0,0001 par rapport au témoin selon le test de Tuckey.



### 1-1-2 Teneur en chlorophylle

La salinité a entraîné des réductions notables des teneurs en chlorophylle a, b et totale ( $p < 0,01$ ) chez *A. thaliana* (Fig. 35A–C). Les traitements avec les bactéries et leurs combinaisons ont amélioré la teneur en chlorophylle a (Fig. 35A), en chlorophylle b (Fig. 35B) et en chlorophylle a + b (Fig. 35C) à tous les niveaux de salinité. Des taux significativement améliorés sont observés pour les souches OR15 et RB13 et leurs combinaisons (Fig. 35A–C).

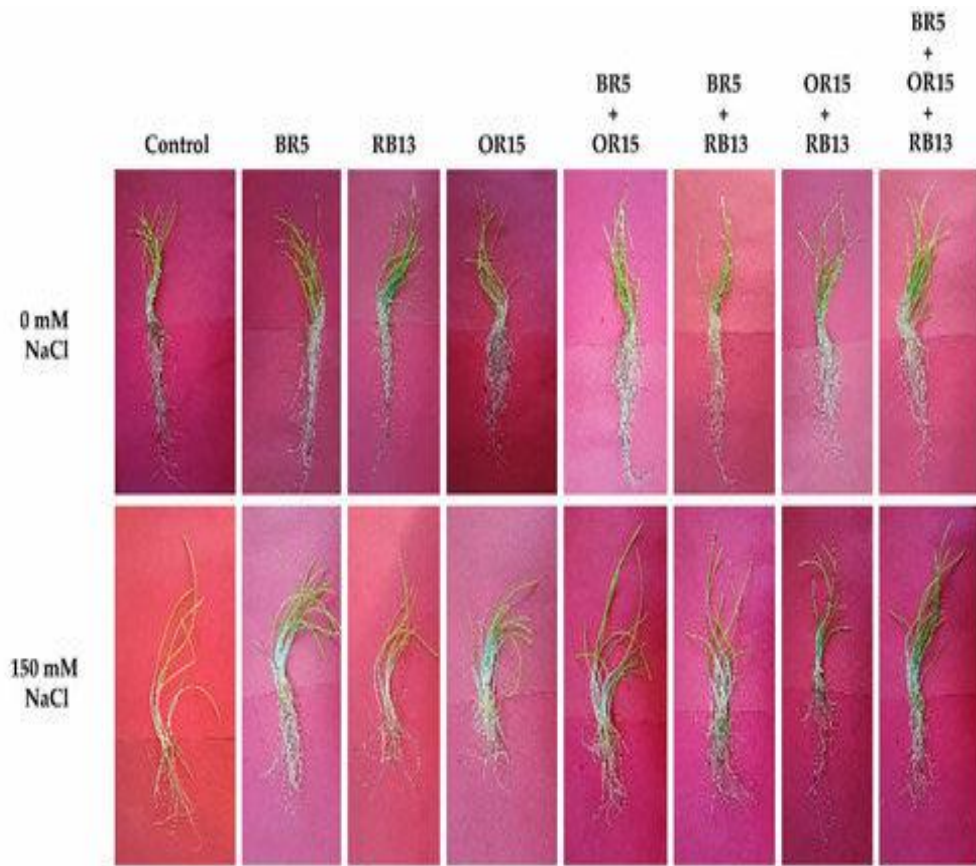


**Fig. 35: Effet des bactéries sur les teneurs en (A) chlorophylle a, (B) chlorophylle b et (C) chlorophylle a+b (µg/g de poids frais) sous différentes concentrations de NaCl. Les valeurs sont les moyennes ± SD de trois répétitions. Les barres de chaque groupe avec des lettres différentes sont significativement différentes à  $p \leq 0,05$ . \*\*\*\* indiquant les variations significatives  $p < 0.0001$  en comparaison à l'échantillon de contrôle.**

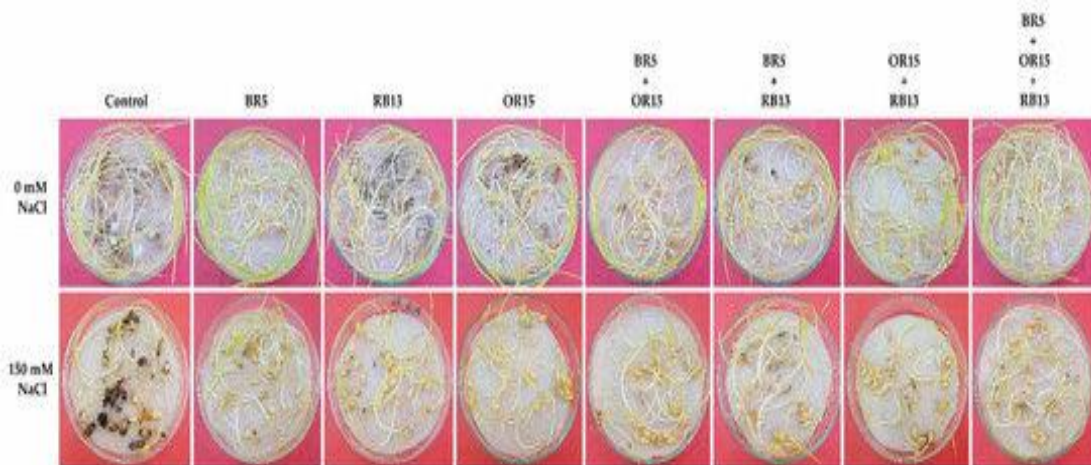
## **1-2- Effets de l'inoculation bactérienne sur la germination des graines de blé en milieu salin.**

### **1-2-1 Germination des graines de blé en présence de PGPR sous stress salin**

Le traitement des graines de blé dur avec les souches bactériennes et leurs combinaisons a considérablement amélioré les paramètres de germination avec et sans sel ajouté (**Fig. 36, 37**). L'effet de l'inoculation des graines par les différentes souches est perceptible sur le taux de germination cumulatif (**Fig. 37A**) et le pourcentage final de germination (**Fig. 37B**). La souche BR5 et la combinaison des trois bactéries (BR5 + OR15 + RB13) ont présenté le meilleur pourcentage final de germination (**Fig. 37B**). D'après les résultats, le stress de salinité a considérablement diminué ces paramètres de germination (**Fig. 37A, B**). À 150 mM de NaCl, l'inoculation bactérienne des graines a permis de réduire considérablement les effets du stress salin. Toutes les bactéries ont amélioré la germination des graines. Cependant, un meilleur taux est enregistré pour la souche BR5 en raison de sa capacité d'halotolérance (**Fig. 37B**). Les indices de vigueur des graines germées (**Fig. 37C, D**) définis comme le niveau d'activité et la durabilité des graines sont significativement améliorés après inoculation par les bactéries et leurs combinaisons avec ou sans sel. Les meilleurs indices sont enregistrés pour les graines inoculées avec la souche BR5 (**Fig. 37C, D**).

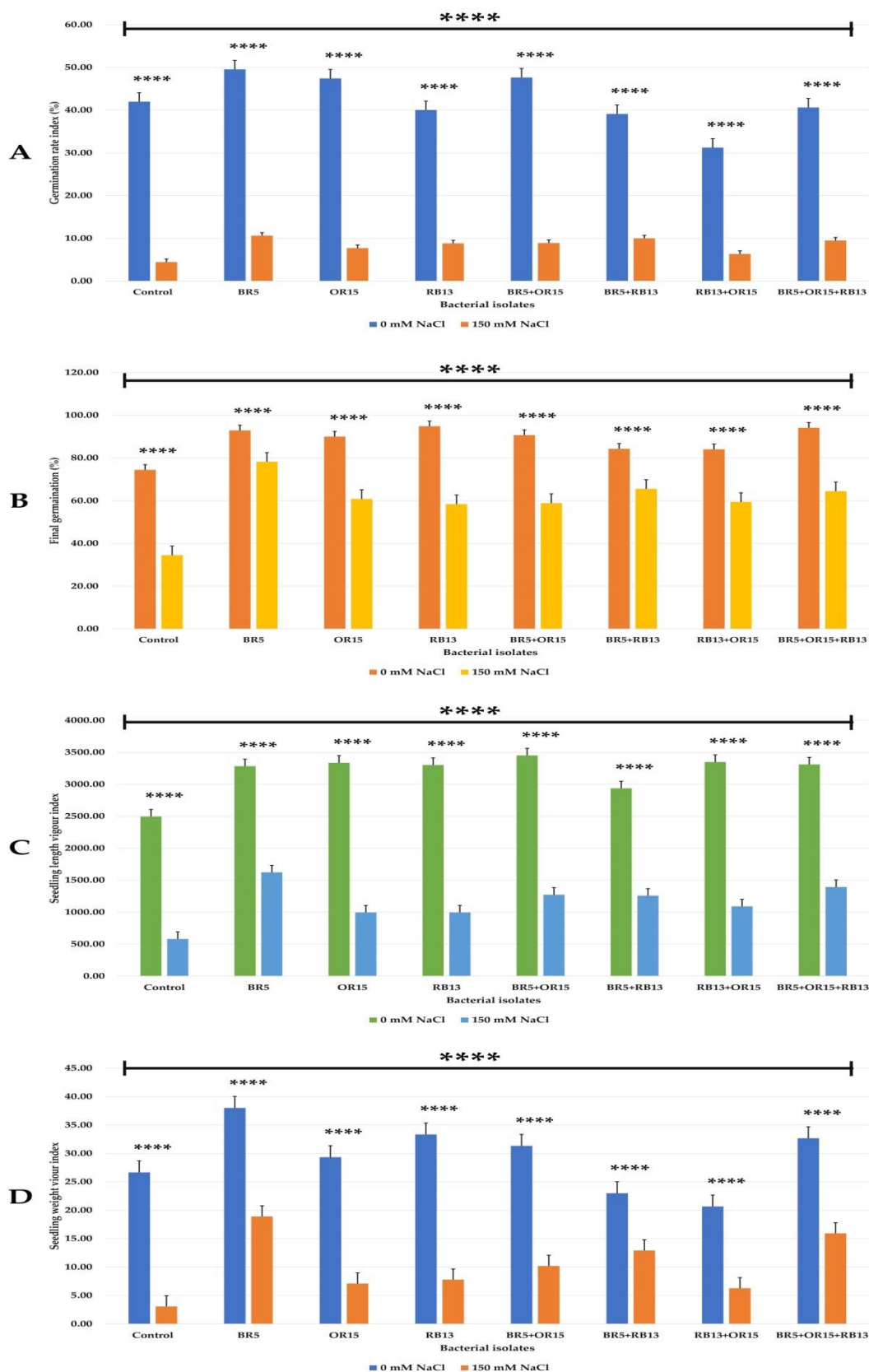


A



B

Fig. 36: Effet des bactéries sur la croissance *in vitro* des semis de blé à des concentrations de NaCl de 0 et 150 mM.



**Fig. 37:** Effet des bactéries sur (A) le taux de germination (%), (B) le pourcentage de germination final, (C) l'indice de vigueur de la longueur des semis et (D) l'indice de vigueur du poids des semis sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent une moyenne  $\pm$  erreur standard. Les barres dans chaque groupe avec des lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$ . \*\*\*\* indique les écarts significatifs à  $p < 0,0001$  par rapport au témoin selon le test de Tukey.

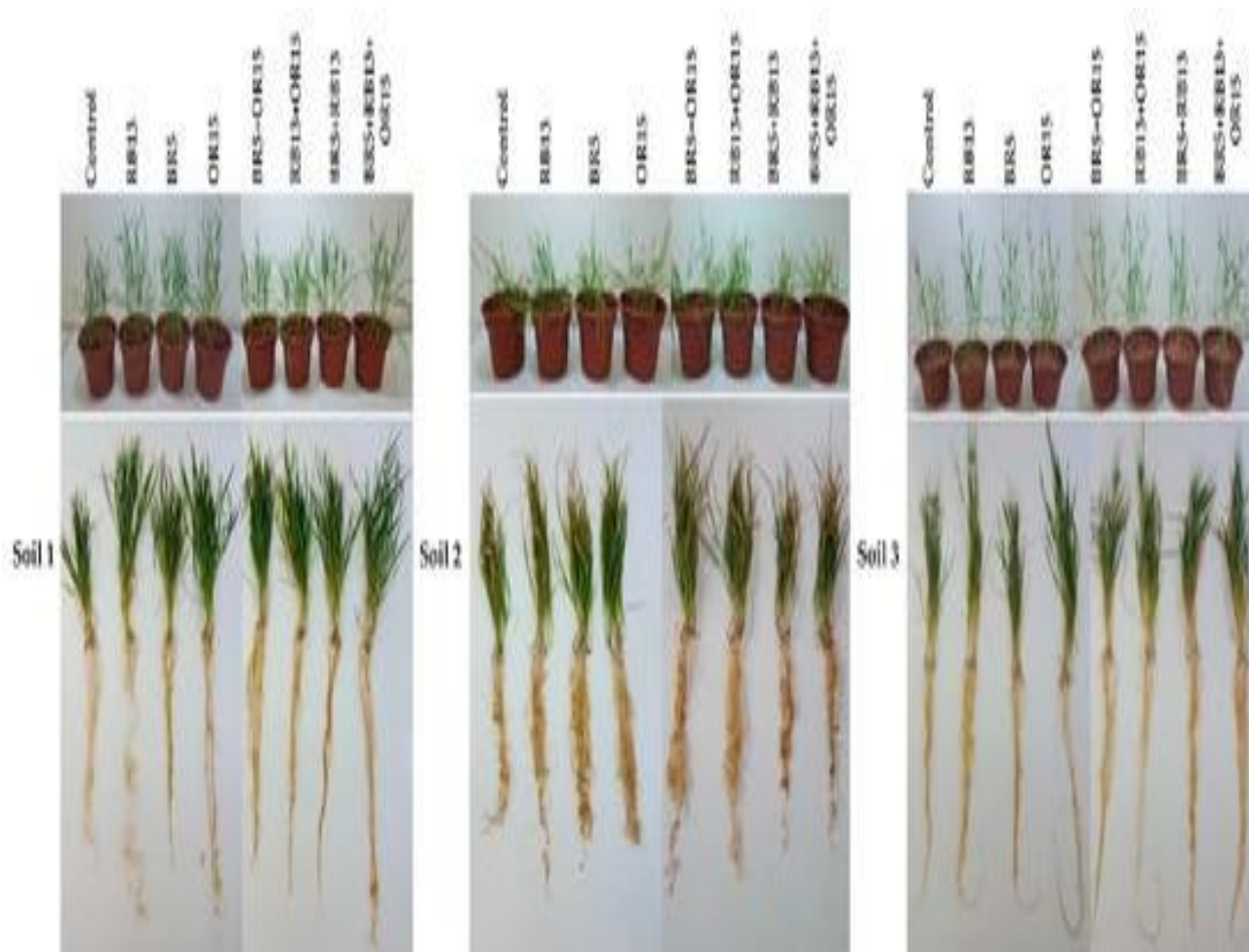


## 2-Test *in vivo*

### 2-1- Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morfo- biochimiques du blé dur en milieu salin.

#### 2-1-1 Paramètres morphologiques

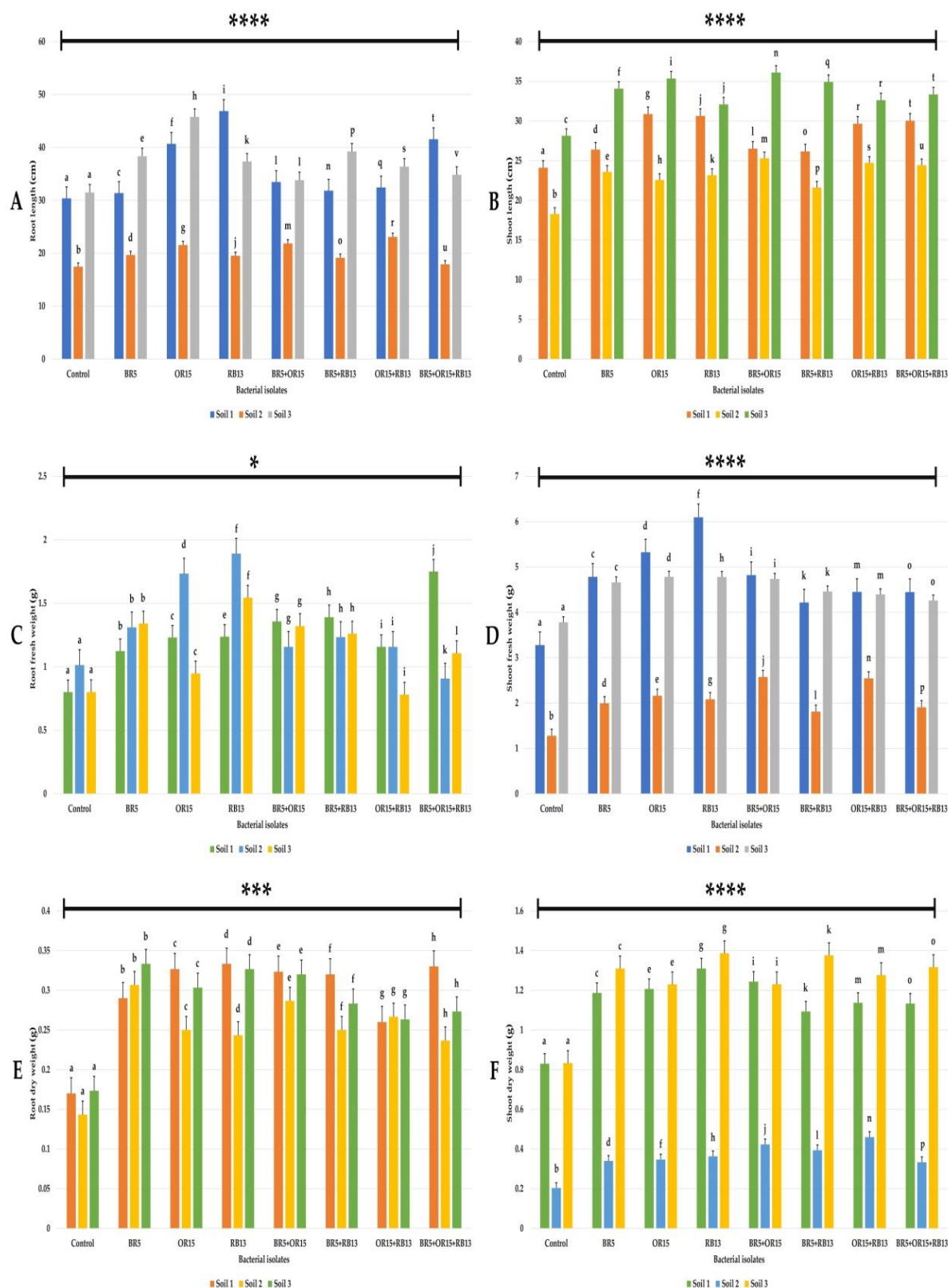
L'étude de l'expérience en pots menée sur trois sols de salinité différente a montré que la croissance du blé représentée par ses paramètres morphologiques est significativement affectée par la salinité et que l'inoculation bactérienne a un effet bénéfique significatif sur ces paramètres (**Fig. 38, 39**).



**Fig. 38: Evaluation *in vivo* des différentes bactéries sur les semis de blé et leurs systèmes racinaires dans les trois sols différents.**

La longueur des racines (**Fig. 39A**) est significativement affectée par la composition des sols et par la contribution des bactéries où une augmentation importante est notée dans les racines inoculées pour le sol 1 et 3 par rapport au témoin. Cependant, l'effet bénéfique des bactéries pour le sol 2 est minime. De plus, la longueur des tiges (**Fig. 39B**) est significativement améliorée en présence de bactéries et les meilleurs taux sont enregistrés pour le sol 3 et le sol

1. Le sol 2 est le plus stressant; l'effet d'inoculation bactérienne existe mais faible. L'inoculation bactérienne a également considérablement augmenté le poids frais et sec des tiges avec les différentes bactéries et leurs combinaisons par rapport au témoin (**Fig. 39D, F**). Cette augmentation est importante par la contribution des bactéries dans les sols moins salins (sols 1 et 3) où il n'y a pas de différence significative entre ces deux traitements. Les résultats ont montré que l'inoculation a un effet stimulant sur la croissance et le développement des plantes. Le meilleur taux de poids frais est enregistré pour la souche RB13 inoculée dans un sol fertile. Le poids de la partie aérienne des plantes dans le sol salin (sol 2) est beaucoup plus faible, mais l'effet bénéfique de l'inoculation bactérienne est perceptible. L'inoculation a augmenté le poids frais et sec des racines (**Fig. 39C, E**). Il n'y a pas de différence significative entre les différents sols et le système racinaire semble être développé de façon similaire dans les trois sols. Cependant, les meilleurs poids frais des racines sont enregistrés pour les plantes cultivées dans le sol 2 inoculées avec les souches OR15 et RB13. La combinaison des trois souches a amélioré le poids frais des racines mais dans le sol 1.

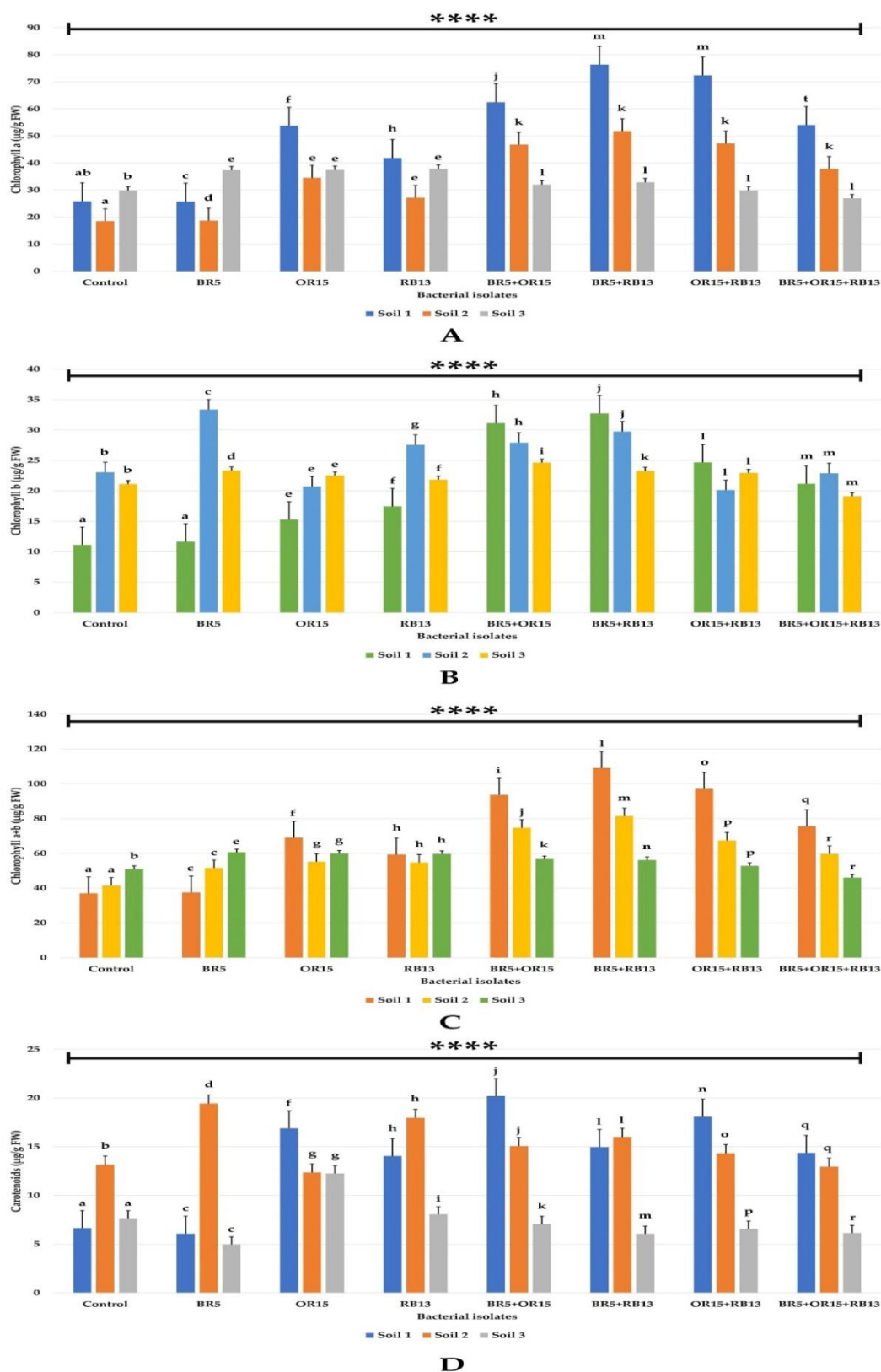


**Fig. 39:** Effet des bactéries sur (A, B) la longueur (cm), (C, D) le poids frais (g), et (E, F) le poids sec, des racines et des tiges sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent une moyenne  $\pm$  erreur standard. Les barres dans chaque groupe avec des lettres différentes sont significativement différentes à p 0,05. \*\*\*\* indique les écarts significatifs à p < 0,0001 par rapport au témoin selon le test de Tuckey.

## **2-1-2- Effets sur les pigments photosynthétiques et les marqueurs biochimiques**

### **2-1-2-1- Teneur en chlorophylle**

Les pigments chlorophylliens des plantes de blé présentent des valeurs significativement différentes selon la composition du sol et les traitements bactériens (**Fig. 40**). Les données ont révélé que la salinité des sols exerce une influence sur la teneur en chlorophylle et que l'inoculation bactérienne améliore cette teneur dans la plante de blé en réduisant le stress à différents niveaux de salinité. Les plantes dans le sol 1 et 2 présentent des niveaux élevés de chlorophylle lorsqu'elles sont inoculées par les bactéries. La chlorophylle a est augmenté de façon marquée après inoculation avec toutes les souches et les différentes combinaisons, sauf la souche BR5 qui a un taux plus faible (**Fig. 40A**). Les niveaux de chlorophylle dans le sol 3 sont améliorés, surtout pour les inoculations en monoculture. Les teneurs en chlorophylle b et en chlorophylle totale ont donné le même taux (**Fig. 40B, C**). Il convient également de noter que ces taux ont considérablement augmenté pour les plantes du sol 2 et 3 inoculés avec la souche BR5. La teneur en caroténoïdes (**Fig. 40D**) a également montré des valeurs significativement élevées chez les plantes traitées avec les bactéries, quelle que soit la nature du sol; cependant, la souche BR5 a un meilleur taux pour le sol le plus stressant. Les teneurs en caroténoïdes sont moins exprimées dans le sol 3, sauf la souche OR15 qui a un niveau plus élevé.



**Fig. 40:** Effet des bactéries sur les teneurs en (A) chlorophylle a ( $\mu\text{g/g}$  PF), (B) chlorophylle b ( $\mu\text{g/g}$  PF), (C) chlorophylle a+b ( $\mu\text{g/g}$  PF) et (D) caroténoïdes ( $\mu\text{g/g}$  PF) sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent une moyenne  $\pm$  erreur standard. Les barres dans chaque groupe avec des lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$ . \*\*\* indique les écarts significatifs à  $p < 0,0001$  par rapport au témoin selon le test de Tuckey.

### **2-1-2-2 Teneur en sucres totaux solubles**

On a observé une variation significative de la teneur en sucre des racines et des tiges des plantes inoculées et non inoculées dans les différents sols (**Fig. 41A, B**). La teneur en sucre des plants de blé varie selon la nature du sol et les bactéries utilisées. La teneur en sucre des racines est significativement différente (**Fig. 41A**). Le stress du sol 2 ne semble pas être compensé par une accumulation de sucres. En revanche, l'effet remarquable de l'inoculation bactérienne est observé chez les plantes cultivées dans le sol 3 où l'inoculation bactérienne avec la souche RB13 et la co-inoculation BR5 + RB13 ont augmenté la teneur en sucre par rapport à d'autres traitements (**Fig. 41A**). En général, la teneur en sucres des feuilles est plus élevée que celle des témoins. La nature du sol ne semble pas affecter la teneur foliaire des sucres, sauf pour les plantes inoculées avec les souches BR5, OR15, OR15 + RB13 ou BR5 + OR15 + RB13 qui ont permis une amélioration significative de ces composés (**Fig. 41B**).

### **2-1-2-3 Teneur en protéines**

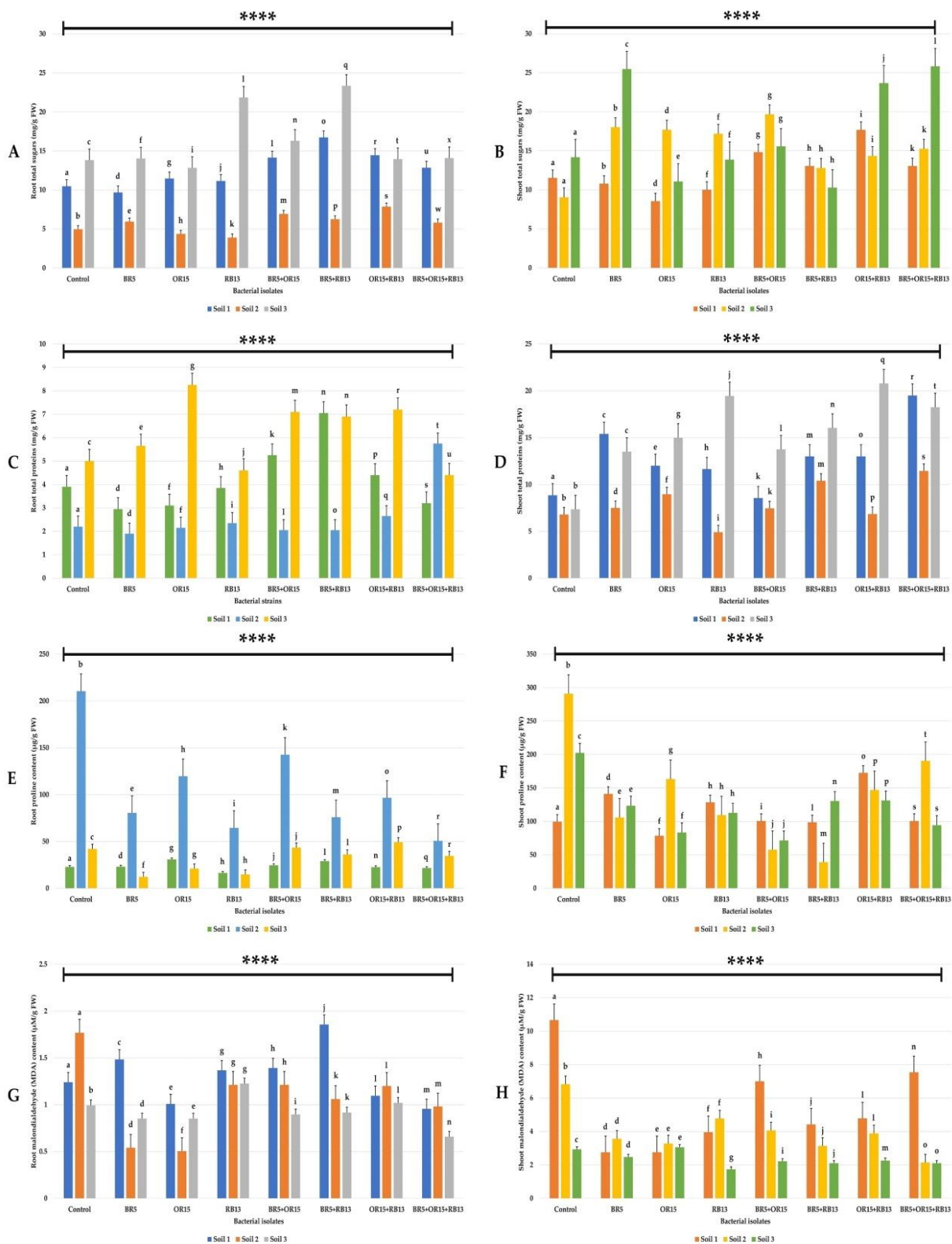
La teneur en protéines des racines et des tiges dépend des traitements et du sol utilisé (**Fig. 41C, D**). L'effet positif de l'inoculation bactérienne sur les teneurs en protéines est observé, en particulier chez les plantes cultivées dans le sol 1 et 3. Les concentrations dans les racines et les tiges des plantes cultivées dans le sol 2 ne sont pas très variables dans tous les types de traitement.

### **2-1-2-4 Estimation du contenu en proline**

Les concentrations de proline foliaire et racinaire sont affectées par la salinité du sol (**Fig. 41E, F**). Les concentrations ont considérablement augmenté dans le sol 2 et ont atteint des niveaux de 200 µg/g PF et de 280 µg/g PF respectivement. Les taux de proline sont faibles dans les racines et modérés dans les tiges pour les sols 1 et 3. L'inoculation de bactéries a réduit les concentrations de proline dans les racines et les feuilles dans le sol 2, essentiellement, lorsque les souches BR5 et RB13 et toutes les autres combinaisons sont utilisées.

### **2-1-2-5 Peroxydation des lipides**

L'effet de la salinité de sol sur les concentrations en MDA est significativement différent (**Fig. 41G, H**). La teneur en MDA n'est pas perceptible au niveau des racines, mais elle est remarquable au niveau des feuilles, les concentrations de MDA dans le sol 1 est 1,56 et 3,64 fois plus élevées que dans le sol 2 et 3, respectivement. Une forte diminution de la concentration de MDA est généralement observée principalement dans les racines de plantes inoculées par les souches BR5 et OR15 dans les sols 2 et 3 (**Fig. 41G**) et dans les tiges de plantes inoculées par différents traitements bactériens pour les sols 1 et 2 (**Fig. 41H**).

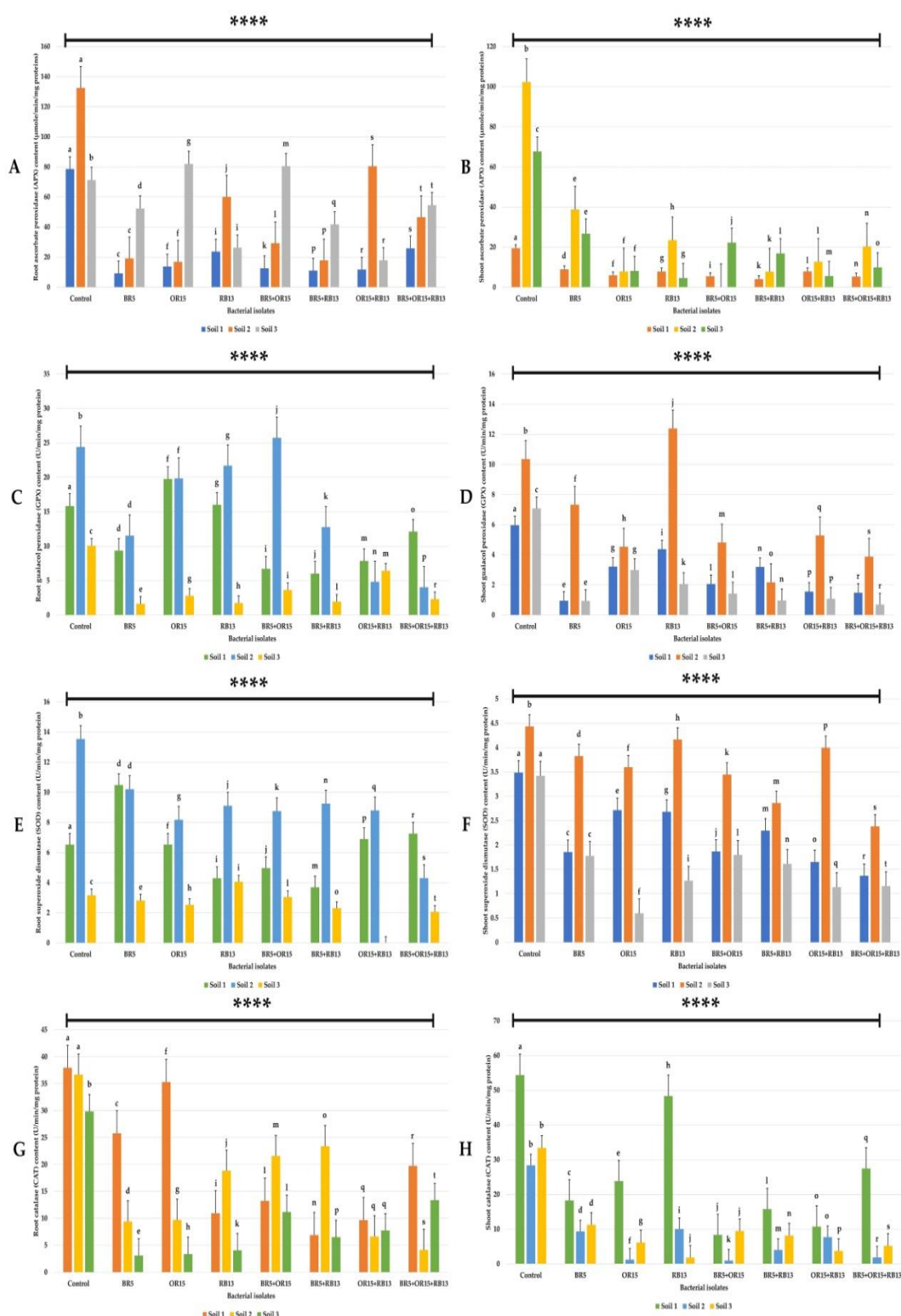


**Fig. 41: Effet des bactéries sur (A, B) les sucres totaux (mg/g PF), (C, D) les protéines totales (mg/g PF), (E, F) la teneur en proline (µg/g PF) et (G, H) la teneur en MDA des racines et des tiges (µM/g PF) sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent une moyenne ± erreur standard. Les barres dans chaque groupe avec des lettres différentes sont significativement différentes à p 0,05. \*\*\* indique les écarts significatifs à p < 0,0001 par rapport au témoin selon le test de Tuckey.**

### **2-1-3- Effets sur les activités des enzymes antioxydantes**

Les activités enzymatiques antioxydantes des racines et des tiges des plantes sont différentes dans les trois sols (**Fig. 42**). Elles sont plus intenses dans le sol 2 pour les enzymes APX (**Fig. 42A, B**), GPX (**Fig. 42C, D**) et SOD (**Fig. 42E, F**), moins variables pour la CAT des racines (**Fig. 51G**) et plus élevées pour la CAT foliaire (**Fig. 42H**) dans le sol 1. Cependant, les résultats des traitements bactériens sur les activités des enzymes sont variables ; une réduction notable de l'APX et de la CAT est observée sous l'effet des 3 bactéries et de leurs différentes combinaisons dans les 3 sols. Alors que la réduction des enzymes GPX et SOD est claire sous l'effet de la co-inoculation avec une combinaison de 2 ou 3 bactéries.





**Fig. 42: Effet des bactéries sur (A, B) la teneur en APX, (C, D) en GPX, (E, F) en SOD et (G, H) en CAT des racines et des tiges (U/mn/mg de protéine) sous différentes concentrations de NaCl dans 3 sols différents. Les données représentent une moyenne ± erreur standard. Les barres dans chaque groupe avec des lettres différentes sont significativement différentes à p 0,05. \*\*\*\* indique les écarts significatifs à p < 0,0001 par rapport au témoin selon le test de Tuckey.**

## Discussion

La salinité est un facteur majeur limitant la croissance et la productivité des plantes (Khan et Panda, 2008). Sur la base de leur évolution adaptative, certaines plantes, en particulier les halophytes, peuvent résister à la salinité par rapport aux glycophytes qui ne peuvent pas résister et meurent. Ainsi, les microorganismes associés à ces halophytes ont pu tolérer, survivre et proliférer dans le sol et la rhizosphère de cet environnement hostile (Etesami et Beattie, 2018). Les bactéries bénéfiques associées à ces plantes ont colonisé la rhizosphère (Glick *et al.*, 2007) et jouent un rôle important dans la résistance des plantes au stress salin. Les plantes inoculées avec ces bactéries ont induit des changements biochimiques et morphologiques conduisant à une tolérance accrue au stress abiotique, défini comme IST (Induced Systemic Tolerance) (Glick, 2014; Kaushal et Wani, 2016). Les recherches actuelles ont porté principalement sur les microorganismes associés à la rhizosphère des halophytes (Rodriguez et Duran, 2020), ayant des activités PGP et une tolérance élevée aux sels, ils sont donc les candidats les plus appropriés pour la croissance et l'amélioration du rendement des plantes glycophytes dans les zones affectées par le sel (Durán *et al.*, 2019).

Dans cette étude, 98 souches ont été isolées de la rhizosphère et de l'endosphère de deux espèces d'halophytes (*Suaeda mollis* et *Salsola tetrandra*) et de sols salés situés dans trois chotts différents de l'Est algérien. Les caractéristiques physico-chimiques des sites d'échantillonnage ont montré que ces sols sont très salins (Ec variant de 22,95 à 30,34 mS/cm) et légèrement alcalins (pH 7,99 à 8,05). Parmi ces isolats, 44,89 % étaient des bactéries de la rhizosphère, le nombre de bactéries cultivables isolées du sol de la rhizosphère de l'halophyte était supérieur au nombre de bactéries non rhizosphériques et endophytes. Ce nombre élevé de bactéries dans la rhizosphère était lié à la richesse de cette zone en exsudats racinaires sécrétés. De tels résultats ont été observés par Mapelli *et al.* (2013), où la rhizosphère de *Salicornia* apparaît comme un habitat très riche en communautés bactériennes par rapport aux sols non rhizosphériques. Cela est dû à l'effet rhizosphère qui a été décrit par plusieurs auteurs (Marasco *et al.*, 2012; Ferjani *et al.*, 2015; Soussi *et al.*, 2016). De nombreux auteurs ont précisé que les mucilages et les exsudats sont les sources les plus importantes de matière organique apportée au sol et assimilée par la microflore tellurique (Rolfe *et al.*, 2019). La salinité a un impact négatif sur l'abondance, la diversité, la composition et les fonctions microbiennes (Borneman *et al.*, 1996). Omar *et al.* (1994) ont montré que l'augmentation du taux de salinité à plus de 5%, le nombre total de bactéries et d'actinobactéries est considérablement réduit. L'augmentation de la salinité de la rhizosphère affecte l'exsudation racinaire et la décomposition de la matière organique par les microorganismes (Ondrasek *et*

*al.*, 2010). Des observations semblables par Li *et al.* (2006) ont remarqué des corrélations négatives significatives entre la conductivité électrique du sol et l'émission totale de CO<sub>2</sub> ou la biomasse microbienne, ce qui suggère que la salinité a eu un effet négatif sur la biomasse microbienne et son activité.

Tous les isolats (98) sont testés pour leurs caractères PGP. Selon Glick (1995), les PGPR facilitent la croissance des plantes de trois façons différentes, favorisent la disponibilité des éléments nutritifs, facilitent leur absorption et leurs régulations et protègent les plantes contre diverses maladies (Garcia de Salamone *et al.*, 2001; Raj *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004). Les bactéries isolées de ces zones avaient également des propriétés favorisant la croissance des plantes (Etesami et Beattie, 2018). Dans cette étude, 73,46 % des isolats testés ont montré une activité de fixation d'azote. L'azote (N) est l'un des principaux nutriments grâce auxquels la plante bénéficie de l'association microbienne (Riggs *et al.*, 2001). L'inoculation de rhizobactéries dans les sols agricoles pour remplacer l'utilisation d'engrais azotés a montré une nette amélioration du rendement des cultures (Vessey, 2003). L'approvisionnement en phosphate minéral est également l'une des principales activités d'amélioration de la croissance des plantes. Les données de cette étude ont montré que 26,53 % des souches sont capables de solubiliser le phosphate. Elles peuvent être considérées comme des biofertilisants car elles pourraient libérer une quantité de P soluble assimilable par les plantes (Kloepper *et al.*, 1989). Le pourcentage de souches obtenu dans cette étude est faible par rapport à d'autres travaux. Il est généralement admis que la nature du sol a un impact sur les performances des souches (Silini *et al.*, 2016).

La synthèse d'hormones de croissance végétales, dont l'AIA, est une faculté très courante chez les PGPR. Toutes les souches isolées sont capables de produire de l'AIA à des niveaux variant de 2,25 µg/mL à 13,83 µg/mL. Les valeurs les plus élevées sont obtenues par les souches rhizosphériques d'Oum El Bouaghi OR16 (12,67 µg/mL), OR15 (13,83 µg/mL), OR14 (10,06 µg/mL). Parmi les phytohormones, les PGPR les plus tolérantes au sel sont capables d'induire la biosynthèse de l'AIA (Tiwari *et al.*, 2011). La variation de la quantité d'AIA produite par les PGPR est cependant spécifique à l'espèce. Un niveau élevé d'AIA produit par les rhizobactéries halotolérantes est responsable de l'augmentation de la croissance des racines dans les sols salins (Siddikee *et al.*, 2011). Les phytohormones sont essentielles pour réguler les réponses des plantes et maintenir une physiologie végétale normale et conférer une tolérance à la salinité et à d'autres stress environnementaux (Ryu et Cho, 2015). Les réponses des plantes à la salinité induisent diverses altérations dans les aspects moléculaires, biochimiques et physiologiques. (Ilangumaran et Smith, 2017). La modulation de l'équilibre

hormonal des plantes est l'une des stratégies que les PGPR ont adapté pour améliorer la croissance des plantes (Tsukanova *et al.*, 2017). Les PGPR peuvent également altérer la signalisation hormonale de la racine à la tige, améliorant ainsi la tolérance au sel des cultures (Yang *et al.*, 2009).

La capacité de production de sidérophores des PGPR augmente la disponibilité des micronutriments pour les plantes (Navarro-Torre *et al.*, 2017). Les sidérophores bactériens sont utilisés par les plantes comme source de fer. De plus, les sidérophores bactériens agissent comme protecteurs contre les micro-organismes phytopathogènes et leurs effets délétères (Zhou *et al.*, 2017). Dans la présente étude, 47,95 % des isolats sont positifs pour la production de sidérophores dont 48,93 % sont des bactéries de la rhizosphère. Les sidérophores sont des composés chélateurs du Fe et ont une forte affinité pour le fer. Les sidérophores rendent le fer plus accessible aux plantes en formant un complexe Fe-sidérophores. Dans les sols salins et sodiques, le niveau de fer disponible pour l'absorption par les plantes est limité. Ensuite, dans ce type de sol, le fer et d'autres micronutriments requis par les plantes ont entraîné une carence (Abbas *et al.*, 2015). Parallèlement à la production d'auxine, la croissance des plantes dans ces types de sol est soutenue par des bactéries de la rhizosphère produisant des sidérophores.

Les substances volatiles sont également impliquées dans la suppression de divers agents pathogènes. L'ammoniac produit en tant qu'intermédiaire dans le catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires peut aider à répondre aux besoins en azote de la plante hôte et, en grande quantité, supprime la colonisation des plantes par des agents pathogènes. La production de NH<sub>3</sub> était très courante chez les souches isolées où 67,34 % produisaient de l'ammoniac. Ce taux est comparable à ceux mentionnés par plusieurs études (Joseph *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008). Le HCN est un métabolite secondaire produit par plusieurs PGPR. Bien que ce composé soit un inhibiteur métabolique général, il est excrété pour éviter la prédation ou la compétition. Il est hautement toxique pour tous les micro-organismes aérobies, sans affecter les microbes producteurs (Bashan et de-Bashan, 2005). Dans notre étude, 24,48 % des isolats pourraient produire du HCN. Il est admis que les souches capables de produire du HCN et des sidérophores présentaient une activité inhibitrice contre plusieurs champignons phytopathogènes (Mishra *et al.*, 2008).

L'existence d'enzymes hydrolytiques associées aux PGPR est une caractéristique nécessaire pour détecter les souches les plus efficaces. Leur présence limite la croissance des phytopathogènes fongiques et renforce la résistance des plantes contre ces maladies (Goswami *et al.*, 2016). Le potentiel enzymatique des isolats a été évalué par la production

d'amylase (92,85 %), de chitinase (61,22 %), de cellulase (41,83 %) et de protéase (36,73 %). La chitinase, par exemple, détruit la paroi cellulaire fongique et provoque la lyse des cellules fongiques. De plus, les oligomères de chitine et de glucane libérés lors de la dégradation de la paroi cellulaire fongique agissent comme des éliciteurs qui déclenchent divers mécanismes de défense chez les plantes. Ces enzymes ont été produites par diverses bactéries telles que *Pseudomonas stutzeri* capables de lyser le pathogène *Fusarium* sp. (Bashan et de Bashan, 2005).

L'activité antifongique réalisée sur 40 isolats sélectionnés en fonction de leur activité PGP, a montré que 55% d'entre eux inhibaient la croissance des champignons phytopathogènes. Les métabolites antifongiques sont plus actifs contre *A. niger* où la majorité (97,5 %) des souches l'inhibaient à un taux de 72,5 % pour la souche OE1. En revanche, *F. oxysporum* est le moins sensible (Silini *et al.*, 2016), il est inhibé à un taux de 44% (souche BR6). Il est bien démontré que les micro-organismes indigènes associés aux plantes dans les écosystèmes agro-désertiques ont un potentiel antagoniste important contre les phytopathogènes (Soussi *et al.*, 2016).

Afin de sélectionner des souches tolérantes à diverses contraintes abiotiques, on a évalué la capacité de 10 souches à croître à différentes concentrations de NaCl, de PEG<sub>8000</sub> et à différentes valeurs de pH et de température. La majorité des souches ont cultivé dans un large éventail de stress testés. La croissance de la plupart des souches est augmentée sensiblement jusqu'à 400 mM NaCl et à 20% de PEG. Ces résultats ont confirmé le lien étroit entre la tolérance de la souche et son origine. Les bactéries associées aux plantes halophytes peuvent tolérer des niveaux de sel allant de 4 à 30 %. Ces PGPR tolèrent une salinité d'au moins 3% de NaCl (Egamberdieva *et al.*, 2011) et elles peuvent survivre dans la rhizosphère des plantes en raison de leur persistance et de leur compétitivité dans des conditions salines et arides. L'adaptation des bactéries à des concentrations élevées de sel est due à leur capacité à synthétiser et à accumuler des solutions intracellulaires compatibles. Ces solutions ont un potentiel d'osmorégulation et de protection contre les effets du stress salin. Par conséquent, les principaux solutés présents chez les bactéries sont les suivants: ion K<sup>+</sup>, glycine, bétaïne, proline, glutamate, divers glucides et N-acétylglutaminyl-glutamine amide (Boncompagni *et al.*, 1999). Cependant, la plupart des isolats ont une croissance optimale entre 30 et 37 °C et à pH 7, sauf pour certaines souches qui peuvent croître à 40°C et à pH alcalin (pH 9) ou même à pH très alcalin (pH 11) pour la souche BR5.

La température est l'un des facteurs les plus importants qui régissent la physiologie et la croissance des microorganismes. La capacité de la souche à croître sur une large gamme de

pH est la preuve de sa capacité à survivre. La tolérance est un caractère spécifique à la souche. Le pH du sol joue un rôle majeur dans la survie et la prospérité des rhizobactéries, et donc dans la croissance de leur plante hôte. Cependant, l'acidité est généralement plus nocive que l'alcalinité (Recep *et al.*, 2009). L'acidification de la rhizosphère par exsudation des acides organiques de la racine joue également un rôle central dans la détermination de la population environnante (Maurhofer *et al.*, 1998). Un pH inférieur à 5,5 peut entraîner une diminution des principaux macronutriments et une augmentation de la concentration et de l'activité des micronutriments comme le manganèse, le fer et l'aluminium, entraînant des effets toxiques sur les racines des plantes et les microorganismes bénéfiques (Coventry *et al.*, 1989). En effet, le prélèvement de l'environnement stressant, favorise le développement de bactéries efficaces. Il est admis que le stress est un inducteur de l'activité des espèces bactériennes (Banerjee *et al.*, 2010). Les écosystèmes fluctuants favorisent le développement de bactéries ayant une bonne tolérance au stress, cela suppose l'existence d'une pression de sélection exercée par le milieu naturel.

Trois souches représentatives de chaque site d'échantillonnage avec les meilleures activités PGP et la meilleure capacité de tolérance au stress ont été choisies et identifiées après séquençage de l'ADNr 16S. Les souches BR5, OR15 et RB13 appartiennent à *Bacillus atrophaeus*. Les *Bacillus* représentent une fraction importante de la communauté microbienne du sol. Ce genre est omniprésent et peut survivre dans plusieurs environnements en fonction de sa capacité de sporulation. De plus, les souches de *Bacillus* présentent plusieurs caractéristiques qui améliorent leur survie dans la rhizosphère et leur efficacité en tant que PGPR. Il a été démontré que lorsque les conditions environnementales sont plus sélectives, la variabilité du microbiome peut être simplifiée et la diversité taxonomique est limitée (Marasco *et al.*, 2013). Il a également été rapporté que dans les écosystèmes salins, des halophytes indigènes tels que *Salicornia* sp. conservent une communauté bactérienne rhizosphérique, homogène dans la composition des taxons (Marasco *et al.*, 2013). Récemment, un certain nombre d'espèces de *Bacillus* sont développées commercialement comme promoteurs de croissance végétale et agents de lutte biologique pour leur utilisation dans l'agriculture (Muis et Quimio, 2016). Les bactéries du genre *Bacillus* sont généralement considérées comme de bons candidats à la bactérisation en raison de leur capacité à éliminer ou à atténuer les effets nocifs du stress salin, à réguler les caractéristiques physiologiques des plantes et à favoriser la croissance des plantes (Pinter *et al.*, 2017). Les *Bacillus* tels que *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. amyloliquifaciens*, etc., sont des espèces étroitement apparentées ayant un potentiel de lutte biologique contre différents

pathogènes fongiques, notamment *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina* (Dubey et Gupta, 2012).

Pour tester le potentiel PGP des souches sélectionnées de *Bacillus* (BR5, OR15 et RB13) sur les plantes, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont inoculées avec chacune des souches et leurs différentes combinaisons par rapport aux plantes témoins non inoculées en conditions de stress salin (0, 50, 100 et 150 mM NaCl). Les résultats ont montré une diminution significative des différents paramètres de croissance (surface foliaire totale, poids de la plante, longueur des racines et teneur en chlorophylle) sous stress salin. Les réponses des plantes à la salinité induisent diverses altérations des aspects structurels biochimiques et physiologiques. Différentes études ont rapporté que la salinité affecte les plantes de plusieurs manières, le taux d'expansion de la surface foliaire diminue avec une réduction du taux de production de feuilles entraînant la mort des plantes (Fan *et al.*, 2020). La salinité peut augmenter la biosynthèse de certaines hormones telles que l'éthylène à des niveaux suffisamment élevés pouvant entraîner des changements physiologiques dans les tissus végétaux (Munns et Rawson, 1999; Suárez et Medina, 2005; Seckin *et al.*, 2009). L'inoculation avec les bactéries a considérablement amélioré les paramètres de croissance d'*A. thaliana*. Des résultats similaires de promotion de la croissance (surface foliaire totale, poids de la plante, teneur en chlorophylle et longueur des racines) sont déjà rapportés par plusieurs travaux utilisant diverses espèces de PGPR telles que *Burkholderia phytofirmans* (Poupin *et al.*, 2013), *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 (Mantelin *et al.*, 2006) et *B. subtilis* GB03 (Liu *et al.*, 2017). A des concentrations élevées de NaCl (100 et 150 mM), les différents paramètres morphologiques sont significativement réduits. L'inoculation bactérienne (dont OR15 et RB13) et leur combinaison ont amélioré la partie aérienne des plantes (poids frais et surface foliaire) et la teneur en chlorophylle. Alors que la longueur des racines ne semble pas être affectée par l'augmentation du sel. On pourrait interpréter que l'auxine produite par ces souches pourrait être responsable de la promotion de la croissance et de la tolérance au sel (Hirano et Upper, 2000). L'auxine est l'une des hormones végétales importantes responsables de la formation de racines latérales à différents stades de développement (Lavenus *et al.*, 2013). L'AIA est le régulateur de croissance des plantes; il peut pénétrer dans les cellules végétales et stimuler la croissance des racines (Patten et Glick, 2002). Dans notre étude, les souches BR5, OR15 et RB13 ont produit l'AIA avec des quantités comparables à celles rapportées par Farah *et al.* (2008) produites par des souches d'*Azotobacter*, *Pseudomonas* et *Bacillus* isolées de la rhizosphère. Les racines traitées avec la souche productrice d'AIA

*P.putida* ont amélioré les racines de graines de canola de 35 à 50 % par rapport à une souche déficiente en AIA (Patten et Glick, 2002).

La détermination du potentiel de germination des graines dans des conditions salines est une autre considération lors de la sélection de PGPR efficaces dans la tolérance au stress salin (Panuccio *et al.*, 2014). La germination finale des graines et le taux de germination du blé diminuent en présence de sel, ce qui est courant chez plusieurs espèces végétales (Al-Karaki, 2001; Silini *et al.*, 2012). Le stress salin affecte vigoureusement les graines en germination par rapport aux plantes en croissance, car la germination se produit normalement à la surface du sol où les sels solubles s'accumulent en raison de l'évaporation. La disponibilité limitée de l'eau et l'accumulation d'ions entraînent une germination réduite, de nombreux changements dans les activités enzymatiques et hormonales des graines et affectent l'organisation structurelle de l'embryon en germination (Huang et Redmann, 1995; Delshadi *et al.*, 2017). De nombreuses études ont signalé une diminution de la germination des semences entraînant des pertes de rendement en raison des effets négatifs de la salinité (Ahmadvand *et al.*, 2012). Le traitement des graines de blé dur avec les souches bactériennes et leurs combinaisons a considérablement amélioré les paramètres de germination avec et sans sel ajouté. L'effet de l'inoculation des graines par les différentes souches est visible sur le taux de germination cumulé et le pourcentage de germination final. Les meilleurs taux sont obtenus après inoculation avec la souche BR5 et la combinaison des trois souches. L'utilisation de bactéries tolérantes au sel était une stratégie efficace pour l'amorçage des graines et éventuellement le rendement des plantes (Ilangumaran et Smith, 2017). Les indices de vigueur germinative sont également significativement améliorés après l'inoculation avec des bactéries et leurs combinaisons avec ou sans sel. Une augmentation significative de la vigueur des plantules serait produite par une meilleure synthèse des auxines par les PGPR (Bharathi *et al.*, 2004) qui améliore directement différents systèmes de défense cellulaire déclenchant une germination précoce même dans des conditions de stress. Les bactéries produisant de l'AIA et de l'acide gibbérellique facilitent également la germination des graines et la croissance des plantes sous stress salin (Kang *et al.*, 2014), en augmentant l'activité de l'alpha amylase dans les graines, entraînant la dégradation de l'amidon en sucres simples. Une germination rapide et saine des graines est la première étape pour obtenir une production végétale vigoureuse (Zafar-ul-Hye *et al.*, 2019).

L'effet de l'inoculation avec les rhizobactéries et leur combinaison sur la croissance des plantes de blé est réalisé en pots sur trois sols de salinités différentes. Ce test permet de vérifier la compétence des souches dans la possibilité de les utiliser comme biofertilisants



pour les cultures végétales sur sols salins ou irrigués par des eaux salines. Pour cela, les sols utilisés sont prélevés directement à la périphérie des Chotts et à différents endroits, présentant des valeurs de conductivité électrique élevées ( $S_2=3,81$  et  $S_3=2,80$  mS/cm) en comparaison avec un sol témoin non salin ( $S_1=0,48$  mS /cm). Les résultats obtenus ont montré que la croissance du blé représentée par ses paramètres morphologiques est significativement affectée par la salinité et que l'inoculation bactérienne a un effet bénéfique significatif sur ces paramètres. Dans cette étude, il est observé que la salinité réduit la hauteur des plantes, la longueur des racines et le poids frais et sec des feuilles et des racines. Ces résultats sont similaires à ceux de nombreuses études (Ashraf, 2004; Razmjoo *et al.*, 2008; Asada, 2000; Zhu, 2007; Türkan et Demiral, 2009; Carrillo *et al.*, 2011). Les effets les plus courants de la salinité sont la perte de la turgescence, une croissance réduite, entraînant des feuilles plus petites, une taille plus courte, une sénescence précoce, une perte d'intégrité cellulaire, une nécrose des tissus et même la mort des plantes (Cheeseman, 1988).

Cependant, dans ce test, l'inoculation des plantes de blé a montré un effet positif à tous les niveaux de salinité pour la hauteur de la plante, la longueur des racines et le poids des feuilles et des racines fraîches et sèches (même minime pour le sol 2, le plus stressant). Ces résultats suggèrent que le stress est plus faible chez les plantes inoculées, avec des preuves que l'inoculation peut réduire efficacement le stress salin (Yue *et al.*, 2007). Les PGPR induisent des changements dans les couches externes du cortex racinaire permettant une division cellulaire accrue aux extrémités des plantules de blé (Baset Mia *et al.*, 2010). Ce phénomène pourrait être attribué à la production d'auxine, à l'inhibition de la synthèse d'éthylène ou à la minéralisation des nutriments (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000) ou encore à une diminution de l'absorption des ions toxiques (Hasnain et Sabri, 1996).

L'analyse de la chlorophylle est l'un des paramètres biochimiques importants en tant qu'indicateur de la tolérance au sel et de la capacité de protection des plantes (Fan *et al.*, 2020). Les résultats relatifs aux teneurs en chlorophylle ont montré que le stress salin entraîne une réduction significative des teneurs en chlorophylle (Mahmood *et al.*, 2016; Panwar *et al.*, 2016; Rabhi *et al.*, 2018). Cette diminution pourrait être due à un stress osmotique élevé entraînant une assimilation réduite des minéraux essentiels (Soliman *et al.*, 2012; Golpayegani et Tilebeni, 2011). Une carence en ces minéraux, notamment en N, pourrait conduire à une inhibition de la formation de molécules de la chlorophylle (Huang *et al.*, 2004). De plus, une concentration élevée de sels dans les feuilles pourrait provoquer une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et détruire tous les composants protéiques du chloroplaste (Muneer *et al.*, 2014). En outre, le rapport  $Na^+/K^+$  déséquilibré

entraîne également une réduction de l'activité de transport d'électrons photosynthétiques, en particulier l'activité du PSII (photosystème II) dans les chloroplastes (Chatterjee *et al.*, 2018). Le taux de fixation du dioxyde de carbone diminue parce que la salinité agit sur la fermeture stomatique, ce qui entraîne une baisse de la concentration de CO<sub>2</sub> intracellulaire. L'impact négatif de la salinité se limite non seulement à la réduction de la production de photosynthétats par fermeture stomatique, mais il décompose également les pigments photosynthétiques en diminuant le taux de biosynthèse ou en augmentant la dégradation des pigments (Ashraf et Harris, 2013).

D'autre part, l'inoculation des PGPR a entraîné une amélioration de la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes par rapport aux témoins respectifs non inoculés. L'amélioration par les PGPR de la teneur en chlorophylle de nombreuses plantes cultivées dans des conditions de stress abiotique a déjà été décrite (Heidari *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Il est noté que pour les différents traitements, la combinaison multi-souches a montré une amélioration significative des teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes par rapport aux autres isolats et aux témoins non inoculés. (Hussain *et al.*, 2014; Heidari *et al.*, 2011; Al-Erwy *et al.*, 2016). L'application d'un consortium multi-souches pourrait être due à une solubilisation et une mobilisation accrue des minéraux (Zahir *et al.*, 2009). Les plantes peuvent également se protéger du stress salin en accumulant des solutés compatibles tels que des sucres et des acides aminés pour l'ajustement osmotique intercellulaire (Evelin *et al.*, 2009), ou en synthétisant des enzymes antioxydantes, qui diminuent les ROS excessifs et maintiennent la stabilité membranaire (Afridi *et al.*, 2019).

Les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes les plus élevées ont été enregistrées dans les cas inoculés par les différentes combinaisons dans les sols 1 et 2. Cependant dans le sol 3, malgré sa faible salinité par rapport au sol 2, les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes étaient plus faibles et similaires pour les différents traitements sauf pour la souche OR15 qui semblait améliorer la teneur en caroténoïdes. Ces résultats ont confirmé que les facteurs affectant le rendement des plantes ne se limitent pas uniquement à la teneur en chlorophylle et que l'efficacité photosynthétique est également liée à une série de facteurs (Simkin *et al.*, 2019). Sous stress de salinité dans le sol 2, la souche BR5 a provoqué une forte augmentation de la teneur en chlorophylle qui pourrait être due à la nature halotolérante de cette souche réduisant l'accumulation de sodium associée à une teneur en chlorophylle plus élevée. La réduction de la chlorophylle est peut-être liée à la sensibilité d'une des étapes de sa biosynthèse au chlorure de sodium. Ce dernier affecte moins la voie de biosynthèse de la chlorophylle b (Tewari et Singh, 1991).

L'analyse de la teneur en sucres solubles totaux a révélé que le stress salin augmente significativement la quantité de ces molécules dans la plante, essentiellement au niveau racinaire, dans le cas des sols 2 et 3. L'accumulation de sucres totaux chez les plantes stressées en sel est un moyen d'ajustement osmotique. Ces molécules jouent un rôle vital dans l'osmoprotection et le stockage du carbone (Parvaiz et Satyawati, 2008). Leur accumulation induite par le stress salin est encore renforcée par les PGPR. Cependant, cela est variable selon le type de traitement. Elle est significativement augmentée par l'inoculation avec les combinaisons RB13 ou BR5+RB13, OR15+RB13 ou BR5+OR15+RB13. L'augmentation des sucres totaux dans les plantes inoculées stressées est attribuée à une photosynthèse et à une dégradation de l'amidon plus élevées (Garg et Baher, 2013; Yu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015, 2018). Ainsi, une augmentation de la teneur en sucres totaux à la suite d'une inoculation ou une co-inoculation avec des PGPR contribue significativement à la croissance des plantes contre le stress salin en modulant les stratégies de défense.

Une augmentation de la teneur en protéines est enregistrée dans les plantes inoculées avec des PGPR. L'inoculation a amélioré la teneur en protéines, ce qui peut être dû à une diminution de l'effet de la salinité par les souches PGPR (Mohamed et Gomaa, 2012) et à une augmentation de l'absorption de N par la plante, qui est un constituant protéique important. L'augmentation de l'activité antioxydante réduit les dommages causés aux protéines et aux acides aminés (Ali *et al.*, 2017). De nombreuses études ont signalé une augmentation induite par les PGPR de la teneur en protéines des feuilles dans les céréales et les légumineuses (Islam *et al.*, 2013; Perez-Montaña *et al.*, 2014).

Les mécanismes de tolérance au stress salin incluent souvent l'accumulation de proline. Dans notre étude, les concentrations de proline foliaire et racinaire sont élevées chez les plantes cultivées en sol salin (sol 2). Il a été rapporté que la proline réduit la dénaturation enzymatique causée par le NaCl et d'autres stress. L'accumulation de proline atténue la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes induite par le stress salin. La proline est considérée non seulement comme un soluté compatible et un osmoprotecteur, mais aussi comme un piègeur de radicaux hydroxyles. Dans des conditions de stress, la proline stabilise les protéines, les membranes et les structures sous-cellulaires et protège les fonctions cellulaires en éliminant les ROS (Han et Lee, 2005; Ahmad *et al.*, 2014; Talaat et Shawky, 2014). L'inoculation a réduit l'accumulation de proline dans la plante cultivée dans le même sol. Les études sur l'impact des PGPR sur la concentration de proline dans les plantes stressées sont contradictoires. De nombreuses études ont rapporté que les niveaux de proline sont plus élevés dans les plantes inoculées par rapport aux plantes non inoculées tandis que

d'autres ont rapporté une teneur en proline plus faible dans les plantes inoculées avec les PGPR. Ces désaccords peuvent être dus aux différentes espèces bactériennes, au mécanisme de communication bactérienne avec la plante, à l'interaction entre bactéries et à l'intensité du stress salin. Outre son rôle d'osmoprotecteur, la proline est également considérée comme un marqueur de stress. En résumé, les plantes inoculées peuvent accumuler moins de proline à mesure que le stress est réduit (Rabie et Almadini, 2005; Sannazzaro *et al.*, 2007; Sapre *et al.*, 2018). Il n'y a pas de différence dans la teneur en proline entre les traitements d'inoculation et les témoins dans des conditions normales, ce qui était cohérent avec le résultat publié par García *et al.* (2017), indiquant que l'inoculation des PGPR n'a pas influencé la teneur en proline dans des conditions sans stress.

La peroxydation lipidique mesurée par les niveaux de MDA est un processus de dégradation oxydative des lipides qui entraîne la production de ROS. Les cibles les plus courantes de la peroxydation lipidique sont les membranes biologiques. Ces modifications entraînent des changements fonctionnels qui perturbent le métabolisme cellulaire (Khan *et al.*, 2019). Par conséquent, une augmentation de la peroxydation lipidique est considérée comme une indication d'une augmentation des dommages oxydatifs souvent appliquée pour estimer la tolérance des plantes à la salinité et à la sécheresse (Miao *et al.*, 2010). Dans la présente étude, une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau des feuilles dans les trois sols a été notée, cependant, le traitement PGPR a réduit les niveaux de MDA chez les plantes cultivées dans des sols salins. Des résultats comparables ont été rapportés sur des plants de concombre traités au PGPR sous stress hydrique (Wang *et al.*, 2012), sur du trèfle blanc (Han *et al.*, 2014) inoculés et cultivés en conditions salines (Bharti *et al.*, 2014). Une réduction significative de la teneur en MDA a été démontrée dans les plants de soja inoculés avec *Azospirillum brasilense* et *A. chroococcum* par rapport aux témoins non inoculés dans des conditions non stressées et de sécheresse (Zakikhani *et al.*, 2012). Cette réduction de la peroxydation lipidique est due au fait que les PGPR réduisent les dommages cellulaires causés par le stress abiotique et augmentent la tolérance au stress environnemental.

Les enzymes antioxydantes jouent un rôle essentiel dans la détoxification des effets destructeurs des ROS créés dans les plantes soumises à un stress hydrique ou salin. En conditions salines (Sol 2), les activités des enzymes APX, GPX et SOD sont plus intenses, tandis que celles de la CAT sont peu variables. Selon Upadhyay *et al.* (2012), l'activité des enzymes antioxydantes dans le blé est améliorée avec une concentration croissante de sel dans le sol. L'induction des activités enzymatiques de CAT, POX et APX sous stress salin est plus élevée chez les cultivars tolérant le sel (Siddiqui *et al.*, 2017). La diminution des activités

enzymatiques antioxydantes observée après l'inoculation de PGPR peut être attribuée à l'augmentation des effets indésirables du stress salin, réduisant ainsi la production de ROS. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Khan *et al.* (2019) qui ont rapporté que l'inoculation de PGPR réduit l'activité de la SOD chez les cultivars sensibles d'*Oryza sativa* et améliore la résistance au stress salin. Les résultats de la réduction de l'enzyme antioxydante APX, CAT et de la glutathion réductase (GR) à la suite du traitement du blé avec *B. subtilis* et *Arthrobacter* sp. dans des conditions de stress sont rapportés par Upadhyay *et al.* (2012). Au contraire, Singh et Jha (2017) ont montré que l'inoculation du blé avec *Stenotrophomonas maltophilia* augmentait les activités de SOD, CAT et POX dans des conditions salines. La meilleure conclusion que l'on puisse tirer de ces résultats quelque peu contradictoires est que chaque souche de PGPR a un potentiel enzymatique spécifique qui peut être exprimé ou supprimé dans des conditions environnementales normales ou stressantes. De plus, une bactérie peut avoir des effets différents lorsqu'elle interagit avec une plante. Les interactions des communautés microbiennes associées aux plantes sont complexes et leurs conséquences sur la santé des plantes définissent le microbiome qui peut favoriser la croissance de diverses manières (Kumar et Dubey, 2020).

## Conclusion

La recherche de solutions alternatives écologiques et respectueuses de l'environnement est nécessaire pour atténuer les effets nocifs du sel et améliorer la production végétale dans les écosystèmes extrêmes. Des mesures prometteuses pour améliorer la santé des plantes dans les sols salins sont l'utilisation d'inoculants microbiens, qui peuvent atténuer le stress salin, favoriser la croissance des plantes et contrôler les phytopathogènes.

Dans cette étude, 98 souches sont isolées de la rhizosphère, de l'endosphère des halophytes et du sol salé entourant trois Sebka à l'Est de l'Algérie. Sur la base de leurs potentialités PGP, dix souches les plus efficaces sont sélectionnées et testées pour leur tolérance à différentes conditions physico-chimiques; température, pH, sécheresse et salinité. Trois souches les plus performantes BR5, OR15 et RB13 identifiées comme *Bacillus atrophaeus* sont utilisées dans l'inoculation d'*Arabidopsis thaliana*, la germination des graines et la croissance du blé dur dans des conditions de stress salin.

Les résultats de l'inoculation d'*Arabidopsis thaliana* ont montré une augmentation significative des paramètres morphologiques et biochimiques de croissance sous stress salin et que l'effet des bactéries est visible soit pour la mono inoculation, ou pour les différentes combinaisons. Le traitement des graines de blé dur avec les souches bactériennes et leurs combinaisons a considérablement amélioré les paramètres de germination en présence et en absence de sel. Par ailleurs, les résultats expérimentaux sur la croissance végétale, obtenus en conditions contrôlées montrent que l'inoculation des graines de blé par les souches et leurs combinaisons confère une diminution de la susceptibilité vis-à-vis du sel. Les souches améliorent significativement les paramètres morphologiques (taille et masse pondérale foliaire et racinaire) et biochimiques (synthèse de pigments chlorophylliens, contenu en sucres totaux et en protéines) des plantes. Cependant, la teneur en proline, la peroxydation lipidique et l'activité des enzymes antioxydantes sont diminuées après inoculation par les PGPR attestant de leur capacité d'atténuer les effets néfastes du stress salin. La divergence constatée de ces résultats confirme la spécificité et la complexité de l'interaction plante /PGPR. Il est parfois difficile de prédire l'issue de ces interactions par rapport à l'activité microbienne et la croissance des plantes.

En effet, cette étude a étendu la gamme des souches PGPR halotolérantes ayant des résultats prometteurs et pouvant être utilisées comme bioengrais pour promouvoir la croissance des plantes et lutter contre les stress biotiques et abiotiques.

Pour compléter ce travail, d'autres travaux sont nécessaires pour explorer l'efficacité de ces PGPR dans des conditions salines sur le terrain. Des efforts pour identifier et décrire d'autres genres tolérants au stress et des études physiologiques et moléculaires afin de comprendre leurs mécanismes de tolérance sont aussi justifiés. L'identification des gènes régulateurs et des facteurs de transcription impliqués dans l'expression des voies de biosynthèse des régulateurs de stress présente également un grand intérêt.

Ces résultats encouragent de nouvelles recherches sur leur application à d'autres cultures stratégiques. Des recherches supplémentaires devraient être axées sur l'utilisation de ces HT-PGPR dans les champs agricoles affectés par le sel afin de promouvoir le développement d'inoculants bactériens en tant que biofertilisants commerciaux améliorant la tolérance à la salinité et la productivité des cultures. De plus, la technologie de nanoencapsulation a été récemment introduite et peut être appliquée pour des essais sur le terrain.

La taille du marché des stimulants de croissance des plantes est en plein essor mais devrait encore s'améliorer dans un avenir proche. La stratégie de développement selon la demande de ces bioengrais fournira donc une feuille de route pour la commercialisation de ces produits microbiens.

A l'avenir, les biostimulants impliquant les HT-PGPR et leurs métabolites devraient encore décoller et entrer sur le marché. Par conséquent, le développement de bioformulations à partir de ces PGPR peut être crucial pour lutter contre la salinité et améliorer le rendement des agro-écosystèmes affectés par le sel, conduisant à une meilleure productivité et durabilité.

## Références bibliographiques

- Abbas, G., Saqib, M., Akhtar, J., & Haq, M. A. U. (2015). Interactive effects of salinity and iron deficiency on different rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **178**(2), 306-311.
- Abbas, R., Rasul, S., Aslam, K., Baber, M., Shahid, M., Mubeen, F., & Naqqash, T. (2019). Halotolerant PGPR: A hope for cultivation of saline soils. *Journal of King Saud University-Science*, **31**(4), 1195-1201.
- Abd\_Allah, E. F., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Wirth, S., & Egamberdieva, D. (2017). Calcium application enhances growth and alleviates the damaging effects induced by Cd stress in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Plant Interactions*, **12**(1), 237-243.
- Abdul-Baki, A. A., & Anderson, J. D. (1973). Relationship between decarboxylation of glutamic acid and vigor in soybean seed 1. *Crop Science*, **13**(2), 227-232.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*, **105**, 121-126.
- Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2011). Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiolgy. In *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems* (pp. 1-36). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Afridi, M. S., Mahmood, T., Salam, A., Mukhtar, T., Mehmood, S., Ali, J., ... & Chaudhary, H. J. (2019). Induction of tolerance to salinity in wheat genotypes by plant growth promoting endophytes: Involvement of ACC deaminase and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **139**, 569-577.
- Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Baba-Moussa, F., Salami, H. A., Sina, H., Sèzan, A., ... & Baba-Moussa, L. (2015). Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from Maize (*Zea mays* L.) in central and Northern Benin (West Africa). *Applied and Environmental Soil Science*, 2015.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, **163**(2), 173-181.
- Ahmad, M. N., Mokhtar, M. N., Baharuddin, A. S., Hock, L. S., Ali, S. R. A., Abd-Aziz, S., ... & Hassan, M. A. (2011). Changes in physicochemical and microbial community during co-composting of oil palm frond with palm oil mill effluent anaerobic sludge. *BioResources*, **6**(4), 4762-4780.
- Ahmad, M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., ... & Ok, Y. S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Chemosphere*, **99**, 19-33.
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Khalid, M., Nazli, F., & Arshad, M. (2013). Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63**, 170-176.
- Ahmad, P., Rasool, S., Gul, A., Sheikh, S. A., Akram, N. A., Ashraf, M., ... & Gucel, S. (2016). Jasmonates: multifunctional roles in stress tolerance. *Frontiers in plant science*, **7**, 813.
- Ahmadvand, G., Soleimani, F., Saadatian, B., & Pouya, M. (2012). Effects of seed priming on germination and emergence traits of two soybean cultivars under salinity stress. *J. Basic Appl. Sci. Res*, **3**, 234-241.



## Références bibliographiques

- Ahmed, N. I. A. Z., Ahsen, S., Ali, M. A., Hussain, M. B., Hussain, S. B., Rasheed, M. K., ... & Danish, S. U. B. H. A. N. (2020). Rhizobacteria and silicon synergy modulates the growth, nutrition and yield of mungbean under saline soil. *Pak. J. Bot*, **52**(1), 9-15.
- Alem, C., & Amri, A. (2005). Importance de la stabilité des membranes cellulaires dans la tolérance à la salinité chez l'orge. *Reviews in Biology and Biotechnology*, **4**(1), 20-31.
- Alerwy, A. S. (2016). Effect of chemical, organic and bio fertilizers on photosynthetic pigments, carbohydrates and minerals of wheat (*Triticum aestivum*L.) irrigated with sea water.
- Ali, A., Ali, Q., Iqbal, M. S., Nasir, I. A., & Wang, X. (2020). Salt tolerance of potato genetically engineered with the *Atriplex canescens* BADH gene. *Biol. Plant*, **64**, 271-279.
- Ali, Q., Daud, M. K., Haider, M. Z., Ali, S., Rizwan, M., Aslam, N., ... & Zhu, S. J. (2017). Seed priming by sodium nitroprusside improves salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by enhancing physiological and biochemical parameters. *Plant physiology and biochemistry*, **119**, 50-58.
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, **80**, 160-167.
- Al-Karaki, G. N., Hammad, R., & Rusan, M. (2001). Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza*, **11**(1), 43-47.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, **8**, 971.
- Anonyme. (2004). Direction générale des Forêts. Atlas des zones humides d'importance internationale.
- Anonyme. (2005). Fiche descriptive sur les zones humides RAMSAR. Ministère de l'agriculture et du développement rural direction générale des forets. Algérie.
- Anonyme. (2008).FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- Anonyme. (2015). Status of the world's soil resources (SWSR)—main report. *Food and agriculture organization of the United Nations and intergovernmental technical panel on soils, Rome, Italy*, 650.
- Antoun, H., & Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1-38). Springer, Dordrecht.
- Arbona, V., Marco, A. J., Iglesias, D. J., López-Climent, M. F., Talon, M., & Gómez-Cadenas, A. (2005). Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted Citrus clementina L. *Plant Growth Regulation*, **46**(2), 153-160.
- Argandona, M., Fernández-Carazo, R., Llammas, I., Martínez-Checa, F., Caba, J. M., Quesada, E., & Moral, A. D. (2005). The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free-living diazotroph. *FEMS microbiology letters*, **244**(1), 69-74.
- Arora, N. K., Fatima, T., Mishra, J., Mishra, I., Verma, S., Verma, R., ... & Bharti, C. (2020). Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*.

## **Références bibliographiques**

- Arora, N. K., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 673-677.
- Asada, K. (2000). The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419-1431.
- Ashraf, M. (2004). Photosynthetic capacity and ion accumulation in a medicinal plant henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under salt stress. *Journal of applied botany*, 78(2), 91-96.
- Ashraf, M. H. P. J. C., & Harris, P. J. (2013). Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, 51(2), 163-190.
- Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, 166(1), 3-16.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., & Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of soils*, 40(3), 157-162.
- Balser, T. C., Kinzig, A. P., & Firestone, M. K. (2002). Linking soil microbial communities and ecosystem functioning. *The functional consequences of biodiversity: empirical progress and theoretical extensions*, 265-293.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., & Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by 'Arthrobacter' Sp. And 'Bacillus' sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*, 4(6), 378-383.
- Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 45(4), 405-413.
- Barea, J. M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van leeuwenhoek*, 81(1), 343-351.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2014). ACC deaminase-containing Arthrobacter protophormiae induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of plant physiology*, 171(11), 884-894.
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.
- Baset, M. M., Shamsuddin, Z. H., Wahab, Z., & Marziah, M. (2010). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured 'musa' plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Australian Journal of Crop Science*, 4(2), 85-90.
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. (2005). Bacteria/plant growth promotion. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Vol. 1 (Hillel D, ed).
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2002). Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum*

## Références bibliographiques

- brasiliense*, streptomycin sulfate, and chemo-thermal seed treatment. *European Journal of Plant Pathology*, **108**(9), 821-829.
- Ben Slama, H., Triki, M. A., Chenari Bouket, A., Ben Mefteh, F., Alenezi, F. N., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2019). Screening of the high-rhizosphere competent *Limoniastrum monopetalum*'culturable endophyte microbiota allows the recovery of multifaceted and versatile biocontrol agents. *Microorganisms*, **7**(8), 249.
- Berg, G., Alavi, M., Schmidt, C. S., Zachow, C., Egamberdieva, D., Kamilova, F., & Lugtenberg, B. (2013). Biocontrol and osmoprotection for plants under salinated conditions. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, **1**, 561-573.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A., & Samiyappan, R. (2004). Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, **23**(9), 835-843.
- Bharti, N., Barnawal, D., Awasthi, A., Yadav, A., & Kalra, A. (2014). Plant growth promoting rhizobacteria alleviate salinity induced negative effects on growth, oil content and physiological status in *Mentha arvensis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **36**(1), 45-60.
- Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K., & Kalra, A. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria *Dietziana tronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific reports*, **6**(1), 1-16.
- Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C. M., Agrawal, R. K., Frank, J., & Nierhaus, K. H. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectronmicroscopy. *Method Enzymol*, **317**, 292-309.
- Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **34**(1), 15-25.
- Blumwald, E., Grover, A., & Good, A. G. (2004, September). Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities. In *New directions for a diverse planet. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia* (pp. 1-15).
- Boncompagni, E., Østerås, M., Poggi, M. C., & le Rudulier, D. (1999). Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family Rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Applied and environmental microbiology*, **65**(5), 2072-2077.
- Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., ... & Triplett, E. W. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and environmental microbiology*, **62**(6), 1935-1943.
- Borriss, R. (2015). *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. In *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 379-391). Springer, Cham.
- Bringhurst, R. M., Cardon, Z. G., & Gage, D. J. (2001). Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(8), 4540-4545.
- Brugnoli, E., & Lauteri, M. (1991). Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 non-halophytes. *Plant physiology*, **95**(2), 628-635.

## Références bibliographiques

- Canaday, C. (2003, November). Biological Control of Soil Borne Plant Pathogens for Sustainable Agriculture. In *Annual Meeting of the Technical Committee S-302 Southern Regional Project, Ft. Lauderdale, FL. 23rd November*.
- Cappuccino JC, Sherman N. 1992. Negative staining. In: Cappuccino JC, Sherman N, editors *Microbiology: A Laboratory Manual*. Benjamin/Cummings: Redwood City. 125-179.
- Caravaca, F., Masciandaro, G., & Ceccanti, B. (2002). Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment. *Soil and Tillage Research*, **68**(1), 23-30.
- Carrillo, L., Martinez, M., Alvarez-Alfageme, F., Castanera, P., Smagghe, G., Diaz, I., & Ortego, F. (2011). A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic *Arabidopsis* plants. *Transgenic research*, **20**(2), 305-319.
- Carrillo, L., Palacios-Hernández, E., Yescas, M., & Ramírez-Manguilar, A. M. (2009). Spatial and seasonal patterns of salinity in a large and shallow tropical estuary of the Western Caribbean. *Estuaries and Coasts*, **32**(5), 906-916.
- Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M. H., & Masclaux-Daubresse, C. (2004). Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant and cell physiology*, **45**(11), 1681-1693.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Chakraborty, A. P., & Dey, P. L. (2013). Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **29**(5), 789-803.
- Chatterjee, P., Samaddar, S., Niinemets, Ü., & Sa, T. M. (2018). *Brevibacterium linens* RS16 confers salt tolerance to *Oryza sativa* genotypes by regulating antioxidant defense and H<sup>+</sup> ATPase activity. *Microbiological research*, **215**, 89-101.
- Chedlly, A., Öztürk, M., Ashraf, M., & Grignon, C. (Eds.). (2008). *Biosaline agriculture and high salinity tolerance*. Springer Science & Business Media. Basel, 367.
- Cheeseman, J. M. (1988). Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant physiology*, **87**(3), 547-550.
- Cheng, Z., Park, E., & Glick, B. R. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**(7), 912-918.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., ChenariBouket, A., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Bouremani, N., ... & Belbahri, L. (2021). Tailoring Next Generation Plant Growth Promoting Microorganisms as Versatile Tools beyond Soil Desalinization: A Road Map towards Field Application. *Sustainability*, **13**(8), 4422.
- Cherif-Silini, H., Thissera, B., Bouket, A. C., Saadaoui, N., Silini, A., Eshell, M., ... & Belbahri, L. (2019). Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *International journal of molecular sciences*, **20**(16), 3989.
- Choure, K., & Dubey, R. C. (2012). Development of plant growth promoting microbial consortium based on interaction studies to reduce wilt incidence in *Cajanus cajan* L. var. Manak. *World Journal of Agricultural Sciences*, **8**(1), 118-128.

## ***Références bibliographiques***

- Chowdhury, A. R. (2009). Recent advances in heavy metals induced effect on male reproductive function-A retrospective. *Al Ameen J Med Sci*, **2**(2), 37-42.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, **86**(6), 1637-1645.
- Coventry, D. R., & Evans, J. (1989). Symbiotic nitrogen fixation and soil acidity. *Soil acidity and plant growth.*, 103-137.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews*, **53**(1), 121-147.
- Damodaran, S., & Strader, L. C. (2019). Indole 3-butyric acid metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, **10**, 851.
- Dantas, B. F., Ribeiro, L. D. S., & Aragão, C. A. (2005). Physiological response of cowpea seeds to salinity stress. *Revista Brasileira de Sementes*, **27**(1), 144-148.
- Dardanelli, M. S., González, P. S., Medeot, D. B., Paulucci, N. S., Bueno, M. Á., & Garcia, M. B. (2009). Effects of peanut rhizobia on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. *Symbiosis*, **47**(3), 175-180.
- Dardanelli, M. S., Manyani, H., González-Barroso, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., Gil-Serrano, A. M., Espuny, M. R., ... & Ollero, F. J. (2010). Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant and soil*, **328**(1), 483-493.
- Del Río, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2003). Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB life*, **55**(2), 71-81.
- Delshadi, S., Ebrahimi, M., & Shirmohammadi, E. (2017). Influence of plant-growth-promoting bacteria on germination, growth and nutrients' uptake of *Onobrychis sativa* L. under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, **12**(1), 200-208.
- Dodd, I. C., & Pérez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, **63**(9), 3415-3428.
- Dotaniya, M. L., Meena, V. D., Basak, B. B., & Meena, R. S. (2016). Potassium uptake by crops as well as microorganisms. In *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (pp. 267-280). Springer, New Delhi.
- Dubey, P., Gupta, G. P., & Dubey, R. C. (2012). Culture filtrates of plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp.(Vigna) strains VR1 and VR2 inhibit growth and sclerotia germination of *Macrophomina phaseolina* in vitro. *New York Sci J*, **5**, 1-9.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, **28**(3), 350-356.
- Durán, R. E., Méndez, V., Rodríguez-Castro, L., Barra-Sanhueza, B., Salvà-Serra, F., Moore, E. R., ... & Seeger, M. (2019). Genomic and physiological traits of the marine bacterium *Alcaligenes aquatilis* QD168 isolated from Quintero Bay, Central Chile, reveal a robust adaptive response to environmental stressors. *Frontiers in microbiology*, **10**, 528.

## Références bibliographiques

- Dwivedi, S., Upadhyaya, H., Subudhi, P., Gehring, C., Bajic, V., Ortiz R. (2010). Enhancing abiotic stress tolerance in cereals through breeding and transgenic interventions. *In: Janick (ed) Plant Breeding Rev*, **33**, Wiley, Hoboken.
- Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, **16**(6), 269-275.
- Egamberdieva, D., & Kucharova, Z. (2009). Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biology and fertility of soils*, **45**(6), 563-571.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Wirth, S. J., Alam, P., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2018). Interactive effects of nutrients and *Bradyrhizobium japonicum* on the growth and root architecture of soybean (*Glycine max* L.). *Frontiers in microbiology*, **9**, 1000.
- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., & Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental microbiology*, **10**(1), 1-9.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in microbiology*, **10**, 2791.
- Egamberdieva, D.; Berg, G.; Lindström, K.; Räsänen, L.A. (2011). Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (Goat's Rue) by co-inoculation of *Rhizobium* with root colonizing *Pseudomonas*. *Plant Soil*, **369**, 453–465.
- Elsakhawy, T. A., Nashwa, A. H., & Ghazi, A. A. (2019). The potential use of ectoine produced by a moderately halophilic bacteria *Chromohalobacter salexigens* KT989776 for enhancing germination and primary seedling of flax "*Linum usitatissimum* L." under salinity conditions. *Biotechnology Journal International*, 1-12.
- EL-Shintinawy, F., & Hassanein, R. A. (2001). Changes in growth, protein patterns and DNA fingerprints of NaCl stressed treated with arginine, putrescine or phenylenediamine. *Egyptian J. Biotechnol*, **10**, 405-415.
- Etesami, H. (2018). Can interaction between silicon and plant growth promoting rhizobacteria benefit in alleviating abiotic and biotic stresses in crop plants?. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **253**, 98-112.
- Etesami, H., & Beattie, G. A. (2017). Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions. In *Probiotics and Plant Health* (pp. 163-200). Springer, Singapore.
- Etesami, H., & Beattie, G. A. (2018). Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Frontiers in microbiology*, **9**, 148.
- Etesami, H., Alikhani, H. A., & Akbari, A. A. (2009). Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. *World Appl Sci J*, **6**(11), 1576-1584.
- Evelin, H., Kapoor, R., & Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of botany*, **104**(7), 1263-1280.
- Fan, D., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2020). Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, **10**(1), 1-18.

## Références bibliographiques

- Farah, A.; Iqbal, A.; Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res*, **163**, 173–181.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368–376.
- Ferjani, R., Marasco, R., Rolli, E., Cherif, H., Cherif, A., Gtari, M., ... & Ouzari, H. I. (2015). The date palm tree rhizosphere is a niche for plant growth promoting bacteria in the oasis ecosystem. *BioMed research international*, 2015.
- Figueiredo, D. D., Batista, R. A., Roszak, P. J., Hennig, L., & Köhler, C. (2016). Auxin production in the endosperm drives seed coat development in *Arabidopsis*. *Elife*, **5**, e20542.
- Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, **37**(7), 604-612.
- Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental botany*, **55**(396), 307-319.
- Flowers, T. J., & Yeo, A. R. (1986). Ion relations of plants under drought and salinity. *Functional Plant Biology*, **13**(1), 75-91.
- Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, **37**(7), 604-612.
- Flowers, T. J., Troke, P. F., & Yeo, A. R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, **28**(1), 89-121.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemanno, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied microbiology and biotechnology*, **76**(5), 1145-1152.
- Galvan-Ampudia CS, Testerink C. (2011). Salt stress signals shape the plant root. *Curr Opin Plant Biol*, Jun; **14**(3), 296-302.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of microbiology*, **47**(5), 404-411.
- García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J. A., & Groppa, M. D. (2017). In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological research*, **202**, 21-29.
- Garg, N., & Baher, N. (2013). Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in proline biosynthesis and metabolism of *Cicer arietinum* L.(chickpea) genotypes under salt stress. *Journal of plant growth regulation*, **32**(4), 767-778.
- Gaur, A. C., & Mathur, R. S. (1990). Organic manures. *Soil fertility and fertilizer use. Vol IV. Nutrient management and supply system for sustaining agriculture in 1990s.*, 149-159.
- Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., Sachdev, M., Garg, A. P., ... & Varma, A. (2005). Mycorrhizosphere: strategies and functions. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (pp. 213-252). Springer, Berlin, Heidelberg.

## Références bibliographiques

- Giri, J. (2011). Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant signaling & behavior*, **6**(11), 1746-1751.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Métraux, J. P., ... & Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal*, **34**(2), 217-228.
- Glenn, E. P., Brown, J. J., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical reviews in plant sciences*, **18**(2), 227-255.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, **41**(2), 109-117.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, **169**(1), 30-39.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research*, 329-339.
- Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2004). The living soil: fundamentals of soil science and soil biology. *Science Publishers*.
- Golpayegani, A., & Tilebeni, H. G. (2011). Effect of biological fertilizers on biochemical and physiological parameters of basil (*Ocimum basilicum* L.) medicine plant. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, **11**(3), 445-450.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, **5**(4), 355-377.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, **2**(1).
- Goswami, L., Sarkar, S., Mukherjee, S., Das, S., Barman, S., Raul, P., ... & Bhattacharya, S. S. (2014). Vermicomposting of tea factory coal ash: metal accumulation and metallothionein response in *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource technology*, **166**, 96-102.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, **206**, 131-140.
- Grammann, K., Volke, A., and Kunte, H. J. (2002). New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM2581T. *Bacteriology* **184**, 3078–3085.
- Grattan, S. R., & Grieve, C. M. (1992). Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, ecosystems & environment*, **38**(4), 275-300.
- Groten, K., Dutilleul, C., van Heerden, P. D., Vanacker, H., Bernard, S., Finkemeier, I., ... &
- Foyer, C. H. (2006). Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS letters*, **580**(5), 1269-1276.



## Références bibliographiques

- Guo, J. H., Qi, H. Y., Guo, Y. H., Ge, H. L., Gong, L. Y., Zhang, L. X., & Sun, P. H. (2004). Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological control*, **29**(1), 66-72.
- Gupta, C. P., Sharma, A., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2001). Effect of metal ions on growth of *Pseudomonas aeruginosa* and siderophore and protein production.
- Gupta, C., Dubey, R., & Maheshwari, D. (2002). Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of soils*, **35**(6), 399-405.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J MicroBiochem Technol*, **7**(2), 096-102.
- Gupta, P., & De, B. (2017). Differential responses of cell wall bound phenolic compounds in sensitive and tolerant varieties of rice in response to salinity. *Plant signaling & behavior*, **12**(10), e1379643.
- Hall, M.A., Smith, A. R. (1995). Ethylene and the responses of plants to stress. *Bulg J Plant Physiol*, **21**, 71–79.
- Han, H. S., & Lee, K. D. (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**(3), 210-215.
- Han, Q. Q., Lü, X. P., Bai, J. P., Qiao, Y., Paré, P. W., Wang, S. M., ... & Wang, Z. L. (2014). Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 525.
- Hashem, A., Abd\_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., AL-Huqail, A. A., Alshalawi, S. R. M., Wirth, S., et al. (2015). Impact of plant growth promoting *Bacillus subtilis* on growth and physiological parameters of *Bassia indica* (Indian bassia) grown under salt stress. *Pak. J. Bot.* **47**, 1735–1741.
- Hashem, A., Abd\_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Al-Huqail, A. A., & Shah, M. A. (2016). Induction of osmoregulation and modulation of salt stress in *Acacia gerrardii* Benth. by arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus subtilis* (BERA 71). *BioMed research international*, 2016.
- Hasnain, S., Akhtar, N., and Sabri, A. N. (1996). Alleviation of Cadmium Toxicity and Growth Enhance Effect of *Helianthus annuus* and *Triticum aestivum* Seedlings through Bacterial Inoculation. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci*, **19**(2/3), 163-169.
- Heidari, M., & Jamshid, P. (2010). Interaction between salinity and potassium on grain yield, carbohydrate content and nutrient uptake in pearl millet. *J Agric Biol Sci*, **5**, 39-46.
- Heidari, M., Mousavinik, S. M., & Golpayegani, A. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) effect on physiological parameters and mineral uptake in basil (*Ocimum basilicum* L.) under water stress. *Journal of Agricultural and Biological Science*, **6**(5), 6-11.
- Heijden, M., G. A., V., Bardgett RD, van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, **11**(3), 296-310.
- Herrera-Medina, M. J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo Bote, J. A., & García Garrido, J. M. (2007). Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, **175**(3), 554-564.

## Références bibliographiques

- Hiltner, L. (1904). Über nevereErfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unterbesondererBeurchsichtigung der Grundungung und Broche. *Arbeit. Deut. Landw. Ges. Berlin*, **98**, 59-78.
- Himabindu, Y., Chakradhar, T., Reddy, M. C., Kanygin, A., Redding, K. E., & Chandrasekhar, T. (2016). Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environmental and Experimental Botany*, **124**, 39-63.
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, **64**(3), 624-653.
- Hirt, H., K. Shinozaki. (2004). *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer, Berlin – Heidelberg - New York – Hong Kong – London – Milan – Paris – Tokyo.
- Huang, J., & Redmann, R. E. (1995). Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Plant Science*, **75**(4), 815-819.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2004). Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution*, **130**(3), 453-463.
- Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., & Asgher, M. (2014). Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat?. *International Journal of Agriculture and Biology*, **16**(1).
- Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1768.
- Ilyas, N., &Bano, A. (2012). Potential use of soil microbial community in agriculture. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 45-64). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Islam, M. R., Sultana, T., Joe, M. M., Yim, W., Cho, J. C., & Sa, T. (2013). Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *Journal of basic microbiology*, **53**(12), 1004-1015.
- Jha, Y., & Subramanian, R. B. (2014). PGPR regulate caspase-like activity, programmed cell death, and antioxidant enzyme activity in paddy under salinity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **20**(2), 201-207.
- Joseph, B., Patra, R. R., & Lawrence, R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, **1**(2), 141-152.
- Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2017). Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Frontiers in microbiology*, **8**, 2593.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in plant science*, **6**, 151.
- Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Hussain, J., Joo, G. J., You, Y. H., ... & Lee, I. J. (2012). Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones. *Journal of microbiology*, **50**(6), 902-909.

## Références bibliographiques

- Kang, S. M., Khan, A. L., Waqas, M., You, Y. H., Kim, J. H., Kim, J. G., ... & Lee, I. J. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *Journal of Plant Interactions*, **9**(1), 673-682.
- Karadeniz, A., Topcuoğlu, Ş. F., & Inan, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**(10), 1061-1064.
- Kasotia, A., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2016). Amelioration of soybean plant from saline-induced condition by exopolysaccharide producing *Pseudomonas*-mediated expression of high affinity K<sup>+</sup>-transporter (HKT1) gene. *Current Science*, 1961-1967.
- Katoh, K., & Toh, H. (2008). Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC bioinformatics*, **9**(1), 1-13.
- Kaushal, M., & Wani, S. P. (2016). Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in dry lands. *Annals of Microbiology*, **66**(1), 35-42.
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Ullah, I., Ali, S., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2019). Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. *Annals of Microbiology*, **69**(8), 797-808.
- Khan, M. H., & Panda, S. K. (2008). Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **30**(1), 81-89.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol*, **16**, 111-120.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablutowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, **7**(2), 39-44.
- Köhl, K. I. (1997). The effect of NaCl on growth, dry matter allocation and ion uptake in salt marsh and inland populations of *Armeria maritima*. *The New Phytologist*, **135**(2), 213-225.
- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in microbial physiology*, **71**, 97-132.
- Körner, C. (2000). Biosphere responses to CO<sub>2</sub> enrichment. *Ecological applications*, **10**(6), 1590-1619.
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, **27**(8), 724-725.
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, **63**(4), 1593-1608.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Koyro, H.W., Abdelly, C. (2010). Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. *Adv. Bot. Res.* **53**, 117-145
- Kukreja, S., Nandwal, A. S., Kumar, N., Sharma, S. K., Unvi, V., & Sharma, P. K. (2005). Plant water status, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biologia Plantarum*, **49**(2), 305-308.
- Kumar, A., & Dubey, A. (2020). Rhizosphere microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. *Journal of Advanced Research*.

## Références bibliographiques

- Kumar, A., Singh, S., Gaurav, A. K., Srivastava, S., & Verma, J. P. (2020). Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 1216.
- Kumar, A., Verma, H., Singh, V. K., Singh, P. P., Singh, S. K., Ansari, W. A., ... & Pandey, K. D. (2017). Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. In *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture* (pp. 195-215). Springer, Singapore.
- Kumar, N. R., Arasu, V. T., & Gunasekaran, P. (2002). Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*, 1463-1466.
- Kylin, A., & Quatrano, R. S. (1975). Metabolic and biochemical aspects of salt tolerance. In *Plants in saline environments* (pp. 147-167). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., ... & Laplaze, L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in plant science*, **18**(8), 450-458.
- Le Houerou, H. N. (1993). Salt-tolerant plants for the arid regions of the Mediterranean isoclimatic zone. In *Towards the rational use of high salinity tolerant plants* (pp. 403-422). Springer, Dordrecht.
- Li, Y. Q., Zhao, H. L., Yi, X. Y., Zuo, X. A., & Chen, Y. P. (2006). Dynamics of carbon and nitrogen storages in plant-soil system during desertification process in Horqin sandy land. *Huanjingkexue=Huanjingkexue*, **27**(4), 635-640.
- Liu, R., Dai, M., Wu, X., Li, M., & Liu, X. (2012). Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. *Mycorrhiza*, **22**(4), 289-296.
- Liu, X., Wei, W., Zhu, W., Su, L., Xiong, Z., Zhou, M., ... & Zhou, D. X. (2017). Histone deacetylase AtSRT1 links metabolic flux and stress response in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, **10**(12), 1510-1522.
- Loper, J. E., & Schroth, M. N. (1986). Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, **76**(4), 386-389.
- Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum*, **1**(2), 142-146.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, **193**, 265-275.
- Luchi, N., Ghelardini, L., Belbahri, L., Quartier, M., & Santini, A. (2013). Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by quantitative real-time PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(17), 5394-5404.
- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, **86**(1), 1-25.
- Lugtenberg, B. J., Malfanova, N., Kamilova, F., & Berg, G. (2013). Plant growth promotion by microbes. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, **2**, 561-573.
- Mahmood, S., Daur, I., Al-Solaimani, S. G., Ahmad, S., Madkour, M. H., Yasir, M., ... & Ali, Z. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria and silicon synergistically enhance salinity tolerance of mung bean. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 876.

## Références bibliographiques

- Mantelin, S., Desbrosses, G., Larcher, M., Tranbarger, T. J., Cleyet-Marel, J. C., & Touraine, B. (2006). Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta*, **223**(3), 591-603.
- Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., ... & Borin, S. (2013). Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMedresearch international*, 2013.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., et al. (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS ONE* **7**:e48479.
- Marasco, R., Rolli, E., Vigani, G., Borin, S., Sorlini, C., Ouzari, H., ... & Daffonchio, D. (2013). Are drought-resistance promoting bacteria cross-compatible with different plant models?. *Plant signaling & behavior*, **8**(10), e26741.
- Marques, A. P., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A. O., & Castro, P. M. (2010). Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**(8), 1229-1235.
- Martínez, C., Espinosa-Ruiz, A., & Prat, S. (2016). Gibberellins and plant vegetative growth. *Annual Plant Reviews online*, 285-322.
- Masouleh, S. S. S., Aldine, N. J., & Sassine, Y. N. (2019). The role of organic solutes in the osmotic adjustment of chilling-stressed plants (vegetable, ornamental and crop plants). *Ornamental Horticulture*, **25**, 434-442.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., & Défago, G. (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, **88**(7), 678-684.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, **166**(2), 525-530.
- Meftah, F., B., ChenariBouket, A., Daoud, A., Luptakova, L., N Alenezi, F., Gharsallah, N., & Belbahri, L. (2019). Metagenomic Insights and Genomic Analysis of *Phosphogypsum* and Its Associated Plant Endophytic Microbiomes Reveals Valuable Actors for Waste Bioremediation. *Microorganisms*, **7**(10), 382.
- Meldau, D. G., Meldau, S., Hoang, L. H., Underberg, S., Wünsche, H., & Baldwin, I. T. (2013). Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. *The Plant Cell*, **25**(7), 2731-2747.
- Miao, Y., Stewart, B.A., Zhang, F., 2010. Long-term experiments for sustainable nutrient management in China. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **31**, 397-414
- Miri, A., Gholamalizadeh Ahangar, A., Ghorbani, M., & Shirmohammadi, E. (2016). The effect of PGPR and alfalfa extract on macronutrient and micronutrient contents of sorghum (*Sorghum vulgare*). *Iran Agricultural Research*, **35**(2), 96-103.
- Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, **125**, 35-45.

## Références bibliographiques

- Mishra, P. K., Bisht, S. C., Ruwari, P., Joshi, G. K., Singh, G., Bisht, J. K., & Bhatt, J. C. (2011). Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *European Journal of Soil Biology*, **47**(1), 35-43.
- Mishra, P. K., Mishra, S., Selvakumar, G., Bisht, S. C., Bisht, J. K., Kundu, S., & Gupta, H. S. (2008). Characterisation of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas. *Annals of Microbiology*, **58**(4), 561-568.
- Misra, S., Dixit, V. K., Khan, M. H., Mishra, S. K., Dwiwedi, G., Yadav, S., ... & Chauhan, P. S. (2017). Exploitation of agro-climatic environment for selection of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase producing salt tolerant indigenous plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, **205**, 25-34.
- Mlaik, N., Bakonyi, J., Borsodi, A., Woodward, S., Belbahri, L., & Mechichi, T. (2015). Microbial diversity in tanning wastewaters treatment reactors. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, **34**(2), 401-410.
- Mohamed, H. I., & Gomaa, E. Z. (2012). Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica*, **50**(2), 263-272.
- Molina-Montenegro, M. A., Oses, R., Torres-Díaz, C., Atala, C., Zurita-Silva, A., & Ruiz-Lara, S. (2016). Root-endophytes improve the ecophysiological performance and production of an agricultural species under drought condition. *AoB Plants*, **8**.
- Muis, A., & Quimio, A. J. (2006). Biological control of banded leaf and sheath blight disease (*Rhizoctonia solani* Kuhn) in corn with formulated *Bacillus subtilis* BR23. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, **7**(1), 1-7.
- Muneer, S., Park, Y. G., Manivannan, A., Soundararajan, P., & Jeong, B. R. (2014). Physiological and proteomic analysis in chloroplasts of *Solanum lycopersicum* L. under silicon efficiency and salinity stress. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**(12), 21803-21824.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, **25**(2), 239-250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, **167**(3), 645-663.
- Munns, R. (2009). Strategies for crop improvement in saline soils. In *Salinity and water stress* (pp. 99-110). Springer, Dordrecht.
- Munns, R., & Rawson, H. M. (1999). Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. *Functional Plant Biology*, **26**(5), 459-464.
- Nadeem, S. M., Naveed, M., Ahmad, M., & Zahir, Z. A. (2015). Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects. In *Plant microbes symbiosis: applied facets* (pp. 1-36). Springer, New Delhi.
- Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., & Nawaz, S. (2013). Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Annals of Microbiology*, **63**(1), 225-232.

## **Références bibliographiques**

- Nascimento, F. X., Brígido, C., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2016). The role of rhizobial ACC deaminase in the nodulation process of leguminous plants. *International Journal of Agronomy*, 2016.
- Nautiyal, C. S., Srivastava, S., Chauhan, P. S., Seem, K., Mishra, A., & Sopory, S. K. (2013). Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **66**, 1-9.
- Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., ... & Rodríguez-Llorente, I. D. (2017). Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology*, **19**(2), 249-256.
- Naz, I., Bano, A., & Ul-Hassan, T. (2009). Isolation of phytohormones producing plant growth promoting rhizobacteria from weeds growing in Khewra salt range, Pakistan and their implication in providing salt tolerance to Glycine max L. *African Journal of Biotechnology*, **8**(21).
- Nikalje, G. C., Srivastava, A. K., Pandey, G. K., & Suprasanna, P. (2017). Halophytes in biosaline agriculture: Mechanism, utilization, and value addition. *Land Degradation & Development*, **29**(4), 1081-1095.
- Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanohoun, A., & Baba-Moussa, L. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*, **15**(27), 1452-1463.
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. K., Khan, A. L., ... & Ahmed, A. H. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. *Microbiological research*, **209**, 21-32.
- Nunkaew, T., Kantachote, D., Kanzaki, H., Nitoda, T., & Ritchie, R. J. (2014). Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA)-containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, **17**(1), 4-4.
- Omar, S. A., Abdel-Sater, M. A., Khallil, A. M., & Abd-Alla, M. H. (1994). Growth and enzyme activities of fungi and bacteria in soil salinized with sodium chloride. *Folia Microbiologica*, **39**(1), 23-28.
- Ondrasek, G., Rengel, Z., Romić, D., & Savic, R. (2010). Environmental salinisation processes in agroecosystem of Neretva River estuary. *Növénytermelés*, **59**, 223-226.
- Ondrasek, G., Rengel, Z., Romić, D., Poljak, M., & Romić, M. (2009). Accumulation of non/essential elements in radish plants grown in salt-affected and cadmium-contaminated environment. *Cereal Research Communications*, **37**, 9-12.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28**(1), 56-63.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, **4**(1), 1-13.
- Orhan, F. (2016). Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian journal of microbiology*, **47**, 621-627.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*, **4**(8), 701-712.

## Références bibliographiques

- Panuccio, M. R., Jacobsen, S. E., Akhtar, S. S., & Muscolo, A. (2014). Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa. *AoB plants*, *6*.
- Panwar, M., Tewari, R., Gulati, A., & Nayyar, H. (2016). Indigenous salt-tolerant rhizobacterium *Pantoeadispersa* (PSB3) reduces sodium uptake and mitigates the effects of salt stress on growth and yield of chickpea. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(12), 1-12.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, *60*(3), 324-349.
- Parks, G. E., Dietrich, M. A., & Schumaker, K. S. (2002). Increased vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, *53*(371), 1055-1065.
- Parvaiz, A., & Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant Soil and Environment*, *54*(3), 89.
- Patel, T., & Saraf, M. (2017). Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their *in vitro* plant growth-promoting efficacy. *Journal of Plant Interactions*, *12*(1), 480-487.
- Pathak, R., Shrestha, A., Lamichhane, J., & Gauchan, D. P. (2017). PGPR in biocontrol: mechanisms and roles in disease suppression. *Int J Agron Agric*, *11*(1), 69-80.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, *68*(8), 3795-3801.
- Paul, D., & Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for sustainable development*, *34*(4), 737-752.
- Pegler, J. L., Grof, C. P., & Eamens, A. L. (2018). Profiling of the differential abundance of drought and salt stress-responsive microRNAs across grass crop and genetic model plant species. *Agronomy*, *8*(7), 118.
- Pérez-Montaña, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, *169*(5-6), 325-336.
- Petersen, D. J., Srinivasan, M., & Chanway, C. P. (1996). *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *FEMS Microbiology Letters*, *142*(2-3), 271-276.
- Phour, M., & Sindhu, S. S. (2020). Amelioration of salinity stress and growth stimulation of mustard (*Brassica juncea* L.) by salt-tolerant *Pseudomonas* species. *Applied Soil Ecology*, *149*, 103518.
- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A 1 and A 3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, *64*(2), 207-210.
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., & Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and fertility of soils*, *51*(4), 403-415.



## Références bibliographiques

- Pinter, I. F., Salomon, M. V., Berli, F., Bottini, R., & Piccoli, P. (2017). Characterization of the As (III) tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to in vitro-grown grapevine. *Applied Soil Ecology*, **109**, 60-68.
- Pinton, R. (2001). The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. *The Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-plant Interface*, 1-17.
- Pliego, C., Kamilova, F., & Lugtenberg, B. (2011). Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. In *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems* (pp. 295-343). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. In *Plant-associated bacteria* (pp. 195-230). Springer, Dordrecht.
- Porcel, R., Aroca, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2012). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **32**(1), 181-200.
- Poupin, M. J., Timmermann, T., Vega, A., Zuñiga, A., & González, B. (2013). Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **8**(7), e69435.
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2013). Biocontrol of plant pathogens using plant growth promoting bacteria. In *Sustainable agriculture reviews* (pp. 319-360). Springer, Dordrecht.
- Qin, Y., Druzhinina, I. S., Pan, X., & Yuan, Z. (2016). Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances*, **34**(7), 1245-1259.
- Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2013). Osmolyte accumulation in moderately halophilic bacteria improves salt tolerance of chickpea. *Pak J Bot*, **45**(3), 1011-1016.
- Rabhi, N. E. H., Silini, A., Cherif-Silini, H., Yahiaoui, B., Lekired, A., Robineau, M., ... & Sanchez, L. (2018). *Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of applied microbiology*, **125**(6), 1836-1851.
- Rabie, G. H., Aboul-Nasr, M. B., & Al-Humiany, A. (2005). Increase salinity tolerance of cowpea plants by dual inoculation of AM fungus *Glomus clarum* and nitrogen-fixer *Azospirillum brasilense*. *Mycobiology*, **33**(1), 51-61.
- Radhakrishnan, R., & Baek, K. H. (2017). Physiological and biochemical perspectives of non-salt tolerant plants during bacterial interaction against soil salinity. *Plant physiology and biochemistry*, **116**, 116-126.
- Rahman, S., Matsumuro, T., Miyake, H., & Takeoka, Y. (2000). Salinity-induced ultrastructural alterations in leaf cells of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, **3**(4), 422-429.
- Raj, S. N., Deepak, S. A., Basavaraju, P., Shetty, H. S., Reddy, M. S., & Kloepper, J. W. (2003). Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop protection*, **22**(4), 579-588.
- Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, **2**(1), 1-7.
- Rangasamy, G., & Bagyaraj, D. J. (2002). *Agricultural microbiology*, printice Hall of India Pvt. Ltd., New Delh, 1-422.

## Références bibliographiques

- Rathinasabapathi, B. (2000). Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, **86**(4), 709-716.
- Razmjoo, K. H. O. R. S. H. I. D., Heydarizadeh, P. A. R. I. S. A., & Sabzalian, M. R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *Int. J. Agric. Biol*, **10**(4), 451-454.
- Recep, K., Fikretin, S., Erkol, D., & Cafer, E. (2009). Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. *Biological Control*, **50**(2), 194-198.
- Redman, R. S., Kim, Y. O., Woodward, C. J., Greer, C., Espino, L., Doty, S. L., & Rodriguez, R. J. (2011). Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. *PLOS one*, **6**(7), e14823.
- Rekik, I., Chaabane, Z., Missaoui, A., Bouket, A. C., Luptakova, L., Elleuch, A., & Belbahri, L. (2017). Effects of untreated and treated wastewater at the morphological, physiological and biochemical levels on seed germination and development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), alfalfa (*Medicago sativa* L.) and fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Journal of hazardous materials*, **326**, 165-176.
- Rengasamy, P. (2002). Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **42**(3), 351-361.
- Rengasamy, P. (2006). Soil salinity and sodicity. *Growing crops with reclaimed wastewater*, 125-138.
- Riedelsberger, J., & Blatt, M. R. (2017). Roots—the hidden provider. *Frontiers in plant science*, **8**, 1021.
- Riggs, P. J., Chelius, M. K., Iniguez, A. L., Kaeppler, S. M., & Triplett, E. W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*, **28**(9), 829-836.
- Rigó, G., Valkai, I., Faragó, D., Kiss, E., Van Houdt, S., Van de Steene, N., ... & Szabados, L. (2016). Gene mining in halophytes: functional identification of stress tolerance genes in *Lepidium crassifolium*. **39**(9), 2074-2084.
- Rima, F. S., Biswas, S., Sarker, P. K., Islam, M. R., & Seraj, Z. I. (2018). Bacteria endemic to saline coastal belt and their ability to mitigate the effects of salt stress on rice growth and yields. *Annals of Microbiology*, **68**(9), 525-535.
- Roberts, M. F. (2000). Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci*, **5**(362), 796-812.
- Rodrigo, M., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., ... & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, **332**(6033), 1097-1100.
- Rodriguez, R., & Durán, P. (2020). Natural holobiome engineering by using native extreme microbiome to counteract the climate change effects. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **8**, 568.
- Roeber -Mueller, B., & Pical, C. (2001). Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant physiology*, **130**(1), 22-46.

## Références bibliographiques

- Rogers, W. E., & Siemann, E. (2005). Herbivory tolerance and compensatory differences in native and invasive ecotypes of Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). *Plant Ecology*, **181**(1), 57-68.
- Rolfe, S. A., Griffiths, J., & Ton, J. (2019). Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Current opinion in microbiology*, **49**, 73-82.
- Rosas, S. B., Andrés, J. A., Rovera, M., & Correa, N. S. (2006). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(12), 3502-3505.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, **19**(8), 827-837.
- Ryu, H., & Cho, Y. G. (2015). Plant hormones in salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology*, **58**(3), 147-155.
- Sáenz-Mata, J., Palacio-Rodríguez, R., Sánchez-Galván, H., & Balagurusamy, N. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria associated to halophytes: potential applications in agriculture. In *Sabkha Ecosystems* (pp. 411-425). Springer, Cham.
- Saghafi, D., Delangiz, N., Lajayer, B. A., & Ghorbanpour, M. (2019). An overview on improvement of crop productivity in saline soils by halotolerant and halophilic PGPRs. *3 Biotech*, **9**(7), 1-14.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, **21**(1), 30.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual review of Ecology and Systematics*, **29**(1), 319-343.
- Sairam, R. K., & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current science*, 407-421.
- Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses; induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia plantarum*, **151**(4), 359-374.
- Sandhya, V. S. K. Z., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation*, **62**(1), 21-30.
- Sannazzaro, A. I., Echeverría, M., Albertó, E. O., Ruiz, O. A., & Menéndez, A. B. (2007). Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**(1), 39-46.
- Sapre, S., Gontia-Mishra, I., & Tiwari, S. (2018). *Klebsiella* sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). *Microbiological research*, **206**, 25-32.
- Saravanakumar, D. (2012). Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. *Bacteria in agrobiolology: stress management*, 187-204.

## Références bibliographiques

- Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2007). ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of applied microbiology*, **102**(5), 1283-1292.
- Sardinha, M., Müller, T., Schmeisky, H., & Joergensen, R. G. (2003). Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. *Applied Soil Ecology*, **23**(3), 237-244.
- Sarkar, A., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., & Maiti, T. K. (2018). Enhancement of growth and salt tolerance of rice seedlings by ACC deaminase-producing Burkholderia sp. MTCC 12259. *Journal of plant physiology*, **231**, 434-442.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., & Jackson, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, **94**(11), 1267-1271.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, **160**(1), 47-56.
- Seckin, B., Sekmen, A. H., & Türkan, I. (2009). An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in roots of wheat under salt stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**(1), 12-20.
- Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., ... & Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **106**, 236-243.
- Sharifi, R., & Ryu, C. M. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany*, **122**(3), 349-358.
- Sharma, A., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2016). Potassium-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in potassium solubilization and uptake. In *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (pp. 203-219). Springer, New Delhi.
- Shibli, R. A., Kushad, M., Yousef, G. G., & Lila, M. A. (2007). Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant growth regulation*, **51**(2), 159-169.
- Shukla, P. S., Agarwal, P. K., & Jha, B. (2012). Improved salinity tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. *Journal of plant growth regulation*, **31**(2), 195-206.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, **160**(1), 47-56.
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G. H., & Sa, T. M. (2010). Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**(11), 1577-1584.
- Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., jong Yim, W., & Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**(4), 427-434.

## Références bibliographiques

- Siddiqui, M. N., Mostofa, M. G., Akter, M. M., Srivastava, A. K., Sayed, M. A., Hasan, M. S., & Tran, L. S. P. (2017). Impact of salt-induced toxicity on growth and yield-potential of local wheat cultivars: oxidative stress and ion toxicity are among the major determinants of salt-tolerant capacity. *Chemosphere*, **187**, 385-394.
- Silini, A., Cherif-Silini, H., & Yahiaoui, B. (2016). Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *African Journal of Microbiology Research*, **10**(12), 387-399.
- Silini, A., Silini-Cherif, H., & Ghoul, M. (2012). Effect of *Azotobacter vinelandii* and compatible solutes on germination wheat seeds and root concentrations of sodium and potassium under salt stress. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, **15**(3), 132-140.
- Simkin, A. J., López-Calcagno, P. E., & Raines, C. A. (2019). Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *Journal of Experimental Botany*, **70**(4), 1119-1140.
- Singh, R. P., & Jha, P. N. (2017). The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. *Frontiers in microbiology*, **8**, 1945.
- Singh, R., Pandey, D. K., Kumar, A., & Singh, M. (2017). PGPR isolates from the rhizosphere of vegetable crop *Momordica charantia*: characterization and application as biofertilizer. *Int J Curr Microbiol App Sci*, **6**(3), 1789-1802.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African journal of agricultural research*, **9**(16), 1265-1277.
- Slama, H. B., Cherif-Silini, H., ChenariBouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., ... & Belbahri, L. (2019). Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in microbiology*, **9**, 3236.
- Sleator, R. D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS microbiology reviews*, **26**(1), 49-71.
- Smyth, E. M., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M. R., Dow, J. M., O'gara, F., & Doohan, F. M. (2011). *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal of applied microbiology*, **111**(3), 683-692.
- Solano, B. R., Maicas, J. B., & Mañero, F. G. (2008). Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley, Weinheim, Germany, 41-52.
- Soliman, W. S., Fujimori, M., Tase, K., & Sugiyama, S. I. (2012). Heat tolerance and suppression of oxidative stress: Comparative analysis of 25 cultivars of the C3 grass *Lolium perenne*. *Environmental and experimental botany*, **78**, 10-17.
- Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*, **30**(4), 205-240.
- Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E., ... & Cherif, A. (2016). Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*, **405**(1), 357-370.

## Références bibliographiques

- Srivastava, R. A. J. A. N. I., & Singh, A. N. S. H. I. K. A. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. *Article International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*.
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS microbiology reviews*, **24**(4), 487-506.
- Suárez, N., & Medina, E. (2005). Salinity effect on plant growth and leaf demography of the mangrove, *Avicennia germinans* L. *Trees*, **19**(6), 722-728.
- Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M. D. C., Cevallos, M. A., ... & Iturriaga, G. (2008). Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**(7), 958-966.
- Sudharani, M., Shivaprakash, M. K., & Prabhavathi, M. K. (2014). Role of consortia of biocontrol agents and PGPR's in the production of cauliflower under field condition. *Trends in Biosciences*, **7**(22), 3542-3546.
- Sukweenadhi, J., Balusamy, S. R., Kim, Y. J., Lee, C. H., Kim, Y. J., Koh, S. C., & Yang, D. C. (2018). A growth-promoting bacteria, *Paenibacillus yonginensis* DCY84T enhanced salt stress tolerance by activating defense-related systems in *Panax ginseng*. *Frontiers in plant science*, **9**, 813.
- Suralta, R. R., Kano-Nakata, M., Niones, J. M., Inukai, Y., Kameoka, E., Tran, T. T., ... & Yamauchi, A. (2018). Root plasticity for maintenance of productivity under abiotic stressed soil environments in rice: Progress and prospects. *Field Crops Research*, **220**, 57-66.
- Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., ... & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 171.
- Takahashi, T., & Kakehi, J. I. (2009). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of botany*, **105**(1), 1-6.
- Talaat, N. B., & Shawky, B. T. (2014). Modulation of the ROS-scavenging system in salt-stressed wheat plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of plant nutrition and soil science*, **177**(2), 199-207.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725– 2729.
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of botany*, **91**(5), 503-527.
- Tewari, S., & Arora, N. K. (2018). Role of salicylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* PF23 EPS+ in growth promotion of sunflower in saline soils infested with phytopathogen *Macrophomina phaseolina*. *Environmental Sustainability*, **1**(1), 49-59.
- Tewari, T. N., & Singh, B. B. (1991). Sodicity-induced changes in chlorophyll, nitrate and nitrite reductase, nucleic acids, proline, yield and yield components in lentil. *Plant Soil* **13t**, 225-230.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in plant science*, **8**, 49.

## Références bibliographiques

- Tiwari, G., Duraivadivel, P., Sharma, S., & Hariprasad, P. (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing beneficial rhizobacteria ameliorate the biomass characters of *Panicum maximum* Jacq. by mitigating drought and salt stress. *Scientific reports*, **8**(1), 1-12.
- Tiwari, S., Singh, P., Tiwari, R., Meena, K. K., Yandigeri, M., Singh, D. P., & Arora, D. K. (2011). Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. *Biology and Fertility of soils*, **47**(8), 907-916.
- TrParray, A. P., Jan, S., Kamili, A. N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., and Ahmad, P. (2016). Current perspectives on plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Growth Regul.***35**, 877–902.
- Tsukanova, K. A., Meyer, J. J. M., & Bibikova, T. N. (2017). Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African journal of botany*, **113**, 91-102.
- Tufail, M. A., Bejarano, A., Shakoor, A., Naeem, A., Arif, M. S., Dar, A. A., ... & Puopolo, G. (2021). Can Bacterial Endophytes Be Used as a Promising Bio-Inoculant for the Mitigation of Salinity Stress in Crop Plants?—A Global Meta-Analysis of the Last Decade (2011–2020). *Microorganisms*, **9**(9), 1861.
- Türkan, I., & Demiral, T. (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **67**(1), 2-9.
- Upadhyay, S. K., & Singh, D. P. (2015). Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biology*, **17**(1), 288-293.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, **21**(2), 214-222.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K., & Singh, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, **14**(4), 605-611.
- Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2016). PGPR-mediated expression of salt tolerance gene in soybean through volatiles under sodium nitroprusside. *Journal of basic microbiology*, **56**(11), 1274-1288.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, **206**(4), 1196-1206.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, **21**(5), 573.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, **255**(2), 571-586.
- Vijayan, K., Chakraborti, S. P., Ercisli, S., & Ghosh, P. D. (2008). NaCl induced morpho-biochemical and anatomical changes in mulberry (*Morus* spp.). *Plant Growth Regulation*, **56**(1), 61-69.
- Vivas, A., Marulanda, A., Ruiz-Lozano, J. M., Barea, J. M., & Azcón, R. (2003). Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza*, **13**(5), 249-256.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International journal of molecular sciences*, **19**(4), 952.
- Walker, V., Couillerot, O., Von Felten, A., Bellvert, F., Jansa, J., Maurhofer, M., ... & Comte, G. (2012). Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with

## Références bibliographiques

- Azospirillum, Pseudomonas and Glomus consortium under field conditions. *Plant and soil*, **356**(1), 151-163.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**(1), 1-14.
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., & Wang, R. (2012). Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant and soil*, **351**(1), 107-119.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany*, **88**(6), 967-988.
- Wutipraditkul, N., Wongwean, P., & Buaboocha, T. (2015). Alleviation of salt-induced oxidative stress in rice seedlings by proline and/or glycinebetaine. *Biologia plantarum*, **59**(3), 547-553.
- Xiong, L., & Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, cell & environment*, **25**(2), 131-139.
- Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in plant science*, **10**(12), 615-620.
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, **14**(1), 1-4.
- Yasin, N. A., Akram, W., Khan, W. U., Ahmad, S. R., Ahmad, A., & Ali, A. (2018). Halotolerant plant-growth promoting rhizobacteria modulate gene expression and osmolyte production to improve salinity tolerance and growth in *Capsicum annum* L. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**(23), 23236-23250.
- Yu, X. M., Yu, T., Yin, G. H., Dong, Q. L., An, M., Wang, H. R., & Ai, C. X. (2015). Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. *Genet Mol Res*, **14**(4), 14717-30.
- Yue, H., Mo, W., Li, C., Zheng, Y., & Li, H. (2007). The salt stress relief and growth promotion effect of Rs-5 on cotton. *Plant and Soil*, **297**(1), 139-145.
- Zafar-ul-Hye, M., Danish, S., Abbas, M., Ahmad, M., & Munir, T. M. (2019). ACC deaminase producing PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* and *Agrobacterium fabrum* along with biochar improve wheat productivity under drought stress. *Agronomy*, **9**(7), 343.
- Zahir, Z. A., & Arshad, M. (2004). Perspective in agriculture. *Advances in agronomy*, **81**, 97.
- Zahir, Z. A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S. M., & Asghar, H. N. (2009). Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Archives of microbiology*, **191**(5), 415-424.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2009). Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. *Microbial strategies for crop improvement*, 23-50.
- Zakikhani, H., Ardakani, M. R., Rejali, F., Gholamhoseini, M., Joghian, A. K., & Dolatabadian, A. (2012). Influence of diazotrophic bacteria on antioxidant enzymes and some biochemical characteristics of soybean subjected to water stress. *Journal of Integrative Agriculture*, **11**(11), 1828-1835.



## **Références bibliographiques**

Zhou, N., Zhao, S., & Tian, C. Y. (2017). Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS microbiology letters*, **364**(11), fnx091.

Zhu, F., Qu, L., Hong, X., & Sun, X. (2011). Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Zhu, H., Zhao, S., Lu, X., He, N., Gao, L., Dou, J., ... & Liu, W. (2018). Genome duplication improves the resistance of watermelon root to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **133**, 11-21.

Zhu, J. K. (2007). Plant salt stress. *eLS*.

Zhu, N., Cheng, S., Liu, X., Du, H., Dai, M., Zhou, D. X., ... & Zhao, Y. (2015). The R2R3-type MYB gene OsMYB91 has a function in coordinating plant growth and salt stress tolerance in rice. *Plant Science*, **236**, 146-156.

## **Annexes**

### **Annexe 1: Trypticase Soja Agar (TSA)**

Tryptone	15 g
Peptone papainique de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	7,3 ± 0,2

### **Annexe 2: Gélose de Pikovskaya.**

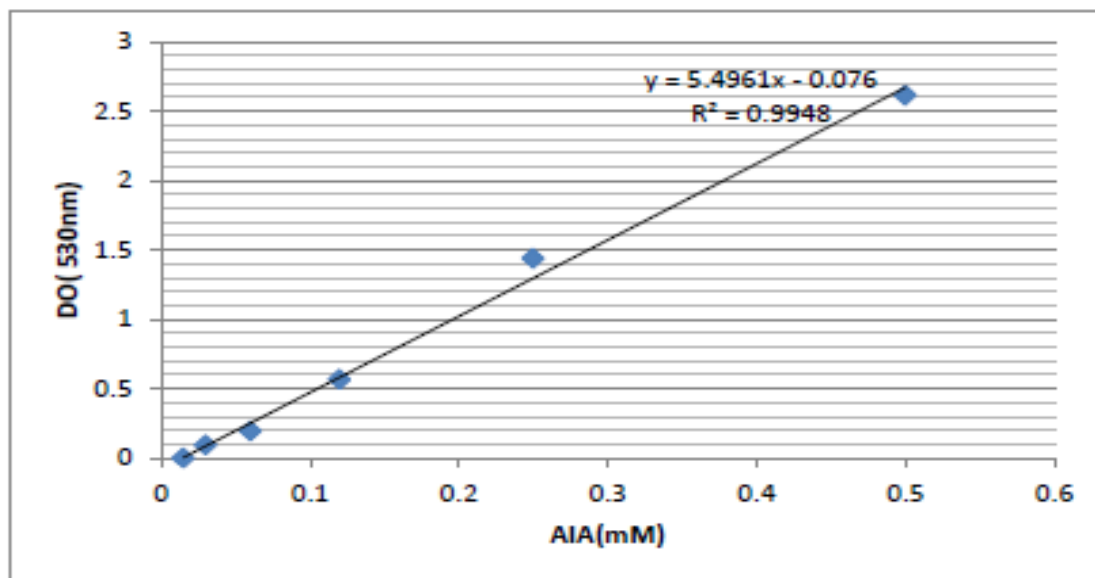
Glucose	10g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5g
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	5g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,25g
KCl	0,2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1g
Agar - agar	15g
Eau distillée	1000mL

### **Annexe 3: Bouillon Luria-Bertani (LB)**

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Chlorure de sodium	0,5g
Eau distillée	1000ml

**Annexe 4: La courbe d'étalonnage de l'AIA**

A partir d'une solution de l'AIA ( $10^{-3}M$ ), les dilutions 2- 3- 4- 5- 10- 15- 20- 50-100 sont effectuées. 1ml de chaque dilution préparée est mélangé à 2 ml de réactif de Salkowski. Après 30 min, la concentration de l'AIA est mesurée par spectrophotométrie à 530nm.

**Annexe 5: Milieu de CAS (Chrome Azurol S)**

Le milieu utilisé est décrit par Schwyn et Neilands (1987). Ce dernier est préparé en mélangeant 2,7 mg de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  dissous dans 10 ml de HCl 10 mM avec 65.6 mg/l de chrome Azurol S (CAS) dissous auparavant dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange, de couleur violette foncée, est ajouté très lentement sous agitation à 72.8 mg de HDTMA (Hexaméthylammoniumbromure) dissous dans 40 ml d'eau distillée. La solution bleu foncé obtenue est autoclavée à 121 °C/15 min. Un autre mélange est préparé en dissolvant 30,24 g du tampon de Pipes et 15 g d'agar dans 750 ml d'eau. Le pH de cette solution est ajusté au pKa de Pipes (6,8) en ajoutant le KOH 50% (w/v).

**Annexe 6: Milieu de King B**

Peptone de caséine	10g
Glycérol	10ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5g
$K_2HPO_4$	1,5g
Agar -agar	15 g
Eau distillée	1000ml

**Annexe 7: La gélose au lait écrémé**

Peptone de caséine	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Solution de lait écrémé	7 %
Agar-agar	15 g
Eau distillée	1000ml

**Annexe 8: gélose de chitine**

Bouillon nutritif	1,62 g
NaCl	0,5g
Chitine	8g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

**Annexe 9: Gélose d'amidon à 1 %.**

Peptone	5g
Amidon (1%)	10g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

**Annexe 10: Milieu Winogradsky solide exempt d'azote**

Une solution stock	5ml
D-glucose	0.5g
CaCO <sub>3</sub>	0.1g
Eau distillée	1000ml
pH	6.2 ajusté avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

**Composition de solution stock:**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25g
NaCl	25g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1g

MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

**Annexe 11: Gélose PDA (Potato-Dextrose agar)**

Extrait de pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	5,4

**Annexe 12: Le milieu Murashige–Skoog au ½ (milieu MS)**

**Sels minéraux**

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/l
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440 mg/l
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370 mg/l
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27,8 mg/l
KNO <sub>3</sub>	1.900 mg/l
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22,3 mg/l
KI	0,83 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	37,2 mg/lb

**Additifs organiques communs**

i-Inositol	100 mg/l
Acidenicotinique	0,5 mg/l

Pyridoxine / HCl	0,5 mg/l
Thiamine / HCl	0,1 mg/l
AIA	1-30 mg/l
Kinétine	0,04-10 mg/l
Glycine	2,0 mg/l
Édamine	1,0 g/l
Saccharose	15 g/l
Agar	8 g/l

**Annexe 13: AIA production ( $\mu\text{g/ml}$ ) de souches de différents endroits A) Sebkha Bazer Sakhra, B) Oum El Bouaghi et C) Baniou.**

Sebkha Bazer Sakhra	
BSN 1	4.54 $\pm$ 0.075
BSN 2	3.87 $\pm$ 0.057
BSN 3	3.67 $\pm$ 0.023
BSN 4	3.67 $\pm$ 0.023
BSN 5	3.93 $\pm$ 0.2
BSN 6	2.82 $\pm$ 0.02
BSN 7	2.82 $\pm$ 0.031
BR1	2.82 $\pm$ 0.054
BR 2	3.77 $\pm$ 0.037
BR 3	3.77 $\pm$ 0.054
BR 4	3.61 $\pm$ 0.037
BR 5	11.67 $\pm$ 0.046
BR 6	2.86 $\pm$ 0.049
BR 7	3.38 $\pm$ 0.037
BR 8	4.09 $\pm$ 0.04
BR 9	4.29 $\pm$ 0.04

BR 10	5.67±0.046
BE 1	3.32±0.023
BE 2	8.67±0.046
BE 3	4.74±0.06
BE 4	3.51±0.051
Oum El Bouaghi	
OSN 1	3.12±0.023
OSN 2	5.54±0.049
OSN 3	3.19±0.025
OSN 4	3.35±0.037
OSN 5	3.25±0.031
OSN 6	3.41±0.04
OSN 7	2.93±0.025
OSN 8	3.22±0.057
OSN 9	4.41±0.017
OR 1	3.93±0.028
OR 2	3.06±0.025
OR 3	7.41±0.026
OR 4	3.45±0.037
OR 5	4.22±0.034
OR 6	4.19±0.025
OR 7	2.83±0.031
OR 8	7.8±0.04
OR 9	3.58±0.031
OR 10	4.03±0.02
OR 11	3.16±0.034
OR 12	3.45±0.04

OR 13	3.64±0.04
OR 14	10.06±0.031
OR 15	13.83±0.04
OR 16	12.67±0.054
OR 17	4.12±0.034
OR 18	3.54±0.054
OR 19	4.03±0.017
OR 20	4.45±0.037
OR 21	6.77±0.049
OE 1	3.22±0.034
OE 2	3.51±0.04
OE 3	4.06±0.031
OE 4	3.93±0.023
<b>Baniou</b>	
SNB 1	4.35±0.037
SNB 2	3.64±0.043
SNB 3	3.58±0.051
SNB 4	4±0.049
SNB 5	3.61±0.043
SNB 6	3.45±0.037
SNB 7	2.96±0.077
SNB 8	3.06±0.046
SNB 9	3.25±0.049
SNB 10	3.38±0.043
SNB 11	3.03±0.052
RB 1	3.25±0.037
RB 2	8.03±0.04



*Annexes*

RB 3	3.38±0.037
RB 4	3.83±0.046
RB 5	3.16±0.031
RB 6	3.2±0.046
RB 7	4.64±0.043
RB 8	4.83±0.034
RB 9	3±0.06
RB 10	3.64±0.049
RB 11	5.61±0.046
RB 12	2.93±0.043
RB 13	9.93±0.054
EB 1	4.22±0.04
EB 2	3.09±0.017
EB 3	3.03±0.034
EB 4	3±0.054
EB 5	3.25±0.046
EB 6	2.35±0.04
EB 7	2.32±0.054

يوجد اهتمام كبير بتخفيف ملوحة التربة التي تحد من نمو النبات وإنتاجيته. في هذه الدراسة، تم عزل تسعة وثمانين سلالة تم جمعها من ريزوسفير واندوسفير من نوعين من الهالوفيت (*Suaeda mollis*) و (*Salsola tetrandra*) من ثلاثة شطوط في الجزائر. تم فحصها لثنتي الصفات التي تعزز نمو النباتات والنشاط المضاد للفطريات ومقاومة الظروف الفيزيائية الكيميائية المختلفة (pH, PEG, NaCl) لتقييم كفاءتها في تخفيف التوتر الملحي وتعزيز نمو الـ *Arabidopsis thaliana* والقمح الصلب تحت ظروف اجهاد الملح. اخيرا تم اختيار ثلاث سلالات بكتيرية BR5 و OR15 و RB13 وتم تحديدها باسم *Bacillus atrophaeus*. ثم استخدمت السلالات البكتيرية (بشكل منفصل و موحد) في تلقيح *Arabidopsis thaliana* والقمح الصلب في مرحلة إنبات البذور تحت ظروف اجهاد الملح. وأشارت النتائج إلى أن تلقيح كل من نوعي النبات بالسلالات البكتيرية بشكل منفصل أو مجتمعة حسنت كثيرا معالم النمو. استخدمت ثلاثة ترب ذات مستويات ملوحة مختلفة (S1 = 0.48، S2 = 3.81، S3 = 2.80 mS/cm) لدراسة آثار السلالات المختارة (BR5 و OR15 و RR13، بشكل منفصل ومدمج) على عدة معالم نمو لنبات القمح. وقد ثبت أن التلقيح (لا سيما الاتحاد متعدد السلالات) هو النهج الأفضل لزيادة محتويات الكلورو فيريل والكاروتينويد مقارنة بالنباتات الشاهدة. ومع ذلك، انخفض محتوى البرولين، بيروكسيد الدهون، وأنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة بعد التلقيح بيكتيريا تعزيز النمو النباتي (PGPR). *plant growth promoting rhizobacteria* الذي يمكن أن يخفف من الآثار السلبية لإجهاد الملح عن طريق الحد من أنواع الأكسجين التفاعلي (ROS). وأشارت هذه النتائج إلى أنه في ظل ظروف التربة المالحة، فإن سلالات PGPR المقاومة للملحة تعد مترشحات واعدة كمخصبات حيوية في ظل ظروف إجهاد الملح.

**الكلمات المفتاحية:** PGPR؛ مقاومة الملوحة؛ *Arabidopsis thaliana*؛ القمح الصلب؛ هندسة الريزوسفير؛ AIA (حمض اندول الخليك).

## Résumé

Il existe un grand intérêt pour l'atténuation de la salinité du sol qui limite la croissance et la productivité des plantes. Dans cette étude, 98 souches sont isolées de la rhizosphère et de l'endosphère de deux espèces d'halophytes (*Suaeda mollis* et *Salsola tetrandra*) prélevées dans trois chotts en Algérie. Elles sont analysées pour divers caractères favorisant la croissance des plantes, l'activité antifongique et la tolérance aux différentes conditions physicochimiques (pH, PEG et NaCl) pour évaluer leur efficacité dans l'atténuation du stress salin et l'amélioration de la croissance d'*Arabidopsis thaliana* et de blé dur dans des conditions de stress salin. Trois souches bactériennes BR5, OR15 et RB13 sont finalement sélectionnées et identifiées comme *Bacillus atrophaeus*. Les souches bactériennes (séparément et combinées) sont ensuite utilisées pour inoculer *Arabidopsis thaliana* et le blé dur dans des conditions de stress salin. Les souches bactériennes (séparément et combinées) sont ensuite utilisées pour inoculer l'*Arabidopsis thaliana* et le blé dur au stade de germination des semences dans des conditions de stress salin. Les résultats indiquent que l'inoculation des deux espèces de plantes avec les souches bactériennes séparément ou combinées améliorent considérablement les paramètres de croissance. Trois sols présentant des niveaux de salinité différents (S1 = 0,48, S2 = 3,81 et S3 = 2,80 mS/cm) sont utilisés pour étudier les effets de souches sélectionnées (BR5, OR15 et RB13; séparément et combinées) sur plusieurs paramètres de croissance des plants de blé. L'inoculation (notamment le groupe multi souches) a prouvé une meilleure approche pour augmenter la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes par rapport aux plantes témoins. Cependant, la teneur en proline, la peroxydation lipidique et les activités des enzymes antioxydantes sont diminuées après inoculation avec les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes (PGPR) et qui peuvent atténuer les effets néfastes du stress salin en réduisant la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Ces résultats indiquent que dans des conditions de sol salin, les souches PGPR halotolérantes sont des candidats promoteurs comme biofertilisants.

**Mots clés:** bactéries favorisant la croissance des plantes; tolérance à la salinité; *Arabidopsis thaliana*; blé dur; ingénierie de la rhizosphère; acide indole acétique (AIA).

## Abstract

There is a great interest in mitigating soil salinity that limits plant growth and productivity. In this study, 98 strains were isolated from the rhizosphere and endosphere of two halophyte species (*Suaeda mollis* and *Salsola tetrandra*) collected from three chotts in Algeria. They were screened for diverse plant growth-promoting traits, antifungal activity and tolerance to different physicochemical conditions (pH, PEG, and NaCl) to evaluate their efficiency in mitigating salt stress and enhancing the growth of *Arabidopsis thaliana* and durum wheat under NaCl-stress conditions. Three bacterial strains BR5, OR15, and RB13 were finally selected and identified as *Bacillus atrophaeus*. The Bacterial strains (separately and combined) were then used for inoculating *Arabidopsis thaliana* and durum wheat during the seed germination stage under NaCl stress conditions. Results indicated that inoculation of both plant spp. with the bacterial strains separately or combined considerably improved the growth parameters. Three soils with different salinity levels (S1 = 0.48, S2 = 3.81, and S3 = 2.80 mS/cm) were used to investigate the effects of selected strains (BR5, OR15, and RB13; separately and combined) on several growth parameters of wheat plants. The inoculation (notably the multi-strain consortium) proved a better approach to increase the chlorophyll and carotenoid contents as compared to control plants. However, proline content, lipid peroxidation, and activities of antioxidant enzymes decreased after inoculation with the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) that can attenuate the adverse effects of salt stress by reducing the reactive oxygen species (ROS) production. These results indicated that under saline soil conditions, halotolerant PGPR strains are promising candidates as biofertilizers under salt stress conditions.

**Keywords:** plant growth promoting bacteria; salinity tolerance; *Arabidopsis thaliana*; durum wheat; rhizosphere engineering; indole acetic acid (IAA).

## Article

# Mitigation of NaCl Stress in Wheat by Rhizosphere Engineering Using Salt Habitat Adapted PGPR Halotolerant Bacteria

Souhila Kerbab <sup>1</sup>, Allaoua Silini <sup>1</sup>, Ali Chenari Bouket <sup>2</sup>, Hafsa Cherif-Silini <sup>1</sup>, Manal Eshelli <sup>3</sup>,  
Nour El Houda Rabhi <sup>1</sup> and Lassaad Belbahri <sup>4,5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas of Setif, 19000 Setif, Algeria; s.kerbab@univ-batna2.dz (S.K.); siliniallaoua@univ-setif.dz (A.S.); cherifhafsa@yahoo.fr (H.C.-S.); n.rabhi@centre-univ-mila.dz (N.E.H.R.)
- <sup>2</sup> East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Plant Protection Research Department, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz 5355179854, Iran; a.chenari@areeo.ac.ir
- <sup>3</sup> Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, University of Tripoli, 13275 Tripoli, Libya; m.eshelli@hotmail.com
- <sup>4</sup> NextBiotech, 98 Rue Ali Belhouane, Agareb 3030, Tunisia
- <sup>5</sup> Laboratory of Soil Biology, University of Neuchatel, 2000 Neuchatel, Switzerland
- \* Correspondence: lassaad.belbahri@unine.ch

**Abstract:** There is a great interest in mitigating soil salinity that limits plant growth and productivity. In this study, eighty-nine strains were isolated from the rhizosphere and endosphere of two halophyte species (*Suaeda mollis* and *Salsola tetrandra*) collected from three chotts in Algeria. They were screened for diverse plant growth-promoting traits, antifungal activity and tolerance to different physico-chemical conditions (pH, PEG, and NaCl) to evaluate their efficiency in mitigating salt stress and enhancing the growth of *Arabidopsis thaliana* and durum wheat under NaCl-stress conditions. Three bacterial strains BR5, OR15, and RB13 were finally selected and identified as *Bacillus atropheus*. The *Bacterial strains* (separately and combined) were then used for inoculating *Arabidopsis thaliana* and durum wheat during the seed germination stage under NaCl stress conditions. Results indicated that inoculation of both plant spp. with the bacterial strains separately or combined considerably improved the growth parameters. Three soils with different salinity levels (S1 = 0.48, S2 = 3.81, and S3 = 2.80 mS/cm) were used to investigate the effects of selected strains (BR5, OR15, and RB13; separately and combined) on several growth parameters of wheat plants. The inoculation (notably the multi-strain consortium) proved a better approach to increase the chlorophyll and carotenoid contents as compared to control plants. However, proline content, lipid peroxidation, and activities of antioxidant enzymes decreased after inoculation with the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) that can attenuate the adverse effects of salt stress by reducing the reactive oxygen species (ROS) production. These results indicated that under saline soil conditions, halotolerant PGPR strains are promising candidates as biofertilizers under salt stress conditions.

**Keywords:** plant growth promoting bacteria; salinity tolerance; *Arabidopsis thaliana*; durum wheat; rhizosphere engineering; indole acetic acid



**Citation:** Kerbab, S.; Silini, A.; Chenari Bouket, A.; Cherif-Silini, H.; Eshelli, M.; El Houda Rabhi, N.; Belbahri, L. Mitigation of NaCl Stress in Wheat by Rhizosphere Engineering Using Salt Habitat Adapted PGPR Halotolerant Bacteria. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1034. <https://doi.org/10.3390/app11031034>

Academic Editor: Stefano Castiglione

Received: 6 January 2021

Accepted: 20 January 2021

Published: 24 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Salinity is a serious problem that limits plant growth and productivity [1–3], hampers agricultural economy, and leads to serious land degradation in many countries [1,3,4]. About 900 million ha, 20% of the irrigated land and 6% of global land mass are affected by salinity. Moreover, according to the Food and Agricultural Organization (FAO) salinization of arable land will be increasing in the future if effective solutions are not applied [5]. Salinity deleterious effects on plant growth and development include water deficit within

the plant, ion toxicity mainly  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ , reduction of nutrient uptake and/or transport to the shoot that leads to nutritional imbalance [3], production and accumulation of reactive oxygen species (ROS) [1], ethylene generation and plasmolysis. These physiological imbalances limit seed germination, seedling growth, flowering and fruit set in consequence [6].

Biotic stresses including pathogens are also seriously threatening plant productivity and fruit quality [7,8]. Chemical treatment, while effective in limiting plant pathogens deleterious infections, is more and more criticized and replaced by biocontrol strategies [4]. Highly multifaceted and versatile biocontrol agents are being described and developed in formulations that allow their efficient use as biofertilizers [3].

Rhizosphere engineering through the use of plant growth-promoting rhizobacteria is a valuable strategy that allows crop tolerance to salinity and subsequent promotion of plant productivity and yield under saline condition [3,4,9]. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) stimulate plant growth [10] with two different lifestyles: free-living soil bacteria associated with the root surface of many different plant species referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) [4,11,12] and those that live inside host plant tissues [3,4,13]. Stimulation of plant growth by PGPB would be provided either through indirect or direct mechanisms [10]. Indirect mechanisms include prevention of the deleterious effects of phytopathogenic organisms by induction of systemic resistance (ISR), the synthesis of antimicrobial compounds, and the release of volatile organic compounds [3,4]. Direct promotion of plant growth may occur by atmospheric nitrogen fixation and subsequent supply to plants, secretion of siderophores, synthesis of phytohormones such as indole acetic acid (IAA), phosphate solubilization, and synthesis of enzymes that can modulate plant ethylene levels [3,14].

*Arabidopsis thaliana* is the model plant used for examining PGPB impacts on plants along with agronomically important crops e.g., wheat (*Triticum durum*). The use of both plants is highly relevant for the investigation of plant growth promotion mechanisms utilizing model crops and the proof of concept of applying non-tractable agronomically important crops to highlight their possible applications in the field.

The present investigation aimed to recover bacterial isolates from halophytes, their rhizosphere and NaCl affected surrounding soil from three salt marshes. Recovered endophytes, PGPR, and marsh soil bacteria were evaluated for different stress and plant growth-promoting (PGP) traits, including temperature, pH, PEG, and high NaCl tolerance. The selected bacteria were then used as biofertilizers and tested for their ability to mitigate salt stress in *Arabidopsis thaliana* and durum wheat (*Triticum durum* cv. Waha).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sampling and Isolation of Bacteria from Saline Soils

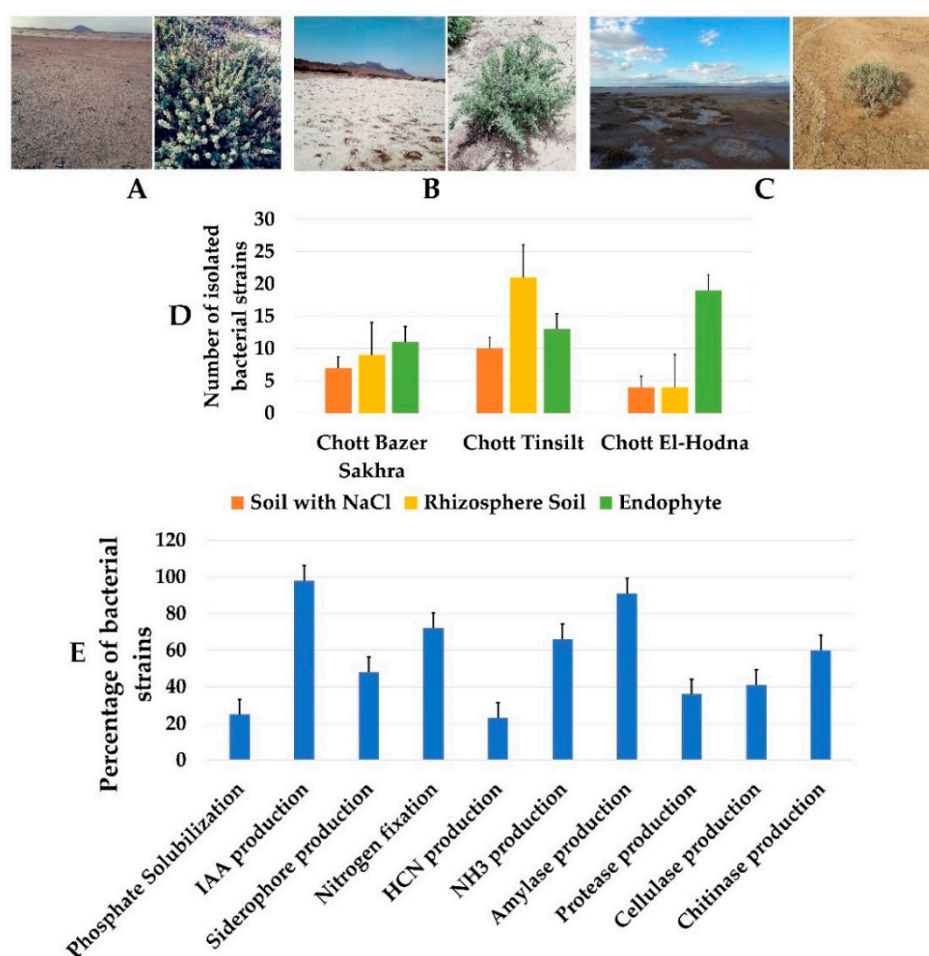
Given the adaptation of the inoculant to a particular ecosystem, the strains used in this study were isolated from three saline sites. The chemical and physical properties of examined soil are given in Table 1. Based on their predominance in Sebkhah, the halophytes *Suaeda mollis* (Bazer Sakhra Sebkhah and Oum El-Bouaghi Sebkhah) (Figure 1A,B) and *Salsola tetrandra* (Baniou Sebkhah) (Figure 1C) were chosen for the isolation of bacteria. Three samples from each site were taken: the rhizosphere (soil adhering to roots), the endophytes (inside the roots), and the non-rhizosphere soil (not affected by the halophyte plant roots). The samples were collected in sterile containers, kept cool, and transported to the laboratory.

Bacterial isolation from soil samples was performed according to the method described by Cherif-Silini et al. [3]. Endophytic bacteria isolation was performed by washing the halophyte plant roots with tap water to eliminate the adhering soil and sterilized by immersion in ethanol 70% for 5 min and in sodium hypochlorite solution 2% for 30 min following by several washes with sterile distilled water. To check the efficiency of root disinfection, the final washing water was spread on nutrient agar and the plates were incubated at 30 °C for 48 h. Surface disinfected roots (1 g) were then ground in 10 mL

sterile NaCl (9 g/L) solution. A serial dilution up to  $10^{-6}$  of the samples were plated on Trypticase Soy Agar medium. The plates were then incubated at  $28 \pm 2$  °C for 24 to 48 h and the colonies showing morphological differences were selected and spread on agar medium to obtain pure colonies.

**Table 1.** Chemical and physical properties of examined soils.

Bacteria Sampling Site	Site	Halophytes	Electrical Conductivity (mS/cm)	pH
Bazer Sakhra Sebkha	Bazer Sakhra Chott (36.0505803° N, 5.6805708° E)	<i>Suaeda mollis</i>	$30.34 \pm 0.525$	$8.055 \pm 0.015$
Oum El Bouaghi Sebkha	Tinsilt Chott (35.8852354° N, 6.4414962° E)	<i>Suaeda mollis</i>	$22.95 \pm 0.145$	$7.99 \pm 0.14$
Baniou Sebkha	El Hodna Chott (35.479223° N, 4.366587° E)	<i>Salsola tetrandra</i>	$25.56 \pm 0.465$	$7.995 \pm 0.014$



**Figure 1.** Locations (A) Chott Bazer Sakhra, (B) Chott Tinsilt, (C) Chott El-Honda, and related plants that bacterial isolates recovered from them. (D) Number of bacterial strains isolated from different habitats (soil with NaCl, rhizospheric soil, and endophytes) in three locations. (E) Percentage of PGP activities of recovered bacterial isolates.

## 2.2. In Vitro Screening of Isolates for Plant Growth-Promoting (PGP) Activities

### 2.2.1. Phosphate Solubilization

Phosphate solubilization was determined by the culturing the isolates in the Pikovskaya's agar medium [3]. Plates were then incubated at  $28 \pm 2$  °C for 7 days and monitored for halo formation surrounding bacterial colonies [3]. For quantitative estimation of phosphate solubilization, isolates were inoculated in 25 mL Pikovskaya's broth and incubated for

5 days at  $28 \pm 2$  °C. The bacterial cultures were centrifuged at 9000 rpm for 30 min and the resulting supernatant (1 mL) was mixed with 10 mL of chloromolybdic acid and the volume adjusted to 45 mL with sterile distilled water. Chlorostannous acid (0.25 mL) was then added to the mixture and the volume adjusted to 50 mL with sterile distilled water. The absorbance of the developing blue color was read at 600 nm. The amount of soluble phosphorus was estimated through comparison to a standard curve made using a variable of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [4].

#### 2.2.2. Quantitative Estimation of Indole Acetic Acid

Indole-3-acetic acid (IAA) production was quantitatively evaluated by growing bacterial isolates in Luria-Bertani broth supplemented with 2 mg/mL tryptophan as a precursor of IAA and incubated for 4 days at  $28 \pm 2$  °C. The bacterial culture was centrifuged at 3000 rpm for 30 min. An aliquot of 2 mL supernatant was mixed with 100 µL of orthophosphoric acid and 4 mL of Salkowski's reagent (50 mL, 35% of perchloric acid, and 1 mL  $\text{FeCl}_3$  0.5 M solution) and incubated in darkness for 1 h. Development of pink color indicated IAA production and the absorbance was read at 530 nm. To determine IAA concentration in the supernatant a calibration curve of pure IAA as a standard was used [4].

#### 2.2.3. Siderophore Production

Strains were examined for siderophore production using Chrome Azurol S (CAS) agar medium following the standard method of Slama et al. [4]. Bacterial isolates were grown under iron-restricted King's B agar medium at  $28 \pm 2$  °C for 24–48 h. After incubation CAS reagent in 0.9%, agar was spread in a thin layer over the isolated colonies and re-incubated at  $28 \pm 2$  °C for 24–48 h. Development of yellow-orange halo around the bacterial colonies is considered as an indication for siderophore production. For quantitative estimation bacteria previously grown ironless King's B broth medium, were centrifuged at 3000 rpm for 30 min, and 500 µL of the supernatant was mixed with 500 µL of CAS solution. The optical density was measured at 630 nm after 20 min of incubation and the percentage of siderophore units was estimated as the proportion of CAS color shift using the formula:

$$\text{Percentage of Decolorization} = \frac{[A_r - A_s]}{A_r} \times 100$$

where  $A_r$  is the absorbance of the reference sample and  $A_s$  is the absorbance of the sample. The color changes from blue to orange according to the amount of siderophores produced.

#### 2.2.4. Production of Enzymes

Protease production was assessed on skim milk agar medium. Chitinase was assessed on chitin agar medium. Cellulase was assessed on TSA agar amended with 10 g carboxymethyl cellulose. Amylase was evaluated on 1% starch agar plates. All of these media were spot inoculated by each of the isolates and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 2 days. Development of the halo zone surrounding the colony was considered as a positive indication of the considered protease or chitinase activity. For cellulase and amylase development of clear halos around the colonies after addition of 1% iodine solution, respectively, was considered as a positive indication of cellulase or amylase activity [3,11,12].

#### 2.2.5. Hydrogen Cyanide (HCN) Production

Isolates were screened for their hydrogen cyanide (HCN) production ability according to Cherif-Silini et al. [3] procedure. Bacteria were spread on HCN medium (tryptic soy broth, glycine, agar: 30, 4.4 and 15 g/L respectively). A Whatman filter paper N° 40 dipped in 0.5% picric acid and 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  was placed at the lid of the Petri plates which were then sealed with parafilm to avoid the gas escaping. After 4 days of incubation at  $28 \pm 2$  °C, development of the orange-brown color of the paper indicated HCN production.



### 2.2.6. NH<sub>3</sub> Production

The ability of strains to produce ammonia was tested by using fresh bacterial cultures grown in 10 mL peptone water and incubated for 4 days at  $28 \pm 2$  °C. Nessler's reagent (0.5 mL) was added in each tube and the development of yellow to brown color was a positive indication of ammonia production [4].

### 2.2.7. Nitrogen Fixation

Nitrogen fixation was tested on WS (Winogradsky) solid medium without nitrogen. Strains were streaked on the medium and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 2 days. Growth of isolates on this medium indicated their capacity to fix nitrogen [3].

### 2.2.8. Antifungal Assay

Bacteria isolates showing the highest siderophores and extracellular enzymatic activities were selected and used in antifungal activity tests against plant pathogenic fungi (*Aspergillus niger* LMA10, *Phytophthora infestans* LMA11, *Fusarium oxysporum* LMA12, and *Botrytis cinerea* LMA13). Fungal pathogens were grown on Potato Dextrose Agar (PDA) (potato infusion, dextrose, agar 4, 20, and 15 g/L, respectively; pH 5.4) and agar plugs (6 mm) of each fungal pathogen was placed in the center of PDA plate. Bacterial cultures grown in Tryptic Soy Broth were spotted or streaked in the same plate with a distance of 4 cm from the test fungus and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 5 to 6 days. The diameter of the inhibition zone against test fungi was measured and the percentage of inhibition relative to the control (without bacteria) was evaluated [11].

## 2.3. Selection of Tolerant PGPB for In Vivo Plant Growth Promotion

From 98 strains examined for different in vitro PGP traits, 10 bacterial isolates were positive in most activities especially siderophore production, phosphate solubilization, antifungal activity, and IAA production which were selected to assess their growth performance under different physico-chemical parameters e.g., temperature, pH, PEG<sub>8000</sub>, and NaCl. The 10 selected isolates were grown on LB broth in microplates with different values of pH (4, 7, 9, and 11), increasing concentrations of NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000, and 1200 mM) and PEG<sub>8000</sub> (0%, 10%, 20%, 30%, and 40%) to mimic varying levels of water potentials. All of the bacterial cultures were incubated at  $28 \pm 2$  °C for 2 days. The growth of strains was also tested at different temperatures (4, 30, 37, 40, and 45 °C) for 2 days and optical density (O.D.) was measured at 600 nm [3].

## 2.4. Molecular Characterization of Salt-Tolerant PGPR

DNA extraction from selected PGPB was performed according to Luchi et al. [8]. DNA quality and quantity estimation were also assessed. Amplification and sequencing were performed as previously. Phylogenetic analyses were performed according to Mefteh et al. [11].

## 2.5. In Vitro and In Vivo Plant Growth Promotion by the Selected Bacterial Strains

Based on the results of bacterial growth performance under salt stress of the ten selected bacterial isolates, three bacteria were further selected (BR5, OR15, and RB13) and considered as salt-tolerant PGPR. These strains showing high mean values of growth and beneficial effects under salt stress were further evaluated for their PGP effect in vitro by wheat seeds germination and *Arabidopsis thaliana* seedlings inoculation in Petri dish and in vivo by wheat plants inoculation in pots grown [3].

## 2.6. In Vitro Assays

### 2.6.1. Plate Grown Arabidopsis Thaliana Seedlings Inoculation

Seeds of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Col-0)/Rédei-L211-497 (LEHLE seeds Round Rock, TX 78680-2366, Texas, USA) were surface disinfested (2 min in 70% ethanol, 20 min in 1% sodium hypochlorite, and four washes with sterilized distilled water) and placed on

plates containing half-strength Murashige–Skoog medium (MS medium) supplemented with 1.5% sucrose and 0.8% agar [3]. MS agar sown seeds were stratified for 3 days at 4 °C and subsequently incubated in a plant growth chamber (16 h light/8 h darkness photoperiod and 23 ± 1 °C). After 6 days of growth, seedlings with similar size were transferred to one side of a plate (10 seedlings per plate) containing MS agar with 0, 50, 100, and 150 mM NaCl. For the bacterial treatment, 100 µL of culture suspensions with approximately 10<sup>8</sup> to 10<sup>9</sup> CFU/mL (OD<sub>600</sub> = 1) was applied on the agar medium 4 cm below the seedlings. Eight treatments were applied (Control, BR15, OR15, RB13, BR5 + OR15, BR5 + RB13, OR15 + RB13, and BR5 + OR15 + RB13) under four NaCl concentrations (0, 50, 100 and 150 mM). The plates were incubated for 14 days (23 ± 1 °C, 16 h/8 h light/darkness). Plant growth was assessed by measuring the total leaf surface area using digital photography and image processing via ImageJ 1.52v software. The fresh biomass and root length were determined. Chlorophyll content (chlorophyll a, b and total (a + b)) was assessed following procedures detailed by Rekik et al. [1]. Fresh leaf samples (0.1 g) were homogenized in 1 mL of 80% acetone, kept at −20 °C overnight, and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The absorbance of the supernatant was measured at 663 and 645 nm. The quantification was done following the procedure of Cherif-Silini et al. [3].

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/g)} = (12.7A_{633} - 2.69A_{645}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/g)} = (22.9A_{645} - 4.68A_{633}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_{a+b} \text{ (mg/g)} = (20.21A_{645} + 8.02A_{663}) \times (V/1000 \times W)$$

V = the final volume of the supernatant; W = fresh weight of the leaf

### 2.6.2. Wheat Seed Germination in the Presence of PGPB under Salt Stress

The three selected isolates BR5, OR15, and RB13 were cultured in Trypticase Soy broth and incubated at 28 ± 2 °C for 2 days. The cultures were centrifuged (12,000 rpm/10 min) and rinsed twice in PBS then adjusted to a density of 10<sup>8</sup> CFU/mL. The Waha durum wheat cultivar (*Triticum durum*) was used in the inoculation experiments. The seeds were surface sterilized (5 min in 70% ethanol, 30 min in a 2% sodium hypochlorite solution and 3 subsequent washes with sterilized distilled water [3]). Thirty selected seeds were incubated in bacterial suspensions for 30 min. As described previously for *A. thaliana*, eight treatments were applied (Control, BR15, OR15, RB13, BR5 + OR15, BR5 + RB13, OR15 + RB13 and BR5 + OR15 + RB13) under two NaCl concentrations (0 and 150 mM). The seeds were then placed on Whatman no. 40 paper in 9 cm Petri dishes containing 10 mL of sterile distilled water or 150 mM NaCl solution. The plates were divided into two groups (0 and 150 mM NaCl) and eight subgroups according to the bacterial treatment in three repetitions. The Petri dishes were incubated in the dark at 23 ± 1 °C. The germinated seeds were counted after 3, 6, 9, and 11 days of incubation. When the radicle was at least 3 mm long, the seeds were considered to have successfully germinated. Four parameters were recorded in this experiment: the final germination percentages (FGP), the germination rate index (GRI), the seedling length vigor index (SLVI), and the weight vigor index seedlings (SWVI). The FGPs were determined on the 11th day of incubation when no other seed had germinated using the equation:

$$\text{Final germination percentage (FGP)} = \text{number of germinated seeds/numbers of total seeds} \times 100$$

The germination rate index (GRI) was determined by using a modified procedure described by Rekik et al. [1]:

$$\text{GRI} = G3/3 + G6/6 + G9/9$$

where G3, G6, and G9 were germination percentages × 100 at 3, 6, and 9 days after initiation of germination [1,3].



$$\text{SLVI} = \text{Seedling length (cm)} \times \text{Germination (\%)}$$

$$\text{SWVI} = \text{Seedling dry weight (mg)} \times \text{Germination (\%)}$$

The parameter was calculated using the above formula suggested by Abdul-Baki and Anderson [15].

## 2.7. In Vivo Assays

### 2.7.1. Wheat Inoculation

Pot experiments were conducted following completely randomized block design to assess the potential of the three salt-tolerant bacteria in mitigation of salinity stress in Waha durum wheat (*Triticum durum*). Three soils (S1, S2, and S3) with different physicochemical characteristics were used to wheat growth (Table 2). The cultures of the three selected isolates and the sterilization of the wheat seeds were applied as described above. The inoculation was carried out after immersion of the seeds for 24 h in the bacterial suspensions (BR15, OR15, RB13, BR5 + OR15, BR5 + RB13, OR15 + RB13, and BR5 + OR15 + RB13). The uninoculated seeds (control) were immersed in sterile distilled water. The treated seeds were sown at the rate of ten seeds per pot (each contains about 1 kg of soil) at a depth of 1 cm from the surface. The experiments were designed with three groups representing the type of soil (S1, S2, S3) and eight treatments indicating the type of inoculum (control, + BR15, + OR15, + RB13, + BR5-OR15, + BR5 -RB13, + OR15-RB13 and BR5-OR15-RB13) with three repetitions (72 pots in total). The experiment was conducted in a growth chamber with an average of day/night temperatures of  $26 \pm 2$  °C and  $16 \pm 2$  °C, respectively, and a photoperiod of 16 h of lighting. The soil humidity is adjusted and kept constant during the experiment by watering with water. After 45 days of growth, the plants were harvested and washed with water. The roots and leaves have been separated. The fresh, the dry (after 72 h at 65 °C) weights, and the length of the roots and leaves were determined.

**Table 2.** Three soils (S1, S2 and S3) with different physico-chemical characteristics were used in this study.

	Location Site	Electrical Conductivity (mS/cm)	pH
Soil 1 (S1)	Setif (fertile soil) (36.195889° N, 5.364722° E)	$0.48 \pm 0.034$	$8.075 \pm 0.055$
Soil 2 (S2)	Bazer Sakhra Sebkhah (periphery of the sebkhah) (36.071722° N, 5.675417° E)	$3.81 \pm 0.16$	$7.735 \pm 0.064$
Soil 3 (S3)	Bazer Sakhra Sebkhah (Mechtat Zaabib: away from Sebkhah) (36.073579° N, 5.667538° E)	$2.8 \pm 0.045$	$7.885 \pm 0.015$

### 2.7.2. Photosynthetic Pigments and Biochemical Markers

#### Photosynthetic Pigments Concentration Estimation

Chlorophyll pigments (chlorophyll a, b, total (a + b) and carotenoids) were assessed following procedures detailed above. Absorbance of the extracts was measured at 663, 645, and 470 nm. The quantification was done as following:

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/g)} = (12.7A_{633} - 2.69A_{645}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/g)} = (22.9A_{645} - 4.68A_{633}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Chl}_{a+b} \text{ (mg/g)} = (20.21A_{645} + 8.02A_{663}) \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Carotenoids (mg/g)} = ((1000A_{470} - 1.9\text{Chl}_a - 63.14\text{Chl}_b)/214) \times (V/1000 \times W)$$

V = the final volume of the supernatant; W = fresh weight of the leaf.

#### Total Soluble Sugars Content

The plant material (0.1 g) was extracted in 3 mL of ethanol 80% incubated at room temperature for 48 h, followed by boiling at 80 °C until evaporation. The extract was

diluted by the addition of 20 mL of distilled water. After centrifugation, the total soluble sugars of supernatant (2 mL) were determined by the phenol-sulfuric method [16].

#### Proline Content Estimation

Proline extraction from leaves and roots was determined according to the method described by Carrillo et al. [17]. Samples (50 mg) were homogenized to a 1 mL mixture of ethanol: water (40:60 *v/v*) and stored at 4 °C overnight and then centrifuged at 14,000 rpm/5 min. 500 µL of the extract was added to 2 mL of the reaction mixture (1% ninhydrin (*w/v*) in acetic acid 60%) and heated 95 °C for 20 min and centrifuged 10,000 rpm/1 min. The absorbance was recorded at 520 nm and proline concentration was measured through comparison to a standard curve [3].

#### Protein Content

Frozen root and leaf samples (0.25 g) were crushed to a fine powder in a mortar under liquid nitrogen and then homogenized with 5 mL of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 containing 1 mM EDTA, and 0.01% Triton X-100. The homogenate was centrifuged at 15,000 rpm/15 min at 4 °C to yield a crude enzyme extract. The soluble protein content (mg/g) was estimated by the technique according to Lowry et al. [18] using bovine serum albumin as a protein standard.

#### Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was measured by quantifying the malondialdehyde (MDA) production by the thiobarbituric acid reaction. Fresh vegetal material (0.2 g) (roots and leaves) was homogenized using 2 mL TCA (0.1% *v/v*). After centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4 °C, the supernatant was added to 4 mL premixed TCA (20%) and TBA (2-Thiobarbituric acid, 0.5%). The mixture was then incubated at 96 °C for 30 min and then transferred into an ice bath to stop the reaction. The tubes were centrifuged at 10,000 rpm/15 min, and the absorbance of the resulting supernatant was measured at 532 nm using a spectrophotometer. The concentration of MDA was calculated using the extinction coefficient of 155 mmol/L<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. The concentration of the MDA was expressed as µmolg<sup>-1</sup> FW (fresh weight) [1].

### 2.8. Antioxidant Enzyme Assays

#### 2.8.1. Guaiacol Peroxidase Activity

Guaiacol peroxidase activity (GPX) reaction was started by adding 0.1 mL of the extract to 3 mL of reaction mixture containing 100 mM phosphate buffer (pH 6.5), 15 mM guaiacol, and 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The kinetic evolution of absorbance at 470 nm was measured for 1 min. GPX activity was calculated using the extinction coefficient (26.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 470 nm). Enzyme activity (U/min/mg Protein) was calculated as the increase in absorbance [1].

#### 2.8.2. Ascorbate Peroxidase Activity

Ascorbate peroxidase (APX) was estimated by observing the decrease in absorbance due to ascorbic acid at 290 nm. Reaction mixture (3 mL) contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.25 mM ascorbic acid, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 0.1 mL enzyme extract. The reaction was started by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the oxidation of ascorbate was determined by a decrease in absorbance at 290 nm ( $E = 2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). One unit of APX activity (µmoles/min/mg Proteins) was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 µmol min<sup>-1</sup> ascorbate [1].

#### 2.8.3. Catalase Enzyme Assay

For catalase analysis, 0.1 mL of extract was added to a 2 mL reaction mixture containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7), 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After adding the extract, the decrease in absorbance was recorded at 240 nm (extinction coefficient of 0.036 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

at 30 s intervals for 2 min. Enzyme activity of catalase was expressed as U/min/mg Proteins [19].

#### 2.8.4. Superoxide Dismutase Enzyme Assay

The reaction mixture (3 mL) containing 13 mM of methionine, 75  $\mu$ M of nitro-blue tetrazolium chloride (NBT), 0.1 mM of EDTA, 50 mM of phosphate buffer (pH 7.5), 50 mM of carbonate sodium, 2 mM riboflavin, and 0.1 mL of enzyme extract was placed under fluorescent light for 15 min. A complete enzyme-free reaction mixture, which gave the maximum color, served as a control. The photo-reduction of NBT by superoxide was stopped by placing the tubes in the dark. The absorbance was recorded at 560 nm and superoxide dismutase (SOD) activity expressed as U/mg of proteins was calculated as a proportion between absorbance observed in presence or absence of this enzyme [1].

#### 2.9. Statistical Analysis

The experiments were performed in triplicate, results expressed as mean  $\pm$  standard deviations. One-way ANOVA and Two-way ANOVA were employed to find the significant effect of different microbial strains under different growth conditions in comparison to the control sample. The level of significance used for all statistical tests is 5% ( $p < 0.05$ ) and Tukey's test Multiple Comparison was used when significant differences were identified within each row, simple effects were used to compare between the mean value of different treatments. Different letters were included on the top each column to indicate the differences between different groups. All statistics were carried out using Graphpad Prism 8.

### 3. Results

#### 3.1. Isolation of Bacteria

A total of 98 strains differing in colony morphology were isolated from root halophytes where they are thriving as endophytes, rhizosphere soil as well as salty soil surrounding the halophytes in three salt-affected sites in the East of Algeria (Figure 1A–C, Table 1). Results showed that 27.55% of the isolates were from salty soil, 44.89% from rhizosphere soil and 27.55% were root endophytes. 21, 34 and 43 of them were recovered from Chott Bazer Sakhra (21.42%), Chott Tinsilt (34.69%), and Chott El Hodna (43.87%), respectively (Figure 1D).

#### 3.2. Plant Growth-Promoting Traits of Isolates

The results of the PGP activities of the different strains were shown in Figure 1E. Phosphate solubilization was detected in 26 isolates (26.53%). The siderophores were produced by 47 isolates (47.95%). All of the strains produced IAA at variable rates ranging from 2.32 to 13.83  $\mu$ g/mL (OR15). IAA production was higher for Sebkhia Oum el Bouaghi rhizospheric isolates (OR14 (10.06  $\mu$ g/mL), OR15 (13.83  $\mu$ g/mL), and OR16 (12.67  $\mu$ g/mL)) (Figure S1, Table S1). The majority of the strains fixed nitrogen (73.46%) and produced ammonia (67.34%). In contrast, only 24 isolates (24.48%) produced HCN. The bacterial strains were also examined for enzymatic potential. The majority (92.85%) produced an amylase, a large number of strains (61.22%) had chitinolytic potential, but less than half of the isolates produced a protease (36.73%) and a cellulase (41.83%).

All the strains tested against phytopathogenic fungi had the performance of inhibiting at least one and more fungal strains (Table S2). Overall, 55% of the strains were active on the totality of fungal strains. The fungus most sensitive to bacterial metabolites was *Aspergillus niger* where 97.5% of the bacteria inhibited its growth at a rate of up to 72.5% (strain OE1). More than half of the strains (55%) were active towards the other fungi the most active strains were from the Sebkhia of Bazer Sakhra and Oum el Bouaghi. In addition, inhibition rates reached 73.5% against *Phytophthora infestans* (strain OR14) and 76% against *Botrytis cinerea* (strain BSN7). However, the activity of the strains against *Fusarium oxysporum* was lower and the best rate was 44% (strain BR6). According to data obtained ten selected

strains according to the production capacity of IAA, were evaluated under stress conditions for the selection of active and tolerant strains for use in inoculating *A. thaliana* and wheat.

### 3.3. Selection of Tolerant PGPB for In Vivo Plant Growth Promotion

The ten strains were screened for their ability to tolerate different abiotic stresses. The effect of salinity significantly reduced the bacterial growth of the 10 strains (Figure S2A). In the absence of NaCl, growth was optimal. Then, a continuous and significant decrease in bacterial density, inversely proportional to the increasing concentrations of NaCl, was observed. However, the majority of strains have developed appreciably at 600 mM ( $OD_{600} \geq 0.4$ ). All of the strains were neutrophilic and had an optimum growth at pH 7 (Figure S2B). The alkalinity and acidity of the medium negatively affected their growth. However, certain strains (BR5, OR14 and OR15) were able to develop remarkably at pH 9. In addition, the majority of strains tolerated acidified environments. On the other hand, only one bacterium (BR5) was alkali-tolerant and grew at pH 11. Given their origin, all the strains were mesophilic, the optimal growth temperature is between 30 and 37 °C (Figure S2C). Some may also be thermotolerant (OR14 and OR15) and developed at 40 °C. The osmotic effect generated by increasing concentrations of PEG8000 in the medium negatively affected the growth of the bacterial strains (Figure S2D). The majority were osmotolerant at concentrations ranging from 10 to 20%. Only two strains isolated from Bazer Sakhra sebkha (BR5 and BR10) were able to grow at concentrations of 40%.

### 3.4. Molecular Characterization of Salt-Tolerant PGPR

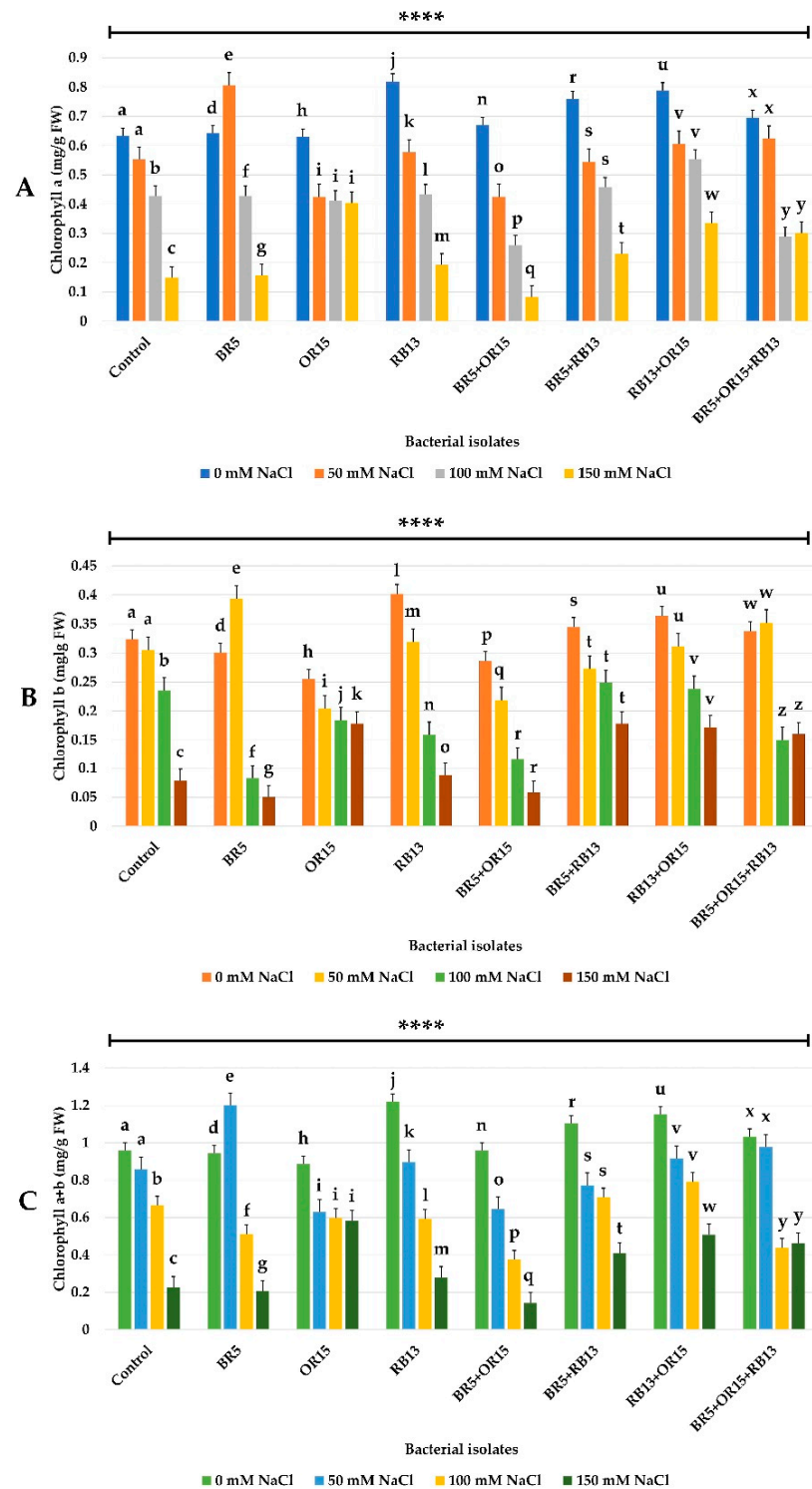
PGPR bacteria 16S-rDNA sequence analysis revealed that RB13, BR5 and OR15 isolates are belonging to *Bacillus atrophaeus*. Maximum Likelihood phylogenetic tree was presented in Figure 2. Their sequences were submitted in GenBank and accession numbers were implied in the tree. *Bacillus pumilis* strain Pl-3 was used as outgroup (Figure S3).

### 3.5. In Vitro Assays

#### 3.5.1. Arabidopsis Thaliana Inoculation

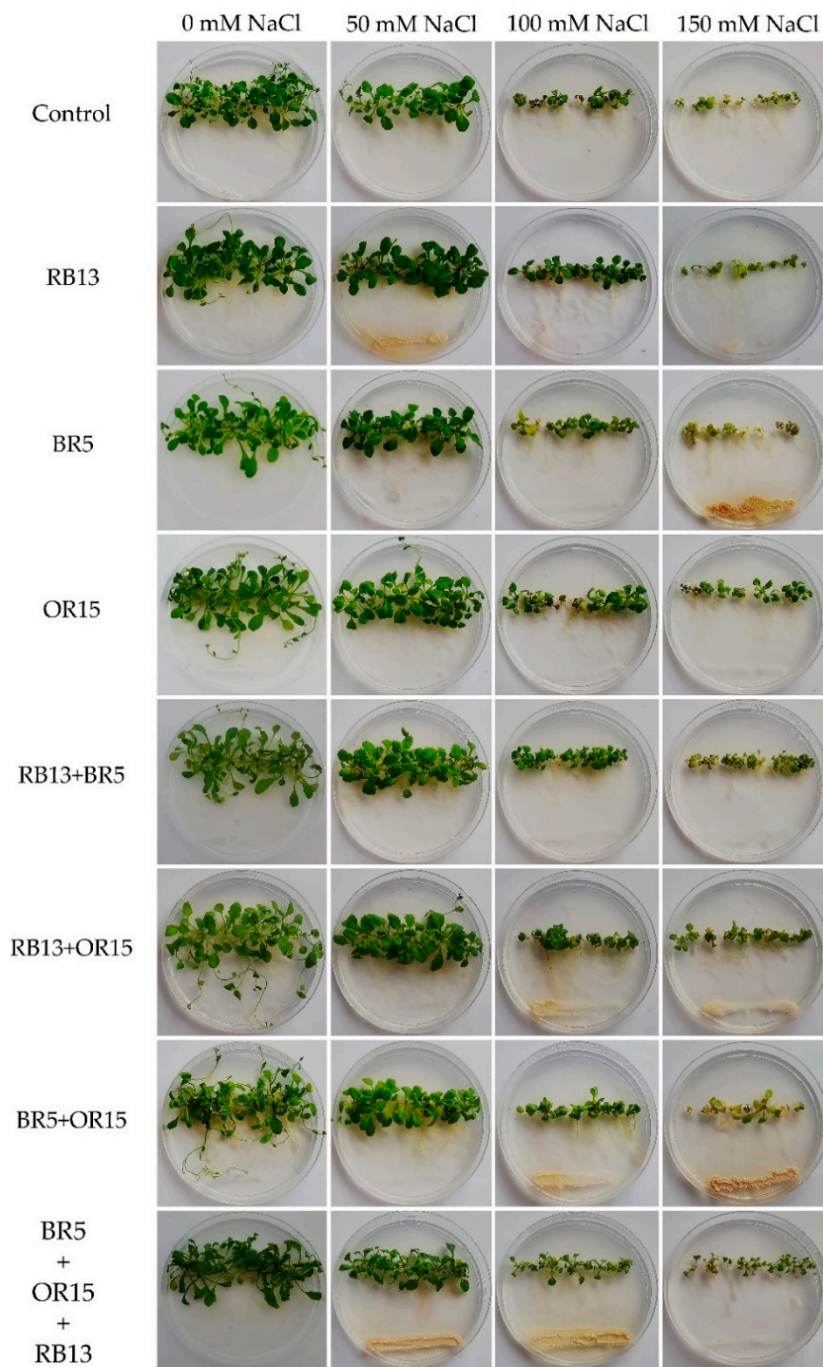
Inoculation of the model plant *A. thaliana* with the three selected strains and their different combinations (BR15, OR15, RB13, BR5 + OR15, BR5 + RB13, OR15 + RB13, and BR5 + OR15 + RB13) was used to assess their capacity to improve growth under different salt concentrations (Figure S4 and Figure 3). Analysis of morphological parameters of the plants, root elongation (Figure S4A), fresh weight (Figure S4B) and leaf area (Figure S4C) showed a significant decrease ( $p \leq 0.05$ ) of these different growth parameters under salinity stress. Inoculation with bacteria significantly improved the weight mass (Figure S4B) and the leaf area of *A. thaliana* (Figure S4C) at low NaCl concentrations (0 and 50 mM). At high NaCl concentrations (100 and 150 mM), the different morphological parameters were significantly reduced. Bacterial inoculation improved the aerial part of the plants (fresh weight and leaf area) (Figure 4B,C). Whereas, the root length seemed not to be affected by the increase in salt (Figure S4A). The analysis showed that the effect of bacteria was visible either for the mono inoculation or the different combinations. However, a better response was obtained for the OR15 and RB13 strains and their combinations (Figure 4A–C).

Salinity resulted in notable reductions in chlorophyll contents a, b and total ( $p < 0.01$ ) in *A. thaliana* plant (Figure 2A–C). Treatments with bacteria and their combinations improved the chlorophyll a (Figure 2A), chlorophyll b (Figure 2B), and chlorophyll a + b (Figure 2C) contents at all salinity levels. Significantly improved rates were observed for the OR15 and RB13 strains and their combinations (Figure 2A–C).

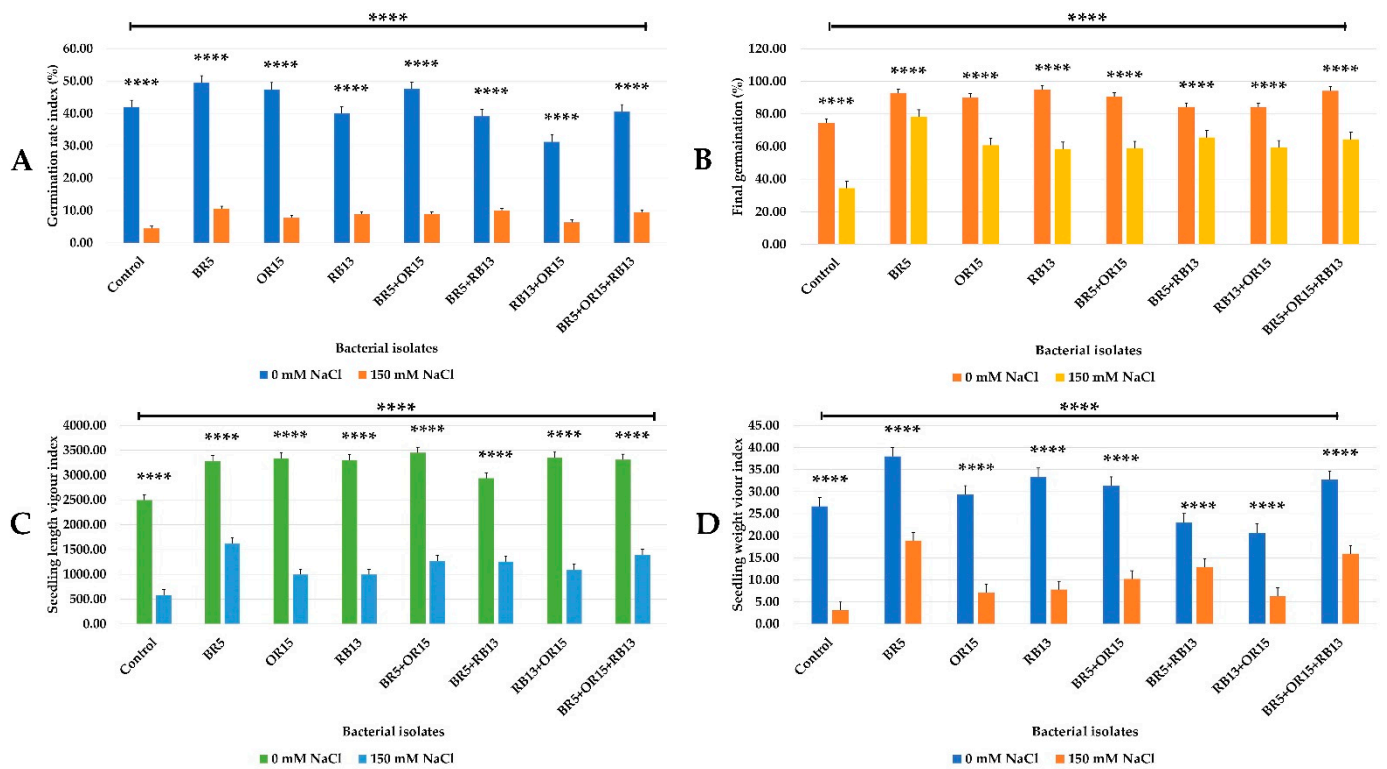


**Figure 2.** Effect of bacteria isolates on (A) Chlorophyll a ( $\mu\text{g/g FW}$ ), (B) Chlorophyll b ( $\mu\text{g/g FW}$ ), and (C) Chlorophyll a + b ( $\mu\text{g/g FW}$ ) contents against different concentrations of NaCl. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey’s multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments each family group. Bars in each group with different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$ . \*\*\*\* indicating the significant variations  $p < 0.0001$  in comparison to the control sample.





**Figure 3.** In vitro effect of bacterial isolates on *Arabidopsis* seedlings growth exposed to different NaCl concentrations.

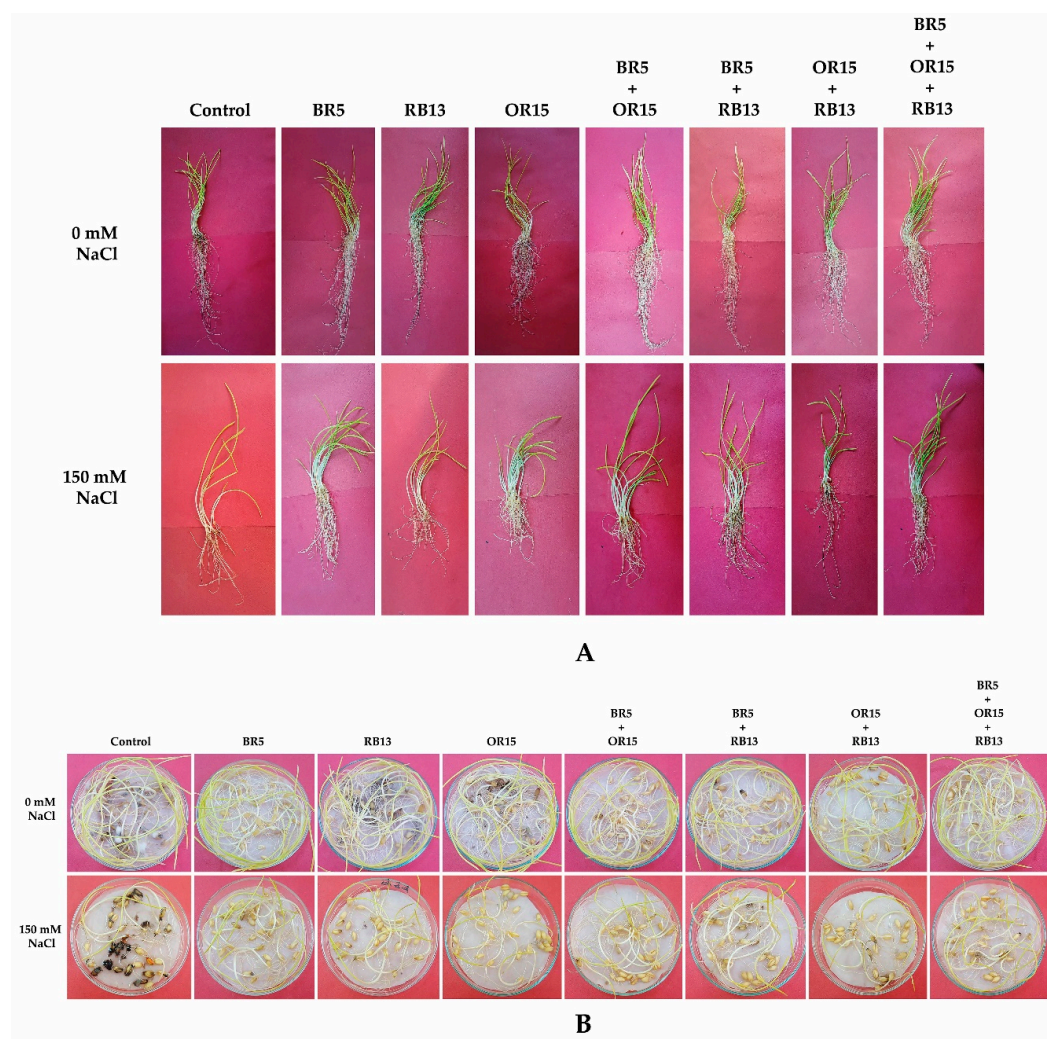


**Figure 4.** Effect of bacterial isolates on (A) Germination rate index (%), (B) Percentage of final germination, (C) Seedlings length vigor index, and (D) Seedling weight vigor index exposed to NaCl different concentrations. Values are means ± SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey’s multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments each family group. Bars with stars \*\*\*\* indicating the significant variations  $p < 0.0001$  in comparison to the control sample.

### 3.5.2. Seed Germination of Wheat in the Presence of PGPR under Salt Stress

The treatment of durum wheat seeds with the bacterial strains and their combinations significantly improved the germination parameters with and without added salt (Figures 4 and 5). The effect of seed inoculation by the different strains was noticeable on the cumulative germination rate (Figure 4A) and the final percentage of germination (Figure 4B). The BR5 strain and the combination of the three bacteria (BR5 + OR15 + RB13) showed the best final germination percentage (Figure 4B). From the results, the salinity stress decreased significantly these germination parameters (Figure 4A,B). At the concentration of 150 mM NaCl seeds bacterial inoculation allowed to considerably reduce the effects of salt stress. All bacteria improved seed germination. However, a better rate was recorded for the BR5 strain given its halotolerance capacity (Figure 4B).

The vigor indices of germinated seeds (Figure 4C,D) defined as the level of activity and the durability of seeds were significantly enhanced after inoculation by bacteria and their combinations with or without salt. The best indexes were recorded for the seeds inoculated with the BR5 strain (Figure 4C,D).



**Figure 5.** Effect of bacterial isolates on (A) in planta and (B) in vitro wheat seedlings growth exposed to 0 and 150 mM NaCl concentrations.

### 3.6. In Vivo Assays

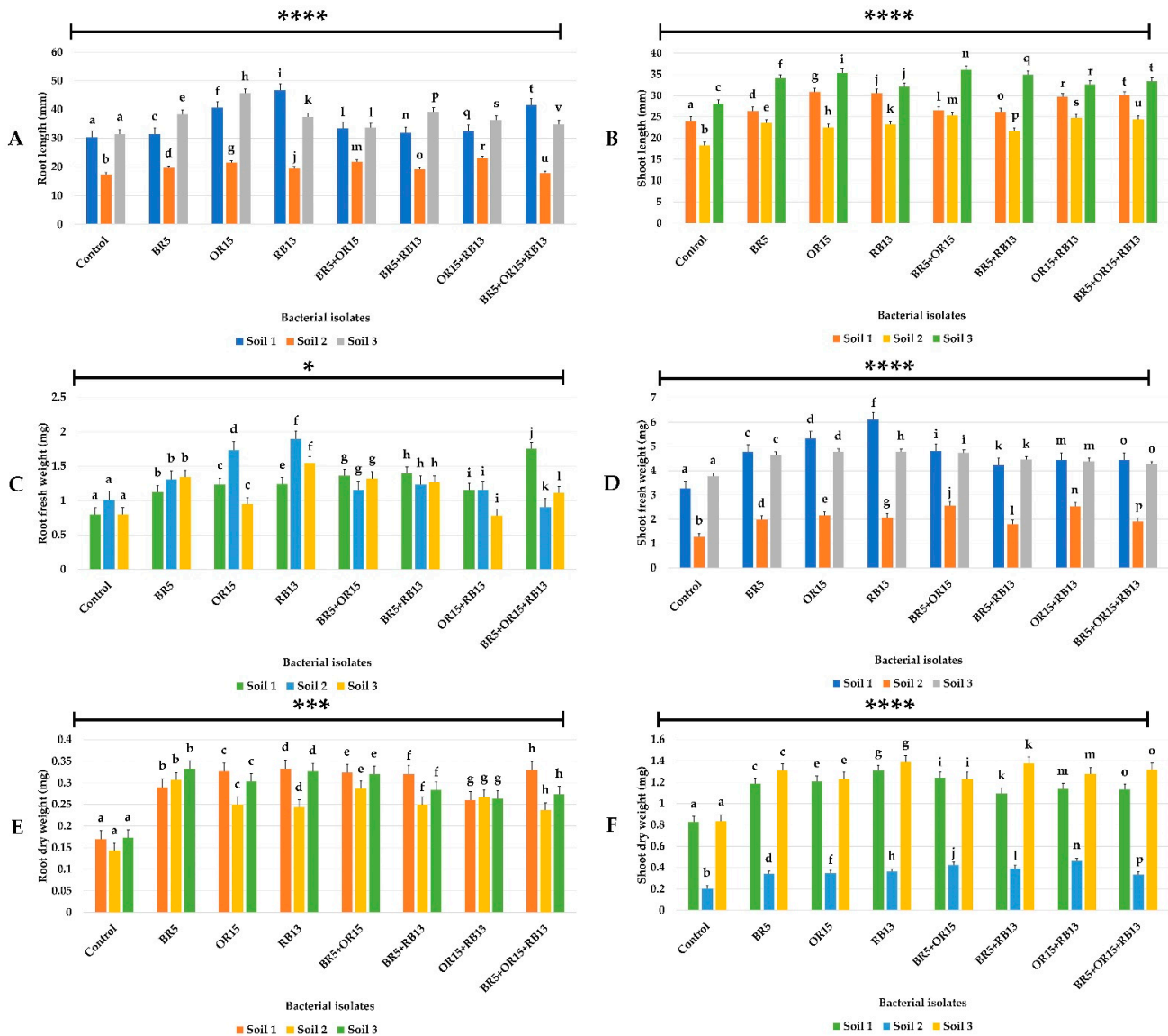
#### Effects of Bacterial Inoculation on Wheat Plants Growth and Development in Different Soils

The study of the experiment in pots conducted on three soils with different salinities showed that the growth of wheat represented by its morphological parameters was significantly affected by salinity and that bacterial inoculation had a significant beneficial effect on these parameters (Figures 6 and 7).

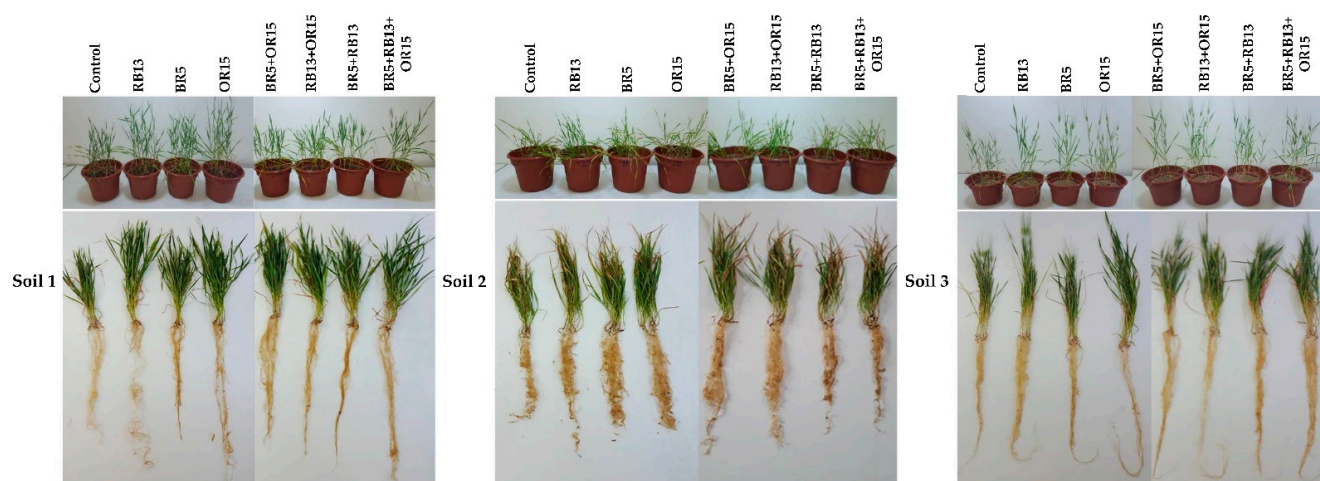
The length of the roots (Figure 6A) was significantly affected by the composition of the soils and by the contribution of bacteria where an important increase was noted in the roots inoculated for the soil 1 and 3 compared to the control. However, the beneficial effect of bacteria for soil 2 was minimal. Furthermore, the length of the shoots (Figure 6B) was significantly improved in the presence of bacteria and the best rates were recorded for soil 3 and soil 1. Soil 2 was the most stressful, the supply of bacterial inoculation existed but remained low. The bacterial inoculation also significantly increased the fresh and dry weight of the shoots with the different bacteria and their combinations in comparison with the control (Figure 6D,F). This increase was important by the contribution of bacteria in the less saline soils (soil 1 and 3) where there was no significant difference between these two treatments. The results showed that inoculation had a stimulating effect on plant growth and development. The best rate of fresh weight was recorded for the RB13 strain inoculated in fertile soil. The aerial part weight of the plants on saline soil (soil 2) was much lower but the beneficial effect of the bacterial inoculation was noticeable. The inoculation increased



the fresh and dry weight of the roots (Figure 6C,E). There was no significant difference between the different soils and the root system seemed to be developed similarly in the three soils. However, the best fresh weights of roots recorded were for the plants grown in soil 2 inoculated with the OR15 and RB13 strains. The combination of the three strains improved the fresh weight of the roots but in the soil 1.



**Figure 6.** Effect of bacteria isolates on (A,B) Root and shoot length (cm), (C,D) Root and shoot fresh weight (g), and (E,F) Root and shoot dry weight exposed to different concentrations of NaCl. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey’s multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments each family group. Bars in each group with different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$ . Bars with stars \*, \*\*, \*\*\*\* indicating the significant variations  $p < 0.1$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$  respectively in comparison to the control sample.



**Figure 7.** In planta evaluation of different bacterial isolates on wheat seedlings and their root systems in three different soils.

### 3.7. Effects on Photosynthetic Pigments and Biochemical Markers

#### 3.7.1. Chlorophyll Content

The chlorophyll pigments of wheat plants showed significantly different values depending on the composition of the soil and the bacterial treatments (Figure S5). The data revealed that the salinity of the soils affected the chlorophyll content and that bacterial inoculation improved this content in the wheat plant by reducing stress at different levels of salinity.

Plants in soil 1 and 2 showed high levels of chlorophyll content when inoculated by bacteria. Chlorophyll a increased markedly after inoculation with all strains and the different combinations except strain BR5 which had a lower rate (Figure S5A). Chlorophyll levels in soil 3 seemed to be improved, especially for monoculture inoculations. The contents of chlorophyll b and total followed the same rate (Figure S5B,C). It should also be noted that these rates had increased markedly for plants of soil 2 and 3 inoculated with the BR5 strain. The carotenoids content (Figure S5D) also displayed significantly high values in plants treated with bacteria whatever the nature of the soil, however, the BR5 strain had a better rate for the most stressful soil. Carotenoids contents were less expressed in soil 3 except OR15 strain which had a higher level.

#### 3.7.2. Total Soluble Sugars Content

Significant variation was observed in the sugar content of the roots and shoots of inoculated and non-inoculated plants growing in different soils (Figure S6A,B). The sugar contents of wheat plants varied according to the nature of the soil and the bacteria used. The sugar content for the roots was significantly different (Figure S6A). The stress of soil 2 did not seem to be offset by an accumulation of sugars. In contrast, the remarkable effect of bacterial inoculation was observed for plants cultivated in soil 3 where bacterial inoculation with the RB13 strain and co-inoculation BR5 + RB13 increased the sugar content compared to others treatments (Figure S6A). In general, the leaf contents of sugars were increased compared to the controls. The nature of the soil did not seem to affect the foliar content of sugars except plants inoculated with the BR5, OR15 strains, OR15 + RB13, or BR5 + OR15 + RB13 which allowed a significant improvement in these compounds (Figure S6B).

#### 3.7.3. Protein Content

The protein content in the roots and shoots depended on the treatments and the soil used (Figure S6C,D). The positive effect of bacterial inoculation on protein contents was observed, especially in plants cultivated in soil 1 and 3. The roots and shoots concentrations of plants cultivated in soil 2 were not very variable in all types of treatment.

#### 3.7.4. Proline Content Estimation

Foliar and root proline concentrations were affected by soil salinity (Figure S6E,F). The concentrations were greatly increased in soil 2 and reached levels of 200 µg/g FW and 280 µg/g FW respectively. Proline levels were low in the roots and moderate in the shoots for soil 1 and 3. Inoculation with bacteria reduced the root and foliar concentrations of proline in soil 2, essentially, when strains BR5 and RB13 and all the other combinations were used.

#### 3.7.5. Lipid Peroxidation

The effect of soil on MDA concentrations was significantly different (Figure S6G,H). MDA contents were not noticeable at the root level but it was remarkable at the leaf level, the MDA concentrations in soil 1 were 1.56 and 3.64 times in compared to soil 2 and 3, respectively. A great decrease in the concentration of MDA was generally observed mainly in the roots of plants inoculated by strains BR5 and OR15 in soils 2 and 3 (Figure S6G) and in the shoots of plants inoculated by different bacterial treatments for soils 1 and 2 (Figure S6H).

#### 3.7.6. Effects on Antioxidant Enzymes Activities

The roots and shoots antioxidant enzymatic activities of the plants were different in the three soils (Figure S7). They were more intense in soil 2 for the enzymes APX (Figure S7A,B), GPX (Figure S7C,D), and SOD (Figure S7E,F), less variable for roots CAT (Figure S7G) and higher for foliar CAT (Figure S7H) in soil 1. However, the results of bacterial treatments on the activities of the enzymes were variable, a noticeable reduction in APX and CAT was observed under the effect of the 3 bacteria and their different combinations in the 3 soils. Whereas, the reduction of the GPX and SOD enzymes were clear under the effect of co-inoculation with a combination between 2 or 3 bacteria.

### 4. Discussion

Salinity is a major factor limiting plant growth and productivity. Based on their adaptive evolution, some plants, especially halophytes, can resist salinity compared to glycophytes that cannot resist and die. Therefore, the microorganisms associated with these halophytes were able to tolerate, survive and proliferate in the soil and rhizosphere of this hostile environment [20]. The beneficial bacteria associated with these plants colonized the rhizosphere and have an important role in the resistance of plants to saline stress. Plants inoculated with these bacteria induced biochemical and morphological changes leading to increased tolerance to abiotic stress. The current research focused primarily on microorganisms associated with the rhizosphere of halophytes, with PGP activities and high salt tolerance, they are therefore the most suitable candidate for the growth and improvement of the yield of glycophytic plants in areas affected by salt [21].

In this study, 98 strains were isolated from the rhizosphere and endosphere of two species of halophytes (*Suaeda mollis* and *Salsola tetrandra*) and salt soils were located in three different Chotts in eastern Algeria. The physico-chemical characteristics of the sampling sites showed that these soils were highly saline (Ec ranging from 22.95 to 30.34 mS/cm) and had a slightly basic pH (pH 7.99 to 8.05). Of these isolates, 44.89% were rhizosphere bacteria, the number of cultivable bacteria isolated from the rhizosphere soil of the halophyte was higher than the number of non-rhizosphere and endophytic bacteria. This high number of bacteria in the rhizosphere was related to the richness of this zone in secreted root exudates. Such results were observed by Mapelli et al. [22], where the *Salicornia* rhizosphere appeared to be a very rich habitat of bacterial communities in comparison with non-rhizosphere soil. This comes back to the rhizosphere effect which was described by several authors [3,22,23]. Many authors have specified that mucilage and exudates are the most important sources of organic matter brought to the soil and assimilated by telluric microflora [23].

Bacteria isolated from these areas also had plant growth-promoting properties [20]. In our study of the isolates tested, 73.46% showed nitrogen fixation activity. Nitrogen (N) is

one of the main nutrients through which the plant benefits from the microbial association. The inoculation of rhizobacteria in agricultural soil to replace the use of nitrogen fertilizers had shown a marked improvement in crop yield [24]. The mineral phosphate supply was also one of the main activities for improving plant growth. Data from this study showed that 26.53% of strains were capable of solubilizing phosphate. They can be considered as biofertilizers because they could release a quantity of soluble  $p$  which can be assimilated by plants. The percentage of strains obtained was low compared to other works. It was generally accepted that the nature of the soil had an impact on the performance of strains [3].

The synthesis of plant growth hormones, including IAA, is a very common faculty in PGPR. All strains isolated were capable of producing IAA at levels varying from 2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 13.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The highest values were obtained by the rhizospheric isolates of Oum Bouaghi OR16 (12.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), OR15 (13.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), OR14 (10.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Among the phytohormones, most salt-tolerant PGPR induced IAA biosynthesis. The variation in the amount of IAA produced by the PGPR was, however, species-specific. A high level of IAA produced by halotolerant rhizobacteria was responsible for increased root growth in saline soils. Phytohormones are essential for regulating plant responses and maintaining normal plant physiology to confer tolerance to salinity and other environmental stresses [23]. The responses of plants to salinity induce various alterations in molecular, biochemical and physiological aspects. Modulating the hormonal balance of plants is one of the strategies that PGPR adapted to improve plant growth. PGPR can also alter hormonal signaling from root to shoot, thereby improving salt tolerance in crops [25].

The siderophores production capacity of PGPR increases the availability of micronutrients for plants. Bacterial siderophores are used by plants as a source of iron. Additionally, bacterial siderophores act as protectors against pathogenic microorganisms and their deleterious effects on plant growth [26]. In the present study, 47.95% of the isolates were positive for the production of siderophores of which 48.93% were rhizosphere bacteria. Siderophores are Fe chelating compounds and have a strong affinity for iron. Siderophores make iron more accessible to plants by forming a Fe-siderophores complex. In saline and sodium soils, the level of iron available for uptake by plants is limited. Then in this type of soil, iron, and other micronutrients required by plants resulted in deficiency [27]. In parallel with auxin production, the growth of plants in these soil types is supported by rhizosphere bacteria producing siderophores.

Volatile substances are also involved in the suppression of various pathogens. Ammonia produced as an intermediate in the amino acid catabolism of root exudates can help supply the nitrogen requirement of the host plant and in large amounts suppresses the colonization of plants by pathogens. The production of  $\text{NH}_3$  was very common in isolated strains where 67.34% produced ammonia. This rate was comparable to those mentioned by several studies [3,4].

HCN is a secondary metabolite produced by several PGPR. Although this compound is a general metabolic inhibitor, it is excreted as a means of avoiding predation or competition. It is highly toxic to all aerobic microorganisms, without affecting the producing microbes. In our study, 24.48% of the isolates could produce HCN. It has been shown that strains capable of producing HCN and siderophores showed inhibitory activity against several phytopathogenic fungi [28].

The existence of hydrolytic enzymes associated with PGPRs is a necessary characteristic to detect the most effective strains. Their presence limits the growth of fungal phytopathogens and reinforces the resistance of plants against these diseases [28]. The enzymatic potential of the isolates was evaluated by the production of amylase (92.85%), chitinase (61.22%), cellulase (41.83%), and protease (36.73%). Chitinase, for example, breaks down the fungal cell wall and causes lysis of fungal cells. Additionally, the chitin and glucan oligomers released during the breakdown of the fungal cell wall act as elicitors that trigger various defense mechanisms in plants. These enzymes were produced by various bacteria such as *Pseudomonas stutzeri* capable of lysing the pathogen *Fusarium* sp. [23].



The antifungal activity carried out on 40 isolates selected according to their PGP activity, showed that 55% of them inhibited the growth of phytopathogenic fungi. The antifungal metabolites were more active against *A. niger* where the majority (97.5%) of the strains inhibited it at a rate of 72.5% for the OE1 strain. On the other hand, *F. oxysporum* was the least sensitive [4], it was inhibited at a rate of 44% (strain BR6). It has been well demonstrated that indigenous microorganisms associated with plants in agro-desert ecosystems have a significant antagonistic potential against phytopathogens [13].

In order to select strains tolerant to various abiotic constraints, 10 strains were evaluated for their ability to grow at different concentrations of NaCl, PEG<sub>8000</sub>, and different pH and temperature values. The majority of strains had grown in a wide range of stress tested. Most strains grew appreciably up to 400 mM NaCl and tolerated 20% PEG. These findings confirmed the close link between strain tolerance and their origin. Bacteria associated with halophytic plants can tolerate salt levels ranging from 4 to 30%. These PGPR tolerated salinity up to at least 3% NaCl [29] and were able to survive in the rhizosphere of plants due to their persistence and competitiveness in saline and arid soil conditions. However, most isolates had optimal growth between 30 and 37 °C and at pH 7 except of some strains which were able to grow at 40 °C and at alkaline pH (pH 9) or even very alkaline pH (pH 11) for strain BR5. Temperature is one of the most important factors governing the physiology and growth of microorganisms. The strain's ability to grow over a wide pH range is evidence to its ability to survive. Strain tolerance is a strain-specific trait. Indeed, the stressful sampling environment promotes the development of efficient bacteria. It is agreed that stress is an inducer of bacterial species activity [30]. Fluctuating ecosystems promote the development of bacteria with good stress tolerance, this supposes the existence of selection pressure exerted by the natural environment.

Three representative strains from each sample site with the best PGP activities and the best stress tolerance capacity were chosen and identified after 16S-rDNA sequencing. The BR5, OR15, and RB13 strains belong to *Bacillus atropheus*. The Bacilli represent a significant fraction of the microbial community in soil. This genus is ubiquitous and can survive in several environments based on its sporulating capacity. Moreover, *Bacillus* strains exhibit several characteristics which improve their survival in the rhizosphere and their efficiency as PGPR. It has been shown that when environmental conditions are more selective, microbiome variability can be simplified, and taxonomic diversity is limited [31].

It has also been reported that in saline ecosystems native halophytes such as *Salicornia* sp. retain a rhizosphere bacterial community, homogeneous in the composition of taxa [22].

To test the PGP potential of the selected strains of *Bacillus* (BR5, OR15, and RB13) on plants, plants of *Arabidopsis thaliana* were inoculated with each strain and their different combinations compared to the control plants not inoculated under saline stress conditions (0, 50, 100, and 150 mM NaCl). The results showed a significant decrease in the different growth parameters (total foliar area, plant weight, root length, and chlorophyll content) under salinity stress. The responses of plants to salinity induce various alterations in the biochemical and physiological structural aspects. Different studies have reported that salinity affects plants in several ways, the rate of leaf area expansion decreases along with a reduction in the rate of leaf production resulting in plant death [32]. Salinity can increase the biosynthesis of certain hormones such as ethylene to high enough levels which can lead to physiological changes in plant tissue. Inoculation with the bacteria considerably improved the growth parameters of *A. thaliana*. Similar results of promoting the growth of *A. thaliana* plants (total leaf area, plant weight, chlorophyll content, and root length) have already been reported by several works using various species of PGPR such as *Burkholderia phytofirmans* [33], *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 [34], and *Bacillus subtilis* GB03 [35]. At high concentrations of NaCl (100 and 150 mM), the various morphological parameters were significantly reduced. Bacterial inoculation (including OR15 and RB13) and their combination improved the aerial part of the plants (fresh weight and leaf surface) and the chlorophyll content. While root length did not seem to be affected by the increase in the salt. It could be interpreted that auxin produced by these strains could be responsible for

the promotion of growth and salt tolerance. Auxin is one of the important plant hormones responsible for the formation of lateral roots at different stages of development. The IAA is the plant growth regulator; it can enter plant cells and stimulate root growth [36]. In our study, strains BR5, OR15, and RB13 produced IAA with amounts comparable to those reported by Farah et al. [37] produced by *Azotobacter*, *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from rhizosphere soil. Roots treated with IAA-producing strain *Pseudomonas putida* improved canola seed roots by 35–50% compared to an IAA-deficient strain [36].

Determining the germination potential of seeds under saline conditions is another consideration when selecting PGPR effective in salt stress tolerance. Final seed germination and the germination rate of wheat decreased in the presence of salt, which was common in several plant species [38]. Salt stress vigorously affects germinating seeds compared to growing plants, as germination normally occurs in soil surfaces where soluble salts accumulate due to evaporation. Restricted water availability and ion accumulation lead to reduced germination, many changes in the enzymatic and hormonal activities of the seeds and affect the structural organization of the germinating embryo [39].

The treatment of durum wheat seeds with the bacterial strains and their combinations considerably improved the germination parameters with and without added salt. The effect of seed inoculation by the different strains was visible on the cumulative germination rate and the final germination percentage. The best levels were obtained after inoculation with the BR5 strain and the combination of the three strains. The use of salt-tolerant bacteria was an effective strategy for seed priming and eventually plant yield [32]. Germination vigor indices were also significantly improved after the inoculation with bacteria and their combinations with or without salt. A significant increase in the vigor of the seedlings would be produced by a better synthesis of auxins by PGPR which directly improves different cell defense systems triggering early germination even under stress conditions. Quick and healthy seed germination is the first step in achieving vigorous plant production [40].

The effect of inoculation with rhizobacteria and their combination on the plant growth of wheat was carried out in pots on three soils of different salinities. This test makes it possible to verify the competence of the strains in the possibility of using them as biofertilizers for plant crops on saline soils or irrigated by saline waters. For this, the soils used were taken directly from the periphery of the Chotts and different places, having high electrical conductivity values (S2 = 3.81 and S3 = 2.80 mS/cm) in comparison with a non-saline control soil (S1 = 0.48 mS/cm). The results obtained showed that the growth of wheat represented by its morphological parameters was significantly affected by salinity and that bacterial inoculation had a significant beneficial effect on these parameters. In this study, salinity was observed to reduce plant height, root length, and fresh and dry weight of shoots and roots. These results were similar to those of many studies [3,20,24]. The most common effects of salinity are loss of turgor, reduced growth, resulting in smaller leaves, shorter stature, early senescence, loss of cell integrity, tissue necrosis, and even plant death [27].

However, in this test, inoculation of wheat plants showed a positive effect at all salinity levels for plant height, root length, and fresh, dry shoot and root weight (even minimal for the most stressful soil 2). These results suggested that stress was lower in the inoculated plants, with evidence that inoculation can effectively reduce saline stress. PGPR induce changes in the outer layers of the root cortex allowing increased cell division at the ends of wheat seedlings [41]. This phenomenon could be attributed to the production of auxin, inhibition of ethylene synthesis, or mineralization of nutrients [28], or even decreased absorption of toxic ions [41].

Chlorophyll analysis is one of the important biochemical parameters as an indicator of salt tolerance and plant protection capacity [32]. The results relating to the chlorophyll contents showed that the salinity stress led to a significant reduction in the chlorophyll contents [42–44]. This decrease could be due to high osmotic stress resulting in reduced assimilation of essential minerals [45]. A deficiency in these minerals, especially N, could lead to inhibition of the formation of chlorophyll molecules [44]. Additionally, a high

concentration of salts in the leaves could cause overproduction of reactive oxygen species (ROS) and destroy all protein components of the chloroplast [43]. On the other hand, inoculation of PGPR resulted in an improvement in the chlorophyll and carotenoid contents compared with the respective uninoculated controls. Improvement by PGPRs of the chlorophyll content in many plants cultivated under abiotic stress conditions had been previously described [35,46]. It was noted that for the different treatments the multi-strain combination showed a significant improvement in the chlorophyll and carotenoid contents compared to the other isolates and the uninoculated controls [47]. Application of a multi-strain consortium could be due to increased solubilization and mobilization of minerals. Plants can also protect themselves from salt stress by accumulating compatible solutes such as sugars and amino acids for intercellular osmotic adjustment or by synthesizing antioxidant enzymes, which decrease excessive ROS and maintain membrane stability [48].

The highest chlorophyll and carotenoid contents were recorded in the cases inoculated by the different combinations in soils 1 and 2. However in soil 3, despite its low salinity compared to soil 2, the chlorophyll and carotenoids contents were lower and similar for the different treatments excepted for OR15 strain which seemed to improve the carotenoid content. These results confirmed that factors affecting plant yield are not only limited to chlorophyll content and that photosynthetic efficiency is also linked to a range of factors [49]. Under salinity stress in soil 2, the BR5 strain caused a strong increase in the chlorophyll content which could be due to the halotolerant nature of this strain reducing the sodium accumulation which was associated with higher chlorophyll content. The reduction of chlorophyll is possibly related to the sensitivity of one of the stages of its biosynthesis to sodium chloride. The latter affects the chlorophyll b biosynthesis pathway less [50].

Analysis of the total soluble sugars content revealed that the saline stress significantly increased the quantity of these molecules in the plant, essentially at the root level, in the case of soils 2 and 3. The accumulation of total sugars in salt-stressed plants is a means of osmotic adjustment. These molecules play a vital role in osmoprotectant and carbon storage. Their accumulation induced by salt stress was further enhanced by PGPR. However, this was variable depending on the type of treatment. It was significantly increased by inoculation with RB13 or BR5 + RB13, OR15 + RB13, or BR5 + OR15 + RB13 co-inoculations. The increase in total sugars in stressed inoculated plants had been attributed to higher photosynthesis and starch degradation [51]. Therefore, an increase in the total sugars content following inoculation or co-inoculation with PGPRs significantly contributes to the growth of plants against salt stress by modulating defense strategies.

An increase in protein content was recorded in plants inoculated with PGPRs. Inoculation improved protein content, which may be due to a decrease in the effect of salinity by PGPR strains and an increase in N uptake by the plant, which is an important protein constituent. The increase in antioxidant activity reduces the damage of proteins and amino acids. Many studies reported that PGPR-induced increase in leaf protein content in cereals and legumes [52].

Saline stress tolerance mechanisms often include the accumulation of proline. In our study, foliar and root proline concentrations were high in plants grown in saline soil (soil 2). Proline has been reported to reduce enzymatic denaturation caused by NaCl and other stresses. Accumulation of proline attenuates the reduction in the activity of antioxidant enzymes induced by saline stress. Proline is considered not only as a compatible solute and an osmoprotectant, but also as a scavenger of hydroxyl radicals. Under stressful conditions, proline stabilizes proteins, membranes and sub-cellular structures and protects cellular functions by eliminating ROS [53]. Inoculation reduced the accumulation of proline in the plant grown in the same soil. Studies on the impact of PGPR on proline concentration in stressed plants are contradictory. Many studies have reported that proline levels are higher in inoculated plants compared to uninoculated plants while others have reported lower proline content in plants inoculated with PGPR. These disagreements can be due to different bacterial species, the mechanism of bacterial communication with the plant, the interaction between bacteria, and the intensity of salt stress. Besides its role as an

osmoprotectant, proline is also considered to be a stress marker. As a result, inoculated plants may accumulate less proline as stress is reduced [38]. There was no difference in proline content between inoculation treatments and controls under normal conditions, which was consistent with the result published by García et al. [54], indicating that PGPR inoculation did not influence proline content under stress-free conditions.

Lipid peroxidation measured by MDA levels is an oxidative degradation process of lipids which results in the production of ROS. The most common targets for lipid peroxidation are biological membranes. These modifications lead to functional changes that disrupt cell metabolism [55]. Therefore, increased lipid peroxidation is considered an indication of increased oxidative damage often applied to estimate the tolerance of plants to salinity and drought. In the present study, an increase in lipid peroxidation at the leaf level in the three soils was noted, however, the PGPR treatment reduced the levels of MDA in plants grown in saline soils. Comparable results have been reported in cucumber plants treated with PGPR under drought stress, in white clover [56] inoculated and cultivated under saline conditions. A significant reduction in MDA content had been shown in soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *A. chroococcum* compared to uninoculated controls under unstressed and drought-stressed conditions [54]. This reduction in lipid peroxidation because PGPRs reduced cellular damage was caused by abiotic stress and increased tolerance to environmental stress.

Antioxidant enzymes play a critical role in detoxifying the destructive effects of ROS created in plants under water or salt stress. Under saline conditions (Soil 2), the activities of APX, GPX, and SOD enzymes were more intense, while those of CAT were little variable. According to, Upadhyay et al. [57], the activity of antioxidant enzymes in wheat was improved with an increasing salt concentration in the soil. The induction of enzymes activities of CAT, POX, and APX under salt stress was higher in salt-tolerant cultivars [58]. The decrease in antioxidant enzymatic activities observed after inoculation with PGPR can be attributed to the enhancement of the adverse effects of salt stress thus reducing the production of ROS. These results were consistent with those reported by Khan et al. [55] who reported that PGPR inoculation reduced SOD activity in susceptible cultivars of *Oryza sativa* and improved resistance to saline stress. The results of the reduction of the antioxidant enzyme, APX, CAT, and glutathione reductase (GR) following the treatment of wheat with *B. subtilis* and *Arthrobacter* sp. under stress conditions have been reported by Upadhyay et al. [57]. In contrary, Singh and Jha [59] showed that inoculation of wheat with *Stenotrophomonas maltophilia* increased the activities of SOD, CAT, and POX under saline conditions. The best conclusion that can be drawn from these somewhat contradictory results is that each PGPR strain has a specific enzymatic potential which can be expressed or suppressed under normal or stressful environmental conditions. In addition, a bacterium can have different effects when interacting with a plant. The interactions of microbial communities associated with plants are complex and their consequences on plant health define the microbiome which can enhance growth in various ways [60].

## 5. Conclusions

The results of this study clearly indicate that BR5, OR15, and RB13 strains showed interesting and promising results to mitigate the salinity issue. These bacteria and their combinations were able to promote the growth parameters and the chlorophyll content of *A. thaliana*, as well as improving the durum wheat final seed germination in the presence of salt (150 mM NaCl). This study has extended the range of the halotolerant PGPR strains that have promising results and it can be used as biofertilizers to reduce salinity and for the benefit of the plants.



**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/3/1034/s1>, Figure S1: PGP activities of different strains in (A) Sebkha Bazer Sakhra, (B) Oum El Bouaghi and (C) Baniou locations. Figure S2: Growth of bacterial strains against (A) different NaCl concentrations, (B) pH values, (C) temperatures and (D) percentages of polyethylene glycol (PEG). Values are means  $\pm$  SD of three replicates. Bars in each group with different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$  according to Tukey's multiple comparison post-test. Figure S3: Maximum Likelihood phylogenetic tree of Gram-positive bacteria including *Bacillus atrophaeus*. *Bacillus pumilis* strain PL-3 was used as outgroup. Supports for branches were assessed by bootstrap resampling of the data set with 1000 replications. (Accession numbers of RB13, BR5 and OR15 are MT644481, MT644479 and MT644480 respectively). Figure S4: Effect of bacterial isolates on (A) Root length (cm), (B) Root fresh weight (mg) and (c) Leaf area (cm<sup>2</sup>) against different concentrations of NaCl. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey's multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments. Bars in each group with different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$ . Figure S5: Effect of bacteria isolates on (A) Chlorophyll a ( $\mu\text{g/g}$  FW), (B) Chlorophyll b ( $\mu\text{g/g}$  FW), (C) Chlorophyll a+b ( $\mu\text{g/g}$  FW) and (D) Carotenoids ( $\mu\text{g/g}$  FW) contents exposed to different concentrations of NaCl in 3 different soils. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey's multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments in each family group. Bars in each group with different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$ . Figure S6: Effect of bacteria isolates on (A,B) Root and shoot total sugars (mg/g FW), (C,D) Root and shoot total proteins (mg/g FW), (E,F) Root and shoot proline content ( $\mu\text{g/g}$  FW) and (G,H) Root and shoot malondialdehyde (MDA) content ( $\mu\text{M/g}$  FW) exposed to different concentrations of NaCl in 3 different soils. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey's multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments each family group. Bars in each group with different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$ . Figure S7: Effect of bacteria isolates on (A,B) Root and shoot ascorbate peptidase (APX) content ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  protein), (C,D) Root and shoot guaiacol peroxidase (GPX) content (U/min/mg protein), (E,F) Root and shoot superoxide dismutase (SOD) content (U/min/mg protein) and (G,H) Root and shoot catalase (CAT) content (U/min/mg protein) exposed to different concentrations of NaCl in 3 different soils. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey's multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments each family group. Bars in each group with different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$ . Table S1 IAA production of strains from different locations (A) Sebkha Bazer Sakhra, (B) Oum El Bouaghi and (C) Baniou locations. Table S2: Antifungal assay of selected strains

**Author Contributions:** Conceived and designed the experiments: S.K., H.C.-S. and L.B. Performed the experiments: S.K., H.C.-S., A.S. and L.B. Analyzed the data: H.C.-S., A.S., M.E. and A.C.B. Contributed reagents/materials/analysis tools: S.K., H.C.-S., A.S., N.E.H.R. and L.B. Wrote and enriched the literature: L.B., H.C.-S., A.S. and A.C.B. Edited the manuscript: L.B., H.C.-S., A.S., A.C.B., M.E. and L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

1. Rekik, I.; Chaabane, Z.; Missaoui, A.; Chenari Bouket, A.; Luptakova, L.; Elleuch, A.; Belbahri, L. Effects of untreated and treated wastewater at the morphological, physiological and biochemical levels on seed germination and development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), alfalfa (*Medicago sativa* L.) and fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *J. Hazard. Mater.* **2017**, *326*, 165–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Frikha-Dammak, D.; Zarai, Z.; Najah, S.; Abdennabi, R.; Belbahri, L.; Rateb, M.E.; Mejdoub, H.; Maalej, S. Antagonistic properties of some halophilic thermoactinomycetes isolated from superficial sediment of a solar saltern and production of cyclic antimicrobial peptides by the novel isolate *Paludifilum halophilum*. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 1205258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Cherif-Silini, H.; Thissera, B.; Chenari Bouket, A.; Saadaoui, N.; Silini, A.; Eshelli, M.; Alenezi, F.N.; Vallat, A.; Luptakova, L.; Yahiaoui, B.; et al. Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Slama, H.B.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Qader, M.; Silini, A.; Yahiaoui, B.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Triki, M.A.; Vallat, A.; et al. Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Munns, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **2002**, *25*, 239–250. [[CrossRef](#)]
6. Pegler, J.L.; Grof, C.P.L.; Eamens, A.L. Profiling of the differential abundance of drought and salt stress-responsive microRNAs across grass crop and genetic model plant species. *Agronomy* **2018**, *8*, 118. [[CrossRef](#)]
7. Lara, E.; Belbahri, L. SSU rRNA reveals major trends in oomycete evolution. *Fungal Divers.* **2011**, *49*, 93–100. [[CrossRef](#)]
8. Luchi, N.; Ghelardini, L.; Belbahri, L.; Quartier, M.; Santini, A. Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by quantitative Real-Time PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5394–5404. [[CrossRef](#)]
9. Bellabarba, A.; Fagorzi, C.; di Cenzo, G.C.; Pini, F.; Viti, C.; Checcucci, A. Deciphering the symbiotic plant microbiome: Translating the most recent discoveries on rhizobia for the improvement of agricultural practices in metal-contaminated and high saline lands. *Agronomy* **2019**, *9*, 529. [[CrossRef](#)]
10. Belbahri, L.; Chenari Bouket, A.; Rekik, I.; Alenezi, F.N.; Vallat, A.; Luptakova, L.; Petrovova, E.; Oszako, T.; Cherrad, S.; Vacher, S.; et al. Comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1438. [[CrossRef](#)]
11. Mefteh, F.B.; Chenari Bouket, A.; Daoud, A.; Luptakova, L.; Alenezi, F.N.; Gharsallah, N.; Belbahri, L. Metagenomic insights and genomic analysis of phosphogypsum and its associated plant endophytic microbiomes reveals valuable actors for waste bioremediation. *Microorganisms* **2019**, *7*, 382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mefteh, F.B.; Frikha, F.; Daoud, A.; Chenari Bouket, A.; Luptakova, L.; Alenezi, F.N.; Al-Anzi, B.S.; Oszako, T.; Gharsallah, N.; Belbahri, L. Response surface methodology optimization of an acidic protease produced by *Penicillium bilaiae* isolate TDPEF30, a newly recovered endophytic fungus from healthy roots of date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.). *Microorganisms* **2019**, *7*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cheffi, M.; Chenari Bouket, A.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Belka, M.; Vallat, A.; Rateb, M.E.; Tounsi, S.; Triki, M.A.; Belbahri, L. *Olea europaea* L. root endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 counteracts oomycete and fungal harmful pathogens and harbours a large repertoire of secreted and volatile metabolites and beneficial functional genes. *Microorganisms* **2019**, *7*, 314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dhoub, H.; Zouari, I.; Abdallah, D.B.; Belbahri, L.; Taktak, W.; Triki, M.A.; Tounsi, S. Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. *Biol. Control* **2019**, *139*, 104092. [[CrossRef](#)]
15. Abdul-Baki, B.A.A.; Anderson, J.D. Relationship between decarboxylation of glutamic acid and vigor in soyabean seed. *Crop Sci.* **1973**, *13*, 227–234. [[CrossRef](#)]
16. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Phenol-sulfuric total sugar. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356. [[CrossRef](#)]
17. Carrillo, P.; Mastrolonardo, G.; Nacca, F.; Parisi, D.; Verlotta, A.; Fuggi, A. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Funct. Plant Biol.* **2008**, *35*, 412–426. [[CrossRef](#)]
18. Lowry, O.H.; Rosbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265. [[CrossRef](#)]
19. Aebi, H. Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1984; Volume 105, pp. 121–126.
20. Etesami, H.; Beattie, G.A. Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 14. [[CrossRef](#)]
21. Durán, R.E.; Méndez, V.; Rodríguez-Castro, L.; Barra-Sanhueza, B.; Salvà-Serra, F.; Moore, E.R.B.; Castro-Nallar, E.; Seeger, M. Genomic and physiological traits of the marine bacterium *Alcaligenes aquatilis* QD168 isolated from Quintero Bay, Central Chile, reveal a robust adaptive response to environmental stressors. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 528. [[CrossRef](#)]
22. Mapelli, F.; Marasco, R.; Rolli, R.E.; Barbato, M.; Cherif, H.; Guesmi, A.; Ouzari, I.; Daffonchio, D.; Borin, S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 248078. [[CrossRef](#)]
23. Rolfe, S.A.; Griffiths, J.; Ton, J. Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *49*, 73–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **2003**, *255*, 571–586. [[CrossRef](#)]
25. Tsukanova, K.A.; Chebotar, V.; Meyer, J.J.M.; Bibikova, T.N. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *S. Afr. J. Bot.* **2017**, *113*, 91–102. [[CrossRef](#)]
26. Zhou, N.; Zhao, S.; Tian, C.Y. Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*, 11. [[CrossRef](#)]
27. Abbas, G.; Saqib, M.; Akhtar, J. Interactive effects of salinity and iron deficiency on different rice genotypes. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2015**, *178*, 306–311. [[CrossRef](#)]
28. Goswami, D.; Thakker, J.N.; Dhandhukia, P.C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A review. *Cogent Food Agric.* **2016**, *2*, 1–19. [[CrossRef](#)]

29. Egamberdieva, D.; Berg, G.; Lindström, K.; Räsänen, L.A. Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (Goat's Rue) by co-inoculation of rhizobium with root colonizing *Pseudomonas*. *Plant Soil* **2011**, *369*, 453–465. [[CrossRef](#)]
30. Banerjee, S.; Palit, R.; Sengupta, C.; Standing, D. Stress induced phosphate solubilization by 'Arthrobacter' sp. and 'Bacillus' sp. isolated from tomato rhizosphere. *Aust. J. Crop Sci.* **2010**, *4*, 378.
31. Marasco, R.; Rolli, E.; Vigani, G.; Borin, S.; Sorlini, C.; Ouzari, H.; Zocchi, G.; Daffonchio, D. Are drought-resistance promoting bacteria cross-compatible with different plant models? *Plant Signal Behav.* **2013**, *8*, e26741. [[CrossRef](#)]
32. Fan, D.; Subramanian, S.; Smith, D.L. Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Poupin, M.J.; Timmermann, T.; Vega, A.; Zuñiga, A.; González, B. Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mantelin, S.; Desbrosses, G.; Larcher, M.; Tranbarger, T.J.; Cleyet-Marel, J.C.; Touraine, B. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta* **2006**, *223*, 591–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Liu, X.; Wei, W.; Zhu, W.; Su, L.; Xiong, Z.; Zhou, M.; Zheng, Y.; Zhou, D.X. Histone deacetylase AtSRT1 regulates metabolic flux and stress response in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **2017**, *10*, 1510–1522. [[CrossRef](#)]
36. Patten, C.L.; Glick, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3795–3801. [[CrossRef](#)]
37. Farah, A.; Iqbal, A.; Khan, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 173–181.
38. Silini, A.; Silini-Cherif, H.; Ghoul, M. Effect of *Azotobacter vinelandii* and compatible solutes on germination wheat seeds and root concentrations of sodium and potassium under salt stress. *Pakistan J. Biol. Sci.* **2012**, *15*, 132–140. [[CrossRef](#)]
39. Delshadi, S.; Ebrahimi, M.; Shirmohammadi, E. Influence of plant-growth-promoting bacteria on germination, growth and nutrients' uptake of *Onobrychis sativa* L. under drought stress. *J. Plant Interact.* **2017**, *12*, 200–208. [[CrossRef](#)]
40. Zafar-ul-Hye, M.; Danish, S.; Abbas, M.; Ahmad, M.; Munir, T.M. ACC deaminase producing PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* and *Agrobacterium fabrum* along with biochar improve wheat productivity under drought stress. *Agronomy* **2019**, *9*, 343. [[CrossRef](#)]
41. Baset Mia, M.A.; Shamsuddin, Z.H.; Wahab, Z.; Marziah, M. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured musa plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Aust. J. Crop Sci.* **2010**, *4*, 85–90.
42. Mahmood, S.; Daur, I.; Al-Solaimani, S.G.; Ahmad, S.; Madkour, M.H.; Yasir, M.; Ali, Z. Plant growth promoting rhizobacteria and silicon synergistically enhance salinity tolerance of mung bean. *Front. Plant. Sci.* **2016**, *7*, 876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Panwar, M.; Tewari, R.; Gulati, A.; Nayyar, H. Indigenous salt-tolerant rhizobacterium *Pantoea dispersa* (PSB3) reduces sodium uptake and mitigates the effects of salt stress on growth and yield of chickpea. *Acta Physiol. Plant.* **2016**, *38*, 278. [[CrossRef](#)]
44. Rabhi, N.E.H.; Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Yahiaoui, B.; Lekired, A.; Robineau, M.; Esmaeel, Q.; Jacquard, C.; Vaillant-Gaveau, N.; Clément, C.; et al. *Pseudomonas knackmussii* MLR6, arhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 1836–1851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Soliman, W.S.; Fujimori, M.; Tase, K.; Sugiyama, S. Heat tolerance and suppression of oxidative stress: Comparative analysis of 25 cultivars of the C3 grass *Lolium perenne*. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *78*, 10–17. [[CrossRef](#)]
46. Kang, S.M.; Khan, A.; Waqas, M.; You, Y.H.; Kim, J.H.; Kim, J.G.; Hamayun, M.; Lee, L.J. Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *J. Plant Interact.* **2014**, *9*, 673–682. [[CrossRef](#)]
47. Al-Erwy, A.S.; Al-Toukhy, A.; Bafeel, S.O. Effect of chemical, organic and bio fertilizers on photosynthetic pigments, carbohydrates and minerals of wheat (*Triticum aestivum* L.) irrigated with sea water. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* **2016**, *3*, 296–310.
48. Afridi, M.S.; Amna, S.; Mahmood, T.; Salam, A.; Mukhtar, T.; Mehmood, S.; Ali, J.; Khatoon, Z.; Bibi, M.; Javed, M.T.; et al. Induction of tolerance to salinity in wheat genotypes by plant growth promoting endophytes: involvement of ACC deaminase and antioxidant enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *139*, 569–577. [[CrossRef](#)]
49. Simkin, A.J.; Lopez-Calcagno, P.E.; Raines, C.A. Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 1119–1140. [[CrossRef](#)]
50. Tewari, T.N.; Singh, B.B. Sodicity induced changes in chlorophyll, nitrate, nitrite reductase, nucleic acids, proline and yield components of lentil. *Plant Soil* **1991**, *136*, 225–230. [[CrossRef](#)]
51. Zhu, S.N.; Feng, P.Z.; Feng, J.; Xu, J.; Wang, Z.M.; Xu, J.L.; Yuan, Z.H. The roles of starch and lipid in *Chlorella* sp. during cell recovery from nitrogen starvation. *Bioresour. Technol.* **2018**, *247*, 58–65. [[CrossRef](#)]
52. Perez-Montaña, F.; Alias-Villegas, C.; Bellogin, R.A.; del Cerro, P.; Espuny, M.R.; Jimenez-Guerrero, I.; Lopez-Baena, F.J.; Ollero, F.J.; Cubo, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 325–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Talaat, N.B.; Shawky, B.T. Modulation of the ROS scavenging system in salt-stressed wheat plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2014**, *177*, 199–207. [[CrossRef](#)]
54. García, J.E.; Maroniche, G.; Creus, C.; Suárez-Rodríguez, R.; Ramirez-Trujillo, J.A.; Groppa, M.D. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiol. Res.* **2017**, *202*, 21–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Khan, M.A.; Asaf, S.; Khan, A.L.; Ullah, I.; Ali, S.; Kang, S.M.; Lee, I.J. Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. *Ann. Microbiol.* **2019**, *69*, 797–808. [[CrossRef](#)]
56. Han, Q.Q.; Lü, X.P.; Bai, J.P.; Qiao, Y.; Paré, P.W.; Wang, S.M.; Zhang, J.L.; Wu, Y.N.; Pang, X.P.; Xu, W.P.; et al. Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Upadhyay, S.K.; Singh, J.S.; Saxena, A.K.; Singh, D.P. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidants status of wheat under saline conditions. *Plant Biol.* **2012**, *4*, 605–611. [[CrossRef](#)]
58. Siddiqui, M.N.; Mostofa, M.G.; Akter, M.M.; Srivastava, A.K.; Sayed, M.A.; Hasan, M.S.; Tran, L.S.P. Impact of salt-induced toxicity on growth and yield-potential of local wheat cultivars: oxidative stress and ion toxicity are among the major determinants of salt-tolerant capacity. *Chemosphere* **2017**, *187*, 385–394. [[CrossRef](#)]
59. Singh, R.P.; Jha, P.N. The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1945. [[CrossRef](#)]
60. Kumar, A.; Dubey, A. Rhizosphere Microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. *J. Adv. Res.* **2020**, *24*, 337–352. [[CrossRef](#)]

Figure S1. PGP activities of different strains in A) Sebkhya Bazer Sakhra, B) Oum El Bouaghi and C) Baniou locations.

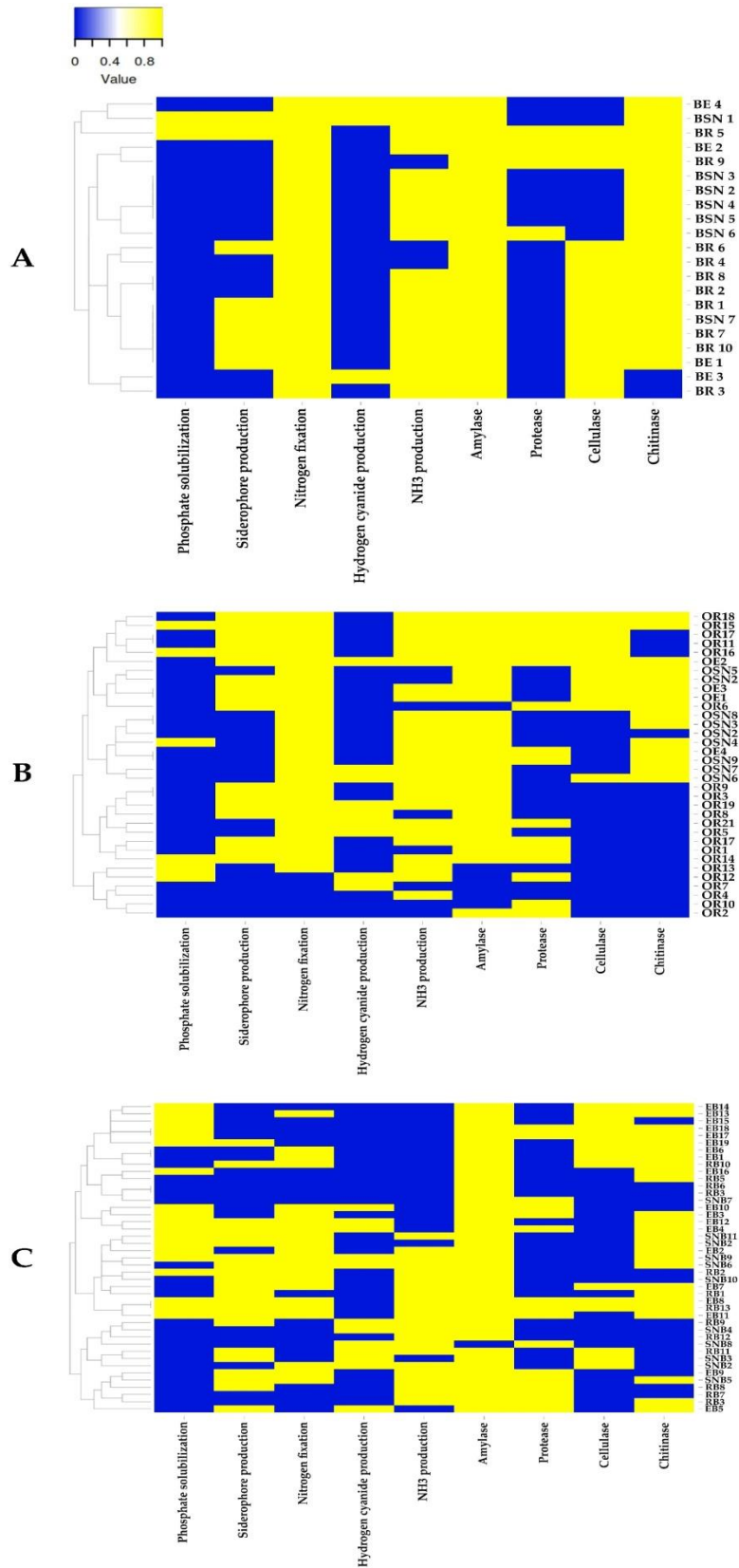




Figure S2. Growth of bacterial strains against (A) different NaCl concentrations, (B) pH values, (C) temperatures and (D) percentages of polyethylene glycol (PEG). Values are means  $\pm$  SD of three replicates. Bars in each group with different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$  according to Tukey's multiple comparison post-test.

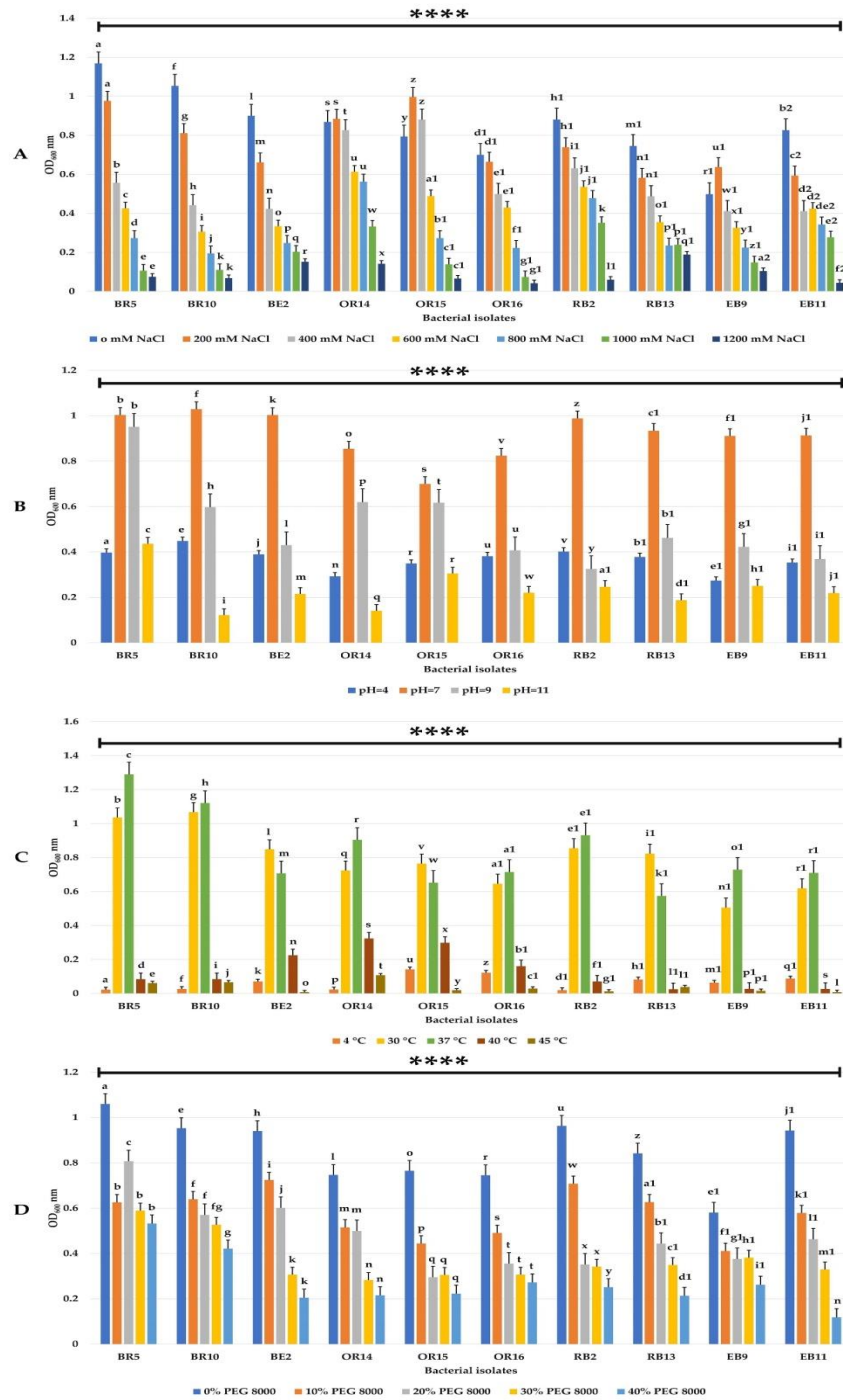


Figure S3. Maximum Likelihood phylogenetic tree of Gram-positive bacteria including *Bacillus atrophaeus*. *Bacillus pumilis* strain PL-3 was used as outgroup. Supports for branches were assessed by bootstrap resampling of the data set with 1000 replications. (Accession numbers of RB13, BR5 and OR15 are MT644481, MT644479 and MT644480 respectively).

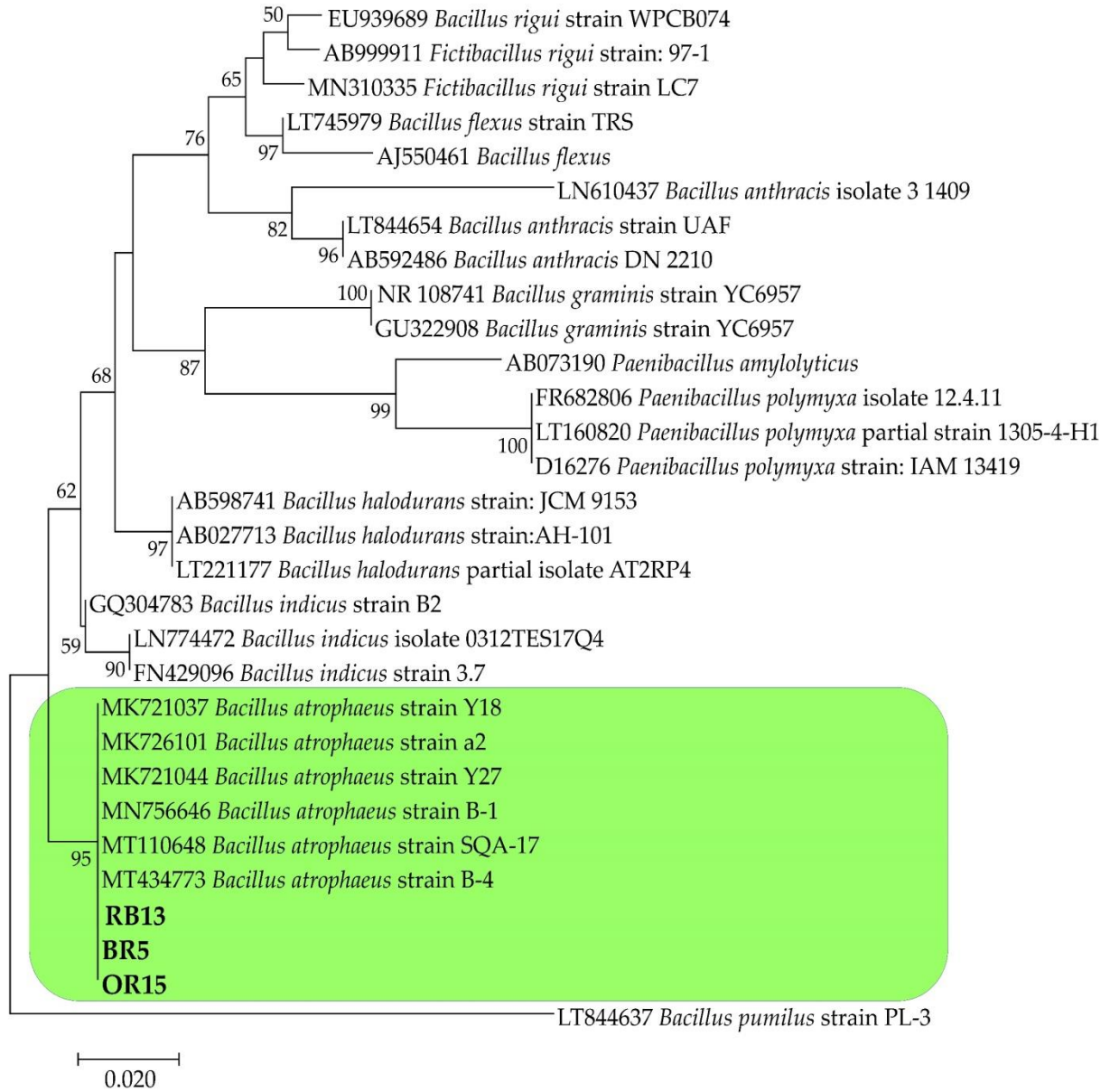


Figure S4. Effect of bacterial isolates on (A) Root length (cm), (B) Root fresh weight (mg) and (c) Leaf area (cm<sup>2</sup>) against different concentrations of NaCl. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey's multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments. Bars in each group with different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$ .

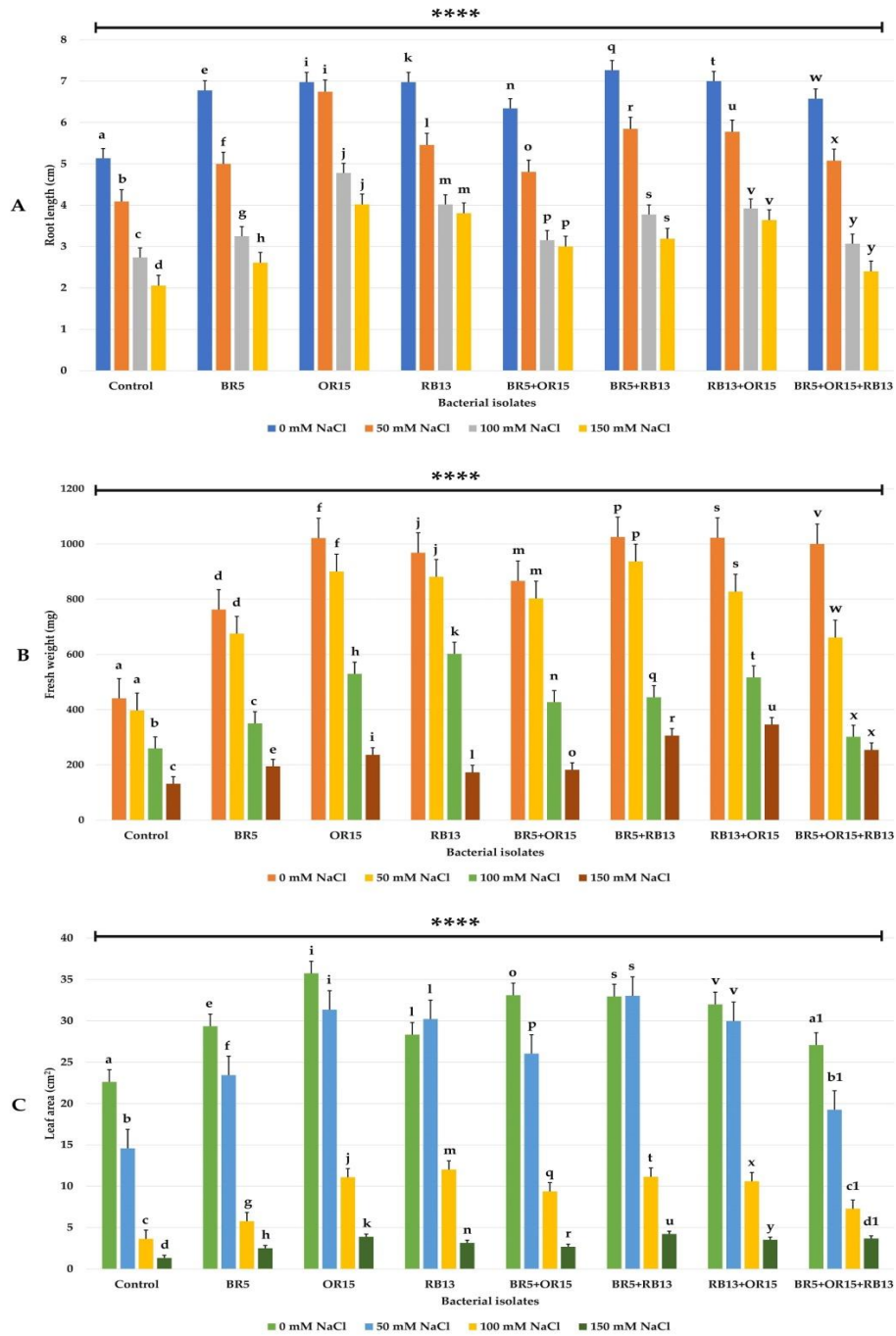




Figure S5. Effect of bacteria isolates on (A) Chlorophyll a ( $\mu\text{g/g FW}$ ), (B) Chlorophyll b ( $\mu\text{g/g FW}$ ), (C) Chlorophyll a+b ( $\mu\text{g/g FW}$ ) and (D) Carotenoids ( $\mu\text{g/g FW}$ ) contents exposed to different concentrations of NaCl in 3 different soils. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey's multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments in each family group. Bars in each group with different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$ .

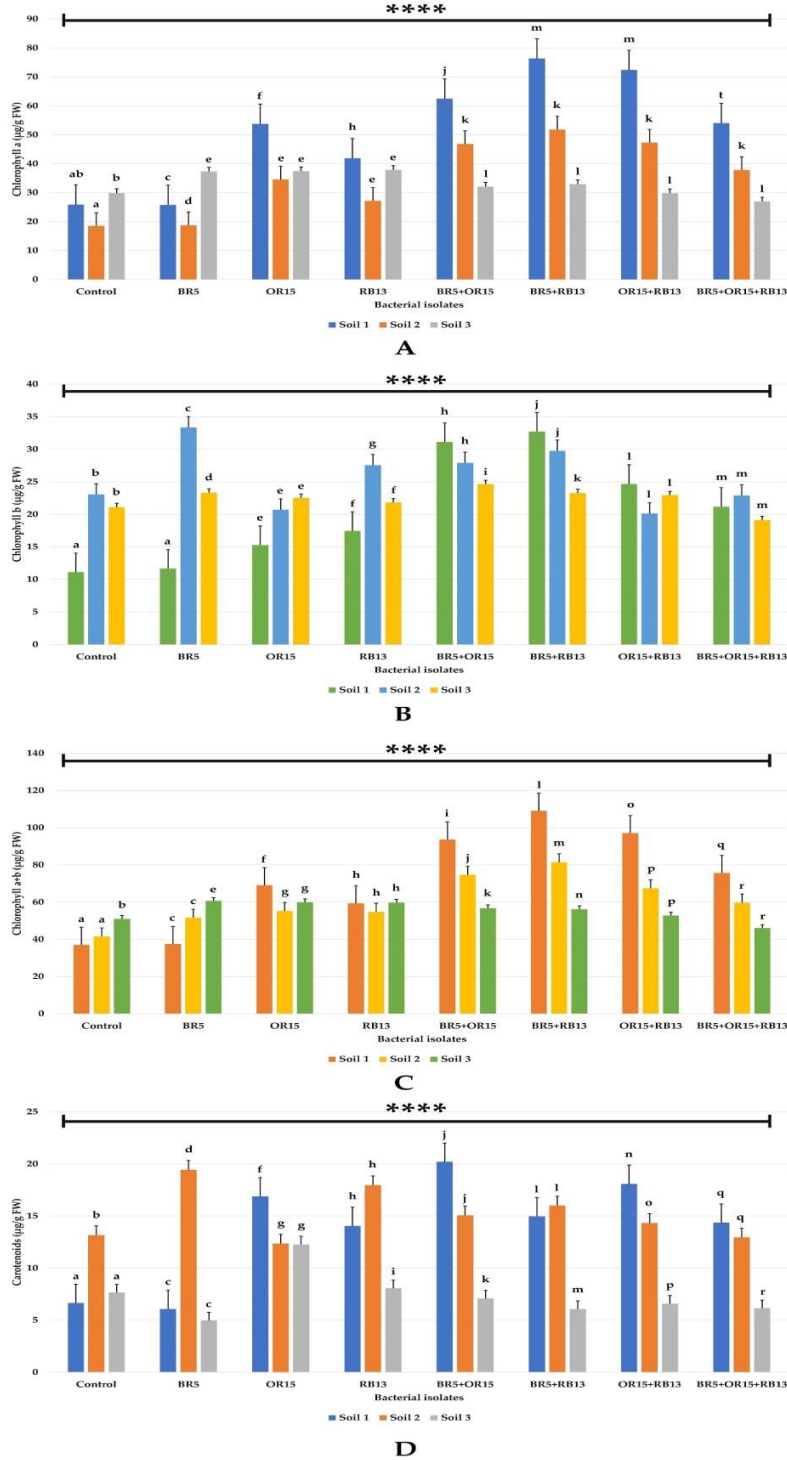


Figure S6. Effect of bacteria isolates on (A, B) Root and shoot total sugars (mg/g FW), (C, D) Root and shoot total proteins (mg/g FW), (E, F) Root and shoot proline content ( $\mu\text{g/g}$  FW) and (G, H) Root and shoot malondialdehyde (MDA) content ( $\mu\text{M/g}$  FW) exposed to different concentrations of NaCl in 3 different soils. Values are means  $\pm$  SD of three replicates. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis. Two-way ANOVA setting followed by Tukey's multiple comparison post-test was used to identify the differences between different treatments each family group. Bars in each group with different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$ .

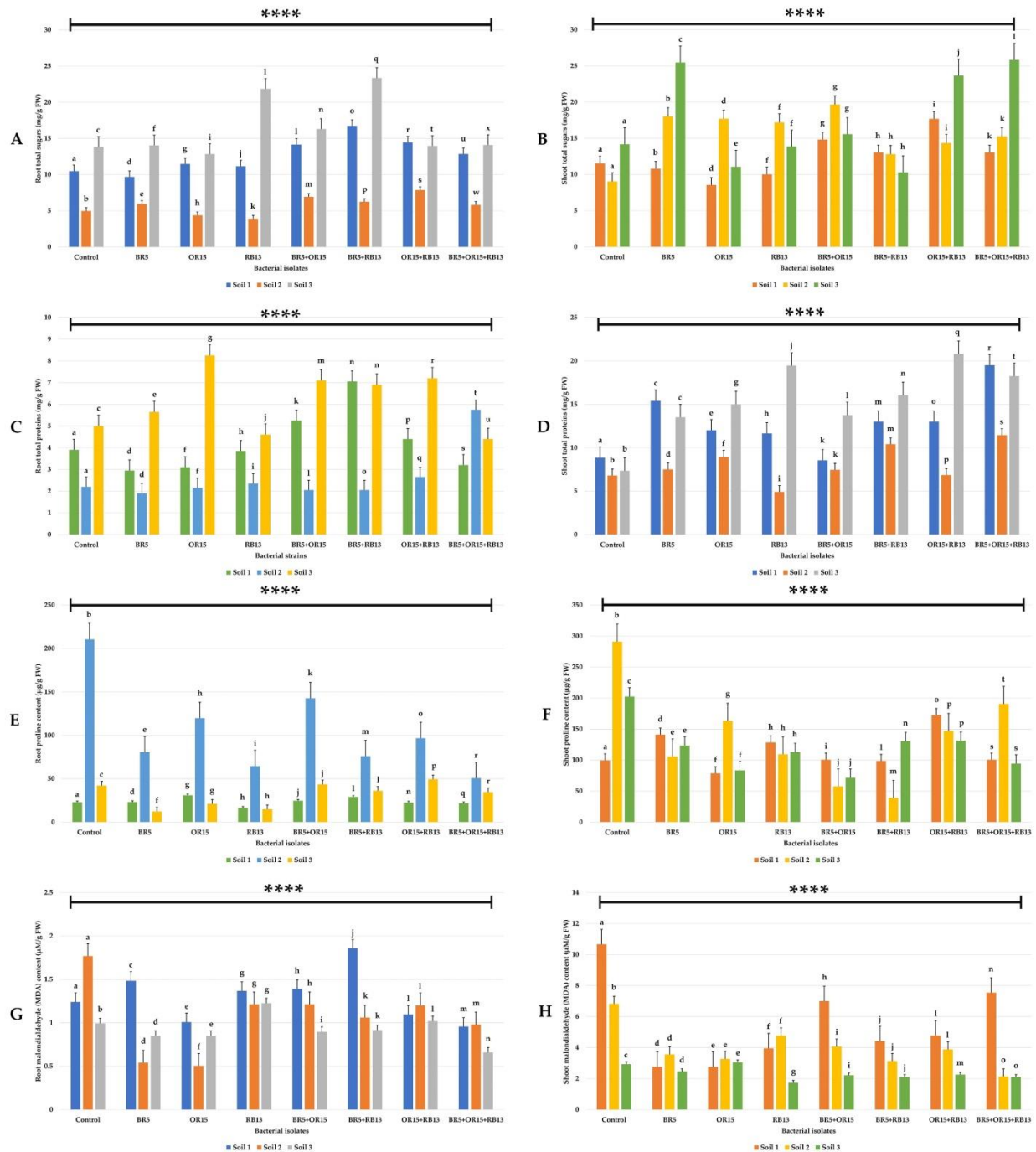




Table S1. Antifungal assay of selected strains.

Bacterial strains	Percentage of Inhibition			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BSN1	47±1.0	46±1.0	42.5±2.5	53.5±1.5
BSN7	45±0.0	59±1.0	43.5±1.5	76±1.0
BR1	55±0.0	71±1.0	40±0.0	61.5±1.5
BR5	61±1.0	72.5±2.5	36±1.0	61.5±1.5
BR6	61.5±1.5	62.5±2.5	44±1.0	63.5±1.5
BR7	54±1.0	66±1.0	33.5±1.5	56.5±1.5
BR10	53.5±1.5	60±0.0	33±1.5	56±1.0
BE1	ND	62.5±2.5	29±1.0	ND
OSN2	53.5±1.5	61.5±1.5	25±0.0	61±1.0
OR1	62.5±2.5	45±0.0	22.5±0.5	51±1.0
OR6	33.5±1.5	55±0.0	20±0.0	50±0.0
OR11	61±1.0	53.5±1.5	41±1.0	52.5±2.5
OR14	60±0.0	73.5±1.5	31±1.0	60±0.0
OR15	61±1.0	71±1.0	29±1.0	45±0.0
OR16	43.5±1.5	ND	26±1.0	43.5±1.5
OR17	51±1.0	61±1.0	31±1.0	60±0.0
OR18	61±1.0	ND	ND	ND
OR19	53.5±1.5	61±1.0	41±1.0	66±1.0
OE1	72.5±2.5	66±1.0	21±1.0	60±0.0
OE2	70±0.0	66±1.0	26±1.0	53.5±1.5
OE3	60±0.0	53.5±1.5	21±1.0	51±1.0
SNB2	31±1.0	ND	ND	ND
SNB3	61±1.0	ND	ND	ND
SNB5	41±1.0	ND	ND	ND
SNB6	35±0.0	ND	ND	ND
SNB9	45±0.0	ND	ND	ND
SNB11	41±1.0	ND	ND	ND
RB1	26.5±1.5	ND	ND	ND
RB8	31±1.0	ND	ND	ND
RB10	59±1.0	56±1.0	42.5±2.5	56±1.0
RB11	49±1.0	46.5±1.5	31±1.0	45±1.0
RB13	56±0.0	46.5±1.5	25.5±0.5	45±1.0
EB4	61±1.0	ND	ND	ND
EB5	48±1.0	ND	ND	ND
EB6	66±1.0	ND	ND	ND
EB8	60±0.0	ND	ND	ND
EB9	62.5±2.5	ND	ND	ND
EB11	56±1.0	ND	ND	ND
EB12	56±1.0	ND	ND	ND
EB19	45±0.0	ND	ND	ND

Table S2. IAA production of strains from different locations A)Sebkha Bazer Sakhra, B) Oum El Bouaghi and C) Baniou locations.

Sebkha Bazer Sakhra	
BSN 1	4.54±0.075
BSN 2	3.87±0.057
BSN 3	3.67±0.023
BSN 4	3.67±0.023
BSN 5	3.93±0.2
BSN 6	2.82±0.02
BSN 7	2.82±0.031
BR1	2.82±0.054
BR 2	3.77±0.037
BR 3	3.77±0.054
BR 4	3.61±0.037
BR 5	11.67±0.046
BR 6	2.86±0.049
BR 7	3.38±0.037
BR 8	4.09±0.04
BR 9	4.29±0.04
BR 10	5.67±0.046
BE 1	3.32±0.023
BE 2	8.67±0.046
BE 3	4.74±0.06
BE 4	3.51±0.051
Oum El Bouaghi	
OSN 1	3.12±0.023
OSN 2	5.54±0.049
OSN 3	3.19±0.025
OSN 4	3.35±0.037
OSN 5	3.25±0.031
OSN 6	3.41±0.04
OSN 7	2.93±0.025
OSN 8	3.22±0.057
OSN 9	4.41±0.017
OR 1	3.93±0.028
OR 2	3.06±0.025
OR 3	7.41±0.026
OR 4	3.45±0.037
OR 5	4.22±0.034
OR 6	4.19±0.025
OR 7	2.83±0.031
OR 8	7.8±0.04
OR 9	3.58±0.031
OR 10	4.03±0.02
OR 11	3.16±0.034

OR 12	3.45±0.04
OR 13	3.64±0.04
OR 14	10.06±0.031
OR 15	13.83±0.04
OR 16	12.67±0.054
OR 17	4.12±0.034
OR 18	3.54±0.054
OR 19	4.03±0.017
OR 20	4.45±0.037
OR 21	6.77±0.049
OE 1	3.22±0.034
OE 2	3.51±0.04
OE 3	4.06±0.031
OE 4	3.93±0.023
<b>Baniou</b>	
SNB 1	4.35±0.037
SNB 2	3.64±0.043
SNB 3	3.58±0.051
SNB 4	4±0.049
SNB 5	3.61±0.043
SNB 6	3.45±0.037
SNB 7	2.96±0.077
SNB 8	3.06±0.046
SNB 9	3.25±0.049
SNB 10	3.38±0.043
SNB 11	3.03±0.052
RB 1	3.25±0.037
RB 2	8.03±0.04
RB 3	3.38±0.037
RB 4	3.83±0.046
RB 5	3.16±0.031
RB 6	3.2±0.046
RB 7	4.64±0.043
RB 8	4.83±0.034
RB 9	3±0.06
RB 10	3.64±0.049
RB 11	5.61±0.046
RB 12	2.93±0.043
RB 13	9.93±0.054
EB 1	4.22±0.04
EB 2	3.09±0.017
EB 3	3.03±0.034
EB 4	3±0.054
EB 5	3.25±0.046
EB 6	2.35±0.04
EB 7	2.32±0.054

EB 8	3.06±0.049
EB 9	7.32±0.04
EB 10	6.22±0.046
EB 11	8.67±0.057
EB 12	4.35±0.037
EB 13	2.83±0.034
EB 14	3.38±0.043
EB 15	3.29±0.046
EB 16	3.54±0.036
EB 17	3.29±0.051
EB 18	3.32±0.043
EB 19	3.41±0.046