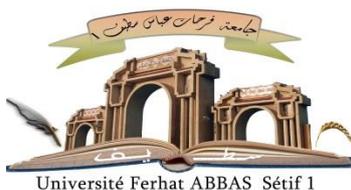


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

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

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة



DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°/SNV/2024

THÈSE

Présentée par

OULD OUALI Karima

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Filière : **SCIENCES BIOLOGIQUES**

Spécialité : **MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE**

THÈME

**Isolement de bactéries extrêmophiles d'intérêt
agricole productrices de molécules antifongiques**

Président	M. KHENCHOUCHE Abdelhalim	Professeur à l'Université de Sétif.
Directeur de thèse	M. HOUALI Karim	Professeur à l'Université de Tizi-Ouzou
Co-directeur de thèse	M. NABTI El-hafid	Professeur à l'Université de Bejaïa
Examinatrice	M ^{me} BENSIDHOUM Leila	MCA à l'Université de Bejaïa
Examinatrice	M ^{me} MEZAACHE-AICHOIR Samia	Professeur à l'Université de Sétif
Examineur	M. MEBARKIA Abdelkrim	Professeur à l'Université de Sétif

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

Dédicaces

À la mémoire de mon père qui nous a quittés avant que ce travail ne soit achevé. J'aurais tellement voulu que tu sois présent le jour de ma soutenance

À ma mère qui m'a toujours encouragée et qui n'a jamais cessé de croire en moi

À mon mari et mes enfants qui m'ont toujours soutenue qui ont partagé avec moi les moments difficiles de cette thèse. Je les remercie pour leur patience et leurs sacrifices

À ma tendre sœur Samia et mes chers frères Cid, Mohand, Karim et Mustapha pour leur aide et leur générosité sans faille

À ma belle-famille, en particulier mes beaux-parents pour leur compréhension.

Merci à vous tous

Remerciements

A l'issue de cette recherche, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin, à réaliser ce travail.

*En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Professeur **HOUALI K.**, pour avoir accepté d'encadrer ce travail. Je le remercie pour les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour sa disponibilité sans faille et sa grande générosité.*

*Je présente également mes remerciements les plus sincères à mon co-directeur de thèse, Professeur **NABTI EL-H.**, pour ses conseils éclairés, et les suggestions pertinentes et le soutien constant qui ont enrichi ce travail.*

*J'ai l'honneur de formuler ma gratitude et profonde reconnaissance à l'égard **KHENCHOUCHE A.** qui m'a honoré en acceptant de présider le jury de ma soutenance.*

*Mes remerciements vont également à M^{me} **BENSIDHOUM L.**, M^{me} **MEZAACHE-AICHOUR S.**, et Mr **MEBARKIA A.**, pour avoir accepté de participer à ce jury.*

*Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude au Professeur **CRUZ C.**, et les membres de son laboratoire pour l'identification de mes souches bactériennes.*

*Ma profonde gratitude va à M^{me} **SELHI-CHERFAOUI**, du CNCC de Tizi-Ouzou pour avoir fourni les semences de blé. Je les remercie pour son aide précieuse.*

*Je tiens à remercier également Mr **CHERFOUH** et M^{me} **TIBICHE G.** pour leur aide précieuse.*

*Je remercie également toute l'équipe de laboratoire **LABAB**, M^{me} **IRATNI**, Mr **SEBBANE**, Mr **TITOUCHE**, Mr **BARIZ**, Mr **MOUALEK** pour leur aide, leur disponibilité et leur sympathie, sans oublier ; **OUZID Y.**, **OUSMER L.** et **MOUZAOUI Z.***

*Un merci tout particulier à Mr **BENSIDHOUM Messaoud** qui m'a beaucoup aidé.*

*Merci aux ingénieurs de laboratoires ; **HOURIA**, **DJIDJI**, **SONIA**, **MALIKA** et **LAMIA**, pour votre aide aux moments de besoin.*

"ربي لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك"

ملخص

تعتبر الملوحة أحد العوامل الرئيسية المسؤولة عن تدهور التربة مما يجعلها غير صالحة للزراعة. ويوفر استخدام البكتيريا المعززة لنمو النباتات المقاومة للملوحة والمحبة للملوحة (PGPR): البكتيريا المعززة لنمو النباتات) ذات أنشطة المكافحة البيولوجية كمبيدات محاصيل بديلاً بيولوجياً لاستخدام الكيماويات الزراعية، خاصةً عند تعرضها للإجهاد الملحي. وتحقيقاً لهذه الغاية، تم عزل 70 سلالة بكتيرية من التربة المالحة (السبخة) في المناطق القاحلة وشبه القاحلة في شرق الجزائر. وقد تم اختيار ثلاث عزلات على أساس إنتاجها للجزيئات النشطة بيولوجياً التي تعزز نمو النبات. 100% من العزلات لديها القدرة على تثبيت النيتروجين الجوي وإنتاج الأمونيا (NH₃)، ولدى 53.33% منها القدرة على إذابة الفوسفات غير العضوي، و33.33% منها تنتج سيانيد الهيدروجين (HCN) و6.67% تنتج حمض الأبييك الأستيل الفوسفاتي تنتمي اثنتان من هذه المعزولات إلى جنس *Serratia* والثالثة هي بكتيريا *Halomonas* الملحية. تم تحديد هذه البكتيريا على أساس تسلسل 16S rDNA. أُجريت اختبارات العداء ضد الفطريات الممرضة للنباتات. تم التعرف على الجزيئات المضادة للفطريات التي تنتجها هذه البكتيريا باستخدام كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء. هذه البكتيريا قادرة على تثبيط النمو الفطري ضد الفطريات الممرضة للنباتات، حيث بلغت نسبتها 80.67% ضد *Botrytis cinerea*، و76.22% ضد *Aspergillus niger* و66.67% ضد *Fusarium culmorum* بالنسبة لبكتيريا *Serratia sp.* قامت سلالة *Halomonas sp.* بتثبيط نمو الفطريات عن طريق إنتاج مواد متطايرة في 71.29% من بكتيريا *Aspergillus niger*، و75.49% من بكتيريا *Aspergillus flavus*، و72.22% من بكتيريا *Penicillium glabrum*. كشف تحديد HPLC للجزيئات المضادة للفطريات التي أنتجتها هذه البكتيريا الثلاث أنها كانت بوليفينول، مما يجعل هذه السلالات أول بكتيريا جذرية قادرة على إنتاج مركبات فينولية. أخيراً، تم إجراء اختبارات وعائية لتحديد مدى فعالية هذه السلالات في تعزيز نمو القمح تحت إجهاد الملح (125 mM، و150 mM، و200 mM). أظهرت النتائج أن اتحاد سلالتين من سلالتين (*Serratia sp.*-SB6 et *Halomonas sp.*-SB39) أعطى أفضل النتائج عند 125 mM مع زيادة كبيرة في ارتفاع النبات بنسبة 30% في التربة المعقمة و46% في التربة غير المعقمة. ومع ذلك، عند التركيزات الأعلى، أعطت بكتيريا *Halomonas sp.* الملحية أفضل النتائج. في جميع الحالات، كان هناك تحسن كبير في نمو شتلات القمح الملقحة بالبكتيريا، مقارنةً بتلك غير الملقحة بالبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المحبة للملح، الإجهاد الملحي، المكافحة البيولوجية، البوليفينول، البكتيريا المعززة لنمو النبات/البكتيريا المحفزة لنمو النبات (PGPB/R).

Résumé

La salinité est l'un des facteurs majeurs responsables de la détérioration des sols en les rendant impropres à l'agriculture. L'application de bactéries halotolérantes et halophiles favorisant la croissance des plantes (PGPB : bactéries promotrices de la croissance des plantes) avec des activités de lutte biologique comme inoculant des plantes cultivées, offre une alternative biologique à l'utilisation des agrochimiques, particulièrement lorsqu'elles sont soumises à un stress salin. Dans cette perspective, 70 souches bactériennes ont été isolées à partir de sols salins (sebkha) dans des zones aride et semi-aride de l'est de l'Algérie. Trois isolats ont été sélectionnés sur la base de la production de molécules bioactives promotrices de la croissance des plantes. 100 % des isolats ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et de produire de l'ammoniac (NH₃). 53,33% ont le pouvoir de solubiliser le phosphate inorganique, et 33,33% produisent du cyanure d'hydrogène (HCN) et 6,67% produisent l'AIA. Deux de ces isolats appartiennent au genre *Serratia* et le troisième est une bactérie halophile *Halomonas*. Ces bactéries ont été identifiées sur la base de la séquence de l'ADNr 16S. Des tests d'antagonismes contre des champignons phytopathogènes ont été réalisés. L'identification des molécules antifongiques produites par ces bactéries a été faite par Chromatographie en phase liquide à haute performance. Ces bactéries sont capables d'inhiber le développement mycélien contre des champignons phytopathogènes avec des taux atteignant 80.67 % contre *Botrytis cinerea*, 76.22 % contre *Aspergillus niger* et 66.67 % contre *Fusarium culmorum* pour *Serratia sp.* La souche *Halomonas sp.* a inhibé la croissance mycelienne par production de substances volatiles de *Aspergillus niger* à 71.29 %, *Aspergillus flavus* à 75.49 % et *Penicillium glabrum* à un taux de 72.22 %. L'identification par HPLC des molécules antifongiques produites par ces trois bactéries révèle qu'il s'agit de polyphénols, ce qui fait de ces souches les premières Rhizobactéries capables de produire des composés phénoliques. Enfin, des tests en pots pour déterminer l'efficacité de ces souches à promouvoir la croissance du blé sous stress salin (125 mM, 150 mM et 200 mM) ont été réalisés. Les résultats ont révélé qu'un consortium de deux isolats (*Serratia sp.*-SB6 et *Halomonas sp.*-SB39) avait donné le meilleur résultat à 125 mM avec une augmentation significative de la hauteur des plants de 30 % sur sol stérile et de 46 % sur sol non stérile. Mais, à des concentrations plus élevées c'est la bactérie halophile *Halomonas sp.* qui a donné le meilleur résultat. Dans tous les cas, on note une amélioration significative de la croissance des semis de blé inoculés avec les bactéries, comparés aux témoins non inoculés.

Mots clés : Bactéries halophiles, stress salin, lutte biologique, polyphénols, bactéries/Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB/R).

Abstract

Salinity is one of the major factors responsible for the deterioration of soils, making them unsuitable for agriculture. The application of halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) with biological control activities as crop inoculants offers a biological alternative to the use of agrochemicals, particularly when they are subjected to saline stress. To this end, 70 bacterial strains were isolated from saline soils (sebkha) in arid and semi-arid zones of eastern Algeria. Three isolates were selected based on their production of bioactive molecules that promote plant growth. %100 of isolates have the capacity to fix atmospheric nitrogen and produce ammonia (NH₃). 53.33 % have the ability to solubilise inorganic phosphate, and 33.33% produce hydrogen cyanide (HCN) and 6.67% produce IAA. Two of these isolates belong to the genus *Serratia* and the third is a halophilic *Halomonas* bacterium. These bacteria were identified based on the 16S rDNA sequence. Antagonism tests against phytopathogenic fungi were carried out. The antifungal molecules produced by these bacteria were identified using high-performance liquid chromatography. These bacteria are capable of inhibiting mycelial growth against phytopathogenic fungi, with rates reaching 80.67% against *Botrytis cinerea*, 76.22% against *Aspergillus niger* and 66.67% against *Fusarium culmorum* for *Serratia sp.* The *Halomonas sp.* strain inhibited mycelial growth by producing volatile substances in 71.29% of *Aspergillus niger*, 75.49% of *Aspergillus flavus* and 72.22% of *Penicillium glabrum*. HPLC identification of the antifungal molecules produced by these three bacteria revealed that they were polyphenols, making these strains the first Rhizobacteria capable of producing phenolic compounds. Finally, pot tests were carried out to determine the effectiveness of these strains in promoting wheat growth under salt stress (125 mM, 150 mM and 200 mM). The results showed that a consortium of two isolates (*Serratia sp.*-SB6 et *Halomonas sp.*-SB39) gave the best results at 125 mM with a significant increase in plant height of 30% on sterile soil and 46% on non-sterile soil. However, at higher concentrations, the halophilic *Halomonas sp.* bacteria gave the best results. In all cases, a significant improvement in the growth of wheat seedlings inoculated with the bacteria was observed compared to the non-inoculated controls.

Key words: Halophilic bacteria, salt stress, biological control, polyphenols, plant growth-promoting bacteria/Rhizobacteria (PGPB/R).

Liste des Principales abréviations

ABA : Acide Abscissique

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

AIA : Acide Indole Acétique

C_E: Conductivité électrique

D.O : Densité optique

ddNTP : Didésoxyribonucléoside triphosphate

dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate

dS: Déci-Siemens

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EPS : Exopolysaccharides

HCN : Cyanure d'Hydrogène

MF : Matière fraîche

mS : milli-Siemens

PBS : Solution tampon phosphate

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PGI : Pourcentage d'inhibition de la croissance

PGPR : Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

PHB : Poly β -hydroxybutyrate

PSB : Bactéries solubilisatrices de phosphates

ROS : Espèces réactives à l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

VOC : Composés Volatils organiques

Liste des figures

Figure 1 : Effets et mécanismes de tolérance cellulaire chez les plantes en réponse au stress salin	09
Figure 2 : Systèmes de transport et de séquestration des ions pour le maintien de l'homéostasie ionique en cas de stress salin	11
Figure 3 : Facteurs influençant les interactions avec la rhizosphère	13
Figure 4 : Mécanismes de l'interaction Plante-PGPR (effet direct et indirect)	14
Figure 5 : Principales enzymes hydrolytiques impliquées dans la colonisation des plantes et l'interaction plantes-bactéries et leur mode d'action.....	17
Figure 6 : Interaction PGPR-plantes sous stress salin.....	23
Figure 7 : La résistance systématique induite chez les plantes par des PGPR.....	29
Figure 8 : Photos Sebket Bazer	32
Figure 9 : Photos Chott El Hodna	33
Figure 10 : Aspect des résultats positifs des activités enzymatiques testées	57
Figure 11 : Valeurs des pH des milieux PVK ensemencés par les isolats sélectionnés.....	61
Figure 12 : Production d'AIA par les six isolats.....	62
Figure 13 : Effet du pH sur la croissance des bactéries sélectionnées	67
Figure 14 : Effet de la température sur la croissance des bactéries sélectionnées	68
Figure 15 : Effet de la concentration en NaCl sur la croissance des bactéries sélectionnées ..	69
Figure 16 : Effet des isolats sur la croissance mycélienne.....	72
Figure 17 : Pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI %) des champignons pathogènes par les bactéries sélectionnées	73
Figure 18 : Effet des substances volatiles produites par les trois souches bactériennes sur l'inhibition de la croissance mycélienne	74
Figure 19 : Effet du filtrat des bouillons de culture sur la croissance mycélienne	76

Figure 20 : Effet de la moisissure fongique sur les pommes traitées (a) ou non (b) avec l'antagoniste bactérien après 6 jours d'incubation	78
Figure 21: Efficacité des isolats bactériens contre <i>A. niger</i> et <i>B. cinerea</i> dans les pommes ..	79
Figure 22 : Effet des souches bactériennes sur le taux de germination des graines de blé à différentes concentrations de NaCl (0, 125 et 200 mM)	81
Figure 23 : Effet des souches bactériennes sur la longueur des tiges des germes de blé à différentes concentrations de NaCl.....	82
Figure 24 : Effet des souches bactériennes sur la longueur des racicules des germes de blé à différentes concentrations de NaCl.....	82
Figure 25 : Effets de l'inoculation des souches bactériennes sur la croissance des plants de blé	84
Figure 26: Effet de l'inoculation avec des rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé cultivés dans un sol stérile sous stress salin	85
Figure 27 : Effet de l'inoculation avec des rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé cultivés dans un sol non stérile sous stress salin.....	88
Figure 28 : Concentrations de la chlorophylle a et b du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol non stérile sous stress salin	93
Figure 29 : Concentrations de la chlorophylle totale du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol non stérile sous stress salin	94
Figure 30 : Concentrations de la chlorophylle a du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile sous stress salin.....	94
Figure 31 : Concentrations de la chlorophylle b et totale du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile sous stress salin.....	95
Figure 32: Teneur en sucres solubles foliaires du blé dur inoculé avec des rhizobactéries halotolérantes dans un sol non stérile sous stress salin.....	97
Figure 33 : Teneur en sucres solubles foliaires du blé dur inoculé avec des rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile sous stress salin.....	98

Figure 34 : Teneur en proline du blé dur inoculé avec des rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile et non stérile sous stress salin99

Liste des tableaux

Tableau 1 : Catégories de solutions salines, leurs applications et leur impact sur la croissance et le rendement des plantes.....	05
Tableau 2 : Sols affectés par le sel dans les zones arides	07
Tableau 3 : Paramètres physico-chimiques des sols étudiés.....	54
Tableau 4 : Résultats des tests des activités enzymatiques des isolats bactériens	57
Tableau 5 : Résultats de fixation d'azote par les six isolats testés.....	59
Tableau 6 : Résultats de solubilisation du phosphate par les six isolats testés	60
Tableau 7 : Résultats de production d'ammoniac (NH ₃) par les six isolats testés	63
Tableau 8 : Résultats de production du cyanure d'hydrogène (HCN) par les six isolats testés	64
Tableau 9 : Caractères morphologiques des trois isolats sélectionnés.....	66
Tableau 10 : Caractères microscopiques des trois isolats sélectionnés	66
Tableau 11 : Résultats des tests de catalase et oxydase	70
Tableau 12 : Composés phénoliques identifiés dans le bouillon de culture filtré et leurs concentrations	77

Liste des communications

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont contribué aux publications et communications suivantes:

Publications :

Ould Ouali, K., Houali, K., Cruz, C., Melo, J., Benakli, Y., Ousmer, L., Madani Z., & Nabti, E. H. (2024). Halophilic Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Producers of Antifungal Metabolites under Salt Stress. *Agronomy*, 14(4), 845.

Communications :

- **Journée Nationale de Biotechnologie Microbienne, université Blida-1, 17 et 18 Mai 2022**, Isolement et sélection de bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB).

- **Congré national sur la Biodiversité et Protection de l'Environnement, Ecole Supérieure d'Agronomie, 26 et 27 Mai 2022**, Isolement de bactéries promotrices de la croissance des plantes et productrices de molécules antifongiques.

- **Congré international sur Conférence sur l'évaluation des plantes alternatives, des terres dégradées et marginales, université de El Oued, 11 et 12 Mai 2022**. Isolement de bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) soumises à un stress salin.

SOMMAIRE

Introduction	1
Revue bibliographique	
1. La salinité	4
1.1. Définitions	4
1.2. Salinisation des sols.....	5
1.3. Le stress salin	7
1.4. Impact de la salinité sur les plantes	7
1.5. Réponse des plantes au stress salin	9
2. Bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	12
2.1. La rhizosphère	12
2.2. Mécanismes d'action des PGPR.....	13
2.2.1. La bio-fertilisation	14
2.2.1.1. Fixation d'azote atmosphérique	14
2.2.1.2. Solubilisation du phosphate.....	15
2.2.1.3. Production d'enzymes lytiques extracellulaire.....	16
2.2.2. Production de phytohormones	20
2.2.3. Production de sidérophores.....	22
3. Mécanismes des PGPR pour augmenter la tolérance des plantes au stress salin.....	22
3.1. Accumulation d'osmolytes	23
3.2. Homéostasie ionique	24
3.3. L'amélioration de l'absorption des nutriments.....	24
3.4. Production d'acide indole-3-acétique.....	26
3.5. Production de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	26
3.6. Production d'exopolysaccharides (EPS)	27
3.7. Modification du système de défense antioxydant	27

4. Champignons phytopathogènes et lutte biologique	28
4.1. Antibiose.....	28
4.2. Résistance Systémique Induite (ISR) chez les Plantes.....	29
4.3. Production de composés organiques volatils (VOC).....	29

Matériel et Méthodes

Partie I : Isolement et sélection des bactéries ayant des caractères promoteurs de la croissance des plantes

1. Localisation des sites d'étude	31
2. Prélèvement des échantillons	33
3. Analyses physicochimiques	33
3.1. Le potentiel hydrogène.....	33
3.2. La conductivité électrique.....	34
3.3. Le contenu gravimétrique.....	34
3.4. La matière organique totale.....	34
4. Analyse microbiologique	35
5. Recherche de propriétés d'intérêt agricoles	35
5.1. Production d'enzymes lytiques extracellulaires.....	35
5.2. Caractères PGPR.....	38
5.2.1. Fixation d'azote.....	38
5.2.2. Solubilisation des phosphates.....	38
5.2.3. Production d'acide indole 3-acétique.....	39
5.2.4. Production d'ammoniac.....	39
5.2.5. Production de cyanure d'hydrogène.....	39

Partie II : Identification des souches bactériennes sélectionnées

1. Caractères morphologiques	40
2. Caractères physiologiques	40

2.1. Détermination de l'effet du pH	40
2.2. Détermination de l'effet de la température.....	40
2.3. Détermination de l'effet de la salinité	40
3. Caractères biochimiques	41
3.1. Recherche de la catalase.....	41
3.2. Le test de l'oxydase	41
4. Identification moléculaire	41
4.1. L'extraction d'ADN total.....	41
4.2. Amplification du gène codant pour l'ARN 16S	42
4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose	43
4.4. Séquençage	43

Partie III : Activité antifongique des souches bactériennes sélectionnées

1. Les souches fongiques.....	44
2. Tests <i>in-vitro</i>	44
2.1. Inhibition directe de la croissance mycélienne (test de confrontation directe)	44
2.2. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne par production de substances volatiles	45
2.3. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne (test de confrontation indirecte)	45
2.4. Caractérisation des métabolites bactériens antifongiques	46
3. Tests <i>in-vivo</i> : Essai biologique sur fruits (pommes).....	47

Partie IV: Effet des souches sélectionnées sur la croissance du blé sous stress salin

1. Préparation de cultures bactériennes	49
2. Stérilisation des graines de blé	49
3. Bactérisation des graines de blé	49
4. Effet des souches bactériennes sur la germination des graines de blé	50
5. Effet des souches bactériennes sur la stimulation de la croissance du blé	50

6. Évaluation des facteurs de croissance des plantes sous stress salin	51
6.1. Paramètres morphologiques	51
6.2. Paramètres biochimiques	51
6.2.1. Dosage de la chlorophylle	51
6.2.2. Dosage des sucres solubles totaux	52
6.2.3. Dosage de la proline	52
7. Analyse statistiques	53

Résultats et discussion

Partie I : Isolement et sélection des bactéries ayant des caractères promoteurs de la croissance des plantes

1. Caractères physico-chimiques des sols étudiés	54
2. Isolement des bactéries	55
3. Recherche de propriétés d'intérêt agricoles	56
3.1. Production d'enzymes lytique extracellulaires	56
3.2. Fixation d'azote	58
3.3. Solubilisation du phosphate.....	59
3.4. Production d'acide indole acétique	61
3.5. Production d'ammoniac.....	62
3.6. Production de cyanure d'hydrogène	63

Partie II : Identification des souches bactériennes sélectionnées

1. Caractérisation morphologique	65
2. Caractérisation physiologique	65
3. Caractérisation biochimique	69
3.1. Test d'oxydase	70
3.2. Test de catalase.....	70
4. Identification moléculaire	70

Partie III : Activité antifongique des souches bactériennes sélectionnées

1. Tests in-vitro	71
1.1. Inhibition directe de la croissance mycélienne (test de confrontation direct)	71
1.2. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne par la production de substances volatiles.....	73
1.3. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne (test de confrontation indirect)	74
1.4. Caractérisation des métabolites bactériens antifongique.....	75
2. Tests in-vivo : Essai biologique sur des fruits (pommes)	77

Partie IV : Effet des souches sélectionnées sur la croissance du blé sous stress salin

1. Tests de stimulation de la germination des graines de blé	79
2. Tests de stimulation de la croissance des plants de blé soumis à un stress salin	82
3. Paramètres biochimiques	90
3.1. Dosage de la chlorophylle	90
3.2. Dosage de composés osmoprotecteurs	95
Conclusion	100
Références bibliographique	102

Annexes

Introduction

Introduction

La salinisation des sols, est un défi majeur dans les régions arides et semi-arides, qui affecte gravement la production agricole (Al Hasini et *al.*, 2019). 20 % du total des terres cultivées et 33 % des terres agricoles irriguées dans le monde en sont touchées. Si cette tendance se poursuit, 50 % des terres cultivées seront salines d'ici 2050 (Shrivastava et Kumar, 2015 ; Vaishnav et *al.*, 2020). Selon l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), environ 1 milliard d'hectares de la surface terrestre mondiale sont touchés par la salinisation, ce qui représente autour de 8,7 % de la surface terrestre de la planète (Cheik, 2021). Chaque année, environ 10 millions d'hectares des terres agricoles mondiales sont détruites par l'accumulation de sel (Pimentel et *al.*, 2004).

L'augmentation du niveau de salinité a des répercussions négatives sur les propriétés du sol et la croissance des plantes. Le problème croissant de la salinisation constitue une menace importante pour la sécurité alimentaire mondiale (Machado et Serralheiro, 2017 ; Mukhopadhyay et *al.*, 2021). L'Australie enregistre des pertes de rendement du blé pouvant aller jusqu'à 50 % en raison de la salinité (El Sabagh et *al.*, 2021). De plus, la réduction du rendement des cultures due à la salinité cause de grandes pertes économiques. Selon le Département de l'Agriculture des États-Unis (USDA, 2018), rien qu'aux États-Unis, la salinité du sol est responsable d'une perte de 3,1 milliards de dollars par an dans la production agricole.

Face à ce stress salin, de nombreuses stratégies physiques, chimiques et biologiques telles que la sélection végétale, le génie génétique des plantes et toute une série de techniques agricoles sont développées. Récemment, l'application de rhizobactéries, a été élaborée afin d'améliorer le système de défense des plantes (Roy and Chowdhury, 2020). L'application des PGPR est l'une des mesures biologiques les plus potentielles pour l'amélioration du rendement agricole (Egamberdieva et *al.*, 2019 ; Bhat et *al.*, 2020). De nombreuses études ont montré que les PGPR favorisent directement ou indirectement la croissance des plantes. Ces mécanismes font référence à la capacité des PGPR à augmenter la disponibilité des nutriments tels que la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphore et la production de sidérophores, la production de phytohormones, telles que l'acide indole-3-acétique (AIA), et d'autres molécules bioactives qui stimulent la croissance et le développement des plantes tout en les protégeant (Qin et *al.*, 2015 ; Backer et *al.*, 2018 ; Wang et *al.*, 2018 ; Lobo et *al.*, 2019 ; Vaishnav et *al.*, 2020).

Pour faire face au stress salin, ces dernières décennies on s'intéresse à l'application de bactéries halotolérantes et halophiles. Ces PGPR favorisent la croissance des plantes sous stress salin par des mécanismes complexes, tels la production d'enzymes antioxydantes pour réguler l'oxygène réactif (ROS), l'accumulation d'osmolytes intracellulaires pour assurer un équilibre ionique et par l'accumulation de métabolites secondaires (El-Esawi et *al.*, 2015 ; Qin et *al.*, 2018 ; Xiong et *al.*, 2019).

Par ailleurs, les phytopathogènes constituent un autre défi à relever. Ils ont un effet dévastateur sur les récoltes agricoles. La FAO estime en effet, que les ravageurs et maladies des plantes causent chaque année jusqu'à 40% de pertes de cultures vivrières, privant des millions de gens de nourriture et portant un grave préjudice à l'agriculture (FAO, 2020). Les champignons phytopathogènes représentent une menace significative pour l'agriculture mondiale, causant environ 70 % des maladies des plantes cultivées. Les pertes économiques dues aux maladies fongiques dans l'agriculture sont estimées à plus de 200 milliards de dollars par an . Les coûts liés aux traitements fongicides sont également considérables, atteignant plus de 600 millions de dollars uniquement aux États-Unis (USDA ERS, 2019).

L'utilisation massive d'engrais chimiques et de pesticides affecte non seulement la santé des sols en épuisant leur fertilité et en diminuant leur microflore, mais peut entraîner la pollution des eaux de surface et souterraines et constitue donc une menace pour la santé humaine et l'écosystème (Tripathi et *al.*, 2020). De plus, l'application intensive et systématique de fongicides contribue à la sélection de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques. Afin d'assurer le futur de l'agriculture, il est donc nécessaire de développer des stratégies alternatives de lutte contre les pathogènes, telle que le biocontrôle (Kumari et *al.*, 2022 ; Estoppey, 2023).

L'utilisation des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) comme agents stimulateurs de la croissance et luttant contre les maladies des plantes constitue une meilleure alternative (Tabli et *al.*, 2014 ; Tudi et *al.*, 2021 ; Lahlali et *al.*, 2022).

Les PGPR participent à la prévention du développement des phytopathogènes, soit par la compétition pour l'espace et les nutriments, soit en produisant des métabolites tels que les antibiotiques, induisant une résistance de la plante (Li et *al.*, 2020 ; Zainab et *al.*, 2020 ; Orozco-Mosqueda et *al.*, 2020).

Ces dernières années, de nombreuses études ont été publiées sur l'application des PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) halophiles dans la lutte contre le stress salin et les champignons phytopathogènes. Ces rhizobactéries, adaptées aux environnements salins, jouent un rôle important en améliorant la tolérance des plantes face à des conditions extrêmes. En favorisant la croissance des racines et en stimulant les mécanismes de défense des plantes, les PGPR halophiles contribuent non seulement à la santé des cultures, mais aussi à la durabilité des systèmes agricoles dans des zones affectées par la salinité et les maladies fongiques (Egamberdieva et *al.*, 2019)

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail, visant à explorer et à approfondir l'application des PGPR halophiles pour améliorer la tolérance des plantes face au stress salin et aux champignons pathogènes. Dans cette étude, nous avons isolé trois bactéries de la rhizosphère de plantes halophytes de deux régions aride et semi-aride de l'est de l'Algérie. Ces bactéries halophiles présentent des capacités potentielles à améliorer la croissance des plants de blé sous stress salin, et à inhiber la croissance fongique.

Notre manuscrit est organisé en deux parties :

Première Partie : Revue Bibliographique, où nous examinerons les points clés sur lesquels nous avons travaillé. Cela permettra de situer notre recherche dans le contexte des études antérieures et d'identifier les lacunes que notre travail vise à combler.

Deuxième Partie : Approche Pratique

Nous y détaillerons les matériels et méthodes utilisés, suivis des résultats obtenus et d'une discussion approfondie. Cette section mettra en lumière la méthodologie adoptée et l'importance des résultats dans le cadre de notre problématique. Elle est composée de quatre parties :

- Isolement et sélection des bactéries halophiles ayant des caractères promoteurs de la croissance des plantes ;
- Identification des souches bactériennes sélectionnées ;
- Activité antifongique des souches bactériennes sélectionnées ;
- Effet des souches sélectionnées sur la croissance du blé sous stress salin.

Revue bibliographique

1. La salinité

1.1. Définitions

La salinité du sol est définie comme la teneur en sels solubles dans la solution du sol. Elle est mesurée par la conductivité électrique (C_E) (Wang et *al.*, 2014a). Les solutions d'eau ou de sol peuvent être classées différemment sur la base de la C_E , (tableau 1).

Les sols affectés par la salinité sont classés en trois types : salins, sodiques et salino-sodiques (O'Geen, 2018).

Les sols salins contiennent des sels solubles à un niveau qui a un impact négatif sur la croissance et le développement des plantes cultivées. Ils sont caractérisés par un pourcentage de sodium échangeable ESP d'environ 15%, une conductivité électrique supérieure à 4 dS.m^{-1} et une valeur de pH inférieure à 8,5 (Childs & Hanks, 1975 ; Jamil et *al.*, 2011 ; Sharma et Chaudhari, 2012 ; Mindari *al.*, 2015)..

Les sols sodiques ont des niveaux de Na^+ échangeable supérieurs à 15% et des valeurs de conductivité électrique inférieures à 4 dS m^{-1} , car ils ne sont pas salins et peuvent ou non avoir un pH alcalin supérieur à 8,5. Les ions Na^+ perturbent la capacité des particules de sol à s'agencer correctement, ce qui entraîne une dégradation de la structure du sol, le rendant instable et susceptible à l'encroûtement et à la compaction. Ceci affecte non seulement la perméabilité du sol, mais également sa capacité à retenir l'eau et les nutriments. (Murphy, 2006).

D'autre part, les sols salino-sodiques présentent à la fois les caractéristiques des sols salins et des sols sodiques. Ils ont des niveaux élevés de sels solubles (principalement des chlorures de sulfates ou de calcium et, en plus petites quantités, des nitrates ou des borates) et d'ions Na^+ , avec une conductivité électrique supérieure à 4 dS m^{-1} et pas nécessairement alcalins (Rengasamy et *al.*, 2010 ; Qadir et *al.*, 2014 ; O'Geen, 2018).

Tableau 1 : Catégories de solutions salines, leurs applications et impact sur la croissance et le rendement des plantes (Giri, & Varma, 2019).

Type de solutions	CE (dS m ⁻¹) de SE	Application/type	Effet sur la plante
Non saline	<1,0	Eau potable et irrigation	L'effet est insignifiant
Légèrement saline	1,0-2,0	Eau d'irrigation	La croissance et le rendement des plantes peuvent être entravés dans le cas des cultures sensibles
Modérément saline	2,0-10,0	Drainage primaire et eaux souterraines	La croissance et le rendement d'un grand nombre de plantes cultivées sont souvent réduits
Fortement saline	10,0-20,0	Drainage secondaire et eaux souterraines	Dans ces conditions, seules les plantes cultivées tolérantes au sel peuvent croître et donner un rendement satisfaisant
Très fortement saline	20,0-45,0	Eau souterraine très salée	Dans ces conditions, seules quelques plantes cultivées ont un rendement satisfaisant tel que les plantes présentant une forte tolérance au stress salin

1.2.Salinisation des sols

La concentration excessive de sels solubles dans les sols a des conséquences négatives sur les terres agricoles et les cultures et, par conséquent, sur les moyens de subsistance des populations dans le monde entier. Plus de 100 pays sont confrontés au problème de la salinité des sols et de la salinisation des eaux souterraines. L'irrigation des cultures agricoles avec de l'eau salée augmente la concentration de sels solubles dans le sol, réduisant ainsi la productivité des plantes cultivées (Srivastava et al., 2019).

Différents types de sels, tels que le chlorure de sodium (NaCl), le sulfate de sodium (Na₂SO₄), le sulfate de magnésium (MgSO₄) et le chlorure de magnésium (MgCl₂) sont présents dans les sols salins. Cependant, le NaCl est plus dommageable pour les plantes que les autres (Jamil et al. 2011). La salinité est, en effet, l'accumulation de sels solubles dans l'eau, dont K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, HCO₃⁻, et Na⁺. Selon le sol, la concentration en sels solubles est différente (Vaishnav et al., 2017).

Le processus d'accumulation de sels solubles dans une solution est connu sous le nom de salinisation. La salinisation est de deux types :

- La salinisation primaire, qui est la salinité résultant de l'altération de roches riches en minéraux qui se sont formées au cours des temps géologiques. Ainsi, de nombreuses régions connaissent la salinisation primaire, un phénomène naturel causé par l'écoulement prolongé des eaux souterraines chargées de sels. Cela peut également mener à la formation de plusieurs lacs salés.

- La salinisation secondaire, principalement causée par l'activité humaine notamment à travers des pratiques agricoles comme l'irrigation et les engrais, se produit lorsque l'irrigation entraîne une remontée des eaux souterraines salées vers la surface, ou lorsque les sels présents dans l'eau d'irrigation s'accumulent dans le sol. Dans les zones semi-arides et arides, et en raison des précipitations insuffisantes et de l'évaporation de l'eau, les ions ne sont pas lessivés du profil du sol et les sels s'accumulent dans la surface, ce qui entraîne une augmentation de la salinité du sol (Zhou et *al.*, 2013 ; Chaitanya et *al.*, 2014 ; Vaishnav et *al.*, 2017).

L'excès de sels perturbe principalement l'équilibre osmotique cellulaire en abaissant le potentiel hydrique à l'intérieur des cellules. Les sels tels que les chlorures et les sulfates de sodium, de calcium et de magnésium ainsi que le bicarbonate de sodium présents dans les sols salins affectent négativement la croissance et la productivité des plantes car ils modifient l'équilibre osmotique entre les racines des plantes et le sol et interfèrent avec les processus physiologiques et métaboliques des plantes (Munns et Tester, 2008).

En général, les sols salins se trouvent dans les régions arides et semi-arides (tableau 2) où les précipitations sont insuffisantes pour répondre aux besoins en eau des cultures et lessivage des sels minéraux hors de la zone racinaire.

Tableau 2 : Sols affectés par le sel dans les zones arides par continent (PNUE, 1992 ; cf FAO-ITPS-GSP, 2015) (Zaman et *al.*, 2018).

Continent	Zone affectée par le sel (mha)		
	Sols salins	Sols sodiques	Total
Afrique	122,9	86,7	209,6
Australasie	17,6	340,0	357,6
Mexique/Amérique centrale	2,0	–	2,0
Amérique du Nord	6,2	9,6	15,8
Asie du Nord et Asie centrale	91,5	120,2	211,7
Amérique du Sud	69,5	59,8	129,3
Asie du Sud	82,3	1,8	84,1
Asie du Sud-Est	20,0	–	20,0
Total	412,0	618,1	1030,1

1.3. Le stress salin

Le stress salin est un type de stress abiotique qui affecte les plantes lorsqu'il y a une concentration excessive de sels, principalement de sodium (Na^+) et de chlore (Cl^-), dans le sol ou l'eau. Le stress réduit la productivité des cultures dans les régions arides et semi-arides (Foolad, 2007). Il crée deux types de contraintes pour la plante :

- Stress osmotique :
 - Diminue l'absorption d'eau par la plante, l'exposant ainsi à un stress hydrique ;
 - En présence d'une forte concentration saline, l'eau a tendance à quitter les cellules végétales, provoquant un déficit hydrique et une perte de turgescence.

- Stress ionique :

Lié à la toxicité des ions Na^+ et Cl^- qui perturbent l'absorption de l'eau et des nutriments par les racines et la photosynthèse dans les feuilles. En s'accumulant, ces ions conduisent aussi à un stress oxydatif (Hopkins, 2003 ; Munns et Tester, 2008).

1.4. Impact de la salinité sur les plantes

La salinité réduit la croissance et le développement en modifiant les processus biochimiques et physiologiques de la plante tels que la croissance des feuilles, la croissance des racines, l'absorption d'eau, l'ouverture des stomates, etc. (Patil, 2013). Parmi les indices mentionnés ci-dessus, la photosynthèse est étroitement liée à la croissance et au rendement des plantes (Tang et *al.*, 2014).

La présence de sels dans la zone racinaire crée des stress osmotiques (manque d'eau) et ioniques pour les plantes entraînant une réduction de l'absorption d'eau et de la pression de turgescence (Bartels *et al.*, 2013 ; Ben Hamed *et al.*, 2013). Par conséquent, certains processus tels que la photosynthèse et la division cellulaire sont affectés dans des conditions de stress (Yan *et al.* 2013). Le stress salin en réduisant la conductance stomatique et mésophylle et la disponibilité en CO₂ diminue l'activité photosynthétique. De plus, le stress salin peut indirectement affecter la photosynthèse en réduisant la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes totaux (Yan *et al.*, 2013 ; Tang *et al.*, 2014).

Gu *et al.* (2016) ont indiqué que le rapport entre la biomasse des racines et la biomasse des pousses est un indicateur de la tolérance des plantes à la salinité. Plus la valeur de ce ratio est élevée, plus la résistance des plantes au stress est importante.

En outre, le stress salin induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les plantes, causant des dommages oxydatifs aux structures et peuvent entraîner des dommages à l'ADN (Ben Hamed *et al.*, 2013 ; Himabindu *et al.*, 2016 ; Meinzer *et al.*, 2023). De plus, l'excès d'ions de sodium et de chlorure, qui sont toxiques pour les plantes, s'accumulent dans les tissus végétaux, perturbant les processus métaboliques vitaux (Himabindu *et al.*, 2016 ; Assaha *et al.*, 2017).

L'absorption excessive de sel aboutit à une situation appelée « empoisonnement par le sel », qui entraîne un déséquilibre nutritif, des dommages aux membranes provoquant des fuites d'électrolytes et une altération des métabolismes (Hameed *et al.*, 2021).

Presque toutes les grandes cultures, qui sont des glycophytes, sont très sensibles au stress salin. Contrairement aux halophytes, ces plantes sont incapables de résister au stress salin et, par conséquent, leur croissance est gravement affectée par la toxicité induite par le sel, ce qui entraîne d'énormes pertes de rendement (Assaha *et al.*, 2017).

En cas de stress salin, l'efficacité de l'utilisation de la lumière par les processus photosynthétiques diminue et les pertes d'énergie augmentent en raison de la sensibilité de plusieurs enzymes à la toxicité de l'ion Na⁺ de manière dose-dépendante (Farooq *et al.*, 2023).

Par exemple, une exposition à un stress salin de 300 mM a montré qu'elle entraînait une perte de 50 à 70 % de la fonction des protéines. L'accumulation de Na⁺ peut entraîner une multitude de problèmes dans la plante, y compris un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire,

stress oxydatif, augmentation de la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), carence en nutriments, l'interférence avec les fonctions K^+ et Ca^{2+} , un retard de croissance et la mort de la cellule (Thiyagarajah *et al.*, 1996 ; Kosová *et al.*, 2013 ; Assaha *et al.*, 2017).

1.5. Réponse des plantes au stress salin

Pour s'adapter aux concentrations élevées de sel, les plantes ont développé un ensemble diversifié de mécanismes et de caractéristiques pour assurer leur survie (figure 1). Cette interaction entre les différentes stratégies est cruciale pour le maintien de l'intégrité et de la fonction cellulaires dans des conditions salines. Les halophytes sont définies comme des plantes qui peuvent accomplir leur cycle de vie complet dans des concentrations de sel de 200 mM NaCl ou plus. Les halophytes ont subi des adaptations évolutives, présentant un large éventail de stratégies morphologiques, anatomiques et physiologiques pour prospérer dans des environnements exceptionnellement salins (Flowers *et al.*, 2010 ; Kosová *et al.*, 2013).

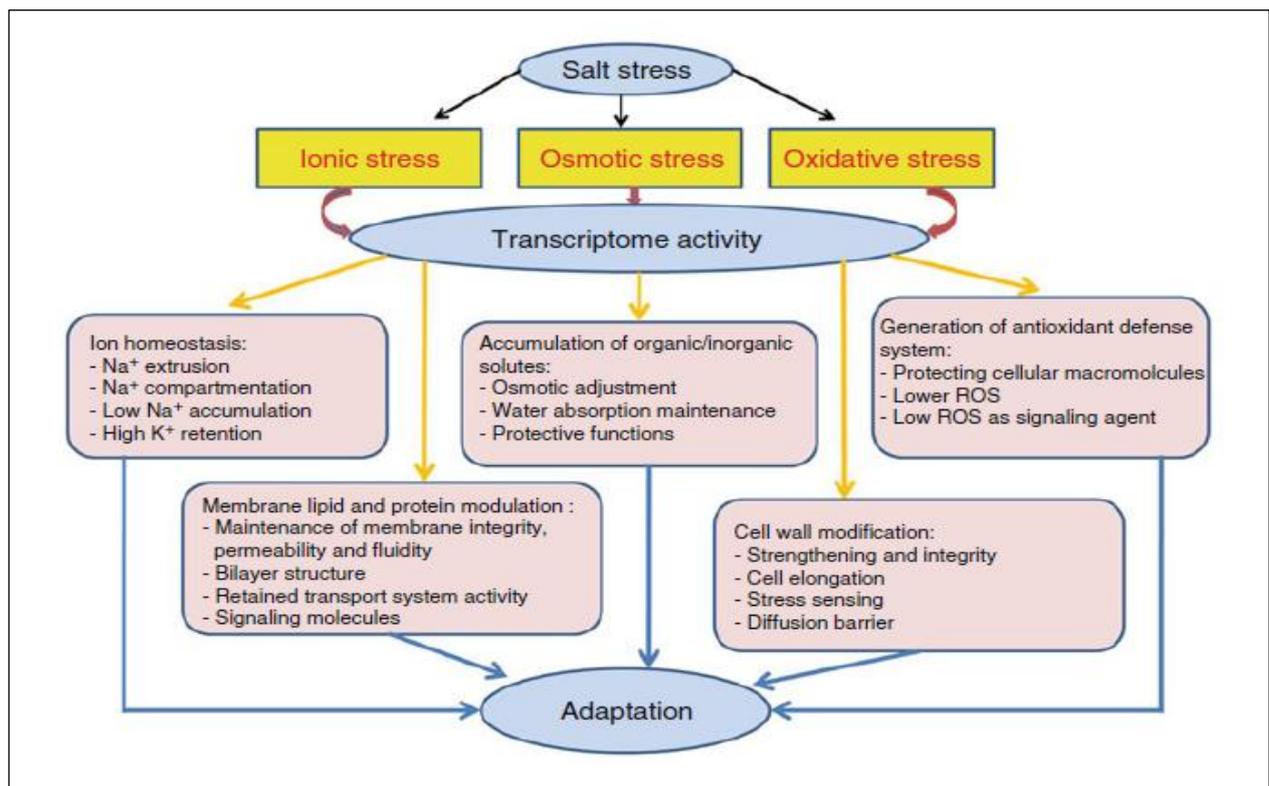


Figure 1 : Effets et mécanismes de tolérance cellulaire chez les plantes en réponse au stress salin (Mansour& Salama, 2019).

L'ajustement osmotique est l'un des mécanismes les plus importants et les plus fondamentaux permettant aux plantes d'atténuer les effets néfastes du stress salin. Ce processus implique l'accumulation de solutés compatibles de faibles poids moléculaires comme la proline, la glycine-bétaïne et les sucres solubles (Maswada *et al.*, 2018). Ces solutés ont de multiples

fonctions, notamment le maintien de la turgescence cellulaire et de l'équilibre hydrique. La proline, par exemple, agit comme un osmoprotecteur en stabilisant les structures cellulaires et en éliminant les radicaux libres. De même, la glycine-bétaïne contribue au maintien de l'homéostasie ionique tout en protégeant les membranes cellulaires contre les dommages. L'ajustement osmotique réduit donc le gradient de potentiel hydrique entre la plante et le sol et maintient ainsi l'absorption d'eau en cas de stress salin (Chen & Murta, 2008 ; Reddy *et al.*, 2015 ; Annunziata *et al.*, 2017).

En conjonction avec l'ajustement osmotique, des systèmes efficaces de transport et de séquestration des ions sont essentiels au maintien de l'homéostasie ionique en cas de stress salin (Roy and Chakraborty, 2015). Comme le montre la figure 2, la forte concentration de solutés compatibles se trouve principalement dans le cytosol et dans d'autres compartiments cellulaires métaboliquement actifs (tels que les chloroplastes et les mitochondries) pour équilibrer les potentiels hydriques inférieurs de l'apoplaste et de la vacuole, dus à l'accumulation de Na^+ et de Cl^- (Turkan et Demiral 2009 ; Shabala 2013 ; Flowers *et al.*, 2015). Les ions toxiques sont concentrés dans les vacuoles par rapport au cytosol et à d'autres compartiments cellulaires car ils ont le potentiel de perturber le métabolisme cellulaire s'ils sont présents à des concentrations élevées dans les compartiments cellulaires (Acosta-Motos *et al.*, 2017).

En outre, la séquestration des ions vacuolaires impliquant les antiporteurs NHX joue un rôle crucial dans la réduction de la charge en sodium dans le cytoplasme en échangeant des ions sodium contre des protons (H^+) à travers la membrane vacuolaire. (Bassil *et al.*, 2011 ; Khan *et al.*, 2018).

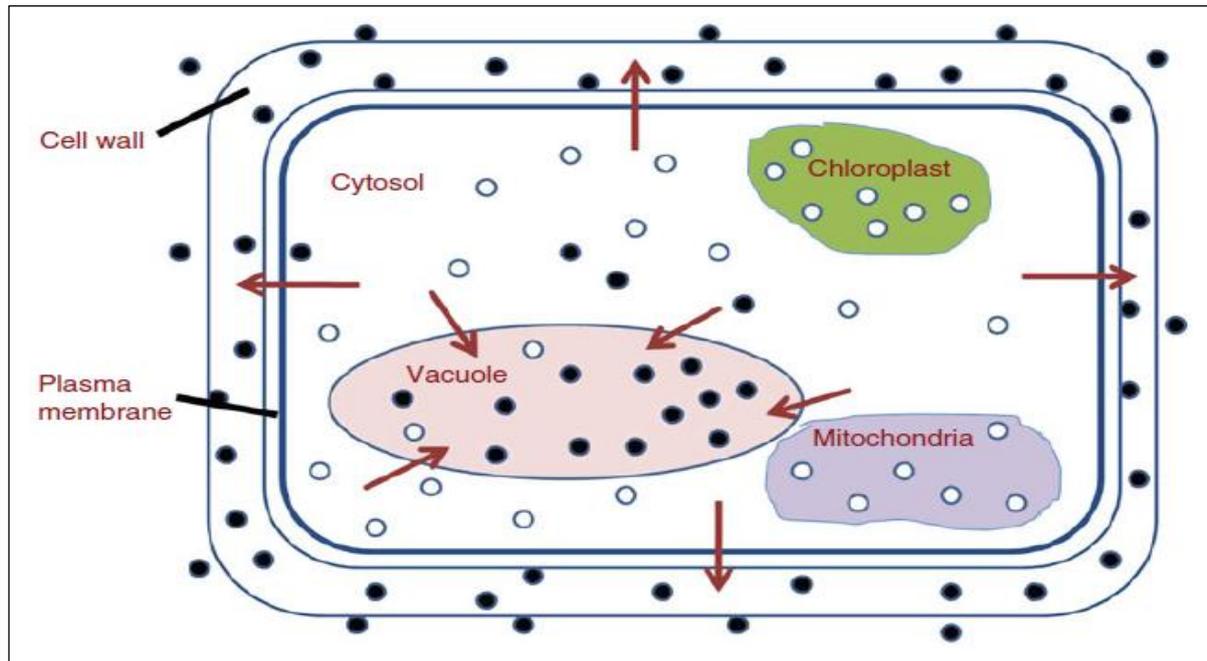


Figure 2 : Systèmes de transport et de séquestration des ions pour le maintien de l'homéostasie ionique en cas de stress salin : les cellules accumulent les solutés compatibles dans les composants métaboliquement actifs (cytosol, chloroplaste, mitochondries) et exportent les ions toxiques dans la vacuole ou hors des cellules via des systèmes de transport actifs.

Cercles clairs : solutés compatibles ; **cercles noirs** : ions toxiques ; **flèches** : transport actif.

Le stress salin entraînant l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De ce fait, les plantes utilisent des mécanismes de piégeage des ROS (Annunziata et al., 2017). Ces mécanismes sont mis en œuvre par un réseau complexe d'enzymes antioxydantes, dont la superoxyde-dismutase, la catalase et les peroxydases. Ces enzymes travaillent ensemble pour piéger les ROS, empêchant ainsi les dommages oxydatifs aux cellules végétales (Hasanuzzaman et al., 2020). En outre, les antioxydants non enzymatiques tels que l'ascorbate et le glutathion jouent un rôle crucial dans la détoxification des ROS (García-Caparrós et al., 2019 ; Garcia et al., 2019).

Outre ces adaptations physiologiques, la régulation hormonale joue un rôle important dans la réponse des plantes au stress salin. Les hormones végétales comme l'acide abscissique (ABA) régulent la fermeture des stomates, réduisant la transpiration et la perte d'eau en cas de stress salin (Dar et al., 2017).

La morphologie des racines contribue également de manière significative à la tolérance au sel chez la plante en réduisant le diamètre des racines, ce qui favorise la longueur, la surface et le volume des racines (Khan et *al.*, 2024). Les halophytes, qui prospèrent dans des environnements salins, possèdent des structures racinaires spécialisées qui empêchent activement le sel de pénétrer dans la plante. Ces adaptations réduisent efficacement l'absorption d'ions toxiques, améliorant ainsi la tolérance des plantes au sel (Shabala & Pottosin, 2014).

2. Bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

2.1. La rhizosphère

La rhizosphère est généralement considérée comme une zone étroite du sol soumise à l'influence des racines vivantes, où les exsudats racinaires stimulent ou inhibent les populations microbiennes et leurs activités. Le rhizoplan ou la surface des racines fournit également une base nutritive très favorable à de nombreuses espèces de bactéries et de champignons, et ces deux zones sont souvent appelées l'interface sol-plante. La rhizosphère est donc la partie de l'écosystème du sol où les racines des plantes, le sol et les éléments nutritifs interagissent les uns avec les autres (figure 3) (Lynch et *al.*, 2001)

La rhizosphère héberge de nombreux organismes qui ont un effet neutre sur la plante, mais aussi des organismes qui ont un effet négatif ou bénéfiques. Les micro-organismes qui nuisent à la croissance et à la santé des plantes sont les champignons pathogènes, les oomycètes, les bactéries et les nématodes. La plupart des pathogènes sont adaptés pour se développer et survivre dans le sol. L'agent pathogène établit une relation parasitaire avec la plante. En outre, un large éventail de micro-organismes est bénéfiques pour la plante et comprennent des bactéries fixatrices d'azote, les champignons endomycorhiziens et ectomycorhiziens, et les bactéries et champignons favorisant la croissance des plantes (Raaijmakers et *al.*, 2009).

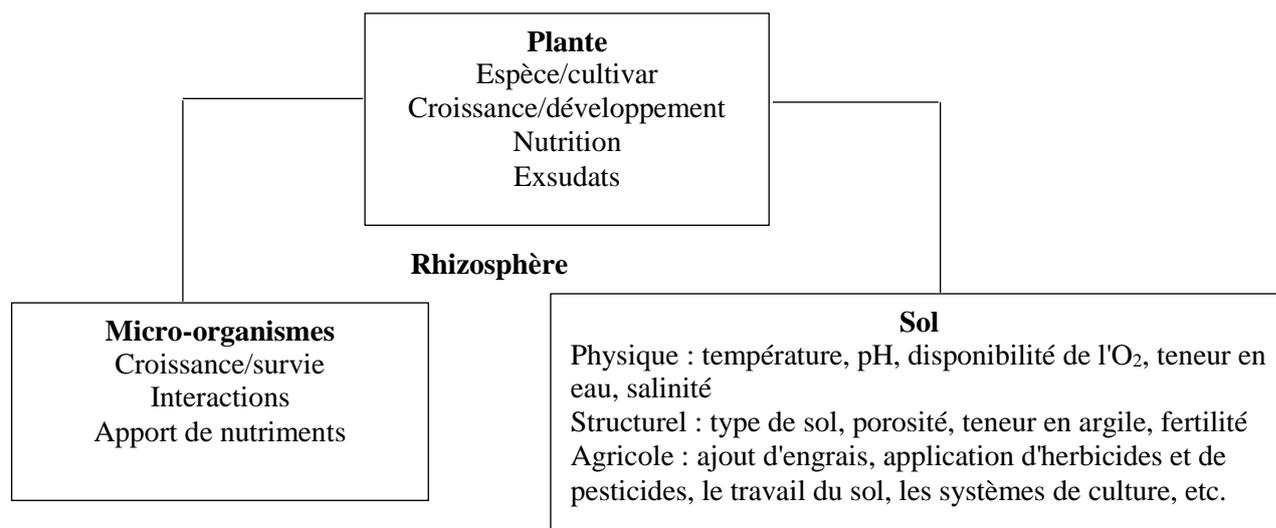


Figure 3 : Facteurs influençant les interactions avec la rhizosphère.

Un grand nombre d'espèces bactériennes et fongiques parmi la microflore du sol sont bien connues pour favoriser la croissance des plantes et sont donc appelées PGPR (Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes /Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Les PGPR colonisent la rhizosphère et les racines des plantes. Elles sont impliquées dans une multitude d'interactions avec la plante hôte et lui sont bénéfiques d'un point de vue nutritionnel et pathologique. Le rôle bénéfique des PGPR s'étend de la fixation de l'azote atmosphérique, à la solubilisation des phosphates, à la production de sidérophores, à la synthèse de régulateurs de croissance des plantes et à la protection des plantes par la production d'antibiotiques, aidant ainsi les plantes à acquérir une résistance (figure 4). Les microbes sont également utilisés à des fins de bioremédiation et agissent ainsi comme un agent nettoyant respectueux de l'environnement (Sinha et *al.*, 2021).

Ces espèces ne sont généralement pas réparties uniformément dans le sol. La concentration de la distribution des PGPR autour de la zone racinaire, "rhizosphère", est beaucoup plus importante que dans le reste du sol (Glick, 2012). Les racines des plantes synthétisent et sécrètent divers composés appelés exsudats racinaires, qui agissent comme des attractifs chimiques pour les microbes du sol. Ces composés chimiques régulent la communauté microbienne de la rhizosphère. (Ahemad et Kibret, 2014 ; Sahu et *al.*, 2018).

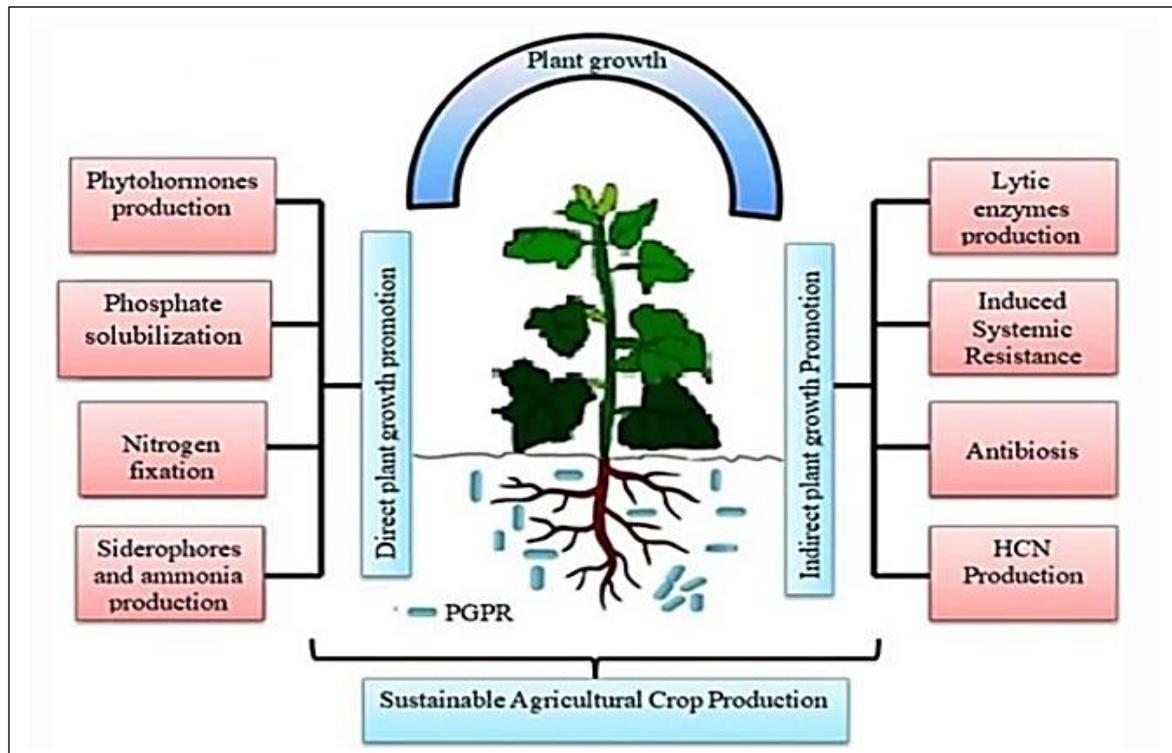


Figure 4 : Mécanismes de l'interaction Plante-PGPR (effet direct et indirect) (Mhatre et *al.*, 2019).

2.2.1. La biofertilisation

Les PGPR ont des impacts significatifs sur la croissance et le développement des plantes car ils améliorent la disponibilité de micronutriments à leur plantes par plusieurs mécanismes. L'absorption de l'azote, du phosphore et du potassium par les racines dépend étroitement de leur disponibilité dans le sol. Les cycles biogéochimiques des principaux nutriments sont principalement gérés par des processus microbiens. Les bactéries de la rhizosphère affectent donc l'état nutritionnel et physiologique des plantes (Sahu et *al.*, 2018). Ainsi, en solubilisant le phosphore, le potassium et le zinc, ou en produisant des sidérophores, l'ammoniaque, HCN et d'autres métabolites secondaires qui sont antagonistes des microbes pathogènes. Ils sont utilisés comme biofertilisants à la place des pesticides et des engrais chimiques pour une agriculture durable (Subrahmanyam et *al.*, 2020).

2.2.1.1. Fixation d'azote atmosphérique

Les rhizobactéries peuvent modifier la disponibilité de l'azote dans le sol par le biais de plusieurs processus, tels que la décomposition de la matière organique du sol, la fixation de N_2 dans l'atmosphère, la nitrification et la dénitrification. Étant donné que l'azote total dans le sol est présent principalement sous forme organique (90%), qui n'est pas disponible pour les

plantes, le rôle des bactéries de la rhizosphère dans la minéralisation de la matière organique du sol est très important. Les protéines, les acides nucléiques et d'autres composés organiques contenant de l'azote sont décomposés et transformés en ammoniac, forme disponible pour les plantes, par le biais du processus appelé ammonification (Verma et *al.*, 2019).

Les bactéries fixatrices d'azote sont essentielles au maintien du cycle de l'azote dans les écosystèmes, la promotion d'un développement agricole durable et la protection de l'environnement (Soumare et *al.*, 2020). La fixation biologique de l'azote peut être réalisée par des diazotrophes non-associés à des plantes (Cyanobactéries, Proteobactéries, Archaea et Firmicutes) et par des diazotrophes symbiotiques (*Rhizobium* et *Bradyrhizobium*) dans le cas des légumineuses et (*Frankia*, *Nostoc*, *Azolla*) dans le cas des non-légumineuses. Dans le processus biologique, le N₂ atmosphérique est transformé en ammoniac par les micro-organismes à l'aide de l'enzyme « nitrogénase », que l'on trouve dans les systèmes libres et symbiotiques (Saha et *al.*, 2017).

2.2.1.2. Solubilisation du phosphate

Le phosphore (P) est un élément majeur très important en tant qu'élément nutritionnel qui joue un rôle crucial dans de nombreuses structures des cellules végétales à savoir les composants phospholipidiques qui constituent les membranes des cellules végétales. Il est essentiel pour la photosynthèse, le transfert d'énergie, la biosynthèse des macromolécules et la respiration (Fernandez et *al.*, 2007).

Le phosphore est principalement présent dans le sol sous forme de phosphates. Ces phosphates peuvent être soit sous forme organique comme l'acide phytique, qui est une forme de stockage du phosphore dans les plantes, soit sous forme inorganique liés à des éléments comme le fer (Fe), l'aluminium (Al) et le calcium (Ca). Cette liaison réduit la solubilité du phosphore, ce qui rend son absorption par les plantes plus difficile. En outre, lors de l'application d'engrais sous forme de phosphates inorganiques, 75 % de ce phosphore est immobilisé dans le sol. Cela signifie qu'il n'est pas disponible pour les plantes, ce qui peut entraîner des carences et affecter leur croissance et leur développement (Tóth et *al.*, 2014).

Les bactéries capables de solubiliser le phosphate sont appelées phosphate-solubilizing bacteria (PSB) (Zaidi et *al.*, 2015). Ces bactéries solubilisent le phosphate en transformant les formes insolubles en formes assimilables par les plantes. Les bactéries solubilisant le phosphate (PSB) fournissent du phosphate soluble aux plantes principalement par la production d'acides

organiques de faible poids moléculaire (acide gluconique, acide citrique) qui acidifient le sol et libèrent le phosphate lié aux particules du sol. Ce processus augmente la disponibilité du phosphate pour les racines. En contrepartie, les plantes fournissent aux bactéries des composés carbonés pour leur croissance. Outre l'augmentation de la disponibilité du phosphate, les rhizobactéries PGP peuvent améliorer l'absorption du phosphate par les plantes en stimulant la membrane plasmique H⁺-ATP-ase (pompe à protons) dans les racines des plantes (Pii et *al.*, 2015). Les bactéries du sol à côté des acides organiques peuvent également produire des enzymes, telles que les phosphatases et les phytases, qui libèrent des phosphates dans le sol (Anzuay et *al.*, 2015 ; Pii et *al.*, 2015).

2.2.1.3. Production d'enzymes lytiques extracellulaire

Un grand nombre des enzymes produites par les bactéries sont des enzymes extracellulaires, générant leurs activités en dehors de leurs cellules, avec des implications directes pour leurs environnements, ou, dans le cas des endophytes, pour leur hôte (Khan et *al.*, 2017).

Les enzymes lytiques extracellulaires des PGPR telles les amylases, les cellulases, les chitinases, les lipases, les pectinases, les protéases, les chitinases, et les xylanases, sont essentielles pour maintenir la fertilité des sols, en favorisant non seulement la décomposition des matières organiques mais aussi en améliorant l'accès aux nutriments, et contribuent à la protection des plantes en dégradant les parois cellulaires des pathogènes (figure 5) (Neeraja et *al.*, 2010).

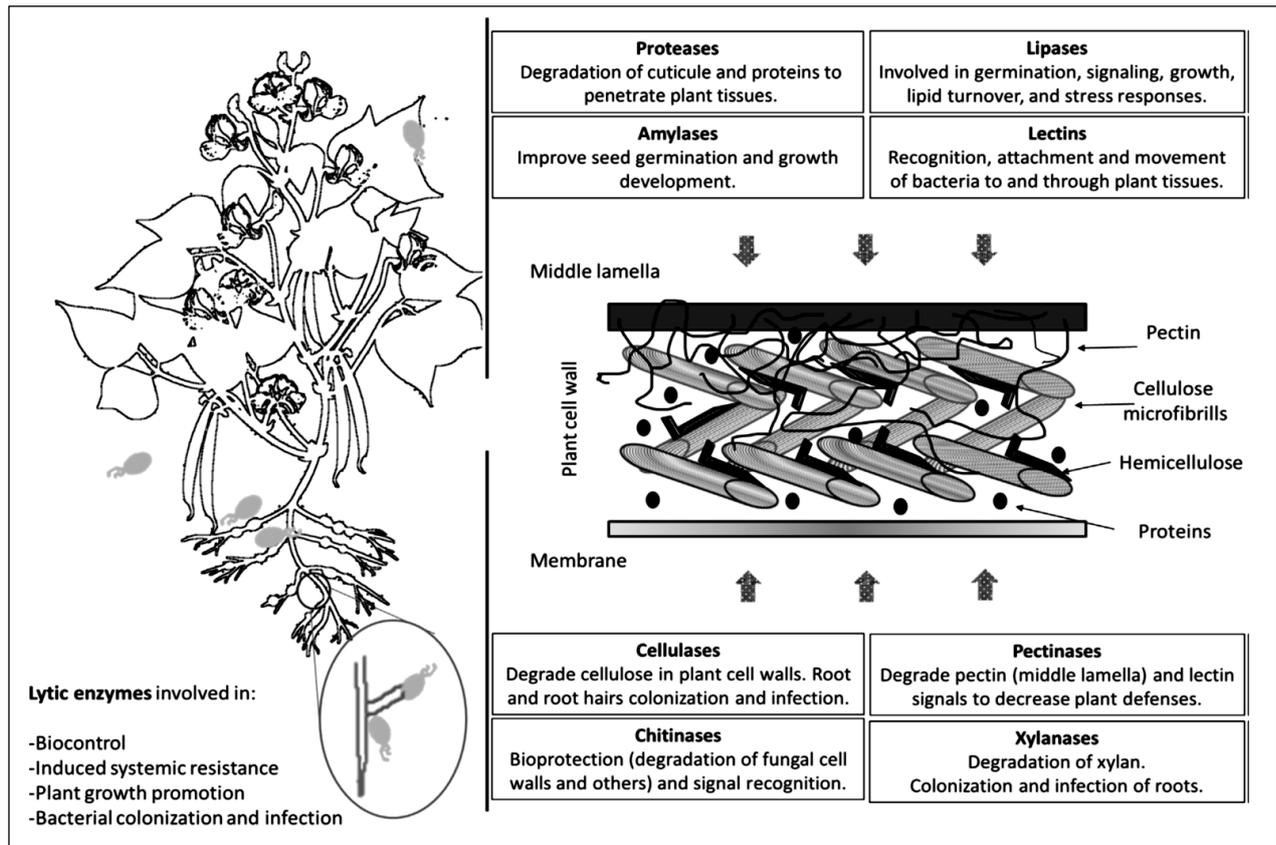


Figure 5 : Principales enzymes hydrolytiques impliquées dans la colonisation des plantes et l'interaction plantes-bactéries et leur mode d'action (Carro & Menéndez, 2020).

▪ **Les amylases**

Les amylases sont une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'amidon en sucres glucose et maltose fournissant une source d'énergie rapidement disponible pour les plantes.

Trois groupes principaux d'amylases ont été décrits :

- les α -amylases, des endohydrolases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glycosidiques à l'intérieur des chaînes d'amidon, produisant principalement des dextrines, du maltose et du maltotriose ;
- β -amylases, exo-hydrolases qui hydrolysent les liaisons α -1, 4- glycosidiques à partir des extrémités non réductrices, libérant du maltose ;
- les γ -amylases (ou glucoamylases), qui hydrolysent à la fois les liaisons α -1,4-glycosidiques et, plus lentement, les liaisons α -1,6-glycosidiques, libérant du glucose (Sundarram et Murthy, 2014).

Les amylases sont des enzymes constitutives qui ont besoin de calcium pour stabiliser leur conformation et sont tolérantes aux conditions acides. Cependant, leur action peut être inhibée par les métaux lourds (Yarullina et *al.*, 2016).

▪ Les cellulases, pectinases et xylanases

La cellulose et le xylane sont les polysaccharides les plus abondants qui font partie des parois cellulaires des plantes. Plusieurs enzymes agissant seules ou en synergie sont nécessaires pour dégrader ces polysaccharides (Nguyen et *al.*, 2018). La pectine est un polysaccharide complexe et l'un des composants les plus abondants de la lamelle moyenne et des parois cellulaires. La dégradation de la pectine nécessite l'action combinée de différentes enzymes à activité pectinolytique (Zhou et *al.*, 2017).

Les cellulases, sont considérées comme des éléments clés du mode de vie endophyte des bactéries endophytes, les aidants à coloniser, pénétrer et se propager dans les tissus des plantes hôtes. De plus, les cellulases dégradent la cellulose, ce qui aide à libérer des sucres simples utilisables par les plantes et à améliorer la structure du sol. (Afzal et *al.*, 2017 ; Egamberdieva et *al.*, 2017a ; Ma 2017). Ces enzymes agissent généralement en synergie entre elles afin d'hydrolyser les parois cellulaires des cellules végétales (Carro & Menéndez, 2020).

Les bactéries présentant des cellulases et d'autres enzymes hydrolytiques sont généralement considérées comme des agents de biocontrôle. Ces enzymes permettent d'inhiber la croissance de champignons pathogènes en dégradant leur paroi cellulaire limitant ainsi leur croissance et leur propagation. (Berendsen et *al.*, 2012; Mene'ndez et Garcí'a-Fraile, 2017).

▪ Les lipases et estérases

Les lipases et estérases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de différents substrats lipidiques contribuant à la libération d'acides gras et de glycérol, essentiels pour le métabolisme des plantes. En dégradant les composés complexes, ces enzymes aident à libérer des nutriments tels que le phosphore et l'azote, ce qui favorise leur absorption par les racines des plantes (Fan & Smith, 2021). Il s'agit de protéines lipolytiques essentielles que l'on trouve dans une grande variété d'organismes, des procaryotes aux eucaryotes (Lee & Park 2019). Ces enzymes sont impliquées dans un large éventail de rôles dans les plantes, y compris la germination des plantes, les processus de signalisation, la croissance et le développement des plantes, le renouvellement des lipides et les réponses au stress (Matos & Pham-Thi, 2009). Les estérases peuvent participer à la réponse au stress hydrique ou salin en modifiant la composition lipidique des membranes

cellulaires, ce qui aide à maintenir l'intégrité cellulaire sous des conditions défavorables (Turan et *al.*, 2016).

▪ Les chitinases

Les chitinases sont produites par toute une série d'organismes, des plantes aux virus et sont impliquées dans la nutrition, la morphogenèse, les processus pathogènes et symbiotiques (Kasprzewska, 2003). Les chitinases sont généralement impliquées dans la défense des plantes contre les champignons pathogènes et permettent d'inhiber leur croissance en dégradant leur paroi cellulaire (Reddy et *al.*, 2022). Mais, elles sont également impliquées dans la croissance et le développement en général (Regalado et *al.*, 2000).

Les enzymes chitinolytiques sont capables de réguler le processus de colonisation en générant ou en dégradant des molécules de signalisation. Il a été démontré que les isoformes de la chitinase végétale varient en fonction des bactéries qui ont pénétré dans les tissus ; d'un côté, les bactéries endophytes induisent des chitinases régulatrices tandis que les bactéries non symbiotiques induiraient des chitinases qui répondent à des molécules élicitrices et déclenchent les mécanismes de défense des plantes (Kasprzewska, 2003). Cependant, il a été démontré que certains micro-organismes mutualistes utilisent la production d'éliciteurs de chitine obtenus à partir de la chitine pour préparer leur hôte à la relation mutualiste (Sa'nchez-Vallet et *al.*, 2015).

▪ Les protéases

Les protéases sont des enzymes qui catabolisent la dégradation des protéines par hydrolyse des liaisons peptidiques. Ce mécanisme est crucial pour la nutrition des plantes facilitant ainsi l'absorption de nutriments tout en produisant des protéases qui dégradent les composants cellulaires qui pourraient inhiber l'absorption. Les protéases des champignons et des bactéries jouent un rôle important dans le recyclage du carbone et de l'azote des protéines (Sims, 2006 ; Holik et *al.*, 2017).

D'autre part, les protéases produites par les PGPR sont capables de dégrader les parois cellulaires des pathogènes fongiques et bactériens, contribuant ainsi à la lutte biologique contre ces agents nuisibles. Cette action aide à réduire l'incidence des maladies des racines et à améliorer la santé globale des plantes. En outre, les protéases des plantes ont été impliquées dans la réponse à l'invasion des micro-organismes, déclenchant la réponse hypersensible qui induit la mort cellulaire programmée des cellules envahies et les signaux nécessaires à l'activation des défenses dans des zones éloignées (Salguero-Linares et Col, 2019).

Les protéases peuvent également être impliquées dans la production de phytohormones, telles que les auxines et les gibbérellines, qui sont essentielles pour la croissance des racines et le développement aérien. En favorisant l'élongation et la division cellulaires (Reddy *et al.*, 2022).

2.2.2. Production de phytohormones

Les PGPR contribuent à la croissance et au développement de la plante par la production de diverses phytohormones, telles que les cytokinines, les gibbérellines, l'acide indole-3- acétique (AIA), l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène (Bohn-Courseau, 2010 ; Glick, 2012 ; Nambara, 2013 ; Egamberdieva *et al.*, 2017b ; Singh *et al.*, 2019). Les phytohormones sont des composés organiques naturels qui influencent divers processus physiologiques ou morphologiques des plantes, tels que l'élongation et la division cellulaires à des concentrations extrêmement faibles (Parewa *et al.*, 2018).

Ces phytohormones affectent de manière visible l'activité métabolique des plantes et contribuent également indirectement à la stimulation des défenses ainsi qu'à la gestion du stress abiotique tel que la sécheresse et la salinité qui entraînent d'énormes pertes de production agricole dans le monde entier. (Egamberdieva *et al.*, 2017b ; Singh *et al.*, 2019).

- **Acide indole-3-acétique (AIA)**

L'acide indole-3-acétique est l'auxine la plus importante et la plus connue dans les plantes (Hayat *et al.*, 2010), et il est produit par plusieurs microbes PGPR. Environ 80 % de la flore microbienne rhizosphérique produit de l'AIA. Il est impliqué dans la division et le développement cellulaires, la différenciation des cellules et des tissus végétaux, la germination des graines, la formation des racines, le développement du système racinaire et aide à la dominance apicale. Il stimule également les racines latérales et affecte la photosynthèse, elle intervient dans la formation des pigments et renforce la tolérance des plantes aux conditions de stress (Aeron *et al.* 2011 ; Goswami *et al.*, 2016). Les plantes traitées avec de l'AIA à long terme ont montré un développement élevé des différentes parties des racines de la plante qui permettent le contact avec le sol afin d'accéder à une plus grande quantité de nutriments présents dans le sol (Aeron *et al.*, 2011).

▪ **Gibbérellines**

Les gibbérellines sont un grand groupe d'hormones qui représentent pas moins de 136 diverses molécules (Goswami et *al.*, 2016). Les processus de développement dans les plantes supérieures, y compris la germination des graines, l'élongation des tiges, la floraison et le développement des fruits, ainsi que la croissance des feuilles et des tiges, sont influencés par les gibbérellines (Hedden & Phillips 2000 ; Bottini et *al.*, 2004). Elles sont principalement responsables de l'allongement des entre-nœuds, ce qui conduit à une augmentation de la taille des plantes (Spaepen & Vanderleyden, 2011). Ces hormones jouent un rôle clé dans la levée de dormance des graines et des bourgeons, facilitant ainsi la germination et le développement (Goswami et *al.*, 2016).

▪ **Cytokinines**

Les cytokinines stimulent la division cellulaire de la plante, le cambium vasculaire, la différenciation, encouragent la formation de poils racinaires et réduisent la formation de racines latérales et l'élongation des racines primaires (Aloni et *al.*, 2006 ; Riefler et *al.*, 2006). Elles jouent un rôle dans le métabolisme cellulaire et la production de chlorophylle, ce qui est crucial pour la photosynthèse (Howell et *al.*, 2003 ; Moc, 2019). Les plantes dont la teneur en cytokinines endogènes est réduite présentent des changements morphologiques évolutifs différents, tels que des entre-nœuds de pousses plus courts, une floraison retardée, moins de fleurs, moins de surface foliaire, des méristèmes apicaux plus petits, une meilleure croissance des racines et un méristème racinaire plus long (Schmulling, 2002).

▪ **Ethylène**

L'éthylène est une petite molécule gazeuse qui régule des processus tels que la croissance des racines et la formation des poils racinaires, la germination, la dormance des graines, la maturation des fruits, la sénescence des fleurs et l'abscission des feuilles (Reid 1981 ; Khan et Khan, 2014 ; De Martinis et *al.*, 2015 ; Sun et *al.*, 2016). L'hormone joue également un rôle dans la réponse aux stress environnementaux (les températures élevées, les inondations, la sécheresse, la présence de métaux toxiques, etc.) et contribue à la réduction des rendements des cultures en réduisant la croissance des tiges et des racines. L'éthylène, qui est produit sous l'effet de divers stress induit la défoliation et les processus cellulaires qui dirigent l'inhibition de la croissance des tiges et des racines (Li et Glick 2005 ; Etesami et *al.* 2015 ; Jha et Saraf 2015).

▪ **Acide abscissique**

L'acide abscissique (ABA) est généralement connu comme une « hormone du stress », qui répond à différents stress environnementaux, à la fois biotiques et abiotiques (Zhang, 2014). Elle joue un rôle essentiel dans un large éventail de stress, tels que les métaux lourds, la sécheresse, la salinité, les radiations, le stress thermique, etc., et améliore également divers processus, tels que la germination des graines, la dormance des graines et la fermeture des stomates (Vishwakarma et *al.*, 2017). L'ABA remplit un certain nombre de fonctions au niveau cellulaire, comme la régulation de la production d'enzymes essentielles à la défense des cellules contre le manque d'humidité (Li et *al.*, 2014), et elle est constante à des températures élevées (Zhang, 2014).

2.2.3. Production de sidérophores

Le fer est l'un des éléments les plus importants. Il existe dans l'environnement aérobie principalement sous forme de Fe^{3+} formant des complexes insolubles hydroxydes et oxyhydroxydes, indisponibles pour les micro-organismes et les plantes. Pour « résoudre » ce problème, les PGPR ont développé une stratégie efficace pour rendre ces complexes disponibles. Dans un environnement pauvre en fer, elles synthétisent des composés de faible poids moléculaire (<1000 Da), appelés sidérophores (Neilands 1983 ; Rodríguez-Dorantes & Guerrero-Zúñiga, 2017). Ces molécules ont une affinité avec les ions métalliques formant des complexes. Les sidérophores forment des complexes avec Fe^{3+} qui sont absorbés par la membrane plasmique de la bactérie, réduisant Fe^{3+} en Fe^{2+} après avoir libéré l'ion dans le plasma cellulaire. Bien que les sidérophores agissent comme agents solubilisant pour beaucoup plus d'ions provenant de minéraux ou de composés organiques moins solubles tels que Al, Cd, Pb, Cu, Zn, etc. (Schalk et *al.*, 2011).

En outre, l'inoculation des semences avec des PGPR produisant des sidérophores améliore significativement les paramètres de croissance comme la longueur des racines, la longueur des pousses et la biomasse. Ces bactéries ont également montré un effet antagoniste contre différents phytopathogènes (Pahari et Mishra, 2017). Selon Berendsen et ses coauteurs (2015), les sidérophores sont l'un des facteurs clés stimulant la résistance systémique induite chez les plantes contre les phytopathogènes.

3. Mécanismes des PGPR pour augmenter la tolérance des plantes au stress salin

Les PGPR sont connues pour permettre aux plantes d'atteindre leur croissance normale en situations de stress abiotiques tels que la sécheresse (Zhao *et al.*, 2023) et la haute salinité (Li *et al.*, 2022). Les PGPR halophiles participent à l'amélioration de la croissance des plantes et de leur tolérance au stress de la salinité par l'accumulation d'osmolytes, l'homéostasie ionique, l'amélioration de l'absorption des nutriments, la production d'ACC désaminase, de l'AIA, de sidérophores et d'exopolysaccharides, et la modification du système de défense antioxydante (Figure 6) (Yang *et al.*, 2016 ; Kumar et Verma, 2018).

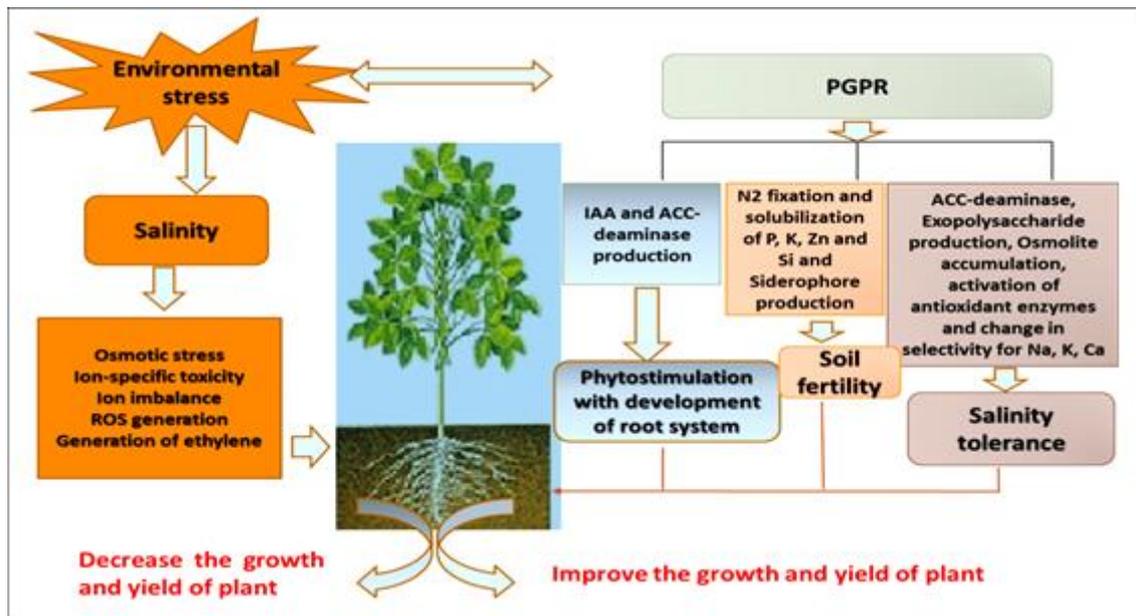


Figure 6 : Interaction PGPR-plantes sous stress salin (Saghafi *et al.*, 2019).

3.1. Accumulation d'osmolytes

L'accumulation d'ions salins autour des racines des plantes provoque un stress osmotique sous l'effet de la salinité, ce qui entraîne un déséquilibre osmotique. Cependant, la rétention d'eau et l'intégrité de la photosynthèse sont essentielles pour réduire les effets négatifs du stress sur la croissance des plantes (Iqbal *et al.* 2014). L'échange d'eau entre la cellule et l'environnement est régulé par des protéines membranaires appelées : les aquaporines (AQP). Les AQP jouent un rôle important dans divers processus physiologiques, tels que la croissance, le développement, et la réponse aux stress biotiques et abiotiques. (Rodrigues *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2014b ; Xin *et al.*, 2014).

Dans les conditions de stress osmotique, les plantes accumulent de nombreux métabolites, appelés solutés (organiques) compatibles tels que la proline et la glycine-bétaïne dans le

cytoplasme. Ces métabolites renforcent la résistance des plantes au stress salin en stabilisant la conformation des protéines, le pH cytosolique, l'équilibre de l'oxydoréduction de la cellule, l'intégrité du PSII et de la membrane, et l'activité des enzymes (Yan et *al.*, 2013 ; Tang et *al.*, 2015). Contrairement à de nombreuses plantes halophytes, les plantes glycophytes ne peuvent pas accumuler des quantités suffisantes de solutés compatibles, c'est la raison principale de la sensibilité de ces plantes au stress salin (Yan et *al.*, 2013).

Les PGPR améliorent les relations hydriques des plantes par l'accumulation d'osmolytes tels que la proline et les sucres solubles en maintenant la conductivité hydraulique des racines dans les plantes inoculées (Choudhary, 2012). Des études ont montré que les plantes inoculées avec des PGPR étaient plus fraîches et avaient une activité photosynthétique et une biomasse plus élevées par rapport aux plantes non inoculées (Shukla et *al.*, 2012 ; Kumari et *al.*, 2015).

3.2. Homéostasie ionique

L'augmentation de la concentration de Na^+ entraîne la diminution de la concentration de K^+ dans les feuilles des plantes soumises à un stress salin. Ainsi, le Na^+ peut entrer en compétition avec K^+ pour les sites de liaison dans des processus tels que les réactions enzymatiques, la synthèse des protéines et les fonctions des ribosomes. Le maintien homéostatique de la concentration d'ions est vitale dans les cellules végétales soumises au stress salin. Les cellules végétales doivent donc exclure les ions toxiques tels que le Na^+ du cytoplasme et les faire entrer dans les vacuoles. De cette manière, les plantes conservent le Na^+ dans les racines et empêchent le flux de Na^+ vers les pousses ou les feuilles. Gu et *al.* (2016) ont rapporté que le rapport K^+/Na^+ est un indice approprié pour évaluer la tolérance au sel chez les plantes. De ce fait, le rapport K^+/Na^+ dans les plantes glycophytes est très faible par rapport aux halophytes (Gu et *al.*, 2016).

Les PGPR halophiles peuvent modifier l'absorption des ions toxiques (Na^+ , Cl^-) par les racines des plantes en modifiant la physiologie de la plante hôte, en diminuant l'accumulation d'ions toxiques dans les feuilles et en améliorant l'état nutritionnel de la plante. Plusieurs études montrent que les plantes inoculées par des PGPR halophiles avaient augmenté la biomasse totale, le rapport K^+/Na^+ , l'efficacité photosynthétique et le taux maximal de transport d'électrons en cas de stress salin (Zhang et *al.*, 2008 ; Rojas-Tapias et *al.*, 2012 ; Wang et *al.*, 2016).

3.3. L'amélioration de l'absorption des nutriments

La disponibilité et l'absorption des nutriments dépendent de plusieurs paramètres tels que le pH du sol, la texture, l'humidité et la composition de ses micro-organismes. La plupart des nutriments sont absorbables dans une fourchette de pH de 5 à 7. Sous l'effet du stress salin, le pH du sol est modifié, ce qui modifie l'absorption des éléments nutritifs par les plantes. La salinité entraîne l'appauvrissement et la sédimentation du phosphore absorbable. Dans l'étude de Shukla et *al.* (2012) et Vaishnav et *al.* (2017), les bactéries solubilisant le phosphate insoluble solubilisent le phosphore sédimentaire dans un milieu hydroponique et augmentent la disponibilité du phosphore pour les plantes soumises au stress de la salinité.

La salinité interfère également avec les étapes du métabolisme de l'azote telles que l'absorption, la réduction du NO_3 et la synthèse des protéines (Frechilla et *al.*, 2001 ; Evelin et *al.*, 2009). Par ailleurs, le stress salin altère l'activité de la nitrogénase, l'enzyme responsable de la conversion de l'azote atmosphérique en formes assimilables par les plantes. Cette inhibition affecte directement le métabolisme azoté et, par conséquent, la croissance des plantes. Plusieurs études ont rapporté que les PGPR halophiles améliorent la croissance des plantes sous stress salin (Saxena et *al.*, 2013 ; Kapadia et *al.*, 2021; Sagar et *al.*, 2022). Ces rhizobactéries sont capables de produire l'enzyme nitrogénase, de fixer l'azote, et de solubiliser le phosphate pour aider à la croissance des plantes et atténuer le stress salin chez les plantes. (Kusale et *al.*, 2021).

Par ailleurs, le fer agit comme cofacteur dans 140 enzymes biochimiques catalytiques. Cet élément est sous forme ferrique (Fe^{3+}) et forme des hydroxydes et oxyhydroxydes insolubles qui ne sont pas absorbables par les plantes et les microorganismes (Ma et *al.*, 2011). L'accessibilité du fer ferrique diminue davantage dans les sols salins car la solubilité de la forme ferrique diminue avec l'augmentation du pH (Thomine et Lanquar, 2011). Les plantes ont deux stratégies pour absorber le fer. La première stratégie implique la libération de composés organiques chélateurs du fer qui maintiennent le fer sous forme de solution et le rendent disponible pour la plante. Le fer soluble est alors réduit et absorbé par le système enzymatique de la membrane cellulaire des plantes. La deuxième stratégie implique l'absorption du composé fer-organique par la plante, de sorte que le fer est réduit et absorbé à l'intérieur de la plante (Goswami et *al.*, 2016).

Les PGPR utilisent différents mécanismes pour accéder au fer, tels les sidérophores. Ce sont des agents chélateurs du fer présents dans diverses bactéries et qui sont importants pour augmenter la croissance des plantes et les protéger contre les agents pathogènes (Scavino et

Pedraza, 2013). Les PGPR produisent des sidérophores dans la rhizosphère, puis le fer est absorbé par les plantes par destruction du chélate ou absorption directe (Patel *et al.*, 2018 ; Khan *et al.*, 2019 ; Sayyed *et al.*, 2019).

3.4. Production d'acide indole-3-acétique

L'un des mécanismes généraux d'adaptation des plantes au stress est la modification de la morphologie des racines. Les hormones jouent un rôle important dans ce processus. Les rhizobactéries productrices d'AIA affectent le système racinaire en augmentant la taille, le poids, la ramification et la surface des racines. Tous ces changements conduisent à une capacité accrue à absorber les nutriments du sol et, en fin de compte, à une amélioration de la croissance des plantes (Etesami *et al.*, 2015 ; Saghafi *et al.*, 2019). Plusieurs auteurs ont rapporté que l'inoculation des plantes par des PGPR halophiles productrices d'AIA soumises à un stress salin ont montré une amélioration de la croissance (Saghafi *et al.*, 2019), une augmentation de l'absorption des nutriments et de l'eau et la formation de racines latérales (Hussain *et al.*, 2018 ; Barnawal *et al.*, 2019).

3.5. Production de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

Les plantes répondent au stress en produisant de l'ACC, un précurseur de la production d'éthylène qui est une hormone végétale liée à la réponse aux stress environnementaux (Glick *et al.*, 2007). L'ACC est sécrété dans la rhizosphère, puis absorbé par les racines et finalement converti en éthylène. L'accumulation d'éthylène empêche la croissance des racines, ce qui limite l'absorption d'eau et d'éléments nutritifs. Par conséquent, tout facteur susceptible de modifier la concentration d'éthylène peut réguler la croissance et le développement des plantes (Siddikee *et al.*, 2010).

L'ACC-désaminase est une enzyme importante qui joue un rôle dans la régulation de l'éthylène. Elle est présente dans de nombreuses espèces microbiennes de bactéries Gram-négatives et Gram-positives, de rhizobiums, d'endophytes et de champignons (Singh et Jha, 2015).

Les PGPR ont la capacité d'utiliser l'ACC des plantes comme source d'azote et d'énergie dans la rhizosphère. Ils empêchent l'accumulation d'éthylène et fournissent un système racinaire sain pour faire face aux stress environnementaux. Ainsi, lorsque l'ACC est sécrété par les racines des plantes, il est hydrolysé en α -cétobutyrate et en ammoniac par les bactéries

productrices d'ACC-désaminase. Par conséquent, la concentration d'ACC est réduite à l'extérieur de la racine et l'ACC est davantage sécrété, provoquant une réduction du niveau d'ACC dans les plantes, ce qui entraîne une diminution de la quantité d'éthylène (Siddikee et *al.*, 2010). On a rapporté que lorsque les plantes ont été traitées avec des bactéries produisant de l'ACC désaminase, une croissance racinaire relativement importante a été observée en raison de la présence moindre d'éthylène (Burd et *al.*, 2000 ; Shaharoon et *al.*, 2006), une résistance améliorée à divers stress a été signalée (Burd et *al.*, 2000 ; Safronova et *al.*, 2006) et une amélioration des paramètres de croissance et l'absorption des nutriments avec une limitation de l'absorption de Na^+ (Saghafi et *al.*, 2019).

3.6. Production d'exopolysaccharides (EPS)

Les contraintes environnementales modifient les propriétés physicochimiques et biologiques du sol et affectent donc directement l'activité microbienne et la production de rendement, et indirectement la structure du sol. Les exopolysaccharides produits par les micro-organismes sont sous forme visqueuse et crée un micro-environnement qui maintient l'eau et ralentit la déshydratation par rapport au milieu environnant. Par conséquent, les EPS protègent les bactéries et les racines de la plante contre le stress (Ilyas et *al.*, 2020). De même, la production d'EPS par les bactéries dans un sol salin peut affecter la productivité des plantes car ils améliorent la génération d'agrégats et les propriétés physicochimiques du sol (Subair, 2015). Les bactéries productrices d'EPS peuvent réduire la disponibilité d'ions toxiques dans des conditions salines, en chélatant les ions sodium excessifs autour des racines permettant une meilleure croissance des plantes (Choudhary et *al.*, 2016).

3.7. Modification du système de défense antioxydant

Les plantes exposées à des conditions stressantes comme la salinité, produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^\cdot) et les radicaux alcalins (Ahanger et *al.*, 2017). Les ROS réagissent avec les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui entraîne des dommages oxydatifs et altère les fonctions générales des cellules végétales (Yan et *al.*, 2013).

Pour faire face à ces dommages, les plantes utilisent leurs systèmes de défense antioxydants, qui comprennent des composants enzymatiques et non enzymatiques. En augmentant l'activité de ces composants, les mécanismes de défense de la plante tentent de prévenir l'accumulation de ROS et le stress oxydatif (Miller et *al.*, 2010). Les composants enzymatiques comprennent les

peroxydases (POX), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX), la glutathion réductase (GR), la déhydroascorbate réductase (DHAR), la monodéhydroascorbate réductase (MDAR), les glutathion peroxydases (GPX), glutathion s-trasferanse (GST), etc. (Reddy *et al.*, 2015).

Les composants non enzymatiques comprennent le glutathion, le tocophérol, les anthocyanes, les composés phénoliques (tels que les flavonoïdes, la lutéine, les tanins), l'acide ascorbique, etc. (Yan *et al.*, 2013 ; Kaushal et Wani 2016). Il existe une corrélation positive entre le niveau de ces enzymes et l'activité oxydative dans des plantes en situation de stress. (Rasool *et al.*, 2013 ; Tang *et al.*, 2014). La surexpression d'enzymes antioxydantes² dans les plantes augmente leur tolérance aux stress oxydatifs. Pour induire la surexpression de la production d'enzymes antioxydantes des PGPR ont été utilisés. Des études ont montré que l'utilisation de PGPR entraîne une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes telles que POX, SOD, CAT, APX et GR (Nautiyal *et al.*, 2008 ; Ilyas *et al.*, 2020).

4. Champignons phytopathogènes et lutte biologique

Au niveau mondial, les champignons phytopathogènes sont la principale cause de menace pour la production des cultures agricoles. Ils entraînent d'énormes pertes dans la production agricole. Il devient un problème majeur, car plusieurs souches deviennent résistantes aux pesticides chimiques. Au cours des trois dernières décennies, diverses stratégies de biocontrôle ont été développées sous forme d'engrais chimiques, de pesticides, d'insecticides et de fongicides contre les ravageurs et les phytopathogènes fongiques pour la protection des cultures. L'utilisation de ces produits chimiques entraîne de graves problèmes environnementaux (Khan *et al.*, 2021).

Les PGPR offrent la possibilité de remplacer ces produits chimiques et ces engrais par des agents biologiques respectueux de l'environnement. Les PGPR empêchent la croissance des phytopathogènes grâce à divers mécanismes (Elshahat *et al.*, 2016).

4.1. Antibiose

L'antibiose est le processus de libération de métabolites secondaires tels que les antibiotiques et d'autres composés volatils par les micro-organismes bénéfiques afin de contrôler des pathogènes (Fravel, 1988). L'utilisation de l'antagonisme microbien contre les phytopathogènes en agriculture n'est pas une nouvelle approche. Le biocontrôle utilise des micro-organismes bénéfiques (non pathogènes) qui suppriment le développement de micro-organismes indésirables et nuisibles (Ulloa-

Ogaz *et al.*, 2015). Les PGPR, comme certaines souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas*, synthétisent des métabolites secondaires qui ont des propriétés antifongiques et antibactériennes. Ces antibiotiques peuvent détruire les agents pathogènes ou inhiber leur croissance en interférant avec leurs processus métaboliques (Gupta *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Ramadan *et al.*, 2016 ; Vejan *et al.*, 2016).

4.2. Résistance Systémique Induite (ISR) chez les Plantes

L'ISR est un mécanisme de défense des plantes qui leur permet de se préparer à résister à des attaques futures par des pathogènes. Ce phénomène est particulièrement associé aux interactions entre les plantes et les PGPR. Les PGPR produisent des éliciteurs qui sont des molécules actives perçues par les racines de la plante. Un signal systémique est véhiculé à travers la plante, alertant les autres parties du végétal d'une éventuelle menace. Ainsi, la plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression et sera donc immunisée. (Berendsen *et al.*, 2015). Cette interaction qui initie une réponse défensive chez la plante sans provoquer de symptômes visibles de maladie est appelée résistance systémique induite (ISR) (Van Loon & Bakker, 2005 ; Ongena & Thonart, 2006). Ainsi, la plante active ses mécanismes de défense, rendant ainsi l'hôte moins susceptible à une infection ultérieure par des agents pathogènes (figure 7) (Shilev, 2013).

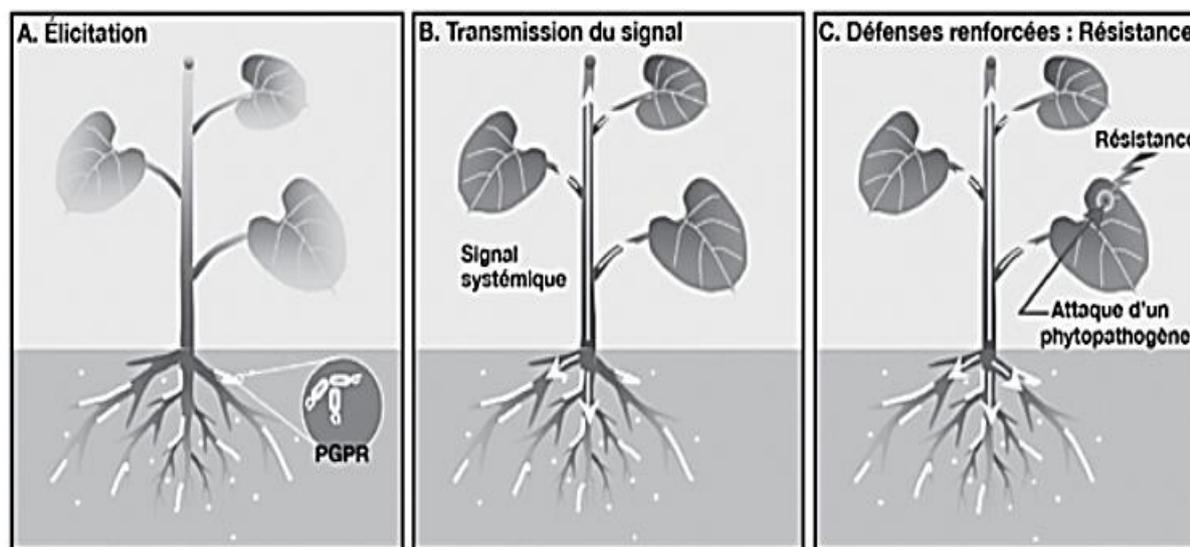


Figure 7 : La résistance systématique induite chez les plantes par des PGPR
(Ongena & Thonart, 2006).

4.3. Production de composés organiques volatils (VOC)

Les bactéries affectent la croissance des plantes par plusieurs mécanismes. Certains PGPR peuvent produire des composés organiques volatils (COV). Ce sont des molécules gazeuses capables d'interagir avec les plantes dans l'environnement du sol et qui possèdent une

activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes, les bactéries ou les nématodes (Ramette et *al.*, 2003).

Les COV peuvent se propager sur une longue distance créant un environnement bactériostatique autour de la rhizosphère de la plante, contrairement aux antibiotiques, qui ne peuvent être efficaces que si les agents de biocontrôle colonisent efficacement les racines de la plante (Raza et *al.*, 2016). Les COV peuvent favoriser la croissance des plantes directement, par résistance systémique induite (ISR), ou indirectement par suppression des phytopathogènes (biocontrôle). À ce jour, relativement peu de COV ont été identifiés et leurs effets sur la croissance des plantes caractérisés. En général, l'effet observé sur une interaction plante-bactérie particulière a été attribué au pool de COV produits, comme une preuve de synergie entre les composés chimiques (Santoro et *al.*, 2015).

Matériel & méthodes

Partie I : Isolement et sélection des bactéries ayant des caractères promoteurs de la croissance des plantes

1. Localisation des sites d'étude

Les échantillons de sol ont été prélevés au niveau de deux régions :

1.1. La Sebkhha de Bazer-Sakra :

Région semi-aride située à 9 km au Sud de la ville d'El Eulma, wilaya de Sétif. Elle est limitée à l'Ouest par le Djebel Braou, au Nord par Merdjet Ech-chtout, au Sud par Koudiat Gueltet Ed Debba et à l'Est, par Mechtet Nouasser. Géographiquement, le site se retrouve entre 36° 00'et 36°05'N de latitude et 05°37'E à 5°45'E de longitude. (Figure 8).

Cette sebkhha couvre une superficie de 4379 ha et se situe entre 910 et 917 m d'altitude.

Le site, d'origine naturelle, est une dépression naturelle salée, labile et fermée. Il s'enfonce dans un relief généralement plat où l'Oued El Mellah, alimenté par les eaux usées (ménagère et industrielle) de la ville d'El Eulma et du village d'El Mellah est permanent. C'est lui qui assure l'hydromorphie de la sebkhha en saison estivale. En hiver et durant les années pluvieuses le niveau d'eau peut atteindre 1,5 m.

Le bassin de la sebkhha est formé de vases salées souvent inondées surtout l'hiver et recouvertes l'été par des croutes de sel. Le bassin est entouré par des sols de types différents, les sols salins dominant avec 70% environ et occupent les parties Nord-est et Sud, les sols bruns calcaires avec 20% se localisent à l'Est et les sols iso-humiques avec 10% sont observés au Sud-ouest.

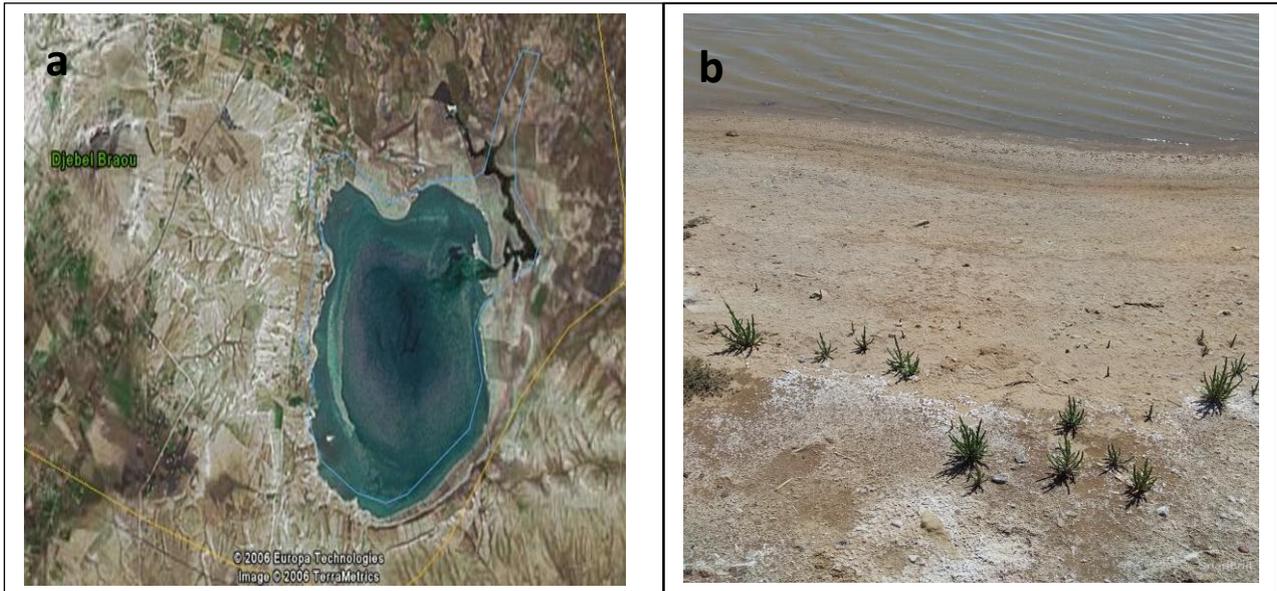


Figure 8 : a : Sebkhet Bazer par Google Earth ; b : photo auteur, 2019.

1.1. Chott El Hodna :

Situé en zone aride dans la région de Bou-Saada (Sud Algérien), ce chott est localisé dans la partie la plus basse de la plaine du Hodna. Le Chott El Hodna fait partie d'une série de chotts (lacs salés) alimentés par l'eau qui descend de la chaîne de l'Atlas tellien au nord, et de l'Atlas saharien au sud. Géographiquement ce site se retrouve entre 35°18'N et 35°32'N de latitude et 04°15'E à 05°06'E de longitude. (Figure 9), avec une superficie de 362000 ha et une altitude comprise entre 390 m et 400 m.

Le Chott El Hodna fait partie d'une série de chotts (lacs salés) alimentés par l'eau qui descend de la chaîne de l'Atlas tellien, au nord et de l'Atlas saharien au sud. À l'Est, il est limité par le Djebel Metlili et la ville de Barika, à l'Ouest, par les hautes plaines steppiques algéro-oranaises. Autour du chott, il y a des oueds et des oasis, ainsi qu'une sebkha (étendue salée) dépourvue de végétation.

L'alimentation du Chott est assurée par au moins 22 cours d'eau principaux, auxquels il faut ajouter des sources d'eau douce. Le Chott se met en eau uniquement en hiver. Sec et salé en été, des croûtes de sel couvrent toute son étendue.

Leurs sols sont sablo-argileux bruns et bruns rouges qui permettent leurs mise en culture.

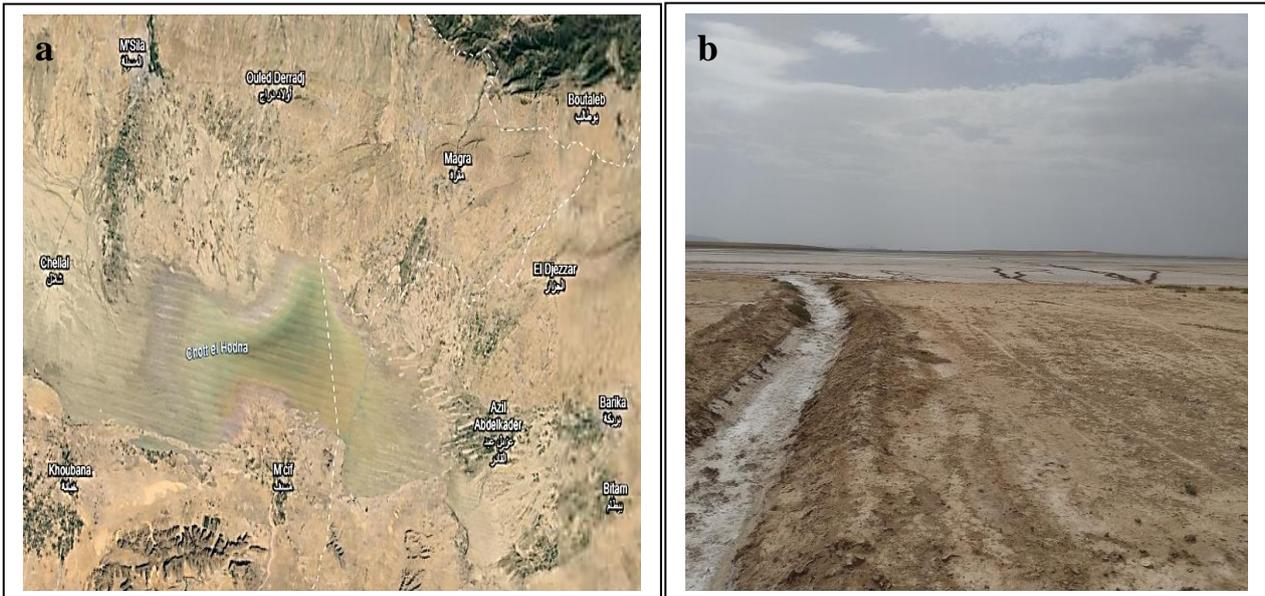


Figure 9 : a: Chott El Hodna par Google Earth; b: photo auteur, 2019.

2. Prélèvement des échantillons

10 échantillons de sol ont été prélevés de chaque site dans la rhizosphère des plantes halophiles sauvages. Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, selon la technique de Pochon et Tardieux (1962), les échantillons ont été prélevés aseptiquement dans la couche superficielle jusqu'à 15cm de profondeur dans des sachets stériles, puis transportés au laboratoire à 4°C.

3. Analyses physicochimiques

3.1. Le potentiel hydrogène (pH)

Le pH du sol indique le degré d'acidité d'un sol. Ainsi, le pH influe sur la solubilité des minéraux dans le sol et leur assimilation par les plantes.

La mesure du pH a été réalisée en suivant le protocole suivant : 10 g de sol préalablement séchés à 40°C et tamisés (< 2mm) ont été ajoutés à 25 ml d'eau distillée dans un bécher. La suspension est agitée pendant 1mn, puis laissée décanter pendant 1h température ambiante. Les valeurs du pH ont été obtenues grâce à un pH-mètre (Hanna Instruments-pH210) préalablement étalonné (Mathieu et Pielain, 2003).

3.2. La conductivité électrique C_E

La conductivité électrique d'un sol permet d'évaluer sa salinité. Pour se faire, 10g de sol préalablement séchés à 40°C et tamisés (< 2mm) ont été ajoutés à 50 ml d'eau distillée. Après agitation pendant 30 min, on laisse décanter. La conductivité électrique C_E est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Hanna Instruments-HI98129) à partir du surnageant (Hardie et Doyle, 2012).

3.3. Le contenu gravimétrique (humidité)

Le taux d'humidité du sol est déterminé par gravimétrie. Cette méthode consiste à prélever une masse connue d'un échantillon de sol, le sécher complètement à 105°C, puis à mesurer la différence de poids avant et après séchage. Le séchage continu jusqu'à stabilisation du poids. Cette différence de poids correspond à la masse d'eau contenue dans cet échantillon, appelée taux d'humidité gravimétrique « θ_g ». La valeur du contenu humide gravimétrique est donnée par la formule suivante : (Pepper et Gerba, 2004).

$$\theta_g = ((m - d) / d) * 100$$

Où :

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

3.4. La matière organique totale

La matière organique joue un rôle essentiel dans la fertilité physique, chimique et biologique du sol. Elle est considérée comme un indicateur important de la fertilité et la qualité d'un sol. La matière organique totale est évaluée en dosant le carbone organique totale (COT) pour le fait que le carbone organique constitue 58% de la matière organique.

Pour le dosage du carbone organique total dans le sol, la méthode ANNE (1945) a été utilisée. Cette méthode repose sur l'extraction du carbone à chaud présent dans les échantillons de sol par le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) en milieu sulfurique. Puis, dosage de l'excès de bichromate par une solution de sel de Mohr et détermination par différence du volume ayant réagi avec le carbone du sol.

La teneur en carbone organique de l'échantillon est déterminée par la formule suivante :

$$C \% = (V_t - V_e) * 0,615$$

Où :

- V_t : volume de sel de Mohr nécessaire pour titrer l'excès de bichromate dans le témoin ;
- V_e : volume de sel de Mohr nécessaire pour titrer l'excès de bichromate dans l'essai ;
- Le facteur 0,615 permet de convertir ce volume en pourcentage, pour 1g d'échantillon.

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

$$MO \% = 1.724 \times C\%$$

4. Analyse microbiologique

10g de sol de chaque échantillon de sol ont été homogénéisés dans de l'eau physiologique stérile. 100µl de chaque suspension ont été inoculés dans un milieu de culture pour halophile (HM) contenant (en g/L): 4 KCl; 2 MgSO₄; 0.36 CaCl₂; 2.06 NaHCO₃; traces de FeCl₃; 10 extrait de levure; et 0.5 glucose à un pH de 7.2 ± 0.02 . La concentration en NaCl était comprise entre 0,5 M et 3 M. Après 72h d'incubation à 28°C, les bactéries ont été isolées sur le même milieu additionné d'agar (15 g/L). 70 isolats bactériens ont été purifiés puis conservés pour des études ultérieures.

5. Recherche de propriétés d'intérêt agricoles

Les 70 isolats bactériens purifiés à partir des sols salins ont été testés afin de sélectionner des souches pouvant être utilisées comme inocula dans le but de promouvoir la croissance du blé. Cette sélection est basée sur la capacité de ces bactéries à produire des enzymes d'intérêt agricole et d'autres molécules bioactives. Tous ces tests ont été réalisés en triplicata.

5.1. Production d'enzymes lytiques extracellulaires

5.1.1. Cellulase

La recherche d'enzymes cellulasiques extracellulaires, a été réalisée en utilisant des disques d'agar de 6 mm de diamètre contenant des cultures bactériennes jeunes et déposés à l'intérieur de boîtes de Pétri contenant le milieu de Carder (1986) ; composition en g/L : Na₂HPO₄ (6) ; KH₂PO₄ (3) ; NaCl (0,5) ; NH₄Cl (1) ; Extrait de levure (3) ; CMC (carboxyméthylcellulose) (7) ; Agar (15) ; à un pH de 7.2 ± 0.02 . Les boîtes sont par la suite incubées à 28°C pendant 8 jours (Carrim, Barbosa, & Vieira, 2006).

Après incubation, une solution de rouge Congo (0,1%) est ajoutée à la surface des milieux. Après 20 minutes, la surface de la boîte est inondée avec une solution de NaCl de 1M, puis laissée au repos pendant une nuit. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique la dégradation de la CMC et traduit la présence d'une cellulase extracellulaire.

5.1.2. Amylase

Des disques de jeunes cultures bactériennes sont déposés sur milieu de culture à base d'amidon afin de mettre en évidence leur capacité à dégrader l'amidon. Le milieu a été préparé selon la méthode décrite par Vinoth *et al.* (2009) et dont la composition en g/L est : KNO₃ (0.5) ; K₂HPO₄ (1.0) ; MgSO₄ (0.2) ; CaCl₂ (0.1) ; FeCl₃ (0.001) ; amidon soluble (10.0) ; agar (15.0) ; 7.2 ± 0.02 pH. Les boîtes sont incubées durant une période allant de 48-72 h à 28°C.

Après incubation, une solution de (Iugol) est utilisée pour inonder le milieu de culture à l'intérieur des boîtes. Après quelques minutes de contact, les boîtes sont lavées à l'eau distillée, et l'apparition de zones claires autour des disques d'agar traduit la présence d'amylase extracellulaire dans le milieu. Les zones dont l'amidon n'est pas dégradé apparaissent en bleu noirâtre.

5.1.3. Lipase

Des disques de jeunes cultures bactériennes sont déposés sur milieu de culture contenant en g/l: peptone (10) ; NaCl (5.0) ; CaCl₂ 2H₂O (0.1) ; Tween 20 (1%, v/v) et Agar (18). Le pH est ajusté à 7,4. Après 48h d'incubation à 28°C, un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Sierra, 1957 ; Carrim *et al.*, 2006).

5.1.4. Estérase

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

5.1.5. Protéase

L'activité protéolytique a été déterminée comme décrit ci-dessus, mais en utilisant un milieu de culture contenant (en g/L) : caséine pancréatique (5) ; extrait de levure (2) ; glucose (1) ; agar (15). Le pH a été ajusté à 7 ± 0,02. Le milieu a été autoclavé à 120°C pendant 20 min.

En parallèle, une solution de lait écrémé à 10% a été préparée et autoclavée à 120°C pendant 10 min. 100 ml de la solution de lait écrémé ont été ajoutés aseptiquement au milieu de culture.

Après incubation à 28°C pendant 48 heures, 2 ml de HCl (0,1 mol/l) sont ajoutés à la surface des boîtes de Petri. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Kumar *et al.*, 2012).

5.1.6. Uréase

Selon Christensen (1946), la révélation de l'uréase bactérienne est réalisée par la méthode des disques d'agar sur un milieu à pH de 6,8 préparé comme suit : Ajouter (en g) à 950 ml d'eau distillée : Peptone (1) ; Glucose (1) ; NaCl (5) ; Na₂HPO₄ (1.2) ; KH₂PO₄ (0.8) ; Rouge de phénol (0.012); Agar (15). Après autoclavage, ajouter 50 ml d'une solution stérile d'urée (40%) et versez le milieu dans des boîtes de Petri. Les isolats ayant produit de l'uréase montrent un halo rose autour de leurs colonies.

5.1.7. Chitinase

Le milieu de culture suivant est utilisé, il est composé de (en g/l) : chitine colloïdale (0.8 à 0.6) ; K₂HPO₄ (2.7) ; KH₂PO₄ (0.3) ; MgSO₄·7H₂O (0.7) ; NaCl (0.5) ; KCl (0.5) ; Extrait de levure (0.13) ; Agar (15). Le milieu estensemencé par la méthode des disques. Incuber à 28°C durant 7 jours minimum. L'activité chitinasique se manifeste par l'apparition d'un halo transparent autour de ces disques (Hsu et Lockwood, 1975 ; Kopečný *et al.*, 1996).

- **Préparation de la chitine colloïdale**

5g de chitine est suspendu dans 40 ml d' HCl concentré (37%). La solution est laissée sous agitation pendant 50 minutes jusqu'à dissolution (apparition d'une couleur brune). Par la suite, 200 ml d'eau distillée à 5-10°C ont été ajoutés à la chitine acidifiée qui sera précipitée sous forme de suspension colloïdale.

La suspension a été recueillie par filtration à l'aide d'une aspiration sur un papier filtre grossier, puis lavée en la suspendant dans environ 5 litres d'eau du robinet et en la filtrant à nouveau. Le lavage a été répété au moins trois fois ou jusqu'à ce que le pH de la suspension soit d'environ 3,5.

Pour l'utilisation, une quantité d'eau suffisante a été ajoutée pour remettre la chitine en suspension, et la suspension a été mélangée à grande vitesse pendant environ 10 minutes. Les gâteaux de filtration ont été autoclavés et peuvent être conservés indéfiniment à température ambiante. (Hsu et Lockwood, 1975 ; Satria et *al.*, 2021).

5.2. Caractères PGPR

Les isolats ayant obtenus les meilleurs scores lors des tests des activités enzymatiques ont été testés pour sélectionner les souches les plus performantes.

5.2.1. Fixation d'azote :

Les isolats bactériens ont été ensemencés par stries sur milieu de culture « Burk's N-free » exempt d'azote contenant en g/l : glucose (10) ; NaCl (30) ; KH_2PO_4 (0,4) ; K_2HPO_4 (0,5) ; Na_2SO_4 (0,05) ; CaCl_2 (0,2) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005) ; Na_2MoO_4 (0,003) ; agar (15). Le développement de colonies bactériennes témoigne de la capacité de la souche à fixer l'azote atmosphérique.

5.2.2. Solubilisation des phosphates :

La capacité des isolats bactériens à solubiliser le phosphate inorganique tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a été testée sur le milieu modifié de Pikovskaya. Etant donné que les agents solubilisateurs produits par les bactéries peuvent avoir une diffusion limitée dans le milieu gélosé, ce test a été réalisé sur le même milieu liquide et solide (Pikovskaya, 1948).

5.2.2.1. Sur milieu solide

Les isolats bactériens ont été incubés à 28°C pendant 7 jours sur le milieu modifié de Pikovskaya (PVK) contenant en g/l : glucose (10) ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5) ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1) ; KCl (0,2) ; extrait de levure (0,5) ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,002) ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,002) ; NaCl (50) et agar (15). L'activité phosphatase se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Sharma et *al.*, 2011).

5.2.2.2. Sur milieu liquide

5ml du milieu liquide Pikovskaya (pH = 7) sont inoculé par 300 μl de chaque suspension bactérienne. Après incubation sous agitation (250 rpm) pendant une semaine à 28°C. Après incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 5000 rpm / 30 min. Le surnageant

est récupéré pour la mesure du pH. La solubilisation du phosphate se traduit par l'abaissement du pH du milieu (Sharma et *al.*, 2013).

5.2.3. Production d'acide indole 3-acétique (AIA)

La mise en évidence de la capacité de chaque isolat à produire l'AIA a été déterminée par la méthode colorimétrique de Salkowski (Bric et *al.*, 1991). Chaque isolat bactérien est ensemencé dans le bouillon de culture HM modifié contenant 1mg.ml^{-1} et 5% de glucose, puis incubé sous agitation (100 rpm) à 28°C pendant 3 jours. Après incubation, 5 ml de chaque culture est centrifugé. 2 ml du surnageant est additionné de 2 ml du réactif de Salkowski (2% de FeCl_3 0,5M dans HClO_4 à 35%) est incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 25 min. la densité optique est mesurée à 530 nm. La concentration en AIA a été déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage de l'AIA.

5.2.4. Production d'ammoniac (NH_3)

Les isolats bactériens ont été ensemencés dans des tubes contenant 5 ml d'eau peptonée (peptone 20g/l et NaCl 30g/l) puis incubés à 28°C pendant 48h. Après incubation, 0,25 ml du réactif de Nessler est rajouté à chaque tube et l'apparition d'une couleur brune à jaune indique la production d'ammoniac.

5.2.5. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production d'HCN est déterminée en suivant la méthode de Lorck (1948). Les bactéries sont ensemencées en strie sur de la gélose nutritive additionnée de glycine à raison de 4,4 g/l. Un disque stérile de papier Whatman est déposé sur le couvercle de la boîte de Pétri imprégné d'une solution de picrate de sodium (2% de carbonate de sodium anhydre dans 5% d'acide picrique). La boîte de Pétri est scellée avec du Parafilm et incubée à 28°C pendant 96h. Le virage de couleur à l'orange ou marron indique la production de HCN.

Partie II : Identification des souches bactériennes sélectionnées

1. Caractères morphologiques

Les trois souches bactériennes sélectionnées ont fait l'objet d'une observation macroscopique (couleur, forme, taille, contours, viscosité ...etc.) des colonies, et microscopique (état frais et leur Gram) pour une identification préliminaire.

2. Caractères physiologiques

Pour déterminer l'effet des paramètres physiologiques sur le développement des trois souches bactériennes sélectionnées, les tests ont été réalisés sur milieu HM liquide. Après 24h d'incubation, la croissance bactérienne est estimée par spectrophotométrie en mesurant la D.O à 600 nm. Les tests ont été réalisés en triplicata.

2.1. Détermination de l'effet du pH

Le pH influence la croissance bactérienne, car chaque espèce a une plage de pH optimale pour son développement. Afin de déterminer l'effet du pH sur chacune des bactéries sélectionnées, le milieu HM liquide est préparé dans une gamme de pH allant de 4 à 10 (4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 ; 9 ; 9,5 ; 10) par addition de KOH 0,5 N.

2.2. Détermination de l'effet de la température

Les températures optimales de croissance définissent les conditions idéales pour le métabolisme bactérien. L'effet de la température sur les trois bactéries a été déterminé en utilisant le milieu HM liquide (pH = 7) inoculé et incubé à différentes températures dans une gamme allant de 4 à 40°C (4 ; 20 ; 25 ; 28 ; 30 ; 32 ; 35 ; 37 ; 40).

2.3. Détermination de l'effet de la salinité

L'effet de la salinité sur la croissance des souches bactériennes a été déterminé sur milieu HM liquide (pH = 7) en variant les concentrations en NaCl dans une gamme de concentration allant de 0 à 3 M (0 ; 0,5 ; 0,85 ; 1,2 ; 1,55 ; 1,9 ; 2,25 ; 3) M.

3. Caractères biochimiques

3.1. Recherche de la catalase :

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

3.2. Le test de l'oxydase :

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

4. Identification moléculaire

L'identification moléculaire des trois souches bactériennes sélectionnées a été réalisée au centre d'écologie, évolution et changements environnementaux (CE3C) de la faculté des sciences de l'université de Lisbonne, Portugal. Ces souches ont été identifiées sur la base de leurs fragments d'ADN codant pour les séquences d'ARN 16S.

4.1. L'extraction d'ADN total (boiling lysis) :

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

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

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

- l'amorce sens (356F) : (5'-ACWCCTACGGGWGGCWGC -3')
- l'amorce antisens (1064R) : (5'-AYCTCACGRCACGAGCTGAC -3')

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

- 2,5 µL tampon de la réaction PCR
- 2,5 µL MgCl₂
- 0,2 µL désoxynucléoside triphosphate (dNTPs)
- 0,3 µL de chaque amorce
- 0,2 µL de Taq ADN polymérase
- 1,0 µL de l'ADN total.

Le programme de PCR consiste en :

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes
- 35 cycles composés chacun de 3 étapes :
 - Dénaturation à 95°C pendant 15 secondes
 - Hybridation (annelage) à 55°C pendant 15 secondes
 - Élongation à 72°C pendant 15 secondes
- Élongation finale à 72°C pendant 3 minutes

La Taq ADN polymérase possède une activité terminal-transférase qui permet l'ajout d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur T100 PCR thermocycler (BIO-RAD). La réaction PCR nécessite un témoin positif (ADN d'une souche de collection de référence amplifiée selon le même protocole) et un témoin négatif (réactifs sans ADN) pour contrôler la spécificité et l'efficacité de l'amplification.

4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

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

4.4. Séquençage

Les produits de PCR purifiés ont été séquencés dans une direction sur StabVida (Caprica, Portugal) en utilisant les amorces précédemment citées.

Un séquençage enzymatique des fragments d'ADN amplifiés est réalisé selon la méthode de Sanger. Les fragments d'ADN amplifiés ont été préalablement purifiés par un traitement enzymatique (exonucléase I et Shrimp phosphatase alcaline SAP) dégradant les amorces et les dNTP restants. Par la suite, les échantillons ont été à nouveau amplifiés et marqués en utilisant un kit de marquage « Big Dye Terminator Cycle Sequencing » (Applied Biosystems).

Le milieu réactionnel est composé de :

- La Taq polymérase ;
- Des dNTP ;
- Des ddNTP marqués par un composé fluorescent « Dye » ;
- Une amorce reverse fraîchement préparée à une concentration de 25 µM ;
- Un tampon de dilution (200mM Tris pH9, 5mM MgCl₂) et de l'eau ultra-pure.

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

Partie III : Activité antifongique des souches bactériennes sélectionnées

1. Les souches fongiques

L'activité antifongique des trois souches bactériennes sélectionnées a été testée à l'encontre de cinq champignons : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea* fournis par le laboratoire de Microbiologie Appliquée-Université A. Mira de Bejaïa. Et *Penicillium glabrum*, *Fusarium culmorum* fournis par le laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), ENS Kouba, Alger.

2. Tests *in-vitro*

2.1. Inhibition directe de la croissance mycélienne (test de confrontation directe)

La méthode par confrontation directe sur gélose (Fokkema, 1978 ; Sagahón et *al.*, 2011) a été utilisée. Un disque d'un jeune mycélium (de 5 jours) de chaque champignon est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar)(Annexe 1). 3 disques d'une culture jeune de la souche bactérienne sont déposés à 2,5 cm du champignon. Des boîtes avec des disques de gélose stérile ont servies de témoins. L'expérience est réalisée en triplicata.

Après 7 jours d'incubation à 25°C, le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante (Korsten et *al.*, 1995 ; Lee and Hwang, 2002) :

$$\text{PGI}\% = (\text{KR}-\text{R1}) / \text{KR} \times 100$$

Où :

KR : le diamètre moyen entre le point de dépôt du champignon et la marge de la colonie contenue dans témoin (mm).

R1 : est le diamètre moyen entre le point de dépôt du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de Pétri traitée (mm).

2.2. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne par production de substances volatiles

Le test d'inhibition de la croissance mycélienne par production de substances volatiles a été réalisé suivant le protocole décrit par Dennis et Webster (1971).

Une boîte de Pétri contenant le milieu HM estensemencé par stries serrés avec l'antagoniste bactérien. Une autre boîte de Pétri contenant le milieu PDA est inoculé avec un disque de 5mm de diamètre d'un jeune mycélium (de 5 jours) du champignon pathogène (*A. niger*, *A. flavus*, *P. glabrum* ou *F. culmorum*). Le bas des deux boîtes de Pétri contenant les milieux de cultureensemencés sont mis face à face et scellés avec du Parafilm. Des boîtes de Pétri inoculées avec le pathogène fongique sans bactéries sont utilisées comme témoin. L'incubation est réalisée à 25°C/7jours. L'expérience est réalisée en duplicata.

La lecture des résultats consiste à mesurer la croissance radiale du champignon. Le diamètre de la croissance mycélienne du champignon test dans le traitement par rapport à celui du témoin permet le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) selon la formule suivante :

$$\text{PGI}\% = [(a-b)/a]*100$$

Où :

a : diamètre moyen du mycélium dans la boîte témoin (cm).

b : diamètre moyen du mycélium dans les boîtes traitées avec les bactéries (cm).

2.3. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne (test de confrontation indirecte)

Ce test a été réalisé vis-à-vis d'*A. niger*. Les filtrats de bactéries ont été préparés par la méthode modifiée de Li et *al.* (2010). Les souches bactériennes ont étéensemencées sur gélose HM à 28°C pendant 24h puis repiquées dans le même milieu liquide. Trois catégories de cultures ont été préparées. La première pure, contenant les souches bactériennes seules. La deuxième mixtes, où des disques du pathogène (*A. niger*) ont été rajoutés au milieu de culture. Dans la troisième, les souches bactériennes ont été cultivées dans un milieu de culture HM exempt de glucose.

Après incubation sous agitation (100 tours/min) à 28°C pendant 72h, ces milieux trois ont été centrifugés à 6000 rpm pendant 30 min, et le surnageant est filtré à travers une membrane multi pore stérile de 0,22 µm.

Des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA sontensemencées par stries serrés avec la suspension sporale du phytopathogène, puis des disques de papier stériles imbibés du filtrat sont déposés aseptiquement pour tester l'activité antifongique. Des disques stériles imbibés du milieu HM stérile ont servis de témoins. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 2 jours. Ce test est réalisé suivant la méthode modifiée d'Aghighi *et al.* (2004) et Mahdieh *et al.* (2016).

Les filtrats ayant donné des résultats positifs (zone d'inhibition) ont été utilisés pour identification des molécules antifongiques par HPLC.

2.4. Caractérisation des métabolites bactériens antifongiques

Les filtrats obtenus ont été lyophilisés à 40°C et 200 KPa. (Jorjandi *et al.*, 2009). Le résidu obtenu est dissous dans 50 ml de méthanol puis ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le mélange obtenu est centrifugé (1535 x g) pendant 20 min puis complété à 100 ml avec une solution méthanol-eau (50 :50 v/v) suivant la méthode modifiée de Kim *et al.* (2002) et N'Guessan *et al.* (2011).

Une colonne Hypersil BDS-C18 en phase inversée (250×4,6 mm, 5 µm) a été utilisée pour les séparations chromatographiques.

La phase mobile est composée d'acide acétique à 0,2 % / acétonitrile (ACN) en gradient, en commençant par 95% d'acide acétique 0.2% et en terminant par 100% de ACN. Le débit était de 1,5 ml min⁻¹ pendant 30 min.

Le volume d'injection des SPC (standard polyphenols compounds) était de 20 µl, tandis que celui des échantillons et de ses solutions étalons était de 10 µl.

La température de la colonne a été maintenue à 30 °C. Les longueurs d'onde de détection UV étaient de 230-255-280-300 et 355nm, conformément aux résultats du balayage UV (Zhao *et al.*, 2017).

Les molécules antifongiques produites par les souches bactériennes ont été identifiées par RP-HPLC en faisant correspondre leur temps de rétention à celui de l'étalon correspondant. La quantification des composés a été déterminée en comparant leur surface à celle de l'étalon correspondant de concentration connue.

Les standards utilisés dans cette étude étaient : Acide gallique, Hydroxyquinone, Résorcinol, Catéchine, 1,2-Dihydroxybenzène (catéchol), Acide syringique, Naringénine 7-glucoside, Acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque, Acide m-anisique, Hespéridine

3. Tests *in-vivo* : Essai biologique sur fruits (pommes)

Les trois souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance fongique de deux champignons phytopathogènes (*Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger*).

Ce test est réalisé selon le protocole modifié de Xiao et Kim (2008) :

- Des pommes fraîches de la variété « Golden Delicious » approximativement de même taille et au même niveau de maturité, ont été stérilisées à l'eau de Javel (2%) pendant 2 min, puis rincées trois fois à l'eau distillée stérile.
- Quatre blessures (3 mm de largeur x 3 mm de profondeur) ont été faites dans la zone équatoriale de chaque fruit. Chaque puits est inoculé par 30 µl de l'antagoniste bactérien (10^8 UFC/ml pour chaque souche testée) et de 30 µl d'eau distillée stérile pour le témoin (Lu et al., 2013).
- Après 2 heures à température ambiante, 15 µl de la suspension sporale du pathogène (2×10^4 spores/ml pour *Botrytis cinerea*, et 10^5 spores/ml pour *Aspergillus niger*) ont été rajoutés.
- Les fruits ont été incubés à 25°C à 90 à 95 % d'humidité relative pendant 6 jours (Huang et al., 2021). L'expérience a été menée en triplicata avec 6 fruits à chaque répétition.
- Les blessures sont évaluées quotidiennement. La sévérité de la maladie a été calculée par l'incidence et la taille des lésions autour des plaies. Les diamètres des plaies ont été mesurés au 3^{ème} et 6^{ème} jours après l'inoculation (Zihao et al., 2023 ; Kilani-Feki et al., 2016).

- Incidence (%) = (nombre de blessures infectées/nombre de blessures total)*100
- Sévérité (%) = (Dt/Dc)*100

Où :

Dt : diamètre moyen de la zone infectée du test (mm).

Dc : diamètre moyen de la zone infectée dans le contrôle (mm).

Partie IV : Effet des souches sélectionnées sur la croissance du blé sous stress salin

1. Préparation de cultures bactériennes

Les bactéries sélectionnées ont été cultivées dans le milieu HM à 28°C pendant 18 heures. Les suspensions bactériennes ont été centrifugées (6000 rpm/10min) et le surnageant a été jeté. Les cellules ont été lavées 3 fois avec 20ml d'une solution saline stérile tamponnée au phosphate (PBS, pH 7.2) (annexe 1) puis suspendues dans du PBS stérile et ajustées à 10⁸ UFC/ml. Des suspensions bactériennes pures et mixtes ont été préparées.

2. Stérilisation des graines de blé

Dans cette expérimentation nous avons utilisé des graines de blé dur (*Triticum durum*) variété Simeto fournies par la Coopérative des Céréales et des Légumes Secs de Tizi-Ouzou (CCLS).

Les graines ont été stérilisées selon la méthode d'Orhan (2016) :

- Les graines sont trempées dans de l'éthanol (70% pendant 1 min) avec une douce agitation.
- Les graines sont remises dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 3% pendant 30 minutes.
- Pour se débarrasser du chlore, cinq lavages successifs à l'eau distillée stérile sont enfin appliqués (15 minutes au minimum).

3. Bactérisation des graines de blé

Les graines de blé stériles sont trempées dans les suspensions bactériennes des trois souches sélectionnées soit seuls ou en association deux par deux ou les trois ensembles pendant 1 heure sous agitation douce à température ambiante. Des graines stériles trempées dans du PBS stérile ont servi de témoins (Bensidhoum et *al.*, 2016).

Les graines de blé ont été réparties en huit groupes :

- Graines A : Non inoculées « témoin » ;
- Graines B : inoculées par la souche SB6 ;
- Graines C : inoculées par la souche CH11 ;
- Graines D : inoculées par la souche SB39 ;
- Graines E : inoculées par l'association SB6-CH11 ;
- Graines F : inoculées par l'association SB6-SB39 ;
- Graines G : inoculées par l'association CH11-SB39 ;
- Graines H : inoculées par l'association SB6- CH11-SB39.

4. Effet des souches bactériennes sur la germination des graines de blé

Des graines inoculées avec les trois isolats bactériens SB6, CH11 et SB39 ont été déposées dans des boîtes de Pétri contenant trois cercles de papier Whatman n° 1 (90 mm de diamètre), imbibés de 5 ml d'eau distillée stérile ou de solutions de NaCl stériles de différentes concentrations (0, 125 et 200 mM). 10 graines de blé ont été déposées dans chaque boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à l'obscurité à 22°C pendant 6 jours. Des graines non inoculées ont servi de témoin. L'expérience a été menée en triplicata (méthode modifiée de Fowler, 1991).

Le suivi de la germination est effectué en dénombrant les graines germées dans chaque boîte. Une graine est considérée comme germée quand l'embryon atteint une longueur de 3 mm au minimum. A la fin de l'expérience, le pourcentage final de germination dans chaque boîte est calculé comme suit :

$$\text{Nombre de graines germées} / \text{Nombre de graines totales} \times 100$$

5. Effet des souches bactériennes sur la stimulation de la croissance du blé

Mise en culture du blé : les graines de blé préalablement stérilisées et inoculées sont semées dans des pots en plastique remplis avec du sol stérilisé ou non stérilisé, à raison de trois graines par pot.

Les pots ont été partagés en lots (9 pots par lot) et chaque lot a été irrigué avec le même volume de solutions salines de concentrations différentes (125, 150 et 200 mM de NaCl) le 1^{er} jour et le 8^{ème} jour. Les autres arrosages ont été faits avec le même volume d'eau de robinet stérile ou non (10 ml/pot) afin d'éviter la déshydratation.

L'expérimentation a été menée dans des conditions semi-contrôlées avec des températures de 20/25°C nocturnes/diurnes et une photopériode de 16/8 heures lumière/obscurité pendant deux semaines. Un plan de randomisation des blocs a été réalisé.

6. Évaluation des facteurs de croissance des plantes sous stress salin

6.1. Paramètres morphologiques

Après 14 jours de croissance, les semis ont été récoltés soigneusement, puis débarrassés du sol accroché à leurs racines.

La croissance des plantes a été observée. Ainsi, les propriétés morphologiques des plantules ont été mesurées dans les différentes conditions expérimentales de croissance : la hauteur de la partie aérienne, la longueur des racines, les poids frais et sec de la partie aérienne et des racines des plantules. Le poids frais a été mesuré juste après la récolte des semis. En revanche, le poids sec est obtenu après séchage dans un four chaud à 45°C jusqu'à stabilisation du poids.

6.2. Paramètres biochimiques

6.2.1. Dosage de la chlorophylle

La teneur en pigments photosynthétiques est déterminée selon la méthode modifiée d'Arnon (1949). Pour cela, 0,1 g de matière fraîche végétale est découpé et broyé en présence de 10 ml d'acétone 80%. Le mélange est incubé à 65°C pendant 15 min. puis, centrifugé à 3000 tpm/10 min.

Après centrifugation, la DO est lue à 663 et 645nm. Les teneurs en chlorophylles a, b et totale et caroténoïdes sont déterminées suivant les équations établies par Arnon (1949) et revues par Lichtenthaler (1987) :

- $\text{Chl a } (\mu\text{g/ ml}) = (12.7 \times \text{D.O } 663) - (2.69 \times \text{D.O } 645).$
- $\text{Chl b } (\mu\text{g/ ml}) = (22.9 \times \text{D.O } 645) - (4.68 \times \text{D.O } 663).$
- $\text{Chl totale } (\mu\text{g/ ml}) = (20.2 \times \text{D.O } 645) + (8.02 \times \text{D.O } 663).$

6.2.2. Dosage des sucres solubles totaux

Le dosage des sucres solubles est réalisé selon la méthode de Dubois et *al.*, (1956) : 100 mg de feuilles fraîches découpées en morceaux dans des tubes à essai, auxquels sont ajoutés 3ml d'éthanol à 80% pour l'extraction des sucres. Le mélange est laissé à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 heures.

Les tubes sont ensuite placés dans l'étuve à 80°C pour faire évaporer l'éthanol. On ajoute à l'extrait obtenu après évaporation dans chaque tube 20 ml d'eau distillée (solution à analyser). On prélève 2 ml de solution à analyser (de l'échantillon), dans des tubes en verre puis on ajoute 1 ml de phénol à 5%, et 5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré à 96 %. On obtient une solution jaune orange à la surface, on passe au vortex pour homogénéiser la solution. On laisse les tubes pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante et on les place ensuite au bain-marie durant 10 à 20 min à une température de 30°C.

L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les concentrations sont déterminées à partir d'une courbe étalon.

6.2.3. Dosage de la proline

Le dosage de la proline est réalisé selon la méthode modifiée de Troll et Lindsley (1955).

2 ml de méthanol à 40% sont ajoutés à 100 mg de matière fraîche végétale finement hachée dans des tubes à essai. Le mélange est chauffé à 85°C dans un bain-Marie pendant 1 heure. (Les tubes sont hermétiquement fermés pendant le chauffage pour éviter la volatilisation de l'alcool.) Après refroidissement, on prélève 1ml d'extrait auquel sont ajoutés 1 ml d'acide acétique et 1 ml du réactif de ninhydrine (annexe I).

Après homogénéisation, chauffer le mélange au bain-marie à 100 °C pendant 30 minutes. Puis placer dans de la glace pour arrêter la réaction.

Extraire le mélange réactionnel avec 5 ml de toluène et bien agiter avec un vortex. Ensuite, laisser reposer pour permettre la séparation des deux phases (la phase supérieure contenant la proline).

La phase supérieure est récupérée est déshydratée par l'ajout d'une spatule de Sulfate de Sodium Na₂SO₄ anhydre (pour éliminer l'eau qu'elle contient). On détermine la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 520 nm.

7. Analyse statistiques

Les analyses de variance (ANOVA) ont été effectuées à l'aide du Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS V.26, USA). Le test de Tukey est utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre les traitements au niveau de signification de 5 % ($p = 0,05$).

Résultats & discussion

Partie I : Isolement et sélection des bactéries ayant des caractères promoteurs de la croissance des plantes

1. Caractères physico-chimiques des sols étudiés

Les résultats des analyses physico-chimiques réalisées sur les échantillons de sols prélevés sur les deux sites, Sebkhet Bazer et Chott El Hodna, sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Paramètres physico-chimiques des sols étudiés.

	pH	C _E (mS/cm)	Humidité (%)	Mat. Org (%)
SB	7,94	7,19	19,94	1,10
CH	8,41	6,07	22,57	1,31

SB: Sebkhet Bazer; CH: Chott El Hodna

La conductivité électrique est une mesure de la capacité d'un sol à conduire l'électricité, ce qui est directement lié à la concentration d'ions dissous (sels) dans le sol. Ainsi, la conductivité électrique est considérée comme un indicateur clé de la salinité, plus un échantillon est salé plus sa conductivité est élevée. Un échantillon est dit salin lorsque sa conductivité électrique est supérieure à 4mS/cm. Selon Rogers et *al.* (2006), Un sol est considéré comme modérément salin lorsque sa conductivité électrique se situe entre 4 et 8 mS/cm. Les mesures de conductivité électrique des sols des deux sites d'échantillonnages indiquent donc que ce sont des sols modérément salés.

La salinité du sol influence la communauté bactérienne. Des niveaux élevés de salinité peuvent être toxiques pour de nombreuses bactéries, réduisant ainsi la diversité microbienne et favorisant des espèces halophiles spécifiques (Sall et *al.*, 2015).

Dans une étude menée par Basile-Doelsch (2022), les sols ont été classés selon leurs pH comme suit : sols acides ($\text{pH} < 6,5$), sols neutres ($6,5 < \text{pH} < 7,5$) et sols alcalins ($\text{pH} > 7,5$). Les valeurs de pH des deux sites de prélèvement (Sebkhet Bazer et Chott El Hodna) sont de 7,94 et 8,41 respectivement. Ce qui indique donc, que les sols de nos sites sont légèrement alcalins. Ce pH peut favoriser certaines espèces bactériennes tout en inhibant d'autres. En général, un pH neutre à légèrement acide est optimal pour la diversité bactérienne. Un pH trop élevé peut réduire la disponibilité de nutriments essentiels, affectant ainsi la croissance bactérienne et la composition des communautés microbiennes (Terrat et *al.*, 2018).

D'autre part, les résultats indiquent également que les deux sols étudiés sont modérément humides et présentent une faible teneur en matière organique ($< 2\%$), ce qui est caractéristique des sols salins (Roussel et *al.*, 2001). Ceci montre la relation étroite entre ces deux paramètres. En effet, la matière organique a une forte capacité de rétention d'eau, permettant d'augmenter la réserve utile du sol. Etant donné que les deux sols ont un taux de matière organique assez faible, cela se traduit par une mauvaise rétention en eau. De plus, cette faible teneur en matière organique, peut partiellement expliquer les pH élevés observés dans ces sols. En effet, lors de sa dégradation, la matière organique libère en effet des acides qui contribuent à acidifier le milieu (Mohammadi et *al.*, 2011).

Ainsi, les paramètres physicochimiques du sol influencent directement la communauté bactérienne. Un pH adéquat, une conductivité électrique modérée, un taux d'humidité optimal et un taux de matière organique élevé sont essentiels pour maintenir une diversité bactérienne saine et fonctionnelle. Des déséquilibres dans ces paramètres peuvent entraîner une diminution de la biodiversité microbienne, affectant ainsi les processus écologiques et la fertilité du sol.

2. Isolement des bactéries

À partir des différents échantillons de sol prélevés, 70 isolats bactériens ont été différenciés à l'observation macroscopique.

3. Recherche de propriétés d'intérêt agricoles

Les 70 isolats bactériens ont fait l'objet de plusieurs tests afin de sélectionner des rhizobactéries ayant la capacité de promouvoir la croissance des plantes.

3.1. Production d'enzymes lytique extracellulaires

Les enzymes lytiques produites par les bactéries telluriques jouent un rôle crucial dans l'écosystème du sol, en particulier dans la protection des plantes contre les pathogènes et l'amélioration de la disponibilité des nutriments (Gowdar et *al.*, 2018).

Les 70 isolats bactériens ont été testés pour leur capacité à produire des enzymes lytiques extracellulaires. Les résultats ont montré que :

- 21,45% étaient capables de produire des uréases ;
- 25,74% étaient capables de produire des amylases ;
- 28,6% étaient capables de produire des estérases ;
- 31,46% des isolats étaient capables de produire des lipases ;
- 42,9% étaient capables de produire des cellulases ;
- 47,19% étaient capables de produire des protéases ;
- 51,48% étaient capables de produire des chitinases.

Ces résultats indiquent que la majorité des isolats bactériens testés possédaient la capacité de sécréter au moins une des enzymes lytiques évaluées. La production de chitinases et de cellulases était particulièrement répandue parmi les isolats, suggérant leur potentiel pour inhiber la croissance de champignons pathogènes en dégradant leurs parois cellulaires. Les résultats sont présentés dans l'annexe II.

Le test préliminaire des activités enzymatiques a permis la sélection de six souches bactériennes nommées (SB6, CH11, CH12, SB29, SB39, CH42). Les résultats sont représentés dans le tableau 4. L'aspect des boîtes après incubation est représenté sur la figure 10.

Tableau 4 : Résultats des tests des activités enzymatiques des isolats bactériens.

	SB6	CH11	CH12	SB29	SB39	CH42
Cellulase	+	+	++	-	+	+
Amylase	+++	-	-	-	+++	-
Lipase	-	++	-	++	-	+
Estérase	-	++	-	++	+	+
Protease	+++	+++	+++	+++	+++	-
Urease	-	-	+	-	++	++
Chitinase	+++	+++	+++	+++	++	++

+++ : activité élevée ; ++ : activité moyenne ; + : activité faible ; - : pas d'activité.

+++ : $\varnothing > 20$ mm; ++: $10 < \varnothing \leq 20$ mm; +: $\varnothing \leq 10$ mm.

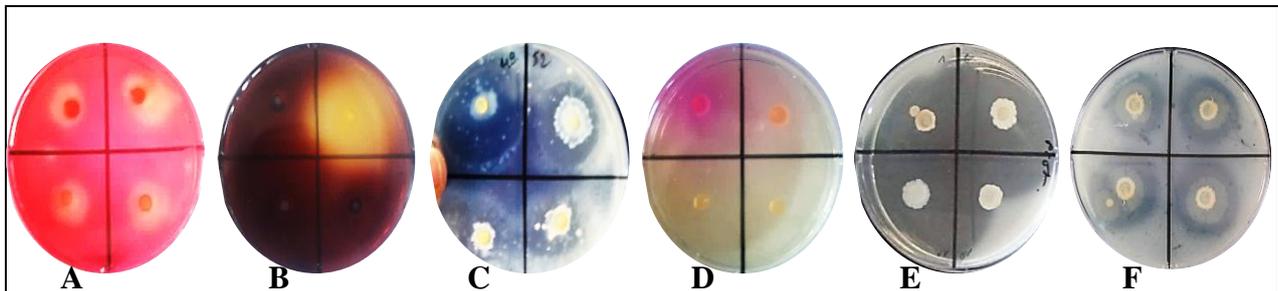


Figure 10 : Aspect des résultats positifs des activités enzymatiques testées.

A : Cellulase ; B : Amylase ; C : Lipase ; D : Uréase ; E : Protéase ; F : Chitinase.

Les PGPR sont reconnus pour leur capacité à produire diverses enzymes hydrolytiques qui favorisent la croissance des plantes et leur résistance aux pathogènes. Les souches isolées produisent activement plusieurs enzymes telles que la cellulase, l'amylase, la lipase, l'estérase, l'uréase, la protéase et la chitinase. . L'action de ces enzymes microbiennes intervient dans la physicochimie du sol en améliorant la disponibilité des éléments essentiels à la croissance des plantes (Egamberdieva et *al.*, 2010b ; Rai et *al.*, 2016).

Les enzymes comme la cellulase, l'amylase et la protéase interviennent dans la dégradation des composés organiques complexes du sol. à savoir la cellulose, l'amidon et les protéines, en molécules plus simples assimilables par les racines des plantes. Ainsi, la cellulase hydrolyse la cellulose en glucose, tandis que l'amylase dégrade l'amidon en maltose et glucose, fournissant ainsi des sources énergétiques facilement absorbables. La protéase, quant à elle, libère des acides aminés à partir des protéines, augmentant la disponibilité de l'azote organique (Khalil et *al.*, 2022).

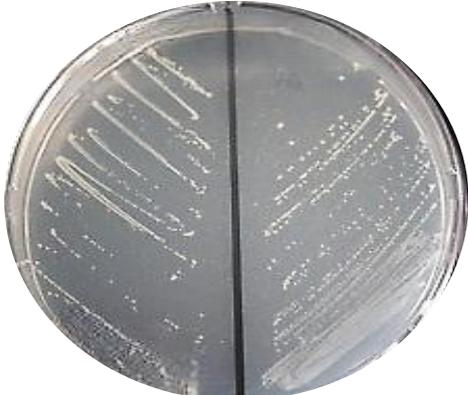
D'autres enzymes comme la lipase et l'estérase contribuent à la dégradation des lipides et esters organiques, améliorant la libération de composés nutritifs et la structure du sol. Tandis que l'uréase facilite la conversion de l'urée en ammonium, une forme d'azote directement utilisable par les plantes. Par ailleurs, la chitinase joue un rôle important en dégradant la chitine des parois cellulaires des champignons phytopathogènes, renforçant ainsi la résistance des plantes aux infections (Egamberdieva et *al.*, 2010b).

L'action synergique de ces enzymes microbiennes modifie les propriétés physicochimiques du sol, notamment en augmentant la disponibilité des éléments essentiels tels que le carbone, l'azote et les phosphates (Khalil et *al.*, 2022). Cette amélioration de la fertilité du sol favorise une meilleure croissance racinaire et une absorption accrue des nutriments, ce qui est particulièrement bénéfique en conditions de stress salin étudié dans nos travaux.

3.2. Fixation d'azote

Les six isolats bactériens sélectionnés ont été testés pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. Après 48 h d'incubation, toutes les bactéries (100 %) se sont développées sur gélose exempt d'azote « Burk's N-free », ce qui indique que ces bactéries sont capables de fixer l'azote. Les résultats du test et l'aspect des boîtes après incubation sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats de fixation d'azote par les six isolats testés

Isolats	Résultats	Aspect
SB6	+	
CH11	+	
CH12	+	
SB29	++	
SB39	++	
CH42	++	

+++ : $\varnothing > 20$ mm; ++ : $10 < \varnothing \leq 20$ mm; + ; $\varnothing \leq 10$ mm

Malgré l'abondance de l'azote dans l'atmosphère (78 %), il est sous une forme moléculaire (N_2) qui est inutilisable par les plantes. Pour être assimilé, l'azote doit être converti en formes réactives, comme l'ammoniac (NH_3), d'où le rôle des bactéries fixatrices d'azote (Verma et *al.*, 2019).

Etant donné que l'azote est un élément essentiel pour la croissance et le développement des plantes, les six isolats sélectionnés présentent donc un fort potentiel pour être utilisés comme biofertilisants. Leur capacité à améliorer la disponibilité de l'azote pourrait ainsi contribuer de manière significative à la nutrition azotée des plantes et à l'optimisation de leur croissance.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Reang et *al.* (2022) dans une étude sur les Caractéristiques favorisant la croissance des plantes des bactéries halophiles et halotolérantes isolées des régions côtières du Saurashtra Gujarat en Inde. Par contre, dans une autre étude sur l'atténuation du stress salin par des bactéries halotolérantes et halophiles favorisant la croissance des plantes de blé (*Triticum aestivum*) menée par Orhan (2016) seulement 28% des bactéries isolées étaient capables de fixer l'azote atmosphérique.

3.3. Solubilisation du phosphate

3.3.1. Sur milieu solide

La capacité des six isolats bactériens à solubiliser le phosphate inorganique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a été mise en évidence sur milieu solide par l'apparition de zones claires autour des colonies (tableau 6).

Tableau 6 : Résultats de solubilisation du phosphate par les six isolats testés.

Isolats	Résultats	Aspect
SB6	++	
CH11	++	
CH12	-	
SB29	+	
SB39	-	
CH42	-	

+ : $\varnothing \leq 10$ mm ; ++ : $10 < \varnothing \leq 20$ mm ; +++ : $\varnothing > 20$ mm

La variation des diamètres des zones claires autour des colonies indique une différence de performance entre les souches testées. Les isolats SB6 et CH11 ont montré un diamètre atteignant 20 mm, tandis que l'isolat SB29 a présenté une activité inférieure. Des résultats similaires ont été rapportés par Bensidhoum et *al.* (2016).

3.3.2. Sur milieu liquide

Certaines bactéries solubilisatrices de phosphate qui ne montrent pas de capacité à solubiliser le phosphate sur milieu solide, peuvent le faire sur milieu liquide. Cette capacité est mise en évidence par l'abaissement du pH du milieu liquide. Ceci est dû à la production d'acides organiques comme l'acide gluconique, oxalique, succinique, malique, etc., dans la rhizosphère par ces bactéries. Cette acidification du milieu favorise la solubilisation des phosphates insolubles, rendant le phosphore plus disponible pour les plantes (Rodriguez et *al.*, 2007 ; Asuming-Brempong et *al.*, 2014).

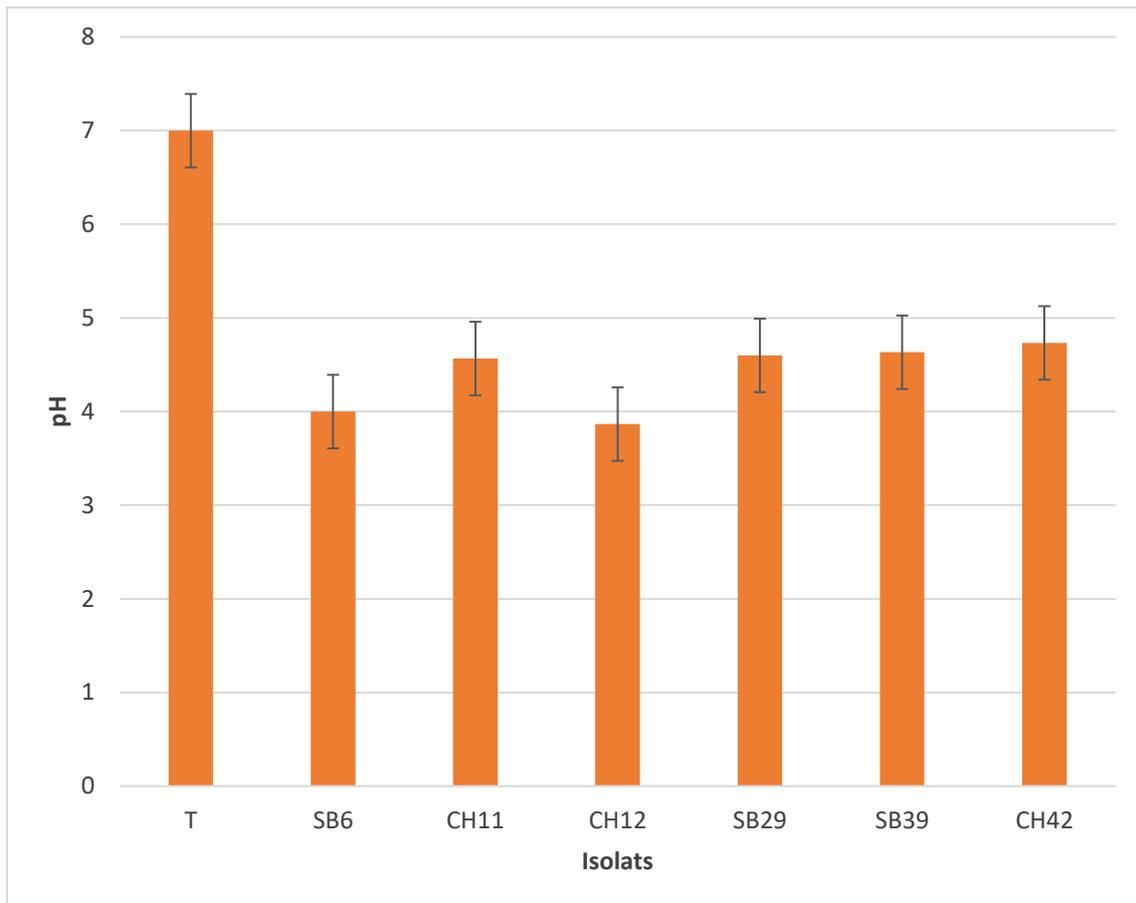


Figure 11 : Valeurs des pH des milieux PVK ensemencés par les isolats sélectionnés.

Les résultats obtenus indiquent une diminution significative du pH dans tous les milieux (voir figure 11). Ainsi, les isolats CH12, SB39 et CH42, qui ont affiché un résultat négatif en milieu solide, démontrent néanmoins une capacité à solubiliser le phosphate en milieu liquide. Cela s'explique principalement par le fait qu'en milieu liquide, les acides organiques produits par ces bactéries peuvent se diffuser plus librement, facilitant ainsi la solubilisation du phosphate. En revanche, la diffusion est limitée en milieu solide, ce qui peut réduire l'efficacité de la solubilisation (Nautiyal, 1999).

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs chercheurs. Bensidhoum et *al.* (2016) ont constaté que 66,67 % des isolats présentaient un résultat positif en milieu solide, contre 100 % en milieu liquide. De même, Zennouhi et *al.* (2018) ont observé que seulement 27,5 % des isolats ont donné un résultat positif en milieu solide, tandis que 100 % l'ont fait en milieu liquide. Ce contraste met en évidence l'importance du choix du milieu de culture pour évaluer la capacité de solubilisation du phosphate des bactéries.

3.4. Production d'acide indole acétique

La détection de la production d'acide indole-3-acétique (AIA) s'est effectuée sur milieu HM enrichi en tryptophane. Parmi les six isolats étudiés, seuls deux ont démontré leur capacité à produire de l'AIA, avec des concentrations de 12,98 µg/ml pour l'isolat SB39 et de 3,05 µg/ml pour l'isolat CH42. Il convient de noter que les isolats SB6 et SB29 ont également montré un résultat positif, mais à des niveaux négligeables (figure 12).

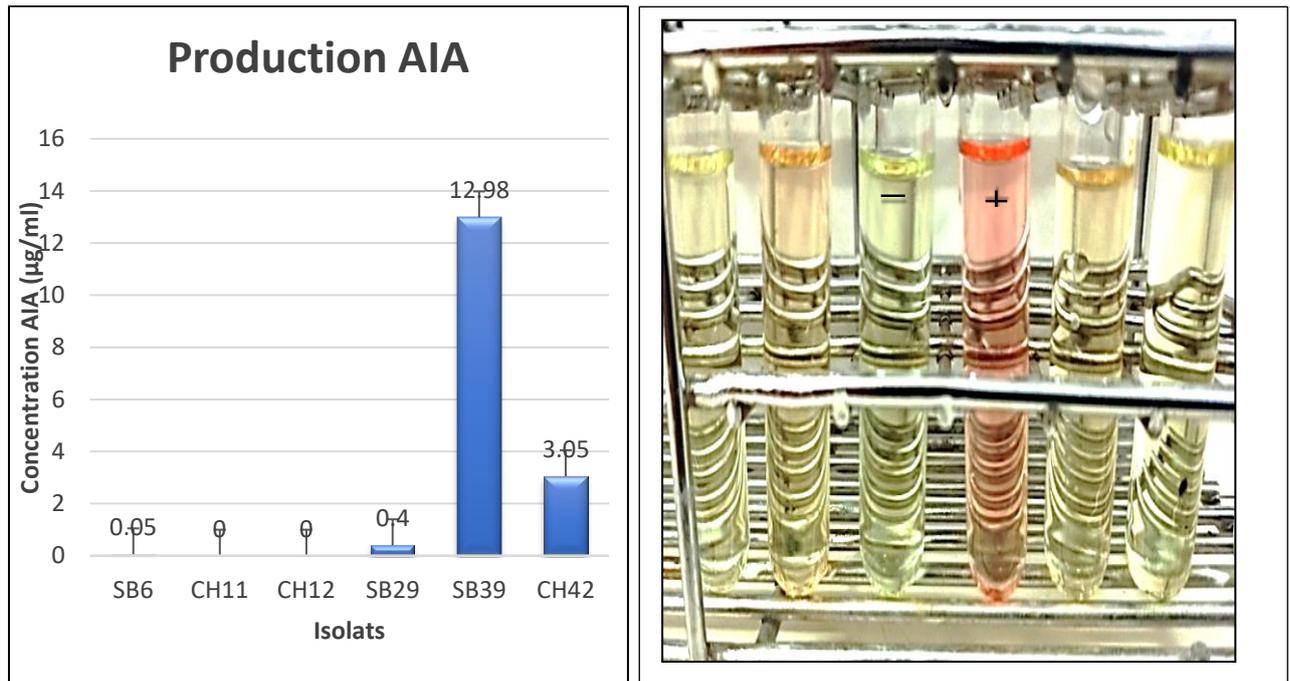


Figure 12 : Production d'AIA par les six isolats.

Dans notre étude, la production d'auxine la plus élevée était de 12,98 µg/ml. Ce résultat est supérieur à celui obtenu par Bensidhoum et *al.* (2016) qui était de 4 µg/ml et Tabli et *al.* (2017) qui était de 5,09 µg/ml, mais inférieur à celui rapporté par Chamkhi et *al.* (2023) où la production la plus élevée était de 125,3 µg/mL. Par ailleurs, Egamberdieva et *al.* (2010a) ont rapportés des résultats similaires avec une production de 12 µg/ml par une souche de *Pseudomonas trivalis*.

Les phytohormones comme l'AIA sont des régulateurs naturels de la croissance des plantes qui influencent les processus physiologiques à de faibles concentrations (Beneduzi & Passaglia, 2011). La réponse des plantes à l'AIA libéré par les microorganismes peut varier des effets bénéfiques aux effets néfastes, selon la concentration d'AIA présente dans les racines. En effet, de faibles concentrations d'AIA peuvent stimuler la croissance, tandis que de fortes

concentrations peuvent inhiber le développement des racines. Les niveaux d'AIA libérés par les bactéries de la rhizosphère dépendent de la croissance bactérienne, de l'activité métabolique et de l'expression des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse de l'AIA (Lambrecht et *al.*, 2000).

Ces différences soulignent l'importance des conditions expérimentales et des souches bactériennes utilisées dans la production d'auxine.

3.5. Production d'ammoniac

La recherche de la capacité à produire l'ammoniac, s'est révélé positive pour les six isolats. Ainsi, après l'ajout du réactif de Nessler, un virage de couleur est apparu dans les six tubes. Ceci, indique que tous les isolats bactériens sont capables de produire de l'ammoniac. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Tableau 7 : Résultats de production d'ammoniac (NH_3) par les six isolats testés.

Isolats	Résultats	Aspect
SB6	++	
CH11	++	
CH12	++	
SB29	++	
SB39	+++	
CH42	++	

+ : jaune (production faible) ; ++ : jaune-orange (production moyenne) ; +++ : orange (production importante).

Ces résultats mettent en évidence le rôle crucial de ces isolats dans les écosystèmes agricoles. La production d'ammoniac est considérée comme une caractéristique importante des Rhizobactéries améliorant indirectement la croissance des plantes (Joseph et *al.*, 2007). Il est bien établi que l'ammoniac libéré par les bactéries accélère l'activité de la glutamine synthétase catalysant l'assimilation initiale de NH_4^+ en glutamine (Sood et *al.*, 2002). Leur

aptitude à enrichir le sol en azote et à favoriser la croissance des plantes justifie leur utilisation en tant qu'inoculants pour les semences, dans le but d'optimiser le développement des cultures. Des résultats similaires ont été rapportés par Pandey et Sharma (2020) et Khalil *et al.* (2022).

3.6. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

Le changement de couleur du papier Whatman imprégné de la solution de picrate de sodium révèle la production de HCN. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8. Les isolats bactériens sont classés selon l'intensité de la coloration.

Tableau 8 : Résultats de production du cyanure d'hydrogène (HCN) par les six isolats testés.

Isolats	Résultats	Aspect
SB6	+	
CH11	-	
CH12	-	
SB29	-	
SB39	+++	
CH42	-	

- : jaune (pas de production) ; + : orange claire (production faible) ; ++ : rouge-orange (production moyenne) ; +++ : marron production importante)

Ces résultats indiquent que seules les isolats SB6 et SB39 sont capables de produire du cyanure d'hydrogène. Ainsi, nos résultats sont inférieurs à ceux de Khalil *et al.* (2022) et Lotfi *et al.* (2022) qui ont rapporté que toutes leurs souches étaient capables de produire du HCN.

Le cyanure d'hydrogène est un composé antimicrobien, de nature volatile, à large spectre impliqué dans la lutte biologique contre les maladies des racines (Ramette *et al.*, 2003). Ce composé est un des métabolites secondaires produits par les PGPR qui joue un rôle important dans le contrôle biologique des agents pathogènes (Lotfi *et al.*, 2022).

En résumé, un total de 70 souches de bactéries halotolérantes, isolées de sols salins, ont été testées pour leur capacité à produire des enzymes d'intérêt agricole. Les tests préliminaires des activités enzymatiques ont permis de sélectionner six souches bactériennes : SB6, CH11, CH12, SB29, SB39 et CH42. Toutes ces souches possèdent la capacité de fixer l'azote atmosphérique et de produire de l'ammoniac (NH₃). De plus, 50% d'entre elles peuvent solubiliser le phosphate inorganique dans un milieu gélosé, tandis que toutes sont capables de le faire dans un milieu liquide. Parmi les souches sélectionnées, 33,33 % produisent du cyanure d'hydrogène (HCN) et 66,67 % synthétisent de l'acide indole-3- acétique (AIA). Cependant, seules les souches SB39 et CH42 sont capables de produire des quantités intéressantes d'AIA, avec respectivement 12,98 µg/ml et 3,05 µg/ml.

A partir de ces résultats, trois souches bactériennes ayant obtenu les meilleurs scores (annexe II) ont été sélectionnées. Il s'agit des isolats : SB6, CH11 et SB39.

Partie II : Identification des souches bactériennes sélectionnées

Les trois souches précédemment sélectionnée (SB6, CH11 et SB39) ont fait l’objet de plusieurs tests d’identification.

1. Caractérisation morphologique

Le résultat de l’examen macroscopique des bactéries sélectionnées est illustré dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Caractères morphologiques des trois isolats sélectionnés.

Isolats	Forme	Contour	Taille (mm)	Elévation	Couleur	Surface	Opacité
SB6	ronde	régulier	2-3	bombée	crème	lisse brillante	opaque
CH11	ronde	régulier	1-2	bombée	crème	lisse brillante	opaque
SB39	ronde	régulier	4	bombée	beige foncé	lisse brillante	opaque

L’observation microscopique a révélé que les trois isolats sont des bacilles Gram négatif, pas ou peu mobiles (tableau 10)

Tableau 10 : Caractères microscopiques des trois isolats sélectionnés.

Isolats	Forme	Gram	mobilité
SB6	bacille	-	immobile
CH11	bacille	-	immobile
SB39	bacille	-	peu mobile

2. Caractérisation physiologique

Les résultats de l’effet du pH, de la température et de la salinité sur la croissance bactérienne des trois isolats sélectionnés est illustré dans les figures 13, 14 et 15.

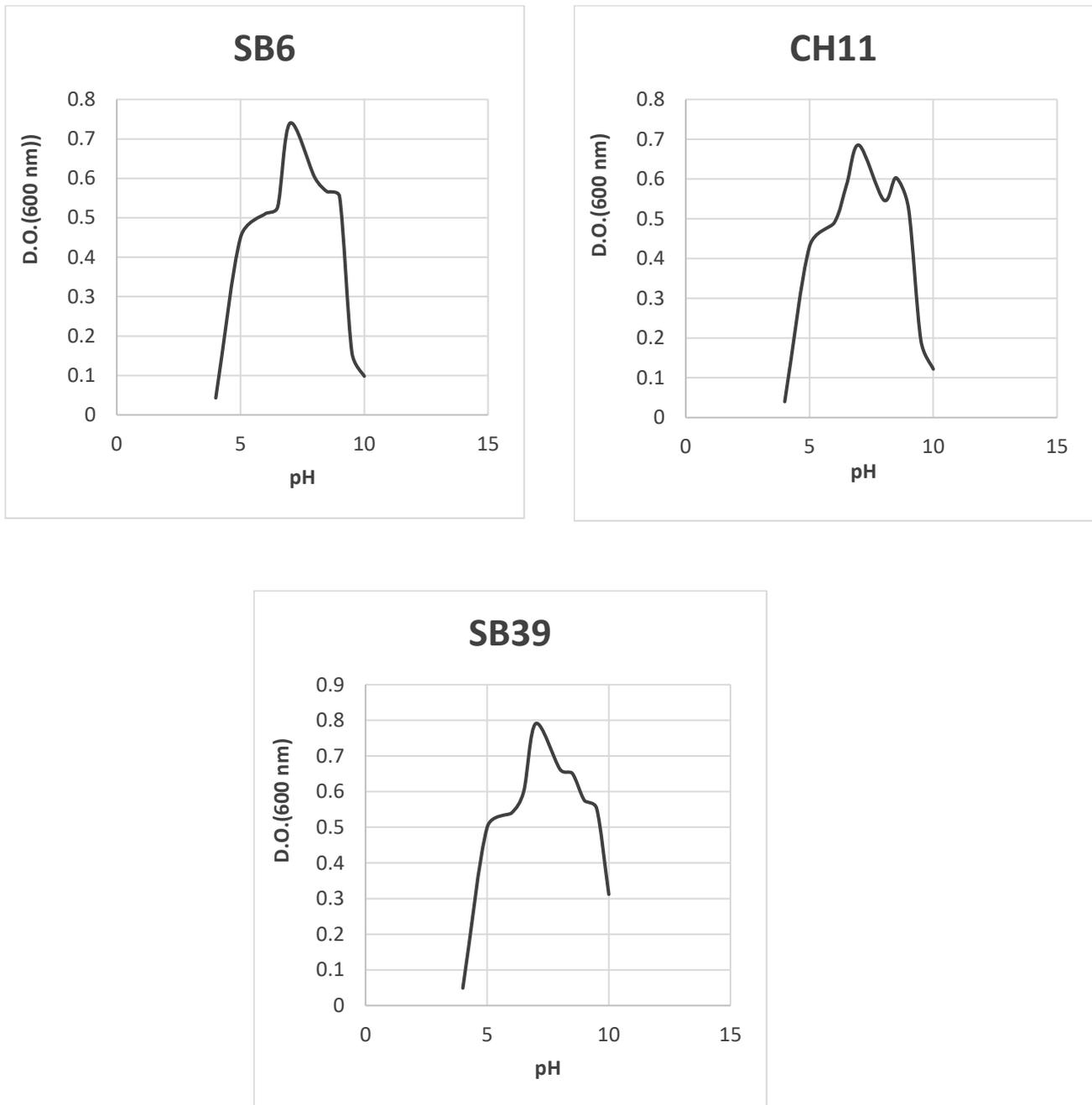


Figure 13 : Effet du pH sur la croissance des bactéries.

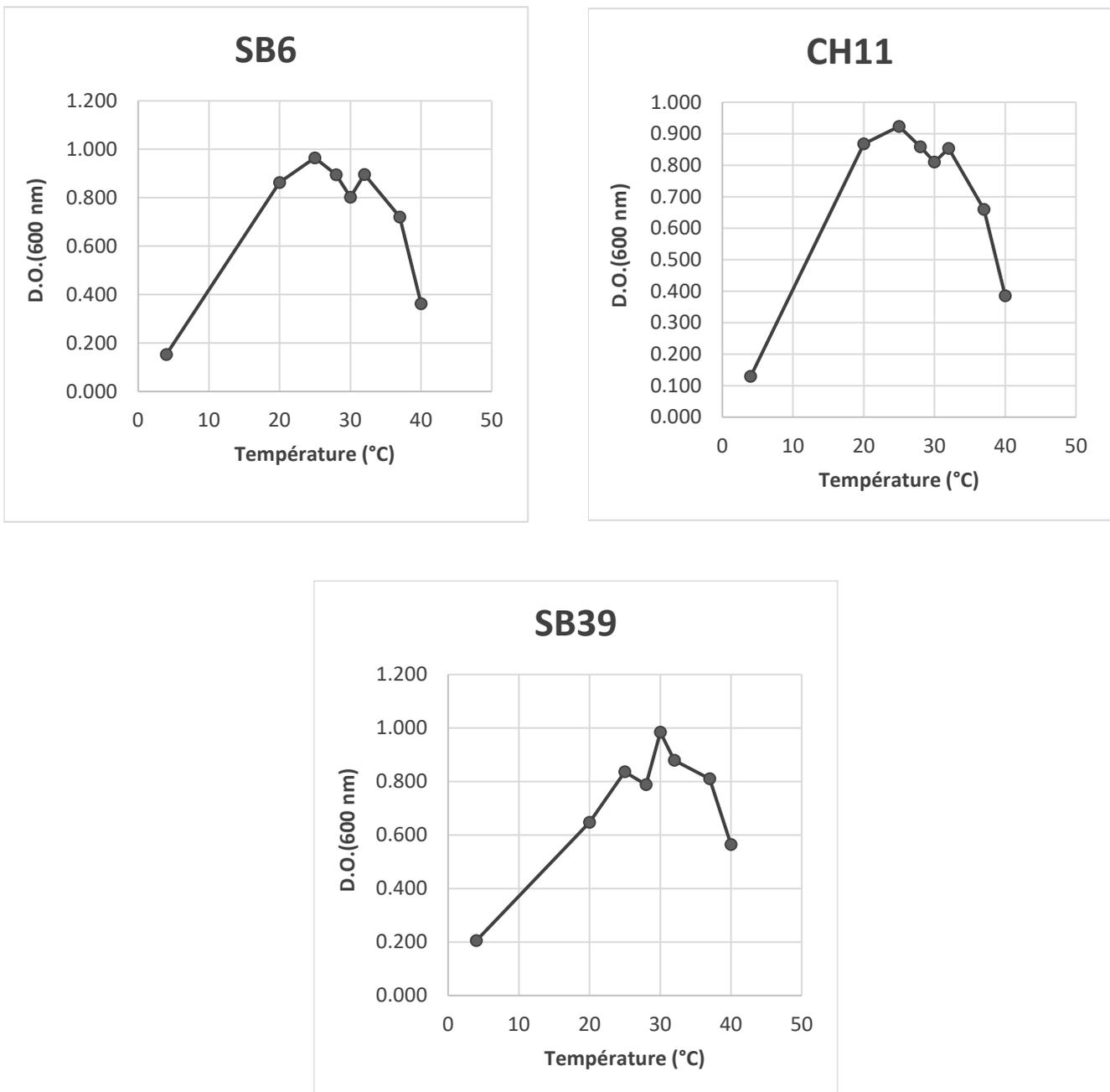


Figure 14 : Effet de la température sur la croissance des bactéries.

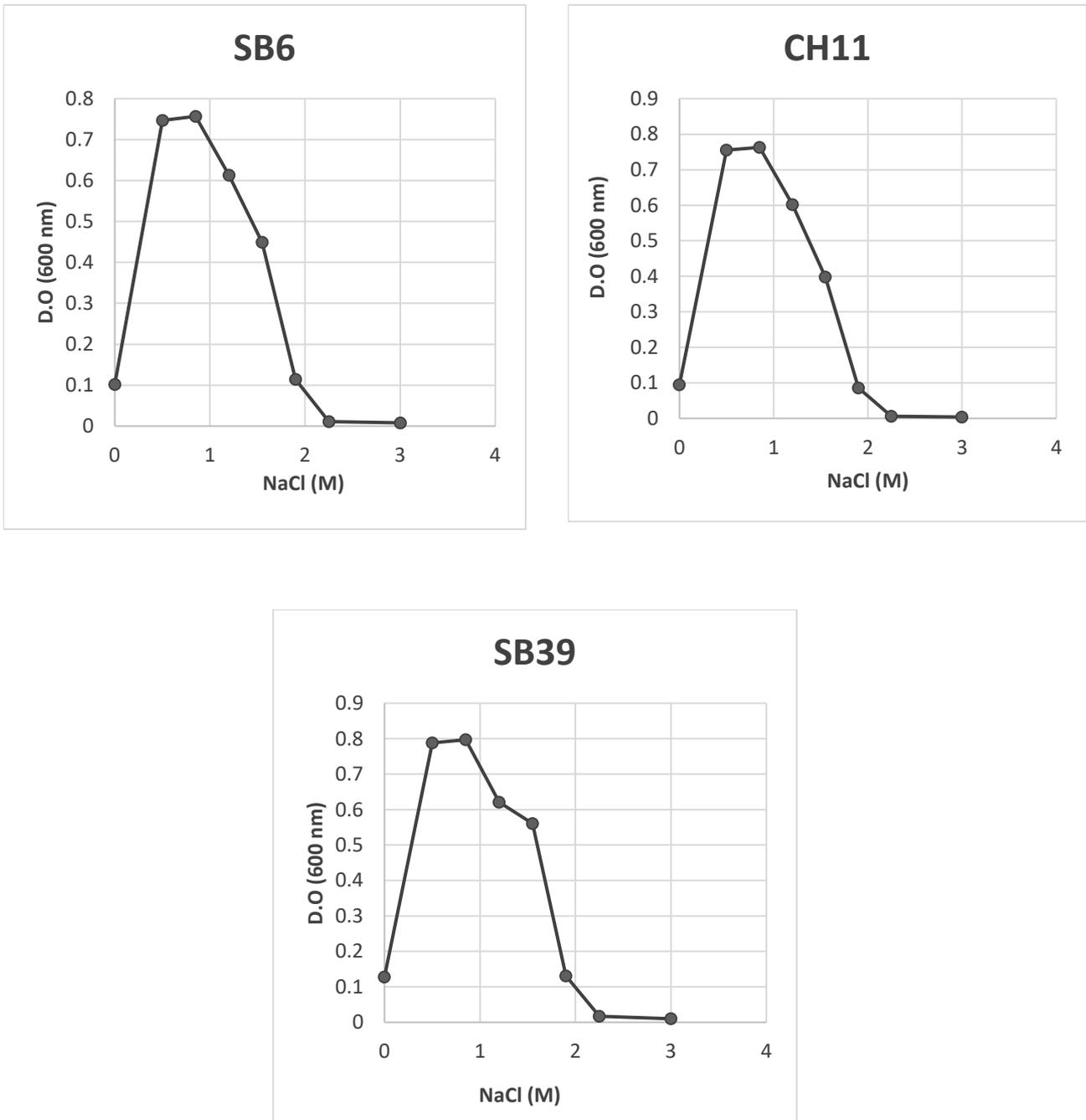


Figure 15 : Effet de la concentration en NaCl sur la croissance bactérienne.

Les résultats de l'effet du pH sur la croissance des bactéries SB6, CH11 et SB39 ont révélé qu'elles pouvaient croître sur une gamme de pH allant de 5 à 10, avec un optimum de croissance à pH 7 (figure 13). Nous constatons également une meilleure croissance à des valeurs de $\text{pH} \geq 7$. Ceci est sans doute dû au fait que ces bactéries aient été prélevées de sol légèrement alcalins.

La croissance des trois souches bactériennes s'étale sur une gamme de température assez large (4 - 40°C). La température optimale de croissance est de 25 °C pour les souches SB6 et CH11, quant à la souche SB39, elle est de 30°C. Ainsi, ces bactéries sont considérées comme mésophiles (figure 14).

Concernant l'étude de l'effet de la salinité, les résultats révèlent que les trois souches SB6 et CH11 et SB39 peuvent se développer sur une gamme de concentration en NaCl qui va de 0 M à 1,9 M, ce qui fait de ces bactéries des halotolérantes. Par ailleurs, nous avons enregistré un optimum de croissance à 0,85 M pour les trois souches (figure 15). Ces résultats indiquent que ces bactéries peuvent avoir un potentiel pour améliorer la croissance des plantes sous stress salin.

3. Caractérisation biochimique

Les tests d'oxydase et de catalase aident à identifier les espèces bactériennes. Ces tests permettent de différencier les bactéries en fonction de leurs caractéristiques métaboliques. Le test d'oxydase permet de détecter la présence de l'enzyme oxydase, qui est impliquée dans le processus de respiration aérobie chez certaines bactéries. Quant au test de catalase, il permet de déterminer la capacité d'une bactérie à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. La catalase joue un rôle crucial dans la protection des cellules bactériennes contre le stress oxydatif en prévenant l'accumulation de peroxyde d'hydrogène, qui est un sous-produit toxique du métabolisme aérobie. Ce test aide à différencier les bactéries aérobies des anaérobies (Jha & Subramanian, 2013).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 11 : Résultats des tests de catalase et oxydase.

Isolats	Catalase	Oxydase
SB6	+	+
CH11	+	-
SB39	-	+

Ces résultats montrent que les souches SB6, CH11 et SB39 présentent des caractéristiques métaboliques distinctes.

3.1. Test d'oxydase

Les souches SB6 et SB39 ont donné un résultat positif à l'oxydase, ce qui indique qu'elles utilisent l'oxygène pour leur métabolisme, une caractéristique typique des bactéries aérobies. Cette capacité à réaliser des réactions d'oxydation est importante pour leur survie dans des environnements salins où l'oxygène est présent (Oren, 2002).

En revanche, la souche CH11 est oxydase négative. Cela signifie qu'elle ne peut pas utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons, mais elle peut néanmoins se développer en milieu aérobie grâce à des voies métaboliques alternatives, ce qui suggère un métabolisme anaérobie facultatif (Rajendran, 2015).

3.2. Test de catalase

Les souches SB6 et CH11 sont catalase positive. La présence de catalase indique que ces souches peuvent décomposer le peroxyde d'hydrogène, ce qui les protège contre les effets toxiques de ce composé. Ce qui prouve qu'elles ont une meilleure capacité à gérer le stress oxydatif (Habib et *al.*, 2016 ; Meinzer et *al.*, 2023).

Par contre la souche SB39 est catalase négative. Elle est donc sensible au peroxyde d'hydrogène, ce qui est atypique pour des bactéries aérobies. Cela pourrait indiquer une adaptation spécifique à son environnement, où elle pourrait compter sur d'autres mécanismes pour gérer le stress oxydatif (Giri & Varma, 2019).

4. Identification moléculaire

Les trois souches sélectionnées sont identifiées par séquençage de l'ADNr 16S. Après amplification par PCR et séquençage de gènes les résultats ont montré que les souches SB6 et CH11 sont étroitement apparentées à *Serratia sp* avec un taux de similitude de 98.84 % pour SB6, et de 98.98 % pour CH11. En revanche, la souche SB39 a donné 98.98 % de similitude avec la bactérie halophile *Halomonas sp*. Toujours est-il ces résultats n'ont permis qu'une attribution non ambiguë du genre.

Partie III : Activité antifongique des souches bactériennes sélectionnées

Les trois souches bactériennes ont été testées pour leur aptitude à inhiber la croissance de champignons phytopathogènes.

1. Tests *in-vitro*

1.1. Inhibition directe de la croissance mycélienne (test de confrontation direct)

La figure (16) représente les résultats de confrontation directe sur gélose des souches bactérienne sélectionnées vis-à-vis des quatre champignons phytopathogènes à savoir *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium glabrum*, *Fusarium culmorum* et *Botrytis cinerea*. Les résultats indiquent que la souche *Serratia sp* - CH11 possède la meilleure activité antifongique allant de 51.04% à 80.67%. Le meilleur taux d'inhibition enregistré pour la souche *Serratia sp* - SB6 est de 71.28% contre *A. niger*. Par contre l'isolat *Halomonas sp* - SB39 a enregistré un taux maximal de 57.44% contre *A. flavus*. Ces résultats montrent que les champignons ont été inhibés par les trois isolats SB6, CH11 et SB39 mais à des degrés différents (figure 17).

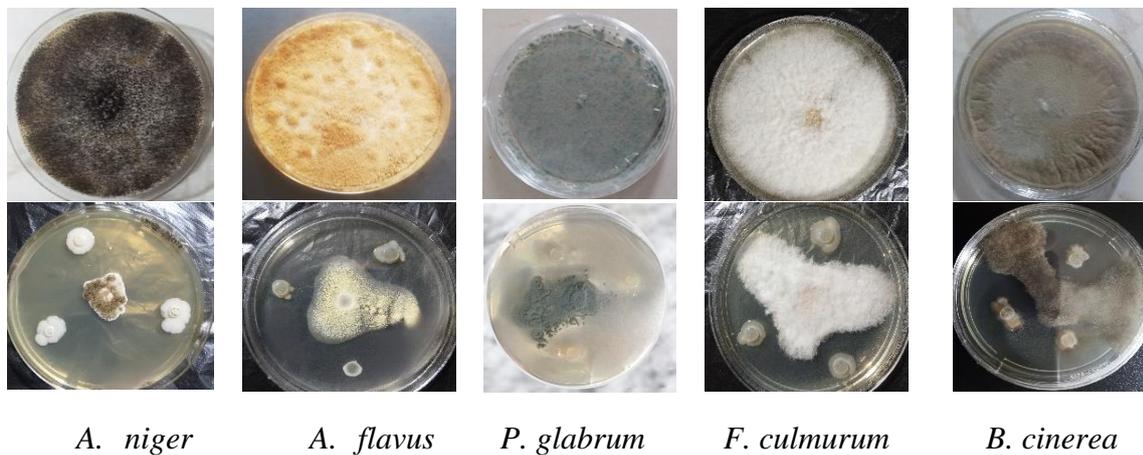


Figure 16 : Effet des isolats SB6, CH11 et SB39 sur la croissance mycélienne (Test de confrontation sur gélose).

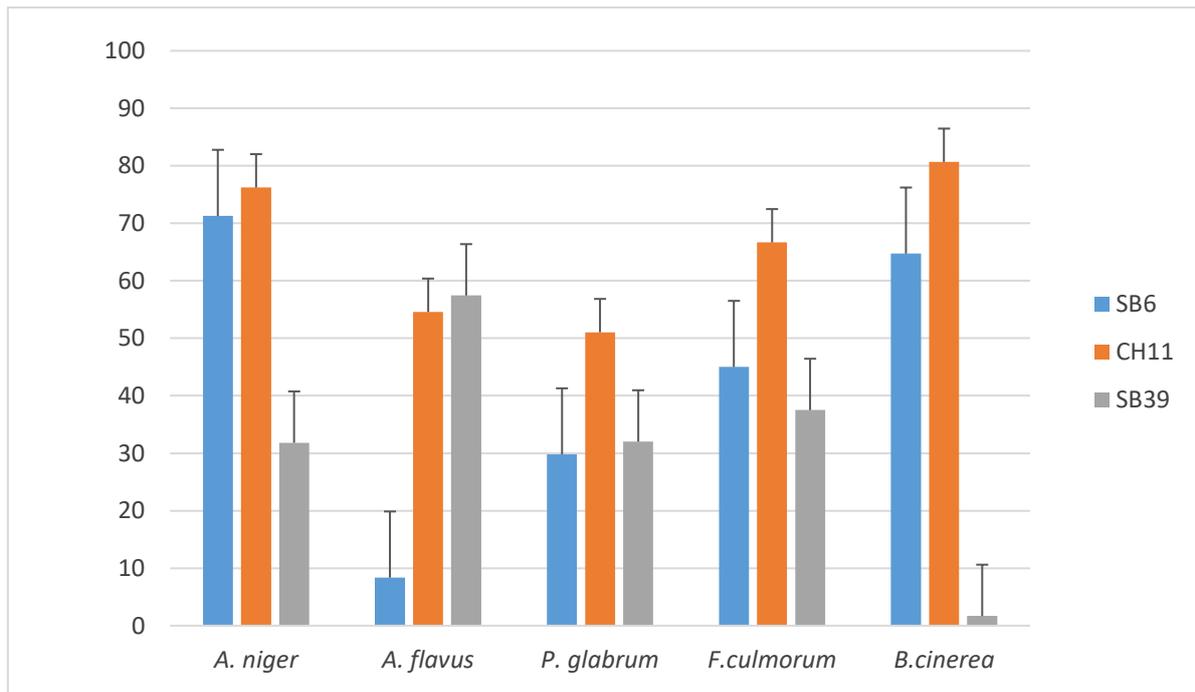


Figure 17 : Pourcentage d’inhibition de la croissance (PGI %) des champignons pathogènes par les bactéries sélectionnées (test de confrontation sur gélose).

Des résultats similaires ont été obtenus par Kamou et *al.* (2016), Tabli et *al.* (2017), Mukherjee et *al.* (2019), Sun et *al.* (2022), Cherif et *al.* (2022) et Alijani et *al.* (2023). Toutes ces études montrent que les bactéries appartenant aux genres *Halomonas* et *Serratia* présentent une activité antifongique faisant d’elles des agents potentiels de biocontrôle.

Selon plusieurs études, l’un des mécanismes d’action des bactéries du sol contre les phytopathogènes est lié à la production de biomolécules (HCN, NH₃) et d’enzymes lytiques telles les cellulase, protéases, chitinases. Ces enzymes jouent un rôle important en dégradant les parois cellulaires des champignons (Xun et *al.*, 2015 ; Fillinger et *al.*, 2016 ; Cherif et *al.*, 2022 ; Trejo-López et *al.*, 2022 ; Alijani et *al.*, 2022 et Reddy et *al.*, 2022). Les résultats que nous avons obtenus ont montré que nos trois souches avaient la capacité de produire du NH₃ et ces enzymes. Ceci pourrait expliquer leur activité antifongique.

1.2. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne par la production de substances volatiles

L'effet des substances volatiles produites par les bactéries sur la croissance mycélienne a été déterminé en calculant le pourcentage d'inhibition par rapport au témoin négatif. Les résultats indiquent que ces substances volatiles ont réduit la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes.

Pour *A. niger* et *P. glabrum* la réduction était de 71.29% et 72.22% respectivement pour *Halomonas*-SB39, de 56.93% et 63.33% pour *Serratia sp*-SB6 et de seulement 3.96% et 27.78% pour l'isolat *Serratia sp*-CH11. Concernant *F. culmorum* la réduction variait de 12.5% à 26.67% pour les trois isolats. En revanche, le meilleur pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été observé par la souche *Halomonas sp*-SB39 à l'encontre d'*A. flavus* avec 75,49% (figure 18).

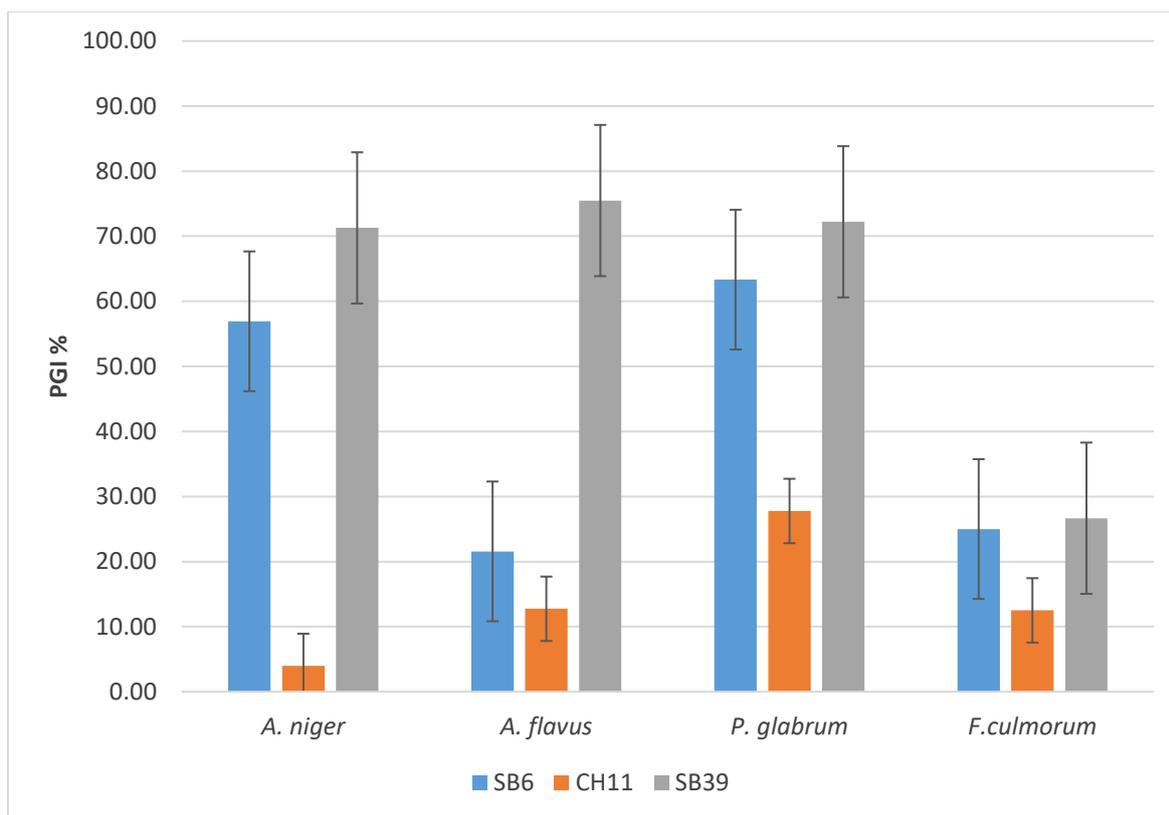


Figure 18 : Effet des substances volatiles produites par les trois souches bactériennes (SB6, CH11 et SB39) sur l'inhibition de la croissance mycélienne (PGI%).

La production de HCN par les PGPRs joue un rôle important dans la lutte biologique contre plusieurs champignons pathogènes du sol, comme l'a rapporté Azeem *al.* (2022). Et comme le montrent nos résultats (tableau 8) les souches *Serratia*-SB6 et *Halomonas*-SB39 produisent à des degrés différents le cyanure d'hydrogène qui inhibe la croissance des champignons. Le cyanure d'hydrogène (HCN) est reconnu pour ses propriétés antifongiques et a un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de divers champignons (Kaddes *et al.*, 2020 ; Gong *et al.*, 2020). Des quantités de l'ordre de quelques micromoles de cyanure inhibent fortement la cytochrome c-oxydase dans la chaîne respiratoire et de plusieurs autres métalloenzymes (Blumer et Haas, 2000). Par la synthèse de ce composé, les bactéries rhizosphériques induisent la résistance systémique des plantes aux différentes infections (Kumar *et al.*, 2012).

Par ailleurs, bien que la souche *Serratia sp*-CH11 ne produise pas de HCN, mais elle a été capable d'inhiber la croissance des quatre champignons dans une faible mesure, comparée aux deux autres souches où l'on observe le meilleur taux d'inhibition à 27,78% seulement à l'encontre de *P. glabrum*. Ceci est peut être dû à la production de composés organiques volatils antifongiques, autres que le HCN (Li *et al.*, 2020).

1.3. Inhibition indirecte de la croissance mycélienne (test de confrontation indirect)

Les résultats de l'effet des filtrats des cultures bactériennes ont montré la présence d'une activité antifongique vis-à-vis de *A. niger* pour l'isolat *Serratia sp*-CH11 dans les trois milieux (sans stress, sous stress biotique ou abiotique) ce qui indique que cet isolat produit des molécules antifongiques d'une manière constitutive. Par contre, pour l'isolat *Halomonas*-SB39 les résultats montrent qu'il y a production de molécules antifongiques seulement lorsque cette bactérie est soumise à un stress biotique (présence du champignon) ou abiotique (milieu exempt de glucose). Ceci indique qu'elle produit des molécules antifongiques de façon inductibles. En revanche, pour l'isolat *Serratia*-SB6, la zone d'inhibition est très négligeable (figure 19).

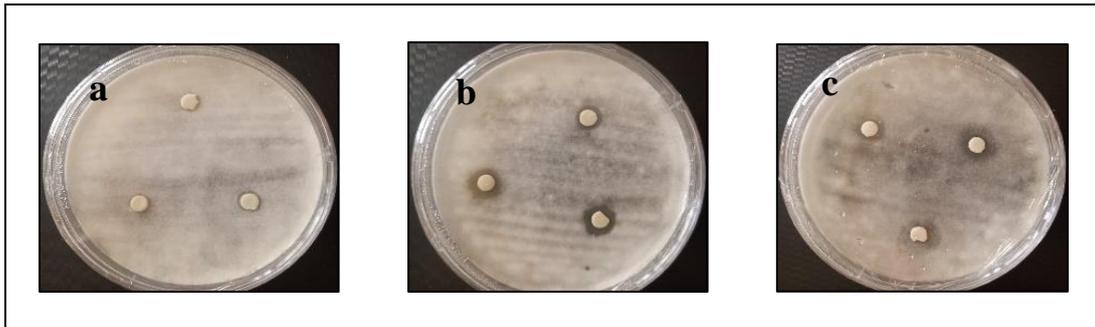


Figure 19 : Effet du filtrat des bouillons de culture sur la croissance mycélienne (a. SB6 ; b. CH11 ; c. SB39).

Des résultats similaires ont été rapportés par Tabli et *al.* (2016) qui a rapporté que l'activité antifongique n'a été mise en évidence que lorsque les souches *Pseudomonas* et *Serratia* aient été cultivées en présence de *A. niger*.

Par contre, pour la souche *Serratia sp*-CH11, les molécules antifongiques sont synthétisées d'une manière constitutive (en présence et en absence de stress). Cette caractéristique peut avoir des implications importantes pour la résistance aux infections fongiques, car une production constante d'antifongiques pourrait potentiellement conférer un avantage dans des environnements où les champignons pathogènes sont présents.

Une étude similaire menée par Alijani et *al.* (2022) a rapporté qu'une souche du genre *Serratia* testée pour son activité antifongique à l'encontre du champignon *Colletotrichum nympheae* produisait des molécules antifongiques d'une manière constitutive.

1.4. Caractérisation des métabolites bactériens antifongique

Les filtrats ayant donné des résultats positifs (zone d'inhibition) ont été utilisés pour l'identification des molécules antifongiques par HPLC.

Les molécules antifongiques produites par les bactéries SB6, CH11 et SB39 ont été identifiées par RP-HPLC en faisant correspondre leurs temps de rétention à celui de l'étalon correspondant. La quantification des composés a été déterminée en comparant leur surface à celle du standard correspondant de concentration connue.

L'analyse des filtrats des bouillons de cultures ayant montré une activité antifongique positive a permis l'identification de polyphénols produits par les isolats bactériens. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 12. Ainsi, les trois isolats bactériens produisent l'acide gallique, les catéchines et l'acide syringique. En présence du pathogène, la souche *Halomonas*

sp-SB39 est capable de produire l'acide gallique et l'acide syringique avec des concentrations qui dépassent les 20 mg/ml. Et c'est la seule qui produit l'hydroxyquinone.

Tableau 12 : Composés phénoliques identifiés dans le bouillon de culture filtré et leurs concentrations.

T(min)	Nom du composé	Filtrat du bouillon (mg/ml)					
		SB6 -	CH11 -	CH11 +	CH11 m.ap	SB39 +	SB39 m.ap
3,15 ± 0,05	Acide gallique	13,77	20,79	12,76	13,43	21,56	9,53
3,61 ± 0,00	Hydroxy quinone	-	-	-	-	6,31	-
5,47 ± 0,23	Résorcinol	2,24	2,82	2,29	2,88	5,38	-
6,10 ± 0,17	Catéchine	3,81	4,84	4,27	1,29	5,17	3,50
6,23 ± 0,41	1,2-hydroxy benzène	-	8,16	3,13	3,55	-	-
7,21 ± 0,05	Acide syringique	16,65	13,24	18,54	11,72	22,88	12,23
10,63 ± 0,00	Naringénine-7-glucoside	-	-	4,56	-	-	-
11,08 ± 0,00	Acide 3,4,5-triméthoxy benzoïque	2,51	-	-	-	-	-
11,36 ± 0,01	Acide m-anisique	-	1,82	1,01	2,39	-	-
15,07 ± 0,01	Hespéridine	9,69	1,91	-	-	-	-

(-) : en l'absence du phytopathogène ; (+) : en présence du phytopathogène ; (m.ap) : milieu de culture appauvri

Les résultats révèlent que nos trois souches bactériennes ont la capacité de produire des polyphénols. D'après Skorokhod & Kurdysh (2014), seuls les végétaux et certains micro-organismes sont capables de synthétiser les précurseurs de composés phénoliques. Par ailleurs, Livinska et al. (2016) ont étudié la production des polyphénols par quelques bactéries lactiques dans des milieux différents. Cette présente étude est la première à démontrer la capacité des bactéries des genres *Serratia* et *Halomonas* à produire des polyphénols. Des études ont rapporté que les endophytes peuvent produire des métabolites secondaires identiques ou similaires à ceux de leur hôte (Puri et al., 2005). Sachant que *Serratia* et *Halomonas* peuvent être des bactéries endophytes, ceci pourrait expliquer nos résultats.

Les composés phénoliques sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Ils jouent un rôle majeur dans la protection des plantes contre les stress biotiques et abiotiques. Ainsi, ils contribuent à la défense des plantes en neutralisant les radicaux libres, en inhibant la croissance de pathogènes, et en modulant les réponses au stress environnemental (Banerjee et al., 2012 ; Dziejzinski et al., 2020).

2. Tests *in-vivo*

Essai biologique sur des fruits (pommes)

Dans cette expérimentation, des fruits de pommes ont été inoculés avec des suspensions sporales des deux champignons pathogènes (*A. niger* ou *B. cinerea*) en présence et en absence de l'antagoniste bactérien des trois isolats. Le diamètre de la zone pourrie a été mesuré au 3^{ème} et 6^{ème} jour. Les résultats montrent que les fruits de pommes qui ont été inoculés avec les pathogènes (*A. niger* ou *B. cinerea*) en présence de l'antagoniste bactérien ont développé des zones d'infection beaucoup moins importantes par rapport aux fruits qui ont été infectés avec les pathogènes seuls (figure 20). Les antagonistes bactériens ont réduit la propagation de la pourriture due aux deux champignons à partir des lésions provoquées sur les fruits de pomme.

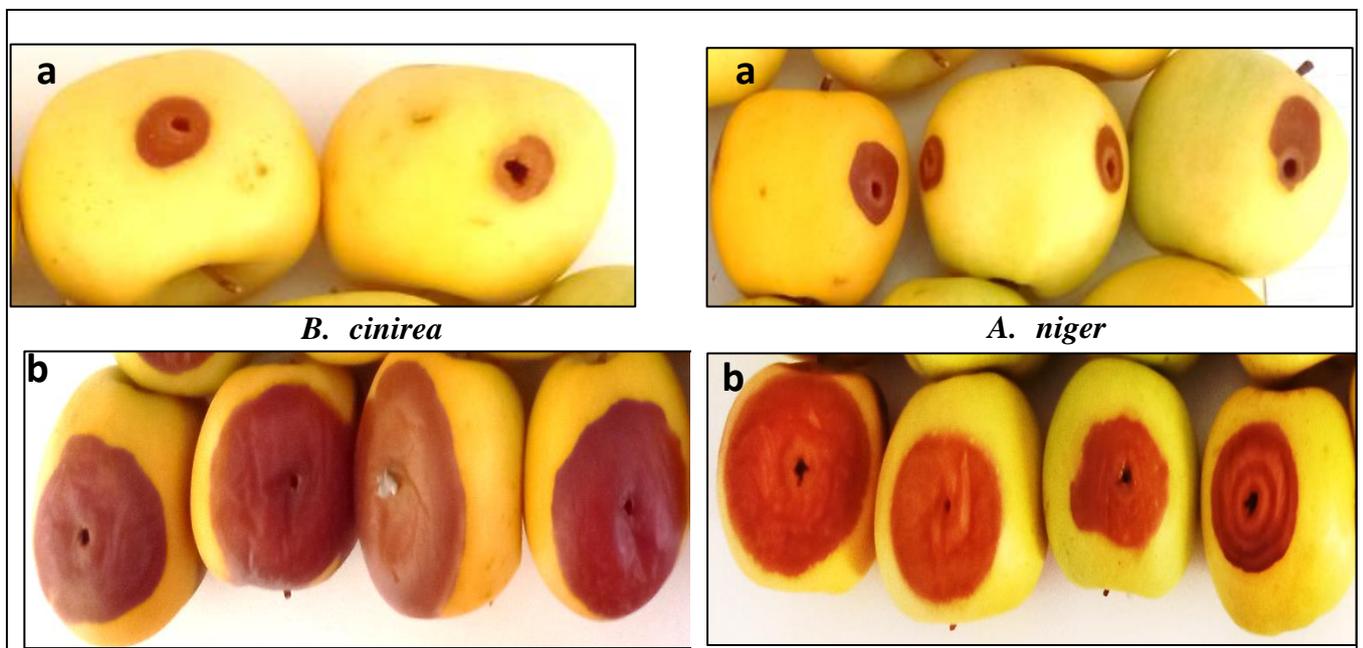


Figure 20 : Effet de la moisissure fongique sur les pommes traitées (a) ou non (b) avec l'antagoniste bactérien après 6 jours d'incubation.

Ainsi, la sévérité de l'infection causée par *A. niger* a été réduite de 58,33 % par l'isolat *Serratia sp*-SB6, de 63,33% par *Serratia sp*-CH11 et de 48,33 % par *Halomonas sp*-SB39. Dans le cas de *B. cinerea*, la sévérité de l'infection a été réduite de 71,43% par les deux souches *Serratia spp* et de seulement 17,56% par la souche *Halomonas sp*. Ces résultats sont représentés par la figure 21 ci-dessous.

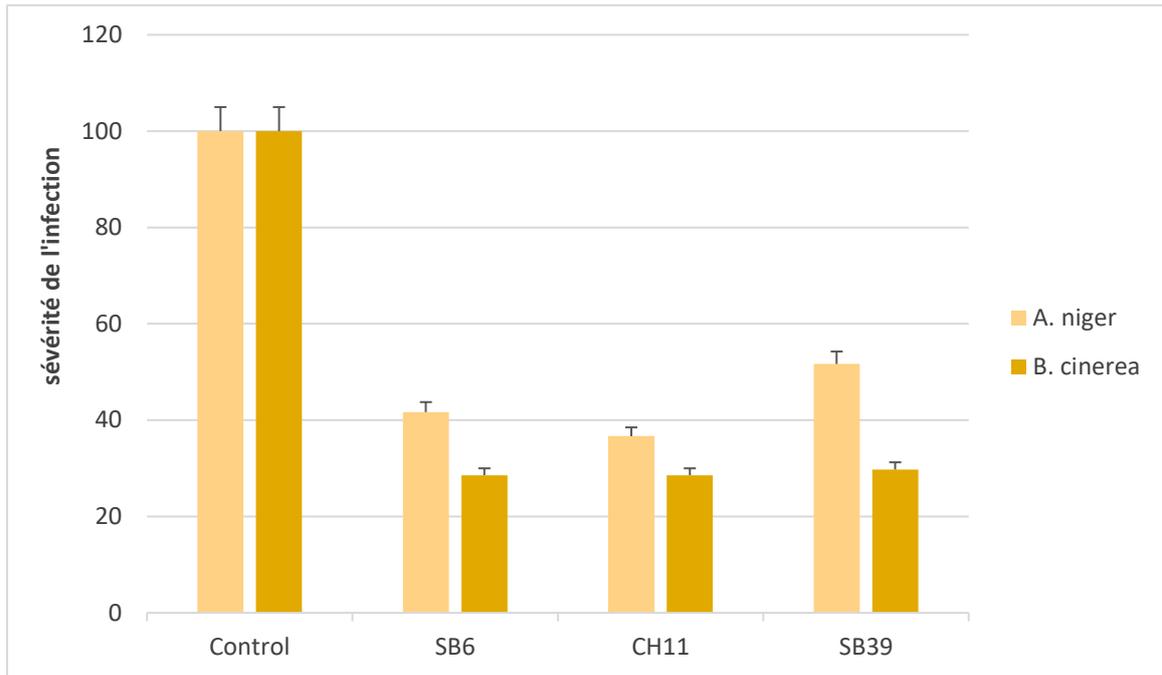


Figure 21 : Efficacité des isolats bactériens (SB6, CH11 et SB39) contre *A. niger* et *B. cinerea* dans les pommes.

La contamination des produits agricoles lors du stockage constitue l'un des principaux défis dans la préservation des récoltes, engendrant des pertes économiques considérables et compromettant la qualité des denrées alimentaires (Xiao et Kim, 2008). En effet, les champignons phytopathogènes, tels qu'*Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea*, sont fréquemment responsables de la détérioration post-récolte des fruits, notamment des pommes, par le développement de zones de pourriture qui réduisent leur durée de conservation et leur valeur commerciale (Sharma et al., 2009 ; Hmiri et al., 2011).

Dans notre étude, l'application de trois souches bactériennes antagonistes sur des pommes préalablement contaminées par ces champignons phytopathogènes a permis de limiter significativement l'expansion de la zone de pourriture. Cette inhibition témoigne de l'efficacité potentielle de ces bactéries comme agents de biocontrôle, offrant une alternative écologique et durable aux traitements chimiques traditionnels. Les résultats obtenus ont révélé une différence significative entre les échantillons traités et le témoin négatif, confirmant ainsi l'impact positif des bactéries antagonistes sur la réduction de la sévérité de la maladie.

Ces résultats corroborent les observations de plusieurs études antérieures, où des souches appartenant aux genres *Halomonas* et *Serratia* ont également démontré des propriétés antifongiques efficaces (Jimtha et al., 2017 ; Masmoudi et al., 2019 ; Sun et al., 2022 ; Alijani

et al., 2022). Ces travaux soulignent l'intérêt croissant pour l'utilisation des bactéries bénéfiques dans la lutte contre les pathogènes post-récolte.

Par ailleurs, l'utilisation de ces bactéries antagonistes présente l'avantage supplémentaire de réduire l'impact environnemental lié à l'usage excessif de fongicides chimiques, tout en préservant la santé des consommateurs. Nos résultats confirment le potentiel prometteur des bactéries antagonistes dans la gestion durable des maladies post-récolte, contribuant ainsi à la réduction des pertes alimentaires et à l'amélioration de la sécurité alimentaire.

Partie IV : Effet des souches sélectionnées sur la croissance du blé sous stress salin

L'étude de l'effet des isolats *Serratia sp-SB6*, *Serratia sp-CH11* et *Halomonas sp-SB39* sur la germination et la croissance du blé dur (*Triticum durum* Desf. Var. Simeto) a été réalisée sur le même sol stérilisé et non stérilisé.

1. Tests de stimulation de la germination des graines de blé

L'effet des trois bactéries a été évalué à trois concentrations de NaCl (0 mM, 125 mM, et 200 mM). La germination des graines a été évaluée en calculant le taux de germination et en mesurant les longueurs des tiges et racicules après six jours. Les résultats sont représentés dans les figures ci-dessous.

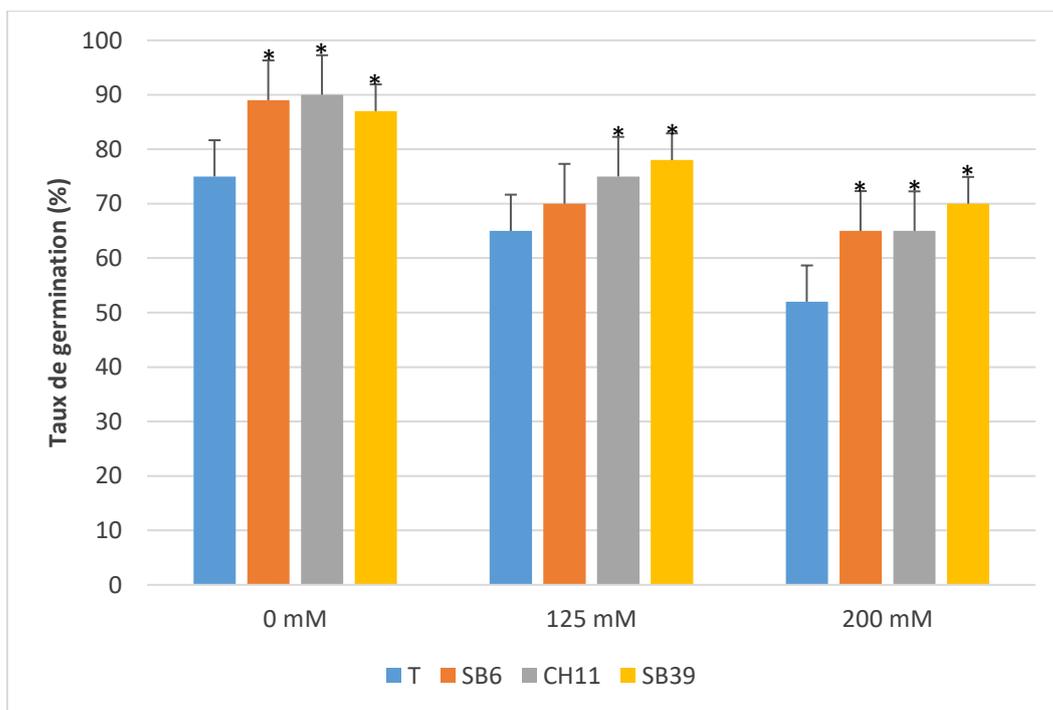


Figure 22 : Effet des souches bactériennes sur le taux de germination des graines de blé à différentes concentrations de NaCl (0, 125 et 200 mM) au bout de six jours. * : différence significative ($p < 0,05$).

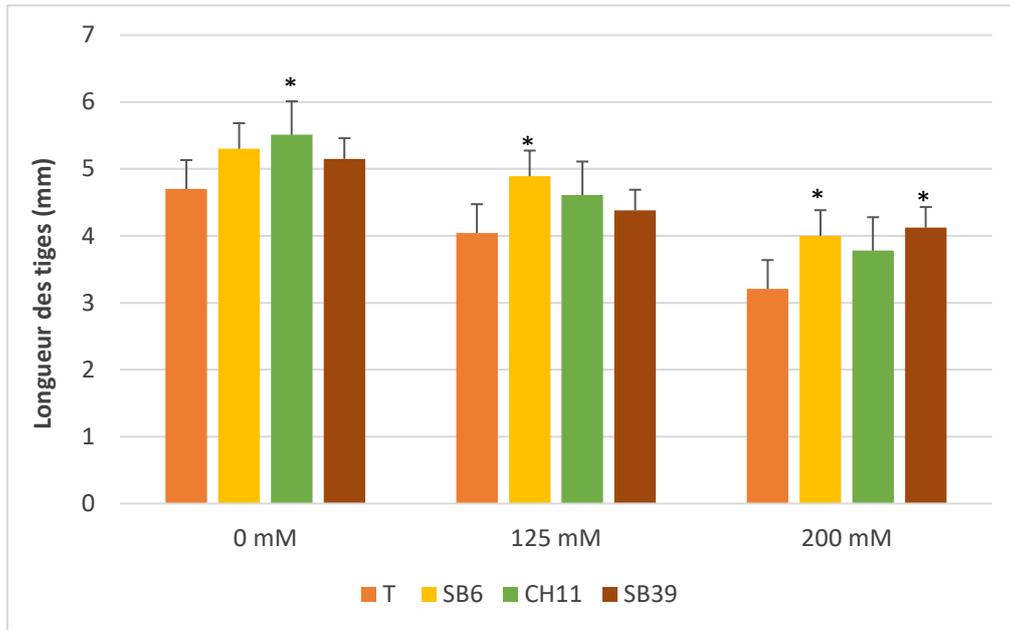


Figure 23 : Effet des souches bactériennes sur la longueur des tiges des germes de blé à différentes concentrations de NaCl (0, 125 et 200 mM) au bout de six jours. * : différence significative ($p < 0,05$).

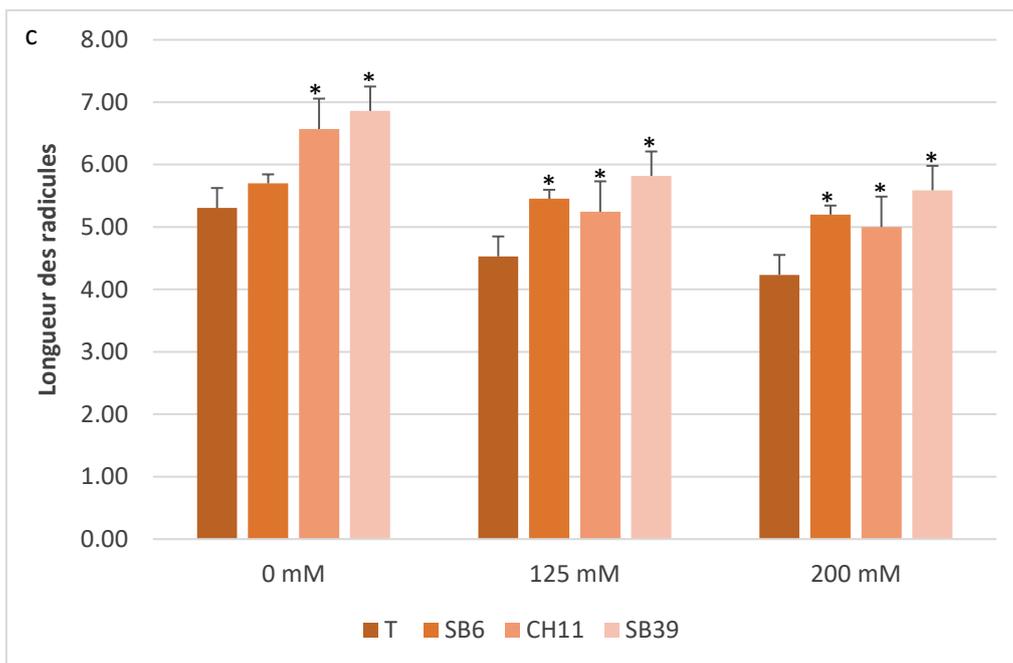


Figure 24 : Effet des souches bactériennes sur la longueur des racicules des germes de blé à différentes concentrations de NaCl (0, 125 et 200 mM) au bout de six jours. * : différence significative ($p < 0,05$).

Les résultats statistiques montrent que les trois souches bactériennes halotolérantes améliorent significativement la germination des graines comparativement au témoin, particulièrement sous stress salin (figure 22). À 0 mM de NaCl, toutes les souches (SB6, CH11, SB39) présentent une augmentation significative du taux de germination par rapport au témoin, ce qui suggère un effet bénéfique même en l'absence de stress salin. Sous une concentration modérée de 125 mM NaCl, seules les souches *Serratia sp-CH11* et *Halomonas sp-SB39* maintiennent une amélioration significative, tandis que *Serratia sp-SB6* ne diffère pas statistiquement du témoin, indiquant une variabilité dans la tolérance au stress entre souches. Enfin, à 200 mM NaCl, niveau de stress élevé, toutes les souches conservent une capacité à améliorer significativement la germination par rapport au témoin, témoignant de leur potentiel à atténuer les effets négatifs du stress salin. Ces observations confirment le rôle prometteur des bactéries halotolérantes comme promoteurs de croissance des plantes (PGPR) dans des conditions salines, en accord avec d'autres études soulignant leur capacité à renforcer la tolérance des plantes aux stress abiotiques

D'autre part, les trois souches ont stimulé la croissance des tiges des graines germées sous stress salin (figure 23). Pour la longueur des racines, le meilleur résultat a été obtenu avec l'isolat *Halomonas-SB39*, où on enregistre une augmentation avoisinant les 32 % à 200 mM de NaCl comparées aux graines non inoculées (figure 24).

Des études similaires ont été rapportées sur l'effet des bactéries halophiles sur la germination des graines. Zhou et *al.* (2017) ont indiqué que la germination des graines a augmenté de 37 % et 94 % sous 50 mM et 125 mM de NaCl, respectivement. La plus forte augmentation des paramètres de croissance a été observée à 125 mM de NaCl (LT = 24%, LR = 13%). Dans une autre étude, les résultats du test de germination ont montré que l'inoculation de semences d'*Halomonas* affectait positivement les paramètres de germination de l'orge dans des conditions avec et sans ajout de sel (Dragojević et *al.*, 2023). Qurashi et Sabri (2012) ont observé une stimulation de la germination des graines de pois chiche inoculées avec une souche de *Halomonas* allant jusqu'à 152 %.

Par ailleurs, dans une étude de Nadeem et *al.* (2013) où des graines de blé, après inoculation avec *Serratia ficaria* W10, ont été semées dans des champs naturellement salins ($C_E = 1,0-15,0 \text{ dS.m}^{-1}$), le pourcentage de germination, le taux de germination, le taux de semis de blé et le rendement des plantes a augmenté significativement, par rapport au témoin non

inoculé. Des résultats similaires ont été signalés par Mahdi et *al.* (2021) où des graines de quinoa ont été inoculées avec *Serratia rubidaea*.

2. Tests de stimulation de la croissance des plants de blé soumis à un stress salin

Les résultats du traitement des graines de blé par les trois isolats bactériens et leurs différentes combinaisons montrent une amélioration significative des paramètres de croissance considérés comparés à ceux obtenus avec le témoin sous stress salin (figure 25).

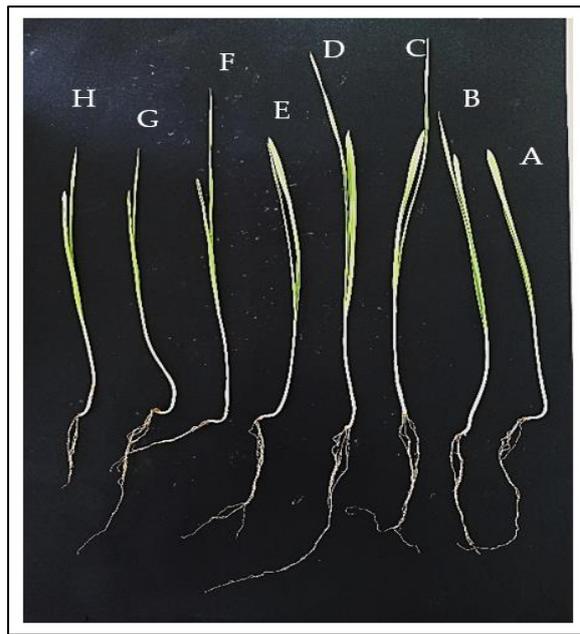


Figure 25 : Effets de l'inoculation des souches bactériennes sur la croissance des plants de blé dans des conditions de stress salin de 125 mM (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39.

Pour évaluer les effets néfastes du stress salin, différentes concentrations de NaCl ont été utilisées (125, 150 et 200 mM). Les résultats obtenus indiquent que l'augmentation de la concentration en NaCl provoque une réduction de la longueur des tiges et des racines et par conséquent de leurs poids frais et sec chez les plants témoins. Cependant, l'inoculation des trois isolats bactériens a montré une atténuation significative des effets néfastes de la salinité. Ainsi, sur sol stérile, l'inoculation des souches bactériennes a provoqué une augmentation de 30% pour la longueur des tiges à 125 mM avec l'association des deux souches SB6 et SB39 (*Serratia sp.* et *Halomonas sp.*) et des augmentations de 34% et 24% à 150 et 200 mM respectivement avec la souche *Halomonas sp.* Concernant la longueur des racines, le meilleur résultat a été obtenu avec la souche *Halomonas sp.* avec une augmentation de 39%, 45% et 46% pour les

concentrations de 125 mM, 150 et 200 mM. Ceci est probablement dû au fait que cet isolat (SB39) soit le seul capable de produire l'AIA qui favorise la croissance des racines.

Les mesures des poids frais des parties aériennes indiquent également une amélioration significative de la croissance des semis de blé inoculés par les isolats bactériens. Notamment pour l'isolat *Halomonas*-SB39, où l'on observe une augmentation de 40% à 125 mM, 80% à 150 mM et 56,4% à 200 mM (figure 26).

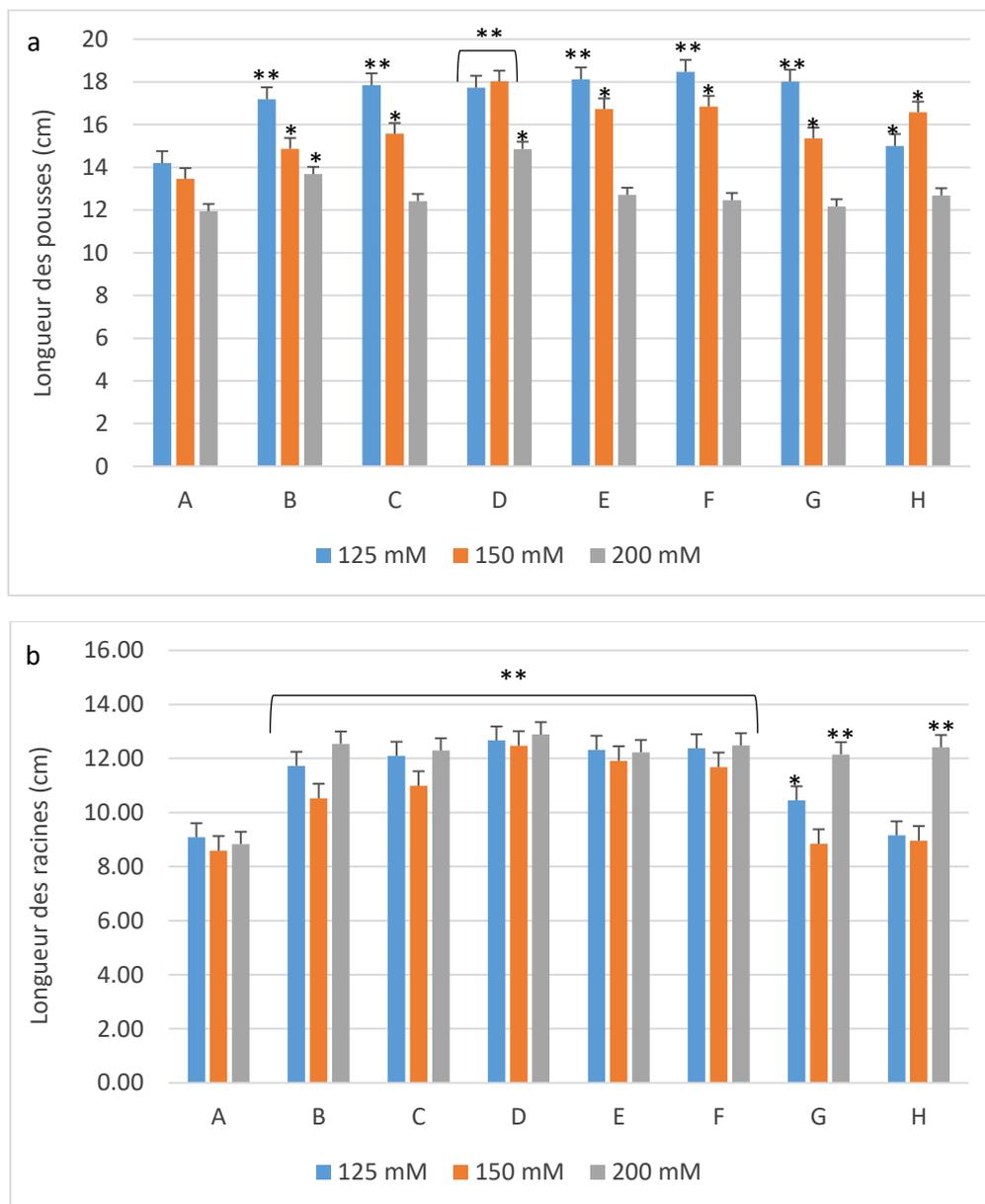


Figure 26 : Effet de l'inoculation avec des rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé cultivés dans un sol stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl (a : longueur des pousses ; b : longueur des racines. (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

* : différence significative ($p < 0,05$) ; ** : différence significative ($p < 0,005$) ; *** différence significative ($p < 0,001$).

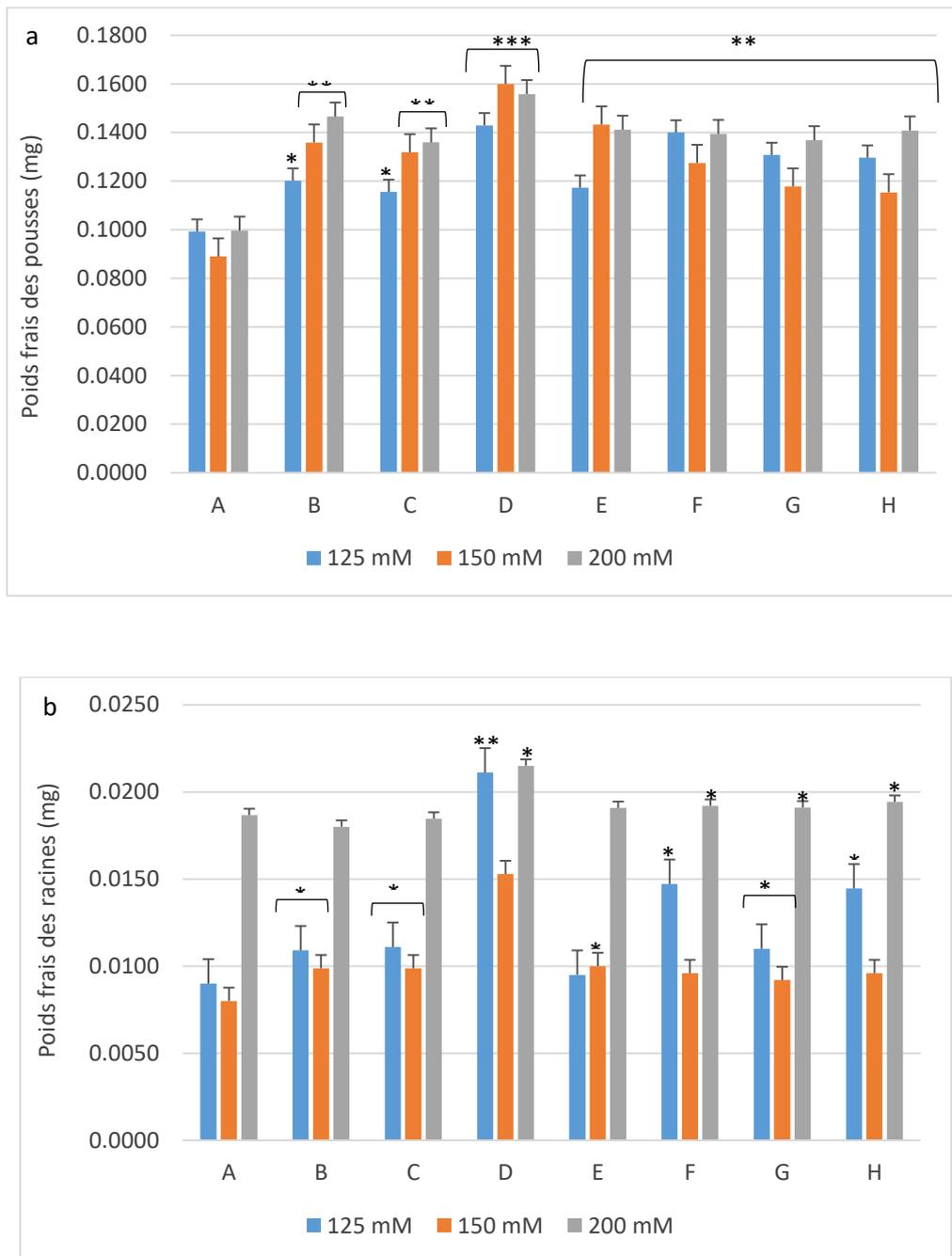


Figure 26 (suite) : Effet de l'inoculation avec des rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé cultivés dans un sol stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl (a : poids frais des pousses ; b : poids frais des racines). (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39. * : différence significative ($p < 0,05$) ; ** : différence significative ($p < 0,005$) ; *** différence significative ($p < 0,001$).

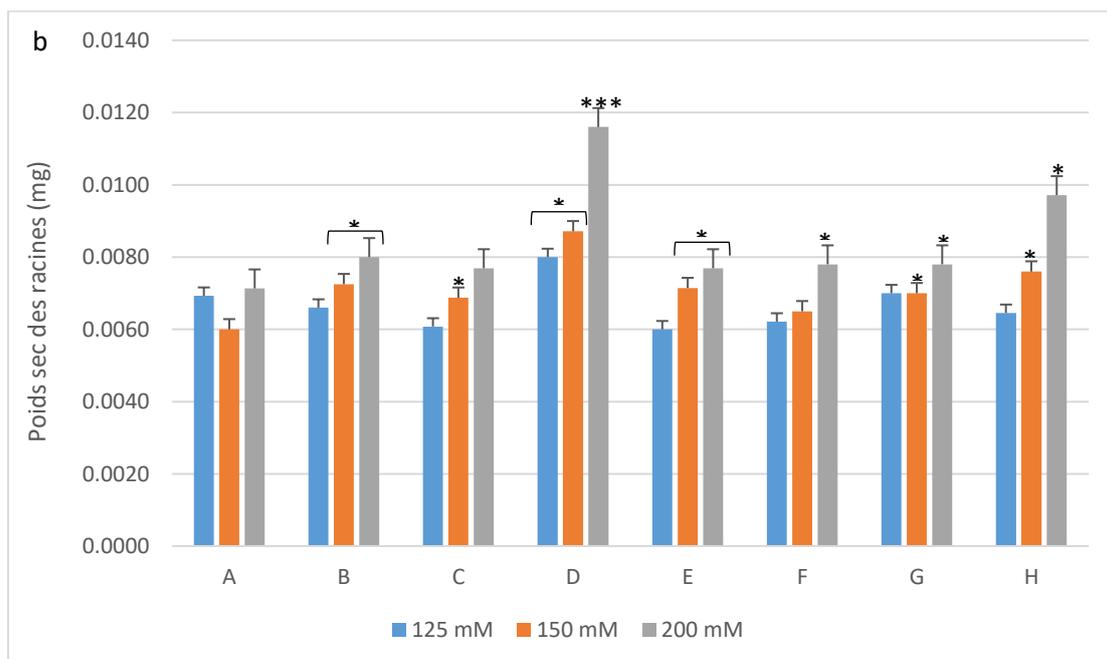
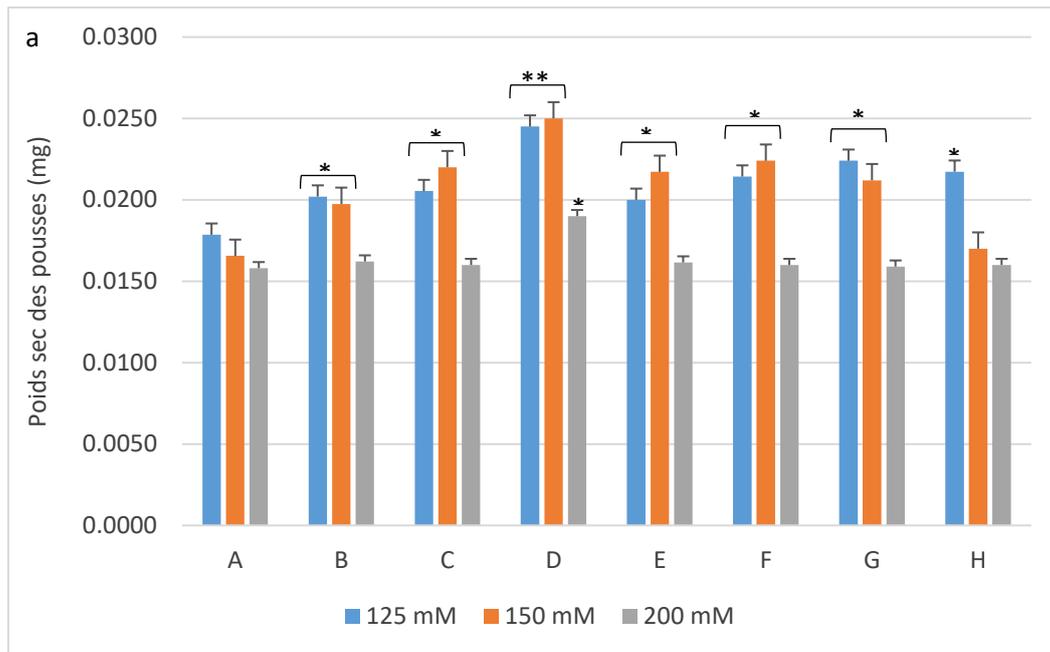


Figure 26 (suite et fin): Effet de l'inoculation avec des rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé cultivés dans un sol stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl (a: poids sec des pousses ; b : poids sec des racines). (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39). * : différence significative ($p < 0,05$) ; ** : différence significative ($p < 0,005$) ; *** différence significative ($p < 0,001$).

En revanche sur sol non stérile, l'inoculation des souches bactériennes a provoqué une augmentation de 46 % pour la longueur des tiges à 125 mM avec l'association des deux souches SB6 et SB39 (*Serratia sp et Halomonas sp*) et des augmentations de 25 % à 150 mM et seulement 16 % à 200 mM. Cette association donne le meilleur résultat à 125 mM que ce soit sur sol stérile ou non stérile. Mais à 200 mM c'est la souche halophile *Halomonas-sp*SB39 qui donne le meilleur résultat avec 32,6 %. Concernant la longueur des racines, le meilleur résultat a été obtenu avec la souche *Halomonas sp* avec une augmentation de 55,8 %, 37,5 % et 42,4 % pour les concentrations de 125, 150 et 200 mM. Pour les poids frais des parties aériennes, on observe une amélioration significative de la croissance des semis de blé inoculés par les isolats bactériens. L'association des deux souches SB6 et SB39 (*Serratia sp et Halomonas sp*) a donné une augmentation de plus de 86 % à 125 mM. L'isolat *Halomonas-SB39*, a enregistré une amélioration de 74 % à 125 mM, 44 % à 150 mM et plus de 140 % à 200 mM (figure 27).

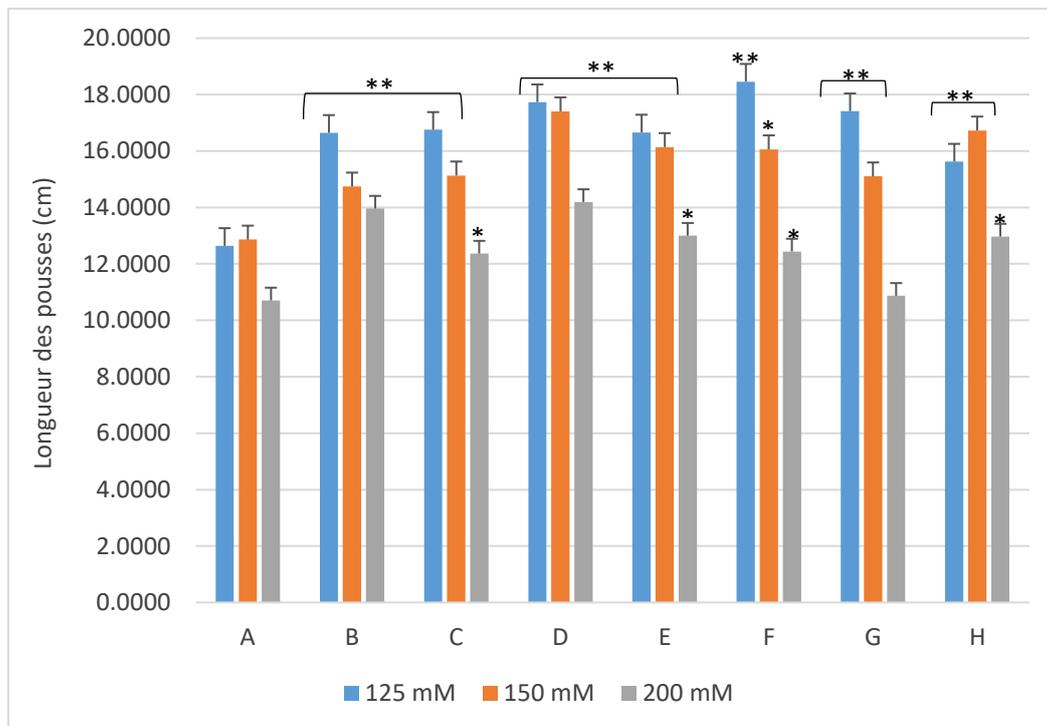


Figure 27 : Effet de l'inoculation avec des Rhizobactéries halotolérantes sur la longueur des plants de blé cultivés dans un sol non stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl. (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39). * : différence significative ($p < 0,05$) ; ** : différence significative ($p < 0.005$)

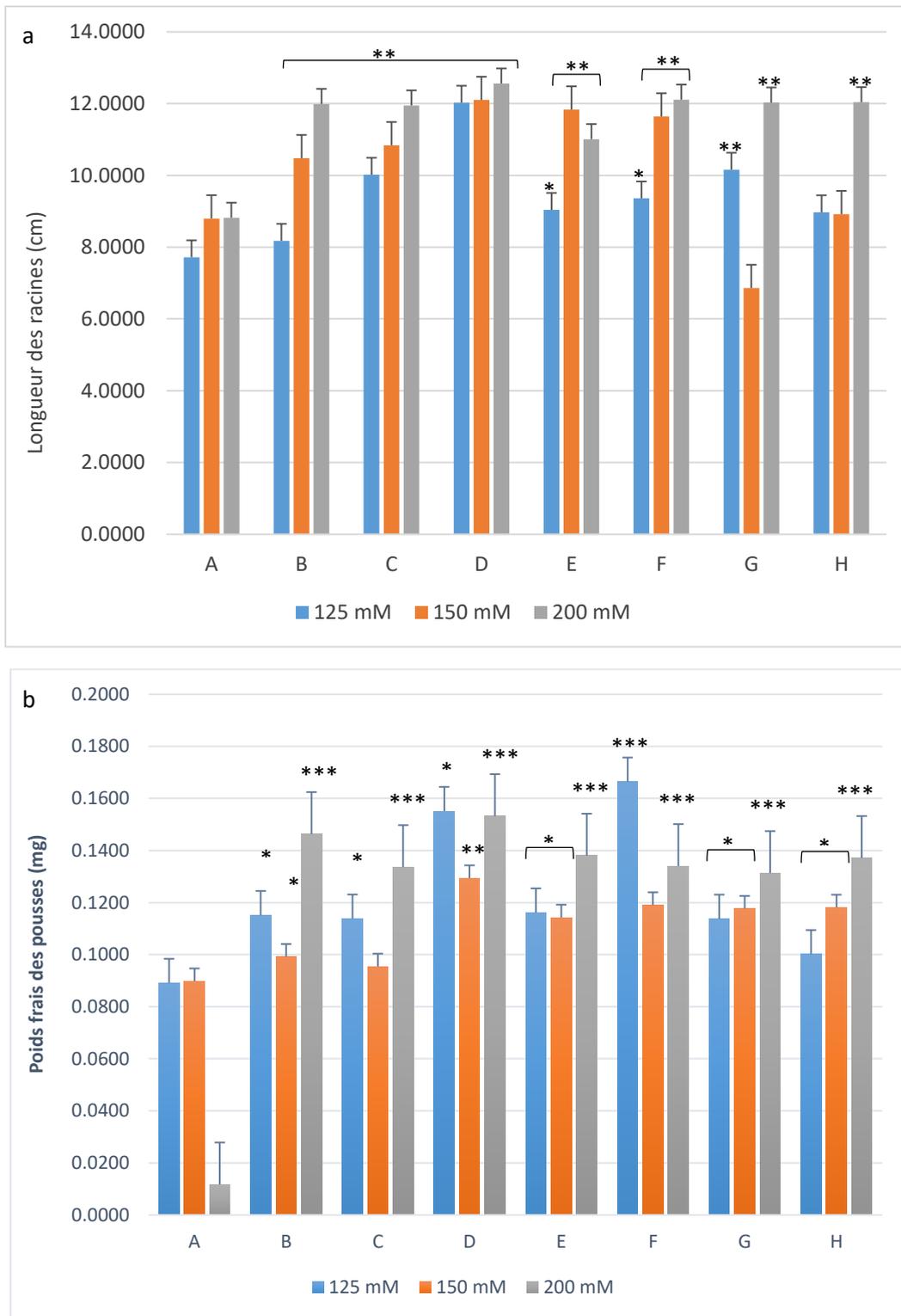


Figure 27 (suite) : Effet de l'inoculation avec des Rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé cultivés dans un sol non stérile sous stress salin de 125 mM, 150 mM ou 200 mM de NaCl (a : longueur des racines ; b : poids frais des pousses). (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39). * : différence significative ($p < 0,05$) ; ** : différence significative ($p < 0,005$) ; *** différence significative ($p < 0,001$).

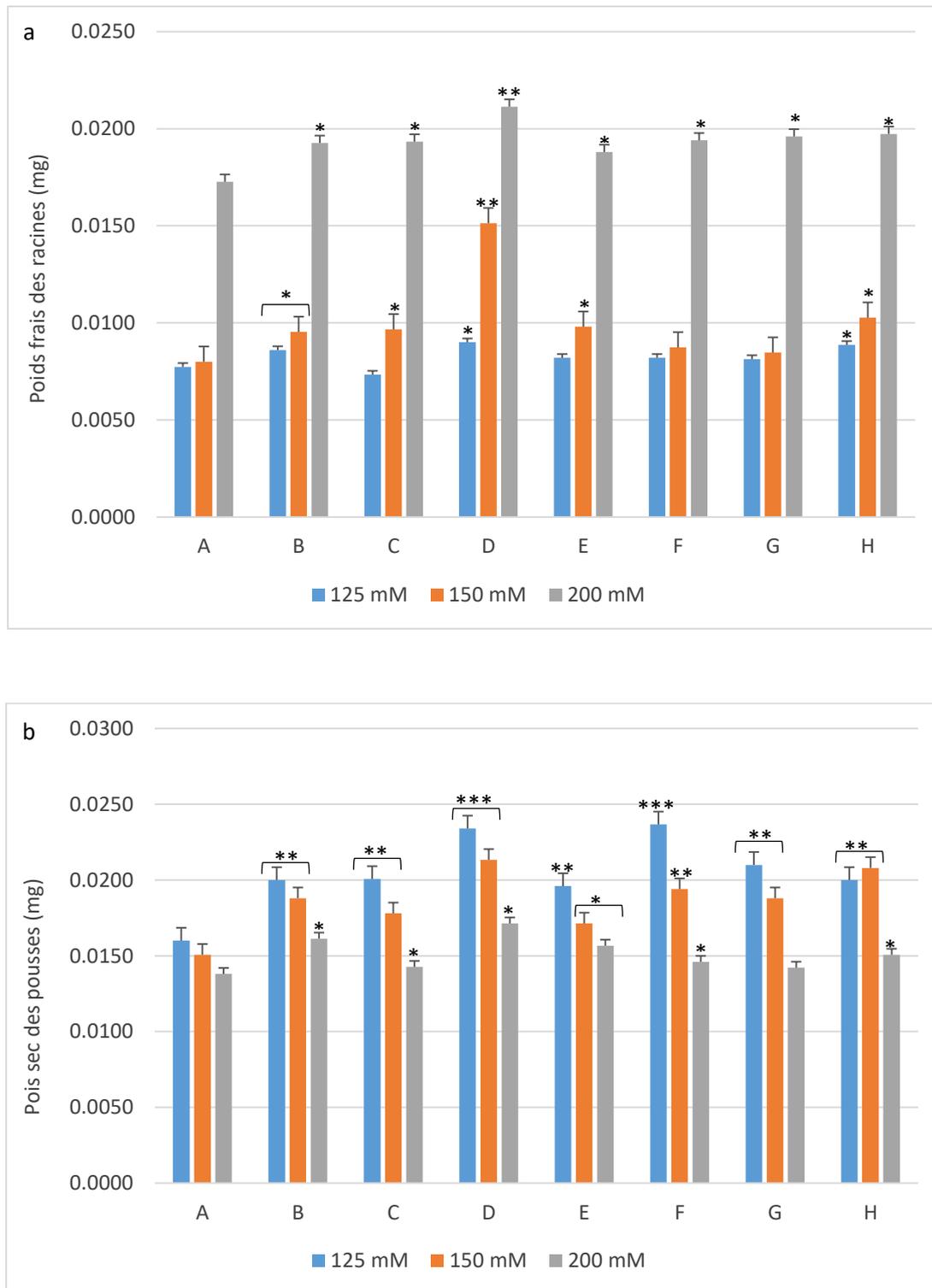


Figure 27 (suite) : Effet de l'inoculation avec des Rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé cultivés dans un sol non stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl (a : poids frais des racines ; b : poids sec des pousses). (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39). * : différence significative ($p < 0,05$) ; ** : différence significative ($p < 0,005$) ; *** différence significative ($p < 0,001$).

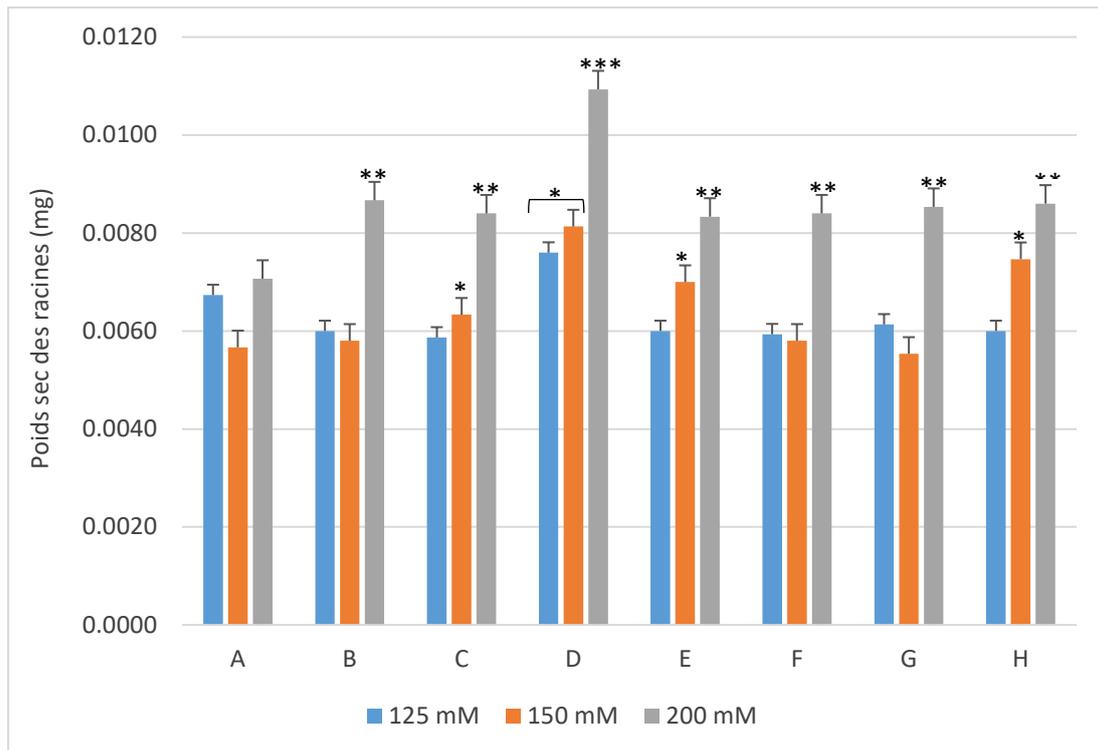


Figure 27 (suite et fin): Effet de l'inoculation avec des Rhizobactéries halotolérantes sur la croissance des plants de blé (poids sec des racines) cultivés dans un sol non stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl. (A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39). * : différence significative ($p < 0,05$) ; ** : différence significative ($p < 0,005$) ; *** différence significative ($p < 0,001$).

Nous avons sélectionner dans cette études des bactéries halotolérantes et halophiles afin de tester leurs effets bénéfiques sur la croissance du blé dur sous stress salin. Plusieurs études ont montré l'effet bénéfique des bactéries halotolérantes et halophiles sur la croissance des plantes (Qurashi *et al.*, 2013 ; Essghaier *et al.*, 2014 ; Orhan, 2016).

Nos souches étudiées ont manifesté la capacités de produire des enzymes hydrolytiques (cellulase, amylase, lipase, protéases, uréase et chitinase), de solubiliser le phosphate inorganique, de fixer l'azote et de produire la phytohormone AIA. Les enzymes d'origine microbienne sont considérés comme des biofertilisants car elles dégradent des polymères organiques, et rendent des éléments essentiels tels l'azote et le phosphore accessibles à la plante (Garcia-Fraile *et al.*, 2015). L'action des enzymes microbiennes intervient dans la physicochimie du sol en améliorant la disponibilité des éléments essentiels à la croissance des plantes (Rai *et al.*, 2016).

Ainsi, l'expression simultanée de différents caractères PGP, agissant de manière synergique, favorise la croissance des plantes (Masmoudi et *al.*, 2019). L'AIA est une phytohormone impliquée dans l'initiation des racines, la division et l'agrandissement cellulaire. Par conséquent, les micro-organismes producteurs d'AIA augmentent la croissance et la longueur des racines des plantes, ce qui permet à la plante d'obtenir plus de nutriments à partir du sol (Boiero et *al.*, 2007). Une étude de Dasele et *al.* (2014) a révélé que *Halomonas sp.* avait un potentiel de production d'AIA. Ceci correspond aux résultats que nous avons trouvés où SB39 était le seul isolat sélectionné capable de produire l'AIA, malgré que des travaux rapportent l'aptitude des bactéries du genre *Serratia* à synthétiser cette phytohormone (Duca et Glick, 2020 ; Singh et Jha, 2016). Les rhizobactéries productrices d'AIA permettent à la plante d'augmenter la perméabilité de l'eau provoquant une meilleure absorption de l'eau dans les feuilles induisant ainsi une amélioration du métabolisme cellulaire lié au stress environnementaux (Etesami et *al.*, 2018 ; Ha-Tran et *al.*, 2021).

En outre, les PGPR peuvent fixer l'azote atmosphérique essentiel au métabolisme de diverses molécules tels les acides aminés, les enzymes, le NADH, chlorophylle...etc. La production d'ammoniac est aussi importante car elle représente une autre source d'azote.

Les phosphates solubles soutiennent directement la croissance des plantes car ils agissent comme macronutriments. Ils favorisent notamment le développement racinaire et interviennent dans d'autres processus comme la maturation des fleurs ou des fruits, la mobilisation des réserves nutritives, etc.

3. Paramètres biochimiques

3.1. Dosage de la chlorophylle

L'effet de l'inoculation par les trois souches bactériennes (*Serratia*-SB6, *Serratia*-H11 et *Halomonas*-SB39) sur la teneur en chlorophylle des plants de blé dur a été évalué à différents niveaux de stress salin (125, 150 et 200 mM NaCl).

Les résultats montrent que le stress salin induit une diminution de la teneur totale en chlorophylle des plantules de blé. Cependant, les plantules inoculées par les souches bactériennes, ont augmenté significativement les teneurs en chlorophylle, même sous stress salin par rapport aux témoins non inoculés (figures 28-31). Notons également que la souche *Halomonas sp*-SB39 (D) a amélioré significativement la teneur en chlorophylle que ce soit sur sol stérile ou non stérile.

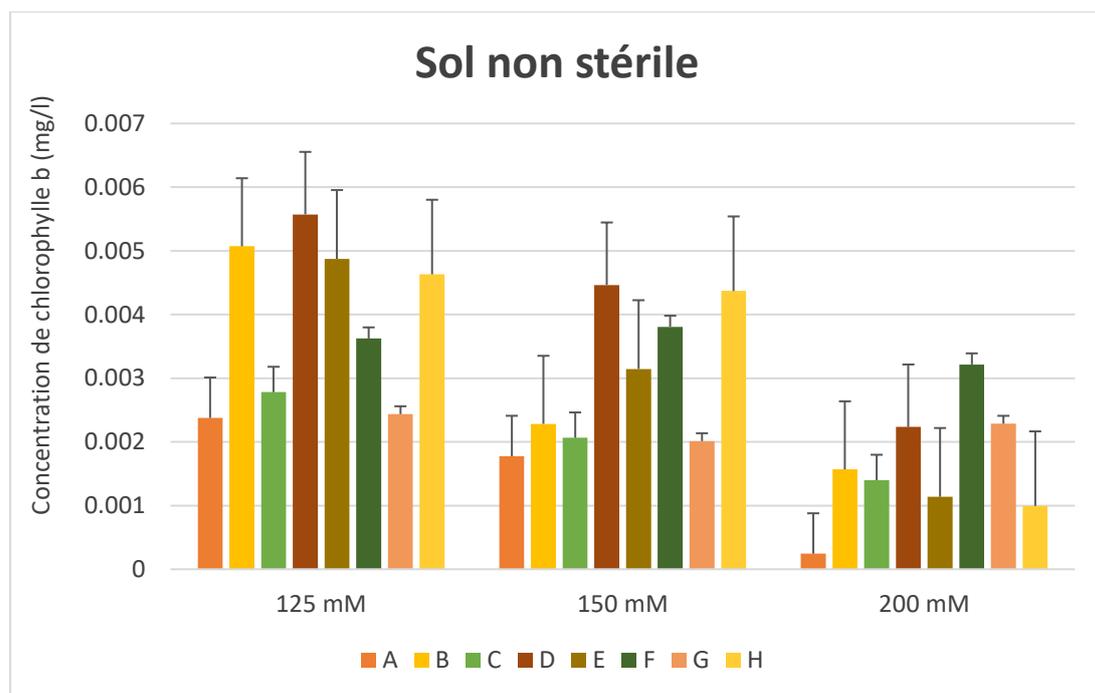
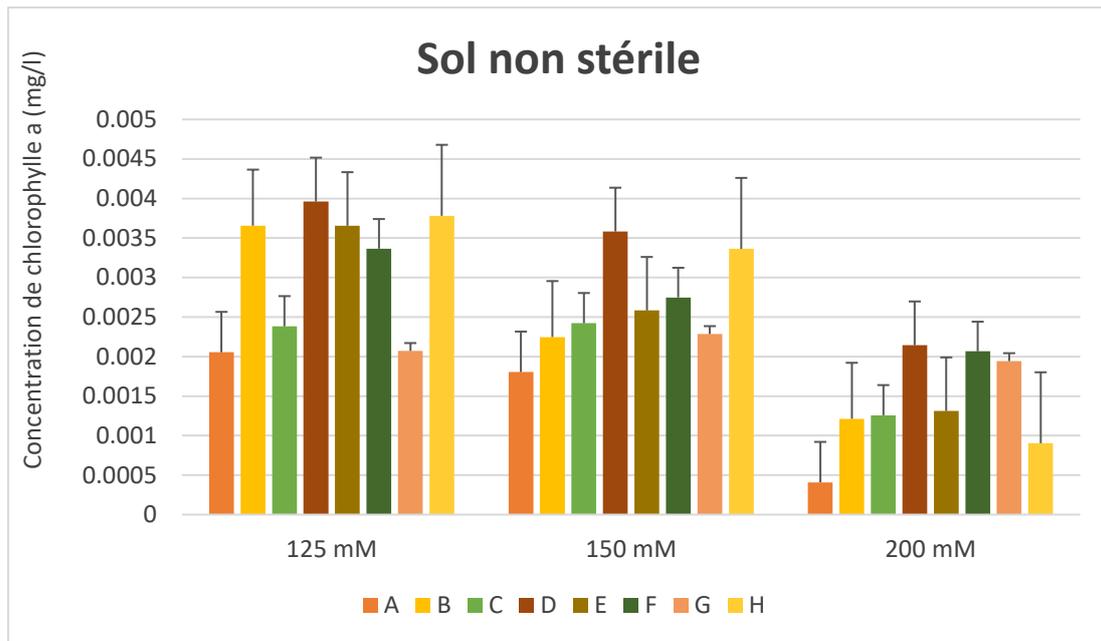


Figure 28 : Concentrations de la chlorophylle a et b du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol non stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl.

(A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

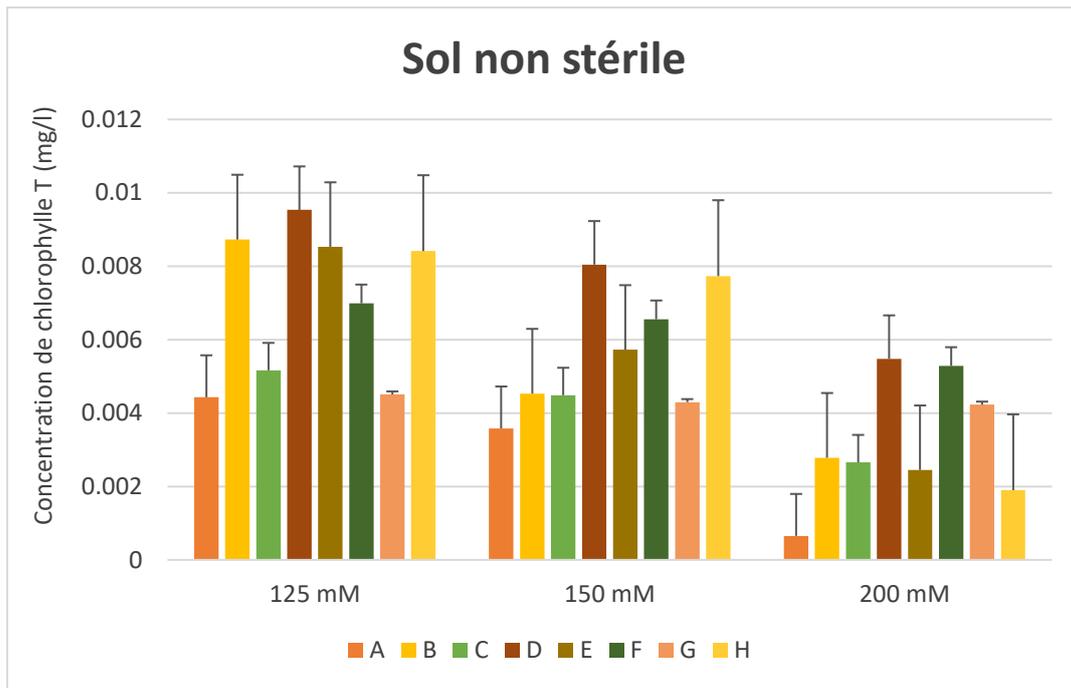


Figure 29 : Concentrations de la chlorophylle totale du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol non stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl.

(A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-SB39 ; (F) SB6-CH11 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

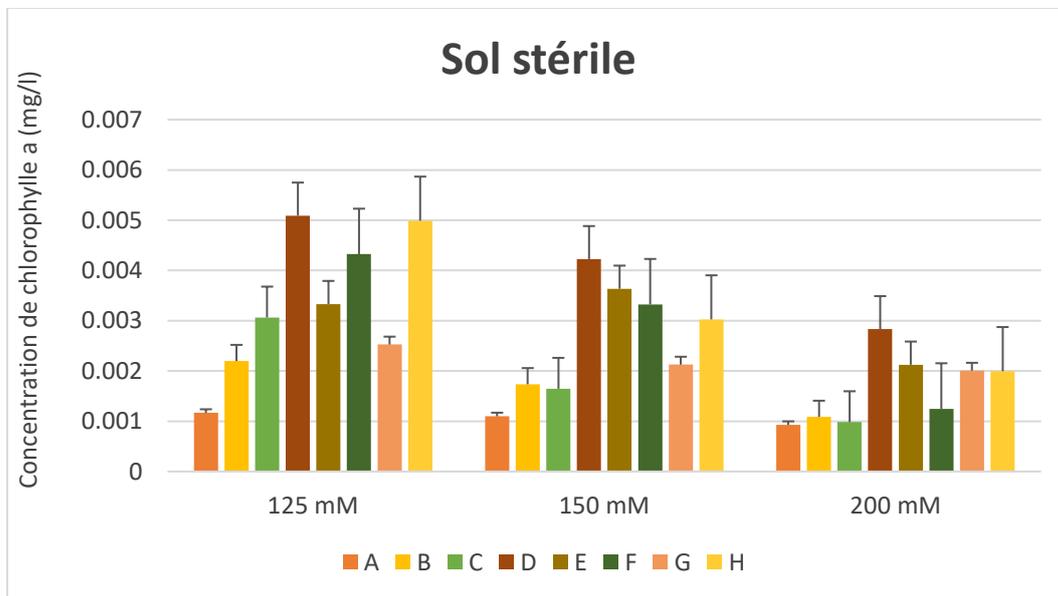


Figure 30 : Concentrations de la chlorophylle a du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl.

(A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

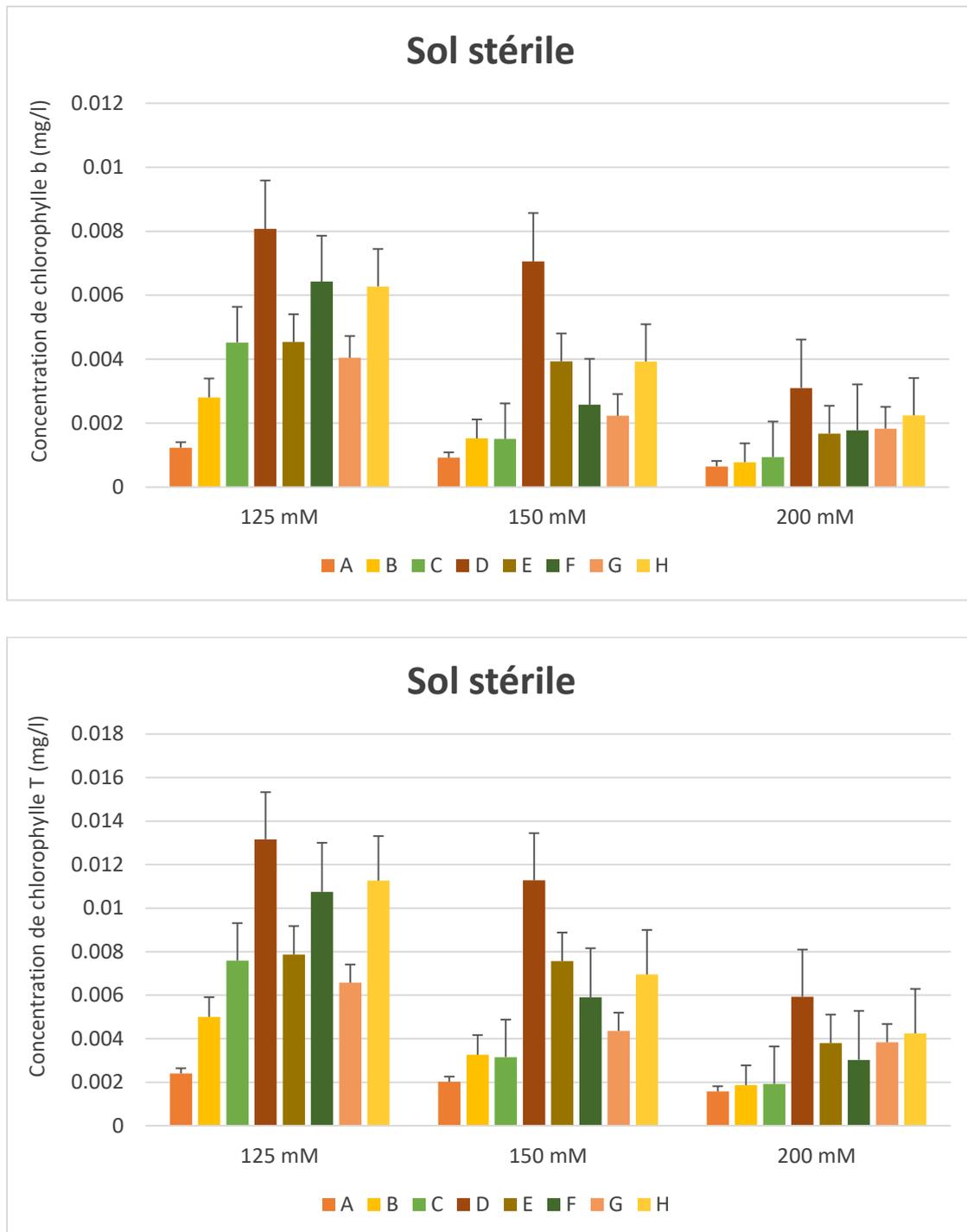


Figure 31 : Concentrations de la chlorophylle b et totale du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile sous stress salin de 125 mM, 150 ou 200 mM de NaCl.

(A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

Sous stress salin, la concentration en chlorophylles dans les feuilles de blé diminue de façon significative. Plusieurs études montrent que l'augmentation de la salinité, notamment par l'application de NaCl, entraîne une réduction marquée des teneurs en chlorophylles a et b chez le blé (Kiani-Pouya & Rasouli, 2014 ; Ilyas *et al.*, 2020). Le stress salin interfère avec les voies métaboliques responsables de la synthèse de la chlorophylle, ce qui entraîne une diminution de sa production. Dans une étude de Santos (2004) et Nunkaew *et al.* (2014) la diminution de la synthèse de la chlorophylle peut être due à une diminution de l'acide 5-aminolévulinique, un précurseur de la chlorophylle, dont la synthèse est inhibée par le NaCl. En plus, les nutriments nécessaires à cette synthèse peuvent également devenir moins disponibles en raison de l'impact du sel sur l'absorption des nutriments.

Par ailleurs, selon Naumann *et al.* (2007), la salinité inhibe la photosynthèse chez beaucoup d'espèces végétales suite à la fermeture des stomates, limitant ainsi la diffusion du CO₂ dans les chloroplastes. La plupart du temps, l'exposition à long terme à de fortes concentrations de stress salin provoque des dommages structurels au PSII (Bukhat *et al.*, 2019).

En revanche, les résultats obtenus suggèrent que l'inoculation par les PGPR sélectionnées peut permettre de contrecarrer l'effet négatif du stress salin sur la teneur en pigments chlorophylliens chez le blé dur. Ce mécanisme contribuerait à l'amélioration de la tolérance des plantes au stress salin en maintenant leur capacité photosynthétique. De ce fait, l'utilisation de PGPR représente une approche prometteuse pour une agriculture durable en conditions salines.

Des résultats similaires ont été obtenus par Deskoy *et al.* (2020) et Abboodi *et al.* (2021) qui ont rapporté une augmentation de la synthèse des pigments chlorophylliens au niveau des feuilles de blé tendre et dur respectivement, inoculés, sous stress salin, avec des souches de *Serratia* comparés à du blé non inoculé. Amin *et al.* (2023) ont obtenu des résultats similaires avec des souches de *Bacillus* et *Halomonas* appliqués en tant que PGPR sur la croissance de l'orge.

5.2. Dosage de composés osmoprotecteurs

L'une des principales voies de tolérance aux contraintes du milieu est la régulation osmotique. Celle-ci est réalisée grâce à l'accumulation de composés osmorégulateurs qui permettent le maintien du potentiel de turgescence (El Midaoui *et al.*, 2007 ; Reddy *et al.*, 2015). Les différences d'accumulation d'osmorégulateurs tels les sucres solubles totaux et la proline sont évaluées chez le blé dur inoculé ou non par les souches SB6, CH11 et SB39.

Les résultats montrent que l'inoculation par les isolats bactériens sous stress salin (NaCl) a entraîné une augmentation significative des sucres solubles dans les feuilles des plantules. On enregistre une augmentation significative des teneurs en sucres solubles chez les isolats B et D et les consortia E, F et G par rapport aux témoins non inoculés. Ainsi, les teneurs en sucres solubles ont été mesurées à 0,97 mg.g⁻¹ dans le témoin, atteignant jusqu'à 3,27 mg.g⁻¹ sous une concentration de 125 mM de NaCl, 4,62 mg.g⁻¹ sous une concentration de 150 mM de NaCl et 4,82 mg.g⁻¹ sous une concentration de 200 mM pour le consotium E, indiquant une augmentation de 237 %, 376 % et 396 % respectivement. En revanche, pour les isolats B et H, on note une augmentation non significative 125 mM (figures 32 et 33).

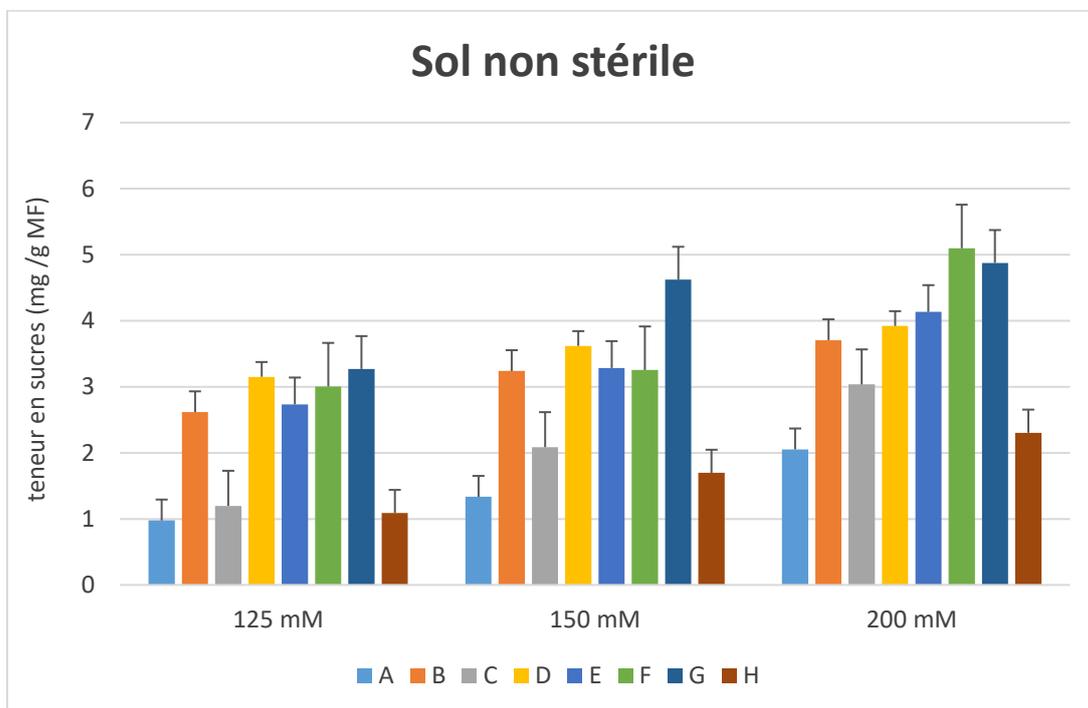


Figure 32: Teneur en sucres solubles foliaires du blé dur inoculé avec des rhizobactéries halotolérantes dans un sol non stérile sous stress salin (125 mM, 150 et 200 mM de NaCl).

(A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

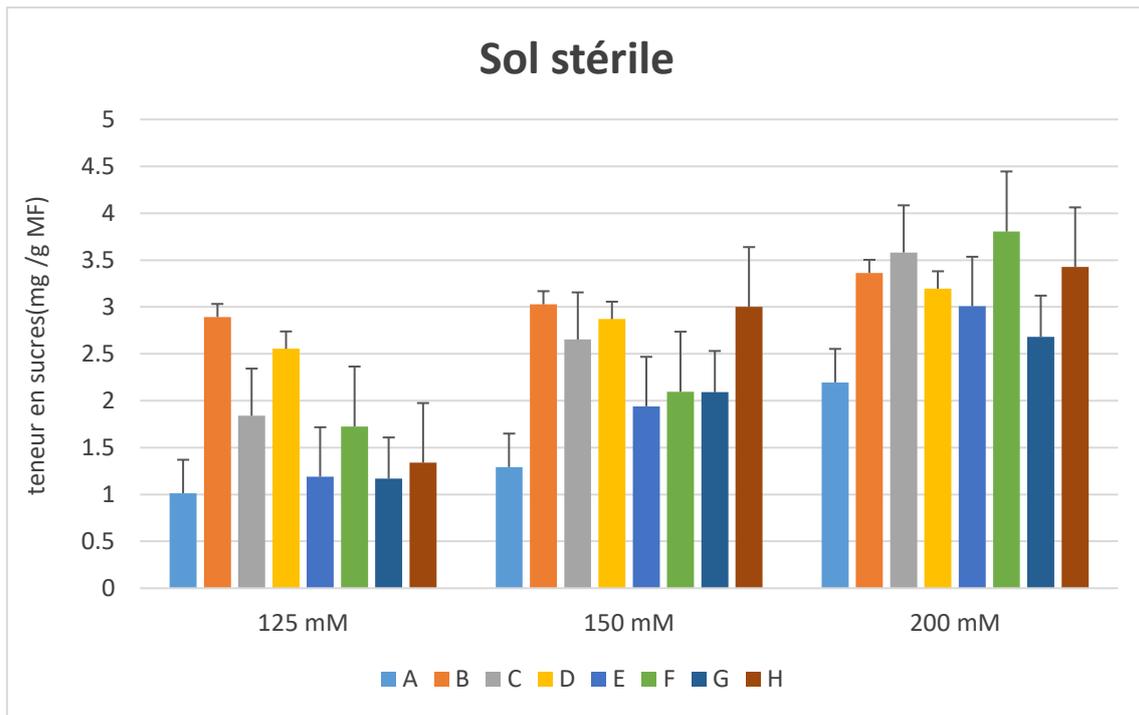


Figure 33 : Teneur en sucres solubles foliaires du blé dur inoculé avec des rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile sous stress salin (125 mM, 150 et 200 mM de NaCl).

(A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

En parallèle, l'accumulation de proline a également été observée. Les niveaux de proline ont montré une augmentation significative chez les plants de blé inoculés avec les isolats bactériens. On observe une augmentation de plus de 48 % pour le consortium F à 125 mM, de 32,1 % et 39 % pour l'isolat D à 150 mM et 200 mM respectivement sur sol non stérile. En revanche, sur sol stérile, on enregistre une augmentation de plus de 70 % pour le consortium F à 125 mM, et de plus de 43 % pour l'isolat D à 150 mM et 200 mM (figure 34).

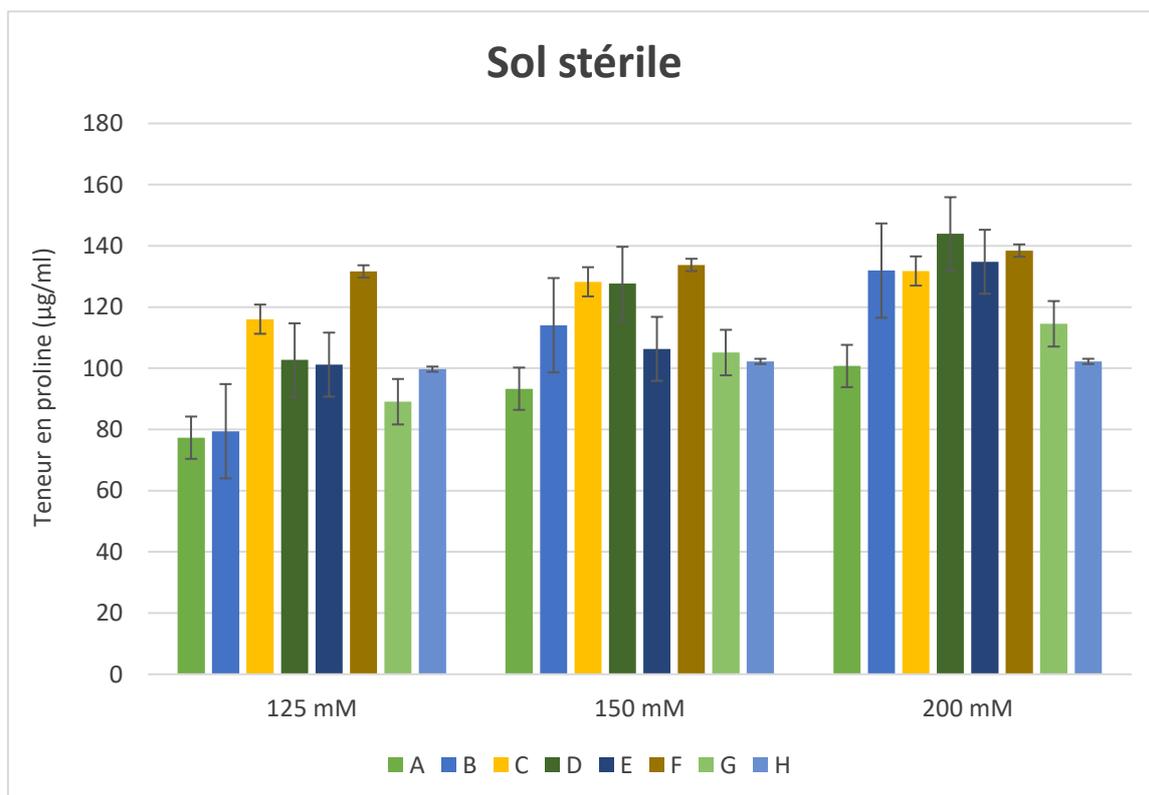
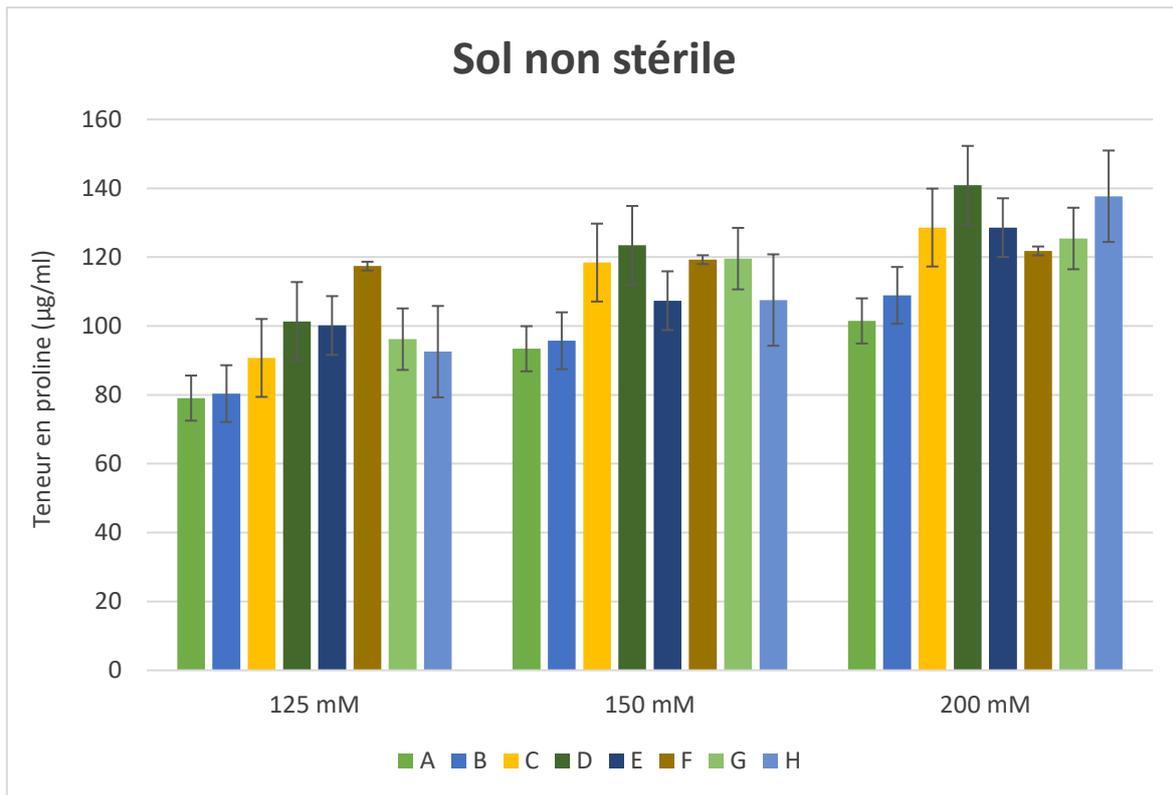


Figure 34 : Teneur en proline du blé dur inoculé avec des Rhizobactéries halotolérantes dans un sol stérile et non stérile sous stress salin (125 mM, 150 et 200 mM de NaCl).

(A) Témoin ; (B) SB6 ; (C) CH11 ; (D) SB39 ; (E) SB6-CH11 ; (F) SB6-SB39 ; (G) CH11-SB39 ; (H) SB6-CH11-SB39).

Il a été rapporté que les PGPRs ont des effets stimulants sur la croissance des plantes dans des conditions de stress. Pour atténuer le stress et promouvoir la croissance des plantes, les PGPR utilisent divers mécanismes tels que la modification de la structure et de la fonction des plantes, la synthèse de phytohormones, une teneur élevée en proline, une meilleure absorption des nutriments, le maintien d'un faible niveau d'éthylène par l'activité de l'ACC désaminase, et l'interaction avec le microbiote du sol (Miransari 2014). Les effets d'amélioration d'*Azospirillum spp.* et de *Rhizobium spp.* contre la sécheresse et la salinité ont été largement étudiés (Arzanesh et al. 2011 ; Hamaoui et al. 2001).

Il a également été signalé que les PGPRs renforcent les mécanismes de défense antioxydants des plantes en raison de l'augmentation de la régulation des gènes de réponse au stress pour faire face aux conditions de stress abiotique (Chakraborty et al. 2015 ; Akram et al. 2016 ; Shahid et al. 2019). La proline a la capacité de piéger les radicaux libres, ce qui contribue à réduire le stress oxydatif. Elle aide à stabiliser les membranes cellulaires et les complexes protéiques, renforçant ainsi la défense des plantes contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Szekely et al., 2008 ; Ben Rejeb et al., 2012)

Les PGPRs résistent à divers stress en augmentant l'absorption de l'ion K^+ ainsi que l'accumulation d'autres solutés comme les polyols, les acides aminés, les saccharides et les bêtaïnes. Ces solutés sont soit produits par les bactéries, soit prélevés dans leur environnement (Miransari 2017. Acosta-Motos et al., 2020). En cas de stress, ces solutés empêchent la dénaturation des protéines (Paul et Nair 2008 ; Street et al. 2006).

Plusieurs études ont rapporté des résultats similaires. Amin et al. (2023) ont obtenu une amélioration de la croissance des cultures d'orge inoculée par une souche de *Halomonas* sous stress salin par accumulation de proline. Dans deux autres études, des souches de *Halomonas* ont induit une augmentation de l'accumulation de proline chez des plants de maïs sous stress salin (Qurashi et Sabri, 2011 ; Aslam et Ali, 2018 ; Meinzer et al., 2023). Par ailleurs, une augmentation de l'accumulation de sucres solubles chez des plants de blé inoculés par *Halomonas sp.* (Tiwari et al., 2011) et chez des plants de pois chiche inoculés par *Halomonas sp.* (Qurashi et Sabri, 2012) sous stress.

Dans une étude de Singh et Jha (2016), l'inoculation de *Serratia marcescens* a amélioré la croissance du plant de blé sous stress salin (150-200 mM) et a réduit de manière significative l'inhibition de la croissance des plantes (15 à 85 %) causée par les facteurs de stress salins. L'application de cette souche a également modulé la concentration (de 20 à 75 %) de différents osmoprotecteurs (proline, malondialdéhyde, sucre soluble total, teneur totale en protéines et acide indole acétique) dans les plantes, suggérant son rôle dans la tolérance des plantes aux facteurs de stress salins. Maxton et *al.* (2018) ont rapporté que des souches de *Serratia sp.* ont induit l'accumulation de proline chez les plants de piment doux (*Capsicum annuum*) inoculé par cette souche à des concentrations de (60, 120 et 240) Mm NaCl.

Les souches de *Serratia spp.*, en tant que micro-organismes endophytes et rhizosphériques, lorsqu'elles interagissent avec les plantes, contribuent non seulement positivement à stimuler la croissance des plantes, à augmenter les rendements et à améliorer la qualité du sol dans des conditions normales, mais peuvent également être utilisées dans des environnements exposés à divers stress abiotiques et biotiques (Verma et *al.*, 2019). De plus, la promotion de la croissance des plantes par *Serratia spp.* peut réduire la dépendance aux engrais synthétiques, contribuant ainsi à des pratiques agricoles durables et respectueuses de l'environnement

Dernièrement, la plupart des recherches se sont concentrées sur l'isolement et l'étude des micro-organismes halotolérants et halophiles pour leur potentiel PGP (Oliva et *al.*, 2023 ; Cherif et *al.*, 2022 ; Alijani et *al.*, 2022). L'inoculation de bactéries halophiles/halotolérantes améliore la croissance des plantes sous stress salin. Ainsi, les souches sélectionnées dans cette étude sont capables de synthétiser un grand nombre de ces métabolites, ce qui pourrait expliquer leur efficacité à l'égard des champignons pathogènes cibles et la stimulation de la croissance du blé.

Ces résultats, suggèrent que ces bactéries (*Serratia-SB6*, *Serratia-CH11* et *Halomonas-SB39*) peuvent jouer un rôle clé dans l'amélioration de la tolérance au stress salin chez le blé.

Conclusion

Conclusion

Au cours des dernières décennies, la salinité des sols a augmenté de façon spectaculaire, ce qui a entraîné des effets néfastes sur les cultures. L'utilisation des PGPRs halophiles dans des conditions de salinité élevée pourrait constituer une approche durable pour améliorer la croissance et le rendement des cultures dans les sols salins. Ces micro-organismes ne favorisent pas seulement la croissance des plantes, mais améliorent également leur tolérance au stress salin et contribuent à la protection des plantes contre les divers agents pathogènes des plantes.

Dans la première partie de ce travail, les 70 souches isolées à partir de sols salins d'Algérie. Ces bactéries ont fait l'objet des tests préliminaires afin de sélectionner des souches capables de promouvoir la croissance du blé. Ces bactéries sont capables de produire des enzymes lytiques extracellulaires. 42,9% des isolats produisent la cellulase, 25,74% les amylases, 47,19% les protéases, 21,45% les uréases, 51,48% les chitinases et 31,46% les lipases. Ces enzymes sont d'un grand intérêt car elles contribuent à la fertilisation des sols en dégradant les polymères organiques. Elles sont aussi impliquées dans le biocontrôle par dépolymérisation des constituants des parois cellulaires des champignons phytopathogènes.

En outre, 100 % des isolats ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et de produire de l'ammoniac (NH₃). 53,33% ont le pouvoir de solubiliser le phosphate inorganique, et 33,33% produisent du cyanure d'hydrogène (HCN) et 6,67% produisent l'AIA

Tous ces résultats indiquent que les bactéries sélectionnées sont capables d'améliorer la croissance des plantes et peuvent être utilisées dans la lutte biologique. De ce fait, elles ont été utilisées dans l'étude *in vivo* sur le blé et ont été testées comme agents de biocontrôle contre des champignons pathogènes.

Les résultats de ces tests ont permis la sélection de trois souches bactériennes. Les souches sélectionnées ont été identifiées sur la base de la séquence d'ADNr 16S. Après amplification par PCR et séquençage de gènes les résultats ont montré que les souches SB6 et CH11 sont étroitement apparentées à *Serratia sp.* avec un taux de similitude de 98.84 % pour SB6, et de 98.98 % pour CH11. En revanche, la souche SB39 a donné 98.98 % de similitude avec la bactérie halophile *Halomonas sp.*

L'inoculation de bactéries halophiles/halotolérantes améliore la croissance des plants de blé sous stress salin. Dans les résultats obtenus, une amélioration significative de la croissance stimulée par les bactéries sous stress salin par rapport au témoin a été enregistrée.

L'activité antifongique a été observée chez les trois souches bactériennes que ce soit *in vitro* ou *in vivo* par l'application des trois souches bactériennes sur des pommes préalablement contaminées par des champignons phytopathogènes avec *A. niger* et *B. cinerea*. L'identification des molécules antifongiques par RP-HPLC a permis de mettre en évidence la capacités des trois souches rhizobactériennes *Serratia spp* et *Halomonas sp* de produire des composé phénoliques.

Bien que des études approfondies aient été menées pour comprendre le rôle des micro-organismes dans l'amélioration de la tolérance des plantes au stress salin et dans la lutte biologique, d'autres études plus approfondies s'imposent :

- Tester l'effet de ces bactéries sur d'autres types de plantes ;
- Réaliser des tests antifongiques sur les plantes ;
- Optimisation les conditions de production des métabolites antifongique produits par les trois souches bactériennes ;
- Tester l'effet des trois souches sur des sols pollués ;
- Développer des stratégies de culture plus durables qui intègrent ces bactéries ;
- Développement de biofertilisants à base de ces bactéries adaptées aux conditions extrêmes pourraient réduire la dépendance aux engrais chimiques.

Références bibliographiques

- Abboodi, A. H., Jobori, K. M. A., Jumaa, M. G., & Sultan, A. J. 2021.** Isolation of multi-trait plant growth-promoting *Serratia marcescens* and evaluation of growth-promoting effects on wheat plant under salinity stress. Iraqi journal of biotechnology, 1(20).
- Acosta-Motos, J.R., Penella, C., Hernández, J.A., Díaz-Vivancos, P., Sánchez-Blanco, M.J., Navarro, J.M., et al. 2020.** Towards a sustainable agriculture: Strategies involving phyto protectants against salt stress. Agronomy. 10(2): 194.
- Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G.H., Saadoun, I., Rawashdeh, R., Batayneh, S. 2004.** First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian, J. Plant Sci. 3, 463–471.
- Akram, M.S., Shahid, M., Tariq, M., Azeem, M., Javed, T., Saleem, S., Riaz, S. 2016.** Deciphering *Staphylococcus sciuri* SAT-17 mediated anti-oxidative defense mechanisms and growth modulations in salt stressed maize (*Zea mays* L.). Front Microbiol 7
- Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M. et al., 2022.** Antifungal Activity of *Serratia rubidaea* Mar61-01 Purified Prodigiosin Against *Colletotrichum nymphaeae*, the Causal Agent of Strawberry Anthracnose. J Plant Growth Regul 41, 585–595.
- Alijani, Z., Amini, J., Karimi, K., Pertot, I., 2023.** Characterization of the Mechanism of action of *Serratia rubidaea* Mar61-01 against *Botrytis cinerea* in Strawberries. Plants, 12, 154.
- Amin, H., Tanveer, S., & Ali, B. 2023.** Evaluation of role of bacillus and *Halomonas* strains in improving the growth of barley crop under salt stress. Ravian Journal of Plant Sciences, 01(01): 08-24.
- Anne, P. 1945.** Sur le dosage rapide du carbone oranique dans les sols. Annales Agronomiques, 5(2), 161-172.
- Arnon, D.I. 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24: 1–15.
- Aslam, F.; Ali, B. 2018.** Halotolerant Bacterial Diversity Associated with *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. Improved Growth of Maize under Salinity Stress. Agronomy. 8, 131.
- Asuming-Brempong, S, Aferi N.K. 2014.** Isolation of phosphate solubilizing bacteria from tropical soil. G AdvRes J AgrSci. 3(1):8-15 ISSN: 2315-5094.

- Azeem, S., Agha, S.I., Jamil, N., Tabassum, B., Ahmed, S., Raheem, A., Jahan, N., Ali, N., Khan, A., 2022.** Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi. *Rev Argent Microbiol.*, 54(3):233–242
- Arzanesh, M.H., Alikhani, H., Khavazi, K., et al. 2011.** Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum sp.* under drought stress. *World J Microbiol Biotechnol* 27:197–205.
- Banerjee, S., Sanjay, K. R., Chethan, S., & Malleshi, N. G. 2012.** Finger millet (*Eleusine coracana*) polyphenols: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *African journal of food science*, 6(13), 362-374.
- Basile-Doelsch, I. 2022.** Recyclage agricole des déchets organiques dans les sols tropicaux (île de la Réunion). *Geoderma*, 183-184, 183-184 [https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.03.015\[1\]](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.03.015[1])
- Becker, D., Stanke, R., Fendrik, I., Frommer, W.B., Vanderleyden, J., Kaiser W.M., et Hedrich, R. 2002.** Expression of the NH₄⁺ -transporter gene LEAMT1; 2 is induced in tomato roots upon association with N₂- fixing bacteria. *Planta*, 215: 424-429.
- Beneduzi, A., & Passaglia, L. M. 2011.** Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting bacilli. *Bacteria in agrobiology: plant growth responses*, 1-20.
- Ben Rejeb, K.B., Abdelly, C., & Savouré, A. 2012.** La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biologie aujourd'hui*, 206(4), 291-299.
- Bensidhoum, L., RAI, A., Tabli, N., Kahouadji, N., Khaber, M. et Nabti, E. 2015.** Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus sp.* strain S5LiBe under abiotic stress. *IJSRST*. 1(6): 7-14.
- Bensidhoum, L., Nabti, E., Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., ... & Hartmann, A. 2016.** Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *European Journal of Soil Biology*, 75, 38-46.
- Blumer, C. et D. Haas. 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173: 170-177.

- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassan, F., Luna, V., 2007.** Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74:874–880.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverston, S.E. 1991.** Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535–538.
- Bukhat, S., Manzoor, H., Zafar, Z.U., Azeem, F., Rasul, S. 2019.** L'adaptabilité photosynthétique induite par l'acide salicylique de *Raphanus sativus* au stress salin est associée à la capacité antioxydante J. Régul. de croissance des plantes. pp. 1 - 14
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E. C., & Vieira, J. D. G. 2006.** Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham.(Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3), 353-359.
- Chamkhi, I., Sbabou, L., & Aurag, J. 2023.** Isolation and screening of multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) colonizing saffron (*Crocus sativus* L.) rhizosphere. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 51, 102730.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B., Dey, P., et al. 2015.** Role of microorganisms in alleviation of abiotic stresses for sustainable agriculture. In: *Abiotic stresses in crop plants*. CABI, Wallingford, pp 232–253
- Cherif, H., Sghaier, I., Hassen, W., Amara, C., Masmoudi, A. S., Cherif, A., & Neifar, M. 2022.** *Halomonas desertis* G11, *Pseudomonas rhizophila* S211 and *Oceanobacillus iheyensis* E9 as biological control agents against wheat fungal pathogens: PGPB consortia optimization through mixture design and response surface analysis. *Int. Clin. Pathol. J.* 9, 20-28.
- Christensen, W.B. 1946.** Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.* 52, 461–466.
- Dennis, C., & Webster, J. 1971.** Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 363–369.

- Desale, P., Patel, B., Singh, S., Malhotra, A., Nawani, N., 2014.** Plantgrowth promoting properties of *Halobacillus sp.* and *Halomonas sp.* in presence of salinity and heavy metals. *JBasic Microbiol.* 54:781–791
- Desoky, E. S. M., Saad, A. M., El-Saadony, M. T., Merwad, A. R. M., & Rady, M. M. 2020.** Plant growth-promoting rhizobacteria: Potential improvement in antioxidant defense system and suppression of oxidative stress for alleviating salinity stress in *Triticum aestivum* (L.) plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101878.
- Dragojević, M., Đokić, L., Stanković, N., Raičević, V., Karličić, V., Lalević, B., & Jovičić-Petrović, J. 2023.** Plant growth promoting *Halomonas* from roots of halophytes as a strategy to improve crop resistance to soil salinity. In *ICGEB WORKSHOP: Trends in microbial solutions for sustainable agriculture* (pp. 71-71). Belgrade: Faculty of Biology.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., et Smith, F. 1956.** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.
- Duca, D.R. & Glick, B.R., 2020.** Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied microbiology and biotechnology.* 104, 8607-8619.
- Dziedzinski, M., Kobus-Cisowska, J., Szymanowska, D., Stuper-Szablewska, K., & Baranowska, M. 2020.** Identification of polyphenols from coniferous shoots as natural antioxidants and antimicrobial compounds. *Molecules*, 25(15), 3527.
- Egamberdieva, D., Berg, G., Lindström, K., & Räsänen, L. A. 2010a.** Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *European Journal of Soil Biology*, 46(3-4), 269-272.
- Egamberdieva, D., Renella, G., Wirth, S., Islam, R. 2010b.** Enzyme activities in the rhizosphere of plants. Pages 149-166. *Soil enzymology*, Springer.
- 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. *Front. Microbiol.*;10:2791.
- El Midaoui, B., Dhieb, C., Rebib, H., Ayari, S., Boudabous, A.R.A., Sadfi-Zouaoui, N. 2007.** Contribution à l'étude de quelques mécanismes d'adaptation à la salinité chez le tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.). *Revue THE* n° 136, pp. 29-34.

Essghaier, B., Dhieb, C., Rebib, H., Ayari, S., Boudabous, A.R.A., Sadfi-Zouaoui, N., 2014. Antimicrobial behavior of intracellular proteins from two moderately halophilic bacteria: strain J31 of *Terribacillus halophilus* and strain M3-23 of *Virgibacillus marismortui*. *J Plant Pathol Microb.*5:214.

Etesami, H., Maheshwari, D.K., 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 156, 225–246.

Fokkema, N.J. 1978. Fungal antagonism in the phyllosphere. *Ann. Appl. Biol.* 89, 115–117.

Fowler, J. L. 1991. Interaction of salinity and temperature on the germination of crame. *Agron. J.* 83: 169- 172.

Garcia-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R., 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering.*2: 183-205.

Giri, B., Varma, A. 2019. *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions.* Springer International Publishing.

Gong, Y., Chen, L. J., Pan, S. Y., Li, X. W., Xu, M. J., Zhang, C. M., Xing, K., Qin, S. 2020. Antifungal potential evaluation and alleviation of salt stress in tomato seedlings by a halotolerant plant growth-promoting actinomycete *Streptomyces sp.* KLBMP5084. *Rhizosphere*, 16, 100262.

Gowdar, S. B., Deepa, H., & Amaresh, Y. S. 2018. A brief review on biocontrol potential and PGPR traits of *Streptomyces sp.* for the management of plant diseases. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 03-07.

Habib, S. H., Kausar, H., & Saud, H. M. 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed research international*, 2016(1), 6284547.

Hamaoui, B., Abbad, J., Burdman, S., et al. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* 21:553–560

Hardie, M. & Doyle, R. 2012. Measuring Soil Salinity. In: S. S. and C. T. A. (eds.) Plant Salt Tolerance: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology vol 913. Springer Science Business Media LLC, Netherlands. pp. 415-425

Ha-Tran, D.M., Nguyen, T.T.M., Hung, S.-H., Huang, E., Huang, C.-C., 2021. Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3154.

Hmiri, S., Amrani, N., & Rahouti, M. 2011. Détermination in vitro de l'activité antifongique des vapeurs d'eugénol et d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Tanacetum annuum* L. vis-à-vis de trois champignons responsables de la pourriture des pommes en post-récolte. *Acta Botanica Gallica*, 158(4), 609-616.

Hsu, S.C.; Lockwood, J. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29, 422–426.

Huang, Y., Sun, C.C., Guan, X.N., Lian, S., Li, B., Wang, C. 2021. Butylated hydroxytoluene induced resistance against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit. *Front. Microbiol.* 11, 599062.

Ilyas, N., Mazhar, R., Yasmin, H., Khan, W., Iqbal, S., Enshasy, H. E., & Dailin, D. J. 2020. Rhizobacteria isolated from saline soil induce systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) against salinity stress. *Agronomy*, 10(7), 989.

Jha, Y., & Subramanian, R. B. 2013. Paddy plants inoculated with PGPR show better growth physiology and nutrient content under saline conditions. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(2), 213–219.

Jimtha, J. C., Jishma, P., Sreelekha, S., Chithra, S., and Radhakrishnan, E. K., 2017. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia* sp. *Rhizosphere* 3, 105-108.

Jorjandi, M., Shahidi Bonjar, G.H., Baghizadeh, A., Sharifi Sirchi, G.R., Massumi, H., Baniasadi, F., Aghighi, S., Rashid Farokhi, P. 2009. Biocontrol of *Botrytis allii* Munn the causal agent of neck rot, the post-harvest disease in onion, by use of a new Iranian isolate of *Streptomyces*. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 4, 72–78.

- Joseph, B., Ranjan Patra, R., et Lawrence. R. 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.* 1: 141- 152.
- Kaddes, A., Fauconnier, M.L., Sassi, K., Berhal, C., Nasraoui B. & M. Jijakli, H. 2020.** «Efficacité des Composés Organiques Volatils fongiques (synthèse bibliographique)», *BASE* [En ligne], Volume 24, Numéro 2, 81-98 URL : <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=18531>.
- Kamou, N.N., Dubey, M., Tzelepis, G., Menexes, G., Papadakis, E.N., Karlsson, M., agopodi, A.L., Jensen, D.F., 2016.** Investigating the compatibility of the biocontrol agent *Clonostachys rosea* IK726 with prodigiosin-producing *Serratia rubidaea* S55 and phenazine producing *Pseudomonas chlororaphis* ToZa7. *Arch. Microbiol.*, 198, 369–377
- Kashyap, B.K., Solanki, M.K., Pandey, A.K., Prabha, S., Kumar, P., Kumari, B. 2019.** *Bacillus* as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a promising green agriculture technology. Pages 219-236. *Plant Health Under Biotic Stress*, Springer.
- Khalil, M. S. M., Hassan, M. H. A.-R., Mahmoud, A. F., Morsy, K. M. M. 2022.** Involvement of Secondary Metabolites and Extracellular Lytic Enzymes Produced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Inhibiting the Soilborne Pathogens in Faba Bean Plants. *J Trop Plant Pests Dis* 22, 100-108.
- Khan, N., Bano, A., Rahman, M.A., Guo, J., Kang, Z., Babar, M.A. 2019.** Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. *Scientific reports* 9: 1-19.
- Kiani-Pouya, A., & Rasouli, F. 2014.** The potential of leaf chlorophyll content to screen bread-wheat genotypes in saline condition. *Photosynthetica*, 52(2), 288-300.
- Kilani-Feki, O., Ben Khedher, S., Dammak, M., Kamoun, A., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Tounsi, S., 2016.** Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biol. aControl* 95, 73–82.
- Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. 2002.** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars from pulms. *Food Chem.* 81, 321–326.

- Kumar, S.; Karan, R.; Kapoor, S.; Singh, S.P.; Khare, S.K. 2012.** Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Braz. J. Microbiol.* 43, 1595–1603.
- Kopečný, J.; Hodrová, B.; Stewart, C.S. 1996.** The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 195–198.
- Korsten, L., & De Jager, E.S. 1995.** Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *S. Afr. Avocado Grow. Assoc. Yearb.* 18, 124–130.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A.V., Vanderleyden, J. 2000.** Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends Microbiol* 8:298–300
- Lee, J.Y.; Hwang, B.K. 2002.** Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48, 407–417.
- Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., & Hochman, A. 1992.** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40, 163-171.
- Li, Q.; Ning, P.; Zheng, L.; Huang, J.; Li, G.; Hsiang, T. 2010.** Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharvest Biol. Technol.* 58, 157–165.
- Li, X., Li, B., Cai, S., Zhang, Y., Xu, M., Zhang, C., Yuan, B., Xing, K., & Qin, S. 2020.** Identification of rhizospheric actinomycete *Streptomyces lavendulae* SPS-33 and the inhibitory effect of its volatile organic compounds against *Ceratocystis Fimbriata* in postharvest sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.). *Microorganisms* 8 (3), 319.
- Lichtenthaler, H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Livinska, O., Ivaschenko, O., Garmasheva, I., & Kovalenko, N., 2016.** The screening of lactic acid bacteria with antioxidant properties. *10.3934/Microbiology*, 4.447
- Lorck, H. 1948.** Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* 1, 142–146.
- Lotfi, N., Soleimani, A., Çakmakçı, R. et al. 2022.** Caractérisation des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) chez le noyer persan associées à la tolérance au stress hydrique. *Sci Rep* 12, 12725. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16852-6>

- Lu, L., Lu, H., Wu, C., Fang, W., Yu, C., Ye, C., & al. 2013.** *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 85, 196–202.
- Mahdi, I., Hafidi, M., Allaoui, A., et Biskri, L. 2021.** La bactérie endophyte halotolérante *Serratia rubidaea* ED1 améliore la solubilisation du phosphate et favorise la germination des graines. *Agriculture* 11:224. doi: 10.3390/agriculture11030224
- Mahdieh, S., Gholam, H.S.B., Gholam, R.S.S. 2016.** Post-harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne Actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biol. Technol.* 112, 46–54.
- Masmoudi, F., Abdelmaleka, N., Tounsia, S., Dunlapb, C.A., Triguia, M., 2019.** Abiotic stress resistance, plant growth promotion and antifungal potential of halotolerant bacteria from a Tunisian solar saltern. *Microbiological Research* 229, 126331.
- Mathieu, C., & Pieltain, F. 2003.** Analyse chimique des sols : méthodes choisies. Lavoisier-Tec & Doc.
- Maxton, A., Singh, P., et Masih, SA 2018.** Les bactéries productrices d'ACC désaminase et induction d'une tolérance à la sécheresse et au sel chez *Capsicum annuum* . *J. Plant Nutr.* 41, 574–583. doi: 10.1080/01904167.2017.1392574
- Meinzer, M., Ahmad, N., Nielsen, B.L. 2023.** Halophilic Plant-Associated Bacteria with Plant-Growth-Promoting Potential. *Microorganisms* 11, 2910.
- Miransari M. 2014.** Plant growth promoting rhizobacteria. *J Plant Nutr* 37:2227–2235. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.920384>
- Miransari, M. 2017.** The interactions of soil microbes affecting stress alleviation in agroecosystems. In: *Probiotics in agroecosystem*. Springer, Singapore, pp 31–50
- Mohammadi, K., Heidari, G., Khalesro, S., & Sohrabi, Y. 2011.** Soil management, microorganisms and organic matter interactions: A review. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19840.
- Mukherjee, P., Mitra, A. and Roy, M., 2019.** *Halomonas* rhizobacteria of avicennia marina of indian sundarbans promote rice growth under saline and heavy metal stresses through exopolysaccharide production. *Front. Microbiol.* 10:1207.

Nadeem, SM, Zahir, ZA, Naveed, M., et Nawaz, S. 2013. Atténuation de l'impact négatif induit par la salinité sur la croissance et le rendement du blé par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes dans des conditions naturellement salines. *Ann. Microbiol.* 63, 225–232. doi: 10.1007/s13213-012-0465-0

Naumann, J. C., Young, D. R., & Anderson, J. E. 2007. Linking leaf chlorophyll fluorescence properties to physiological responses for detection of salt and drought stress in coastal plant species. *Physiologia plantarum*, 131(3), 422-433.

Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265- 270.

N'Guessan, A.H.O., Dago Déliko, C.E., Akhanovna, J., Békro, M., Békro, Y.A. 2011. Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Génie Ind.* 6, 55–61.

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 electrontransport and antioxidative enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology* , vol. 17, no. 1, pp. 19-26.

Oliva, G., Di Stasio, L., Vigliotta, G., Guarino, F., Cicatelli, A. and Castiglione, S., 2023. Exploring the potential of four novel halotolerant bacterial strains as plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) under saline conditions. *Appl. Sci.* 13, 4320.

Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.

Orhan, F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian journal of microbiology*, 47(3), 621-627.

Pandey, N., & Sharma, O. P. 2020. Potential *Bacillus* strains having plant growth promoting and volatile activity against pathogens of Pea (*Pisum sativum* L.). *Annals of Plant Protection Sciences*, 28(1), 52-59.

- Paul, D., & Nair, S. 2008.** Stress adaptations in a plant growth promoting *Rhizobacterium* (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *J Basic Microbiol* 48:378-384
- Pepper, I. L. & Gerba, C. P. 2004.** Environmental Microbiology, a Laboratory Manual, 2nd edition. Elsevier Academic Pressr, USA.
- Pikovskaya, R.I. 1948.** Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- Pochon, J., & Tardieux, P. 1962.** Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Éditions : Tourelle. Pp : 111.
- Puri, S.C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N., Spiteller, M., 2005.** An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Products*. 68:1717-9.
- Qurashi, A.W., Sabri, A.N. 2011.** Alleviation of salt stress by *Halomonas sp.* and osmolytes in *Zea mays*. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 17778–17788.
- Qurashi, A.W., Sabri, A.N. 2012.** Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.* 43, 1183–1191. [Google Scholar] [CrossRef]
- Qurashi, A.W., Sabri, A.N. 2013.** Osmolyte accumulation in moderately halophilic bacteria improves salt tolerance of chickpea. *Pak J Bot.* 45:1011–1016.30
- Rai, A., Bensidhoum, L., Tabli, N., Bouaoud, Y., Naili, F., Cruz, C., Nabti, E., 2016.** A *Pseudomonas Protegens* with high antifungal activity protects apple fruits against *Botrytis Cinerea* Gray Mold. *Int. J. Sci. Res. Sci. Tech.* 2, 227–237.
- Rajendran, N. 2015.** Environmental Diversity and Biological Survivability of Halophilic Bacteria. In: Maheshwari, D., Saraf, M. (eds) Halophiles. Sustainable Development and Biodiversity, vol 6. Springer, Cham.
- Rajput, L., Imran, A., Mubeen, F., Hafeez, F.Y. 2018.** Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth promotion by halo-tolerant PGPR-consortium. *SOIL & ENVIRONMENT* 37: 178-189.

- Ramette, A., Frapolli, M., Defago, G., & Moenne-Loccoz, Y. 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonads* and their relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4542-4551.
- Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R. S., Joshi, K., Padhiyar, S., Vyas, U. M., & Kheni, J. K. 2022.** Plant growth promoting characteristics of halophilic and halotolerant bacteria isolated from coastal regions of Saurashtra Gujarat. *Scientific reports*, 12(1), 4699.
- Reddy, P.S.; Jogeswar, G.; Rasineni, G.K.; Maheswari, M.; Reddy, A.R.; Varshney, R.K.; Kishor, P.K. 2015.** Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiol. Biochem.* 94, 104–113.
- Reddy, E.C. et al. 2022.** Hydrolytic Enzyme Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Plant Growth Promotion and Biocontrol. In: Sayyed, R.Z., Uarrota, V.G. (eds) *Secondary Metabolites and Volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07559-9_15
- Rodríguez, H., Fraga, R., González, T., Bashan, Y. 2007.** Genetic of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth promoting bacteria. In: Velázquez, E., Rodríguez-Barrueco, C. (Eds.), *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 15–21.
- Rogers, M. E., Craig, A. D., Munns, R. E., Colmer, T. D., Nichols, P. G. H., Malcolm, C. V., Barrett-Lennard, E.G., Brown, A.J., Semple, W.S., Evans, P.M., Cowley, K., Hughes, S.J., Snowball, R., Bennett, S.J., Sweeney, G.C., Dear, B.S., & Ewing, M. A. 2006.** Corrigendum to: The potential for developing fodder plants for the salt-affected areas of southern and eastern Australia: an overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(12), 1665-1665.
- Roussel, O., Bourmeau, E., & Walter, C. 2001.** Evaluation du déficit en matière organique des sols français et des besoins potentiels en amendements organiques. *Etude et gestion des sols*, 8(1), 65-81.

Sagahón, I.P.; Reyes, M.A.A.; Rojas, H.V.S.; Cuenca, A.A.; Jurado, A.T.; Alvarez, I.O.C.; Flores, Y.M. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5522–5537.

Sall, S. N., Ndour, N. Y. B., Diédhiou-Sall, S., Dick, R., & Chotte, J. L. 2015. Microbial response to salinity stress in a tropical sandy soil amended with native shrub residues or inorganic fertilizer. *Journal of environmental management*, 161, 30-37.

Santos, C. V. 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves, *Scientia Horticulturae*, vol. 103, no.1, pp. 93-99.

Satria, P.B.U., Liliek, S., & Pearl, P.C.C. 2021. Characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) From Saline Soil in Taiwan. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **709** 012079.

Shahid, M., Javed, M.T., Mushtaq, A., Akram, M.S., Mahmood, F., Ahmed, T., Noman, M., Azeem, M. 2019. Microbe-mediated mitigation of cadmium toxicity in plants. In: *Cadmium toxicity and tolerance in plants*. Academic Press, pp 427-449

Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.

Sharma, S., Kumar, V., & Tripathi, R. B. 2011. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of microbiology and Biotechnology Research*, 1(2), 90-95.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2, 1-14.

Sierra, G.A. 1957. A simple method for the detection of lyolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *A. Van. Leeuw.* 28, 15-22.

Singh, R.P., & Jha, P.N. 2015. Plant growth promoting potential of ACC deaminase rhizospheric bacteria isolated from *Aerva javanica*: a plant adapted to saline environments. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4: 142-152.

- Singh, R. P., & Jha, P. N. 2016.** The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). PLoS one, 11(6), e0155026.
- Skorokhod, I., & Kurdysh, I. 2014.** The low-molecular weight antioxidants of microorganisms. Mikrobiology, 76: 48-59.
- Sood, G., Kaushal, R., Panwar, G., et Dhiman, M. 2019.** Effet des rhizobactéries indigènes favorisant la croissance des plantes sur la productivité du blé (*Triticum Aestivum* L.) et les nutriments du sol. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 50, 141–152. doi: 10.1080/00103624.2018.1556282
- Street, T.O., Bolen, D.W., Rose, G.D. 2006.** A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. Proc Natl Acad Sci 103:13997-14002.
- Sun, M., Liu, J., Li, J., Huang, Y., 2022.** Endophytic Bacterium *Serratia plymuthica* From Chinese Leek Suppressed Apple Ring Rot on Postharvest Apple Fruit. Front. Microbiol. 12:802887.
- Szekely, G., Abraham, E., Cselo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C & Szabados, L. 2008.** Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. Plant J, 53, 11-28.
- Tabli, N., Rai, A., Bensidhoum, L., Palmieri, G., Gogliettino, M., Cocca, E., Consigliob, C., Ciloc, F., Bubicic, G., & Nabti, E. 2018.** Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. Biological Control, 117, 78-86.
- Terrat, S., Karimi, B., Dequiedt, S., Prévost-Bouré, N. C., Horrigue, W., Djemiel, C., & Ranjard, L. 2018.** La caractérisation des communautés microbiennes du sol à l'échelle de la France pour évaluer l'effet de l'usage des sols. Innovations Agronomiques, 69, 27-37.
- 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. Biol. Fertil. Soils 47, 907-916. [CrossRef]

- Trejo-López, J.A., Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C.A., Villagómez-Ibarra, J.R., Falfán-Cortes, R.N., Acevedo-Sandoval, O.A., Castro-Rosas, J., 2022.** Isolation and Molecular Identification of *Serratia* Strains Producing Chitinases, Glucanases, Cellulases, and Prodigiosin and Determination of Their Antifungal Effect against *Colletotrichum siamense* and *Alternaria alternata* In Vitro and on Mango Fruit. *Int. J. Plant Biol.*, 13, 281–297.
- Troll, W., & Lindsley, J. 1955.** A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry*, 215, 655-661.
- USDA Economic Research Service (ERS). (2019).** Agricultural Chemical Use: Fungicides.
- Verma, M., Mishra, J., et Arora, NK 2019.** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Diversity and Applications. In: *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. éd. RC Sobti, NK Arora, et R. Kothari (Berlin : Springer), 129–173.
- Vinoth, R. S., Kanikkai, R. A., Babu, V. A., Manoj, G. T., Naman, H. S., Johnson, A. J., Infant, S. B. et Sathiyaseelan, K. 2009.** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent. res. sci. Technol.* 1(1): 008–013.
- Xiao, C.L., Kim, Y.K. 2008.** Postharvest fruit rots in apples caused by *Botrytis cinerea*, *Phacidiopycnis washingtonensis*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. *Online Plant Health Prog.* 9, 34.
- Zennouhi, O., El Mderssa, M., Ibijbjen, J., & Nassiri, L. 2018.** Caractérisation génotypique de bactéries solubilisant le phosphate isolées de nodules racinaires d'*Adenocarpus boudyi* (Maire), endémique du Moyen Atlas central marocain. *Journal of Applied Biosciences*, 126, 12630-12637.
- Zhao, Y., Wang, Y., Jiang, Z.-T., Li, R. 2017.** Screening and evaluation of active compounds in polyphenol mixtures by HPLC coupled with chemical methodology and its application. *Food Chem.*, 227, 187–193.
- 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 Microbiol. Lett.* 2017, 364, fnx091. [CrossRef] [PubMed]

Zihao, S., Baihui, H., Cuicui, W., Shiyu, L., Yuxin, X., Baohua, L., Caixia, W. 2023. Biocontrol features of *Pseudomonas syringae* B-1 against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit. *Front. Microbiol.* 11, 599062. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.599062>.

ANNEXES

Annexe I. Composition des milieux de culture et réactifs**Composition d'un litre de PBS :**

NaCl.....	8g.
KCl.....	0,2g.
KH ₂ PO ₄	0,24g.
Na ₂ HPO ₄	1,44g.
Eau distillée.....	1000ml.

pH = 7,00 ± 0,2.

Composition d'un litre du réactif Salkowsky :

Eau distillée.....	1000ml.
H ₂ SO ₄	300ml.
FeCl ₃	15ml.

Réactif de Nessler :

KI	3,5 g.
HgI ₂	1,3 g.
H ₂ O.....	70 ml.
NaOH (30%).....	30 ml.

Réactif de ninhydrine :

Ninhydrine	5 g
Acide acétique	300 ml
Acide orthophosphorique 85 %	80 ml
Eau distillé	120 ml

Potato Dextrose Agar (PDA) :

Pommes de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	15 g

pH = 5,4 ± 0,2.

Annexe II. Résultats des différents tests des activités enzymatiques des isolats bactériens prélevés à partir des différents échantillons

	Lipase	Estérase	Amylase	Cellulase	Uréase	Protéase	Chitinase
1	++	+++	+	-	-	+++	-
2	-	-	+++	-	-	+++	++
3	-	-	+++	-	-	+++	++
4	-	++	-	-	-	++	-
5	-	-	+	+	-	-	-
6	-	-	+++	+	-	+++	+++
7	-	-	-	-	+++	-	+++
8	-	-	-	-	+++	-	+++
9	-	-	-	-	+++	-	+++
10	+++	+++	+	+	++	-	-
11	++	++	-	+	-	+++	+++
12	-	-	-	++	+	+++	+++
13	-	-	-	++	-	+++	+++
14	-	-	-	+	-	++	++
15	-	-	-	-	+++	-	++
16	-	-	-	-	+++	-	++
17	-	++	-	+	-	+++	+++
18	-	-	-	++	-	+++	+++
19	-	-	-	-	+++	++	-
20	++	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	++	-
23	-	-	-	++	-	+++	+++
24	-	+	-	+	-	+++	+++
25	-	+	-	+	-	+++	+++
26	-	-	-	++	-	+++	+++
27	-	-	-	-	-	++	-

Annexes

28	-	-	-	++	-	+++	+++
29	++	++	-	-	-	+++	+++
30	-	-	-	++	-	+++	+++
31	-	-	-	++	-	+++	+++
32	++	-	-	-	-	-	-
33	+	+	-	-	-	-	-
34	-	-	-	++	-	-	+++
35	-	-	+	+	-	-	+++
36	-	-	-	++	-	-	+++
37	-	-	-	++	-	-	+++
38	+	-	+++	-	-	+++	++
39	-	+	+++	-	++	+++	++
40	++	-	-	-	-	-	-
41	-	-	+++	-	-	+++	++
42	+	+	-	+	++	-	++
43	+	+	-	-	-	-	-
44	-	-	+++	-	-	++	++
45	++	-	-	+	-	-	-
46	-	+	-	+	-	++	-
47	+	-	-	-	-	-	-
48	-	-	+++	+	-	-	-
49	+++	++	+++	++	-	++	-
50	+	-	-	-	-	-	-
51	+	-	-	-	-	-	-
52	+++	++	+++	++	-	+++	-
53	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-
55	++	+	-	+	+	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-

58	++	-	-	-	-	+++	-
59	-	-	+	-	-	-	+
60	++	+	+++	++	-	+	-
61	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-
63	++	+	+++	++	-	+	-
64	-	++	+++	+	-	+++	-
65	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	+++	-	++
67	-	-	-	-	+++	-	++
68	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	+++	-	++
70	-	-	-	-	+++	-	++

Annexe III. Résultats des différents tests des traits PGP des six isolats bactériens sélectionnés

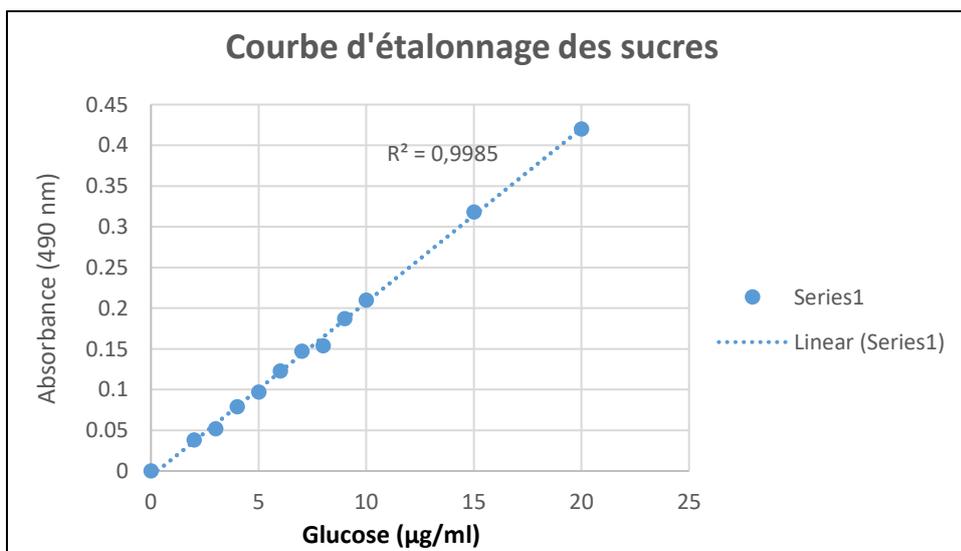
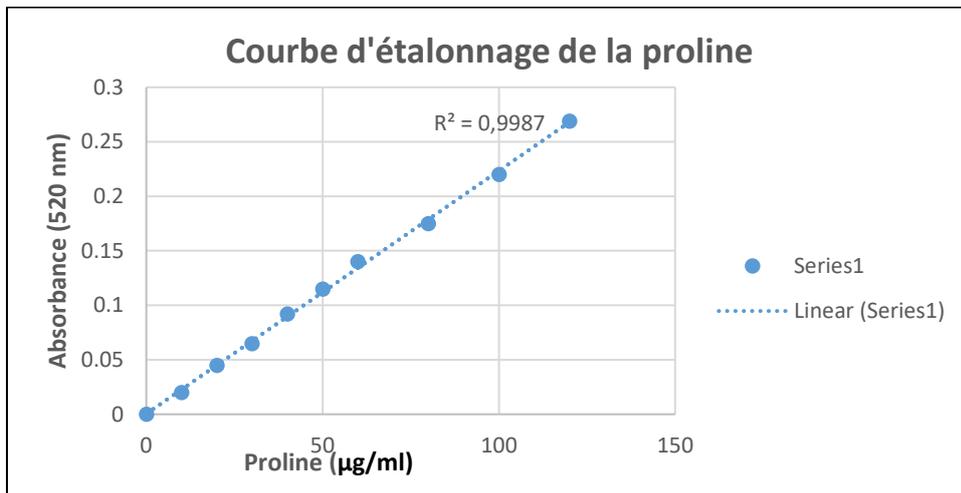
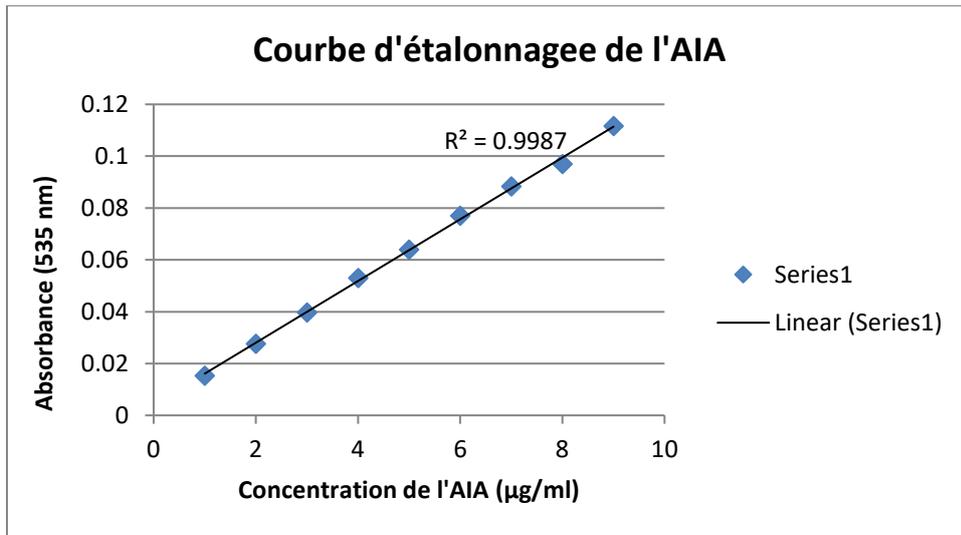
a. Résultats des tests enzymatiques :

	Lipase	Estérase	Amylase	Cellulase	Uréase	Protéase	Chitinase	Score
SB6	-	-	+++	+	-	+++	+++	10
CH11	++	++	-	+	-	+++	+++	11
CH12	-	-	-	++	+	+++	+++	09
SB29	++	++	-	-	-	+++	+++	10
SB39	-	-	+++	+	++	+++	++	10
CH42	+	+	-	+	++	-	++	07

b. Résultats de l'activité PGP :

	Solubilisation des phosphates	Production de HCN	Production de NH ₃	Fixation de N ₂	Production d'AIA	Score
SB6	++	+	++	+	-	6
CH11	++	-	+	+	-	4
CH12	-	-	+	+	-	2
SB29	+	-	++	++	-	5
SB39	-	+++	+++	++	-	8
CH42	-	-	++	++	-	4

Annexe IV. Courbes d'étalonnage



Article

Halophilic Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Producers of Antifungal Metabolites under Salt Stress

Karima Ould Ouali ^{1,2}, Karim Houali ¹, Cristina Cruz ³, Juliana Melo ³, Yasmina Benakli ¹, Lila Ousmer ¹, Zahia Madani ¹ and El-Hafid Nabti ^{4,*}

- ¹ Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Tizi Ouzou 15000, Algeria; karima_ouldouali@hotmail.com (K.O.O.); houlitizi@yahoo.fr (K.H.); benakli.yasmina@yahoo.com (Y.B.); cqalila@yahoo.fr (L.O.); concepteco@yahoo.fr (Z.M.)
- ² Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Setif 19000, Algeria
- ³ cE3c—Center for Ecology, Evolution and Environmental Changes & CHANGE—Global Change and Sustainability Institute, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal; ccruz@fc.ul.pt (C.C.); jmdconceicao@ciencias.ulisboa.pt (J.M.)
- ⁴ Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables, Faculté des Sciences de la Nature et de le Vie, Université de Bejaïa, Bejaïa 06000, Algeria
- * Correspondence: nabtielhafid1977@yahoo.com

Abstract: Salinity is one of the main factors causing soil deterioration, making it unsuitable for agriculture. It is well documented that the application of halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria (PGPR: plant growth-promoting rhizobacteria) with biological control activities as an inoculant of cultivated plants offers a biological alternative to the use of agrochemicals, particularly when subjected to salt stress. From this perspective, 70 bacterial strains were isolated from saline soils (sebkha) in arid and semi-arid areas of Eastern Algeria. Three isolates were selected based on their ability to produce bioactive molecules allowing them to promote plant growth, such as hydrolytic enzymes, indole acetic acid (auxin-phytohormone), HCN, NH₃, etc. Two of these isolates belonged to the genus *Serratia* and the third was a halophilic *Halomonas* bacteria. These bacteria were identified based on their 16S rDNA sequences. Antagonism tests against phytopathogenic fungi were carried out. The identification of the antifungal molecules produced by these bacteria was determined using high-performance liquid chromatography. These bacteria can inhibit mycelial development against phytopathogenic fungi with rates reaching 80.67% against *Botrytis cinerea*, 76.22% against *Aspergillus niger*, and 66.67% against *Fusarium culmorum* for *Serratia* sp. The strain *Halomonas* sp. inhibited mycelial growth through the production of volatile substances of *Aspergillus niger* at 71.29%, *Aspergillus flavus* at 75.49%, and *Penicillium glabrum* at a rate of 72.22%. The identification of the antifungal molecules produced by these three bacteria using HPLC revealed that they were polyphenols, which makes these strains the first rhizobacteria capable of producing phenolic compounds. Finally, pot tests to determine the effectiveness of these strains in promoting wheat growth under salinity stress (125 mM, 150 mM, and 200 mM) was carried out. The results revealed that a consortium of two isolates (*Serratia* sp. and *Halomonas* sp.) performed best at 125 mM. However, at higher concentrations, it was the halophilic bacteria *Halomonas* sp. that gave the best result. In all cases, there was a significant improvement in the growth of wheat seedlings inoculated with the bacteria compared to non-inoculated controls.

Keywords: halophilic bacteria; salt stress; biological control; polyphenols; plant growth-promoting bacteria (PGPB)



Citation: Ould Ouali, K.; Houali, K.; Cruz, C.; Melo, J.; Benakli, Y.; Ousmer, L.; Madani, Z.; Nabti, E.-H. Halophilic Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Producers of Antifungal Metabolites under Salt Stress. *Agronomy* **2024**, *14*, 845. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040845>

Academic Editor: Roberto Barbato

Received: 4 February 2024

Revised: 30 March 2024

Accepted: 4 April 2024

Published: 18 April 2024



Copyright: © 2024 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

Soil salinization is a major challenge in arid and semi-arid regions, which seriously affects agricultural production worldwide [1,2]. According to the Food and Agriculture Organization (FAO), approximately 1 billion hectares of the world's land surface were

affected by salinization, which represents 8.7% of the planet's land surface; this causes an estimated 27.3 billion dollars in economic losses [3]. Each year, approximately 10 million hectares of the world's agricultural land is destroyed by salt accumulation [4].

Salinity has negative repercussions on soil properties, plant physiology, and development [5]. Saline soils have a high electrical conductivity (EC) and may impose ionic toxicity, osmotic and oxidative stress, and nutrient deficiency on plants and thus limit plant water absorption from the soil [2].

Many strategies, such as plant breeding, genetic engineering of plants, and agricultural techniques have been developed to fight against the effects of salinity on crop productivity. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) is one of the most recent developments [6] and is the one with the highest potential [7,8]. Many studies have shown that PGPR can promote plant growth directly or indirectly. Direct mechanisms refer to the ability of PGPR to fix nitrogen, dissolve organic or inorganic phosphorus, produce phytohormones such as auxin or indole-3-acetic acid (IAA), and produce other bioactive molecules that stimulate plant growth and development [9–13]. Indirect mechanisms refer to the potential of PGPR to prevent the development of phytopathogens, either through competition for space occupation and nutrient use or through the production of metabolites such as antibiotics or compounds inducing plant resistance [14–16].

Halotolerant and halophilic PGPRs may promote plant growth under salt stress through complex mechanisms, such as enhancing antioxidant enzymes to regulate reactive oxygen (ROS), enhancing the accumulation of intracellular osmolytes to ensure ionic balance, and through the accumulation of secondary metabolites [17–19].

Therefore, PGPR are able to increase plant tolerance to multiple and simultaneous stressors (biotic and abiotic) can be instrumental to developing more sustainable agriculture under the expected climate changes to hotter and dryer environments [20].

In this study, three bacterial strains were isolated from halophytic plant rhizospheres in arid and semi-arid regions of Eastern Algeria. Bacterial screening was performed based on the ability of the strains to produce hydrolytic enzymes, hydrogen cyanide, ammonia, indole acetic acid (IAA), and other PGPR traits. After molecular identification, the PGPR isolates tested for their *in vitro* ability to inhibit fungal growth and to enhance the growth of wheat plants under salt stress.

2. Materials and Methods

2.1. Soil Sampling

Sampling was performed at two sites: Sebket Bazer (36°03'16" N 5°40'35" E) and Chott El Hodna (35°25'34" N 4°44'39" E) in Eastern Algeria. In each site, ten soil samples were collected from the rhizospheres of wild halophilic plants.

The samples were transported to the laboratory at 4 °C in sterile plastic bags. From each soil sample, an aliquot of 10 g was homogenized in 10 mL of sterile physiological water. A volume of one hundred microliters was taken from each suspension and inoculated into liquid culture media for halophiles containing (in g/L): 2 KCl; 1 MgSO₄·7H₂O; 0.36 CaCl₂·2H₂O; 0.23 NaBr; 0.06 NaHCO₃; traces of FeCl₃; 5 peptone; 10 yeast extract; and 1 glucose at a pH of 7.2 ± 0.02. The NaCl concentration ranged from 0.5 M to 3 M. All tests were performed in triplicate. After 72 h of incubation at 28 °C, 10 µL of each culture was inoculated in the same medium supplemented with agar (15 g/L). Bacterial isolates (24 h old) were obtained from 70 colonies, and each originated from a single cell. The isolates were preserved in culture and/or cold conditions for the subsequent studies.

2.2. Production of Extracellular Lytic Enzymes

2.2.1. Cellulase

The extracellular cellulase determination was carried out using agar disks that were 6 mm in diameter containing young bacterial cultures. The disks were placed inside Petri dishes with Carder's medium (1986) containing (in g/L): 6 Na₂HPO₄; 3 KH₂PO₄; 0.5 NaCl; 1 NH₄Cl; 3 yeast extract; 7 CMC (carboxymethylcellulose); and 15 gar at a pH of 7.2 ± 0.02.

The plates were subsequently incubated at 28 °C for 8 days [21]. After the incubation period, a Congo red solution (0.1%) was poured onto the medium's surface. After 20 min, the Petri dish's surface was flooded again with 1 M NaCl solution and left to stand overnight. The appearance of a clear halo around the colonies indicated the degradation of CMC, reflecting the presence of extracellular cellulase activity.

2.2.2. Amylase

Discs of young bacterial cultures were placed on starch-based culture medium in order to demonstrate their ability to degrade starch. The medium was prepared according to Vinoth et al. [22] and contained (in g/L): 0.5 KNO₃; 1.0 K₂HPO₄; 0.2 MgSO₄; 0.1 CaCl₂; 0.001 FeCl₃; 10.0 soluble starch; 15.0 agar; 7.2 ± 0.02 pH. The Petri dishes incubated for 48–72 h at 28 °C. After the incubation period, a lugol solution (1%) was used to flood the culture medium inside the Petri dishes. After 5 min of contact, the plates washed with distilled water. The appearance of clear zones around the agar discs indicated the presence of extracellular amylase in the medium. Non-degraded starch appeared blackish blue.

2.2.3. Lipase

Discs of young bacterial cultures were placed on culture medium containing (in g/L): 10 peptone; 5.0 NaCl; 0.1 CaCl₂ 2H₂O; (1%, *v/v*) Tween 20; and 18 agar. The pH was adjusted to 7.4 ± 0.02. After 48 h of incubation at 28 °C, a clear halo appearance around the colonies was considered as a positive result [21,23].

2.2.4. Protease

The proteolytic activity was determined as described above, but using a culture medium containing (in g/L) 5 pancreatic casein; 2 yeast extract; 1 glucose; 15 agar. The Ph was adjusted to 7 ± 0.02. The medium was autoclaved at 120 °C for 20 min. In parallel, a 10% skimmed milk solution was prepared and autoclaved at 120 °C for 10 min. 100 mL of the skimmed milk solution was aseptically added to the culture medium. After incubation at 28 °C for 48 h, 2 mL of HCl (0.1 mol/L) are added to the surface of the Petri dishes. A positive result was indicated by the appearance of a clear halo around the colonies [21,24].

2.2.5. Urease

Based on Christensen's methods [25], urease was revealed using the agar disk method using a medium with following preparation (pH 6.8) in g per 950 mL of distilled water: 1 peptone; 1 glucose; 5 NaCl; 1.2 Na₂HPO₄; 0.8 KH₂PO₄; 0.012 phenol red; 15 agar. After autoclaving for 20 min at 120 °C, a sterile urea solution (40% *w/v*) was added to the medium. The solution spread out through the plates. Urease activity was detected as a pink halo around the colonies.

2.2.6. Chitinase

The following culture medium was used to detect the chitinase activity (in g/L): 0.8 to 0.6 colloidal chitin; 2.7 K₂HPO₄; 0.3 KH₂PO₄; 0.7 MgSO₄·7H₂O; 0.5 NaCl; 0.5 KCl; 0.13 yeast extract; 15 agar. The medium was inoculated with young culture disks and incubated at 28 °C for a minimum of 7 days. Chitinase activity was identified by a transparent halo appearance around each disc [26,27].

2.3. PGPR Traits

2.3.1. Nitrogen Fixation

The bacterial isolates were streaked on nitrogen-free "Burk's N-free" culture medium containing (in g/L): 10 glucose; 30 NaCl; 0.4 KH₂PO₄; 0.5 K₂HPO₄; 0.05 Na₂SO₄; 0.2 CaCl₂; 0.005 MgSO₄·7H₂O; 0.003 Na₂MoO₄; 15 agar. The development of bacterial colonies confirmed the capacity of the strain to fix atmospheric nitrogen.

2.3.2. Phosphate Solubilization

The bacterial isolates were incubated at 28 °C for 7 days on modified Pikovskaya medium containing (in g/L): 10 glucose; 5 Ca₃(PO₄)₂; 0.5 (NH₄)₂SO₄; 0.1 MgSO₄·7H₂O; 0.2 KCl; 0.5 yeast extract; 0.002 MnSO₄·H₂O; 0.002 FeSO₄·7H₂O; 50 NaCl; 15 agar.

2.3.3. Production of Ammonia (NH₃)

The isolates were inoculated in tubes containing 5 mL of peptone water (peptone 20 g/L and NaCl 30 g/L) and incubated at 28 °C for 48 h. After the incubation period, 0.25 mL of Nessler reagent was added to each tube. A color change from brown to yellow revealed the production of ammonium.

2.3.4. Production of Hydrogen Cyanide (HCN)

The HCN production was determined according to Lorck [28]. The bacterial isolates were streaked on nutrient agar supplemented with glycine (4.4 g/L). A sterile disk of Whatman paper was placed on the lid of the Petri dish and impregnated with a solution of sodium picrate (2% anhydrous sodium carbonate in 5% picric acid). Each plate was sealed with parafilm and incubated at 28 °C for 96 h. A color change from orange to brown indicated the production of HCN.

2.3.5. Production of Indole 3-Acetic Acid (IAA)

To determine the capacity of the strains to produce IAA-auxin-phytohormone, the Salkowski colorimetric method was used [29]. The bacterial isolate was inoculated in modified HM culture broth containing 1 mg/mL of tryptophan and 5% glucose. The cultures were incubated under shaking conditions (100 rpm) at 28 °C for 3 days. After incubation, 5 mL of each culture was centrifuged. A sample of 2 mL of the supernatant was added to 2 mL of Salkowski's reagent (2% FeCl₃ 0.5 M in 35% HClO₄) and incubated in the dark at room temperature for 25 min. The optical density of each culture was measured at 530 nm, and the IAA concentration was determined against an IAA calibration curve.

2.4. Molecular Identification of the Bacterial Isolates

The selected strains were identified based on 16S rDNA sequencing. DNA extraction was followed by amplification of this gene using the forward primer (356F) 5'ACWCC-TACGGGWWGGCWGC and the reverse primer (1064R) 5'AYCTCACGRACACGAGCTGAC. Polymerase chain reactions (PCR) were carried out in a final volume of 20 µL. The reaction mixture contained 10 µL of Xpert Fast Hotstar Mastermix 2× (Grisp), 1 µL of DNA sample, and 7 µL of ultra-pure water. The mixture was placed in the T100 PCR thermocycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), using an initial denaturation at 95 °C for 3 min followed by 35 cycles, each composed of three steps: denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 55 °C for 15 s, elongation at 72 °C for 15 s, then a final elongation at 72 °C for 3 min. Aliquots of the PCR reactions were resolved on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. The purified PCR products were sequenced using StabVida (Caparica, Portugal) using the previously mentioned primers.

2.5. Antifungal Activity

The antifungal activity of the selected strains was tested against five fungi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium glabrum*, *Fusarium culmorum*, and *Botrytis cinerea*.

2.5.1. In Vitro Tests

Directed inhibition of mycelial growth (direct confrontation test):

The inhibition of fungal growth under direct confrontation with the isolates was realized on agar [30,31]. A disc of young mycelium (5 days old) from each mushroom was placed in the center of a Petri dish containing PDA (potato–dextrose–agar) medium. Three disks of a young culture of each bacterial strain were sited 2.5 cm from the fungus. Plates with sterile agar disks served as controls. After 7 days of incubation at

25 °C, the percentage of inhibition was calculated according to the following formula: $PGI\% = (KR - R1)/KR \times 100$, where KR is the average diameter between the point of deposition of the fungus and the margin of the colony contained in the control (mm), and R1 is the average diameter between the point of deposition of the fungus and the margin of the colony contained in the treated plates (mm) [32,33].

Indirect inhibition of mycelial growth (indirect confrontation test):

This test was applied against *A. niger*. Bacterial filtrates were prepared using the modified method of Li et al. [34]. The bacterial strains were inoculated on HM agar at 28 °C for 24 h then subcultured in the same liquid medium. Three categories of cultures were prepared. The first was pure, containing the bacterial strain alone. The second was mixed, where disks of the pathogen (*A. niger*) were added. In the third, the bacterial strains were cultivated in HM (halophilic medium) culture medium, free of glucose. After incubation with shaking (100 rpm) at 28 °C for 72 h, the media was centrifuged at 6000 × g rpm for 30 min and the supernatant was filtered through a sterile 0.22 µm multi-pore membrane.

Petri dishes containing PDA medium were inoculated in tight streaks with the sporal suspension of the phytopathogen, and then sterile paper disks were soaked in the filtrate obtained above and placed aseptically to test the antifungal activity. Sterile discs soaked in sterile HM medium served as controls. The boxes were incubated at 25 °C for 2 days. This test was performed following the modified method of Aghighi et al. [35] and Mahdih et al. [36].

Indirect inhibition of mycelial growth through the production of volatile substances:

The test for inhibition of mycelial growth through the production of volatile substances was carried out following the protocol described by Dennis and Webster [37]. A Petri dish containing the HM medium was inoculated in tight streaks with the bacterial antagonist. Another Petri dish containing the PDA medium was inoculated with a 5 mm diameter disk of the pathogenic fungus (*A. niger*, *A. flavus*, *P. glabrum*, or *F. culmorum*). The bottoms of the two plates containing the seeded culture media were placed face to face and sealed with parafilm. Plates without bacteria were used as a control. The radial growth of the mushrooms was measured after 7 days of incubation and compared to the control. Only filtrates with positive results (inhibition zone) were used for identification using HPLC.

2.5.2. Characterization of Bacterial Antifungal Metabolites

The filtrates were lyophilized at 40 °C and 200 KPa [38] followed by the dissolution in 50 mL of methanol of the residue obtained, which was then adjusted to 100 mL with distilled water. The obtained mixture was centrifuged (1535 × g) for 20 min then completed to 100 mL with a methanol–water solution (50:50 v/v) following the modified method of Kim et al. [39] and N'Guessan et al. [40].

A Hypersil BDS-C18 reversed-phase column (250 × 4.6 mm, 5 µm) was used for chromatographic separations. The mobile phase was composed of 0.2% acetic acid/acetonitrile (ACN) in a gradient, starting with 95% 0.2% acetic acid and ending with 100% ACN. The flow rate was 1.5 mL min⁻¹ for 30 min.

The injection volume of the SPCs (standard polyphenol compounds) was 20 µL, while that of the samples and their standard solutions was 10 µL. The column temperature was maintained at 30 °C. The UV detection wavelengths were 230-255-280-300 and 355 nm, consistent with the UV scanning results [41]. Antifungal molecules were produced by bacterial strains SB6, CH11, and SB39, which were identified using RP-HPLC by matching their retention times to that of the corresponding standard. The quantification of the compounds was determined by comparing their surface area to that of the corresponding standard of a known concentration.

The standards used in this study were gallic acid, hydroxyquinone, resorcinol, catechin, 1-2dihydroxybenzene, syringic acid, naringenin-7-glucoside, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid, m-anisic acid, and hesperidine.

2.5.3. In Vivo Test

Biological test on fruits (apples):

This test was carried out according to the modified protocol of Xiao and Kim [42]. Fresh apples of the “Golden Delicious” variety of approximately the same size and at the same level of maturity were sterilized with bleach (2%) for 2 min and then rinsed three times with sterile distilled water. Four wounds (3 mm wide × 3 mm deep) were made in the equatorial zone of each fruit. Each well was inoculated with 30 µL of the bacterial antagonist (10^8 CFU/mL for each strain tested) and 30 µL of sterile distilled water for the control [43]. After 2 h at room temperature, 15 µL of the spore suspension of the pathogen (2×10^4 spores/mL for *Botrytis cinerea*, and 10^5 spores/mL for *Aspergillus niger*) was added. The fruits incubation was performed at 25 °C at 90 to 95% relative humidity for 6 days [44]. The experiment was carried out in triplicate, with 6 fruits in each repetition. The injuries assessed daily. The disease severity calculation was performed based on the incidence of lesions and the size around the wounds. After 3 and 6 days of inoculation, we measured the wound diameters [45].

2.6. Plant Growth Stimulation Tests

2.6.1. Potting

For durum wheat seeds (*Triticum durum*, Simeto variety), surface sterilization was accomplished using 70% ethanol and 3% sodium hypochlorite followed by rinsing 5 times in sterile distilled water according to the Orhan method [46].

Seed inoculation: CH11, SB6, and SB39 bacteria were cultured in HM medium at 28 °C for 18 h. The bacterial suspensions were centrifuged ($6000 \times g$ rpm/10 min), and the supernatant was discarded. The cells were washed 3 times with 20 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2), then re-suspended in sterile PBS (10^8 CFU/mL). The sterile seeds were soaked in the three isolates of bacterial suspensions, selected either alone or in combinations of two by two or all three together for 1 h. Sterile seeds soaked in sterile PBS served as controls [47].

Growing wheat: wheat seeds were sown in plastic pots filled with sterilized soil at a rate of three seeds per pot. The pots were divided into batches (9 pots per batch), and each batch was irrigated with the same volume of saline solution (125, 150, and 200 Mm NaCl concentration) on the 1st day and the 8th day. Other watering was carried out with the same volume of sterile tap water (10 mL/pot) to avoid dehydration. The experiments were performed under semi-controlled conditions with temperatures of 20/25 °C night/day; a photoperiod of 16/8 h light/dark, and a relative humidity of 60% for two weeks. A block randomization plan was used.

2.6.2. Evaluation of Plant Growth Factors under Salt Stress

After 14 days of growth, the seedlings were harvested and the plant growth was observed. Hence, the morphological properties of the seedlings were evaluated based on different experimental growth conditions: stem height, roots length, fresh and dry weight of roots, and aerial part. The fresh weight was obtained just after harvest. The dry weight was measured after drying in a hot oven at 45 °C until the weight stabilized.

2.7. Statistical Analysis

The effects of inoculation on the plant parameters (germination, biomass, etc.) were tested separately using a one-way analysis of variance (ANOVA) with the strain and salinity level used as fixed factors using the Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS V.26, Chicago, IL, USA). The Tukey test was used to compare the mean values between the treatments at a significance level of $p = 0.05$.

3. Results

3.1. Bacterial Traits Are Able to Promote Plant Growth

In this study, 70 halotolerant bacteria were isolated from saline soils. These bacteria were studied for their ability to increase soil fertility and promote plant growth. The potential functions of the isolates based on their enzyme activities (Table 1) allowed for the selection of six bacterial strains (SB6, CH11, CH12, SB29, SB39, CH42) that were able to produce cellulases, amylases, lipases, proteases, ureases, and chitinases. All these bacteria were able to fix molecular nitrogen and to produce ammonia (NH₃). Three isolates (SB6, CH11, and SB29) were able to solubilize inorganic phosphate, and two (SB6 and SB39) were able to produce HCN. The isolates SB39 and CH42 had the potential to produce IAA, although in small quantities (2.031 ± 0.01 and $1.027 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.1$, respectively).

Table 1. Plant growth-promoting traits of the selected isolates.

	SB6	CH11	CH12	SB29	SB39	CH42
Cellulase	+	+	++	nd	+	+
Amylase	+++	nd	nd	nd	+++	nd
Lipase	nd	++	nd	++	nd	+
Protease	+++	+++	+++	+++	+++	nd
Urease	nd	nd	+	nd	++	++
Chitinase	+++	+++	+++	+++	++	++
Nitrogen fixation	+	+	+	++	++	++
Phosphate solubilization	++	++	nd	+	nd	nd
IAA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	nd	nd	nd	nd	+	+
NH ₃	++	+	+	++	+++	++
HCN	+	nd	nd	nd	+++	nd

+++—high activity; ++—intermediate activity; +—low activity; nd—activity not detected. For enzymes, +++— $\varnothing > 20$ mm; ++— $10 < \varnothing \leq 20$ mm; +— $\varnothing \leq 10$ mm; nd—activity not detected. For NH₃, +++—orange-red; ++—orange; +—yellow; nd—activity not detected. For HCN, +++—orange-red; ++—orange; +—light orange; and nd—activity not detected.

3.2. Molecular Identification

The isolates with the highest scores for the secretion of certain enzymes such as cellulases, proteases, and chitinases, and the production of ammonia and hydrogen cyanide, which have an inhibitory effect on fungal growth while being capable of fixing atmospheric nitrogen and solubilizing inorganic phosphate, were selected (SB6, CH11, and SB39) for molecular identification.

Bacterial identification based on the 16S rDNA allowed for genus identification. The SB6 and CH11 strains were closely related to *Serratia*, with a similarity of 98.84% for SB6 and 98.98% for CH11. The SB39 strain was related to the halophilic bacterium *Halomonas* sp. with a 98.98% similarity.

3.3. Bacterial Antifungal Activity

3.3.1. Direct Inhibition of Mycelial Growth

Figure 1a shows the results of the direct inhibition of fungal growth due to the presence of the bacterial strains. CH11 was more efficient at inhibiting phytopathogenic fungal growth, with rates of inhibition ranging from 51 to 80%. The SB6 strain gave an inhibition rate of 71.28% against *A. niger*. On the other hand, isolate SB39 recorded a maximum rate of 57.44% against *A. flavus*. The results demonstrate that the fungi were inhibited by isolates SB6, CH11, and SB39, but to different degrees (Figure 1b).

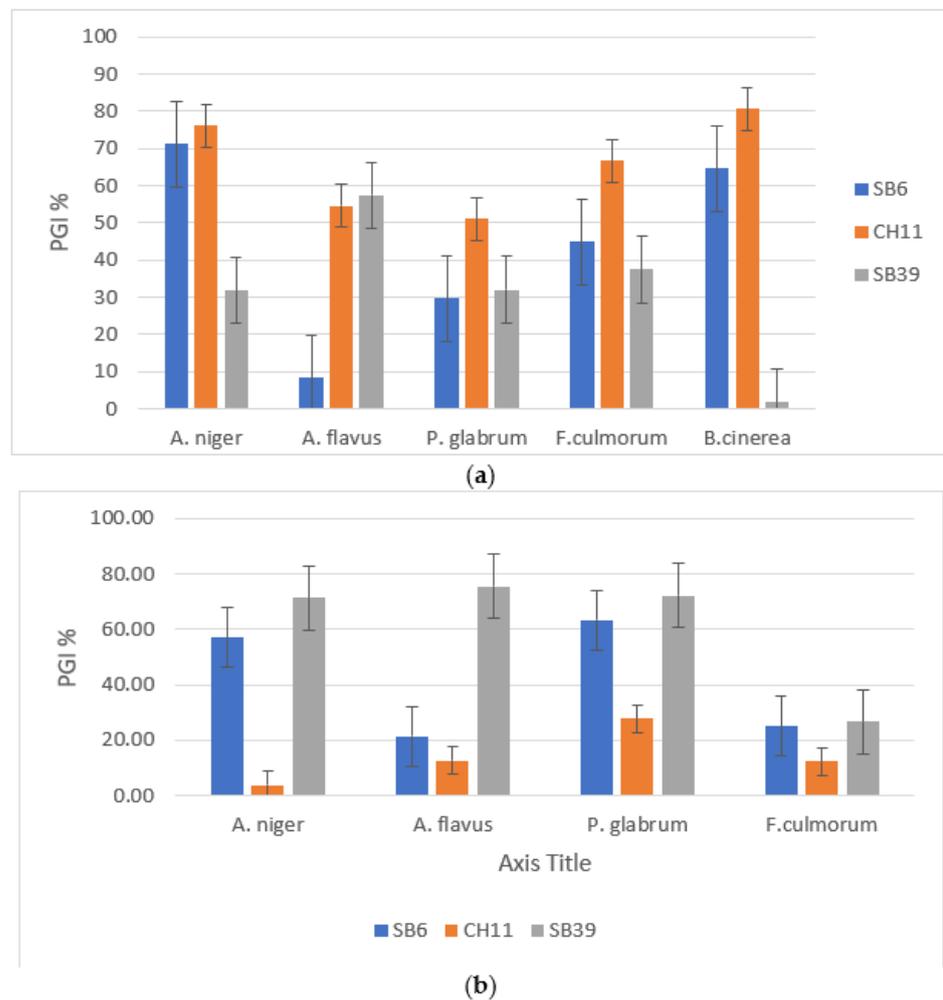


Figure 1. (a) Percentage growth inhibition (PGI%) of phytopathogenic fungi by isolates (plate confrontation tests). (b) Effect of volatiles substances produced by the three strains on growth inhibition (PGI%). Bars are the mean \pm SE. No significant differences are shown.

3.3.2. Indirect Inhibition of Mycelial Growth

The bacterial cultures' media filtrates showed the presence of antifungal activity against *A. niger* for the strain CH11 in three environments (with and without biotic and abiotic stress). This means that the isolate produces antifungal molecules even in the absence of the fungus. SB39 is able to produce antifungal compounds only when in presence of the fungus or when the medium is free of glucose. The capacity of the isolate SB6 to inhibit fungal growth was negligible in the three environments.

3.3.3. Inhibition of Mycelial Growth by Volatile Substances

The results obtained revealed that the volatile substances were reduced the phytopathogenic fungi's mycelial growth. For *A. niger* and *P. glabrum*, they were decreased by 71.29% and 72.22%, respectively. For the strain SB39, we noted a 56.93% decrease. The same was noted for SB6 (63.33%), but only a 3.96% to 27.78% decrease was shown for CH11. Concerning *F. culmorum*, the reduction varied from 12.5% to 26.67% for the three isolates (Figure 2).

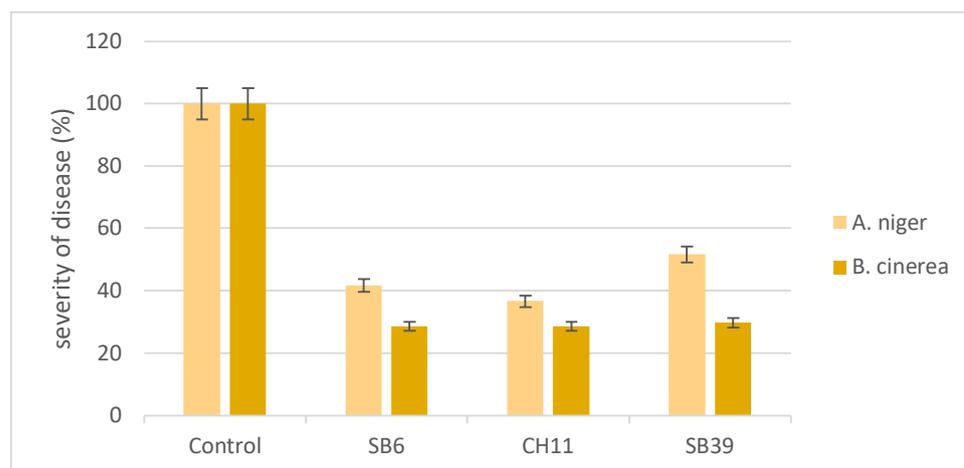


Figure 2. Efficiency of bacterial isolates (SB6, CH11, and SB39) against *A. niger* and *B. cinerea* in apples. Bars show the mean \pm SE. No significant differences are shown.

3.3.4. Characterization of Bacterial Antifungal Metabolites

The analysis of the filtrates of the culture broths, which showed positive antifungal activities, allowed for the identification of polyphenols produced by the bacterial isolates (Table 2). Thus, the three bacterial isolates produced gallic acid, catechins, and syringic acid. In the presence of the pathogen, the SB39 strain produced gallic acid and syringic acid in concentrations exceeding 20 mg/mL. In addition, it was the only one producing hydroxyquinone.

Table 2. Phenolic compounds identified in the filtrate culture broth and their concentrations.

RRT (min)	Compound Name	Broth Filtrate (mg/mL)					
		SB6 –	CH11 –	CH11 +	CH11 dep	SB39 +	SB39 dep
3.15 \pm 0.05	Gallic acid	13.77	20.79	12.76	13.43	21.56	9.53
3.61 \pm 0.00	Hydroxy quinone	nd	nd	nd	nd	6.31	nd
5.47 \pm 0.23	Resorcinol	2.24	2.82	2.29	2.88	5.38	nd
6.10 \pm 0.17	Catechin	3.81	4.84	4.27	1.29	5.17	3.5
6.23 \pm 0.41	1,2-hydroxybenzene	nd	8.16	3.13	3.55	nd	nd
7.21 \pm 0.05	Syringic acid	16.65	13.24	18.54	11.72	22.88	12.23
10.63 \pm 0.00	Naringenin-7-glucoside	nd	nd	4.56	nd	nd	nd
11.08 \pm 0.00	3,4,5-Trimethoxy benzoic acid	2.51	nd	nd	nd	nd	nd
11.36 \pm 0.01	m-anisic acid	nd	1.82	1.01	2.39	nd	nd
15.07 \pm 0.01	Hesperidine	9.69	1.91	nd	nd	nd	nd

(–): in the absence of the phytopathogen; (+): in the presence of the phytopathogen; (dep): in a depleted culture medium; nd—not detected. The purification of molecules using HPLC was performed only for bacteria showing inhibition zones (positive results only).

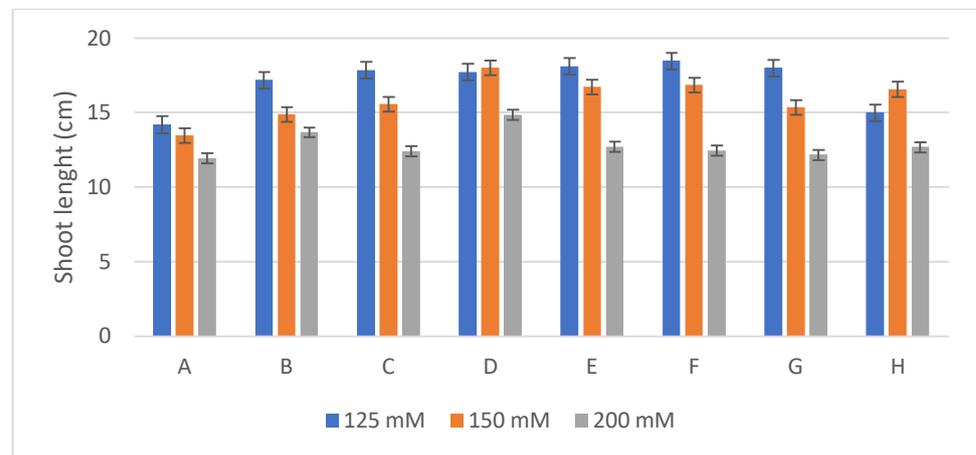
3.4. Tests to Stimulate the Growth of Wheat Plants Subjected to Salt Stress

The results of the treatment of wheat seeds with the three bacterial isolates and their different combinations showed a significant improvement in the growth parameters considered compared to those obtained for the control under salt stress (Figures 3 and 4). To evaluate the harmful effects of salt stress, different concentrations of NaCl were used (125, 150, and 200 mM). The results obtained indicated that the increase in the NaCl concentration cause a reduction in the length of the stems and roots, and consequently in their fresh and dry weight in the control plants. However, the inoculation of the three bacterial isolates showed a significant attenuation of the harmful effects of salinity (Figure 4). Thus, the inoculation of the bacterial strains caused an increase of 30% in the length of the stems of the plants grown under the 125 mM treatment. The two strains SB6 and SB39 (*Serratia* sp. and *Halomonas* sp.) were associated with increases of 34% and 24% at 150 and 200 mM,

respectively. Concerning the length of the stems, the best result was obtained for the *Halomonas* sp. strain, with increases of 39%, 45%, and 53% for NaCl concentrations of 125 mM, 150 mM, and 200 mM, respectively.

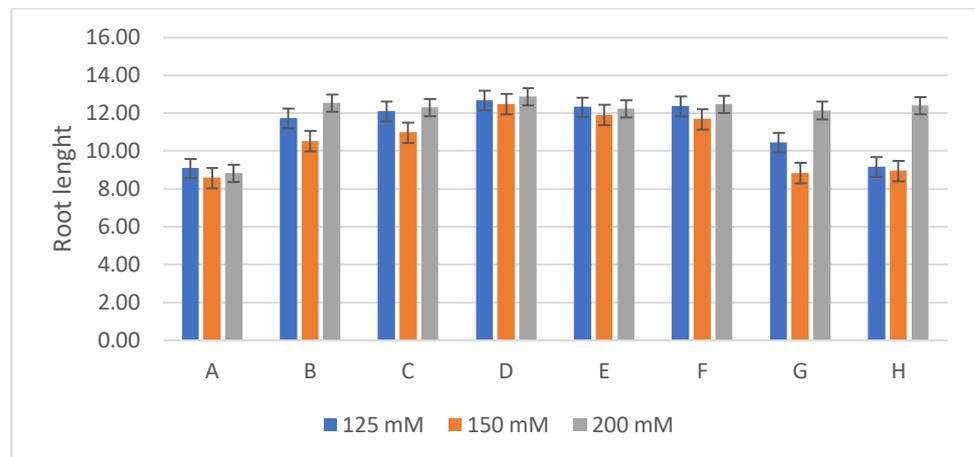


Figure 3. Effects of bacterial strain treatment on the growth of wheat seedlings under the 125 mM salt stress condition. (A) Control; (B) SB6; (C) CH11; (D) SB39; (E) SB6-SB39; (F) SB6-CH11; (G) CH11-SB39; (H) SB6-CH11-SB39.

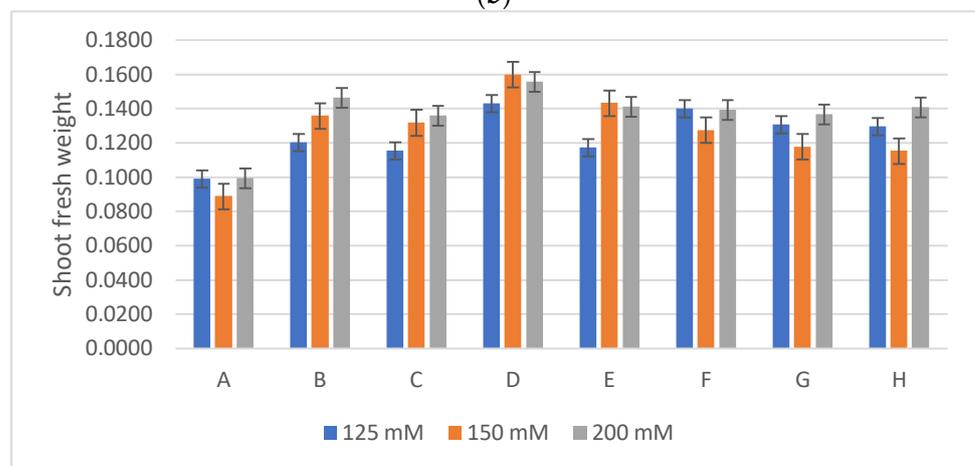


(a)

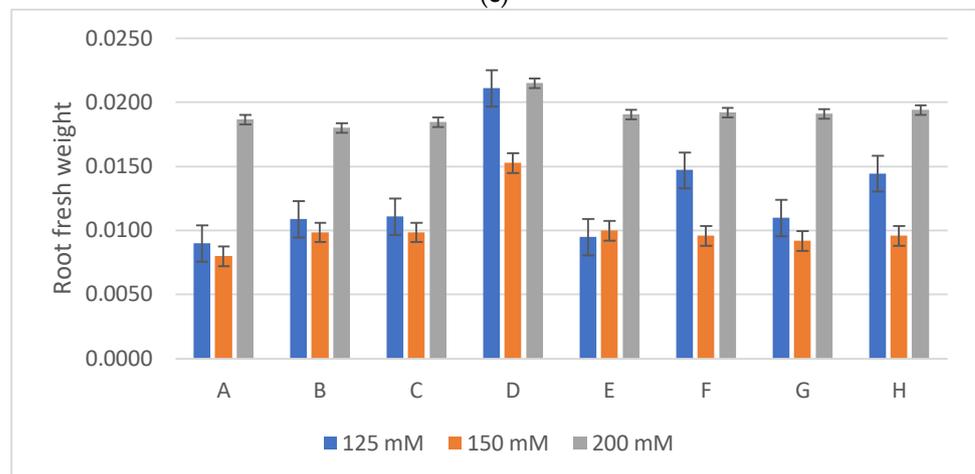
Figure 4. Cont.



(b)

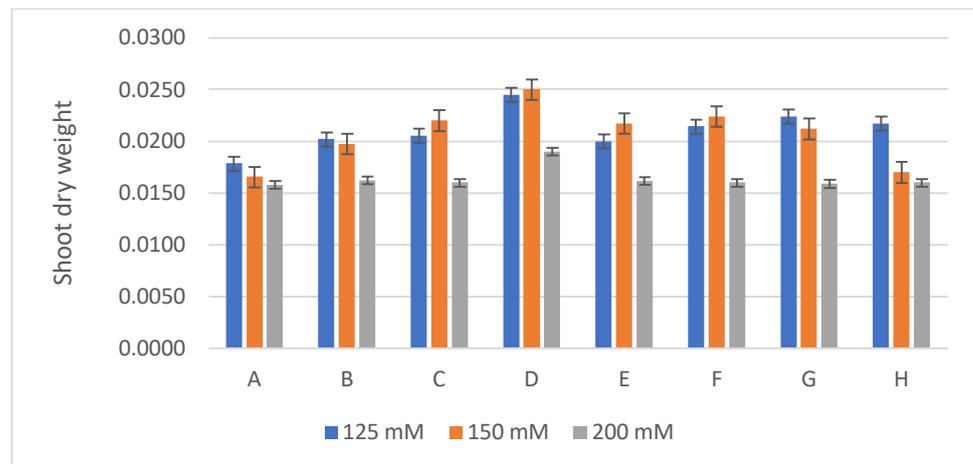


(c)

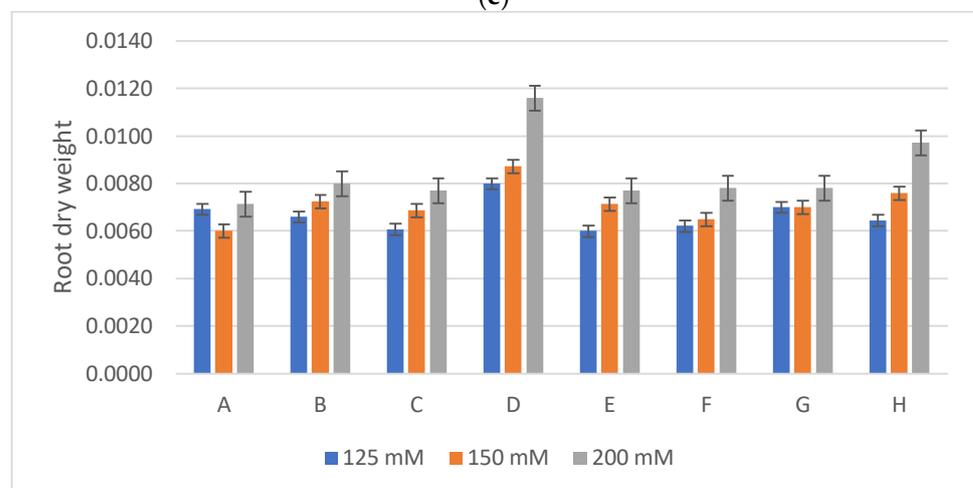


(d)

Figure 4. Cont.



(e)



(f)

Figure 4. The effects of inoculation with halotolerant rhizobacteria (SB6: *Serratia* sp.; CH11: *Serratia* sp.; SB39: *Halomonas* sp.) on the growth ((a) shoot length; (b) root length; (c) shoot fresh weight; (d) root fresh weight; (e) shoot dry weight; (f) root dry weight) of wheat plants grown under salt stress conditions of 125 mM, 150 mM, or 200 mM of NaCl. (A) Control; (B) SB6; (C) CH11; (D) SB39; (E) SB6-SB39; (F) SB6-CH11; (G) CH11-SB39; (H) SB6-CH11-SB39. Different letters indicate significant differences between the control and different treatments (with bacteria): B, C, D, E, F, G, H. Bars indicate the mean \pm 1SE. Significance level: $p = 0.05$. (a) At 125 mM NaCl: significant differences between A and different treatments (B, C, D, E, F, and G). No significant difference between A and H. For 150 mM NaCl, there was a significant difference between the treatments. For 200 mM, NaCl there was a significant difference between A, B, and D. No significant differences were shown with the other treatments. (b) For 125 mM, all the treatments were significantly different (A, B, C, D, E, F, and G) except for H. For 150 mM, there was significant difference between all the letters except for G and H. For 200 mM, all the treatments were significantly different. (c) For 125 mM, there were significant differences between A, D, F, G, and H. For 150 mM, there were significant differences between all the treatments except for G and H. For 200 mM, there were significant differences between A and all the other treatments. (d) For 125 mM, there were significant differences between A, D, F, and H. At 150 mM, there was a significant difference between only A and D. For 200 mM, there was no significant difference shown. (e) For 125 mM, there were significant differences between A, D, F, G, and H. For 150 mM, there were significant differences between A, D, and F. For 200 mM, there was a significant difference between A and D only. (f) For 125 mM, no significant differences are shown. For 150 mM, there was a significant difference between only A and D. For 200 mM, there were significant differences between A, D, and H.

Bioassay on Apples

In this experiment, the apples that were inoculated with the pathogens (*A. niger* or *B. cinerea*) with the antagonist developed much smaller areas of infection compared to the fruits that were inoculated with the pathogens alone (Figure 5a). Thus, the severity of the disease was reduced by more than 50% in the case of *A. niger* and by more than 70% for *B. cinerea* (Figure 5b).



Figure 5. Effects of fungal mold on apples treated (b) or not treated (a) with the bacterial antagonist after 6 days of incubation.

4. Discussion

It should be remembered that agricultural soil salinization constitutes one of the major problems in agriculture, which limits plant growth and agricultural productivity by up to 50% [48–50]. Approximately 1 billion hectares of the world’s land surface are affected by salinization, which represents approximately 7% of the planet’s land surface [31]. On the other hand, the use of fungicidal chemicals has a negative effect on health and the environment. Therefore, the application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as growth-promoting and plant disease-fighting agents is a better alternative [20,51,52].

Recently, most research has focused on the isolation and study of halotolerant and halophilic bacteria with plant growth potential [53–55]. In our work, all the isolated bacteria could fix molecular nitrogen and solubilize mineral phosphate. These traits are relevant to improve plant growth, since they increase the availability of two essential nutrients for plant development, root growth, ripening of flowers and fruits, and mobilization of resources to the fruits. The studied strains were also able to produce hydrolytic enzymes

(cellulase, amylase, lipase, proteases, urease, and chitinase) (Table 1). These microbial enzyme activities intervene with soil functionality by improving the availability of essential nutrients for plant growth [56]. Of the six bacterial isolates, SB39 and CH42 were the only ones that produced IAA in detectable amounts. IAA is a phytohormone involved in root initiation, cell division, and enlargement. IAA-producing microorganisms stimulate root growth, allowing for increased nutrient and water use efficiency [57–60]. The simultaneous expression of different PGP traits promotes plant growth [53] and increases the potential of the isolates to be used as plant biostimulants, especially under stress conditions such as saline soils.

The aim was to understand if the isolates with the highest PGP potential based on their PGP traits were also able to antagonize phytopathogenic fungi, known for their capacity to attack plants, especially those under stress. To answer this question, the three strains with the highest PGP potential, namely nitrogen fixation, phosphate solubilization, plant hormone production (IAA), and secretion of phytopathogen-limiting enzymes, were investigated for their potential to inhibit the growth of five phytopathogenic fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium glabrum*, *Fusarium culmorum*, and *Botrytis cinerea*). Antifungal activity was observed in all of the three bacterial strains. SB6 and CH11 showed better antagonistic potential when in direct confrontation with the fungi, while SB39 was the most efficient in fungal growth inhibition due to the production of volatile substances. Several studies suggest the involvement of biomolecules (HCN, NH₃) and lytic enzymes such as cellulase, proteases, and chitinases (Table 1) in the antifungal activities of several bacteria. These enzymes may play an important role in degrading the fungal cell walls [48–50]. The production of HCN by PGPRs is a trait that is frequently reported in PGP bacteria, which may contribute to the promotion of plant defenses [56–61].

A comparison of the compounds detected in the mixed cultures of bacteria and the phytopathogen *A. niger* or the bacteria alone revealed that SB39 only produced antifungal compounds when in the presence of *A. niger*. The same was reported for the interaction between *Pseudomonas* and *Serratia* strains with *A. niger*. On the contrary, the strain CH11 produced antifungal compounds even in the absence of the fungi. This may be a very interesting trait for the design of disease-preventing products.

The HPLC characterization of some of the compounds produced by the bacterial strains revealed their capacity to produce polyphenols. According to Skorokhod et al. [62], only plants and certain microorganisms can synthesize the precursors of phenolic compounds. Most of the bacteria described as able to produce phenolic compounds are endophytic, possibly because of their need to synthesize secondary metabolites identical or like those of their host [63]. Based on the molecular identification of SB6 and CH11 as belonging to the genus *Serratia* and SB39 as belonging to the genus *Halomonas*, the genera for which endophytic bacteria are common may explain the production of polyphenols by the three isolates studied. However, this is the first study to demonstrate the capacity of bacteria from *Serratia* and *Halomonas* genera to produce polyphenols.

Plant inoculation with each of the isolated bacteria improved plant performance under the salinity conditions. It is interesting to point out that the wheat inoculation stimulated more growth at 200 mM NaCl than at lower salinity levels in comparison to the control. These results may be mediated through the synthesis of phytohormones by these bacteria as well as to the improvement in nutrient bioavailability [64]. These results agree with those of previous studies [46,47,54,65–68].

Apart from stimulating plant growth, the three bacterial strains can also contribute to increased plant defense against fungal infections in the post-harvest stage. One of the problems of harvests is the contamination of products during storage, which leads to significant losses [42]. In our study, inoculation of apples previously contaminated by phytopathogenic fungi with one of the three bacterial strains limited the expansion of the root zone induced by the fungi. Furthermore, after the application of the three bacterial antagonists, the rot in the apples contaminated with *A. niger* and *B. cinerea* was reduced.

Similar results were reported by Sun et al. [59] and Jimtha et al. [69–74] using bacteria of the genus *Serratia*.

5. Conclusions

Ultimately, the strains selected in this work proved to be halophilic and to have the capacity to restore the growth of wheat under saline stress conditions. Additionally, their production of enzymes involved in soil fertilization, nitrogen fixation, and phosphate solubilization was increased. This also highlights the production of antifungal metabolites.

The three halotolerant and halophilic strains isolated belonging to *Serratia* sp. (SB6 and CH11) and *Halomonas* sp. (SB39) were revealed to be able to stimulate the growth of wheat under salinity conditions. These isolates were also able to inhibit the development of phytopathogenic fungi, most likely due to the production of polyphenols. Based on the results, these strains have a high potential to be used as bio-stimulants. Field trials should be performed to demonstrate their potential in the field.

Author Contributions: Conceptualization, K.H. and E.-H.N.; methodology, K.O.O., K.H. and Z.M.; validation, E.-H.N.; formal analysis, J.M.; investigation, C.C.; data curation, Y.B.; writing—original draft, L.O.; writing—review and editing, K.O.O.; supervision, C.C. and E.-H.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Portuguese funds from Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the project UIDB/00329/2020 (DOI 10.54499/UIDB/00329/2020).

Data Availability Statement: The data are contained within this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. El Hasini, S.; Iben Halima, O.; El Azzouzi, M.; Douaik, A.; Azim, K.; Zouahri, A. Organic and inorganic remediation of soils affected by salinity in the Sebkh of Sed El Mesjoune–Marrakech (Morocco). *Soil Tillage Res.* **2019**, *193*, 153–160. [[CrossRef](#)]
2. Shrivastava, P.; Kumar, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 123–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ha-Tran, D.M.; Nguyen, T.T.M.; Hung, S.-H.; Huang, E.; Huang, C.-C. Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pimentel, D.; Berger, B.; Filiberto, D.; Newton, M.; Wolfe, B.; Karabinakis, E.; Clark, S.; Poon, E.; Abbett, E.; Nandagopal, S. Water Resources: Agricultural and Environmental Issues. *BioScience* **2004**, *54*, 909–918. [[CrossRef](#)]
5. Machado, R.M.A.; Serralheiro, R.P. Soil Salinity: Effect on Vegetable Crop Growth. Management Practices to Prevent and Mitigate Soil Salinization. *Horticulturae* **2017**, *3*, 30. [[CrossRef](#)]
6. Roy, S.; Chowdhury, N. Salt Stress in Plants and Amelioration Strategies: A Critical Review. In *Abiotic Stress in Plants*; IntechOpen: London, UK, 2020; Chapter 19.
7. Egamberdieva, D.; Wirth, S.; Bellingrath-Kimura, S.D.; Mishra, J.; Arora, N.K. Salttolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bhat, M.A.; Kumar, V.; Bhat, M.A.; Wani, I.A.; Dar, F.L.; Farooq, I.; Bhatti, F.; Koser, R.; Rahman, S.; Jan, A.T. Mechanistic insights of the interaction of plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) with plant roots toward enhancing plant productivity by alleviating salinity stress. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Qin, S.; Miao, Q.; Feng, W.W.; Wang, Y.; Zhu, X.; Xing, K.; Jiang, J.H. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Appl. Soil Ecol.* **2015**, *93*, 47–55. [[CrossRef](#)]
10. Backer, R.; Rokem, J.S.; Ilangumaran, G.; Lamont, J.; Praslickova, D.; Ricci, E.; Subramanian, S.; Smith, D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Wang, W.; Wu, Z.; He, Y.; Huang, Y.; Li, X.; Ye, B.C. Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *164*, 520–529. [[CrossRef](#)]
12. Lobo, C.B.; Tomás, M.S.J.; Viruel, E.; Ferrero, M.A.; Lucca, M.E. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiol. Res.* **2019**, *219*, 12–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vaishnav, A.; Singh, J.; Singh, P.; Rajput, R.S.; Singh, H.B.; Sarma, B.K. Sphingobacterium sp. BHU-AV3 induces salt tolerance in tomato by enhancing antioxidant activities and energy metabolism. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Li, X.; Li, B.; Cai, S.; Zhang, Y.; Xu, M.; Zhang, C.; Yuan, B.; Xing, K.; Qin, S. Identification of rhizospheric actinomycete *Streptomyces laevendulae* SPS-33 and the inhibitory effect of its volatile organic compounds against *Ceratocystis Fimbriata* in postharvest sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.). *Microorganisms* **2020**, *8*, 319. [[CrossRef](#)]
15. Zainab, N.; Amna, D.B.U.; Javed, M.T.; Afridi, M.S.; Mukhtar, T.; Kamran, M.A.; Ul Ain, Q.; Khan, A.A.; Ali, J.; Jatoi, W.N.; et al. Deciphering metal toxicity responses of flax (*Linum usitatissimum* L.) with exopolysaccharide and ACC-deaminase producing bacteria in industrially contaminated soils. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *152*, 90–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Orozco-Mosqueda, M.D.C.; Glick, B.R.; Santoyo, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiol. Res.* **2020**, *235*, 126439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. El-Esawi, M.; Glascoe, A.; Engle, D.; Ritz, T.; Link, J.; Ahmad, M. Cellular metabolites modulate in vivo signaling of Arabidopsis cryptochrome-1. *Plant Signal. Behav.* **2015**, *10*, e1063758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Qin, S.; Feng, W.W.; Zhang, Y.J.; Wang, T.T.; Xiong, Y.W.; Xing, K. Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e01533-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Xiong, Y.W.; Gong, Y.; Li, X.W.; Chen, P.; Ju, X.Y.; Zhang, C.M.; Yuan, B.; Lv, Z.P.; Xing, K.; Qin, S. Enhancement of growth and salt tolerance of tomato seedlings by a natural halotolerant actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 isolated from a coastal halophyte. *Plant Soil.* **2019**, *445*, 307–322. [[CrossRef](#)]
20. Tabli, N.; Nabti, E.H.; Dahel, D.; Mokrane, N.; Manyani, H.; Dary, M.; Megias, M.G. Impact of Diazotrophic Bacteria on Germination and Growth of Tomato, with Bio-Control Effect, Isolated from Algerian Soil. *J. Ecol. Health Environ.* **2014**, *2*, 1–7. [[CrossRef](#)]
21. Carrim, A.J.I.; Barbosa, E.C.; Vieira, J.D.G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham.(Carobinha-do-campo). *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2006**, *49*, 353–359. [[CrossRef](#)]
22. Vinoth, R.S.; Kanikkai, R.A.; Babu, V.A.; Manoj, G.T.; Naman, H.S.; Johnson, A.J.; Infant, S.B.; Sathiyaseelan, K. Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent. Res. Sci. Technol.* **2009**, *1*, 008–013.
23. Sierra, G.A. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Leeuwenhoek* **1957**, *28*, 15–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kumar, S.; Karan, R.; Kapoor, S.; Singh, S.P.; Khare, S.K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Braz. J. Microbiol.* **2012**, *43*, 1595–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Christensen, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.* **1946**, *52*, 461–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hsu, S.C.; Lockwood, J. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* **1975**, *29*, 422–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kopečný, J.; Hodrová, B.; Stewart, C.S. The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *23*, 195–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lorck, H. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant* **1948**, *1*, 142–146. [[CrossRef](#)]
29. Bric, J.M.; Bostock, R.M.; Silverston, S.E. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 535–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Fokkema, N.J. Fungal antagonism in the phyllosphere. *Ann. Appl. Biol.* **1978**, *89*, 115–117. [[CrossRef](#)]
31. Sagahón, I.P.; Reyes, M.A.A.; Rojas, H.V.S.; Cuenca, A.A.; Jurado, A.T.; Alvarez, I.O.C.; Flores, Y.M. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5522–5537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Korsten, L.; De Jager, E.S. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *S. Afr. Avocado Grow. Assoc. Yearb.* **1995**, *18*, 124–130.
33. Lee, J.Y.; Hwang, B.K. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **2002**, *48*, 407–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Li, Q.; Ning, P.; Zheng, L.; Huang, J.; Li, G.; Hsiang, T. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharvest Biol. Technol.* **2010**, *58*, 157–165. [[CrossRef](#)]
35. Aghighi, S.; Shahidi Bonjar, G.H.; Saadoun, I.; Rawashdeh, R.; Batayneh, S. First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian J. Plant Sci.* **2004**, *3*, 463–471. [[CrossRef](#)]
36. Mahdieh, S.; Gholam, H.S.B.; Gholam, R.S.S. Post-harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne Actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *112*, 46–54.
37. Dennis, C.; Webster, J. Antagonistic properties of species groups of Trichoderma, II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1971**, *57*, 363–369. [[CrossRef](#)]
38. Jorjandi, M.; Shahidi Bonjar, G.H.; Baghizadeh, A.; Sharifi Sirchi, G.R.; Massumi, H.; Baniasadi, F.; Aghighi, S.; Rashid Farokhi, P. Biocontrol of *Botrytis allii* Munn the causal agent of neck rot, the post-harvest disease in onion, by use of a new Iranian isolate of *Streptomyces*. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **2009**, *4*, 72–78. [[CrossRef](#)]
39. Kim, D.O.; Jeong, S.W.; Lee, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars from pulms. *Food Chem.* **2002**, *81*, 321–326. [[CrossRef](#)]

40. N'Guessan, A.H.O.; Dago Déliko, C.E.; Akhanovna, J.; Békro, M.; Békro, Y.A. Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la thérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Génie Ind.* **2011**, *6*, 55–61.
41. Zhao, Y.; Wang, Y.; Jiang, Z.-T.; Li, R. Screening and evaluation of active compounds in polyphenol mixtures by HPLC coupled with chemical methodology and its application. *Food Chem.* **2017**, *227*, 187–193. [[CrossRef](#)]
42. Xiao, C.L.; Kim, Y.K. Postharvest fruit rots in apples caused by *Botrytis cinerea*, *Phacidiopycnis washingtonensis*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. *Online Plant Health Prog.* **2008**, *9*, 34. [[CrossRef](#)]
43. Lu, L.; Lu, H.; Wu, C.; Fang, W.; Yu, C.; Ye, C.; Shi, Y.; Yu, T.; Zheng, X. Rhodosporidium paludigenum induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2013**, *85*, 196–202. [[CrossRef](#)]
44. Huang, Y.; Sun, C.C.; Guan, X.N.; Lian, S.; Li, B.; Wang, C. Butylated hydroxytoluene induced resistance against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 599062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zihao, S.; Baihui, H.; Cuicui, W.; Shiyu, L.; Yuxin, X.; Baohua, L.; Caixia, W. Biocontrol features of *Pseudomonas syringae* B-1 against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit. *Front. Microbiol.* **2023**, *11*, 599062. [[CrossRef](#)]
46. Orhan, F. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 621–627.
47. Bensidhoum, L.; Nabti, E.H.; Tabli, N.; Kupferschmied, P.; Weiss, A.; Rothballer, M.; Schmid, M.; Keel, C.; Hartmann, A. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* **2016**, *75*, 38–46. [[CrossRef](#)]
48. Vimal, S.R.; Singh, J.S.; Arora, N.K.; Singh, D.P. PGPR—an effective bioagent in stress agriculture management. In *Microbial Empowerment in Agriculture: A Key to Sustainability and Crop Productivity*; Sarma, B.K., Jain, A., Eds.; Biotech Books: New Delhi, India, 2016; pp. 1–108.
49. Farahmand, N.; Sadeghi, V. Estimating soil salinity in the dried lake bed of Urmia Lake using optical sentinel-2 images and nonlinear regression models. *J. Indian Soc. Rem. Sens.* **2020**, *48*, 675–687. [[CrossRef](#)]
50. Li, H.; La, S.; Zhang, X.; Gao, L.; Tian, Y. Salt-induced recruitment of specific root-associated bacterial consortium capable of enhancing plant adaptability to salt stress. *ISME J.* **2021**, *15*, 2865–2882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Noumavo, P.A.; Agbodjato, N.A.; Baba-Moussa, F.; Adjanohoun, A.; Baba-Moussa, L. Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *Afr. J. Biotechnol.* **2016**, *15*, 1452–1463.
52. Djebaili, R.; Marika, P.; Claudia, E.; Beatrice, F.; Mahmoud, K.; Maddalena, D.G. Biocontrol of Soil-Borne Pathogens of *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L. by Plant Growth-Promoting Actinomycetes: In Vitro and In Planta Antagonistic Activity. *Pathogens* **2021**, *10*, 1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Oliva, G.; Di Stasio, L.; Vigliotta, G.; Guarino, F.; Cicatelli, A.; Castiglione, S. Exploring the potential of four novel halotolerant bacterial strains as plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) under saline conditions. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 4320. [[CrossRef](#)]
54. Cherif, H.; Sghaier, I.; Hassen, W.H.; Amara, C.; Masmoudi, A.S.; Cherif, A.; Neifar, M. *Halomonas desertis* G11, *Pseudomonas rhizophila* S211 and *Oceanobacillus iheyensis* E9 as biological control agents against wheat fungal pathogens: PGPB consortia optimization through mixture design and response surface analysis. *Int. Clin. Pathol. J.* **2022**, *9*, 20–28.
55. Alijani, Z.; Amini, J.; Ashengroph, M.; Bahramnejad, B. Antifungal Activity of *Serratia rubidaea* Mar61-01 Purified Prodigiosin against *Colletotrichum nymphaeae*, the Causal Agent of Strawberry Anthracnose. *J. Plant Growth Regul.* **2022**, *41*, 585–595. [[CrossRef](#)]
56. Essghaier, B.; Dhieb, C.; Rebib, H.; Ayari, S.; Boudabous, A.R.A.; Sadfi-Zouaoui, N. Antimicrobial behavior of intracellular proteins from two moderately halophilic bacteria: Strain J31 of *Terribacillus halophilus* and strain M3-23 of *Virgibacillus marismortui*. *J. Plant Pathol. Microb.* **2014**, *5*, 214. [[CrossRef](#)]
57. Masmoudi, F.; Abdelmaleka, N.; Tounsia, S.; Dunlap, C.A.; Triguia, M. Abiotic stress resistance, plant growth promotion and antifungal potential of halotolerant bacteria from a Tunisian solar saltern. *Microbiol. Res.* **2019**, *229*, 126331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Boiero, L.; Perrig, D.; Masciarelli, O.; Penna, C.; Cassan, F.; Luna, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 874–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Singh, R.P.; Jha, P.N. The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Etesami, H.; Maheshwari, D.K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *156*, 225–246. [[CrossRef](#)]
61. Tabli, N.; Rai, A.; Bensidhouma, L.; Palmierib, G.; Gogliettino, M.; Coccab, E.; Consigliob, C.; Cillo, F.; Bubicic, G.; Nabti, E.-H. Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. *J. Biocontrol.* **2017**, *117*, 78–86. [[CrossRef](#)]
62. Sun, M.; Liu, J.; Li, J.; Huang, Y. Endophytic Bacterium *Serratia plymuthica* from Chinese Leek Suppressed Apple Ring Rot on Postharvest Apple Fruit. *Front. Microbiol.* **2022**, *12*, 802887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Xun, F.; Xie, B.; Liu, S.; Guo, C. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 598–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Vacheron, J.; Desbrosses, G.; Bouffaud, M.L.; Touraine, B.; Moëne-Loccoz, Y.; Muller, D.; Prigent-Combaret, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Nawaz, A.; Shahbaz, M.; Imran, A.; Marghoob, M.U.; Imtiaz, M.; Mubeen, F. Potential of Salt Tolerant PGPR in Growth and Yield Augmentation of Wheat (*Triticum aestivum* L) under Saline Conditions. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2019.
66. Desoky, E.S.M.; Saad, A.M.; El-Saadony, M.T.; Merwad, A.R.M.; Rady, M.M. Plant growth-promoting rhizobacteria: Potential improvement in antioxidant defense system and suppression of oxidative stress for alleviating salinity stress in *Triticum aestivum* (L.) plants. *Front. Plant Sci.* **2020**, *30*, 1878–8181. [[CrossRef](#)]
67. Mukherjee, P.; Mitra, A.; Roy, M. *Halomonas rhizobacteria* of avicennia marina of indian sundarbans promote rice growth under saline and heavy metal stresses through exopolysaccharide production. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Kamou, N.N.; Dubey, M.; Tzelepis, G.; Menexes, G.; Papadakis, E.N.; Karlsson, M.; Agopodi, A.L.; Jensen, D.F. Investigating the compatibility of the biocontrol agent *Clonostachys rosea* IK726 with prodigiosin-producing *Serratia rubidaea* S55 and phenazine producing *Pseudomonas chlororaphis* ToZa7. *Arch. Microbiol.* **2016**, *198*, 369–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Fillinger, S.; Elad, Y. *Botrytis—The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; p. 488.
70. Trejo-López, J.A.; Rangel-Vargas, E.; Gómez-Aldapa, C.A.; Villagómez-Ibarra, J.R.; Falfán-Cortes, R.N.; Acevedo-Sandoval, O.A.; Castro-Rosas, J. Isolation and Molecular Identification of *Serratia* Strains Producing Chitinases, Glucanases, Cellulases, and Prodigiosin and Determination of Their Antifungal Effect against *Colletotrichum siamense* and *Alternaria alternata* In Vitro and on Mango Fruit. *Int. J. Plant Biol.* **2022**, *13*, 281–297. [[CrossRef](#)]
71. Azeem, S.; Agha, S.I.; Jamil, N.; Tabassum, B.; Ahmed, S.; Raheem, A.; Jahan, N.; Ali, N.; Khan, A. Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi. *Rev. Argent. Microbiol.* **2022**, *54*, 233–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Jimtha, J.C.; Jishma, P.; Sreelekha, S.; Chithra, S.; Radhakrishnan, E.K. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia* sp. *Rhizosphere* **2017**, *3*, 105–108. [[CrossRef](#)]
73. Alijani, Z.; Amini, J.; Karimi, K.; Pertot, I. Characterization of the Mechanism of action of *Serratia rubidaea* Mar61-01 against *Botrytis cinerea* in Strawberries. *Plants* **2023**, *12*, 154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Skorokhod, I.; Kurdysh, I. The low-molecular weight antioxidants of microorganisms. *Mikrobiology* **2014**, *76*, 48–59.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.