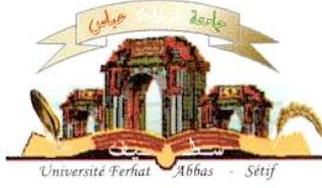


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE**

**THÈSE**

N° ...../SNV/2025

Présentée par

**BALLA Amel**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>EME</sup> CYCLE**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Microbiologie appliquée**

**THÈME**

**Développement de biofertilisants par bioencapsulation des PGPR**

Soutenue publiquement le 19/06/2025

DEVANT LE JURY

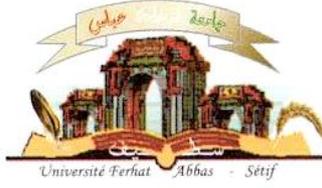
Président	<b>NANCIB Nabil</b>	<b>Pr. UFA Setif-1</b>
Directeur	<b>SILINI Allaoua</b>	<b>Pr. UFA Setif-1</b>
Co-Directrice	<b>CHERIF-SILINI Hafsa</b>	<b>Pr. UFA Setif-1</b>
Examineurs	<b>BENHIZIA Yacine</b>	<b>Pr. UFM Constantine-1</b>
	<b>BOUDEMAGH Allaoueddine</b>	<b>Pr. UFM Constantine-1</b>
	<b>HAMIDECHI M<sup>d</sup> Abdelhafid</b>	<b>Pr. UAL Khenchela</b>

*Laboratoire de microbiologie appliquée*



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE**

**THÈSE**

N° ...../SNV/2025

Présentée par

**BALLA Amel**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>EME</sup> CYCLE**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Microbiologie appliquée**

**THÈME**

**Développement de biofertilisants par bioencapsulation des PGPR**

Soutenue publiquement le 19/06/2025

DEVANT LE JURY

Président	<b>NANCIB Nabil</b>	<b>Pr. UFA Setif-1</b>
Directeur	<b>SILINI Allaoua</b>	<b>Pr. UFA Setif-1</b>
Co-Directrice	<b>CHERIF-SILINI Hafsa</b>	<b>Pr. UFA Setif-1</b>
Examineurs	<b>BENHIZIA Yacine</b>	<b>Pr. UFM Constantine-1</b>
	<b>BOUDEMAGH Allaoueddine</b>	<b>Pr. UFM Constantine-1</b>
	<b>HAMIDECHI M<sup>d</sup> Abdelhafid</b>	<b>Pr. UAL Khenchela</b>

*Laboratoire de microbiologie appliquée*

## **Remerciements**

*Avant toute chose, je rends grâce à Dieu, le Très-Haut, le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien cette thèse. Ce travail est le fruit d'un long cheminement scientifique, intellectuel et humain, jalonné d'apprentissage, de défis et d'opportunités précieuses. Chaque étape a été une occasion de croissance personnelle et professionnelle. Je suis profondément reconnaissante pour toutes les connaissances, l'enrichissement intellectuel et l'expérience qui ont marqué ce parcours.*

*Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à mon directeur de thèse, Mr **SILINI Allaoua**, Professeur de Microbiologie à l'Université Ferhat Abbas Sétif-1, pour son encadrement rigoureux, sa bienveillance et son soutien indéfectible tout au long de cette aventure scientifique. Son exigence scientifique et sa vision éclairée de la recherche ont été des guides précieux tout au long de ce parcours. Ses conseils avisés et son engagement ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail, et je lui en suis sincèrement reconnaissante.*

*Mes remerciements vont également à ma co-directrice de thèse, Mme **SILINI-CHERIF Hafsa**, Professeure de Microbiologie à l'Université Ferhat Abbas Sétif-1, dont l'accompagnement constant a été d'une aide inestimable. Sa disponibilité, son écoute attentive et son expertise scientifique ont été des piliers essentiels de cette recherche. Son enthousiasme et ses encouragements ont été une source de motivation précieuse. Toujours prête à partager ses connaissances et à guider avec patience et générosité, elle a joué un rôle fondamental dans la réalisation de cette thèse. Je lui témoigne ici toute ma gratitude et mon profond respect*

*Je tiens également à remercier chaleureusement Mr **Nancib Nabil**, Professeur de Microbiologie à l'Université Ferhat Abbas Sétif-1, président du jury, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury et d'évaluer cette thèse.*

*J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury, Mr **Benhizia Yacine** et Mr **Boudemagh Allaoueddine**, Professeurs de Microbiologie à l'Université des frères Mentouri Constantine-1, ainsi qu'à Mr **HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid** Professeur de Microbiologie à l'Université Abbes Laghrour Khenchela pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour l'honneur qu'ils me font par leur présence.*

*Je souhaite exprimer ma reconnaissance au Docteur **BOUCHAREB Samir** et à la Professeure **DOUFNOUNE Rachida** de l'université des Sciences et Technologie Ferhat Abbas Sétif-1, pour leur précieuse contribution à la réalisation des analyses physico-chimiques.*

*Je remercie également mes collègues du laboratoire, Naoual, Sarah et Nora, pour les moments de partage qui ont marqué ce parcours.*

*Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude à toutes les personnes que j'ai croisées au cours de ce parcours et qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.*

## ***Dédicace***

*À ceux qui ont façonné mon chemin, par leur amour, leur présence ou leur souvenir.*

*À ma mère, qui m'a transmis, sans le savoir, les gènes de l'amour de la science et la curiosité qui m'anime, et dont l'influence guide chaque étape de ma vie.*

*À ma grand-mère, dont l'encouragement sincère dépasse les mots et les connaissances, mais jamais l'amour.*

*À mon père, dont le soutien indéfectible et la force tranquille sont les fondations sur lesquelles repose tout mon parcours.*

*À mon frère, compagnon de route et d'instantanés partagés, dont la présence a toujours été une source de force et de réconfort.*

*À mes grands-parents et tantes disparus, qui auraient été fiers de me voir accomplir ce chemin.*

*À toute ma famille.*

*À tous ceux qui m'aiment.*

*Amel*

**« One never notices what has been  
done; one can only see what remains to be done»**

**Marie Curie**

## Production scientifique

### • Publications

- **Balla, A.**, Silini, A., Cherif-Silini, H., Mapelli, F., & Borin, S. (2025). Root colonization dynamics of alginate encapsulated rhizobacteria: implications for *Arabidopsis thaliana* root growth and durum wheat performance. *AIMS Microbiology*, *11*(1), 87-125. Doi : [10.3934/microbiol.2025006](https://doi.org/10.3934/microbiol.2025006)
- Mayouf, F., Hamidouche, M., Maouche, N., Cherif-Silini, H., & **Balla, A.** (2023). Fast pulsed electrodeposition of silver nanoparticles on polypyrrole thin films for antibacterial and biomedical applications. *Journal of Alloys and Compounds*, *968*, 172086. Doi : [10.1016/j.jallcom.2023.172086](https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2023.172086)
- **Balla, A.**, Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022). Recent advances in encapsulation techniques of plant growth-promoting microorganisms and their prospects in the sustainable agriculture. *Applied Sciences*, *12*(18), 9020. Doi : [10.3390/app12189020](https://doi.org/10.3390/app12189020)
- **Balla, A.**, Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Boudechicha, A., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2022). Screening of cellulolytic bacteria from various ecosystems and their cellulases production under multi-stress conditions. *Catalysts*, *12*(7), 769. Doi : [10.3390/catal12070769](https://doi.org/10.3390/catal12070769)
- **Balla, A.**, Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Moser, W. K., Nowakowska, J. A., ... & Belbahri, L. (2021). The threat of pests and pathogens and the potential for biological control in forest ecosystems. *Forests*, *12*(11), 1579. Doi : [10.3390/f12111579](https://doi.org/10.3390/f12111579)

### • Communications internationales

- **Balla, A.**, Silini, A., & Cherif-Silini, H. (2024). Encapsulation of *Bacillus thuringiensis* and *Pantoea agglomerans* for enhanced biofertilization in durum wheat. International Conference on Applied Microbiology and Biotechnology (ICAMB-2024), Béjaia, Algeria, 16-17 Oct.
- **Balla, A.**, Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouremani, N., Chenari Bouket, A., & Belbahri, L. (2022). Bacterial cellulases production under multi stress conditions. *International Days of Biotechnology (IDB 2022)*, Yasmine Hammamet, Tunisie, 19-22 Dec.

## Résumé

L'encapsulation microbienne dans des matrices d'alginate représente une solution innovante pour améliorer l'efficacité des bioinoculants dans l'agriculture durable. Dans cette étude, la technique de gélification ionique a été utilisée pour encapsuler deux bactéries promotrices de la croissance végétale, *Bacillus thuringiensis* (B25) et *Pantoea agglomerans* (Pa), dans des capsules d'alginate à 1% enrichies avec 5mM de proline comme osmoprotecteur. Les résultats ont montré une encapsulation efficace, avec plus de 99% de bactéries piégées. Après 24 mois de stockage à 4°C, B25 a maintenu une viabilité élevée, tandis que la concentration initiale de Pa de  $8,72 \times 10^9 (\pm 0,04 \times 10^9)$  UFC/ml a été réduite de 99,9 % [ $5,3 \times 10^4 (\pm 0,02 \times 10^4)$  UFC/g]. La survie des bactéries encapsulées individuellement était significativement supérieure à celle des bactéries co-inoculées. Par ailleurs, les bactéries encapsulées ont démontré une capacité notable à coloniser les racines d'*Arabidopsis thaliana* ainsi que la rhizosphère, le rhizoplan et l'endosphère du blé dur (*Triticum durum*), améliorant significativement la croissance végétale, avec des augmentations notables des teneurs en protéines, sucres et chlorophylles chez le blé. Afin de renforcer la viabilité et l'efficacité des formulations microbiennes, ces dernières ont été optimisées en enrichissant les capsules d'alginate avec des additifs d'origine naturelle tels que l'argile et le talc. Les analyses physico-chimiques (DRX, FTIR) ont révélé des interactions moléculaires et structurales favorables à la stabilité des matrices. Une encapsulation quasi-parfaite (> 99,9%) a été atteinte pour toutes les formulations, avec des taux de survie exceptionnels après 12 mois de stockage pour B25 dans les matrices d'alginate enrichies en argile et en talc. Ces matrices ont également montré une modulation efficace de la diffusion bactérienne et une protection accrue contre les rayons UV. L'application de ces formulations sur le blé dur a entraîné une amélioration significative des paramètres de croissance, une réduction du stress oxydatif (MDA) et une densité bactérienne plus élevée dans la rhizosphère pour les bactéries encapsulées par rapport aux bactéries libres, avec une colonisation réussie des tissus internes par Pa. En conclusion, cette étude démontre que l'encapsulation de *B. thuringiensis* et *P. agglomerans* dans des matrices d'alginate enrichies en additifs naturels garantit une viabilité bactérienne prolongée, une maintenance des activités PGP, une libération contrôlée dans la rhizosphère, et une protection efficace contre les effets néfastes des radiations UV. Ces formulations innovantes offrent un potentiel considérable pour le développement de bioinoculants durables et performants, répondant aux défis de l'agriculture moderne tout en réduisant l'usage des intrants chimiques.

**Mots clés** : bioencapsulation ; alginate; PGPR; *Arabidopsis thaliana*; blé dur.

## Abstract

Microbial encapsulation in alginate matrices represents an innovative solution for improving the efficacy of bioinoculants in sustainable agriculture. In this study, the ionic gelation technique was used to encapsulate two plant growth-promoting bacteria, *Bacillus thuringiensis* (B25) and *Pantoea agglomerans* (Pa), in 1% alginate capsules enriched with 5mM proline as an osmoprotectant. Results showed effective encapsulation, with over 99% of bacteria trapped. After 24 months' storage at 4°C, B25 maintained high viability, while the initial Pa concentration of  $8,72 \times 10^9 (\pm 0,04 \times 10^9)$  CFU/ml was reduced by 99,9% [ $5,3 \times 10^4 (\pm 0,02 \times 10^4)$  CFU/g]. Survival of individually encapsulated bacteria was significantly higher than that of co-inoculated bacteria. Furthermore, the encapsulated bacteria demonstrated a notable ability to colonize *Arabidopsis thaliana* roots as well as the rhizosphere, rhizoplane and endosphere of durum wheat (*Triticum durum*), significantly improving plant growth, with significant increases in protein, sugar and chlorophyll contents in wheat. To enhance the viability and efficacy of the microbial formulations, these were optimized by enriching the alginate capsules with natural additives such as clay and talc. Physico-chemical analyses (XRD, FTIR) revealed molecular and structural interactions favorable to matrix stability. Near-perfect encapsulation (> 99.9%) was achieved for all formulations, with exceptional survival rates after 12 months' storage for B25 in alginate matrices enriched with clay and talc. These matrices also demonstrated effective modulation of bacterial diffusion and enhanced protection against UV radiation. Application of the formulations to durum wheat resulted in a significant improvement in growth parameters, reduced oxidative stress (MDA) and higher bacterial density in the rhizosphere for encapsulated versus free bacteria, with successful colonization of internal tissues by Pa. In conclusion, this study demonstrates that encapsulation of *B. thuringiensis* and *P. agglomerans* in alginate matrices enriched with natural additives guarantees prolonged bacterial viability, maintenance of PGP activities, controlled release into the rhizosphere, and effective protection against the damaging effects of UV radiation. These innovative formulations offer considerable potential for the development of sustainable, high-performance bioinoculants, meeting the challenges of modern agriculture while reducing the use of chemical inputs.

**Keywords** : bioencapsulation; alginate; PGPR; *Arabidopsis thaliana*; durum wheat.

## ملخص

يمثل التغليف الميكروبي في مصفوفات الألبينات حلاً مبتكراً لتحسين فعالية المحفزات الحيوية في الزراعة المستدامة ، في هذه الدراسة، استُخدمت تقنية التغليف الهلامي الأيوني لتغليف نوعين من البكتيريا المعززة لنمو النباتات، وهما *Bacillus thuringiensis* (B25) و *Pantoea agglomerans* (Pa) ، داخل كبسولات ألبينات بنسبة 1% مدعمة ب 5 ملي مول من البرولين كعامل حماية اسموزي. أظهرت النتائج تغليفاً فعالاً، حيث تم احتجاز أكثر من 99% من البكتيريا. بعد التخزين لمدة 24 شهراً في درجة حرارة 4 درجات مئوية، حافظت بكتيريا B25 على قابلية عالية للبقاء، بينما انخفضت التركيزات الأولية ل Pa البالغة  $10^9 \times 8.72 (\pm 0.04 \times 10^9)$  وحدة تشكيل المستعمرات /مل ب  $10^4 \times 5.3 (\pm 0.02 \times 10^4)$  وحدة تشكيل المستعمرات /غ. كما أظهرت البكتيريا المغلفة بشكل فردي بقاءً أعلى بكثير مقارنة بتلك التي تم تغليفها معاً. وبالإضافة إلى ذلك، أظهرت البكتيريا المغلفة قدرة على كبيرة على استعمار جذور نبات *Arabidopsis thaliana* ، وكذلك منطقة الجذور والغلاف الجذري والأنسجة الداخلية لجذور القمح الصلب (*Triticum durum*)، مما أدى إلى تحسين نمو النبات بشكل كبير، مع زيادة في البروتين والسكر ومحتوى الكلوروفيل لدى القمح . لتعزيز صلاحية وفعالية التركيبات الميكروبية، تم تحسينها عن طريق إثراء كبسولات الألبينات بمواد مضافة من أصل طبيعي مثل الطين والتلك. كشفت التحاليل الفيزيائية والكيميائية (FTIR ، XRD) عن تفاعلات جزيئية وهيكلية مواتية لاستقرار المصفوفة. تم تحقيق تغليف شبه مثالي (> 99.9%) لجميع التركيبات، مع معدلات بقاء استثنائية بعد 12 شهراً من التخزين لبكتيريا B25 في مصفوفات الألبينات المعززة بالطين والتلك. كما أظهرت هذه المصفوفات أيضاً تعديلاً فعالاً للانتشار البكتيري وحماية معززة ضد الأشعة فوق البنفسجية. أدى تطبيق هذه التركيبات على نبات القمح الصلب إلى تحسن كبير في معايير النمو ، وانخفاض الإجهاد التأكسدي (MDA) ، وارتفاع الكثافة البكتيرية في المحيط الجذري للبكتيريا المغلفة مقارنة بالبكتيريا الحرة، مع نجاح استعمار البكتيريا في الأنسجة الداخلية للجذور بواسطة بكتيريا Pa. في الختام، توضح هذه الدراسة أن تغليف بكتيريا *B. thuringiensis* و *P. agglomerans* في مصفوفات الألبينات المدعمة بإضافات طبيعية يضمن بقاء البكتيريا لفترة طويلة، مع الحفاظ على الأنشطة البكتيرية المحفزة لنمو النبات (PGP)، و إنتشاراً محكماً في منطقة الجذور، والحماية الفعالة من الآثار الضارة للأشعة فوق البنفسجية. توفر هذه التركيبات المبتكرة إمكانيات كبيرة لتطوير مواد حيوية مستدامة وعالية الأداء تساهم في مواجهة تحديات الزراعة الحديثة مع الحد من استخدام المدخلات الكيميائية.

**الكلمات المفتاحية:** التغليف الحيوي؛ الألبينات؛ PGPR؛ *Arabidopsis thaliana*؛ القمح الصلب.

## Liste des abréviations

- AIA** : Acide indole-acétique
- APX** : Ascorbate peroxydase
- ATR**: Attenuated Total Reflection
- Bt** : *Bacillus thuringiensis*
- CAT**: Catalase
- CMC**: Carboxyméthylcellulose
- DAPG**: Diacétylphloroglucinol
- DO** : Densité optique
- DRX** : diffraction des rayons X
- EE** : Efficacité d'encapsulation
- EPS**: Exopolysaccharides
- ERD15** : Early responsive to dehydration 15
- FS** : Facteur de sphéricité
- FTIR** : Fourier-transform infrared spectroscopy
- GDE** : Granulés dispersibles dans l'eau.
- GGPP** : Géranylgeranyl pyrophosphate
- GM** : Granulés mouillables
- HCN**: Hydrogen cyanide
- HSP**: Heat shock protein
- ISR**: Induced Systemic Resistance
- LB**: Luria Bertani
- MDA** : Malondialdéhyde
- MS** : Murashige and skoog
- nifH** : Nitrogenase iron protein H
- ODD** : Objectifs de développement durable
- PBS** : Phosphate-buffered saline
- PEG**: Polyéthylène glycol
- PGPR**: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
- PM**: Poudres mouillables
- POD**: Peroxydase
- PSB**: Phosphate Solubilizing Bacteria
- PVK**: Pikovskaya

**PVP:** Polyvinylpyrrolidone

**ROS:** Reactive oxygen species

**SAR:** Systemic Acquired Resistance

**SOD:** Superoxyde dismutase

**TCA:** Trichloroacetic acid

**TTC:** Triphenyl-tetrazolium chloride

**UFC:** Unité formant colonie

**ZSB:** Zinc Solubilizing Bacteria

## Liste des figures

<b>Fig.1.</b> Les principes fondamentaux de l'agriculture durable .....	5
<b>Fig.2.</b> Principaux domaines d'interactions plantes-bactéries, et les principaux services fournis par les bactéries bénéfiques à la plante .....	12
<b>Fig.3.</b> Disponibilité des nutriments médiée par les bioinoculants. (A) Bioinoculants fixateurs d'azote. (B) Bioinoculants solubilisants les P, K et Zn .....	18
<b>Fig.4.</b> Promotion de la croissance des plantes <i>via</i> la production de différentes phytohormones.....	21
<b>Fig.5.</b> Schéma des principaux avantages de la bioformulation conventionnelle et de la bioencapsulation .....	32
<b>Fig.6.</b> Schéma des principales techniques d'encapsulation des PGPR .....	36
<b>Fig.7.</b> Effet des (A) différentes concentrations de PEG <sub>6000</sub> (%) et (B) différents osmoprotecteurs (mM) sur la croissance des souches B25 et Pa .....	65
<b>Fig.8.</b> Survie de (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa à différentes étapes du processus de bioencapsulation .....	67
<b>Fig.9.</b> Survie de (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa pendant 24 mois de stockage .....	68
<b>Fig.10.</b> Production d'AIA par (A) Pa et (B) B25+Pa pendant 24 mois de stockage .....	70
<b>Fig.11.</b> Production de sidérophores par (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa pendant 24 mois de stockage .....	70
<b>Fig.12.</b> Solubilisation du phosphate par (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa pendant 24 mois de stockage .....	71
<b>Fig.13.</b> Taux de gonflement (%) des capsules sèches de B25, Pa et B25+Pa .....	72
<b>Fig.14.</b> Cinétique de libération des bactéries à partir des capsules sèches de B25, Pa et B25+Pa .....	73
<b>Fig.15.</b> Effet de l'inoculation par les bactéries libres (L) et encapsulées (E) sur (A, B) le poids frais des racines et des pousses (g), (C) la longueur des racines (cm), (D) la surface foliaire et (E) la couleur des rosettes des plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> cultivées sur milieu MS ½.....	75
<b>Fig.16.</b> Illustration de la colonisation des racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par des bactéries libres et encapsulées révélée par le chlorure de triphényltétrazolium (TTC).....	76
<b>Fig.17.</b> Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur la teneur en (A) chlorophylle a (mg/g MF), (B) chlorophylle b (mg/g MF), (C) chlorophylle a+b (mg/g MF) et (D) caroténoïdes (mg/g MF) des plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> cultivées sur milieu MS ½ .....	77
<b>Fig.18.</b> Effet de l'inoculation de B25 et Pa libres et encapsulées sur la croissance du blé dur .....	78

<b>Fig.19.</b> Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur (A, B) la longueur des racines et des pousses (cm), (C, D) le poids frais des racines et des pousses (g) et (E, F) le poids sec des racines et des pousses des plantes de blé dur .....	79
<b>Fig.20.</b> Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur la teneur en (A) chlorophylle a (mg/g MF), (B) chlorophylle b (mg/g MF), (C) chlorophylle a+b (mg/g MF) et (D) caroténoïdes (mg/g MF) des plantes de blé dur .....	80
<b>Fig.21.</b> Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur (A, B) la teneur totale en sucres solubles des racines et des pousses (µg/g MF) et (C, D) la teneur totale en protéines des racines et des pousses (µg/g MF) des plantes de blé dur .....	81
<b>Fig.22.</b> Dénombrements bactériens (Log N (UFC/g)) de la rhizosphère, du rhizoplan et de l'endosphère racinaire des plantes de blé inoculées avec (A) B25 libre, (B) B25 encapsulée, (C) Pa libre et (D) Pa encapsulée .....	83
<b>Fig.23.</b> Effets de l'inoculation de B25 libre, de B25 encapsulée, de Pa libre et de Pa encapsulée sur la longueur (A) des racines et (B) des pousses, et le poids (C) des racines et (D) des pousses des plantes de blé après 15, 30 et 45 jours de traitement .....	84
<b>Fig.24.</b> Spectres FTIR de l'alginate, et des films de mélange d'alginate+perlie, alginate+amidon, alginate+perlite+amidon, alginate+talc et alginate+argile .....	95
<b>Fig.25.</b> Diagrammes de diffraction des rayons X de l'alginate, et des mélanges d'alginate+perlie, alginate+amidon, alginate+perlite+amidon, alginate+talc et alginate+argile.....	96
<b>Fig.26.</b> Image des capsules fabriquées d'alginate et de différents mélanges d'additifs .....	97
<b>Fig.27.</b> La croissance des deux souches testées (Log N (UFC/ml) en présence d'alginate, d'argile et du talc. Les diagrammes à barres représentent l'erreur type moyenne de trois expériences différentes .....	98
<b>Fig.28.</b> Survie de B25 aux différentes étapes du procédé de bioencapsulation lors de l'encapsulation dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc .....	100
<b>Fig.29.</b> Survie de Pa aux différentes étapes du procédé de bioencapsulation lors de l'encapsulation dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc .....	101
<b>Fig.30.</b> Survie de B25 dans les billes (A) d'alginate, (B) d'alginate + argile et (C) d'alginate + talc durant 12 mois de stockage .....	102
<b>Fig.31.</b> Survie de Pa dans les billes (A) d'alginate, (B) d'alginate + argile et (C) d'alginate + talc durant 12 mois de stockage .....	103
<b>Fig.32.</b> Production de sidérophores par B25 encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage .....	104

<b>Fig.33.</b> Production de sidérophores par Pa encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage .....	105
<b>Fig.34.</b> Solubilisation de phosphate par B25 encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage .....	106
<b>Fig.35.</b> Solubilisation de phosphate par Pa encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage .....	107
<b>Fig.36.</b> Production d'AIA par Pa encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage .....	108
<b>Fig.37.</b> Taux de gonflement (%) des capsules sèches de (A) B25 et de (B) Pa durant 10 jours.	
<b>Fig.38.</b> Cinétique de diffusion des bactéries à partir des capsules sèches de (A) B25 et de (B) Pa durant 10 jours .....	111
<b>Fig.39.</b> Effet de l'exposition aux rayons ultraviolets sur la survie de (A) B25 et (B) Pa encapsulées dans l'alginate, alginate+argile et alginate+talc .....	112
<b>Fig.40.</b> Effet de l'inoculation de B25 et Pa libres et encapsulées sur la croissance du blé dur .....	113
<b>Fig.41.</b> Effet de l'inoculation bactérienne par FZB42 et par B25 et Pa libres et encapsulées sur (A, B) la longueur des pousses et des racines (cm), (C, D) le poids frais des pousses et des racines (g) et (E, F) le poids sec des pousses et des racines des plantes de blé dur .....	114
<b>Fig.42.</b> Effet de l'inoculation bactérienne par FZB42 et par B25 et Pa libres et encapsulées sur le contenu de (A) chlorophylle a (mg/g MF), (B) la chlorophylle b (mg/g MF), (C) la chlorophylle a + b (mg/g MF), (D) les caroténoïdes (mg /g MF) et (E) MDA (nM/g MF) des plantes de blé dur .....	116
<b>Fig.43.</b> Effet de l'inoculation bactérienne par FZB42 et par B25 et Pa libres et encapsulées sur (A, B) la teneur en sucres solubles totaux (µg/g MF) et (C, D) la teneur en protéines totales (µg/g MF) des pousses et des racines des plantes de blé dur .....	117
<b>Fig.44.</b> Dénombrement des bactéries (Log N (UFC/g)) de (A) la rhizosphère et (B) de l'endosphère racinaire des plantes de blé dur inoculées avec FZB42, B25 et Pa libres et encapsulées.....	118

## Liste des tableaux

<b>Tab.1.</b> Caractéristiques principales des catégories de bioformulation .....	33
<b>Tab.2.</b> Exemples de caractéristiques des bioformulations de PGPR et de leurs objectifs d'application .....	44
<b>Tab.3.</b> Résumé des formulations de bioinoculants commercialisées disponibles dans le marché des PGPR .....	45
<b>Tab.4.</b> Caractéristiques des différentes billes d'alginate .....	66
<b>Tab.5.</b> Facteurs de sphéricité des capsules fabriquées d'alginate et de différents mélanges .....	97
<b>Tab.6.</b> Caractéristiques des différentes formulations de capsules d'alginate.....	99

## Table des matières

Résumé .....	I
Abstract .....	II
المخلص .....	III
Liste des abréviations .....	IV
Liste des figures .....	VI
Liste des tableaux .....	IX
Table des matières .....	XI
INTRODUCTION .....	1
<b>CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART</b>	
1. Origine de l'agriculture intensive et sa dépendance aux produits chimiques .....	4
2. Développement de l'agriculture durable .....	5
3. L'importance des bioinoculants dans l'agriculture durable .....	6
3.1. Les rhizobactéries.....	8
3.2. Les endophytes.....	9
3.3. Les bactéries épiphytes et les phyllobactéries.....	10
4. Rôle des bioinoculants dans l'agriculture durable .....	12
4.1. Réduction de l'utilisation des engrais chimiques.....	12
4.1.1. Fixation biologique d'azote.....	13
4.1.2. Solubilisation du phosphate .....	14
4.1.3. Solubilisation du potassium .....	15
4.1.4. Solubilisation du zinc .....	16
4.2. Amélioration de la croissance des plantes.....	18
2.1. Production de phytohormones.....	18
4.3. Promotion de la résilience des plantes .....	21
4.3.1. Résistance aux stress abiotiques.....	21
4.3.2. Résistance aux stress biotiques .....	24
4.3.2.1. L'antibiose.....	24
4.3.2.2. Les enzymes lytiques .....	24
4.3.2.3. Production d'ACC désaminase .....	25
4.3.2.4. Production de sidérophores .....	25
4.3.2.5. La résistance systémique induite.....	26
5. Design des bioinoculants.....	26

6. Caractéristiques biologiques et écologiques de <i>Bacillus thuringiensis</i> et son rôle dans la promotion de la croissance des plantes .....	27
7. Caractéristiques biologiques et écologiques de <i>Pantoea agglomerans</i> et son rôle dans la promotion de la croissance des plantes .....	28
8. Méthodes d'application des bioinoculants et limites des méthodes conventionnelles.....	29
9. Techniques d'encapsulation .....	34
9.1. Séchage par atomisation.....	34
9.2. Émulsification .....	35
9.3. Gélation ionique .....	35
10. Propriétés et choix des supports polymériques .....	36
10.1. Alginate de sodium .....	37
10.2. Chitosane .....	37
10.3. La chitine .....	38
11. Choix des additifs .....	38
11.1. Amidon.....	39
11.2. Acide humique .....	39
11.3. Minéraux argileux .....	40
11.3.1. Bentonite .....	40
11.3.2. Perlite .....	41
11.3.3. Kaolin .....	41
11.4. Sucres .....	42
11.5. Lait écrémé.....	42
11.6. Talc.....	42
12. Progrès récents dans l'encapsulation des biofertilisants et des agents stimulateurs de croissance .....	43
13. État actuel et perspectives de bioformulations commerciales des PGPR .....	45

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

<b>Partie 1 : Dynamique de colonisation racinaire des rhizobactéries encapsulées dans de l'alginate : implications pour la croissance racinaire d'<i>Arabidopsis thaliana</i> et les performances du blé dur .....</b>	<b>48</b>
1. 1. Souches bactériennes .....	48
1.2. Croissance bactérienne sous stress hydrique .....	49
1.3. Effet des osmoprotecteurs sur la survie bactérienne .....	49
1.4. Microorganismes et conditions de culture .....	49

1.5. Bioencapsulation des cellules.....	49
1.6. Efficacité d'encapsulation (EE) .....	50
1.7. Taux de survie .....	50
1.8. Vérification de la viabilité cellulaire et des activités PGP pendant le stockage .....	50
1.9. Propriétés de gonflement .....	52
1.10. Propriétés de libération .....	52
1.11. Test d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
1.11.1. Conditions de croissance.....	52
1.11.2. Estimation des chlorophylles et des caroténoïdes .....	53
1.12. Effets de l'application de rhizobactéries libres et encapsulées sur la croissance du blé dur ....	53
1.12.1. Désinfection et germination des graines .....	53
1.12.2. Préparation de l'inoculum bactérien libre .....	54
1.12.3. Semis et croissance des graines .....	54
1.12.4. Évaluation des paramètres morphologiques .....	55
1.12.5. Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes .....	55
1.12.6. Estimation des sucres totaux .....	55
1.12.7. Estimation des protéines totales .....	55
1.12.8. Dénombrement des bactéries rhizosphériques .....	56
1.12.9. Dénombrement des bactéries épiphytes des racines .....	56
1.12.10. Dénombrement des bactéries endophytes des racines .....	56
1.13. Analyse statistique .....	56
<b>Partie 2 : Développement de biofertilisants par encapsulation de <i>Pantoea agglomerans</i> et <i>Bacillus thuringiensis</i> avec additifs pour améliorer la survie et la croissance du blé dur .....</b>	<b>57</b>
2.1. Analyses physico-chimiques des bioformulations .....	57
2.1.1. Préparation des billes non inoculées .....	58
2.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	58
2.1.3. Analyse par diffraction des rayons X (DRX) .....	58
2.2. Analyse de la morphologie .....	59
2.3. Souches bactériennes .....	59
2.4. Effet des additifs sur la croissance bactérienne .....	59
2.5. Préparation des inoculums .....	59
2.6. Bioencapsulation des cellules .....	60
2.7. Efficacité d'encapsulation .....	60
2.8. Taux de survie .....	60

2.9. Vérification de la viabilité cellulaire et des activités PGP durant le stockage .....	60
2.10. Propriétés de gonflement .....	61
2.11. Cinétique de libération .....	61
2.12. Effets des irradiations UV sur les cellules bactériennes immobilisées .....	61
2.13. Expérience en pots .....	61
2.13.1. Désinfection et germination des graines .....	61
2.13.2. Préparation de l'inoculum bactérien libre .....	61
2.13.3. Semis et mise en culture des graines .....	62
2.13.4. Evaluation des paramètres morphologiques .....	62
2.13.5. Peroxydation lipidique .....	62
2.13.6. Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes .....	63
2.13.7. Sucres totaux .....	63
2.13.8. Protéines totales .....	63
2.13.9. Dénombrement des bactéries rhizosphériques et endophytiques racinaires .....	63
2.14. Analyse statistique .....	63

### **CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

<b>Partie 1 : Dynamique de colonisation racinaire des rhizobactéries encapsulées dans de l'alginate : implications pour la croissance racinaire d'<i>Arabidopsis thaliana</i> et les performances du blé dur .....</b>	<b>65</b>
1.1. Réponse des souches bactériennes au stress hydrique et ajout d'osmoprotecteurs.....	65
1.2. Bioencapsulation .....	66
1.3. Études du stockage des billes .....	68
1.3.1. Survie des souches encapsulées .....	68
1.3.2. Maintien des caractéristiques PGP par les souches encapsulées au fil du temps.....	69
1.4. Étude du gonflement .....	71
1.5. Cinétique de libération .....	72
1.6. Test d'inoculation sur <i>Arabidopsis thaliana</i> : effets sur les paramètres morphologiques, la colonisation et les paramètres biochimiques .....	73
1.6.1. Paramètres morphologiques et analyse de la surface foliaire .....	73
1.6.2. Dosage des pigments chlorophylliens .....	76
1.7. Potentiel des souches bactériennes encapsulées sur la croissance du blé dur.....	77
1.7.1. Paramètres morphologiques .....	77
1.7.2. Paramètres biochimiques .....	80
1.7.2.1. Pigments chlorophylliens .....	80

1.7.2.2. Sucres totaux et protéines totales .....	81
1.7.3. Dénombrement des bactéries rhizosphériques, épiphytes et endophytes des racines .....	82
1.7.4. Évolution du poids et de la longueur des racines et des pousses .....	83
1.8. Discussion .....	84
<b>Partie 2 : Développement de biofertilisants par encapsulation de <i>Pantoea agglomerans</i> et <i>Bacillus thuringiensis</i> avec additifs pour améliorer la survie et la croissance du blé dur .....</b>	<b>94</b>
2.1. Caractérisation physico-chimique des bioformulations .....	94
2.1.1. Analyse infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	94
2.1.2. Analyse par diffraction des rayons X .....	95
2.2. Analyse des diamètres et calcul des indices de sphéricité .....	96
2.3. Effet de l'ajout des additifs sur la croissance bactérienne .....	97
2.4. Bioencapsulation des cellules .....	98
2.5. Études du stockage .....	102
2.5.1. Survie .....	102
2.5.2. Production des sidérophores .....	103
2.5.3. Solubilisation du phosphate .....	105
2.5.4. Production d'AIA .....	107
2.6. Taux de gonflement .....	108
2.7. Cinétique de libération .....	110
2.8. Effets des rayonnements UV sur la survie bactérienne .....	111
2.9. Réponse de la croissance du blé dur aux traitements par les rhizobactéries libres et encapsulées.....	112
2.9.1. Paramètres morphologiques .....	112
2.9.2. Paramètres biochimiques .....	115
2.9.2.1. Dosage des chlorophylles et de MDA .....	115
2.9.2.2. Dosages des sucres solubles et des protéines totales .....	116
2.9.3. Détermination de la colonisation rhizosphérique et endophytique racinaire .....	117
2.10. Discussion .....	118
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>133</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>135</b>
<b>Annexes</b>	

# **INTRODUCTION**

Le monde est actuellement confronté à des défis croissants en raison de la surpopulation, l'industrialisation massive et les changements climatiques (Ali et *al.*, 2023). D'ici 2050 la population du monde devrait atteindre 9,7 milliards d'habitants, exerçant une pression sans précédent sur les ressources naturelles et la sécurité alimentaire (Ehrlich et Harte, 2015). Pour répondre à la demande alimentaire croissante, l'agriculture est forcée de s'étendre vers des zones moins fertiles et d'intensifier l'utilisation de fertilisants et de pesticides chimiques, avec près de 190 millions de tonnes d'engrais synthétiques et 2,7 millions de tonnes de pesticides utilisés annuellement (FAO, 2021 ; Ali et *al.*, 2023). Si ces intrants chimiques améliorent temporairement les rendements agricoles, leur usage intensif a des conséquences écologiques et sanitaires graves (Rani et *al.*, 2021). Les fertilisants à base de nitrates et de phosphates, essentiels pour stimuler la productivité agricole, polluent les eaux souterraines et déséquilibrent les écosystèmes, mettant en danger la biodiversité aquatique et terrestre (Vitousek et *al.*, 1997). Parallèlement, l'utilisation excessive et non contrôlée de pesticides chimiques menace la sécurité alimentaire à long terme en affectant les espèces non ciblées, en affaiblissant les cultures face aux pathogènes et en présentant des risques importants pour la santé publique. Ces pratiques perturbent également la fertilité des sols et l'équilibre biologique global, tout en favorisant l'accumulation de résidus toxiques dans les aliments, compromettant ainsi la santé des consommateurs et des agriculteurs (Damalas et Eleftherohorinos, 2011).

Face aux défis environnementaux et aux impacts négatifs des pratiques agricoles conventionnelles, la communauté scientifique s'oriente vers des solutions innovantes pour protéger l'environnement et réduire l'utilisation des produits chimiques synthétiques. L'agriculture durable, basée sur la bio-ingénierie microbienne, émerge comme une alternative prometteuse et respectueuse de l'environnement (Kaur et Kaur, 2018). Dans ce contexte, les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) représentent une solution efficace pour améliorer la productivité agricole tout en préservant la qualité des sols et la biodiversité (Hossain et *al.*, 2023). Utilisées comme bioinoculants, elles agissent par divers mécanismes, notamment la solubilisation et le recyclage des nutriments, la production de phytohormones, le renforcement de la tolérance des plantes aux stress abiotiques, la suppression des pathogènes par l'induction de la résistance systémique et la sécrétion de molécules antimicrobiennes (Etesami et *al.*, 2023a ; Orozco-Mosqueda et *al.*, 2023 ; Singh et *al.*, 2023).

Malgré le potentiel remarquable des PGPR pour améliorer la croissance et le rendement des plantes, leur application pratique et leur commercialisation rencontrent plusieurs défis majeurs

(Rai et *al.*, 2023). Les inoculants microbiens conventionnels souffrent de limitations telles que la faible survie des bactéries face aux conditions environnementales défavorables (stress abiotiques comme la sécheresse et la compétition microbienne). Ces contraintes réduisent leur capacité à coloniser efficacement les plantes cibles et à maintenir leurs activités dans le sol (Vejan et *al.*, 2016 ; Rai et *al.*, 2023).

L'encapsulation des PGPR dans des matrices protectrices, comme l'alginate, émerge comme une solution prometteuse pour surmonter ces limitations. L'alginate, un polymère naturel dérivé d'algues marines, est reconnu pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa capacité à former des gels en présence d'ions divalents tels que le calcium (Saber Riseh et *al.*, 2021). Cette méthode protège les bactéries contre les stress biotiques et abiotiques tout en assurant une libération progressive et contrôlée dans la rhizosphère (Balla et *al.*, 2022). L'ajout d'additifs tels que l'argile, le talc ou l'amidon peut encore améliorer les propriétés des billes d'alginate. L'argile, riche en minéraux, renforce la structure des billes, améliore leur stabilité thermique et leur rétention d'eau, offrant une protection accrue contre les stress environnementaux (Massaro et *al.*, 2018). Le talc, quant à lui, favorise une libération progressive des micro-organismes grâce à sa faible réactivité chimique et sa texture douce (Jadhav et *al.*, 2013).

*Pantoea agglomerans* et *Bacillus thuringiensis* figurent parmi les bactéries promotrices de la croissance des plantes les plus prometteuses en agriculture. *P. agglomerans* connue pour ses nombreuses propriétés bénéfiques, colonise efficacement diverses céréales, notamment le blé, le riz, et le maïs (Gond et *al.*, 2015 ; Lv et *al.*, 2022 ; Ansari et *al.*, 2024). Cette bactérie établit des interactions bénéfiques durables dans la rhizosphère et l'endosphère des plantes (Quecine et *al.*, 2012), favorisant leur croissance grâce à la production de phytohormones (Lorenzi et *al.*, 2022), la solubilisation des phosphate et la production d'ammoniac (Cherif-Silini et *al.*, 2019). Elle stimule également le système immunitaire des plantes et sécrète diverses enzymes et protéines contribuant à sa capacité de lutte contre des phytopathogènes fongiques (Herrera et *al.*, 2016 ; Lorenzi et *al.*, 2022).

*B. thuriengiensis*, principalement reconnu comme biopesticide efficace contre de nombreux ravageurs, est capable de survivre dans des conditions environnementales difficiles grâce à la formation d'endospores résistantes (Bravo et *al.*, 2011). Cette bactérie possède également des propriétés de biofertilisation et de biostimulation remarquables ; elle améliore la croissance des plantes en produisant des phytohormones, de l'ACC désaminase, des sidérophores et des composés organiques volatiles (Azizoglu, 2019). En tant que colonisateur efficace de la rhizosphère et des racines, elle mobilise les nutriments et protège les plantes contre divers

pathogènes grâce à un arsenal enzymatique antimicrobien (Azizoglu, 2019 ; Gomis-Cebolla et Berry, 2023).

Deux espèces végétales ont été choisies pour évaluer l'efficacité des bactéries encapsulées : *Arabidopsis thaliana* et *Triticum durum* (blé dur). D'une part, *Arabidopsis thaliana* en tant que plante modèle universelle offre une plateforme expérimentale rapide et contrôlée pour étudier les interactions plante-micro-organismes (Song et al., 2021). Et d'autre part, le blé dur, culture stratégique en Algérie et dans le bassin méditerranéen, a été sélectionnée pour tester l'impact des bioinoculants dans un contexte agricole réel (Grosse-Heilmann et al., 2024).

En tant que céréale essentielle dans ces régions, le blé dur constitue une culture clé pour la sécurité alimentaire et un pilier économique grâce à sa culture étendue dans des environnements souvent soumis à des contraintes abiotiques, telles que la sécheresse et les sols pauvres (Erenstein et al., 2022). Ainsi, les souches bactériennes utilisées dans cette étude, isolées de la rhizosphère du blé dur, renforcent leur pertinence pour cette plante.

Cette thèse vise à développer des approches innovantes pour améliorer l'efficacité des bioinoculants microbiens dans des systèmes agricoles. Le premier volet de cette recherche s'est concentré sur la conception de capsules d'alginate contenant *B. thuringiensis* B25 et *P. agglomerans* Pa, afin de garantir leur viabilité à long terme, de préserver leurs activités promotrices de la croissance végétales et de permettre une libération contrôlée. L'efficacité d'encapsulation, le taux de survie, la cinétique de libération, ainsi que la capacité de ces bactéries encapsulées à coloniser les racines d'*Arabidopsis thaliana* en conditions hydroponiques ont été examinées. Par ailleurs, l'impact de ces formulations sur la croissance du blé dur a également été étudié.

Dans le second volet, l'accent a été mis sur le développement de biofertilisants en encapsulant les mêmes souches bactériennes dans des matrices d'alginate enrichies en divers additifs, afin d'améliorer la structure physico-chimique des matrices, renforcer la survie bactérienne, préserver les activités PGP et offrir une protection efficace contre les rayonnements UV. L'effet des bioformulations sur la croissance du blé dur ainsi que leur capacité de colonisation rhizosphérique et endophytique ont été abordés.

# **CHAPITRE I : ÉTAT DE L'ART**

### 1.1. Origine de l'agriculture intensive et sa dépendance aux produits chimiques

L'agriculture intensive a véritablement pris son essor après la seconde guerre mondiale, dans le cadre de la « Révolution verte » des années 1950-1970 (Orczewska et *al.*, 2024). Cette période a marqué une transformation radicale des pratiques agricoles, visant à répondre aux besoins alimentaires croissants dûs à l'explosion démographique mondiale (Khatri et *al.*, 2024). Pour atteindre cet objectif, des innovations techniques et scientifiques ont été introduites, notamment l'utilisation d'engrais chimiques, de pesticides synthétiques (comme le DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane, et le glyphosate), et de variétés de culture à haut rendement (Kruse-Pläß et *al.*, 2021 ; Xiong et *al.*, 2022). En parallèle, les pratiques de monoculture et l'expansion des terres agricoles ont renforcé la productivité, mais souvent au détriment des écosystèmes naturels (Belete et Yadete, 2023).

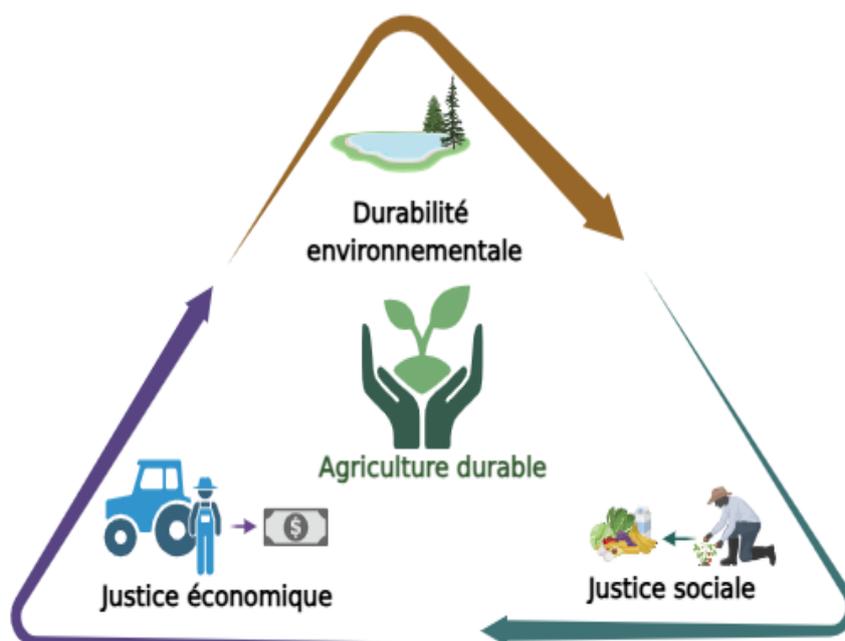
Bien que ces intrants synthétiques aient permis une augmentation spectaculaire des rendements agricoles, leur utilisation intensive a entraîné des impacts environnementaux et sociaux profonds (Nulkar, 2024). Les pratiques de monoculture épuisent les nutriments du sol, nécessitent l'application continue de fertilisants pour maintenir la production et les rendements (Belete et Yadete, 2023). L'utilisation excessive d'engrais chimiques peut entraîner une salinisation et une acidification des sols, réduisant ainsi leur fertilité naturelle à long terme, les excès d'engrais azotés et phosphatés lessivés dans les cours d'eau peuvent provoquer le phénomène d'eutrophisation, entraînant une prolifération d'algues toxiques, la désoxygénation des plans d'eau et la mort des poissons (Liu et *al.*, 2021). Ce phénomène affecte également les réserves d'eau potable, entraînant des risques sur la santé humaine (Liu et *al.*, 2021). Les pesticides ne ciblent pas uniquement les parasites, mais aussi les insectes bénéfiques, les pollinisateurs et d'autres organismes utiles. Cela conduit à une diminution de la biodiversité des sols et des écosystèmes environnants (Beaumelle et *al.*, 2023). L'exposition prolongée aux pesticides a été associée à divers problèmes de santé, tels que les cancers, les troubles neurologiques et les perturbations endocriniennes (El-Nahhal et El-Nahhal, 2021). Les résidus de pesticides dans les aliments constituent également une menace pour la sécurité alimentaire (Wahab et *al.*, 2022).

L'agriculture intensive favorise la concentration des terres et la dépendance des agriculteurs envers les grandes entreprises agrochimiques pour l'achat de semences et d'intrants. Cela peut exacerber les inégalités économiques et réduire la résilience des petites exploitations agricoles (Selwyn, 2021).

### 2. Développement de l'agriculture durable

Le terme « agriculture durable » a été popularisé dans les années 1980, en réponse aux critiques croissantes de l'agriculture intensive. L'idée était de développer un système agricole capable de produire de la nourriture tout en préservant les ressources naturelles (Golaś et al., 2020). Le terme a été formalisé lors de la conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement (Sommet de la Terre) en 1992 à Rio De Janeiro (Mahanayak, 2024). Plus récemment, les objectifs de développement durable (ODD) adoptés par l'ONU en 2015 ont réaffirmé l'engagement mondial pour une agriculture durable (objectif 2 : « faim zéro » et objectif 12 : « consommation et production responsables ») (Stroparo et Floriani, 2024).

L'agriculture durable repose sur trois piliers fondamentaux (Fig.1): la durabilité environnementale (préservation des sols, de l'eau et de la biodiversité), la viabilité économique (rentabilité pour les agriculteurs), et la justice sociale (conditions de travail équitables et sécurité alimentaire) (Hariram et al., 2023). Plusieurs pratiques sont associées à l'agriculture durable y compris la rotation des cultures et l'intégration des techniques agroécologiques, un accent particulier est mis sur le recours aux bioinoculants dans le cadre agroécologique (Trigo et al., 2021).



**Fig.1.** Les principes fondamentaux de l'agriculture durable.

L'introduction des bioinoculants comme solution durable en agriculture a émergé progressivement, sous l'impulsion des préoccupations environnementales et économiques liées aux pratiques agricoles intensives (Karnwal et al., 2023). Ce développement s'inscrit

dans une longue évolution scientifique visant à comprendre et exploiter les interactions entre les micro-organismes et les plantes (Karnwal et *al.*, 2023). Les premières observations sur les interactions bénéfiques entre les micro-organismes et les plantes remontent à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Les travaux de Martinus Beijerinck et Sergei Winogradsky, pionniers de la microbiologie, ont permis de découvrir le rôle des bactéries fixatrices d'azote, telles que *Rhizobium* qui colonisent les nodosités des légumineuses (Mahapatra et *al.*, 2023). Ces découvertes ont jeté les bases de la bioinoculation en mettant en évidence la capacité des micro-organismes à améliorer la nutrition des plantes (Mahapatra et *al.*, 2023). Les bioinoculants ont été développés comme une alternative partielle aux engrais chimiques, en particulier pour les légumineuses (Bomfim et *al.*, 2021). Cependant, leur utilisation restait limitée en raison des connaissances insuffisantes sur leur efficacité et leur mode d'application (Bomfim et *al.*, 2021).

Face aux impacts négatifs de l'agriculture intensive dans les années 1980 et 1990, les scientifiques ont commencé à réévaluer les solutions biologiques (Ewert et *al.*, 2023). Cette période a vu l'essor de concepts comme l'agroécologie, qui met en avant des pratiques agricoles respectueuses de l'environnement et des ressources naturelles comme l'utilisation des bioinoculants qui ont gagné plus de popularité grâce à leurs multiples bénéfices liés à la réduction de la dépendance aux intrants chimiques, à l'amélioration de la résilience des cultures et de la qualité des sols (Ewert et *al.*, 2023). À partir des années 2000, l'utilisation des bioinoculants s'est étendue et diversifiée, soutenue par l'augmentation significative de la sensibilisation des populations envers les pratiques agricoles durables et par les progrès dans des domaines tels que la biotechnologie et la microbiologie (Gebaska et *al.*, 2020 ; Yadav et *al.*, 2020). Parallèlement, la mise au point des techniques de bioformulation a accru la viabilité et l'efficacité des bioinoculants, facilitant, ainsi, leur application sur le terrain et leur adoption par les agriculteurs (Khan et *al.*, 2023).

### **3. L'importance des bioinoculants dans l'agriculture durable**

À l'heure actuelle, l'agriculture biologique occupe une place prépondérante dans le domaine, et garantit une durabilité pérenne. Les avancées dans le domaine de la durabilité nécessitent l'exploitation de micro-organismes utiles et l'emploi des communautés microbiennes (Suman et *al.*, 2022).

Les bioinoculants sont des ajouts de micro-organismes bénéfiques au sol fréquemment employés afin de booster le potentiel du sol, d'améliorer sa santé et de satisfaire les besoins en nutriments de la plante hôte. Leur composition comprend des cellules dormantes ou vivantes

de micro-organismes (bactéries, champignons et algues), qui sont capables de fixer l'azote, de produire le cyanure d'hydrogène et les sidérophores, et ayant d'autres activités favorisant la croissance végétale (Karnwal et *al.*, 2023).

Les bioinoculants sont regroupés en tant que biofertilisants, biostimulants ou bioagents (agents de biocontrôle) en fonction de l'objectif visé, à savoir l'amélioration de la disponibilité et l'absorption des nutriments, la stimulation des processus naturels impliqués dans la croissance, la nutrition et la tolérance aux stress abiotiques, ou la protection des plantes contre les ravageurs (Tallapragada et Seshagiri, 2017 ; Roupael et Colla, 2020). Les bioinoculants sont appliqués directement au sol ou indirectement par traitement des semences, trempage des racines des semis ou par pulvérisation sur la surface de la plante.

L'origine et le développement des bioinoculants remontent à la découverte initiale des interactions bénéfiques entre les microbes du sol et les plantes. Les premières utilisations de bioinoculants remontent à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, notamment avec l'introduction des *Rhizobium* pour améliorer la fixation d'azote chez les légumineuses (Martínez-Romero, 2009). Ces bactéries diazotrophes colonisent la rhizosphère en formant des nodules dans les racines de leurs plantes hôtes, issues de diverses espèces de la famille des Fabaceae. Lors de la symbiose légumineuses-*Rhizobium*, une fixation biologique de l'azote survient, ce qui peut souvent répondre intégralement aux besoins de la plante en azote (Etesami, 2022). Depuis lors, les bioinoculants ont évolué pour inclure une grande diversité de micro-organismes, tels que les bactéries, les champignons mycorrhiziens et les actinomycètes, qui favorisent la croissance des plantes, la protection contre les pathogènes et l'amélioration de la fertilité des sols (Solanki et *al.*, 2016). Aujourd'hui, les bioinoculants jouent un rôle crucial dans l'agriculture moderne, en imposant un équilibre écologique entre les défis agricoles et environnementaux. L'utilisation efficace des bioinoculants assure une production agricole élevée tout en minimisant les impacts environnementaux.

La majorité des premiers bioinoculants développés contenaient une seule souche microbienne. Cependant, la recherche s'est rapidement orientée vers l'utilisation de consortiums microbiens, combinant deux ou plusieurs souches du même genre ou de genres différents (Santos et *al.*, 2019). On désigne couramment l'utilisation d'inoculants mixtes sous le nom de co-inoculation ou d'inoculation mixte (Mondal et *al.*, 2020). L'idée consiste à associer des souches ou des espèces qui interviennent dans divers processus microbiens, offrant l'avantage d'un éventail plus large de fonctions bénéfiques pour les plantes en assurant des effets synergiques (Patil et Solanki, 2016).

Dans le cadre de l'agriculture durable, plusieurs types de bactéries sont exploités en tant que bioinoculants pour leurs contributions bénéfiques aux plantes, notamment les bactéries colonisatrices de la rhizosphère, de l'épiphyte et de l'endosphère (Fig.2). Ces microorganismes interagissent différemment avec les plantes et l'environnement, offrant une gamme de services écosystémiques allant de la nutrition végétale à la protection contre les pathogènes.

### 3. 1. Les rhizobactéries

Lorenz Hiltner a développé le concept de « rhizosphère » en 1904 en décrivant la zone du sol ou le microenvironnement qui entoure la racine et qui est influencé par l'excrétion des composés racinaires appelés « les exsudats » (Hartmann et *al.*, 2008). La rhizosphère est un point chaud pour divers micro-organismes tels que les bactéries et les champignons, ainsi que pour d'autres organismes comme les nématodes et les algues, et elle est considérée comme l'un des écosystèmes les plus complexes de la planète (Mendes et *al.*, 2013). En réalisant la photosynthèse, les plantes déposent leurs métabolites photosynthétiques dans la rhizosphère par rhizodéposition, le sol rhizosphérique est ainsi fertilisé et enrichi en nutriments ayant un apport abondant de carbone, notamment les acides aminés et les glucides. Ces derniers agissent comme des signaux pour attirer les populations microbiennes afin de renforcer leur prolifération, augmentant ainsi les populations de celles qui ont le plus d'avantages à les absorber en assurant la disponibilité énergétique et nutritive pour la population microbienne de la rhizosphère (connues également sous le nom de rhizobacteria ou bacteriorhiza) (Vetterlein et *al.*, 2020).

Plusieurs facteurs physiologiques régissent les interactions entre les plantes et les micro-organismes, ainsi que la composition de leurs exsudats, ce qui permet aux plantes de moduler les micro-organismes rhizosphériques (Nuccio et *al.*, 2020). Selon les scientifiques, la rhizosphère est généralement la plus riche en microbes, suivie du rhizoplan, puis de l'endosphère (Nuccio et *al.*, 2020).

Chez les bactéries rhizosphériques, certaines, connues sous le nom de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (**PGPR**), ont la capacité de stimuler la croissance et la santé des plantes grâce à des interactions antagonistes et synergiques (dos Santos et *al.*, 2020). Il est possible que ces PGPR soient libres, symbiotiques, parasites ou saprophytes et jouent un rôle essentiel dans la promotion de la croissance et de la productivité des végétaux (Bhattacharyya et Jha, 2012). Des rhizobactéries des genres *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* et d'autres ont été

identifiées comme PGPR (Chandran et *al.*, 2021). La présence d'actinomycètes comme *Micromonospora* sp. et *Streptomyces* sp. dans la rhizosphère est également supposée favoriser la croissance des plantes et gérer les agents pathogènes fongiques liés aux racines (Abdellatif et *al.*, 2024).

Les PGPR favorisent la croissance des plantes par la production des enzymes antioxydantes et de divers métabolites comme les phytohormones et les composés organiques volatils (García-Fraile et *al.*, 2015 ; Ha-Tran et *al.*, 2021). Elles ont aussi la capacité de fixer l'azote, de rendre le phosphate soluble et de neutraliser le stress des plantes causé par des facteurs biotiques et abiotiques (Kumar et *al.*, 2018). Les PGPR permettent aussi de renforcer la qualité du sol en augmentant la quantité de matière organique présente qu'il contient, en plus de leur impact significatif sur la bioremédiation en éliminant les xénobiotiques, les métaux lourds et les pesticides (Saharan et Nehra, 2011 ; Tak et *al.*, 2012).

### 3.2. Les endophytes

L'ensemble des micro-organismes qui sont plus proches des plantes et qui vivent dans leurs tissus est appelé « endophytes » (Hardoim et *al.*, 2015). Différents types d'interactions entre les endophytes et les plantes ont été développés, tels que le neutralisme, le commensalisme, le mutualisme, la symbiose et le parasitisme (Schultz et Boyle, 2005). En tant que bioinoculants, les endophytes non pathogènes, qui ont des interactions positives avec les plantes, sont employés dans l'agriculture durable (Santoyo et *al.*, 2016). On désigne également les **iPGPR** (rhizobactéries intracellulaires favorisant la croissance des plantes) comme les bactéries endophytes symbiotiques présentes à l'intérieur des cellules racinaires, généralement dans des structures nodulaires spécialisées comme *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Frankia* (Verma et *al.*, 2016).

La sélection et la composition des micro-organismes à l'intérieur des tissus végétaux se font à partir des populations du microbiome racinaire et se déroulent selon deux mécanismes (Santoyo et *al.*, 2016). Lorsqu'on parle des **endophytes de relations à long terme**, le mécanisme est appelé « colonisation systémique ». Il s'agit des micro-organismes du microbiome central qui peuvent être transmis verticalement par les graines et qui font partie du noyau d'endophytes « sélectionnés » par la plante. Les **endophytes d'association à court terme** sont sélectionnés par une colonisation non systémique et qui ont tendance à coloniser la plante hôte par des mécanismes aléatoires, comme la colonisation de fissures ou de zones endommagées, principalement celles des racines (Wani et *al.*, 2015).

Qu'elle soit intercellulaire ou intracellulaire, la position des endophytes dans les différents tissus végétaux détermine leur nature mutualiste avec la plante hôte (Potshangbam et al., 2017). À l'exception d'*Agrobacterium tumefaciens* connu pour sa capacité à induire la formation de galles tumorales, la présence de bactéries endophytes dans le cytoplasme et l'espace entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire témoigne d'une relation mutualiste entre l'hôte et les endophytes présents qui produisent des métabolites bactériens directement dans le protoplasme de l'hôte, ce qui pourrait avoir un impact sur l'expression génétique et le métabolisme de ce dernier (Thomas et Sekhar, 2014).

Les racines sont les zones où les bactéries endophytes sont les plus fréquentes (Vandana et al., 2021). Ces endophytes peuvent vivre dans les divers points d'entrée situés, ou se propagent dans les tissus internes de la plante, ce qui favorise la croissance, la santé et le développement de leurs hôtes grâce à différents mécanismes fonctionnels (Vandana et al., 2021). (1) Ils produisent des phytohormones tout en bénéficiant d'avantages considérables pour eux-mêmes et en favorisant le développement des pousses et des racines. (2) Ils protègent les plantes contre les attaques des phytopathogènes en activant les deux mécanismes de défense appelés : résistance systémique induite (ISR : Induced Systemic Resistance) et résistance systémique acquise (SAR : Systemic Acquired Resistance). L'activation de l'ISR est provoquée par des micro-organismes non pathogènes en fonction de la signalisation de l'éthylène et de l'acide jasmonique présents dans la plante, tandis que la SAR est généralement déclenchée par des bactéries pathogènes nécrotiques et des molécules de signalisation ayant un rôle crucial dans la croissance et la protection des plantes. (3) Ils fournissent des nutriments azotés ou phosphatés, car l'intérieur de la plante a un accès direct à ces éléments nutritifs (Compant et al., 2010).

### 3.3. Les bactéries épiphytes et les phyllobactéries

La limite entre le rhizoplan et la rhizosphère est extrêmement mince, ce qui fait que cet habitat soit généralement perçu comme un continuum. Le rhizoplan est la partie de la surface des racines située entre les cellules épidermiques et le mucilage où les micro-organismes se fixent grâce à des structures de surface comme des flagelles, des fimbriae et d'autres protéines membranaires ou à des polysaccharides de surface cellulaire (Dunn et Becerra-Rivera, 2023).

Les bactéries qui sont déjà implantées dans la rhizosphère deviennent épiphytes en s'accrochant aux surfaces racinaires en tant que cellules individuelles, puis comme des doublets sur le rhizoderme, formant ainsi une chaîne de bactéries. Les bactéries peuvent alors

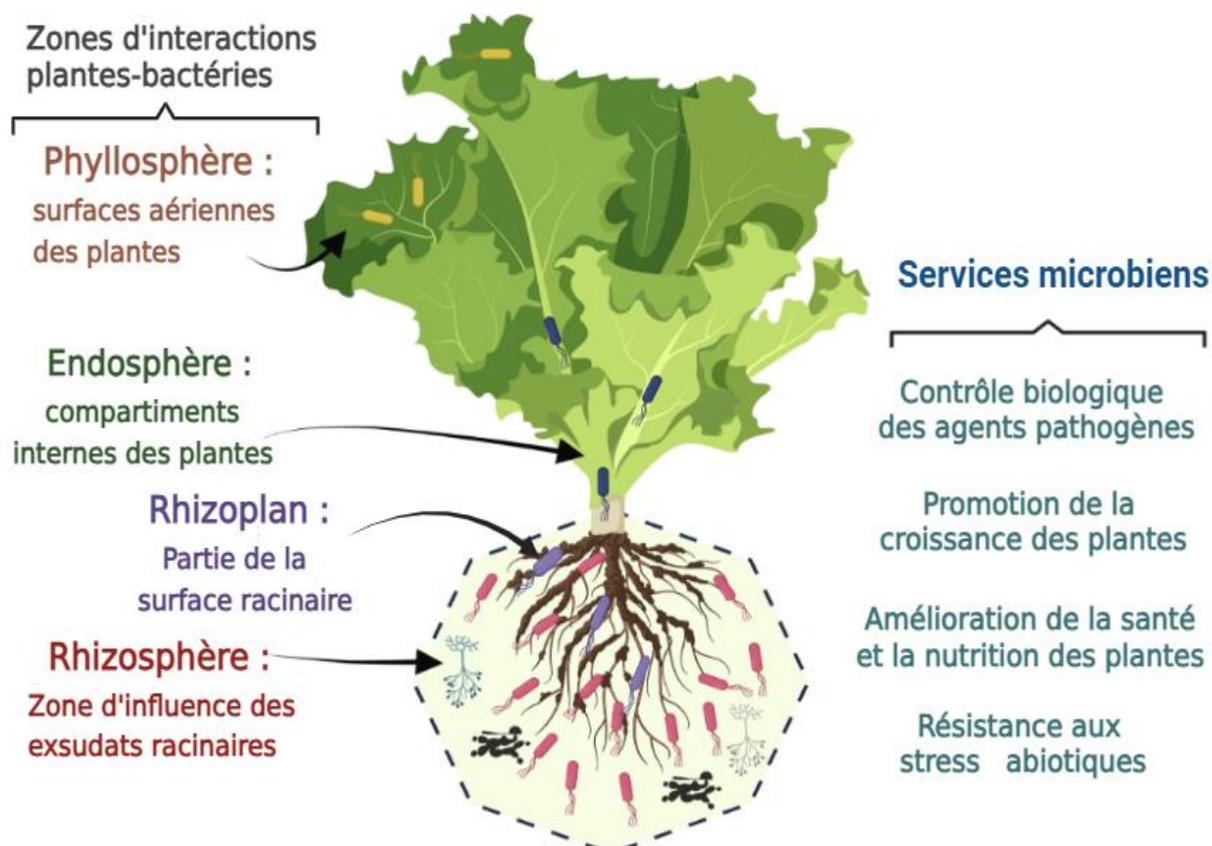
continuer à coloniser toute la surface des cellules rhizodermiques et s'installer sous forme de microcolonies ou de biofilms (Compant et *al.*, 2010). La compétition microbienne est intense dans le rhizoplan, et les rhizobactéries doivent d'abord coloniser les racines pour pouvoir conférer des effets positifs aux plantes. Par conséquent, ces bactéries doivent faire preuve d'une rhizocompétence afin de coloniser la surface racinaire. La capacité compétitive des bactéries du rhizoplan implique divers métabolites secondaires comme les sidérophores, les enzymes lytiques et les antibiotiques. Ces substances ont la capacité de diminuer la prolifération des phytopathogènes dans la rhizosphère et de les empêcher de s'installer (Compant et *al.*, 2010).

Le rhizoplan n'a pas une colonisation homogène. En fonction de la zone racinaire, la répartition et la densité des rhizobactéries diffèrent. Différents éléments peuvent expliquer la diversité de la colonisation bactérienne le long de la racine, tels que la nature des exsudats racinaires et les capacités de détection du quorum bactérien (Gamalero et *al.*, 2004). L'aptitude des rhizobactéries à s'implanter sur les racines de l'hôte et à se déplacer sur le rhizoplan assure les effets désirés en favorisant la croissance et en contrôlant les maladies (Dutta et Podile, 2010).

La phyllosphère désigne l'habitat aérien des végétaux, qui englobe les feuilles, les fleurs, les tiges, les fruits et les graines, dont la surface et l'intérieur peuvent être colonisés par différents micro-organismes, principalement des bactéries, qui sont connues sous le nom de phyllobactéries (Vorholt, 2012). En raison de leur exposition aux variations environnementales, les phyllobactéries peuvent être confrontées à diverses conditions défavorables telles que les fluctuations de disponibilité d'eau, les fluctuations de température et les rayons ultraviolets (UV) (Vorholt, 2012). L'interaction entre le microbiote racinaire et le microbiote de la phyllosphère est influencée par le système vasculaire qui relie les racines aux pousses. En conséquence, la dynamique et la composition du microbiote de la phyllosphère peuvent influencer celles des racines (Liu et *al.*, 2024).

Le génotype de la plante et l'environnement extérieur, tels que les localisations géographiques et la température, jouent un rôle essentiel dans la composition microbienne dans les différents compartiments de la phyllosphère (Laforest-Lapointe et *al.*, 2016). La majorité des bactéries qui se trouvent à la surface des feuilles et des tiges forment des agrégats volumineux (Lindow et Brandl, 2003). La réussite de la reproduction et de l'assemblage dans la phyllosphère dépend de l'adaptation aux conditions de cet habitat, telles que la pénurie de nutriments et les stress abiotiques et biotiques (Vorholt, 2012). Différents traits et stratégies jouent un rôle important dans la survie et la répartition des phyllobactéries, tels que la production de

métabolites secondaires antimicrobiens, des EPS (exopolysaccharides), de biosurfactants et de solutés compatibles, ainsi que la production de catalases et de superoxydes dismutases pour lutter contre les pathogènes et se protéger contre le stress osmotique et les variations d'humidité (Freeman et *al.*, 2010 ; Yu et *al.*, 2013 ; Moitinho et *al.*, 2020 ; Fessia et *al.*, 2022 ). Ces bactéries ont, aussi, la capacité de se protéger contre les rayons UV en activant les mécanismes de réparation de l'ADN et en synthétisant des pigments (Stone et *al.*, 2018).



**Fig.2.** Principaux domaines d'interactions plantes-bactéries, et les principaux services fournis par les bactéries bénéfiques à la plante (modifiée à partir de Santoyo, 2022).

#### 4. Rôle des bioinoculants dans l'agriculture durable

##### 4.1. Réduction de l'utilisation des engrais chimiques

L'utilisation excessive d'engrais chimiques en agriculture a des impacts environnementaux majeurs, notamment la pollution des sols et des eaux par les nutriments excédentaires, tels que l'azote et le phosphore. Les bioinoculants à base de PGPR jouent un rôle essentiel dans la réduction de la dépendance à ces intrants chimiques en améliorant la disponibilité des nutriments pour les plantes. Leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, ainsi qu'à solubiliser des minéraux essentiels comme le phosphate, le zinc et le potassium,

permet une meilleure nutrition des plantes (Fig.3). Cela contribue à limiter l'accumulation excessive de ces minéraux dans les écosystèmes, réduisant ainsi les risques de pollution des eaux souterraines et d'eutrophisation des cours d'eau.

### 4.1.1. Fixation biologique d'azote

L'azote (N) joue un rôle crucial dans le développement et la fructification des plantes d'intérêt agricole telles que le blé, le riz, le maïs et la pomme de terre (Mahmud *et al.*, 2020). Il s'agit du macronutriment le plus important de la physiologie végétale et un composant clé des acides nucléiques, des protéines et des enzymes (Mahmud *et al.*, 2020). Toutefois, l'azote est présent dans l'atmosphère sous forme gazeuse et il est inaccessible aux plantes et aux animaux (Chandran *et al.*, 2021). Le manque de l'azote dans le sol par rapport à la demande en produits agricoles a entraîné l'utilisation de quantités considérables d'engrais chimiques azotés afin d'atteindre les objectifs de rendement (Chandran *et al.*, 2021).

Le mécanisme de fixation biologique de l'azote par les PGPR chez les plantes joue un rôle crucial dans la durabilité de la production agricole et le bon fonctionnement des écosystèmes. Différentes bactéries fixatrices d'azote ont été découvertes, restaurant l'azote soit en symbiose avec des plantes spécifiques telles que les légumineuses, soit par un système non symbiotique (Mahmud *et al.*, 2020). Certaines bactéries du sol appelées « rhizobia » peuvent interagir endosymbiotiquement avec les légumineuses. Ce groupe de bactéries regroupent les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Neorhizobium* et *Pararhizobium*. Ce sont des bactéries libres (diazotrophes) qui ont la capacité de pénétrer les tissus végétaux en échange de signaux chimiques et de créer des nodules (Olanrewaju *et al.*, 2017). Les nodules sont des formations globulaires ou cylindriques où vivent les rhizobiens sous forme endophyte (Bueno Batista et Dixon, 2019). Les *Rhizobium* peuvent capter l'azote atmosphérique par l'action de l'enzyme nitrogénase et le convertir en ammoniac, une forme d'azote assimilable pour les plantes, dans des conditions micro-aérobies, selon la réaction suivante :  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16Mg-ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16Mg-ADP + 16P$  (Mahmud *et al.*, 2020). Tandis que *Frankia* s'associe aux arbres et arbustes non légumineux (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Dans les systèmes non symbiotiques, les bactéries diazotrophes fixent l'azote à l'état libre en utilisant des sources de carbone et d'énergie issues de l'excrétion de glucides par les racines et la dégradation de la matière organique du sol, et l'azote est fixé probablement après la lyse des cellules bactériennes (White *et al.*, 2012 ; Bekele et Yilma, 2021). Des bactéries du genre *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* et des cyanobactéries comme *Nostoc* et *Anabaena* ont été identifiées comme

des bactéries fixatrices d'azote libres associatives à la rhizosphère, formant des associations non symbiotiques qui peuvent être rhizosphériques ou endophytes (Bhattacharyya et Jha, 2012 ; Chittora et *al.*, 2020). Des expressions actives du gène *nifH* codant pour la di-nitrogenase réductase phylogénétiquement similaires à celles des *Rhizobium* ont été signalées (Mahmud et *al.*, 2020).

### 4.1.2. Solubilisation du phosphate

Le phosphore (P) est un macronutriment vital et c'est le deuxième élément le plus important à la croissance des plantes après l'azote (Timofeeva et *al.*, 2022). Il s'agit d'un nutriment essentiel pour le métabolisme, la biosynthèse des macromolécules, la photosynthèse, le développement et la maturation des racines, des tiges, des fleurs et des graines, et se trouve dans les acides nucléiques, les enzymes, les coenzymes et les phospholipides (Ingle et Padole, 2017). Le phosphore est peu abondant dans de nombreux sols à travers le monde et se trouve souvent sous des formes insolubles, ce qui limite son accessibilité et son utilisation par les plantes (Timofeeva et *al.*, 2022). Par ailleurs, P n'est assimilé par les plantes que sous deux formes solubles, à savoir les ions monobasiques ( $H_2PO_4$ ) et dibasiques ( $HPO_4$ ) du phosphate (Timofeeva et *al.*, 2022). Traditionnellement, la carence en phosphore dans le sol a été résolue par l'utilisation d'engrais phosphatés chimiques considérés, souvent, comme inefficaces (Silva et *al.*, 2023). En effet, lorsque le P est ajouté au sol, il est rapidement immobilisé par des cations métalliques (Al, Fe et Ca), lié aux surfaces minérales. Il peut également s'infiltrer, contaminant ainsi les réserves d'eau souterraine, ce qui limite sa disponibilité pour l'absorption par les plantes (Silva et *al.*, 2023). En outre, l'application des engrais phosphatés sur de longues périodes provoque l'acidification et l'eutrophisation des sols (Chaney et *al.*, 2012). Les bactéries présentes dans le sol, connues sous le nom de bactéries solubilisantes du phosphate (PSB : Phosphate Solubilizing Bacteria), ont la capacité de rendre le phosphate soluble et biodisponible pour les plantes. Elles accomplissent cela par des processus de solubilisation et de minéralisation (Silva et *al.*, 2023). Différents mécanismes sont employés par les PSB afin de solubiliser les phosphates. La production d'acides organiques de faible poids moléculaire lors du métabolisme des sucres est l'un des mécanismes clés (de Almeida Leite et *al.*, 2024). Les acides organiques sont synthétisés par oxydation directe dans l'espace périplasmique, et sont ensuite libérés dans l'environnement entraînant une baisse du pH. Puis, les acides organiques libèrent les phosphates des composés phosphatés par chélation (Patel et *al.*, 2008).

La réussite et l'efficacité de la solubilisation sont influencées par la nature des acides. Les acides tri- et dicarboxyliques ont un meilleur pouvoir solubilisant que les acides monobasiques et aromatiques, tandis que les acides aliphatiques solubilisent mieux le phosphate que les acides phénolique, citrique et fumarique (de Almeida Leite *et al.*, 2024). Parmi les principaux acides organiques qui solubilisent les phosphates, on trouve les acides citrique, lactique, glycolique, 2-cétogluconique, oxalique, glyconique, acétique, malique, fumarique, succinique, tartrique, malonique, glutarique, propionique, butyrique, glyoxalique et adipique (Kalayu, 2019). La sécrétion des enzymes par les PGPR est également impliquée dans la minéralisation des phosphates à partir des substances phosphatées organiques. Les phosphatases et les phytases sont les enzymes les plus étudiées (Timofeeva *et al.*, 2022).

### 4.1.3. Solubilisation du potassium

Le potassium (K) occupe la troisième place en tant que nutriment végétal essentiel, étant le septième élément le plus présent sur la surface terrestre (Ahmad *et al.*, 2016). Le potassium (K) est essentiel pour la résistance au stress, le métabolisme, la croissance, le développement et la reproduction des plantes. Il participe à la photosynthèse des plantes, à la production d'adénosine triphosphate (ATP), la translocation des sucres, le transport d'eau et des nutriments, comme il est impliqué dans la fixation de l'azote par les légumineuses et la synthèse de protéines et d'enzymes. Bien que le potassium soit très abondant dans le sol, seulement 2 à 3 % de celui-ci est soluble et disponible pour les plantes, le reste étant lié à d'autres minéraux du sol, représentant environ 95 % du potassium total (Wolde, 2016). Cela a conduit de nombreux agriculteurs à recourir à l'utilisation d'engrais potassiques dans divers types de sols à travers le monde (Olaniyan *et al.*, 2022). Malgré une utilisation encore limitée, la consommation des engrais de potassium a augmenté de 300 % entre 1961 et 2015, et la demande pour ces engrais a continué de croître de 2,4 % entre 2015 et 2020 (Olaniyan *et al.*, 2022). À l'instar des engrais phosphatés, l'utilisation inconsidérée et prolongée d'engrais chimiques à base de potassium pour pallier sa carence entraîne une dégradation de la santé du sol, de l'homme et de l'environnement (Hamid et Bashir, 2019). Il a été observé que les engrais de potassium perturbent la microflore du sol et diminuent la fertilité des sols, ce qui peut entraîner la perte de certaines fonctions écologiques majeures des communautés microbiennes à la suite de leurs perturbations et de leur déplacement (Vejan *et al.*, 2016 ; Berger *et al.*, 2018). D'autre part, l'excès d'engrais potassiques provoque une adsorption importante de K sur les minéraux fixateurs de K, ce qui les rend inaccessibles aux plantes

(Yadav, 2022). Il a été estimé que jusqu'à 70 à 90 % du potassium d'engrais potassiques introduit était fixé sous une forme non échangeable (Rao et Srinivas, 2017).

De nombreux micro-organismes du sol (bactéries, champignons, actinomycètes) jouent un rôle essentiel dans le recyclage du potassium et ont été reconnus comme des solubilisateurs importants du potassium à partir des matrices insolubles (Hamid et Bashir, 2019). Cependant, les bactéries sont considérées comme les micro-organismes les plus dominants et les plus efficaces dans la solubilisation du potassium ou sa transformation de sources insolubles en formes utilisables par les plantes par rapport aux autres microbes (Bashir et *al.*, 2017).

Différents mécanismes sont utilisés par les bactéries solubilisantes du potassium, tels que la production d'acides organiques, la formation de complexes et des biofilms sur les surfaces minérales, et la sécrétion de polysaccharides (Sattar et *al.*, 2019). En chélatant les ions  $Al^{3+}$ ,  $Si^{4+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ , les acides organiques peuvent libérer lentement des ions potassium à partir de minéraux tels que la phlogopite, qui en contient (Etesami et *al.*, 2017). Cela permet de dissocier la structure du réseau et de libérer du potassium dans le sol par protonation (Etesami et *al.*, 2017). Les bactéries solubilisantes du potassium produisent différents acides organiques tels que les acides fumarique, malonique, propionique, oxalique et tartrique (Olaniyan et *al.*, 2022).

Il est également possible que les bactéries forment des couches épaisses de biofilms, qui sont constituées d'un consortium de cellules bactériennes adhérant les unes aux autres à la surface minérale ou rocheuse afin de créer des microenvironnements optimaux autour de leurs cellules, favorisant ainsi une solubilisation efficace (Sattar et *al.*, 2019). Les polysaccharides extracellulaires (EPS) et d'autres exopolymères sont synthétisés par les cellules du biofilm, ce qui accélère la solubilisation en utilisant des acides organiques et d'autres métabolites secondaires, tout en diminuant le pH rhizosphérique (Sattar et *al.*, 2019).

#### 4.1.4. Solubilisation du zinc

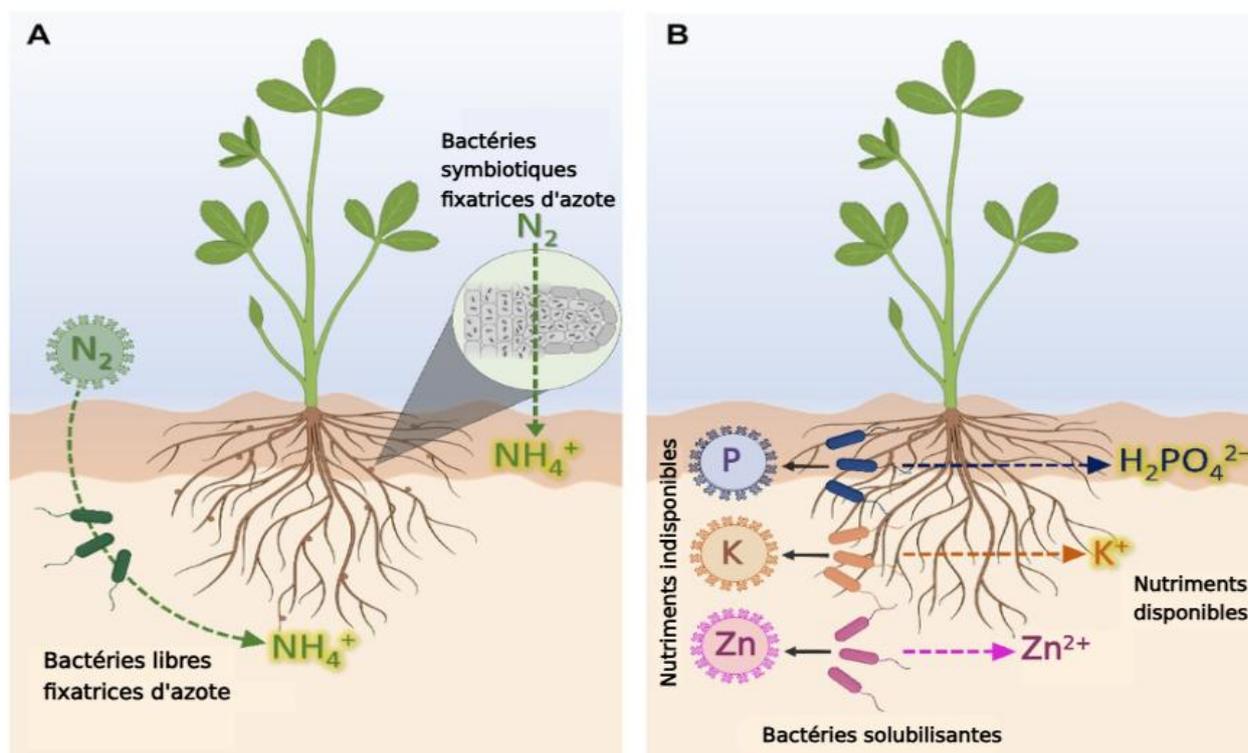
Une carence en Zinc (Zn) peut entraver différents aspects et processus de la croissance et du métabolisme, tels que la synthèse des protéines et des sucres, ainsi que la formation des graines, ce qui entraîne une diminution du potentiel de productivité et de rendement des plantes cultivées (Fariduddin et *al.*, 2022). La santé des humains et des animaux est fortement impactée dans les zones où les cultures sont souvent carencées en Zn (Singh et *al.*, 2024).

La plupart des sols agricoles renferment assez de zinc pour favoriser la croissance des cultures, mais les plantes ne peuvent pas l'assimiler en raison de sa présence fixe, inaccessible

et indisponible (Singh et *al.*, 2024). La carence en Zn peut aussi résulter d'une intensivité et une fertilisation excessive des cultures ou d'une diminution de la matière organique (Kumar et *al.*, 2019). Il est également peu courant de fortifier les cultures avec du zinc synthétique en tant qu'engrais, car il est non durable, coûteux, se transforme rapidement en composants inaccessibles et s'accumule dans le sol (Sindhu et *al.*, 2019).

L'utilisation des bactéries solubilisantes du Zn (ZSB : Zinc Solubilizing Bacteria) pour la biofortification est une méthode alternative à moindre coût et durable pour l'enrichissement du Zn (Upadhyay et *al.*, 2022). Les ZSB ont la capacité d'accroître la disponibilité du Zn dans les cultures en le rendant soluble, à partir des sources organiques et inorganiques de Zn total présentes dans le sol (Fariduddin et *al.*, 2022). Les ZSB qui habitent la rhizosphère, ou les tissus végétaux internes, montrent leur aptitude à rendre le Zn soluble de diverses façons, telles que les réactions d'échange, la chélation, la libération d'acides organiques et l'acidification (Singh et *al.*, 2024). L'acidification par production de gluconate ou de dérivés de l'acide gluconique, comme l'acide 2-céto-gluconique ou l'acide 5-céto-gluconique, est le mécanisme le plus souvent utilisé par les bactéries solubilisant le zinc (Kumar et *al.*, 2019). Le processus de mobilisation et de chélation du zinc implique la synthèse de sidérophores ou d'autres ligands chélateurs tels que l'acide éthylènediaminetétraacétique (Singh et *al.*, 2024). Différents acides organiques peuvent améliorer l'absorption du Zn, comme l'acide malique, l'acide citrique, l'acide ascorbique et l'acide lactique (Upadhyay et *al.*, 2022).

Les PGPR peuvent également solubiliser et minéraliser d'autres minéraux tels que le calcium, le magnésium, le sélénium, le fer et le manganèse. En décomposant les formes insolubles de ces nutriments, ils facilitent leur absorption par les plantes contribuant ainsi à une fertilisation respectueuse de l'environnement (Devi et *al.*, 2022).



**Fig.3.** Disponibilité des nutriments médiée par les bioinoculants. (A) Bioinoculants fixateurs d'azote. (B) Bioinoculants solubilisants les P, K et Zn (Alzate Zuluaga et *al.*, 2024).

## 4.2. Amélioration de la croissance des plantes

### 4.2.1. Production de phytohormones

Les phytohormones sont considérées comme les principaux régulateurs de croissance, jouant un rôle crucial dans divers processus physiologiques et développementaux tels que le métabolisme, la stimulation des mécanismes de défense et la revitalisation des racines (Carlos et *al.*, 2021). Cinq catégories d'hormones végétales ont été identifiées : auxines, cytokinines, gibbérellines, acide abscisique et éthylène (Oleńska et *al.*, 2020). Certaines phytohormones comme l'acide jasmonique, l'acide salicylique et l'éthylène sont impliquées dans la croissance et le développement des plantes (Fig.4), notamment dans des conditions de stress biotique et abiotique (Oleńska et *al.*, 2020).

Les auxines sont considérées comme les phytohormones les plus essentielles pour pratiquement tous les aspects du développement des plantes (Gomes et Scortecci, 2021). Elles jouent un rôle crucial dans la division et la différenciation des cellules végétales, la germination, le phototropisme, le géotropisme, la biosynthèse des métabolites et la résistance au stress. L'auxine la plus fréquemment produite et la mieux étudiée est l'acide indole-acétique (AIA) (Gomes et Scortecci, 2021). Chez les plantes, l'AIA est impliqué dans la germination des graines, la photosynthèse, la synthèse des métabolites, la division la

différenciation et le développement cellulaire notamment au niveau des racines (Gomes et Scortecci, 2021).

Le précurseur de la synthèse de l'AIA chez les bactéries est le tryptophane, un acide aminé qui se trouve dans les exsudats racinaires de la plante (Tang et *al.*, 2023). Les bactéries peuvent présenter trois voies principales de biosynthèse de l'AIA:

(1) La voie la plus commune chez les bactéries est la voie de l'indole-3-pyruvate, que l'on retrouve dans les genres bactériens comme *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, et *Rhizobium*. Elle comprend deux étapes : La décarboxylation du tryptophane en indole-3-pyruvate par l'enzyme tryptophane aminotransférase, puis la réduction de l'indole-3-pyruvate en acide-3-acétique par l'enzyme indole-3-pyruvate décarboxylase (Tang et *al.*, 2023).

(2) La voie de l'indole-3-acétamide, dans laquelle le tryptophane est d'abord converti en indole-3-acétamide par l'action du tryptophane monooxygénase. Ensuite, indole-3-acétamide est hydrolysé par l'amidase pour former l'AIA. Cette voie est souvent associée à des bactéries du genre *Agrobacterium*, *Erwinia* et *Pseudomonas*. Deux gènes impliqués dans cette voie, et dont la localisation peut être chromosomique ou plasmidique comme est le cas pour *Pantoea agglomerans* (Tang et *al.*, 2023).

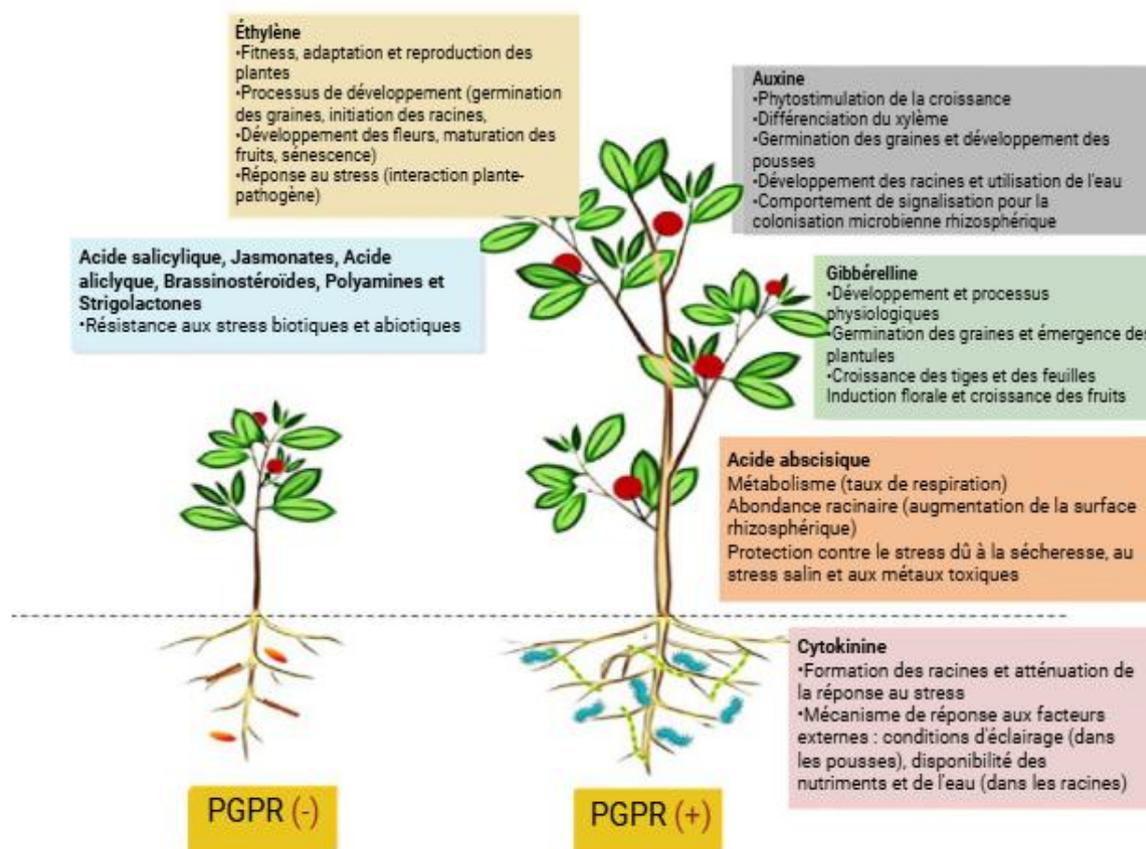
(3) La voie de l'indole-3-acétonitrile, dans laquelle des enzymes spécifiques convertissent le tryptophane en indole-3-acétonitrile, qui est ensuite hydrolysé en AIA par une enzyme appelée nitrilase. Cette voie est moins répandue chez les bactéries mais présente chez certaines espèces d'*Agrobacterium* (Tang et *al.*, 2023).

Les cytokinines sont des hormones végétales cruciales qui régulent divers aspects du développement des plantes, tels que la division cellulaire, la croissance des bourgeons, le retardement de la sénescence et la mobilisation des nutriments (S.M.Li et *al.*, 2021). Elles jouent également un rôle essentiel dans la réponse des plantes aux stress environnementaux et favorisent les interactions bénéfiques entre les plantes et les microbes (S.M.Li et *al.*, 2021). Les cytokinines interagissent étroitement avec d'autres hormones comme les auxines et l'éthylène ; l'équilibre entre les niveaux d'auxines et de cytokinines régule le développement des racines et des bourgeons (Sosnowski et *al.*, 2023).

La principale voie de biosynthèse des cytokinines chez les bactéries et les plantes utilise l'adénosine monophosphate comme point de départ. Les principales étapes incluent la formation de précurseurs tels que l'isopentényl-AMP, qui est ensuite transformé en cytokinines actives (Bajguz et Piotrowska-Niczyporuk, 2023). La voie tRNA-dérivée est une voie alternative provient de la modification des ARN de transfert (tRNA), qui peuvent libérer

des cytokinines actives après leur dégradation. Ce processus joue un rôle mineur mais existe dans certains cas pour produire des cytokinines en fonction des besoins physiologiques de la plante (Bajguz et Piotrowska-Niczyporuk, 2023). La synthèse de cytokinine a été observée chez les espèces de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* et *Xanthomonas* (Tsukanova et al., 2017).

À l'instar des auxines et des cytokinines, les bactéries sont également capables de produire des gibbérellines, qui jouent un rôle clé dans divers aspects du développement des plantes, notamment la germination, l'élongation des tiges, la floraison et la fructification. Elles participent aussi à la régulation de la dormance et de la sénescence (Orozco-Mosqueda et al., 2023). Les gibbérellines peuvent exister sous différentes formes chez la plante : (1) À l'état libre sous une forme active et non liées à d'autres molécules ou (2) liées ou conjuguées à des molécules de sucres, notamment le  $\beta$ -D-glucose. Ces formes conjuguées sont souvent inactives (Takehara et Ueguchi-Tanaka, 2018). La production des gibbérellines a été observée chez les *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* et *Rhizobium*. Les voies de biosynthèse sont différentes et moins caractérisées que celles des auxines et des cytokinines et impliquent généralement le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) comme précurseur clé dans la biosynthèse (Keswani et al., 2022). Les gibbérellines interagissent également avec d'autres hormones végétales comme les auxines, l'acide abscissique et l'éthylène pour réguler la croissance et le développement des plantes (Castro-Camba et al., 2022).



**Fig.4.** Promotion de la croissance des plantes *via* la production de différentes phytohormones (Aloo et *al.*, 2022).

#### 4.3. Promotion de la résilience des plantes

##### 4.3.1. Résistance aux stress abiotiques

La sécheresse, la salinité, les polluants du sol et les températures extrêmes sont des stress abiotiques qui modifient la morphologie, la physiologie et la biochimie des plantes (Koza et *al.*, 2022). Ils restreignent la stabilité du rendement et de la production des cultures, limitent également la capacité des plantes à absorber les nutriments et l'eau du sol, et entravent la photosynthèse (Koza et *al.*, 2022). Les PGPR sont impliquées dans l'amélioration de la croissance des plantes dans des conditions de stress, en atténuant les effets résultants et en améliorant la résistance des cultures aux stress (Barnawal et *al.*, 2019). La tolérance varie en fonction de la capacité des PGPR à stimuler les systèmes végétaux en exprimant des EPS sensibles aux stress, des facteurs de transcription, en récupérant les espèces ROS (Reactive Oxygen Species), en synthétisant l'ACC désaminase, la proline et d'autres protéines, ainsi qu'en stabilisant la biomasse (Hakim et *al.*, 2021).

Divers mécanismes et stratégies de tolérance et d'adaptation sont menés par les PGPR afin d'améliorer le développement et la croissance des plantes en situation de déficit hydrique (Asghari et *al.*, 2020). Ces mécanismes incluent la régulation des facteurs de transcription associés au stress hydrique, notamment l'expression du gène de réponse à la sécheresse ERD15 (Early responsive to dehydration 15) (Koza et *al.*, 2022), à la conductivité hydraulique des racines et à la diminution des fuites d'électrolytes (Jiang et *al.*, 2013). Les PGPR peuvent également accumuler la proline, le tréhalose et la glycine bêtaïne, ce qui leur permet de préserver leur consistance membranaire, leur intégrité et leurs protéines fonctionnelles (Asghari et *al.*, 2020). L'activité des ROS peut être diminuée par stimulation de la production d'enzymes antioxydantes, de sucres et d'acides aminés libres (Gowtham et *al.*, 2022). La capacité des PGPR à renforcer la machinerie photosynthétique en cas de sécheresse permet d'améliorer la biomasse végétale (Hakim et *al.*, 2021).

Le stress thermique associé à l'élévation de la température est perçu comme un défi majeur pour la production agricole dans plusieurs régions du monde (Hakim et *al.*, 2021). Cela entraîne une dégradation des protéines et des dommages cellulaires graves (Ljubej et *al.*, 2021). Il perturbe également la photosynthèse, la floraison et la fructification, réduit l'eau des plantes et attire les ravageurs et les phytopathogènes (Ljubej et *al.*, 2021). En cas de stress thermique, les rhizobactéries peuvent agir de manière adaptative, et leur capacité à faire face à la chaleur peut se manifester chez les plantes en augmentant les niveaux d'expression et d'accumulation des protéines de choc thermique (HSP), qui jouent un rôle crucial dans l'atténuation des effets néfastes des températures élevées (Khan et *al.*, 2020). Il est possible que la thermotolérance se manifeste également par la production d'enzymes antioxydantes et la formation d'un épais biofilm protecteur (Sarkar et *al.*, 2018).

Le stress causé par le froid lorsque la température diminue de 15 à 0 °C est également une forme de stress thermique (Diamond et *al.*, 2019). Ce stress engendre diverses contraintes mécaniques affectant l'intégrité membranaire comme les blessures et les piqûres de surface, un stress osmotique, une production d'éthylène, une réduction de la photosynthèse, une diminution des teneurs en chlorophylles et une sensibilité aux maladies (Koza et *al.*, 2022). Les PGPR sont également impliquées dans le combat contre les effets néfastes liés aux basses températures en améliorant la biomasse et en réduisant la fuite d'électrolytes des membranes (Yang et *al.*, 2018). D'autres mécanismes sont impliqués incluant une augmentation des niveaux de sucres et de proline, et une régulation positive de l'expression des protéines contenant de l'antigel (Koza et *al.*, 2022).

La salinité est un autre facteur abiotique limitant qui, selon les prévisions, devrait avoir un impact destructeur sur environ 50% des terres agricoles en 2025 (Abdul Rahman et *al.*, 2021). L'absorption d'eau par les plantes est limitée par la salinité, ce qui réduit le potentiel hydrique du sol et altère les mécanismes d'absorption des nutriments de la plante (Abdul Rahman et *al.*, 2021). Cela provoque une augmentation de la concentration en ions, en particulier les ions  $\text{Na}^+$ , ce qui entraîne une cytotoxicité ionique (Ketehouli et *al.*, 2019). Le stress salin provoquera d'autres stress secondaires, comme le stress osmotique et oxydatif (Hakim et *al.*, 2021). Les PGPR via leur halotolérance ont également été documentées dans l'atténuation du stress salin chez diverses plantes. Le rôle atténuant de ces rhizobactéries contre les effets néfastes des conditions de forte salinité est basé sur la formation de biofilm, la production d'EPS qui se lie aux cations, restreignant ainsi leur accessibilité pour les cellules végétales, l'accumulation d'osmolytes dans le cytoplasme des cellules végétales, le maintien de la pression de turgescence des cellules stressées et la synthèse des antioxydants (Nawaz et *al.*, 2020 ; Becquer, 2022). Les PGPR peuvent induire des modifications chimiques, physiques et génétiques en présence du stress salin conduisant à une activation de la signalisation ISR, une augmentation de la croissance des graines et des plantes et la régulation de l'expression de plusieurs gènes liés au stress salin (Ji et *al.*, 2020 ; Latif et *al.*, 2024). Les rhizobactéries améliorent la croissance des plantes et renforcent leurs propriétés antioxydantes en conditions de salinité et de sécheresse notamment grâce à la production d'ACC désaminase (Chandran et *al.*, 2021).

La contamination du sol par les polluants inorganiques (métaux lourds, radionucléides) et organiques (hydrocarbures, pesticides, produits pharmaceutiques) est une autre forme de stress abiotique ayant une incidence physiologique sur les plantes (Vocciante et *al.*, 2022). La croissance des plantes est fortement influencée par la présence des concentrations élevées de polluants, qui freinent l'absorption des nutriments par les plantes, ce qui entraîne une dégradation de l'intégrité de la membrane et une altération de l'activité enzymatique des cellules (Koza et *al.*, 2022). L'effet toxique des polluants peut induire la production de ROS, provoquant, ainsi, un stress oxydatif qui inhibe les activités enzymatiques et bloque les groupes fonctionnels des métabolites dans les cellules végétales (Dumanović et *al.*, 2021). Cela peut endommager les organites végétaux et entraîner la mort de la plante (Dumanović et *al.*, 2021).

L'effet néfaste de nombreux de ces composés peut être considérablement diminué par les rhizobactéries bénéfiques. Cela est réalisé par la fixation de l'azote, la mobilisation des nutriments, la production directe de phytohormones et par la réduction de la production

d'éthylène en activant la synthèse de l'ACC désaminase (Vocciante et *al.*, 2022). Ces bactéries ont aussi la capacité de supprimer l'inhibition de la germination provoquée par les substances contaminantes (Franchi et *al.*, 2016). Diverses recherches ont montré que les plantes inoculées avec les PGPR avaient une concentration diminuée de ROS et un niveau plus élevé d'enzymes antioxydantes, notamment la peroxydase (POD), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et l'ascorbate peroxydase (APX).

### 4.3.2. Résistance aux stress biotiques

La suppression des maladies des plantes est l'un des mécanismes clés des PGPR pour limiter le stress biotique. Elle peut résulter de l'antagonisme microbien ou de l'induction de la résistance des plantes contre les microorganismes pathogènes.

#### 4.3.2.1. L'antibiose

La synthèse des substances antimicrobiennes est un moyen très efficace utilisé par les rhizobactéries pour prévenir les infections pathogènes chez différentes plantes. Les antibiotiques sont les antimicrobiens les plus étudiés, synthétisés par divers genres bactériens et comprennent le diacétylphloroglucinol (DAPG), la polymyxine, la circuline, la colistine et d'autres (Lanteigne et *al.*, 2012 ; Liu et *al.*, 2018). Ces antibiotiques sont très efficaces contre les bactéries phytopathogènes et ont également le potentiel de supprimer les phytopathogènes fongiques, notamment *Pythium*, *Gaeumannomyces graminis* et *Fusarium oxysporum* (Lanteigne et *al.*, 2012 ; Liu et *al.*, 2018). Les rhizobactéries peuvent aussi synthétiser le cyanure d'hydrogène (HCN), volatil et diffusible, en tant que molécule de défense, qui inhibe la respiration cellulaire des pathogènes en bloquant les enzymes essentielles. Le HCN est essentiellement lié au biocontrôle des infections racinaires (Lanteigne et *al.*, 2012). Les biotensioactifs lipopeptidiques sont une autre catégorie d'agents antimicrobiens qui sont synthétisés par les espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas*. Ces biotensioactifs comme la surfactine et la fengycine sont impliqués dans les interactions compétitives avec des organismes tels que les champignons, les bactéries, les oomycètes, les nématodes et les protozoaires (Ali et *al.*, 2020).

#### 4.3.2.2. Les enzymes lytiques

Les PGPR jouent un rôle important dans la prévention et la protection contre plusieurs champignons pathogènes grâce à la sécrétion et la production d'enzymes lytiques (Tariq et *al.*, 2017). Les enzymes lytiques agissent en altérant la stabilité structurelle et l'intégrité des parois cellulaires des agents pathogènes ciblés en dégradant les composants qui constituent ces parois (Tariq et *al.*, 2017). La déshydrogénase, les chitinases, la  $\beta$ -glucanase, les protéases, les

cellulases, les phosphatases, les lipases et les xylanases sont les principaux enzymes lytiques produites par les PGPR (Joshi et al., 2015). Les enzymes lytiques ont un impact significatif sur le contrôle biologique de divers champignons pathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora* sp. et *Rhizoctonia solani* (Chen et al., 2020).

### 4.3.2.3. Production d'ACC désaminase

En réponse aux conditions stressantes comme les infections pathogènes, les plantes accumulent plusieurs hormones, y compris l'éthylène (Abiri et al., 2017). L'augmentation de la concentration d'éthylène entraîne une sénescence suite à des stress secondaires tels le stress oxydatif et la carence en nutriments. Cela conduit à la désactivation du métabolisme, à la diminution du taux de croissance, du développement et de la productivité des cultures, et enfin à la mort des plantes (Abiri et al., 2017). La production de l'enzyme ACC-désaminase par les PGPR est essentielle pour réduire le niveau d'éthylène induit par les pathogènes, limitant ainsi ses effets néfastes sur les plantes. En cas de stress, ces rhizobactéries expriment les gènes de l'enzyme ACC désaminase qui clivent le précurseur de l'éthylène ACC en ammoniac et en  $\alpha$ -cétobutyrate, diminuant, ainsi, le niveau d'éthylène chez les plantes (Abiri et al., 2017). Les PGPR capables de synthétiser de l'ACC désaminase jouent un rôle essentiel dans la lutte contre les conséquences nuisibles de l'éthylène et ont un effet captivant en tant qu'agent de lutte biologique contre diverses attaques pathogènes telles que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas oryzae*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora* sp. et *Sclerotium rolfsii* (Hakim et al., 2021).

### 4.3.2.4. Production de sidérophores

Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire qui chélatent le fer complexe et sont sécrétées par les bactéries rhizosphériques (Ansari et al., 2017). Le fer présent dans le sol étant sous forme inaccessible aux micro-organismes et aux plantes, il existe généralement sous les formes  $Fe^{3+}$  et  $Fe^{2+}$ , des hydroxydes et oxyhydroxydes insolubles dans un environnement aérobie (Ansari et al., 2017). Cette aptitude contribue indirectement à réduire les microbes pathogènes en créant une concurrence pour le fer dans la région rhizosphérique (Subramaniam et Sundaram, 2020). Il existe quatre grandes catégories de sidérophores bactériens (catécholate de phénol, carboxylate, pyoverdines et hydroxamates) qui sont classées en fonction de leurs ligands et d'autres caractéristiques structurales (Hakim et al., 2021). Dans des situations compétitives où les micro-organismes sont en forte concurrence pour les ressources, la capacité à obtenir le fer joue un rôle crucial dans la

réussite de cette compétition. La capacité à produire des sidérophores influence également la capacité des micro-organismes à utiliser efficacement les différentes sources de carbone comme celles provenant des racines *via* les exsudats (Hakim *et al.*, 2021). Les racines des plantes sont efficacement colonisées par les rhizobactéries productrices de sidérophores, qui éliminent toute autre microflore de cet environnement compétitif (Hakim *et al.*, 2021).

Les sidérophores microbiens ont un double rôle en aidant à la séquestration du fer, en formant des complexes stables avec des métaux lourds et des particules radioactives. Ceci contribue de manière indirecte à réduire le stress causé par les polluants présents dans le sol (Hider et Kong, 2010).

#### 4.3.2.5. La résistance systémique induite

L'un des mécanismes démontrés par les PGPR pour la protection des plantes est la suppression des maladies est le déclenchement d'une résistance systémique. La résistance systémique induite chez les plantes correspond à un état physiologique d'amélioration des défenses dépendant des hormones de signalisation, déclenché par des stimuli environnementaux spécifiques et renforcent leur système de défense inné contre les attaques pathogènes (Hakim *et al.*, 2021). Elle est induite par les interactions avec les micro-organismes bénéfiques du sol, qui émettent des molécules signal (comme les lipopeptides, les exopolysaccharides) qui sont perçues par des récepteurs spécifiques situés sur les racines des plantes (Kamle *et al.*, 2020). Cela active des voies de signalisation, principalement l'acide jasmonique et l'éthylène. Lors d'une attaque par des pathogènes nécrotrophes, l'acide jasmonique est synthétisé par les cellules végétales, qui va ensuite circuler dans toute la plante et agit comme un signal d'alerte qui prépare les cellules à activer leurs défenses (Kamle *et al.*, 2020). L'éthylène agit en synergie avec l'acide jasmonique pour amplifier la réponse de défense. Ces hormones activent l'expression de gènes de défense spécifiques comme le renforcement des parois cellulaires, la production de composés antimicrobiens et des protéines associées à la réponse aux stress (Kamle *et al.*, 2020).

### 5. Design des bioinoculants

La conception de bioinoculants implique une sélection stratégique de souches microbiennes, soit en tant qu'espèces individuelles, soit en tant que partie de communautés microbiennes synthétiques (Suman *et al.*, 2022). Dans de nombreux cas, un seul micro-organisme peut être utilisé comme bioinoculant s'il présente des caractéristiques bénéfiques importantes, telles que la fixation d'azote, la production de phytohormones et la solubilisation

du phosphate (Negi et *al.*, 2024). Les communautés microbiennes synthétiques, en revanche, sont assemblées pour compléter les fonctions des autres et élargir la gamme des activités favorisant la croissance des plantes (Negi et *al.*, 2024). Qu'il s'agit d'un seul micro-organisme ou d'un consortium, la composition des bioinoculants est soigneusement élaborée pour garantir leur efficacité dans l'obtention des résultats souhaités, comme une meilleure absorption des nutriments ou une meilleure tolérance au stress (Poppeliers et *al.*, 2023).

Les systèmes gnotobiotiques, dans lesquels seuls les micro-organismes introduits sont présents, sont indispensables pour étudier l'interaction d'une souche unique ou d'une communauté microbienne avec les plantes dans un environnement contrôlé. Ils permettent aux chercheurs de vérifier les effets spécifiques de chaque micro-organisme et d'évaluer leurs performances dans diverses conditions (Saranraj et *al.*, 2022). Les tests expérimentaux *in vitro*, *in situ* et *in vivo* permettent de mieux comprendre la dynamique fonctionnelle du bioinoculant, ce qui permet de garantir que les microorganismes introduits fonctionnent efficacement dans des environnements naturels ou contrôlés (dos Reis et *al.*, 2024). Que le bioinoculant contienne un seul microorganisme ou une communauté microbienne, la compatibilité avec le modèle végétal sélectionné est essentielle pour le succès de l'application (dos Reis et *al.*, 2024). La compréhension des caractéristiques fonctionnelles des micro-organismes, telles que leurs capacités métaboliques, est importante pour développer des bioinoculants adaptés à des cultures spécifiques (dos Reis et *al.*, 2024).

### **6. Caractéristiques biologiques et écologiques de *Bacillus thuringiensis* et son rôle dans la promotion de la croissance des plantes**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) est une bactérie aérobie, Gram positive, sporulante et entomopathogène, appartenant à la famille des Bacillaceae et au phylum des Firmicutes. Elle est étroitement liée à *Bacillus cereus* (Carroll et *al.*, 2022). *B. thuringiensis* a une histoire riche et une importance écologique considérable. La bactérie a été isolée pour la première fois en 1901 par le chercheur japonais Shigetane Ishiwatari, qui l'a baptisé *Bacillus sotto* après l'avoir identifiée comme la cause d'une maladie chez les larves de vers de soie (*Bombyx mori*) (Kumar et *al.*, 2021). Plus tard, en 1911, le scientifique allemand Ernst Berliner a isolé la même bactérie dans la région de Thuringe et la renommée *Bacillus thuringiensis* (Kumar et *al.*, 2021). Cependant, ce n'est qu'en 1953 que les propriétés insecticides des inclusions cristallines parasporales (protéines Cry) associées à ses endospores ont été pleinement comprises, présentant une activité toxique contre un large éventail d'insectes nuisibles (Hannay et Fitz-James, 1955). Cela a fait de Bt l'un des biopesticides les plus utilisés en

agriculture, le succès commercial des souches de *B. thuringiensis*, telles que *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, met en évidence son rôle dans l'agriculture durable en tant que biopesticide (Jallouli et *al.*, 2020).

D'un point de vue écologique, Bt est omniprésent, et peut être trouvé dans divers environnements, notamment le sol, les surfaces végétales et les habitats d'insectes. Il joue un rôle essentiel dans les écosystèmes agricoles, en établissant des associations rhizosphériques avec les racines des plantes, où il agit à la fois comme biopesticide et comme biofertilisant (Gomis-Cebolla et Berry, 2023). Il pourrait, également, se trouver dans les tissus végétaux en tant que bactérie endophyte (Gomis-Cebolla et Berry, 2023).

Il a été démontré que les isolats Bt rhizosphériques ou endophytes peuvent favoriser à la fois la croissance des plantes et leur résistance aux agents pathogènes et prédateurs (Azizoglu, 2019). Des caractéristiques de croissance des plantes sont observées chez les souches Bt, telles que la production de phytohormones comme l'AIA (acide indole-acétique) et de l'ACC-désaminase, la fixation biologique de l'azote ( $N_2$ ), la production d'ammoniac ( $NH_3$ ), la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores et de composés organiques volatils (Azizoglu, 2019). De plus, les plantes colonisées ou inoculées par Bt ont démontré une stimulation des voies de signalisation (ISR) une régulation positive de divers gènes associés à la défense, après une infection par un phytopathogène (Takahashi et *al.*, 2014). Bt présente également une activité chitinolytique et peut être employé pour combattre les champignons phytopathogènes (Azizoglu, 2019). Par ailleurs, une amélioration de la résistance aux stress abiotiques tels que les métaux lourds et les substances chimiques a été observée chez les plantes colonisées par Bt (Suyamud et *al.*, 2018).

### **7. Caractéristiques biologiques et écologiques de *Pantoea agglomerans* et son rôle dans la promotion de la croissance des plantes**

Précédemment connu sous le nom d'*Enterobacter agglomerans* et *Erwinia herbicola*, *Pantoea agglomerans* est une bactérie Gram négative reconnue pour son rôle dans la promotion de la croissance des plantes et la lutte biologique (Gavini et *al.*, 1989). Souvent isolée des surfaces végétales et du sol, *P. agglomerans* appartient à la famille des Enterobacteriaceae au sein de la classe des Gammaproteobacteria. Elle était auparavant classée dans le genre *Enterobacter*, mais les progrès de l'analyse génétique ont conduit à sa reclassification dans le genre *Pantoea* (Mardaneh et Dallal, 2013). Elle est étroitement liée à d'autres espèces du genre *Pantoea* et se trouve souvent en association avec diverses plantes,

faisant partie du microbiote rhizosphérique, épiphytique et endophytique (Delétoile et *al.*, 2009).

Sur le plan écologique, *P. agglomerans* occupe plusieurs niches notamment le sol, la poussière, l'eau, les surfaces végétales et les corps des arthropodes (Lorenzi et *al.*, 2022). Elle est également associée aux animaux et aux humains, ce qui met en évidence sa capacité d'adaptation à tous les environnements (Lorenzi et *al.*, 2022). Elle entretient une relation mutualiste avec plusieurs plantes telles que le blé et le riz, où elle contribue à la santé des plantes en colonisant la rhizosphère, le rhizoplan et les tissus internes (Lorenzi et *al.*, 2022). Son rôle de biofertilisant est évident par sa capacité à produire des phytohormones, à fixer l'azote et à améliorer de l'absorption des nutriments à partir du sol (Lv et *al.*, 2022). En plus de ses propriétés biofertilisantes, *P. agglomerans* fonctionne comme un biopesticide en raison de sa production de composés antimicrobiens comme les enzymes lytiques et les composés organiques volatiles efficaces contre plusieurs pathogènes fongiques et bactériens (Dutkiewicz et *al.*, 2016). *P. agglomerans* peut aussi améliorer la défense contre les pathogènes par le biais des mécanismes qui stimulent le système immunitaire de la plante *via* les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Aziz et *al.*, 2016).

Sur le plan commercial, certaines souches de *P. agglomerans* ont été développées comme bioinoculant pour une agriculture durable. Par exemple, la souche *Pantoea agglomerans* C9-1 est commercialisée pour sa capacité de supprimer le feu bactérien, une maladie destructrice causée par *Erwinia amylovora* sur les pommiers et les poiriers (Ibrahim et *al.*, 2024).

### **8. Méthodes d'application des bioinoculants et limites des méthodes conventionnelles**

La formulation des bioinoculants a émergé comme une étape essentielle dans le développement des produits biologiques pour l'agriculture, visant à améliorer la stabilité, l'efficacité et la facilité d'application des micro-organismes bénéfiques (Khan et *al.*, 2023). Ainsi, la bioformulation représente une avancée clé dans ce domaine, définie biologiquement comme l'ensemble des produits actifs contenant un ou plusieurs microbes bénéfiques ou leurs métabolites et qui sont immobilisés sur un matériau support inerte (Rani et Kumar, 2019). Le microbe est considéré comme un bioagent et peut être soit une souche unique, une spore ou un consortium microbien (Singh et Kumar, 2023). Le matériau porteur est un matériau inactif et sert de support à l'organisme vivant, fournissant une niche protectrice. Ce support doit être non toxique, chimiquement stable, facilement disponible, peu coûteux, capable de maintenir l'humidité, d'assurer la viabilité des cellules pendant le stockage et d'assurer leur transport à

proximité de la plante cible (Bhattacharjee et *al.*, 2023). Le support utilisé peut être organique (sol, tourbe, charbon, etc.) ou inorganique (polymères), solide ou liquide (Chaudhary et *al.*, 2020). Outre le support et l'organisme vivant, les bioformulations peuvent également contenir des additifs, tels que l'amidon et l'acide humique, qui fournissent un soutien nutritionnel aux micro-organismes formulés (Vassilev et *al.*, 2020). Qu'elle soit solide ou liquide, la bioformulation conventionnelle est depuis longtemps la technologie de choix pour le développement de bioinoculants (Rai et *al.*, 2023). Sur le plan pratique, les techniques sont faciles à mettre au point et les matériaux utilisés sont le plus souvent disponibles (Chaudhary et *al.*, 2020).

L'histoire de la formulation des bioinoculants remonte aux premières tentatives d'introduire des micro-organismes bénéfiques dans les pratiques agricoles pour améliorer la fertilité des sols et la croissance des cultures (Aloo et *al.*, 2022). Initialement, les bioinoculants, principalement des bactéries fixatrices d'azote comme *Rhizobium*, étaient appliqués sous forme liquide relativement simple directement sur les semences (Aloo et *al.*, 2022). Ces inoculants qui étaient principalement conçus pour des tests en laboratoire et des applications expérimentales à petites échelle, étaient souvent préparés à partir des cultures bactériennes fraîches mélangées à de l'eau ou à des solutions nutritives, permettant une application facile mais offrant une stabilité et une efficacité limitées en raison de la faible survie des bactéries dans les conditions environnementales défavorables à cause de l'absence d'agents stabilisants (Fadiji et *al.*, 2024). Pour pallier ces limites, des améliorations ont été apportées au fil des années. Outre le liquide porteur et les micro-organismes, des stabilisateurs, des agents dispersants et des tensioactifs ont été intégrés aux bioinoculants liquides afin d'améliorer leur qualité physico-chimique (Brar et *al.*, 2006). Par exemple, des polysaccharides comme le PVP (polyvinylpyrrolidone) ou des osmoprotecteurs comme tels que l'ectoïne et le glycérol peuvent être ajoutés pour renforcer la stabilité microbienne et prolonger la durée de conservation (Brahmaprakash et *al.*, 2020). Des innovations comme les émulsions et les nanoparticules bioactives ont également, vu le jour (Vishnu et *al.*, 2024). Cependant, l'absence d'un support solide les rend sensibles à la contamination et aux conditions et périodes de stockage prolongées (Chaudhary et *al.*, 2020). Ces formulations sont appliquées principalement sur les semences, mais trouvent aussi des usages variés dans le traitement direct des cultures et la restauration des sols dégradés (Bashan et *al.*, 2014). Les bioformulations solides sont réalisées en mélangeant le micro-organisme bénéfique avec un support solide, qui est utilisé comme véhicule. La tourbe est le support privilégié dans ce type de formulation. Avec sa grande surface, sa grande capacité de rétention d'eau et sa

composition, elle offre un environnement favorable à l'activité métabolique et à la multiplication cellulaire pendant le stockage (Khan *et al.*, 2023). Cependant, les composés de tourbe peuvent affecter le développement de certains micro-organismes (Malusá *et al.*, 2012). Outre la tourbe, divers autres supports sont utilisés, tels que le biochar, la bagasse, le compost de liège, l'attapulgite, la sépiolite, la perlite et la silice amorphe (Albareda *et al.*, 2008 ; Chaudhary *et al.*, 2020). Les bioformulations solides comprennent les granulés, les microgranules, les poudres mouillables (PM), les granulés mouillables (GM)/granulés dispersibles dans l'eau (GDE) et les poussières (Malusá *et al.*, 2012). Ces bioformulations solides peuvent être appliquées comme amendement du sol (Bashan *et al.*, 2014).

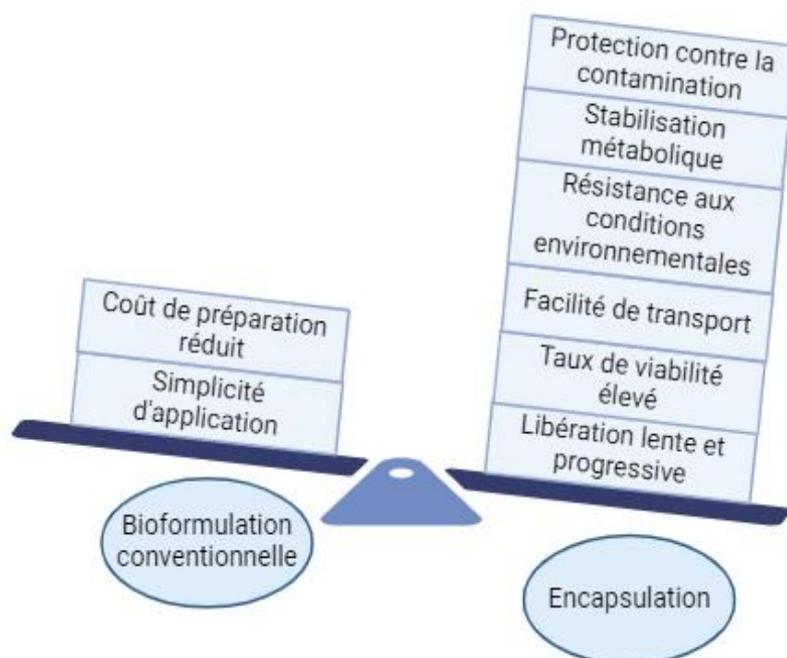
En raison de la forte demande de bioinoculants à base de PGPR dans le secteur agricole et afin de surmonter les limitations liées aux bioformulations conventionnelles (solides et liquides), la science s'est orientée vers le développement de nouvelles formulations, assurant une meilleure viabilité, une plus grande stabilité pendant le stockage et le transport, une facilité d'utilisation et de meilleures performances sur le terrain (Çakmakçı, 2019). De plus, ces formulations doivent garantir le succès de l'application dans des conditions extrêmes, telles que les sols salins, acides ou alcalins, les températures élevées et la sécheresse (Çakmakçı, 2019). Les formulations immobilisées des PGPR dans des polymères ou l'encapsulation sont une technologie avancée, prometteuse et en développement rapide qui présente des avantages significatifs par rapport aux autres formulations (Fig.5). L'encapsulation tend à recouvrir les cellules vivantes d'une matrice polymère qui sert de microenvironnement protégeant les cellules et leurs métabolites des conditions extérieures défavorables. Ce processus est également appelé immobilisation. La co-immobilisation se produit lorsque plusieurs souches sont appliquées (Chaudhary *et al.*, 2020). Dans le secteur agricole, la bioencapsulation présente des avantages essentiels par rapport aux autres bioformulations. En plus du grand nombre de cellules piégées dans les capsules formées, ce processus stabilise la viabilité des cellules microbiennes pendant et après l'encapsulation, en particulier pendant de longues périodes de stockage ou même lors de l'application aux cultures ; maintient l'efficacité des propriétés des activités liées à la promotion de la croissance végétale à long terme ; et assure la libération lente contrôlée et progressive des cellules à proximité du site ciblé, pour une colonisation rhizosphérique et racinaire efficace (Rojas-Sánchez *et al.*, 2022).

La bioencapsulation s'effectue généralement en trois étapes distinctes :

Dans la première étape, le principe actif ou le micro-organisme est mélangé et absorbé dans une matrice polymère. Puis dans la deuxième étape, qui est une opération mécanique, une

solution liquide est dispersée sous agitation, où des particules solides se forment. Dans la troisième étape, les particules formées lors de l'étape précédente subissent une polymérisation et une stabilisation physico-chimique (Chaudhary et *al.*, 2020).

L'encapsulation dans des macroparticules (1 à 4 mm de diamètre) est une technologie prometteuse, notamment dans les pays en développement, car elle ne nécessite pas d'équipements ou de matériaux spéciaux, et les procédés requis sont généralement disponibles (Bashan, 2016). Les microbilles, avec un diamètre d'environ 1 mm se distinguent par leur capacité à assurer un taux de survie élevée et une efficacité accrue sur terrain. Cependant, malgré ces avantages largement discutés, la technologie des microbilles deux défauts majeurs, qui sont le coût relativement élevé des matériaux requis et l'appareillage spécifique nécessaire au développement du procédé (Bashan, 2016). Le tableau 1 résume les principales catégories de bioformulation abordées, leurs sous-catégories, ainsi que les supports et caractéristiques associés.



**Fig.5.** Schéma des principaux avantages de la bioformulation conventionnelle et de la bioencapsulation.

**Tab.1.** Caractéristiques principales des catégories de bioformulation (Khan et *al.*, 2023)

Catégorie principale	Sous-catégories	Support utilisé	Caractéristiques
Solide	Granules	Particules sèches, ingrédients actifs (5-20%), particules grossières (100-1000µm), non poussiéreuses	Granules de blé, appâts à base de semoule de maïs, gluten, farine de coton, gélatine, alginate de sodium, semoule de blé et granulés de pesta
	Poudres mouillables (PM)	50 à 80 % de poudre, 15 à 45 % de charge, 1 à 10 % de dispersant et 3 à 5 % de tensioactif	Mélanges de son de blé et de sable, mélange de sciure de bois, de sable et de mélasse, fumier de ferme, talc, charbon de bois
	Les granulés mouillables (GM)/granulés dispersibles dans l'eau (GDE)	Petits granulés, non poussiéreux, fluides, avec agent dispersible sec, respectueux de l'environnement et facilement miscibles à l'eau	De l'eau ou d'autres liquides
Liquide	Concentré de suspension	Non poussiéreux, mesurable et facile à verser pour le processus de pulvérisation	Eau, bouillon, jus de fruits et polyvinylpyrrolidone (PVP)
	Concentré fluide miscible à l'huile	Suspension avec principes actifs dans un liquide organique	Liquide organique
Encapsulée	Macro et microencapsulation	Enrober de cellules microbiennes dans un matériau polymère pour produire des billes	Polymères naturels, (alginates, agarose, chitosane, cellulose, collagène, xanthane) et polymères synthétiques (polyéthylène glycol, alcool polyvinylique, polyuréthane, polyéthersulfone, polypropylène, sulfate de polystyrène sodique et polyacrylate, polyacrylonitrile-sodium-méthallylsulfonate)

### 9. Techniques d'encapsulation

Plusieurs techniques d'encapsulation par des procédés physicochimiques sont décrites dans la littérature, et d'autres continuent d'émerger afin de développer de nouvelles formulations. Selon Hudson et Margaritis (2014), il existe 20 techniques pour l'élaboration des capsules polymériques dont chacune a ces fins d'utilisation, nécessite des matériaux et des équipements différents et a des avantages et inconvénients, qui sont : (1) gélification externe, (2) émulsification et gélification interne, (3) méthode de réticulation par émulsion, (4) technique de microémulsion inverse, (5) extraction par émulsion-solvant, (6) méthode de diffusion par solvant d'émulsification, (7) méthode de coalescence par émulsion-gouttelettes, (8) coacervation complexe, (9) méthode micellaire inverse, (10) méthodes d'auto-assemblage, (11) émulsification eau dans huile, (12) procédé de désolvatation, (13) méthode de coacervation par pH, (14) émulsification, (15) technologie de nanoparticules liées à l'albumine (nab), (16) auto-assemblage, (17) méthode de désolvatation, (18) méthodes impliquant des dérivés de pullulane hydrophobisés, (19) méthode de synthèse de micelles inverses, et (20) émulsification-diafiltration. Les techniques de gélification ionique (extrusion ou réticulation), d'émulsification et de séchage par atomisation sont les plus souvent utilisées pour l'encapsulation des PGPR (Vejan et *al.*, 2019) (Fig.6).

#### 9.1. Séchage par atomisation

Le séchage par atomisation est un procédé de déshydratation bien connu et courant pour la production d'inoculum microbien immobilisé commercialisable (Schoebitz et López Belchí, 2016). Au cours de ce procédé, les cellules bactériennes sont dispersées dans un matériau support. L'émulsion résultante est ensuite dirigée vers une chambre de séchage pour subir une atomisation en impliquant de l'air chaud ou du gaz. La ventilation de l'extracteur génère par l'évaporation suivante du solvant pour ne laisser que de la poudre, qui est en fait des microcapsules sèches (Saber Riseh et *al.*, 2021). Bien que le séchage par atomisation soit une méthode rentable et fournisse des microcapsules stables, de qualité et rapidement solubles, il présente un certain nombre d'inconvénients, notamment dans le choix et la sélection du matériau, qui doit être de faible viscosité et de concentration et solubilité élevées et avoir des caractéristiques de séchage infaillibles (Sehrawat et *al.*, 2022). En plus du matériau, la température de séchage élevée est un paramètre clé qui influence l'encapsulation et la survie des cellules bactériennes au cours du procédé. Cela nécessite une optimisation contrôlée de la température d'entrée et de sortie et un matériau adéquat afin d'avoir des capsules stables, viables et homogènes (Schoebitz et López Belchí, 2016).

### 9.2. Émulsification

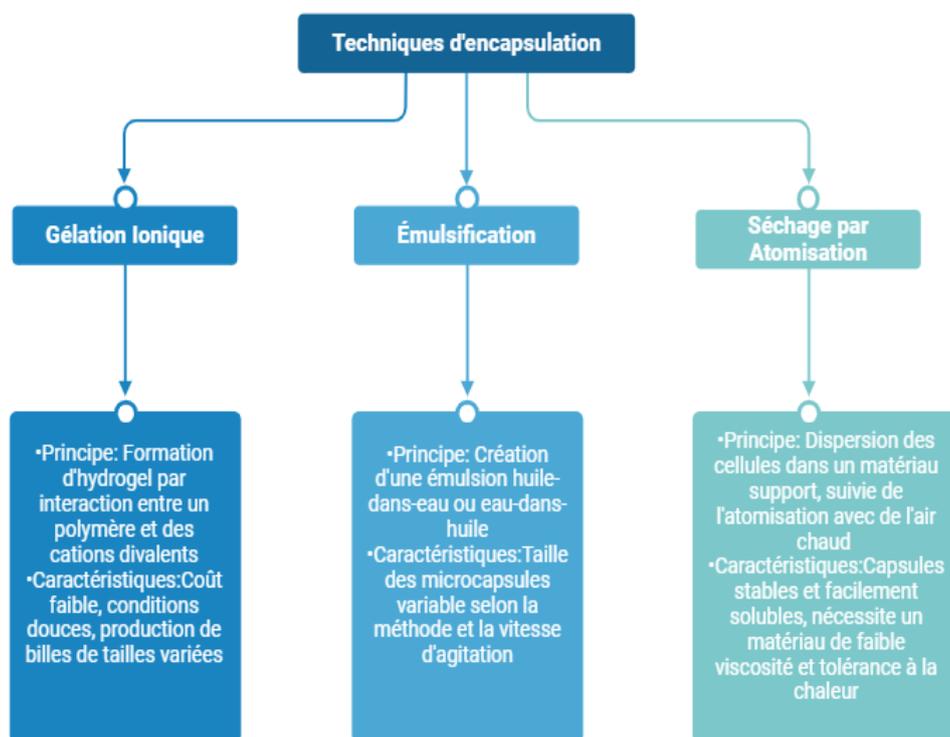
Les émulsions huile-dans-eau ou eau-dans-huile sont également utilisées pour former des capsules contenant des PGPR. Les polymères sont mis en suspension dans l'eau et mélangés à des huiles non miscibles. La suspension microbienne est ensuite ajoutée sous agitation (Vemmer et Patel, 2013). Cette technique donne des microcapsules dont la taille diffère selon la méthode d'émulsification et la vitesse d'agitation, tandis que la distribution de taille est généralement plus élevée que celle des techniques de goutte à goutte (Vemmer et Patel, 2013). Diverses méthodes d'émulsification sont décrites dans la littérature, telles que la gélification thermique et la polymérisation interfaciale (Vemmer et Patel, 2013). Les polymères tels que l'alginate de sodium, la gélatine ou la gomme arabique (Saberri Riseh et *al.*, 2021) et les huiles telles que l'huile de soja et l'huile de paraffine sont les matériaux les plus utilisés dans les techniques d'émulsification (Liffourrena et Lucchesi, 2018 ; Pour et *al.*, 2019).

Cependant, cette technique présente plusieurs limitations. La production de microcapsules repose sur des étapes d'agitation et de mélange qui peuvent causer des pertes significatives en viabilité microbienne en raison des forces de cisaillement élevées. Par ailleurs, le recours à des huiles non miscibles peut poser des défis en termes de compatibilité environnementale et de coûts, notamment lorsqu'elles sont utilisées à grande échelle (Eratte et *al.*, 2018). De plus, la stabilité des capsules obtenues peut être affectée par la difficulté de contrôler précisément la taille et l'uniformité des microcapsules, ce qui influence leur performance sur le terrain. Enfin les procédés d'émulsification nécessitent souvent des équipements spécifiques et un contrôle rigoureux des paramètres, ce qui peut limiter leur application pour des productions industrielles à faible coût (Eratte et *al.*, 2018).

### 9.3. Gélation ionique

La gélification ionique est une technique très appréciée et utilisée dans le monde entier en raison de coûts de production abordables et de conditions méthodologiques accessibles (Saberri Riseh et *al.*, 2021). Cette technique consiste à disperser une solution aqueuse d'alginate de sodium contenant l'agent microbien souhaité sur une solution contenant des cations divalents, comme le chlorure de calcium. Un hydrogel est alors formé après solidification des gouttelettes après interaction entre la chaîne polymère de la charge négative contenue dans l'alginate de sodium et les cations  $\text{Ca}^{2+}$  (Saberri Riseh et *al.*, 2021). Cette technique génère des billes uniformes dont la taille peut varier de quelques micromètres à plusieurs millimètres, selon la taille de l'aiguille, et peut donc être adaptée à la

macroencapsulation et à la microencapsulation. De plus, des billes à l'échelle nanométrique sont formées par des dispositifs d'encapsulation spéciaux (Anandhakumar et *al.*, 2017). D'autres polymères, tels que les dérivés de pectinate et la gomme de guar, sont utilisés comme alternative à l'alginate de sodium, tandis que le gluconate de calcium, le  $Ba^{2+}$  et le  $Cu^{2+}$  sont utilisés pour remplacer le  $CaCl_2$  (Vejan et *al.*, 2019). En outre, les billes obtenues par gélification ionique sont caractérisées par leur uniformité, leur capacité à encapsuler efficacement les micro-organismes tout en préservant leur viabilité et leur aptitude à libérer progressivement les bactéries (Riseh et *al.*, 2022). Ces caractéristiques font de la gélification ionique une méthode incontournable dans le développement des bioinoculants modernes.



**Fig.6.** Schéma des principales techniques d'encapsulation des PGPR.

## 10. Propriétés et choix des supports polymériques

Il a déjà été établi que la qualité et l'efficacité de la formulation sont largement influencées par le support. Ce dernier est le constituant prédominant de la formulation, qui va transporter le microorganisme vivant et dans la concentration souhaitée jusqu'au champ tout en préservant ses performances (Bashan et *al.*, 2014). Selon Bashan et *al.* (2014), un support idéal devrait avoir les caractéristiques suivantes : (i) est biodégradable et non toxique et ne

présente aucun risque pour les humains, les animaux et l'environnement ; (ii) permet la préservation du microorganisme et de ses performances sur une longue période de stockage ; (iii) est disponible à un coût raisonnable et facile à manipuler et assure une libération contrôlée du microorganisme ; (iv) est facile à fabriquer et à combiner avec des additifs ou des nutriments ; et (v) est adapté aux souches PGPR et possède des caractéristiques physicochimiques permettant une capacité de rétention d'eau élevée.

### 10.1. Alginate de sodium

L'alginate de sodium est un polysaccharide abondant dans les parois cellulaires des algues brunes, et également présent dans les parois de certaines espèces bactériennes, telles que *Pseudomonas* et *Azotobacter* (Dobrinčić et al., 2020). Ce polymère est constitué de résidus  $\beta$ -d-mannuronate et  $\alpha$ -l-guluronate dont les groupes carboxylates portent une charge nette négative (Dobrinčić et al., 2020). L'alginate est appliqué dans de nombreux domaines, à savoir pharmaceutique, alimentaire et agricole (Tønnesen et Karlsen, 2002 ; dos Santos Silva et al., 2011). Parmi ses applications, il est considéré comme le substrat de choix pour l'encapsulation des PGPR compte tenu de sa biodégradabilité, de sa biocompatibilité, de sa disponibilité, de sa nature non toxique, de son coût relativement faible et de sa capacité à résister aux conditions acides du sol et à piéger un grand nombre de cellules microbiennes et à permettre leur diffusion lente et progressive (Sosnik, 2014 ; Simó et al., 2017). L'alginate hydrosoluble forme un hydrogel irréversible après avoir réagi avec des acides ou des sels contenant des cations divalents (Thakur et al., 2018). L'alginate à base d'acide guluronique a une affinité ionique plus élevée que l'alginate à base d'acide mannuronique, et la matrice de gel se forme après diffusion de cations dans la solution d'alginate après échange de  $\text{Na}^+$  avec  $\text{Ca}^{2+}$  et formation d'un pont ionique entre les deux chaînes (Montanucci et al., 2015). Cependant, il a été rapporté que la présence de certains agents antigélifiants, tels que  $\text{Mg}^{2+}$ , ou d'agents chélatants, tels que le citrate, peut affecter l'intégrité des capsules d'alginate (Verma et al., 2020). La combinaison de l'alginate avec d'autres polymères, tels que le chitosane et la gélatine, semble être la solution (Saberri Riseh et al., 2021).

### 10.2. Chitosane

Le chitosane peut également être utilisé comme support de formulation pour les microorganismes bénéfiques pour les plantes (Chanratana et al., 2018). Le chitosane est constitué de longues chaînes d'unités N-acétyl glucosamine (GlcNAc). Il comprend également des unités N-glucosamine (GlcN), qui sont plus abondantes que la GlcNAc (Naveed et al., 2019). Cet oligosaccharide partage les mêmes caractéristiques de biodégradabilité, de non-toxicité,

de facilité de manipulation et de faible coût que l'alginate (Naveed et *al.*, 2019). Le chitosane peut également induire la production d'osmorégulateurs dans les plantes et présenter des activités antimicrobiennes importantes (Vassilev et *al.*, 2020). L'inconvénient majeur de l'utilisation du chitosane comme support pour l'encapsulation des microbes est sa résistance mécanique limitée et sa faible flexibilité de chaîne (Qu et Luo, 2020). Sa combinaison avec d'autres polymères, tels que l'alginate et l'amidon, peut améliorer ces caractéristiques en renforçant sa structure et sa stabilité physicochimique (Belščak-Cvitanović et *al.*, 2015). Dans une étude récente, le chitosane à différentes concentrations (0,3–3 %) a été utilisé en combinaison avec 2 % d'alginate pour l'encapsulation de *Methylobacterium oryzae*, avec une viabilité maintenue par formulation de  $10^7$  UFC/ml et une survie de 80 % après 3 mois de stockage. L'application a montré une meilleure promotion de la croissance des plantules de tomate par rapport aux formulations d'alginate seul (Chanratana et *al.*, 2018). Une autre équipe de recherche a encapsulé avec succès *Azospirillum brasilense* et *Pseudomonas fluorescens* dans une formulation de chitosane (3 %) et d'amidon (8 %). La formulation a assuré la viabilité de  $10^9$  UFC/g pour *A. brasilense* et de  $10^8$  UFC/g pour *P. fluorescens* après 12 mois de stockage à température ambiante (Perez et *al.*, 2018).

### 10.3. La chitine

La chitine est un autre biopolymère utilisé dans l'encapsulation comme charge (Vassilev et *al.*, 2020). La chitine est le deuxième biomatériau le plus abondant dans la nature après la cellulose, présent notamment dans les levures, les champignons, les insectes et les invertébrés marins (Hudson et Jenkins, 2001). C'est un homopolymère de 2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose. La chitine est appelée chitosane lorsque la forme amine libre est désacétylée à plus de 50 % (Hudson et Jenkins, 2001). La chitine présente également des propriétés antimicrobiennes importantes et est utilisée comme agent d'enrobage des semences ; cela semble stimuler la sécrétion de chitinases végétales pour contrôler l'invasion de parasites nuisibles (Hudson et Jenkins, 2001). L'ajout de chitine dans une bioformulation à base d'alginate a induit la synthèse de chitinase dans *Penicillium janthinellum* et amélioré sa capacité à solubiliser le phosphate (Vassilev et *al.*, 2020). La chitine est insoluble dans la plupart des solvants courants, ce qui limite son utilisation dans certains processus d'encapsulation (Vejan et *al.*, 2019).

## 11. Propriétés et choix des additifs

En plus des polymères porteurs nécessaires aux processus d'encapsulation, des additifs sont ajoutés aux formulations afin de réduire leur coût et d'améliorer certaines

caractéristiques, telles que la survie et les performances sur le terrain (Vassilev *et al.*, 2020), et de maintenir la stabilité des cellules à l'intérieur des billes pendant la formulation, le stockage et le transport vers les champs d'application (John *et al.*, 2011), ce qui permet de contrôler la libération et de s'adapter rapidement à l'environnement d'application. Il existe une large gamme d'additifs, tels que l'amidon, l'argile, l'acide humique, le lait écrémé et les sucres (Vassilev *et al.*, 2020). Cependant, le choix de l'additif le plus adéquat qui convient aux types de cellules encapsulées et au support utilisé est essentiel et doit être bien étudié (John *et al.*, 2011).

### 11.1. Amidon

L'amidon contient deux types d'alpha-glucanes, l'amylose et l'amylopectine dont les concentrations varient selon l'origine botanique de l'amidon (Seetharaman et Bertoft, 2012). L'amidon est un polymère bon marché et très abondant, et son ajout comme additif aux formulations d'alginate a toujours été un succès. L'amidon améliore la résistance au stress physique et protège contre les rayons UV nocifs (Bashan *et al.*, 2002). De plus, il a un effet protecteur, grâce à l'adhésion cellulaire à ses granules. Cela protège les bactéries du stress notamment pendant l'étape critique de séchage, et aide à maintenir une population microbienne stable sur une longue période de stockage (Schoebitz *et al.*, 2012). De plus, des niveaux élevés d'amidon augmentent la viscosité et diminuent la porosité des capsules, ce qui permet une diffusion plus contrôlée des micro-organismes dans l'environnement (Vassilev *et al.*, 2020). La combinaison alginate–amidon est prometteuse, en particulier pour les micro-organismes qui peuvent utiliser l'amidon comme source de carbone ; ce résultat est confirmé par des images de microscopie électronique qui montrent une distribution homogène entre les particules des deux polymères (Schoebitz *et al.*, 2012).

### 11.2. Acide humique

Les substances humiques constituent l'élément majoritaire de la matière organique du sol, de l'eau et des sédiments (Olivares *et al.*, 2017) dont l'acide humique assemble divers composants hétérogènes de faible poids moléculaire (Young *et al.*, 2006). La composition chimique exacte des acides humiques est difficile à établir et diffère selon plusieurs paramètres géographiques, climatiques et biologiques. Les acides humiques comprennent généralement des groupes fonctionnels phénoliques, acides carboxyliques, énoliques, quinoniques et éthers, des sucres et des peptides (de Melo *et al.*, 2016). La présence d'acide humique dans le sol en vrac de la plante ou dans la rhizosphère s'est avérée très favorable ; elle accélère l'absorption des nutriments, du carbone et de l'azote en plus de l'induction du

métabolisme secondaire (Nardi *et al.*, 2017). L'acide humique favorise également la formation de racines latérales et de poils racinaires, car il stimule la chimiotaxie au sein de la communauté microbienne de la rhizosphère, conduisant ainsi à une colonisation rhizosphérique et endophyte efficace (Olivares *et al.*, 2017). Cet acide a déjà démontré un effet bénéfique significatif sur différentes cultures, notamment la canne à sucre, la tomate, le haricot commun et le maïs (Olivares *et al.*, 2017).

L'acide humique forme des liaisons chimiques fortes avec l'alginate, ce qui donne des capsules stables et performantes. L'immobilisation des souches de *Pseudomonas putida* et de *Bacillus subtilis* dans des billes d'alginate supplémentées en acide humique appliquées à des plantes de *Lactuca sativa* a montré une augmentation significative de la hauteur des pousses et des racines après inoculation par rapport au témoin libre (Rekha *et al.*, 2007). Ainsi, l'ajout de 1 % d'acide humique dans 2 % de formulation d'alginate d'une souche de *Bacillus subtilis* a permis de maintenir une viabilité élevée après 5 mois de stockage et d'assurer une promotion réussie de la croissance des plants de laitue dans des conditions gnotobiotiques (de Melo *et al.*, 2016). Parallèlement, l'encapsulation de la souche *Azospirillum brasilense* AbV5 dans des capsules d'alginate supplémentées en acide humique a assuré un taux de survie élevé et une viabilité élevée après 90 jours de stockage (Zago *et al.*, 2019).

### 11.3. Minéraux argileux

Les minéraux argileux sont les minéraux les plus répandus dans la biosphère. Ces minéraux présentent des caractéristiques physicochimiques exceptionnelles, en plus de leur grande capacité de rétention d'eau et de leur teneur élevée en carbone et en potassium. L'activité biogéochimique des micro-organismes résulte de leur interaction avec ces minéraux ; ces derniers sont impliqués dans la croissance et l'activité métabolique dans les processus microbiens et divers autres processus microbiens (Fomina et Skorochood, 2020). La bentonite, la perlite et le kaolin sont les minéraux argileux les plus couramment utilisés comme additifs dans les procédés d'encapsulation des PGPR.

#### 11.3.1. Bentonite

La bentonite est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et dans l'agriculture comme vecteur de médicaments et de pesticides (Li *et al.*, 2009). Zohar-Perez *et al.* (2003) ont déduit que l'utilisation de 0,5 % de bentonite et 0,5 % de kaolin en combinaison avec 2 % d'alginate augmente l'épaisseur des parois des capsules, ce qui conduit à maintenir un taux de survie élevé après les avoir exposées aux rayons UV. La combinaison de la bentonite avec l'alginate de *Raoultella planticola* a permis d'augmenter la porosité des capsules et, par

conséquent, de réguler la diffusion du microorganisme dans le sol (He et *al.*, 2015). Wu et *al.* (2012) ont utilisé un mélange d'alginate, d'amidon et de bentonite pour la formulation bactérienne de *Raoultella planticola* Rs-2. Cette combinaison s'est avérée meilleure pour une libération contrôlée dans des conditions de stress abiotique. La combinaison de bentonite et d'amidon a été conçue pour l'immobilisation de *Pseudomonas putida* Rs-198 dans l'alginate ; ce mélange a augmenté le taux de survie pendant le stockage. De plus, l'application de cette formulation aux plantes de coton soumis à un stress salin a conduit à une colonisation racinaire plus efficace et à une augmentation de la biomasse et de la teneur en protéines solubles (He et *al.*, 2016).

### 11.3.2. Perlite

La perlite est un matériau inorganique naturel poreux et structurellement amorphe qui présente une très haute résistance chimique physique et biologique (Lobo et *al.*, 2019). La perlite a été utilisée comme alternative à la tourbe pour la formulation de souches de *Rhizobium*. Ce matériau a permis de maintenir un pourcentage élevé de survie après stockage à 25 °C pendant 120 jours et d'augmenter les performances des rhizobiums dans la promotion de la croissance des plantes de soja (Albareda et *al.*, 2008). Selon Sari et *al.* (2012), l'ajout de perlite dans les bioformulations à base de polymères offre une meilleure stabilité mécanique et protège contre les menaces microbiennes et contre les conditions physicochimiques défavorables. De plus, la présence de perlite dans une formulation à base d'alginate–paraffine de *Pseudomonas putida* a amélioré la stabilité mécanique des microcapsules avec une meilleure colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* après 21 jours de colonisation (Liffourrena et Lucchesi, 2018).

### 11.3.3. Kaolin

La composition chimique du Kaolin riche en kaolinite en fait l'un des minéraux argileux les plus importants de l'industrie (Murray, 2006). Une souche de *Streptomyces griseus* a été formulée en alginate seul et en alginate (2,5%) additionné de kaolin (1:4 kaolin/alginate). L'ajout de ce minéral a non seulement amélioré l'efficacité de la formulation mais a permis de contrôler efficacement une souche phytopathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* par rapport à la formulation à base d'alginate seule (Zacky et Ting, 2015). De plus, une formulation lyophilisée de *Streptomyces* sp. à base d'alginate et de kaolin a efficacement supprimé le champignon pathogène *Rhizoctonia* sur les plantes de tomates (Sabaratnam et Traquair, 2002).

### 11.4. Sucres

Plusieurs sucres sont utilisés dans les technologies de bioencapsulation comme agents protecteurs externes (Vassilev et *al.*, 2020). Les sucres, tels que le tréhalose, le saccharose, le glucose et le fructose, protègent contre la pression osmotique et la dessiccation pendant l'étape de séchage (Morgan et *al.*, 2006). Les sucres peuvent être ajoutés aux formulations après la récolte des cellules ou ajoutés aux milieux de culture car ils ont le potentiel d'être absorbés et agrégés dans le cytoplasme (Berninger et *al.*, 2018). L'effet protecteur du tréhalose consiste à maintenir une membrane intacte et fluide, grâce aux liaisons hydrogène formées avec les protéines dans des conditions de dessiccation (García, 2011). Le tréhalose ajouté au milieu de culture a amélioré la survie de *Bradyrhizobium japonicum* (Streeter, 2003) et a renforcé la viabilité de *Raoultella terrigena* pendant le séchage (Schoebitz et *al.*, 2012). Le saccharose a protégé *Pantoea agglomerans* pendant le processus de séchage par atomisation en le protégeant contre la dessiccation lors de l'étape de séchage (Costa et *al.*, 2000), tandis que le glucose en combinaison avec du lait écrémé et de la polyvinylpyrrolidone K-90 a permis une survie de 78 % de *Beauveria bassiana* après 12 mois de stockage à 30 °C (Mishra et *al.*, 2013). D'autres mono- et disaccharides sont également utilisés comme protecteurs, tels que le fructose et le lactose (Costa et *al.*, 2000).

### 11.5. Lait écrémé

Le lait écrémé est également utilisé comme agent protecteur et comme source de nutriments dans les bioformulations (Vassilev et *al.*, 2020). Plusieurs études ont rapporté l'utilisation de lait écrémé dans l'immobilisation de PGPR. Un support d'alginate et du lait écrémé ont été utilisés pour l'encapsulation de deux souches bactériennes, *Pseudomonas fluorescens* et *Burkholderia cepacia*, et l'application de leurs microcapsules a amélioré la croissance des plants de blé dans des conditions semi-arides (Saxena, 2011). Dans une autre étude, *Pseudomonas fluorescens* a été immobilisé dans de l'alginate et du lait écrémé, ce qui a entraîné une libération efficace du micro-organisme dans le sol (Power et *al.*, 2011). Ainsi, le lait écrémé en combinaison avec de l'argile a amélioré les performances d'*Enterobacter* sp. dans les conditions du sol (Vassilev et *al.*, 2020). De plus, Bashan et *al.* (2002) ont découvert que le lait écrémé avait un effet positif significatif sur le nombre de cellules d'*Azospirillum brasilense* piégées et sur la libération efficace dans le sol adjacent de la plante.

### 11.6. Talc

Le talc, un silicate hydraté de magnésium naturellement abondant et économique, est aussi utilisé comme additif dans les formulations d'alginate en raison de ses propriétés

physico-chimiques (Hubballi et *al.*, 2023). Il améliore la résistance mécanique des capsules ce qui est très important lors de la manipulation et de l'application sur terrain. De plus, le talc offre une protection physique contre les variations de température contribuant à maintenir une meilleure viabilité des bactéries encapsulées sur de longues périodes de stockage (Hubballi et *al.*, 2023). Le talc agit également comme un support absorbant qui favorise une meilleure rétention d'humidité ce qui réduit le stress hydrique pendant le séchage et le stockage. Des études ont montré que l'intégration du talc dans des formulations de PGPR telles que *Azospirillum brasilense* et *Pseudomonas fluorescens* améliore significativement leurs performances sur terrain, notamment en augmentant leur capacité à coloniser les racines et à promouvoir la croissance des plantes (Prasad et Babu, 2017).

De nombreux autres matériaux sont utilisés comme additifs dans la technologie d'encapsulation des micro-organismes, tels que les hydrolysats de protéines, le glycérol, le silicium, l'acide polyactique, les strigolactones, la carboxyméthylcellulose (CMC), le sorbitol, le polyéthylène glycol (PEG), le glutamate de sodium, le mannitol et la gélatine (Berninger et *al.*, 2018 ; Vassilev et *al.*, 2020). L'ajout de ces additifs dépend en grande partie de la méthode d'encapsulation utilisée, du type de support utilisé et des micro-organismes formulés.

### **12. Progrès récents dans l'encapsulation des biofertilisants et des agents stimulateurs de croissance**

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux résultats de recherche ont été obtenus sur l'application des PGPR encapsulées à des fins de biofertilisation et d'amélioration de la croissance (Tab.2). La bioformulation d'engrais et de promoteurs de croissance a été largement étudiée, et le succès de leur application sur le terrain a été rapporté. He et *al.* (2015) ont rapporté que *Raoultella planticola* Rs-2 encapsulée dans des microcapsules d'alginate-bentonite pourrait être une option peu coûteuse comme engrais, grâce à leurs propriétés de libération lente et à leur taux de survie relativement élevé. Chanratana et *al.* (2018) ont découvert que *Methylobacterium oryzae* CBMB20 formulé dans du chitosane humide produisait un effet significatif sur la longueur des pousses et des racines et le poids sec des plants de tomates, et que les bactéries encapsulées dans des microbilles avaient un meilleur taux de survie après 21 jours d'application dans les sols de serre. *Methylobacterium oryzae* encapsulé dans des microbilles de chitosane pourrait être une technique nouvelle et faisable pour l'application de fertilisation du sol. Une autre étude a démontré que l'application *in vivo* aux plantes de laitue de billes contenant la bactérie favorisant la croissance des plantes *Bacillus subtilis* CC-pg104 obtenait une promotion de croissance significative en augmentant

la longueur des pousses et des racines et en assurant une colonisation efficace des racines et de la rhizosphère ; ainsi, l'acide humique ajouté à cette formulation a stimulé la viabilité de ces cellules pendant le stockage, a assuré une libération cellulaire progressive et a protégé les bactéries contre les facteurs environnementaux défavorables (Young et *al.*, 2006). Dans une autre étude, John et *al.* (2013) ont utilisé de l'huile de canola et de la gomme xanthane pour la formulation de *Sinorhizobium meliloti*. Un effet significatif sur la nodulation a été observé lors de l'application d'une émulsion contenant  $10^5$  UFC/ml sur des graines de luzerne. En plus d'améliorer l'indice de nodulation, le *Rhizobium* fixateur d'azote *Sinorhizobium meliloti* a également augmenté la taille des nodules, la hauteur de la plante, le poids sec des pousses et le poids sec des racines. De même, Rojas-Padilla et *al.* (2022) ont étudié l'encapsulation de 3 souches de *Bacillus* (*B.megaterium*, *B.cabrialesii* et *B.paralicheniformis*) dans 2 % d'alginate de sodium et leur application sur le blé. Cette bioformulation a significativement amélioré les paramètres biométriques des plantes comme la hauteur de la tige, le poids sec et la teneur en chlorophylle.

**Tab.2.** Exemples de caractéristiques des bioformulations de PGPR et de leurs objectifs d'application (Balla et *al.*, 2022).

Micro-organisme	Support	Additifs	Méthode d'encapsulation	But d'application	Plante
<i>Raoultella planticola</i>	Alginate de sodium	Bentonite	Gélation ionique	biofertilisant	/
<i>Pseudomonas putida</i>	Alginate de sodium + paraffine	Bentonite	Émulsification	Promotion de la croissance des plantes	/
<i>Methylobacterium oryzae</i>	Alginate de sodium + chitosane	/	Gélation ionique	Promotion de la croissance des plantes	tomate
<i>Bacillus subtilis</i>	Alginate de sodium	Acide humique + glycérol	Gélation ionique	Promotion de la croissance des plantes	Laitue
<i>Pseudomonas putida</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	Alginate de sodium	Acide humique	Gélation ionique	Promotion de la croissance des plantes	Laitue
<i>Azospirillum brasilense</i>	Alginate de sodium	Acide humique +tréhalose + tourbe	Gélation ionique	Promotion de la croissance des plantes	Blé
<i>Pseudomonas putida</i>	Alginate de sodium +paraffine	perlite	Émulsification	Promotion de la croissance des plantes	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Pseudomonas Fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Eudragit + copolymère méthacrylique	silice	Séchage par atomisation	biofertilisant	/

Micro-organisme	Support	Additifs	Méthode d'encapsulation	But d'application	plante
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas corrugata</i>	Alginate de sodium	Lait écrémé	Gélation ionique	Promotion de la croissance des plantes	Maïs
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Alginate de sodium	Lait écrémé	Gélation ionique	Biofertilisant dans un sol salin	Blé
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sodium alginate	/	Gélation ionique	Biofertilisant dans un sol salin	Coton
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Huile de canola + gomme xanthane	/	Émulsification	Promotion de la nodulation et de la croissance des plantes	Luzerne

### 13. État actuel et perspectives de bioformulations commerciales des PGPR

La majorité des produits commerciaux à base de PGPR disponibles à ce jour se présentent sous des formes solides ou liquides. Ces bioformulations sont développées pour une large gamme de cultures et sont utilisées sur plusieurs continents, illustrant leur importance croissante dans les systèmes agricoles modernes (Fadiji et al., 2024). Les produits encapsulés restent encore à l'état expérimental ou limités à des marchés de niche. C'est notamment le cas dans des pays comme l'Inde et la Chine, où certaines avancées dans la commercialisation de formulations encapsulées commencent à émerger (Yang et al., 2024). Le tableau ci-dessous présente un aperçu des formulations solides et liquides actuellement disponibles dans le marché mondial.

**Tab.3.** Résumé des formulations de bioinoculants commercialisées disponibles dans le marché des PGPR (Fadiji et al., 2024).

Produit	Composition	Cultures ciblées	Type de formulation	Entreprise de fabrication	Pays
AzoFer	<i>Azospirillum brasilense</i>	Maïs et grandes cultures	Liquide	Biofabrica,	Mexique
Liquifix	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja	Liquide	Legume Technology Ltd.	Royaume-uni
Azoter	<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Bacillus megaterium</i> et <i>Azotobacter chroococcum</i>	Cultures horticoles et agricoles	Liquide	Azoter	Hongrie
Dimargon	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Café et soja	Liquide	Biocultivos	Colombie
Utrisha N	<i>Mesorhizobium symbioticum</i>	Riz, maïs, canola, tournesol, soja, sorgho et betterave sucrière	Liquide	Corteva Agriscience	USA

Produit	Composition	Cultures ciblées	Type de formulation	Entreprise de fabrication	Pays
Bioboost+	<i>Burkholderia acidovorans</i> et <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Canola	Liquide	Lallemand	Canada
Custom N2	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Cultures horticoles et agricoles	Liquide et solide	Custom Biologicals	USA
RoshdAfza	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> et <i>Azospirillum brasilense</i>	Canne à sucre, maïs, céréales, arbres fruitiers et riz	Liquide et solide	Biorun company	Iran
TwinN	<i>Azospirillum</i> sp. et <i>Azorhizobium</i> sp.	Cultures horticoles et agricoles	Solide	Mapleton Agri Biotec, Mapleton	Australie
Rhizosum N	<i>Azotobacter vinelandii</i> et <i>Rhizopagus irregularis</i>	Riz, maïs, canola, betterave sucrière, soja, sorgho et tournesol	Liquide	Syngenta	Suisse
NoduleNTM Peat	Souches de <i>Rhizobia</i>	Pois chiche	Solide	New Edge Microbial	Australie
EasyRhizTM	Souches de <i>Rhizobia</i>	Féverole, pois et vesce	Liquide	New Edge Microbial	Australie
Optimize LV	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja	Liquide	Novozymes BioAg Ltd.	Danemark
Cedomon	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Avoine et orge	Solide	Lantmännen BioAgri	Suède
Nodulator N/T	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> et <i>Bacillus subtilis</i>	Soja	Liquide	BASF	Allemagne
Sol-B	<i>Bacillus mucilaginosus</i>	Légumineuses	Solide	AgriLife	Inde
Bio Gold	<i>Azotobacter chroococcum</i> et <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cultures horticoles et agricoles	Liquide et solide	Bio Power Lanka	Sri Lanka
Serenade ASO	<i>Bacillus subtilis</i>	Cultures maraîchères et fruitières	Liquide	Bayer CropScience	Allemagne
Phylazonit M	<i>Azotobacter chroococcum</i> et <i>Bacillus megaterium</i>	Soja, canola, maïs, tournesol et céréales	Liquide	Phylazonit	Hongrie
CataPult	<i>Glomus intraradices</i> et <i>Bacillus</i> spp.	Céréales d'hiver	Liquide	Bio-Tech Organics	Australie
NoduMax	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Soja	Liquide	UPL OpenAg	Nigeria
QuickRoots	<i>Trichoderma virens</i> et <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Maïs, soja, tournesol, canola, betterave à sucre et légumineuses	Liquide	Novozymes BioAg Ltd.	Danemark
LegumeFix	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> et <i>Rhizobium</i> sp.	Légumineuses et soja	Liquide	Legume Technology	Royaume-uni
Jumpstart	<i>Pseudomonas bilaiae</i>	Cultures multiples	Liquide	Univar Solutions Ltd.	Canada

<b>Produit</b>	<b>Composition</b>	<b>Cultures ciblées</b>	<b>Type de formulation</b>	<b>Entreprise de fabrication</b>	<b>Pays</b>
MycoApply	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i> , <i>Glomus etunicatum</i> et <i>Glomus aggregatum</i>	Cultures multiples	Liquide et formes granulaires	MAI Australia Pty Ltd	Australie
TagTeam Soybean	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> et <i>Pseudomonas bilaiae</i>	Soja	Liquide	Bayer CropScience Pty Ltd	Australie
Indigo biotransicWN 29FP	<i>Clonostachys tenuissimum</i>	Blé et autres céréales	Liquide	Indigo Ag, Inc.	USA

# **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Partie 1 : Dynamique de colonisation racinaire des rhizobactéries encapsulées dans de l'alginate : implications pour la croissance racinaire d'*Arabidopsis thaliana* et les performances du blé dur.**

Les défis agricoles actuels, exacerbés par l'urbanisation croissante, les changements climatiques et la pression démographique, exigent des solutions durables pour garantir la sécurité alimentaire mondiale (Ali et *al.*, 2023). L'intensification de l'utilisation d'engrais et de pesticides chimiques a permis d'augmenter la productivité agricole, mais au prix de graves conséquences écologiques et sanitaires (Intisar et *al.*, 2022). En réponse à ces problématiques, les approches biotechnologiques fondées sur les micro-organismes suscitent un intérêt croissant. Parmi elles, l'encapsulation des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) dans des biopolymères biodégradables comme l'alginate représente une stratégie prometteuse qui optimise leur viabilité, leur libération progressive dans la rhizosphère et leur efficacité en tant que bioinoculants (Maçik et *al.*, 2020).

En tant que PGPR, *Pantoea agglomerans* et *Bacillus thuringiensis* se distinguent par leurs capacités à améliorer la croissance des plantes, et à exprimer plusieurs propriétés probiotiques végétales (Azizoglu, 2019 ; Lorenzi et *al.*, 2022). Malgré ces atouts, l'utilisation des bioinoculants encapsulés reste limitée par des contraintes liées à leur conservation et viabilité (Rai et *al.*, 2023). Cette partie explore le développement des capsules d'alginate renfermant ces deux bactéries, optimisant leur viabilité, leur activité PGP et leur libération progressive dans la rhizosphère. Leurs impacts sur la croissance du blé dur et leur colonisation d'*Arabidopsis thaliana* sont également évalués.

#### **1. 1. Souches bactériennes**

Les deux souches bactériennes utilisées dans cette étude sont *Pantoea agglomerans* (souche Pa) et *Bacillus thuringiensis* (souche B25). Les deux souches ont été sélectionnées à partir d'une étude précédente (Saadaoui et *al.*, 2022). La souche Pa a été isolée de la rhizosphère de champs de blé dur dans la région de Bou-Saâda, en Algérie, tandis que la souche B25 a été isolée de la rhizosphère de blé dur dans le nord de la région de Sétif, en Algérie. Les deux souches ont été précédemment testées pour leurs activités de promotion de la croissance des plantes et pour l'absence d'antagonisme entre elles (Saadaoui et *al.*, 2022).

### 1.2. Croissance bactérienne sous stress hydrique

Le milieu liquide Luria Bertani (LB) (Annexe 1) a été préparé en ajoutant du polyéthylène glycol (PEG<sub>6000</sub>) à différentes concentrations (00, 10, 20, 30, 40 et 50 %), et inoculé avec 1 % de pré-cultures des deux souches bactériennes. Après une incubation de 48 heures à 30 °C sous agitation (200 tpm), la croissance a été évaluée en mesurant la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La relation directe entre le potentiel hydrique et son effet inhibiteur de croissance a été déduite.

### 1.3. Effet des osmoprotecteurs sur la survie bactérienne

Afin de tester l'effet des osmoprotecteurs sur la croissance et la survie des deux souches testées, le milieu LB avec 50% de PEG<sub>6000</sub> a été supplémenté avec différents osmoprotecteurs (glycine betaine, choline, glutamate, mannitol et proline). Les osmoprotecteurs sont ajoutés au milieu à une concentration finale de 5mM. Les milieux inoculés avec 1% de pré-culture ont été incubés sous agitation (200 tpm) à 30°C pendant 48 h. La croissance a été mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### 1.4. Microorganismes et conditions de culture

Les bactéries, initialement conservées dans 15 % de glycérol à -20 °C, ont été cultivées dans 500 ml de milieu LB stérile, ajusté à un pH de 7. Les cultures ont été incubées à 30 °C sous agitation (200 tr/min) pendant 48 heures, puis les cellules ont été récoltées par centrifugation à 3000 tr/min pendant 30 minutes. Les culots de chaque souche ont ensuite été resuspendus dans 10 ml de bouillon tryptone-sel. Pour la co-inoculation, un inoculum individuel de chaque souche a été préparé et centrifugé, et les deux culots ont été remis en suspension conjointement dans 10 ml de bouillon tryptone-sel. Les concentrations bactériennes dans la solution finale de tryptone-sel ont été estimées à  $8,15 \times 10^{10}$  ( $\pm 0,01 \times 10^{10}$ ) UFC/ml pour Pa et  $1,42 \times 10^9$  ( $\pm 0,32 \times 10^9$ ) UFC/ml pour B25. Le mélange bactérien comprenait  $9,17 \times 10^7$  ( $\pm 0,01 \times 10^7$ ) UFC/ml de Pa et  $8,48 \times 10^8$  ( $\pm 0,33 \times 10^8$ ) UFC/ml de B25. La technique d'étalement par dilution sur boîtes de gélose de LB à 30 °C pendant 24 h a été utilisée pour l'estimation de la concentration bactérienne.

### 1.5. Bioencapsulation des cellules

La méthode d'extrusion (gélification ionique) a été utilisée comme technique de bioformulation suivant la méthode décrite par Wu et *al.* (2011). La solution matricielle a été préparée en mélangeant 1% d'acide alginique (A-7128 Sigma, Steinheim, Allemagne, 14,000 cP à 2% et 25°C) et 5 mM de proline dans de l'eau distillée. Ensuite, 10 ml des suspensions bactériennes

précédemment préparées ont été mélangées à 100 ml de solution matricielle stérile et agitées pendant 30 min pour obtenir une solution homogène. Le mélange est transféré dans une seringue stérile puis déposé sur une solution stérile de CaCl<sub>2</sub> (2%) sous agitation (150 tpm). Après 30 min de contact avec la solution de calcium, les billes gélifiées ont été récupérées, lavées 5 à 6 fois avec de l'eau distillée stérile et déposées sur du papier filtre dans une boîte de Pétri et séchées stérilement sous flux laminaire pendant 24 h à température ambiante. Les billes séchées ont été stockées à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure.

### 1.6. Efficacité d'encapsulation (EE)

Le nombre de bactéries non piégées restantes dans la solution de CaCl<sub>2</sub> après le développement des capsules a été évalué selon Panichikkal et *al.* (2021), par l'équation suivante :

$$EE = (N_0 - N_e)/N_0 \times 100$$

Où : N<sub>0</sub> est le nombre de bactéries dans la solution d'alginate et N<sub>e</sub> représente le nombre de bactéries présentes dans la solution de CaCl<sub>2</sub>.

Le dénombrement bactérien sur gélose nutritive (GN) à partir de différentes dilutions a été utilisé pour déterminer le nombre de bactéries dans les deux solutions. Toutes les boîtes de gélose nutritive étalées ont été incubées à 30 °C pendant 24 h.

### 1.7. Taux de survie

Le taux de survie des bactéries pendant le processus d'encapsulation a été déterminé selon Chi et *al.* (2020) en divisant le nombre de bactéries contenues dans les billes séchées (N) par le nombre de bactéries contenues dans les billes fraîches (N<sub>0</sub>) selon l'équation suivante :

$$(N/N_0) \times 100$$

### 1.8. Vérification de la viabilité cellulaire et des activités PGP pendant le stockage

1 g de billes séchées, stockées à 4 °C, a été prélevé tous les mois et dissous dans 10 ml de tampon phosphate 0,1M (pH 7,0) à 30 °C pendant 1 h dans un agitateur rotatif à 200 tr/min. Ces billes ont, ensuite, été broyées de manière stérile dans la même solution et les bactéries libérées ont été comptées à l'aide de la méthode conventionnelle de dénombrement sur gélose en boîtes. En bref, une série de dilutions de chaque bioformulation a été préparée dans une solution saline stérile à 0,85 %, puis 0,1 ml de chaque dilution a été étalé sur des boîtes de GN. Les unités formant des colonies (UFC/g) ont été calculées après incubation à 30 °C / 24 h.

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

Pour analyser la production d'acide indole acétique (AIA) par les bactéries piégées dans les capsules séchées, 100 µl de la matière broyée de chaque bioformulation ont été inoculés dans 10 ml de bouillon nutritif supplémenté de 0,2 % de L-tryptophane ; les tubes ont été incubés à 30°C pendant 4 jours. Après incubation, le surnageant a été recueilli par centrifugation à 12 000 tr/min pendant 10 min et 0,5 ml de surnageant a été mélangé à 1 ml de réactif de Salkowski (Annexe 2). Les tubes ont, ensuite, été conservés dans l'obscurité pendant 30 min. Le développement d'une couleur rouge a été observé comme une indication positive de la production d'AIA et l'absorbance a été lue à 530 nm. La quantité d'AIA (µg/ml) a été calculée selon une courbe d'étalonnage d'AIA pur déterminée précédemment (Kerbab et *al.*, 2021).

La production de sidérophores a été évaluée en utilisant le milieu Chrome Azurol S (CAS) selon Saidi et *al.* (2021). 10 ml de milieu King B (Annexe 3) restreint en fer ont été inoculés avec 100 µl de matière broyée de chaque bioformulation et incubés à 30°C pendant 4 jours. Après centrifugation des cultures à 12 000 tr/min pendant 10 min, 500 µl du réactif CAS (Annexe 4) ont été ajoutés aux 500 µl du surnageant. Le mélange a, ensuite, été incubé dans l'obscurité pendant 30 min. Le changement de couleur du bleu à l'orange indique la production de sidérophores et leur production a été lue à 630 nm. Le pourcentage d'unités sidérophores a été déterminé selon la formule :

$$\text{Décoloration (\%)} = [(Ar \times As) / Ar] 100$$

Où Ar est l'absorbance du contrôle et As est l'absorbance de l'échantillon.

L'estimation quantitative de la solubilisation du phosphate par les bactéries encapsulées a été déterminée sur un milieu liquide Pikovskaya (PVK) (Annexe 5), contenant du phosphate insoluble. 10 ml de PVK liquide ont été inoculés avec 100 µl d'homogénat bactérien broyé et incubés à 30°C /7 jours. Les cultures ont été récoltées par centrifugation à 12 000 tr/min pendant 10 min et le phosphore en culture a été estimé à l'aide de la méthode décrite par Slama et *al.* (2019). 500 µl de surnageant ont été mélangés avec 500 µl d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % (p/v) dans un tube à essai auquel 4 ml de réactif coloré ont été ajoutés (rapport 1:1:1:2 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M, molybdate d'ammonium à 2,5 % (p/v), acide ascorbique à 10 % (p/v) et eau distillée) et incubés à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance de la couleur bleue a été mesurée à 630 nm. La quantité de phosphate soluble a été détectée à partir de la courbe standard de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Toutes les expériences décrites ci-dessus ont été réalisées en triplicat.

### 1.9. Propriétés de gonflement

L'étude du gonflement des capsules a été réalisée selon Wu et *al.* (2011). 1 g de billes séchées a été immergé dans une solution de 10 ml de NaCl à 0,85 % pendant 10 jours. Les billes gonflées ont été retirées chaque jour et l'excès de solution a été éliminé en pressant doucement les billes entre deux morceaux de papier absorbant. Les billes gonflées ont, ensuite, été pesées à l'aide d'une balance électronique de précision. Le taux de gonflement a été estimé selon le ratio :

$$\text{Taux de gonflement} = W_s/W_d \times 100$$

Où :

$W_s$  est le poids des billes gonflées à l'instant  $t$  et  $W_d$  est le poids des billes sèches initiales à  $t_0$ . Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

### 1.10. Propriétés de libération

L'objectif de cette expérimentation est de tester l'efficacité des capsules pour stocker et libérer progressivement les bactéries dans un environnement donné.

La libération cumulative de cellules bactériennes viables libérées à partir des capsules bioformulées a été mesurée en immergeant 1 g de capsules du stock après 6 mois de stockage à 4°C, dans 10 ml de PBS (pH 7,2) (Annexe 6) et en les incubant pendant 60 jours à température ambiante. Les volumes ont été prélevés à différents intervalles et le nombre de cellules dans la solution collectée a été déterminé par la méthode de dénombrement sur la gélose nutritive en boîtes. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

### 1.11. Test d'*Arabidopsis thaliana*

#### 1.11.1. Conditions de croissance

Pour évaluer l'effet de la colonisation racinaire par des bactéries libres et encapsulées sur la croissance et le développement d'*Arabidopsis thaliana*, des graines de type sauvage Columbia Col-0, fournies par Lehle Seeds (États-Unis), ont été stérilisées en surface. La stérilisation a été réalisée en les immergeant successivement dans de l'éthanol à 70 % pendant 1 minute, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 5 minutes. Les graines ont ensuite été rincées six fois avec de l'eau distillée stérile.

Pour la germination sur milieu gélosé, les graines ont été semées à la surface d'un milieu  $\frac{1}{2}$  Murashige et Skoog (MS) (pH 5,7) (Annexe 7) dépourvu de saccharose et supplémenté avec de l'agar à 0,8 % (p/v). Toutes les boîtes ont été recouvertes et scellées avec du papier Parafilm et placées dans une chambre de germination maintenue à  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  avec une photopériode de 16 h de lumière/8 h d'obscurité. Quatre jours après la germination, 10

plantules ont été transférées dans la moitié d'une boîte de Petri contenant MS ( $\frac{1}{2}$ ). Pour les cultures libres, chaque bactérie a été inoculée individuellement avec une concentration cellulaire de  $1 \times 10^8$  ( $\pm 0,2 \times 10^8$ ) UFC/ml sur une moitié de la boîte de Petri. Dans l'autre moitié, 50 billes séchées ont été disposées pour chaque bioformulation encapsulée.

Chaque traitement comprenait 5 répétitions avec un total de 50 plantules. Les boîtes ont été incubées pendant 11 jours dans les mêmes conditions de germination. À la fin de cette période, la longueur des racines et la biomasse des racines et des feuilles ont été enregistrées.

La capacité des souches libres et encapsulées à s'attacher et à coloniser les racines des plantules a été estimée visuellement à l'aide de la procédure au chlorure de triphényltétrazolium (TTC) (Tsavkelova et al., 2004), tandis que le logiciel ImageJ a été utilisé pour analyser la surface foliaire.

Les boîtes ont été divisées en cinq groupes représentant les cinq traitements qui sont :

(1) plantules non inoculées (contrôle négatif), (2) plantules inoculées avec B25 libre (B25 L), (3) plantules inoculées avec B25 encapsulée (B25 E), (4) plantules inoculées avec Pa libre (Pa L), (5) plantules inoculées avec Pa encapsulée (Pa E).

### 1.11.2. Estimation des chlorophylles et des caroténoïdes

Les chlorophylles a, b, totales et les caroténoïdes ont été déterminés selon la méthode Kerbab et al. (2021). Une quantité de 0,5 g de feuilles de chaque échantillon a été coupée en petits segments (0,5 cm), homogénéisée dans 10 ml d'acétone à 80 % et conservée à  $-10$  °C pendant une nuit. L'extrait organique a été centrifugé à 14 000 tr/min pendant 5 min et l'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotomètre à 663 nm pour les chlorophylles a (chl<sub>a</sub>), à 645 nm pour les chlorophylles b (chl<sub>b</sub>) et à 470 nm pour déterminer les caroténoïdes.

$$\text{Chla} = (12,70 A_{663} - 2,69 A_{645})$$

$$\text{Chlb} = (22,90 A_{645} - 4,68 A_{663})$$

$$\text{Chla+b} = (20,21 A_{645} + 8,02 A_{663})$$

$$\text{Caroténoïdes} = ((1000 A_{470} - 1,9 \text{ Chla} - 63,14 \text{ Chlb})/214)$$

### 1.12. Effets de l'application de rhizobactéries libres et encapsulées sur la croissance du blé dur

#### 1.12.1. Désinfection et germination des graines

Les graines de blé de la variété Bousselam (*Triticum durum* L.c.v Bousselam) (Pedigree : Heider/Marli/Heider-Cro ICD-414-1BLCTR-4AP) ont été désinfectées en surface

avec de l'éthanol (70 % pendant 1 min), puis avec de l'hypochlorite de sodium (1 % pendant 30 min) et rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Les semences stérilisées ont été mises à germer sur du papier filtre dans des boîtes de Petri contenant 10 ml d'eau distillée stérile à 22°C/48 h dans l'obscurité.

### 1.12.2. Préparation de l'inoculum bactérien libre

Les deux souches ont été inoculées dans du bouillon LB sous agitation constante à 150 tr/min pendant 48 h à 30 °C. Les cultures ont été centrifugées à 3 000 tr/min pendant 30 min. Le culot de chaque souche a été suspendu dans une solution saline stérile à 0,85 % et ajusté à  $1 \times 10^8$  ( $\pm 0,2 \times 10^8$ ) UFC/ml.

### 1.12.3. Semis et croissance des graines

Des pots en plastique (9 cm de diamètre et 10 cm de hauteur), désinfectés avec une solution d'hypochlorite de sodium ont été remplis de 550 g de sable stérilisé à 180 °C / 1 h, pendant 3 jours alternés. Ces pots ont été arrosés avec 10 % (v/p) d'une solution de ½ Hoagland (Annexe 8) avant le semis.

Pour les échantillons inoculés avec des souches libres, des graines germées (radicule de 3 mm) ont été utilisées. Cinq graines ont été semées par pot, à une profondeur de 1 cm sous la surface du sol. Chaque pot a ensuite étéensemencé avec 1 ml de suspension d'une culture fraîche, préparée comme décrit précédemment.

Pour les échantillons encapsulés, 1 g de capsules a été prélevé après 6 mois de stockage à 4 °C. Ces capsules contenaient  $3,05 \times 10^7$  ( $\pm 0,15 \times 10^7$ ) UFC/g pour B25 et  $5,7 \times 10^6$  ( $\pm 0,04 \times 10^6$ ) UFC/g pour Pa. Elles ont été placées à 1 cm de profondeur, à proximité des graines semées.

Les pots ont été répartis en cinq groupes correspondant aux cinq traitements suivants : (1) graines non inoculées (contrôle négatif), (2) graines inoculées avec B25 libre (B25 L), (3) graines inoculées avec B25 encapsulé (B25 E), (4) graines inoculées avec Pa libre (Pa L), (5) graines inoculées avec Pa encapsulé (Pa E).

Les pots ont été conservés pendant 45 jours dans une chambre de culture à une température moyenne jour/nuit de 25°C et 16°C respectivement et une photopériode lumineuse de 16 h. L'humidité des pots a été contrôlée par un arrosage périodique avec des doses constantes d'eau stérile (Silini et *al.*, 2016).

Les plantes ont été récoltées après 45 jours, les racines ont été lavées à l'eau distillée et les pousses ont été séparées. Les paramètres morphologiques (longueurs des pousses et des racines, poids frais et sec) et les paramètres biochimiques (pigments chlorophylliens, sucres

totaux et protéines totales) ont été analysés. La survie bactérienne a été déterminée en analysant la capacité de colonisation rhizosphérique et racinaire des bactéries inoculées. Pendant le traitement, les plantes ont été retirées à deux moments différents (après 15 et 30 jours) avant la récolte finale pour l'analyse des paramètres morphologiques et des dénombrements bactériens rhizosphériques, épiphytes et endophytes.

### **1.12.4. Évaluation des paramètres morphologiques**

Les longueurs des pousses et des racines (cm) et le poids frais et sec des pousses et des racines (g) ont été mesurés. Les mesures morphologiques ont été effectuées en triplicat.

### **1.12.5. Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes**

Les teneurs en chlorophylle a, b, totale et en caroténoïdes ont été déterminées en triplicat, comme décrit précédemment.

### **1.12.6. Estimation des sucres totaux**

L'extraction des sucres totaux à partir de feuilles et de racines fraîches a été réalisée selon le protocole suivant : 3 ml d'éthanol (80 %) ont été ajoutés à 0,1 g de feuilles. Le mélange a été incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 48 h. Ensuite, le mélange a été chauffé à 80 °C dans un bain-marie pour évaporer l'éthanol, puis 20 ml d'eau distillée ont été ajoutés au mélange. Les sucres totaux ont été déterminés selon la méthode de Dubois et *al.* (1956). Le mélange réactionnel contenait 0,5 ml de l'échantillon, 0,5 ml d'une solution de phénol (5 %) et 2,5 ml d'acide sulfurique 12 M. L'intensité de la couleur proportionnelle à la concentration en sucre a été mesurée par spectrophotomètre à DO=490 nm. Les valeurs obtenues ont été traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie.

### **1.12.7. Estimation des protéines totales**

La teneur en protéines solubles a été estimée en broyant 0,25 g d'échantillons de tissus frais (pousses et racines) dans de l'azote liquide. La poudre obtenue a été solubilisée dans 5 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,0. Après centrifugation de l'homogénat à 12 000 tr/min et 4 °C pendant 15 min, la concentration de protéines solubles surnageantes a été déterminée par spectrophotométrie selon Lowry et *al.* (1951).

L'ensemble des paramètres biochimiques a été réalisés en triplicat.

### **1.12.8. Dénombrement des bactéries rhizosphériques**

1 g de sable rhizosphérique a été homogénéisé dans 10 ml d'eau physiologique stérile et agité pendant 10 min. Une quantité de 100 µl de l'échantillon et de chaque dilution décimale allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  a été étalée en double sur gélose nutritive et incubée à 30 °C / 48h. Le nombre de bactéries a été exprimé en UFC/g de sol.

### **1.12.9. Dénombrement des bactéries épiphytes des racines**

1 g de racines de chaque traitement a été lavé 3 fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer tout le sable attaché, puis les racines ont été transférées dans 10 ml d'eau physiologique stérile et agitées pendant 15 min. Des dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  ont été préparées et le nombre d'épiphytes attachés aux racines a été déterminé en étalant 100 µl de chaque dilution sur un milieu nutritif gélosé. L'incubation a été réalisée à 30°C / 48 h et le nombre de bactéries a été exprimé en UFC/g de racines.

### **1.12.10. Dénombrement des bactéries endophytes des racines**

La surface des racines a d'abord été désinfectée en immergeant les racines dans de l'éthanol à 70 % pendant 1 min, puis dans de l'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 20 min et rincée plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Pour vérifier l'efficacité de la désinfection des racines, l'eau de lavage finale a été étalée sur de la gélose nutritive et les boîtes ont été incubées à 30 °C / 48 h. Une quantité de 1 g de racines désinfectées a été broyée et homogénéisée dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Des dilutions en série de 100 µl jusqu'à  $10^{-6}$  des échantillons ont été étalées à la surface du milieu GN et incubées à 30 °C / 48 heures. Le nombre de bactéries a été exprimé en UFC/g de racines.

### **1.13. Analyse statistique**

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) et lorsque des effets significatifs ont été détectés, les groupes ont été comparés à l'aide d'un test HSD de Tukey post hoc. Le niveau de signification utilisé pour tous les tests statistiques était de 5 % ( $p < 0,05$ ). Les programmes statistiques utilisés dans l'analyse étaient Graphpad Prism 9.4.0 et OriginPro 2022.

### **Partie 2 : Amélioration de la croissance du blé dur et de la survie bactérienne grâce aux biofertilisants encapsulés avec additifs naturels : effet de *Pantoea agglomerans* Pa et *Bacillus thuringiensis* B25.**

Les défis mondiaux, tels que les changements climatiques et la croissance démographique, exigent une agriculture durable capable de répondre aux besoins alimentaires croissants. Cependant, les pratiques agricoles intensives actuelles basées sur l'utilisation massive de fertilisants et pesticides chimiques, ont des impacts environnementaux et sanitaires alarmants (Toromade et *al.*, 2024). Dans ce contexte, les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) représentent une solution écologique et durable pour améliorer la productivité agricole (Alzate Zuluaga et *al.*, 2024). Bien qu'efficaces, les inoculants microbiens conventionnels se heurtent à des limites, notamment une viabilité réduite en conditions défavorables (Rai et *al.*, 2023).

L'encapsulation des PGPR dans les matrices protectrices, telles que l'alginate enrichi en additifs comme l'argile ou le talc, offre une approche innovante pour surmonter ces contraintes (Balla et *al.*, 2022). Ces matrices protègent les micro-organismes favorisant leur survie et leur efficacité sous stress environnementaux. Dans ce contexte, *Pantoea agglomerans* et *Bacillus thuringiensis* émergent comme des candidats prometteurs pour la biofertilisation, en raison de leurs activités phytostimulantes et leur capacité à coloniser la rhizosphère des plantes (Lorenzi et *al.*, 2022 ; Gomis-Cebolla et Berry, 2023).

Cette partie met en évidence le développement de biofertilisants innovants en encapsulant *P. agglomerans* Pa et *B. thuringiensis* B25 dans des matrices d'alginate enrichies en additifs tels que l'argile et le talc. Ces formulations visent à améliorer la survie des bactéries, leur libération contrôlée et leur capacité à coloniser efficacement la rhizosphère et l'endosphère du blé dur.

#### **2.1. Analyses physico-chimiques des bioformulations**

Afin de caractériser la nature des interactions entre l'alginate et les additifs incorporés dans les matrices, des billes non chargées ont été préparées et soumises à diverses analyses physico-chimiques. Ces investigations avaient pour objectif de déterminer si les mélanges étaient de simples associations physiques ou s'ils conduisaient à la formation de nouveaux composés, susceptibles d'améliorer les propriétés fonctionnelles de la matrice.

### 2.1.1. Préparation des billes non inoculées

Les billes non inoculées ont été préparées par extrusion (gélification ionique) en mélangeant dans de l'eau distillée 3% d'acide alginique (A-2158 Sigma-Aldrich, États-Unis d'Amérique) avec divers additifs, les solutions matricielles sont obtenues avec des concentrations finales de 0,4% de perlite, 3% d'amidon, 5% de talc et 5% d'argile. Les billes témoins étaient exclusivement composées d'alginate.

Par la suite, le mélange est déplacé dans une seringue manuelle, puis déposé sur une solution de  $\text{CaCl}_2$  (2%) en agitant (150tr/min). Les billes gélifiées sont récupérées après 30 min de contact avec la solution de calcium, lavés avec de l'eau distillée et placées sur un papier filtre dans une boîte de Pétri, puis séchées sous flux pendant 24 h à température ambiante. Les échantillons étaient au nombre de 6 représentant les différents traitements qui sont :

3% Alginate

3% Alginate + 0.4% perlite (93763-70-3, VWR Chemicals, États-Unis d'Amérique)

3% Alginate + 3% amidon (S9765, Sigma-Aldrich, Allemagne)

3% Alginate + 0.4% perlite + 3% amidon

3% alginate + 5% talc (C8110, LAB Alley, États-Unis d'Amérique)

3% Alginate + 5% argile (MVF 300, Argile verte du Velay, France)

### 2.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Des films d'alginate et de différents lots des mélanges d'alginate et d'additifs ont été préparés selon une méthode rapportée par Rohman et *al.* (2021). Brièvement, la solution de mélange a été versée sur une surface plane et séchée au four à 45 °C pendant 10 h. Les films minces obtenus ont été appliqués directement sur la cellule ATR (Attenuated Total Reflection) du spectromètre (Shimadzu spectrometer). Les échantillons ont ensuite été scannés de 4 000 à 400  $\text{cm}^{-1}$  à une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.1.3. Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

Les billes séchées formées à partir d'alginate et de divers mélanges d'additifs ont été broyées et transformées en poudre et les échantillons obtenus ont été caractérisés à l'aide d'un diffractomètre à rayons X (Phillips Xpert-Pro) équipé d'un rayonnement  $\text{Cu K}\alpha$  à une tension de 40 kV, un courant de 50 mA et à température ambiante. Les diffractogrammes ont été enregistrés de 5° à 80° (2 $\theta$ ) à une vitesse angulaire de 1° (2 $\theta$ )  $\text{min}^{-1}$ . Les phases cristallines et les impuretés associées des polymères organiques ont été identifiées à l'aide de la DRX.

### 2.2. Analyse de la morphologie

L'analyse de la morphologie des billes a été réalisée en mesurant le facteur de sphéricité (FS) à l'aide du logiciel ImageJ selon la méthode décrite par Kaur et *al.* (2023). Un FS=0 indique une forme parfaitement sphérique et il est calculé comme suit :

$$FS = [(d_{max}-d_{min}) / (d_{max}+d_{min})]$$

Où : ( $d_{max}$ ) est le diamètre maximum et ( $d_{min}$ ) est le diamètre minimum.

En fonction des résultats obtenus par les analyses FTIR et DRX, ainsi que des résultats du calcul du facteur de sphéricité, l'argile et le talc ont été sélectionnés comme additifs pour les formulations utilisées dans les expériences subséquentes.

### 2.3. Souches bactériennes

*P. agglomerans* Pa et *B. thuringiensis* B25 ont été incluses dans cette étude. Pour préparer les pré-cultures, une colonie de chaque souche a été inoculée dans 5 ml de bouillon LB et incubée toute la nuit. Les suspensions bactériennes ( $10^8$  cellules /ml) obtenues ont, ensuite, été utilisées pour l'étape suivante.

### 2.4. Effet des additifs sur la croissance bactérienne

Afin d'évaluer l'effet des matrices sur la croissance bactérienne, les deux souches bactériennes ont été cultivées dans un milieu LB additionné de 3% d'alginate, de 3% d'alginate combiné avec 5% d'argile et de 3% d'alginate combiné avec 5% de talc. Des dénombrements cellulaires ont été réalisés après incubation des cultures à 30°C sous agitation à 150tr/min pendant 48h. Les cultures ont été diluées en effectuant des dilutions décimales (de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ). 100 µl de chacune des dilutions obtenues sont étalées sur des boîtes de GN et incubées à 30°C pendant 24h. Le milieu LB seul a été utilisé comme contrôle pour comparer les effets des différents additifs sur la croissance bactérienne.

### 2.5. Préparation des inoculums

Pour la préparation des inoculums, six boîtes de gélose de LB solide ont été étalées par 100 µl de pré-culture de chacune des souches et incubées à 30 °C / 16 h. Après incubation, la biomasse microbienne a été récupérée en raclant la surface de la gélose avec une anse en platine, puis en lavant soigneusement la surface avec de l'eau distillée stérile. Le contenu raclé ainsi que les eaux de lavage ont ensuite été mis en suspension dans 10 ml de solution tryptone-sel. Puis, 100 µl de la suspension bactérienne ainsi que de chaque dilution décimale, allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ , ont été étalés sur gélose GN et incubés à 30°C/24h.

Les densités bactériennes utilisées dans les matrices d'encapsulation, étaient les suivantes :

Nature de la matrice	Densités bactériennes (UFC/ml)	
	B25	Pa
Alginate	$3,93 \times 10^9 (\pm 0,09 \times 10^9)$	$1,17 \times 10^{10} (\pm 0,06 \times 10^{10})$
Alginate + argile	$2,9 \times 10^9 (\pm 0,37 \times 10^9)$	$1,28 \times 10^{10} (\pm 0,09 \times 10^{10})$
Alginate + talc	$3,93 \times 10^9 (\pm 0,01 \times 10^9)$	$5,34 \times 10^9 (\pm 0,04 \times 10^9)$

### 2.6. Bioencapsulation des cellules

La solution matricielle d'alginate a été préparée en mélangeant 3% d'alginate et 5mM de Proline dans de l'eau distillée. La composition de la matrice alginate-argile est donnée comme suit : 5% d'argile sont ajoutés à la solution de 3% d'alginate, tandis que 5% de talc sont ajoutés à la même solution d'alginate pour la matrice alginate-talc. Ensuite, 10 ml de la suspension bactérienne préalablement préparée sont mélangés avec 100 ml de chaque solution matricielle stérile et agitée pendant 30 min pour obtenir une solution homogène. La bioformulation cellulaire a été réalisée par la méthode d'extrusion comme décrit précédemment.

Les expériences suivantes ont été réalisées selon les protocoles détaillés dans la partie 1.

### 2.7. Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation a été évaluée en mesurant le nombre de bactéries non piégées, et calculée selon la formule décrite par Panichikkal et *al.* (2021).

### 2.8. Taux de survie

Le taux de survie a été calculé à partir du ratio des bactéries présentes dans les billes séchées par rapport à celles dans les billes fraîches, conformément à Chi et *al.*, (2020).

### 2.9. Vérification de la viabilité cellulaire et des activités PGP durant le stockage

La viabilité bactérienne a été vérifiée sur une période de 12 mois par dénombrement sur milieu GN, et les activités PGP (AIA, production de sidérophores et solubilisation du phosphate) ont été analysées comme décrit dans les références (Kerbab et *al.*, 2021 ; Saidi et *al.*, 2021 ; Slama et *al.*, 2021).

### 2.9. Propriétés de gonflement

Le gonflement des capsules a été étudié selon Wu et *al.* (2011) en mesurant le ratio de gonflement sur une période de 10 jours.

### 2.11. Cinétique de libération

Les cellules libérées à partir des capsules bioformulées ont été quantifiées à divers intervalles, conformément à la méthode décrite précédemment.

### 2.12. Effets des irradiations UV sur les cellules bactériennes immobilisées

Le rayonnement UVC (253.7 nm) a été utilisé pour exposer les cellules bactériennes immobilisées dans des billes séchées d'alginate, d'alginate-argile et d'alginate-talc dans des conditions stériles à température ambiante. L'expérience a été menée en posant 1g de billes sur une boîte de Pétri stérile de 9 cm de diamètre, et en utilisant une hotte à flux laminaire pour préserver la stérilité pendant l'irradiation. Pendant une durée de 4 h, une lampe SANKYO DENKI, modèle GL20, a été utilisée pour émettre du rayonnement UVC à un débit de flux UV de  $76.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{1m}$ . Quatre fois (chaque une heure) des billes ont été retirées afin de réaliser des dénombrements bactériens selon la méthode traditionnelle de dénombrement sur GN (Zohar-Perez et *al.*, 2003).

### 2.13. Expérience en pots

#### 2.13.1. Désinfection et germination des graines

La désinfection et la germination des graines de blé de la variété Bousselam (*Triticum durum* L.c.v Bousselam) (Pedigree: Heider/Marli/Heider-Cro ICD-414-1BLCTR-4AP) ont été réalisées comme indiqué dans la partie 1. En bref, les graines ont été désinfectées en surface avec de l'éthanol (70%) et une solution d'hypochlorite de sodium (1%) avant d'être rincées à l'eau distillée stérile et germées à l'obscurité.

#### 2.13.2. Préparation de l'inoculum bactérien libre

Les deux souches B25 et Pa ont été inoculées dans un bouillon LB sous agitation constante à 150 tr/min pendant 48 h/30 °C. Les cultures ont été centrifugées à 3 000 tr/min pendant 30 min. Le culot de chaque souche a été suspendu dans 0.85% de solution saline stérile et ajusté à  $10^9$  UFC/ml. La souche commercialisée *Bacillus velezensis* FZB42 a été utilisée comme contrôle positif et inoculée à une densité de  $10^7$  UFC/ml.

### 2.13.3. Semis et mise en culture des graines

Des pots en plastique (10 cm de diamètre et 12 cm de hauteur), désinfectés avec une solution d'hypochlorite de sodium, ont été remplis de 750 g de sable stérilisé à 180 °C/1 h pendant 3 jours alternés. Les graines germées ont été semées et inoculées comme décrit précédemment.

Les pots ont été répartis en dix groupes représentant les dix traitements qui sont :

(1) graines non inoculées (Contrôle négatif), (2) graines inoculés avec *Bacillus velezensis* FZB42 (Contrôle positif), (3) graines inoculées avec B25 libre, (4) graines inoculées avec B25 encapsulée dans l'alginate, (5) graines inoculées avec B25 encapsulée dans l'alginate+argile, (6) graines inoculées avec B25 encapsulée dans l'alginate+talc, (7) graines inoculées avec Pa libre, (8) graines inoculées avec Pa encapsulée dans l'alginate, (9) graines inoculés avec Pa encapsulée dans l'alginate+argile et (10) graines inoculés avec Pa encapsulée dans l'alginate+talc.

Les pots ont été placés dans une chambre de culture à conditions contrôlées suivant le protocole décrit par Silini et *al.* (2016).

### 2.13.4. Évaluation des paramètres morphologiques

Les paramètres morphologiques des plantes récoltées (longueur, poids frais et sec des pousses et des racines) ont été mesurés selon la méthode décrite dans la partie 1.

### 2.13.5. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique dans les feuilles a été déterminée par estimation de la teneur en malondialdéhyde (MDA). En effet, 0,2 g de matière fraîche a été découpé en morceaux de 5 mm et macéré dans 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) (0,1 %) et centrifugé (10 000 tr/min pendant 5 min). Une quantité de 0,5 ml du surnageant a été ajoutée à 2 ml de TCA (20 %) contenant 0,5 % d'acide thiobarbiturique. Le mélange a été chauffé à 95°C/30 min puis rapidement refroidi dans un bain de glace. Le mélange a été centrifugé à 10 000 tr/min pendant 15 min et l'absorbance du surnageant a été mesurée à une DO de 532 nm. La DO a été corrigée pour éliminer la turbidité non spécifique en soustrayant la DO de 600 nm. La concentration de MDA a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction de 155 mM×1cm×1 (Kerbab et *al.*, 2021).

### **2.13.6. Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes**

Les pigments chlorophylliens ont été extraits et quantifiés en suivant la méthode décrite par Kerbab et *al.* (2021). Les calculs des concentrations ont été effectués à l'aide des formules standards.

### **2.13.7. Sucres totaux**

L'extraction des sucres totaux a été réalisée selon le protocole classique de Dubois et *al.* (1956). Les concentrations ont été déterminées par spectrophotomètre à une DO de 490 nm.

### **2.13.8. Protéines totales**

La quantification des protéines solubles totales a suivi la méthode de Lowry et *al.* (1951), comme décrit dans la partie 1, en utilisant des échantillons frais des racines et des pousses. Tous les paramètres biochimiques ont été effectués en triplicat.

### **2.13.9. Dénombrement des bactéries rhizosphériques et endophytiques racinaires**

Les méthodes de dénombrement des bactéries rhizosphériques et endophytes sont conformes à celle décrites dans la partie précédente.

### **2.14. Analyse statistique**

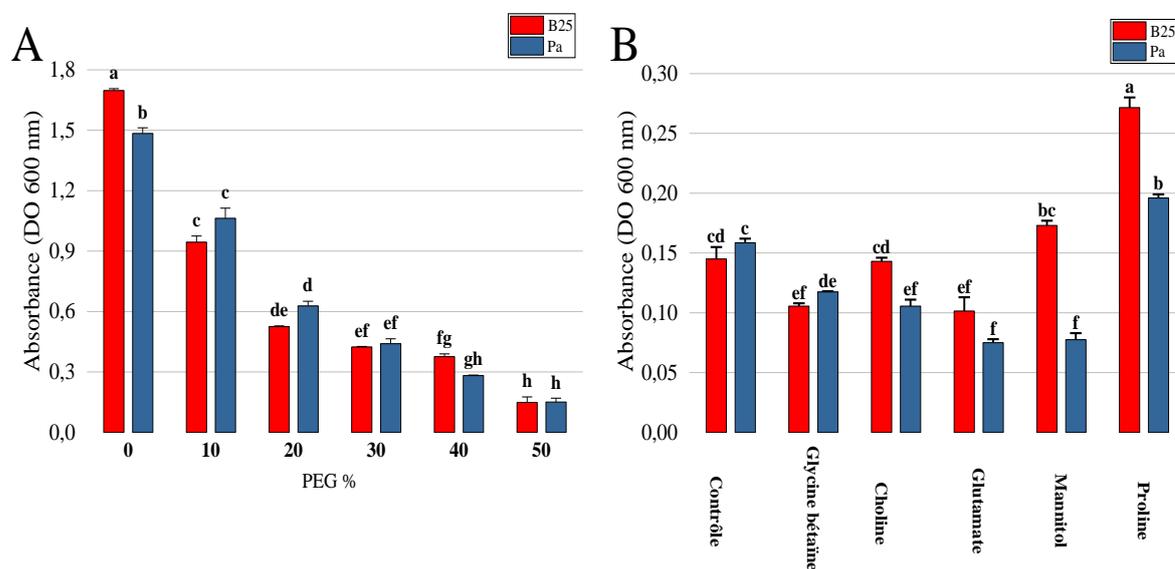
L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide des logiciels Graphpad Prism 9.4.0 et OriginPro2022. Les données ont été analysées par une ANOVA, suivie d'un test post-hoc de Tukey pour les comparaisons.

# **CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## Partie 1 : Dynamique de colonisation racinaire des rhizobactéries encapsulées dans de l'alginate : implications pour la croissance racinaire d'*Arabidopsis thaliana* et les performances du blé dur.

### 1.1. Réponse des souches bactériennes au stress hydrique et ajout d'osmoprotecteurs

Afin d'évaluer quel niveau de stress hydrique affectait la croissance bactérienne, les souches ont été cultivées dans un milieu LB liquide supplémenté de différentes concentrations de PEG<sub>6000</sub> (00 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % et 50 %). La présence de PEG a exercé un effet négatif significatif sur la croissance après 48 h d'incubation. Cet effet était proportionnel à l'augmentation des concentrations de PEG (Fig. 7A), la croissance des deux souches testées diminue de manière maximale à une concentration de 50 %. Par conséquent, cette concentration a été sélectionnée pour une étude d'application d'osmoprotecteurs. Les deux souches ont montré le même comportement en réponse au stress hydrique. L'application d'osmoprotecteurs n'a pas révélé d'amélioration significative de la croissance, sauf pour le mannitol avec B25 et la proline pour les deux souches (Fig. 7B). L'ajout de ces composés a permis d'obtenir, après 48 h, une densité cellulaire nettement plus élevée, avec des valeurs de DO de 0,27 et 0,19 pour B25 et Pa, respectivement, contre 0,145 et 0,158 pour les témoins.



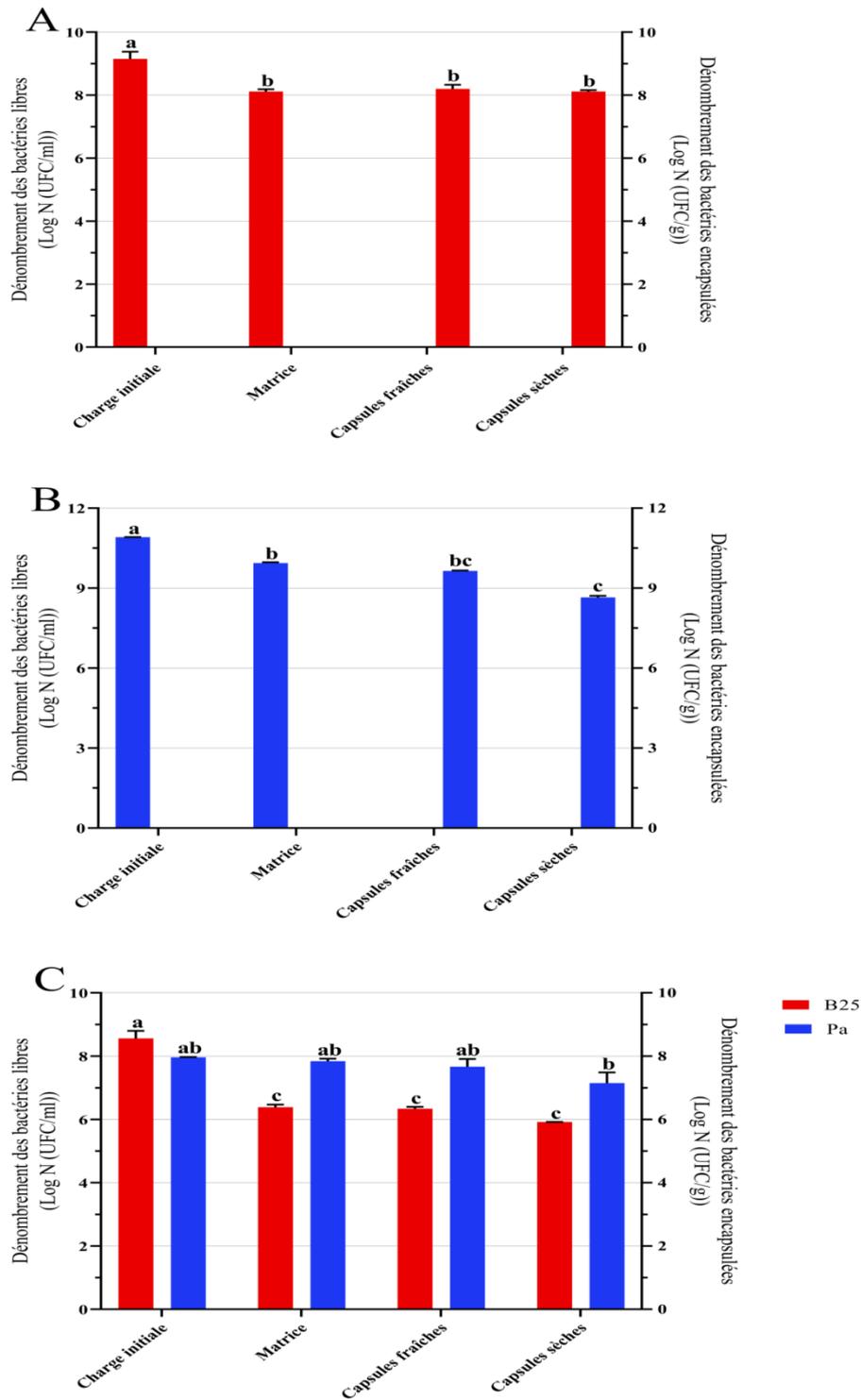
**Fig.7.** Effet des (A) différentes concentrations de PEG<sub>6000</sub> (%) et (B) différents osmoprotecteurs (mM) sur la croissance des souches B25 et Pa. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

## 1.2. Bioencapsulation

Les billes formées après gélification avaient une forme sphérique dont le diamètre variait entre 2,48 ( $\pm 0,18$ ) mm et 3,17 ( $\pm 0,18$ ) mm, tandis que le plus grand diamètre après séchage est attribué aux billes B25 (1,11  $\pm$  0,06 mm). Le nombre total de cellules viables a été calculé à chaque étape du processus d'encapsulation. La concentration cellulaire de départ de B25 était de  $1,42 \times 10^9$  ( $\pm 0,32 \times 10^9$ ) UFC/ml et celle de Pa était de  $8,15 \times 10^{10}$  ( $\pm 0,01 \times 10^{10}$ ) UFC/ml tandis qu'une concentration de  $3,66 \times 10^8$  ( $\pm 0,33 \times 10^8$ ) UFC/ml pour B25 et de  $9,18 \times 10^7$  ( $\pm 0,01 \times 10^7$ ) UFC/ml pour Pa a été ajoutée à la solution de matrice d'alginate pour leur mélange (Fig.8A-C). Après bioencapsulation, la viabilité cellulaire n'a pas été modifiée de manière significative pour B25 encapsulée seul ou en mélange, ce qui a entraîné un taux de survie de 98,60 % après séchage (Tab.4). Le nombre de bactéries dans les billes encapsulées séchées de Pa s'est avéré être de  $4,48 \times 10^8$  ( $\pm 0,09 \times 10^8$ ) UFC/g et de  $1,407 \times 10^7$  ( $\pm 0,34 \times 10^7$ ) UFC/g lorsqu'elles étaient encapsulées seules et en combinaison respectivement (Fig.8A-C). Ces résultats correspondent à l'excellente efficacité d'encapsulation (EE) où plus de 99 % des cellules ont été efficacement piégées dans les capsules de gel pour tous les traitements.

**Tab.4.** Caractéristiques des différentes billes d'alginate

Traitement	Poids frais (mg)	Poids sec (mg)	Diamètre des billes fraîches (mm)	Diamètre des billes sèches (mm)	Taux de survie (%)	Efficacité d'encapsulation (EE) (%)
B25	17,18 $\pm$ 1,17	0,24 $\pm$ 0,05	3,17 $\pm$ 0,18	1,11 $\pm$ 0,06	98,60	99,97
Pa	12,64 $\pm$ 0,68	0,55 $\pm$ 0,07	2,61 $\pm$ 0,1	1,06 $\pm$ 0,08	89,68	99,92
B25+Pa	17,84 $\pm$ 1,21	0,51 $\pm$ 0,06	2,48 $\pm$ 0,18	1,08 $\pm$ 0,04	93,23	99,92

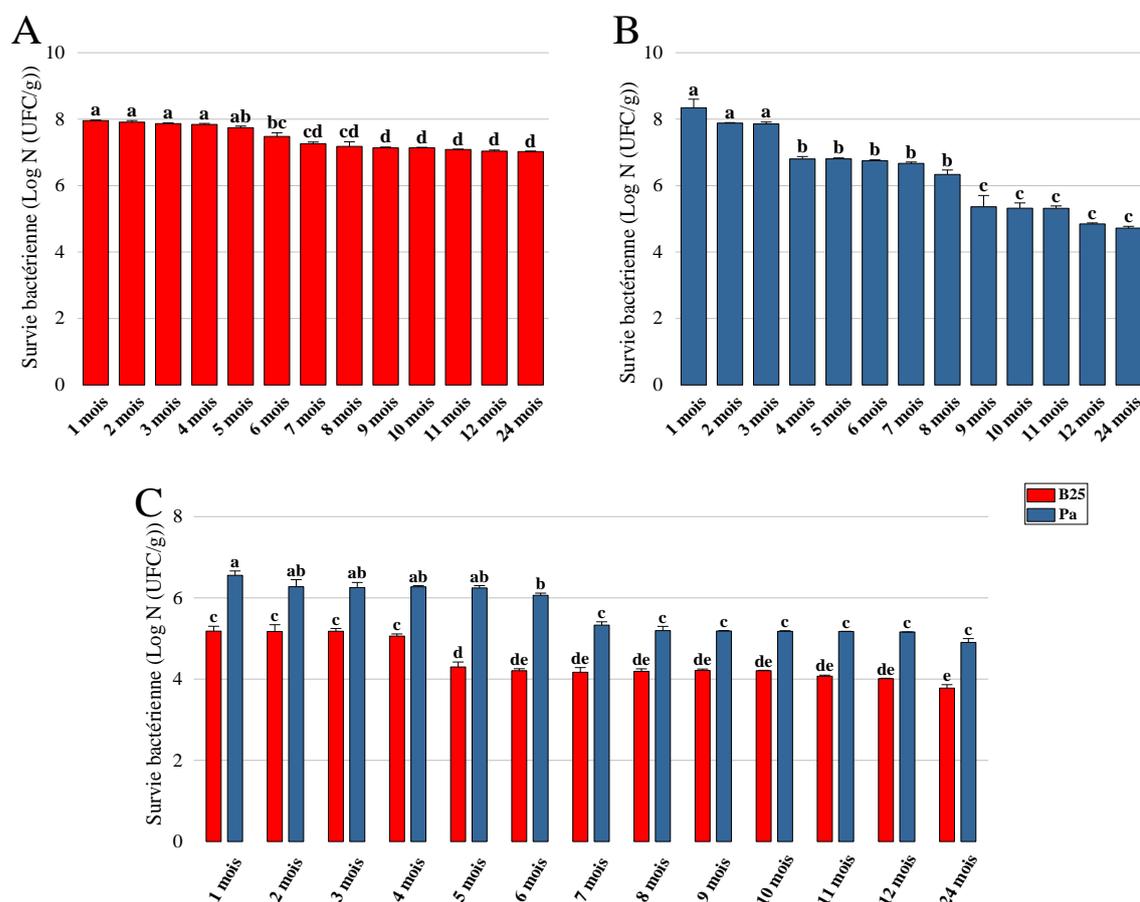


**Fig.8.** Survie de (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa à différentes étapes du processus de bioencapsulation. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. GraphPad Prism 9.4.0 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

### 1.3. Études du stockage des billes

#### 1.3.1. Survie des souches encapsulées

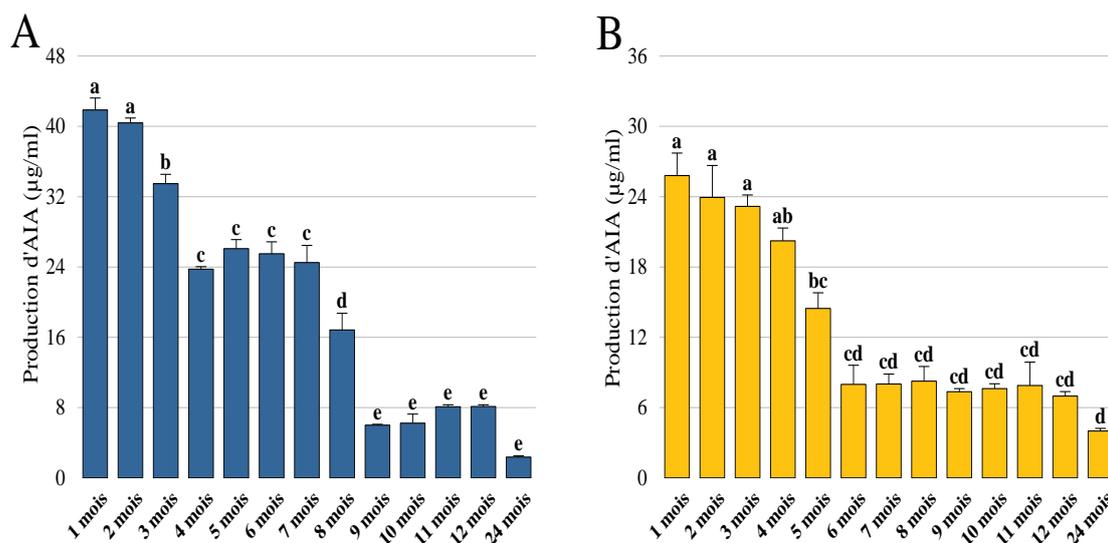
L'analyse de la survie a été réalisée tous les mois après stockage des billes séchées à 4°C pendant 24 mois. Le nombre de cellules viables dans les billes B25 est resté presque constant pendant 24 mois de stockage (Fig.9A). Les billes Pa ont montré un taux de survie plus faible : le nombre de cellules viables a atteint  $7 \times 10^4$  ( $\pm 0,04 \times 10^4$ ) UFC/g après 12 mois et  $5,3 \times 10^4$  ( $\pm 0,07 \times 10^4$ ) UFC/g après 24 mois de stockage (Fig.9B). Pour les billes de mélange bactérien, la charge bactérienne des deux souches a diminué d'un log pendant la première phase de stockage (de 1 mois à 6 mois) puis s'est stabilisée et a atteint  $5,9 \times 10^3$  ( $\pm 0,11 \times 10^3$ ) UFC/g pour B25 et  $8 \times 10^4$  ( $\pm 0,13 \times 10^4$ ) UFC/g pour Pa après 24 mois de stockage (Fig.9C). Le paramètre de survie peut être utile dans la sélection de bioformulations pour l'inoculation des cultures.



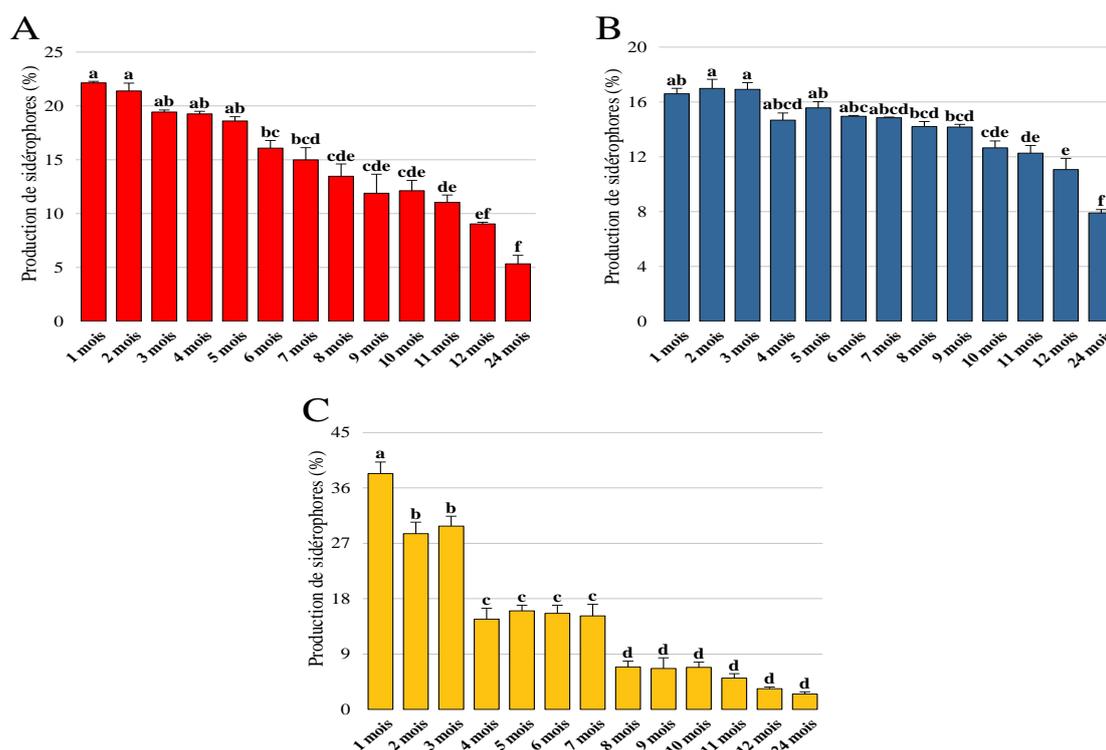
**Fig.9.** Survie de (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa pendant 24 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

### 1.3.2. Maintien des caractéristiques PGP par les souches encapsulées au fil du temps

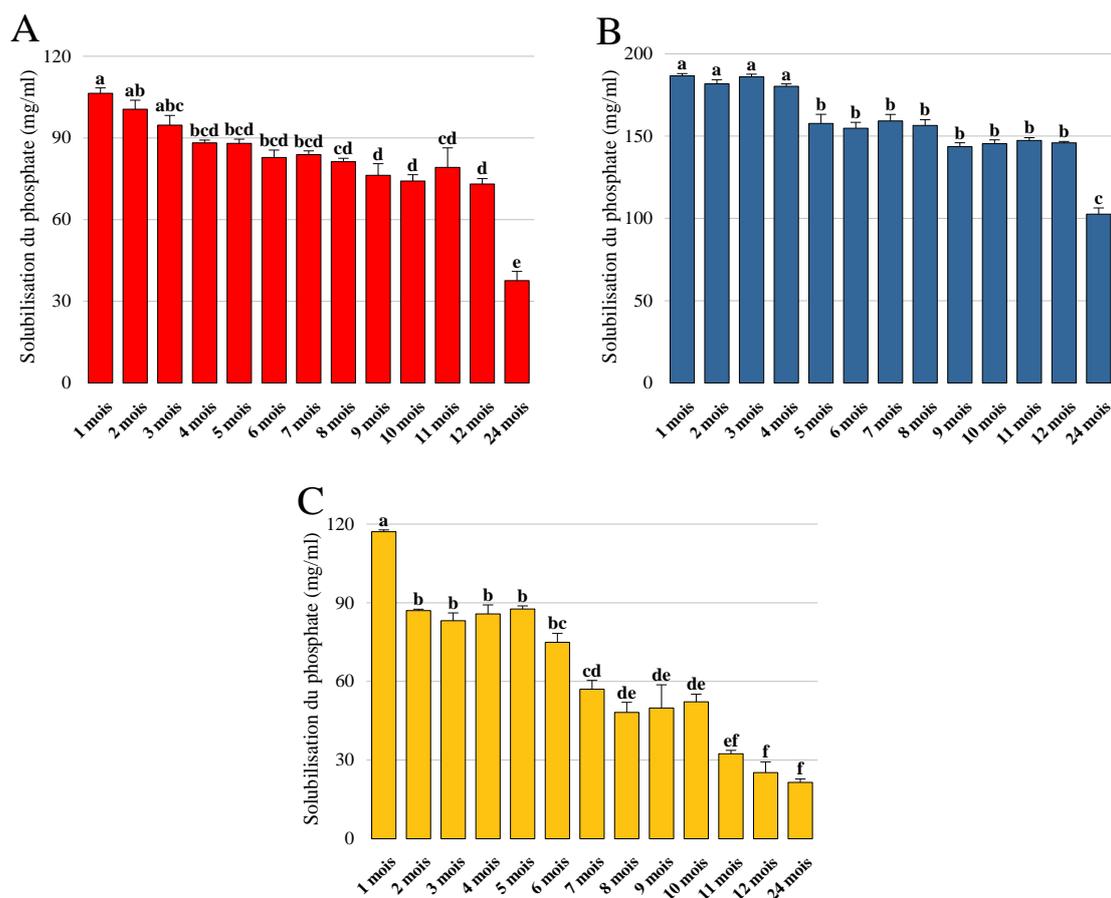
Afin de vérifier la conservation des propriétés favorisant la croissance des plantes pendant le stockage, les activités liées à la phytostimulation (production d'AIA) au biocontrôle (production de sidérophores) et à la biofertilisation (solubilisation du phosphate) ont été quantifiées chaque mois. Les résultats obtenus ont confirmé que Pa conservait sa capacité à produire de l'AIA dans son état encapsulé, où sa production s'est avérée stable pendant les 3 premiers mois et a atteint 18,88 µg/ml après 8 mois de stockage (Fig.10A). La production d'AIA par les billes de mélange bactérien a connu une baisse initiale significative après le premier mois et a atteint 25,8 µg/ml. Une deuxième baisse a été enregistrée après 6 mois lorsque la production était de 7,98 µg/ml. Après cette baisse, la production d'AIA par Pa est restée faible et constante jusqu'à 24 mois de stockage (Fig.10B). La production de sidérophores a été détectée dans toutes les bioformulations à des niveaux variables. Une activité stable et significative a été observée par les billes de Pa même après 12 mois de stockage (Fig.11B) ; tandis qu'une diminution progressive de la production a été enregistrée par B25 encapsulée qui a atteint 9,04 % après un an de stockage (Fig.11A). La production de sidérophores du mélange bactérien a atteint des niveaux d'activité de 15,6 %, 3,36 % et 2,49 % après 6 mois, 12 mois et 24 mois de stockage, respectivement (Fig.11C). La solubilisation du phosphate s'est avérée élevée dans le cas de la bioformulation de Pa suivie de B25 et de leur mélange. L'étude statistique a révélé que la solubilisation du phosphate est restée stable chez Pa qui a atteint 102,58 mg/ml après 24 mois (Fig.12B). Pour B25, la quantité de phosphate est restée constante du premier mois de stockage jusqu'à 12 mois où elle s'est avérée être de 73,09 mg/ml après 12 mois (Fig.12A). Une diminution notable du phosphate solubilisé au fil du temps par le mélange encapsulé a été enregistrée, où une quantité de 21,5 mg/ml a été détectée après 24 mois de stockage (Fig.12C).



**Fig.10.** Production d'AIA par (A) Pa et (B) B25+Pa pendant 24 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.



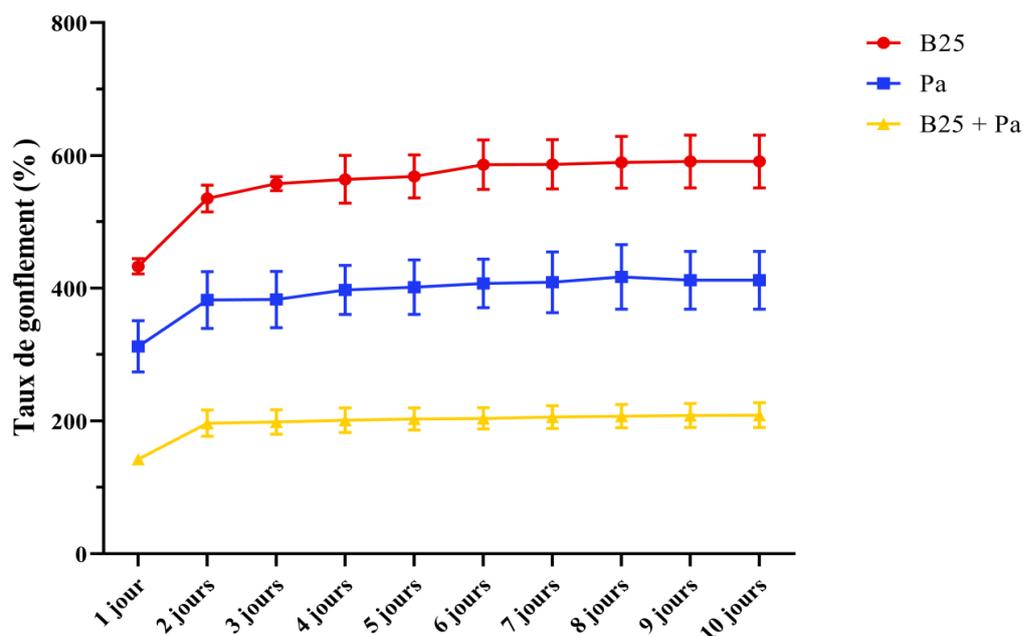
**Fig.11.** Production de sidérophores par (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa pendant 24 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.



**Fig.12.** Solubilisation du phosphate par (A) B25, (B) Pa et (C) B25+Pa pendant 24 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

#### 1.4. Étude du gonflement

Le taux de gonflement a été étudié à température ambiante pendant 10 jours. Les capsules de toutes les formulations ont gonflé rapidement le premier jour, une augmentation progressive mais négligeable a été notée du 2<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour de l'étude. L'équilibre de gonflement est atteint après le 9<sup>ème</sup> jour où des taux de 590,98 %, 412,06 % et 209 % ont été enregistrés pour les capsules B25, Pa et leur combinaison, respectivement (Fig.13).

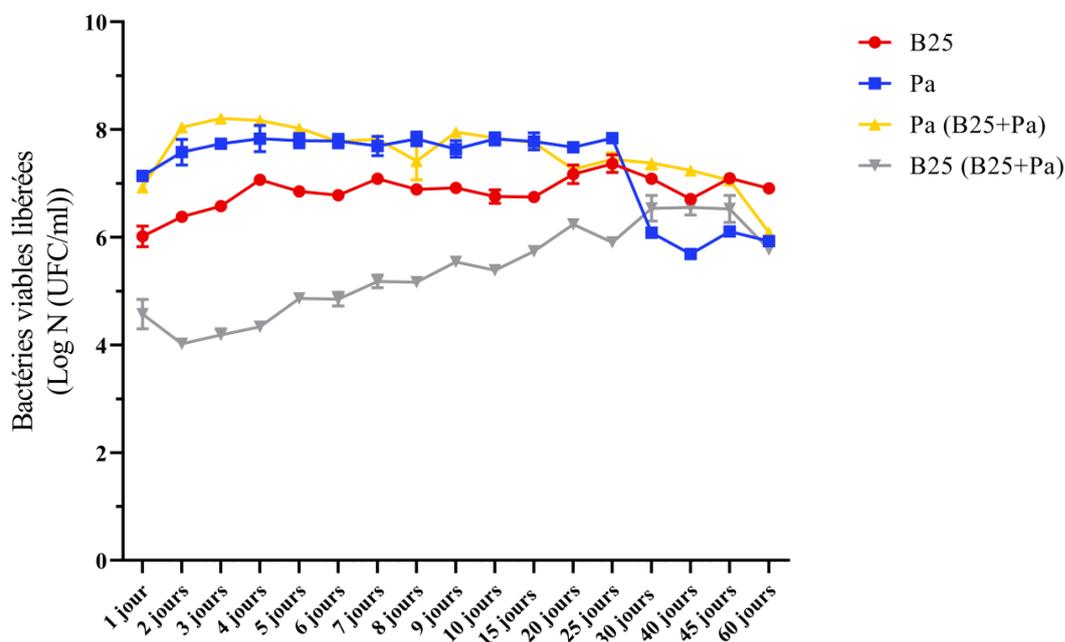


**Fig.13.** Taux de gonflement (%) des capsules sèches de B25, Pa et B25+Pa. GraphPad Prism 9.4.0 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une corrélation des moyennes de trois répétitions.

### 1.5. Cinétique de libération

Le nombre de bactéries cumulatives libérées par les capsules B25 sèches était significativement plus élevé le 7<sup>ème</sup> jour par rapport au 1<sup>er</sup> jour (Fig.14). Ce nombre a également augmenté après 25 jours et a atteint  $8,1 \times 10^6$  ( $\pm 0,11 \times 10^6$ ) UFC/ml le 60<sup>ème</sup> jour de l'expérience. La cinétique de libération du Pa a été divisée en deux phases, dont la première s'est déroulée entre le 1<sup>er</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour, et qui a été régulière et élevée où le nombre de bactéries viables libérées et accumulées a varié entre  $1,38 \times 10^7$  ( $\pm 0,1 \times 10^7$ ) UFC/ml et  $7 \times 10^7$  ( $\pm 0,06 \times 10^7$ ) UFC/ml, tandis que la deuxième phase a été courte et a connu une baisse rapide au 30<sup>ème</sup> jour, le taux de libération a donc diminué et a atteint  $8,5 \times 10^5$  ( $\pm 0,03 \times 10^5$ ) UFC/ml au 60<sup>ème</sup> jour. Concernant le mélange bactérien, le taux de libération du Pa était significativement plus élevé que celui de B25. Le nombre de cellules B25 vivantes libérées des capsules a augmenté régulièrement avec le temps et a atteint un équilibre de libération maximal de  $3,4 \times 10^6$  ( $\pm 0,33 \times 10^6$ ) UFC/ml après 30 jours (Fig.14). La libération de Pa a évolué en déclin progressif à partir du 5<sup>ème</sup> jour et a atteint un taux de libération minimal de  $1,2 \times 10^6$  ( $\pm 0,02 \times 10^6$ ) UFC/ml après 60 jours (Fig.14). Les deux souches libérées des billes de mélange bactérien ont été distinguées en observant leurs phénotypes distinctifs sur la gélose nutritive en boîtes, Pa forme des colonies jaunes, rondes et régulières, d'environ 3 mm de

diamètre et de texture lisse, tandis que B25 est caractérisée par des colonies plus grandes que celle de Pa, d'environ 8 à 12 mm de diamètre, de forme légèrement irrégulière, de couleur blanche et de texture poudreuse.



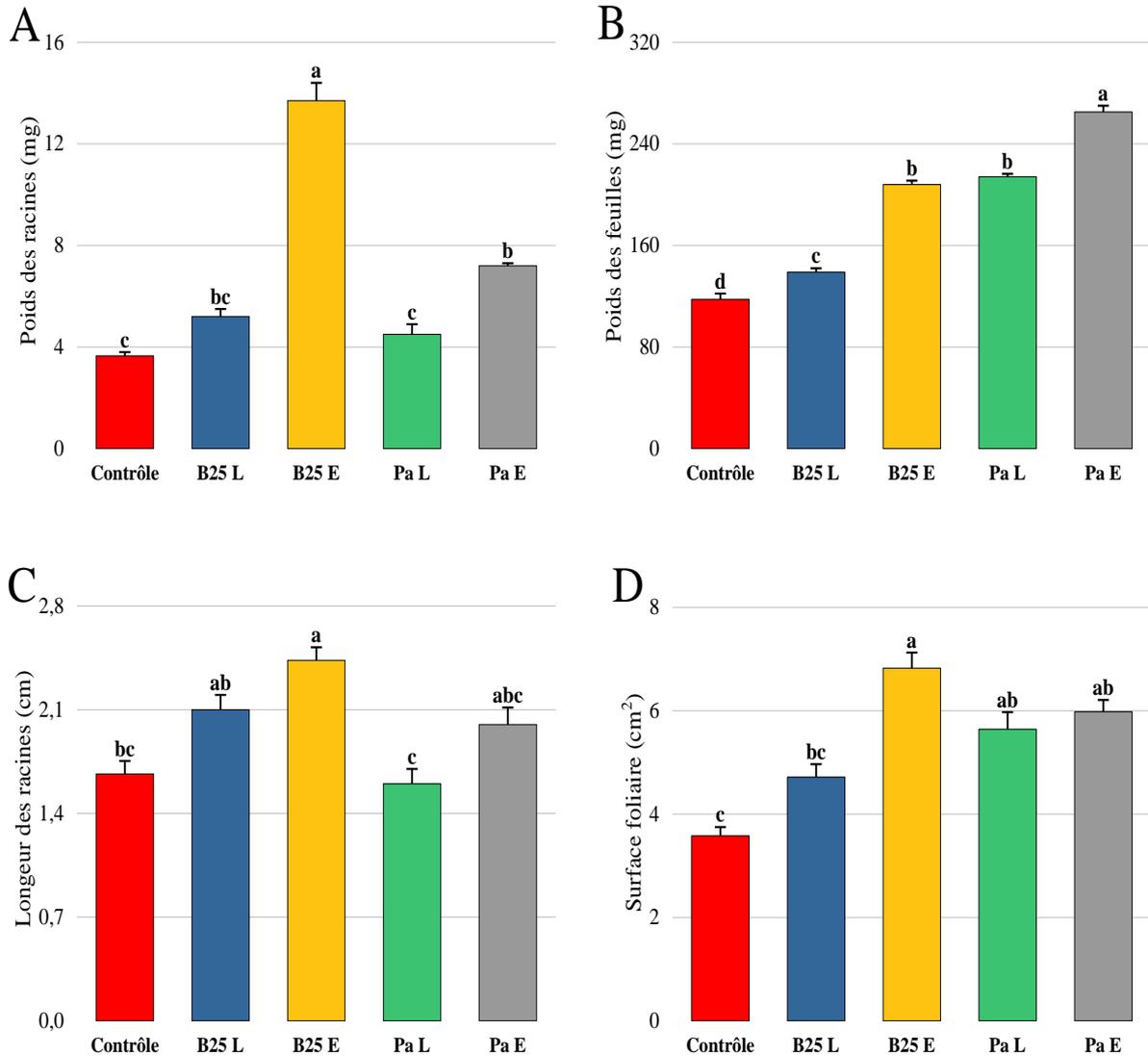
**Fig.14.** Cinétique de libération des bactéries à partir des capsules sèches de B25, Pa et B25+Pa. GraphPad Prism 9.4.0 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une corrélation des moyennes de trois répétitions.

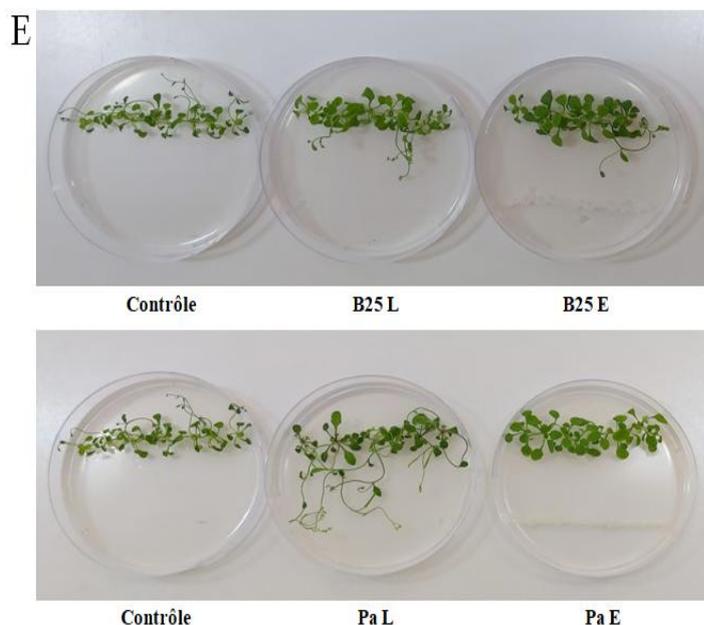
## 1.6. Test d'inoculation sur *Arabidopsis thaliana* : effets sur les paramètres morphologiques, la colonisation et les paramètres biochimiques

### 1.6.1. Paramètres morphologiques et analyse de la surface foliaire

Pour évaluer l'effet de l'inoculation des deux souches bactériennes testées sur la croissance des plantules d'*Arabidopsis thaliana*, des boîtes de Petri alimentées avec le milieu MS (½) ont été utilisées. Nos résultats montrent que les deux souches utilisées sous forme libre et encapsulée sont capables de stimuler la longueur du système racinaire et la production de la biomasse végétale (Fig.15A-C). Les billes de B25 ont été efficaces pour augmenter le poids frais des racines de 3 fois par rapport aux plantules non inoculées (Fig.15A). Une augmentation significative du poids des feuilles a été observée chez les plantules inoculées avec B25 et Pa encapsulées par rapport aux mêmes traitements inoculés librement (Fig.15B). L'analyse de la surface foliaire a révélé que ce paramètre augmentait significativement chez les plantules inoculées avec B25 et Pa par rapport aux plantules non inoculées (Fig.15D), indiquant que les plantes inoculées produisaient des feuilles de taille et de forme plus grandes

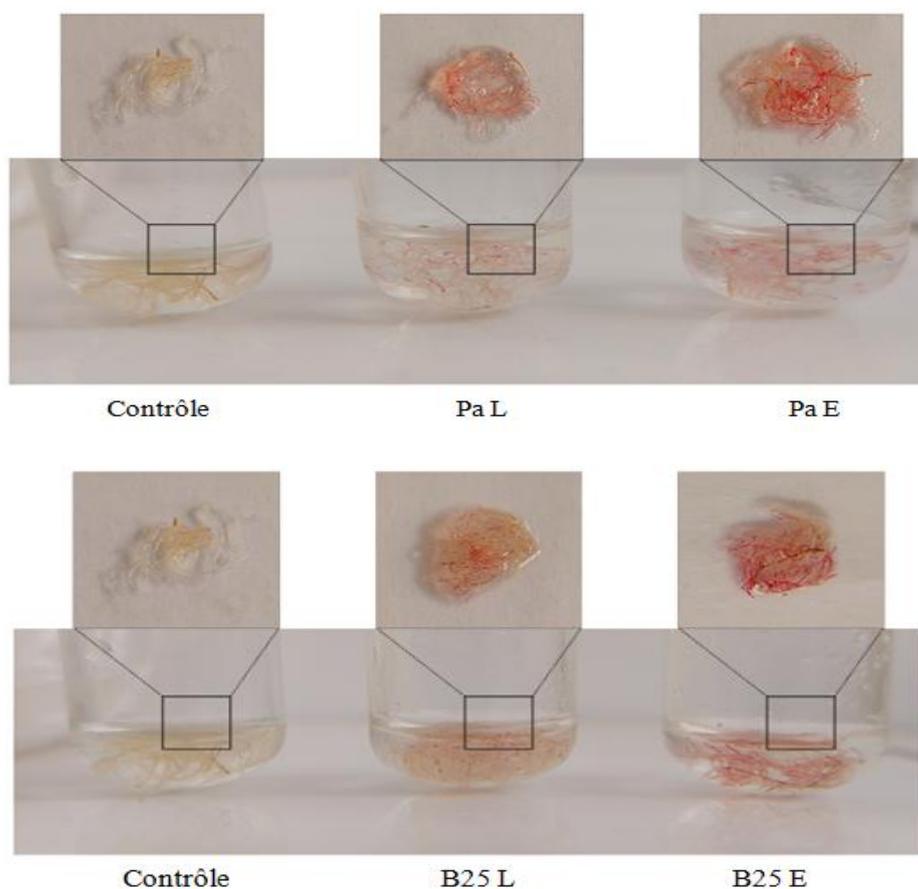
que les plantes témoins. Une augmentation plus prononcée a été notée chez les plantules inoculées avec B25 encapsulée, dont la surface foliaire correspondait à 91% de plus par rapport à celle des plantules témoins (Fig.15D). Ainsi, l'examen visuel à l'œil nu des boîtes de gélose MS a révélé une couleur verte plus intense des rosettes dans les traitements inoculés, comparativement au témoin non inoculé (Fig. 15E).





**Fig.15.** Effet de l'inoculation par les bactéries libres (L) et encapsulées (E) sur (A, B) le poids frais des racines et des pousses (g), (C) la longueur des racines (cm), (D) la surface foliaire et (E) la couleur des rosettes des plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées sur milieu MS ½. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

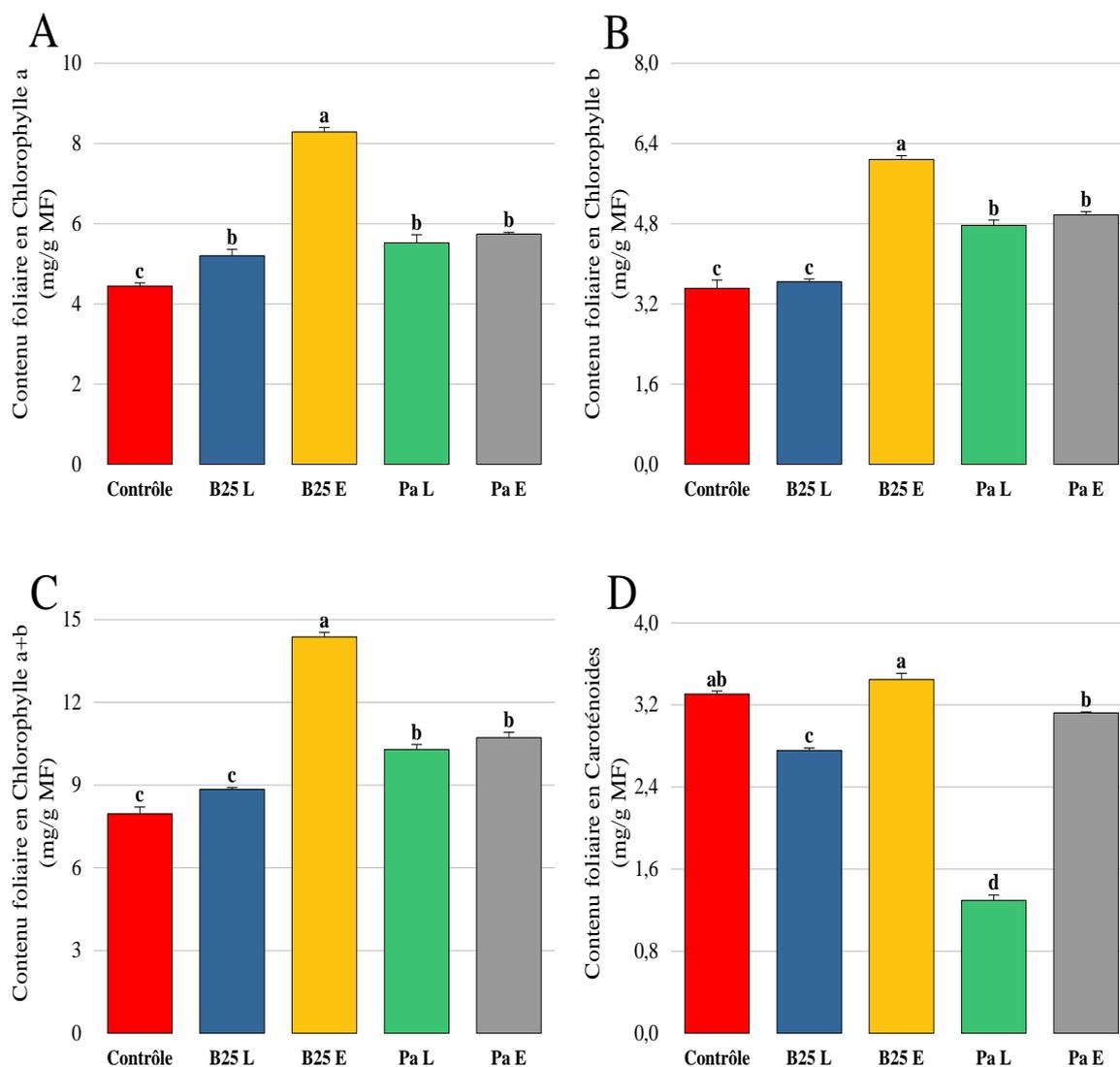
La révélation de la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par des rhizobactéries libres et encapsulées a été réalisée de manière aseptique à l'aide de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) et les racines ont été photographiées (Fig.16). Une colonisation racinaire qualitative des plantules inoculées a été notée avec une différence significative entre les racines des inoculums libres et encapsulés qui étaient plus colorées. Ceci suggère fortement que le niveau d'attraction entre les racines et les bactéries est plus élevé chez les souches encapsulées et que l'adhésion aux racines est plus forte.



**Fig.16.** Illustration de la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par des bactéries libres et encapsulées révélée par le chlorure de triphényltétrazolium (TTC).

### 1.6.2. Dosage des pigments chlorophylliens

L'application de billes de B25 et de Pa sur *Arabidopsis thaliana* a montré une augmentation significative de la teneur en pigments chlorophylliens. Les chlorophylles a, b et totales ont été significativement améliorées chez les plantes inoculées avec B25 et Pa encapsulées, tandis que le traitement avec des souches libres a eu un effet non significatif sur la teneur en caroténoïdes dont les niveaux étaient inférieurs aux niveaux témoins (Fig.17A-D).



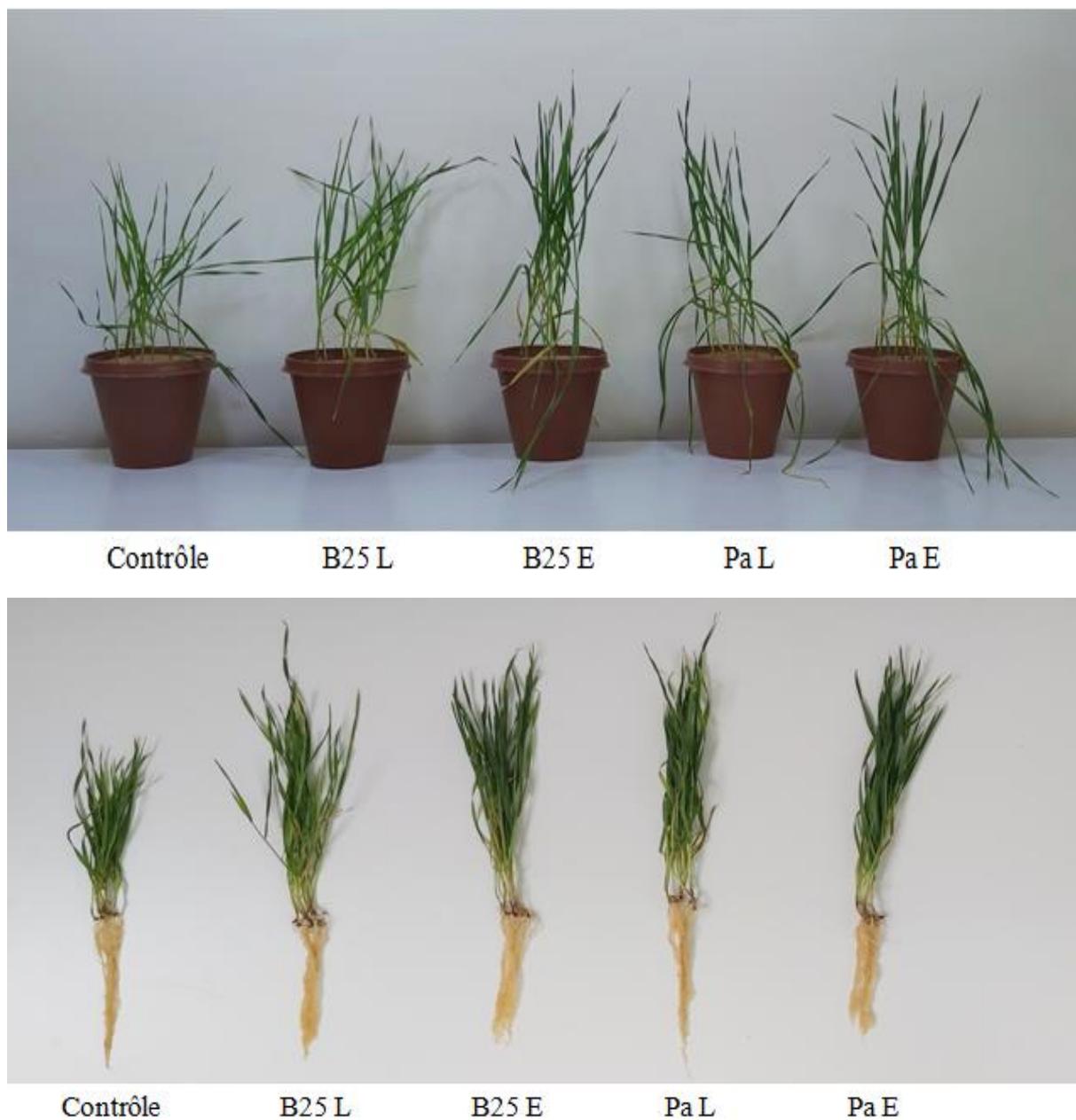
**Fig.17.** Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur la teneur en (A) chlorophylle a (mg/g MF), (B) chlorophylle b (mg/g MF), (C) chlorophylle a+b (mg/g MF) et (D) caroténoïdes (mg/g MF) des plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées sur milieu MS ½. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

## 1.7. Potentiel des souches bactériennes encapsulées sur la croissance du blé dur

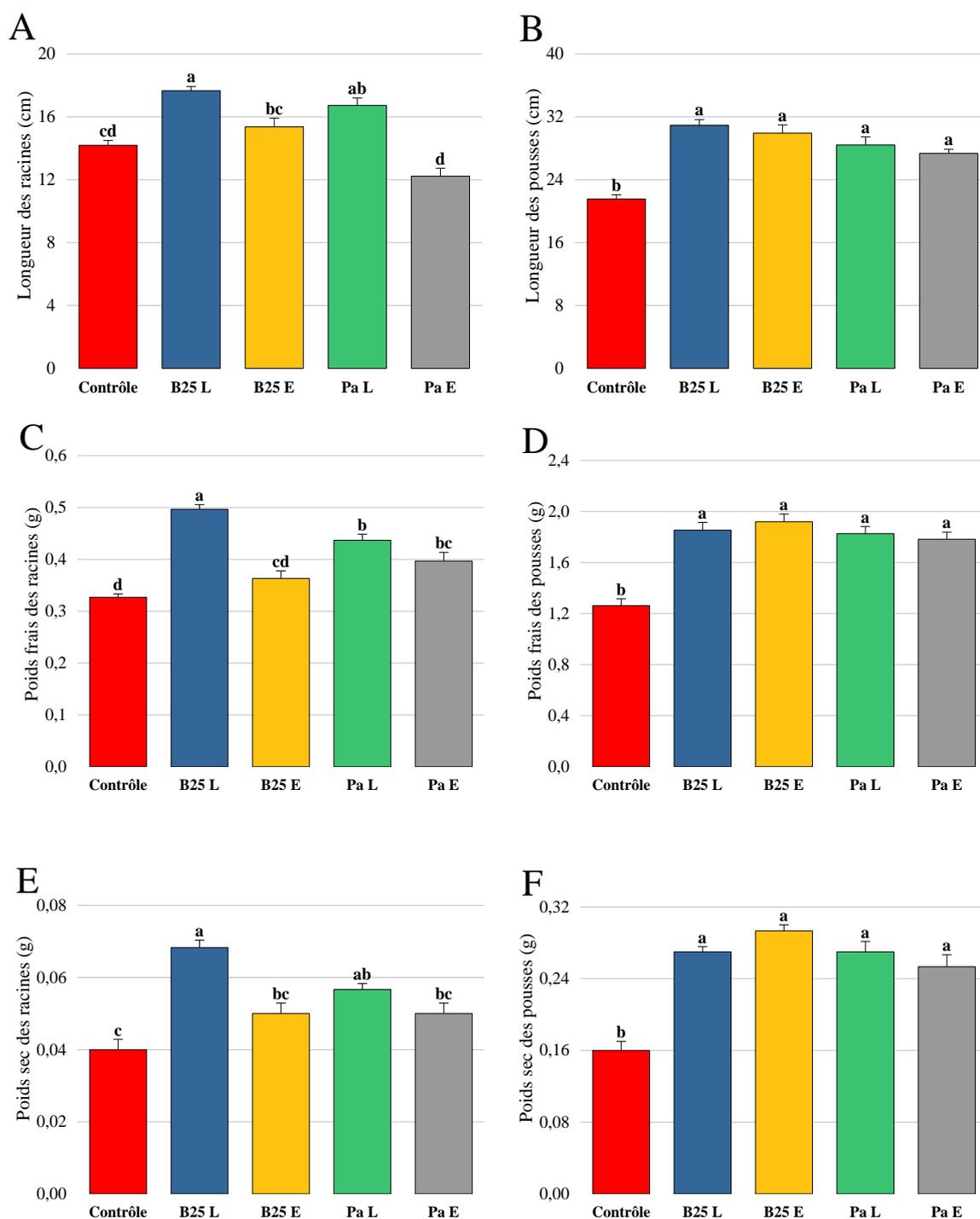
### 1.7.1. Paramètres morphologiques

L'évaluation de l'effet de l'application des souches bactériennes encapsulées sur les plantes de blé dur a été réalisée à l'aide des expériences en pots dans des conditions contrôlées (Fig.18). Les résultats concernant la hauteur de la plante, le poids frais et sec des racines et des pousses sont présentés sur la Figure 19. L'inoculation avec les souches encapsulées a

entraîné une augmentation significative de la hauteur des pousses, ainsi que du poids frais et sec, par rapport au contrôle négatif (Fig. 19B, D, F). En revanche, l'analyse des résultats relatifs à la biomasse et à l'élongation des racines a montré que cette inoculation n'avait aucun effet significatif (Fig. 19A, C, E).



**Fig.18.** Effet de l'inoculation de B25 et Pa libres et encapsulées sur la croissance du blé dur.

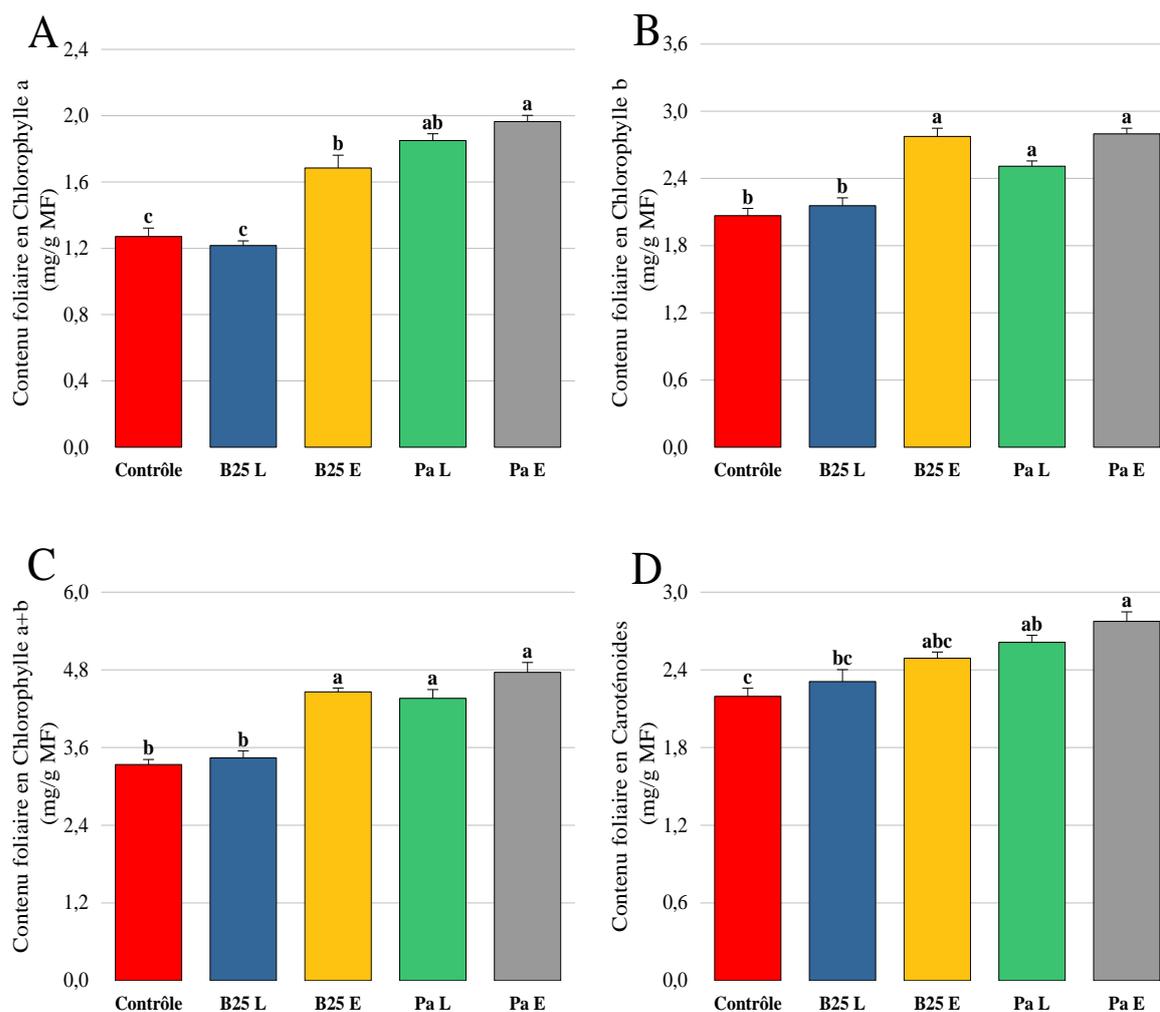


**Fig.19.** Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur (A, B) la longueur des racines et des pousses (cm), (C, D) le poids frais des racines et des pousses (g) et (E, F) le poids sec des racines et des pousses des plantes de blé dur. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

## 1.7.2. Paramètres biochimiques

### 1.7.2.1. Pigments chlorophylliens

L'inoculation bactérienne a amélioré de manière significative les niveaux de pigments chlorophylliens. Les niveaux de chlorophylle a, b, totale et de caroténoïdes étaient significativement plus faibles chez les plantes inoculées avec les souches libres que chez celles inoculées avec les souches encapsulées (Fig.20A-D). Cependant, le traitement avec B25 à l'état libre n'a eu aucun effet significatif par rapport au témoin négatif.

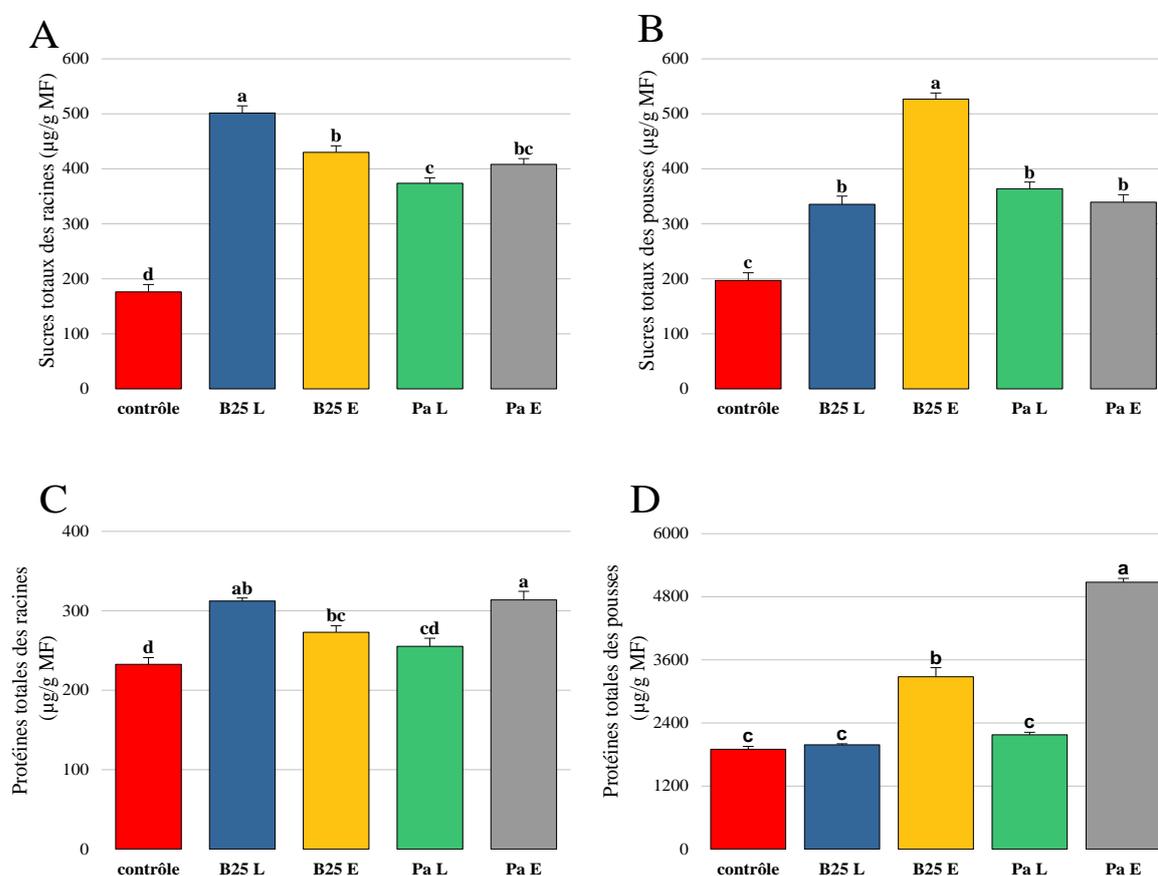


**Fig.20.** Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur la teneur en (A) chlorophylle a (mg/g MF), (B) chlorophylle b (mg/g MF), (C) chlorophylle a+b (mg/g MF) et (D) caroténoïdes (mg/g MF) des plantes de blé dur. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

### 1.7.2.2. Sucres totaux et protéines totales

La teneur en sucres solubles totaux des racines et des pousses a significativement augmenté après inoculation par rapport au témoin. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les racines des plantes inoculées avec des souches bactériennes libres et celles traitées avec des souches encapsulées. En revanche, la teneur en sucres des pousses était significativement plus élevée chez les plantes inoculées avec B25 encapsulée par rapport à tous les autres traitements (Fig. 21A, B).

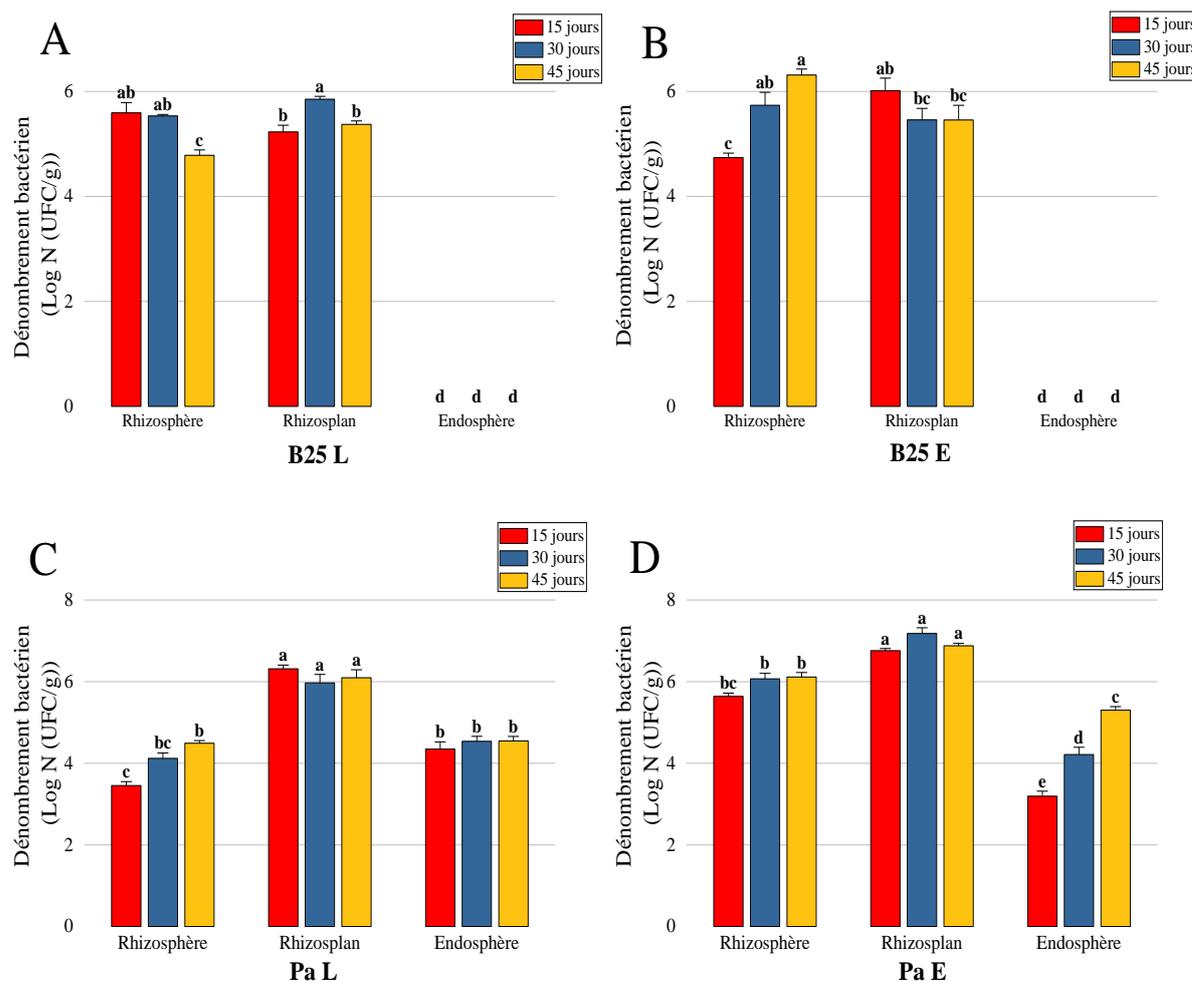
Concernant les protéines totales, nos résultats montrent que les souches encapsulées améliorent significativement la teneur en protéines des pousses par rapport aux souches libres. Toutefois, B25 libre et Pa encapsulée ont donné les meilleurs résultats en ce qui concerne la teneur en protéines totales des racines (Fig. 21C, D).



**Fig.21.** Effet de l'inoculation bactérienne libre et encapsulée sur (A, B) la teneur totale en sucres solubles des racines et des pousses ( $\mu\text{g/g MF}$ ) et (C, D) la teneur totale en protéines des racines et des pousses ( $\mu\text{g/g MF}$ ) des plantes de blé dur. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

### 1.7.3. Dénombrement des bactéries rhizosphériques, épiphytes et endophytes des racines

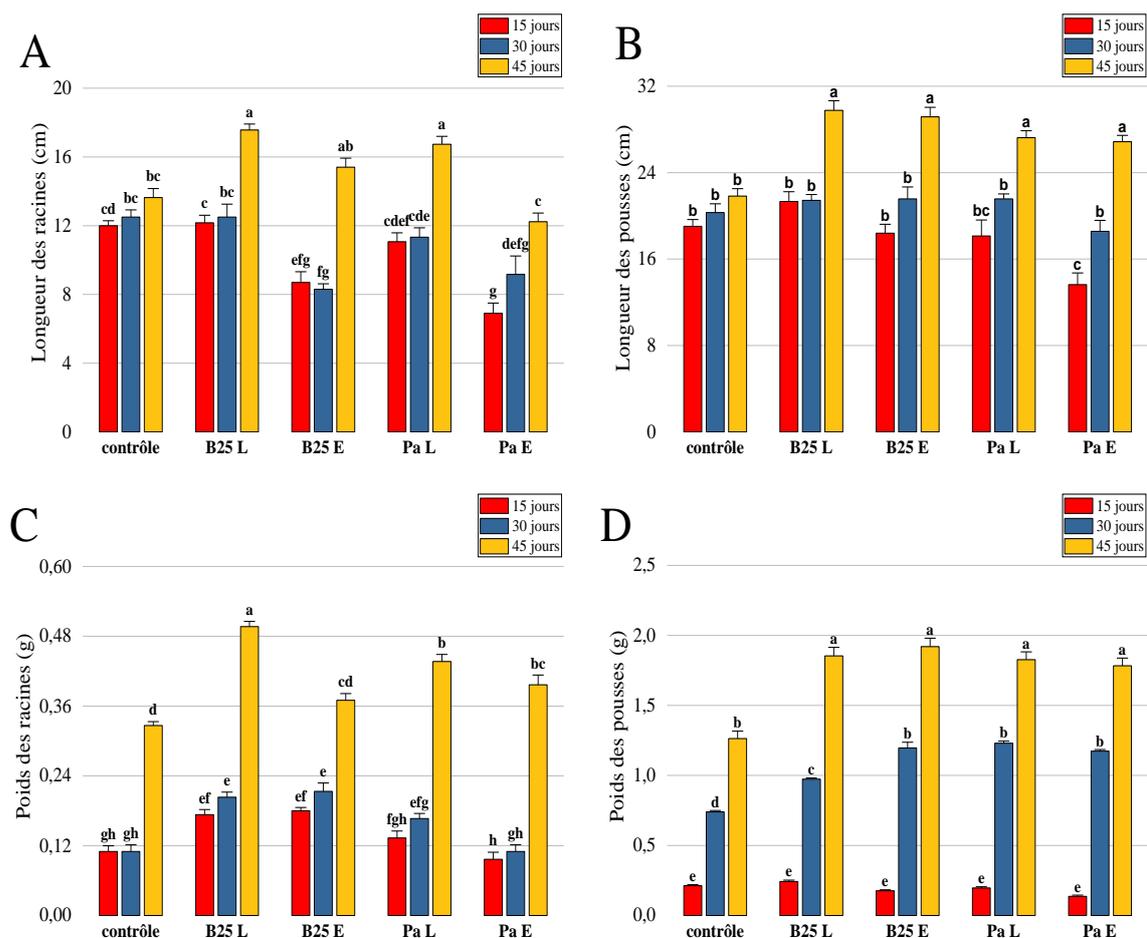
La densité bactérienne rhizosphérique, épiphyte et endophytique racinaires a été analysée après 15, 30 et 45 jours de traitement. Les résultats indiquent une diminution considérable de la charge en B25 dans la rhizosphère au fil du temps lorsqu'elle est inoculée librement, alors qu'elle augmente significativement après 45 jours et atteint  $2,06 \times 10^6$  ( $\pm 0,18 \times 10^6$ ) UFC/g dans le cas de B25 encapsulée (Fig.22A,B). En examinant les bactéries colonisant le rhizoplan, l'analyse a révélé qu'il n'y a pas de différence significative entre le traitement de B25 libre et encapsulée alors que dans les deux cas, les endophytes n'ont pas pu être ré-isolés (Fig.22A,B). La survie bactérienne de Pa dans la rhizosphère a été trouvée inférieure lors de l'inoculation sous forme libre par rapport à la forme encapsulée qui a atteint respectivement  $3,1 \times 10^4$  ( $\pm 0,14 \times 10^4$ ) UFC/g et  $1,3 \times 10^6$  ( $\pm 0,02 \times 10^6$ ) UFC/g (Fig.22C,D). Les densités bactériennes du rhizoplan de l'endosphère en Pa libre et encapsulée n'ont pas été modifiées en fonction du temps. (Fig.22C,D).



**Fig.22.** Dénombrements bactériens (Log N (UFC/g)) de la rhizosphère, du rhizoplan et de l'endosphère racinaire des plantes de blé inoculées avec (A) B25 libre, (B) B25 encapsulée, (C) Pa libre et (D) Pa encapsulée. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

#### 1.7.4. Évolution du poids et de la longueur des racines et des pousses

L'analyse de la longueur des pousses et des racines au fil du temps indique une différence non significative entre les traitements inoculés et le témoin après 15 et 30 jours (Fig.23). Les effets des traitements sont plus marqués après 45 jours, où les deux souches, qu'elles soient libres ou encapsulées, ont amélioré significativement le poids et la longueur des racines par rapport au témoin (Fig.23A,C). Le traitement B25 encapsulé (B25 E) a montré des effets plus prononcés sur la longueur des racines par rapport au même traitement de Pa. Pour les pousses, tous les traitements ont amélioré la longueur et le poids par rapport au témoin sans différence significative entre les souches libres et encapsulées (Fig.23B,D).



**Fig.23.** Effets de l'inoculation de B25 libre, de B25 encapsulée, de Pa libre et de Pa encapsulée sur la longueur (A) des racines et (B) des pousses, et le poids (C) des racines et (D) des pousses des plantes de blé après 15, 30 et 45 jours de traitement. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

### 1.8. Discussion

Pour développer un bioinoculant encapsulé, *B. thuringiensis* B25 et *P. agglomerans* Pa ont été incorporées dans une matrice d'alginate de sodium. Cette encapsulation assure une répartition efficace des bactéries dans la rhizosphère, favorisant ainsi la croissance et la santé des plantes tout en réduisant l'utilisation d'engrais chimiques. Le séchage, étape clé du processus de bioencapsulation, influence particulièrement la viabilité des bactéries non sporulées (Berninger et al., 2018). L'ajout d'osmoprotecteurs pourrait ainsi jouer un rôle déterminant dans l'amélioration de leur survie.

Différents osmoprotecteurs ont été testés en présence de 50 % de PEG<sub>6000</sub>, qui a été utilisé ici pour créer un stress de sécheresse artificiel similaire à l'étape de séchage du processus d'encapsulation, et la proline a considérablement amélioré la croissance des deux souches testées. La proline est connue comme un très bon osmolyte et un osmoprotecteur clé contre le stress hydrique (Daffonchio et *al.*, 2015), et il a été démontré qu'elle maintient efficacement l'intégrité cellulaire en interférant avec les enzymes et les protéines membranaires pendant la pénurie d'eau (Hayat et *al.*, 2012). De plus, la proline est une excellente molécule de signalisation de stress et un excellent antioxydant (Ashry et *al.*, 2022). Pour ces raisons, la proline a été ajoutée comme coformulant dans les billes destinées à la délivrance des deux souches objet de ce travail, la souche B25 de *B. thuringiensis* et la souche Pa de *P. agglomerans*.

L'introduction de la solution matricielle contenant de l'alginate de sodium, de la proline et les bactéries B25 ou Pa ou leur consortium dans une solution de CaCl<sub>2</sub> a abouti avec succès à la formation de capsules sphériques et insolubles, ce qui confirme que l'alginate constitue une matrice efficace pour piéger les cellules bactériennes et prouve que la gélation ionique est une méthode valide, sûre et réussie pour l'encapsulation des PGPR. Une efficacité d'encapsulation remarquable a été obtenue (plus de 99 %) pour tous les traitements, ces taux sont significativement plus élevés que ceux rapportés par Panichikkal et *al.* (2021), Wu et *al.* (2020) et Kaur et *al.* (2023) qui sont respectivement de 90 %, 93 % et 94,11 %. La combinaison de conditions d'encapsulation et des techniques de manipulation précises semble avoir été plus optimisée dans notre étude par rapport aux études mentionnées précédemment, et a donc contribué à obtenir une efficacité d'encapsulation plus élevée. La concentration optimale d'alginate peut assurer une formation de gel plus homogène, capable de retenir efficacement les cellules bactériennes. La méthode d'incorporation des bactéries dans l'alginate et les conditions de solidification telles que la vitesse d'agitation pendant la préparation des billes et la durée d'incubation en présence de CaCl<sub>2</sub> interviennent également dans l'optimisation du procédé et favorisent une meilleure réticulation du gel d'alginate réduisant ainsi les pertes cellulaires pendant l'encapsulation. L'analyse de la charge bactérienne dans les billes séchées a montré que des taux de survie considérables ont été obtenus après séchage et qu'ils étaient supérieurs à ceux de plusieurs études précédentes. Par exemple, Wu et *al.* (2012) ont obtenu des taux inférieurs à 89 % tandis que des taux variant entre 71,6 % et 72,4 % ont été obtenus par Chi et *al.* (2020). Cela indique que la déshydratation des billes n'a entraîné qu'une légère perte de cellules. Comme l'ont montré Berninger et *al.* (2018), la survie bactérienne pendant le séchage en présence

d'osmoprotecteurs est beaucoup plus élevée qu'en leur absence. Nous émettons l'hypothèse que la survie plus élevée rapportée par notre étude peut être attribuée à la présence de proline, qui réduit la perte cellulaire et maintient un équilibre hydrique pendant l'étape de séchage, en particulier pour la bactérie Gram-négative Pa.

Le choix du protocole de séchage est également critique pour la survie des non-sporulées compte tenu de la température et du temps de traitement. Des lésions délétères peuvent survenir allant de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à des dommages oxydatifs (García, 2011), selon la technique utilisée, sachant que la vitesse de traitement est proportionnelle à la température (Berninger et al., 2018). Nos résultats démontrent que malgré le temps considérable du séchage à l'air (12 heures en moyenne) ; il s'avère rentable en termes de rendement et de coût, d'autant plus qu'il ne nécessite aucun équipement particulier contrairement à d'autres techniques telles que le séchage par atomisation, le séchage en lit fluidisé ou le séchage sous vide. De plus, l'ajout de proline comme osmoprotecteur a ramené son effet protecteur en tant qu'antioxydant et inhibiteur de ROS (Hayat et al., 2012). Ces résultats corroborés par ceux de Berninger et al. (2018) qui ont rapporté que l'ajout de gomme arabique et d'extrait de levure comme osmoprotecteurs améliorait significativement la viabilité de *Paraburkholderia phytofirmans* lors du séchage.

Dans ce travail, la survie des cellules bactériennes dans des billes sèches pendant le stockage à 4°C a été suivie. Nos données ont montré que le nombre de cellules viables de B25 est resté constant à  $10^7$  ( $\pm 0,68 \times 10^7$ ) UFC/g, tandis que Pa a montré une baisse progressive de la survie cellulaire lors du stockage. D'autre part, le taux de survie était plus faible pour les deux souches lorsqu'elles étaient encapsulées ensemble plutôt que seules. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque la viabilité cellulaire après encapsulation diffère selon le micro-organisme (Schoebitz et al., 2012). La température de stockage est un autre facteur clé qui influence la survie pendant le stockage (Berninger et al., 2018). Il a été démontré que les basses températures préservent le métabolisme et l'énergie des bactéries formulées, comme en témoignent les résultats obtenus par Liffourrena et Lucchesi (2018), où aucune perte significative de viabilité des bactéries *Pseudomonas putida* n'a été observée après 150 jours de stockage à 4°C encapsulées dans une matrice d'alginate et de perlite. Ces résultats ne peuvent pas être généralisés car dans une autre étude, une survie de seulement 0,3 % des mêmes bactéries *P.putida* encapsulées dans 1,5 % d'alginate et stockées à 4°C pendant 90 jours a été constatée (Wu et al., 2020), alors qu'un taux de survie de 46 % a été observé dans une bioformulation de *Bacillus megaterium* obtenue par lyophilisation stockée à 4°C pendant 6 mois (Chi et al., 2020). D'autres facteurs interviennent dans l'influence de la stabilité

pendant le stockage comme l'exposition à la lumière, l'oxygénation et les conditions de conditionnement, et leur optimisation doit être prise en considération (Berninger et *al.*, 2018). Il est important de souligner que contrairement à notre étude, peu d'études ont rapporté le suivi de la viabilité sur de longues périodes même si cela est nécessaire pour la commercialisation des bioinoculants (Timmusk et *al.*, 2017). De même, des études antérieures ont rapporté l'encapsulation de cultures mixtes (Guo et *al.*, 2012 ; Anwar et *al.*, 2019), mais aucune étude sur la survie à long terme n'a été rapportée. Le développement de bioinoculants mixtes doit prendre en compte plusieurs aspects, à savoir l'absence d'antagonisme entre les souches sélectionnées, la similarité de l'adaptation physiologique, les concentrations cellulaires adéquates et la compatibilité avec le génotype de la plante hôte (Santos et *al.*, 2019). Notre étude a pour objectif de contribuer à combler cette lacune en développant des formulations de mélanges bactériens encapsulés et en étudiant leur survie à long terme.

Un autre point très important abordé dans cette étude concernant l'application des bioinoculants sur le terrain est l'importance de démontrer que les bactéries encapsulées peuvent maintenir leurs activités PGP pendant le stockage.

La capacité du Pa à produire de l'AIA a été décrite précédemment (Cherif-Silini et *al.*, 2019). Les cellules de Pa immobilisées dans des billes d'alginate conservent partiellement leurs capacités de production d'AIA ; ceci est en accord avec les observations d'Ozidal et *al.* (2017) et Panichikkal et *al.* (2021). Il n'existe aucun rapport dans la littérature sur le suivi de cette activité après stockage de souches de PGP encapsulées. Le déclin enregistré est probablement dû à des conditions de stockage stressantes ; l'effet du manque d'eau sur la synthèse d'AIA a déjà été discuté (Sandhya et *al.*, 2009). De plus, l'AIA est synthétisée par des voies très complexes et implique l'intervention de plusieurs enzymes inductibles, dont certaines peuvent être réprimées par les conditions environnementales (Duca et Glick, 2020).

La capacité à produire des sidérophores a été testée pour les deux souches bactériennes, B25 et Pa. Elles ont montré la capacité de produire des sidérophores pendant le stockage à des taux variables avec une diminution de la production pour B25. Cela pourrait probablement s'expliquer par l'effet inhibiteur du stress osmotique sur le gène de synthèse des bacillibactines (Höper et *al.*, 2006), qui sont les sidérophores prédominants dans les espèces de *Bacillus* (Dunyashev et *al.*, 2021).

*Bacillus* et *Pantoea*, les genres auxquels appartiennent nos souches, comprennent les bactéries les plus efficaces dans la solubilisation du phosphate (Yadav et *al.*, 2018). La différence de solubilisation du phosphate enregistrée entre B25 et Pa peut être attribuée à l'état physiologique et moléculaire des deux bactéries, et à la diversité et à l'efficacité des

mécanismes de solubilisation qui sont intrinsèquement liés aux espèces bactériennes (Pan et Cai, 2023). La capacité de Pa à maintenir une concentration bactérienne capable de produire des métabolites secondaires et à produire une gamme diversifiée et efficace d'acides organiques explique sa performance supérieure dans la solubilisation du phosphate par rapport à B25. Les espèces de *Pantoea* produisent une variété d'acides organiques, notamment les acides citrique, malique, succinique, acétique, oxalique et formique (Han et al., 2014 ; Wang et al., 2016). Ces acides, qui sont principalement tricarboxyliques et dicarboxyliques, sont généralement plus efficaces pour solubiliser les phosphates que les acides mono et aromatiques (Kalayu, 2019). En comparaison, une souche de *Bacillus* isolée du sol de la rhizosphère du blé produit principalement de l'acide glycolique, qui est moins efficace pour la solubilisation du phosphate que d'autres acides produits par les souches de *Pantoea* (Khourchi et al., 2022). De plus, *Pantoea* produit également une enzyme d'hydrolyse du phosphate, la phytase, ajoutant un autre mécanisme de solubilisation du phosphate qui n'est pas observé chez *Bacillus* (Suleimanova et al., 2015).

L'étude des propriétés de gonflement a révélé des taux variables allant de 209 % jusqu'à 591 %. Ces taux sont similaires à ceux obtenus par Tu et al. (2016) qui variaient entre 182 % et 454 % dans une formulation d'alginate et de bentonite. La cinétique de gonflement est médiée par la diffusion de l'eau à l'intérieur de la bille et provoque la libération de chaînes de réseau d'alginate (Wu et al., 2012). Nos observations indiquent que les capsules absorbent rapidement l'eau ce qui entraîne un gonflement rapide après le premier jour, les interactions des groupes -OH de l'alginate de sodium avec les molécules d'eau augmentent progressivement le taux de gonflement des billes en raison de la nature hydrophile de l'alginate jusqu'à saturation, ce qui entraîne un équilibre après le 9<sup>ème</sup> jour (Liu et al., 2013). Les taux de gonflement obtenus dans notre étude sont relativement plus élevés par rapport à ceux rapportés par He et al. (2015) et Pour et al. (2019). De plus, *P.agglomerans* et *B.thuringiensis* ont été étudiés pour leur capacité à produire des exopolysaccharides (EPS) dans des conditions de culture standard (Al-Qaysi et al., 2021 ; Wang et al., 2021). Ces EPS ayant des propriétés hydrophiles peuvent amplifier la capacité des billes à absorber et à retenir l'eau. Selon Donati et al. (2005), l'incorporation de substances hydrophiles dans une matrice d'alginate peut augmenter sa capacité de gonflement en raison de la rétention d'eau accrue par les EPS.

La cinétique de libération et la survie cumulée des souches encapsulées sur une période de 60 jours ont été réalisées à température ambiante. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Pour et al. (2019), la libération bactérienne est rapide les premiers jours

et augmente avec le temps, la diffusion rapide de l'eau à l'intérieur des billes entraîne une expansion et les bactéries diffusent dans le sens inverse de la dynamique de l'eau (He et *al.*, 2015). Ceci suggère que le gonflement contribue à cette libération en agissant sur la relaxation du réseau de la matrice d'alginate en augmentant la taille des pores par lesquels les bactéries passeront de l'intérieur de la bille vers le milieu extérieur. La libération ralentit puis se stabilise en raison de l'équilibre de gonflement et de la saturation des capsules en eau, ce qui entraîne une réduction des canaux au niveau de l'enveloppe d'alginate (Liew et *al.*, 2006). L'efficacité de l'encapsulation influence également la libération, selon Pour et *al.* (2019) et Wu et *al.* (2012), car une densité cellulaire élevée dans les billes entraîne la libération d'un nombre important de bactéries vivantes. La diminution du taux de libération peut être attribuée aux conditions environnementales et à une éventuelle mortalité bactérienne (Pour et *al.*, 2019). La capacité décrite des capsules à retenir et à libérer efficacement les bactéries de cette étude suggère que la bioformulation mise en place pourrait être appliquée avec succès dans le scénario réel.

À notre connaissance, notre étude propose pour la première fois un système modèle pour étudier la capacité à favoriser la croissance des plantes et la dynamique de colonisation racinaire de bactéries encapsulées dans des expériences à court terme. Nos recherches sur les paramètres morphologiques d'*Arabidopsis thaliana*, la colonisation racinaire, la surface foliaire et le dosage des pigments chlorophylliens indiquent que la bioformulation bactérienne dans des billes d'alginate fournit un système efficace de bioinoculant.

Il est important de souligner que selon la littérature, l'exercice des effets PGP nécessite que les bactéries sortent de la bille et se dirigent vers les racines grâce à leur capacité à communiquer avec la plante *via* les exsudats racinaires (Allard-Massicotte et *al.*, 2016). Cette communication est appelée chimiotaxie et conduit à la colonisation racinaire (Allard-Massicotte et *al.*, 2016). Plusieurs facteurs interviennent dans le succès de la colonisation racinaire par des microbes favorables, comme la biochimie de la surface racinaire et la composition biochimique des exsudats racinaires (Doornbos et *al.*, 2011). Ainsi, il a été démontré lors d'une étude sur la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par la bactérie rhizosphérique *Pantoea* sp. YR343 que des métabolites actifs comme les auxines seraient impliquées dans le processus de colonisation (Polisetti et *al.*, 2016). De même, certaines hormones végétales peuvent se déplacer de la racine vers les feuilles tout en améliorant le processus de croissance foliaire (Allard-Massicotte et *al.*, 2016), comme les cytokinines qui agissent comme médiateurs chimiques de l'azote des racines vers les pousses (Kudo et *al.*, 2010). Ces données nous amènent à expliquer l'amélioration du poids, de la

surface foliaire et de la teneur en pigments chlorophylliens des feuilles des plantules d'*Arabidopsis thaliana* inoculées par rapport à celles du témoin, notamment chez Pa dont le profil d'hormones et d'auxines telles que les cytokinines, l'acide indole acétique et l'acide phényl acétique a déjà été décrit (Cherif-Silini et al., 2019). Néanmoins, la mobilité des bactéries est nécessaire pour adhérer aux racines et cette mobilité est induite par les exsudats racinaires qui servent de molécules d'attraction (Allard-Massicotte et al., 2016). Parallèlement, des travaux ont établi que la formation de biofilm est essentielle à la colonisation racinaire chez *Bacillus* et qu'elle est déclenchée par les polysaccharides et autres métabolites libérés par la plante (Rudrappa et al., 2008 ; Beauregard et al., 2013). Nos données montrent que les bactéries encapsulées améliorent significativement la croissance d'*Arabidopsis thaliana* par rapport aux souches inoculées librement, cette amélioration est probablement attribuée à l'efficacité accrue des bactéries encapsulées en termes de colonisation, de mobilité et de survie.

La couleur des rosettes des plantules est plus foncée sous traitement avec des souches bactériennes encapsulées par rapport au traitement non inoculé, ceci est directement lié au processus de photosynthèse qui est indispensable chez les plantes pour obtenir de l'énergie, et son efficacité est positivement corrélée à la teneur en chlorophylles (Fan et al., 2020). L'assombrissement des pousses des plantules inoculées s'expliquerait donc par l'action accrue des bactéries encapsulées sur le photosystème d'*Arabidopsis thaliana* dont les pigments chlorophylliens absorbent la lumière et la convertissent en énergie chimique (Graça et al., 2021).

Avant de recommander une application sur champ, il est important de prouver les fonctions probiotiques végétales des formulations développées sur une culture de grande importance agricole, nous nous sommes donc concentrés sur le blé dur comme culture modèle. Nos résultats confirment la capacité biofertilisante précédemment étudiée des deux souches testées (Saadaoui et al., 2022). Une stimulation directe de la croissance des plantes a été notée, en particulier du système aérien de l'appareil végétatif où une augmentation significative de la longueur et du poids des pousses a été observée chez les plantes traitées avec Pa et B25 sous forme libre et encapsulée par rapport aux plantes témoins. Ces résultats valident les interactions bénéfiques entre les bactéries testées et la plante hôte, et décrivent que cette capacité est maintenue lorsque les souches sont délivrées aux plantes sous forme de cellules immobilisées dans des billes. Étant donné que la croissance des pousses est le paramètre le plus important pour le rendement du blé, notre étude démontre clairement que l'application de souches en suspension ou encapsulées améliore également la croissance des

pousses et nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elle améliorerait également le rendement du blé. Chez les espèces de *Bacillus*, cet effet est directement lié non seulement à la production de phytohormones, de sidérophores, de lipopeptides, de polysaccharides et d'enzymes (Mirskaya et al., 2022), mais aussi à la régulation de l'homéostasie et des enzymes antioxydantes dans les conditions naturelles de croissance des plantes et sous divers stress (Sood et al., 2020 ; Pishchik et al., 2021). En ce sens, la capacité de B25 à fixer l'azote, à produire du NH<sub>3</sub>, de l'ACC désaminase, des sidérophores et à solubiliser le phosphate a déjà été discutée (Saadaoui et al., 2022). Des études similaires sur l'inoculation de souches encapsulées de *Bacillus* ont rapporté une amélioration de la croissance et du développement des plants de blé dur en augmentant la biomasse aérienne et la hauteur des plantes ; cet avantage est principalement attribué à deux mécanismes clés : une meilleure absorption des nutriments et des minéraux, principalement l'azote du sol, et une stimulation accrue de la production de phytohormones impliquées dans la division cellulaire et l'élongation des pousses telles que les cytokinines et les auxines (Azaroual et al., 2022 ; Rojas-Padilla et al., 2022). De même, Pa s'avère efficace dans la production de sidérophores, d'AIA, d'ACC désaminase, de NH<sub>3</sub> et de HCN et dans la solubilisation du phosphate et la fixation de l'azote (Saadaoui et al., 2022). De plus, *Pantoea* joue un rôle stimulant dans la croissance des cultures céréalières en augmentant la disponibilité et l'assimilation des nutriments tout en favorisant une régulation plus efficace des phytohormones endogènes (Suman et al., 2020). De plus, il a été constaté que même si la bactérie produit peu ou pas de phytohormones, son inoculation avec du blé peut induire et réguler la production de phytohormones par la plante inoculée (Mirskaya et al., 2022). De même, une étude a rapporté que l'inoculation d'une souche de *Bacillus* sp. V2026 modifiait les niveaux d'AIA endogène dans les tissus des pousses et des racines et stimulait la productivité et le rendement des plants de blé (Mirskaya et al., 2022). Une autre étude a révélé une forte corrélation entre la présence de cytokinine et la longueur, le poids frais et le poids sec des pousses, tandis que l'AIA bactérienne est corrélée négativement à la longueur des racines (Hussain et Hasnain, 2011).

Des concentrations élevées de pigments chlorophylliens indiquent un métabolisme actif et un bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique de la plante (Mirskaya et al., 2022). L'inoculation de bactéries encapsulées a amélioré les performances photosynthétiques du blé dur ; ceci est probablement associé aux effets de ces bactéries sur l'amélioration de l'absorption d'eau et de nutriments, qui jouent un rôle important dans la construction structurale de la machinerie photosynthétique (Yaghoubi Khanghahi et al., 2021), et dans l'assurance des échanges gazeux et le transport d'électrons (Yong et al., 2010). Ainsi, la

production d'AIA, d'ACC désaminase et l'augmentation de la biomasse végétale seraient également impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle (Kanagendran et *al.*, 2019 ; Kumar et *al.*, 2019). En effet, l'augmentation des teneurs en caroténoïdes est liée à la collecte de l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse (Acosta-Motos et *al.*, 2017).

La capacité de colonisation est un trait important qui détermine la capacité des bactéries à survivre et à rivaliser avec d'autres microbes, et elle définit l'efficacité et la performance du PGPR lors de son inoculation sur le terrain (Singh et *al.*, 2020), elle est considérée comme le principal facteur de survie des bactéries (Saber-Rise et *al.*, 2020). À cette fin, les capacités de colonisation de la rhizosphère, du rhizoplan et des tissus internes des racines ont été analysées. Nos résultats démontrent que les deux souches bactériennes ont survécu efficacement dans un milieu stérile et relativement pauvre en nutriments et indiquent une augmentation du nombre de bactéries rhizosphériques et endophytes au fil du temps dans les traitements des formulations encapsulées tandis qu'une diminution considérable a été observée dans les formulations liquides. Ces observations sont cohérentes avec celles de Bhise et Dandge (2019), qui ont constaté qu'une colonisation accrue des racines de riz par une souche de *P. agglomerans* encapsulée dans de l'alginate a été enregistrée après 20 et 30 jours par rapport aux mêmes inoculum libres. Dans une autre étude axée sur la colonisation des racines du coton, la capacité de *P. putida* Rs-198 encapsulée à coloniser les racines a augmenté de manière significative au fil du temps par rapport à l'inoculum de cellules libres (He et *al.*, 2016). De même, l'analyse du dénombrement a révélé que les charges bactériennes en Pa sont en accord avec les rapports de la littérature et qui sont de  $10^6$  à  $10^9$  UFC/g dans la rhizosphère et de  $10^4$  à  $10^8$  UFC/g dans l'endosphère racinaire (Soluch et *al.*, 2021). Considérant que la colonisation est un processus complexe qui implique la mobilité des bactéries et leur capacité de chimiotaxie avec la plante hôte (Compant et *al.*, 2010), le maintien de ces interactions est crucial pour établir une association bactérienne stable à long terme avec la plante hôte (Soluch et *al.*, 2021). Cette capacité de persistance est fortement prononcée chez les bactéries encapsulées qui sont lentement libérées dans le sol, assurant ainsi leur survie et leur capacité à favoriser la croissance des plantes, ce qui garantit leur rendement à long terme. D'autre part, la capacité de colonisation rhizosphérique et racinaire peut être limitée par l'affinité au génotype de la plante hôte et par la compétition avec son microbiote interne lorsqu'il s'agit de l'endosphère de la plante (Kumar et *al.*, 2011). L'absence de cellules B25 dans les tissus internes du blé dur suggère que l'endosphère racinaire n'appartient pas aux zones écologiques privilégiées de cette souche. De plus, les résultats de l'analyse des paramètres morphologiques au cours du temps suggèrent que l'effet de

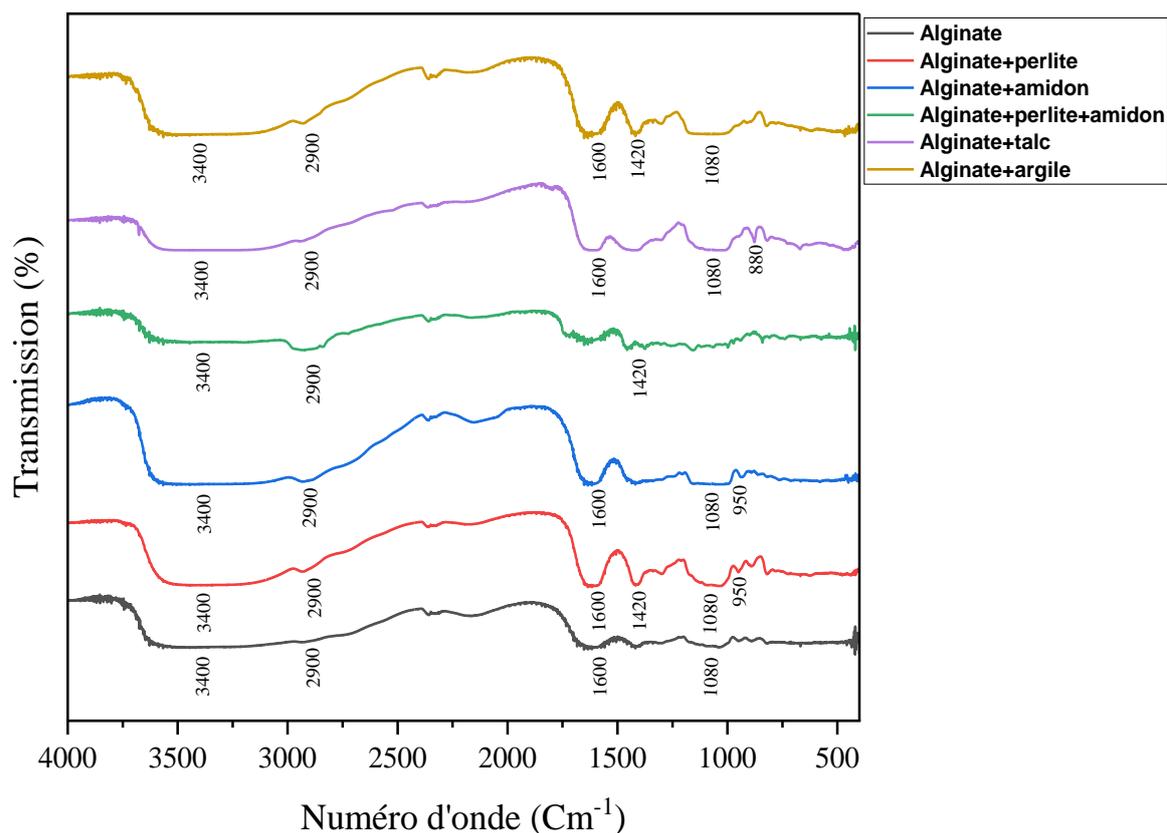
l'inoculation sur la stimulation de la croissance peut être affecté après plus de 30 jours de croissance de la plante.

## **Partie 2 : Amélioration de la croissance du blé dur et de la survie bactérienne grâce aux biofertilisants encapsulés avec additifs naturels : effet de *Pantoea agglomerans* Pa et *Bacillus thuringiensis* B25.**

### **2.1. Caractérisation physico-chimique des bioformulations**

#### **2.1.1. Analyse infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)**

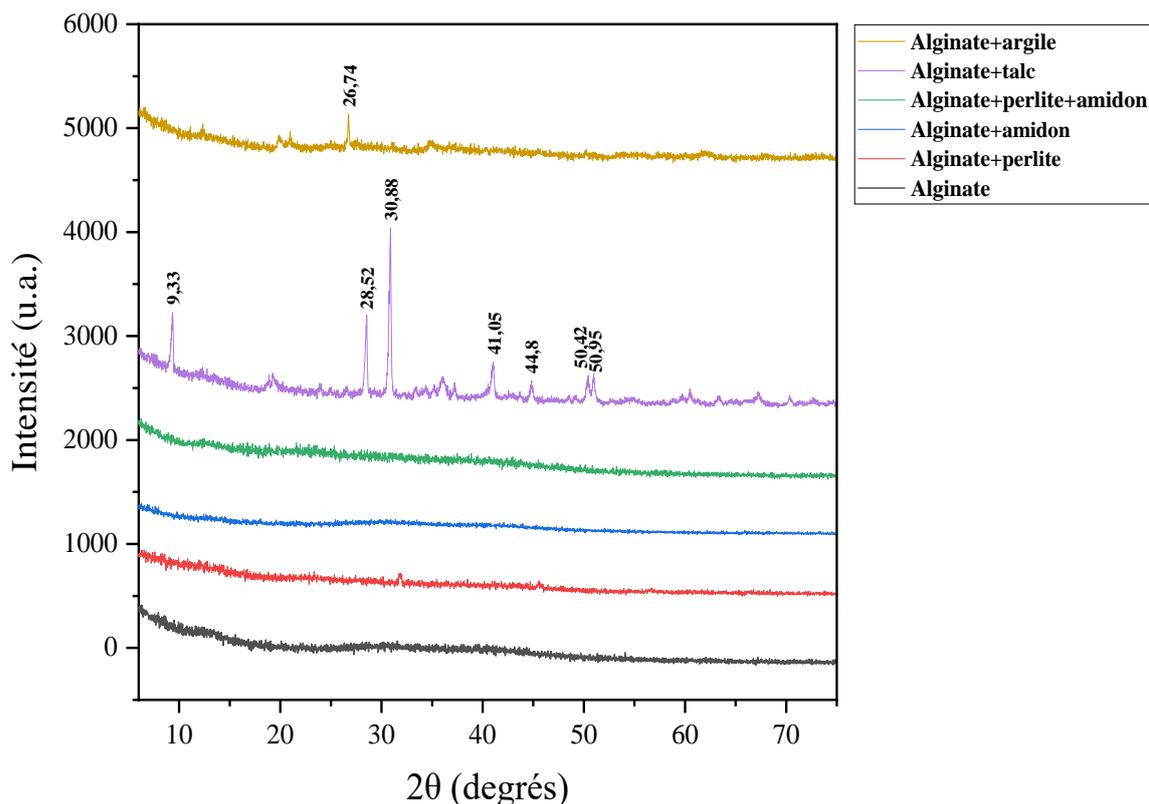
La spectroscopie infra-rouge a été réalisée pour identifier les interactions alginate-perlite, alginate-amidon, alginate-perlite-amidon, alginate-talc et alginate-argile. Le spectre indique la présence d'une large bande à  $3400\text{ cm}^{-1}$  et des bandes dans la région  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$  dans les spectres de tous les mélanges d'alginate-additifs. Des bandes dans les régions  $1600\text{ cm}^{-1}$  et  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  ont également caractérisé les spectres d'alginate, alginate-perlite, alginate-amidon, alginate-talc et alginate+argile (Fig.24). Les spectres de la perlite et du talc ont montré une bande autour de  $1420\text{ cm}^{-1}$ , alors que des petites bandes  $950\text{ cm}^{-1}$  et  $800\text{ cm}^{-1}$  sont présentes dans les spectres d'alginate-perlite, alginate-amidon et d'alginate-talc. Les résultats FTIR bien qu'informatifs sur les interactions chimiques et la présence des groupes fonctionnels n'ont pas été suffisants pour déterminer la compatibilité cristalline et la structure interne des composites d'alginate avec différents additifs, l'analyse DRX est nécessaire pour identifier les phases cristallines formées, évaluer la dispersion des additifs et détecter les impuretés, permettant ainsi une évaluation plus complète et précise de la meilleure combinaison d'additifs pour optimiser les propriétés des matériaux composites.



**Fig.24.** Spectres FTIR de l'alginate, et des films de mélange d'alginate+perlite, alginate+amidon, alginate+perlite+amidon, alginate+talc et alginate+argile.

### 2.1.2. Analyse par diffraction des rayons X

L'analyse DRX des billes encapsulées en position  $2\theta$  a démontré une absence des pics distincts pour les échantillons de l'alginate, l'alginate+perlite, l'alginate+amidon et l'alginate+perlite+amidon, Seuls les mélanges alginate+talc et alginate+argile montrent des pics à  $9,33^\circ$  ;  $28,52^\circ$  ;  $30,88^\circ$  ;  $41,05^\circ$  ;  $44,8^\circ$  ;  $50,42^\circ$  et  $50,99^\circ$  (Fig.25).



**Fig.25.** Diagrammes de diffraction des rayons X de l'alginate, et des mélanges d'alginate+perlite, alginate+amidon, alginate+perlite+amidon, alginate+talc et alginate+argile.

## 2.2. Analyse des diamètres et calcul des indices de sphéricité

Le calcul du facteur de sphéricité a été effectué sur des billes fraîches issues de formulations d'alginate et de diverses combinaisons d'additifs (Fig.26). Le facteur de sphéricité est le degré de rapprochement de la forme de la bille d'une sphère parfaite. Ce facteur peut être de zéro si la sphère est parfaite. D'après nos résultats, la forme des billes provenant de toutes les formulations était sphérique. Les billes contenant de l'alginate seul, de l'alginate+talc et de l'alginate+argile présentaient les formes les plus parfaitement sphériques, avec des FS de 0,035 ; 0,037 et 0,042, respectivement (Tab.5).



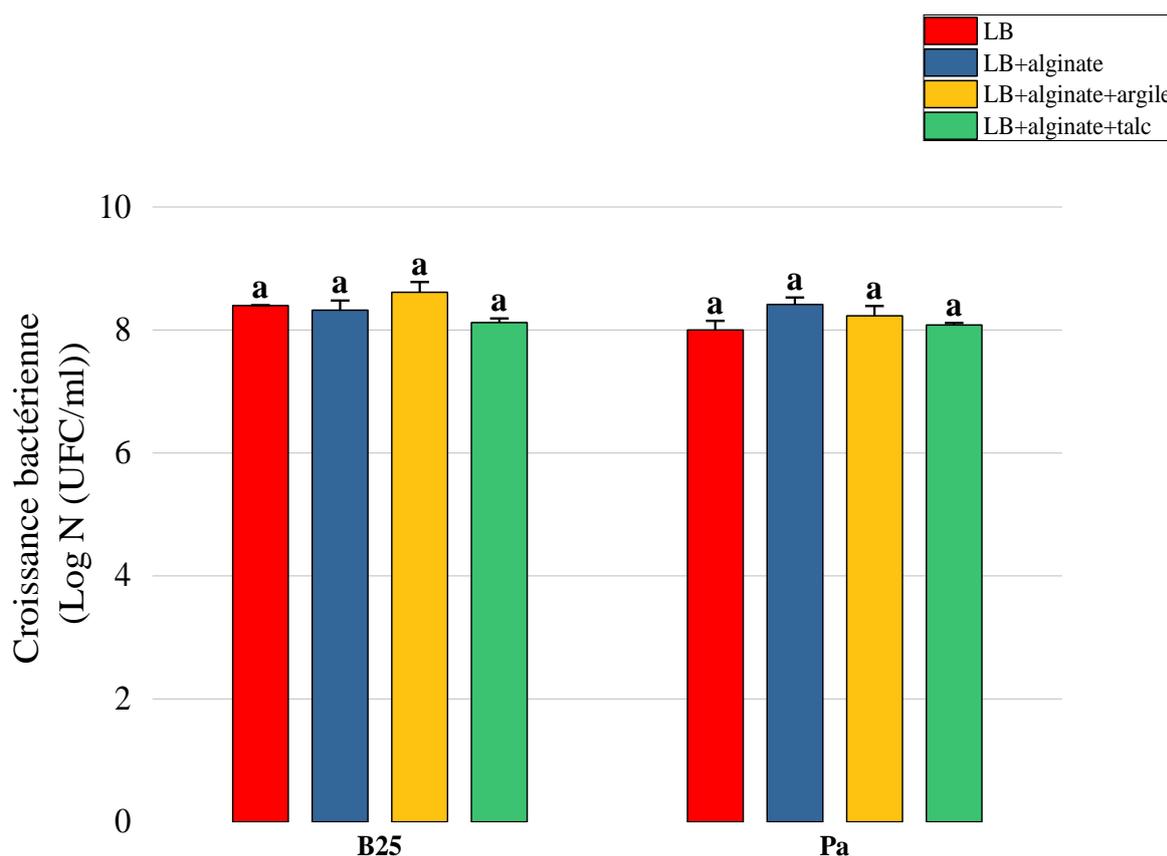
**Fig.26.** Image des capsules fabriquées d'alginate et de différents mélanges d'additifs.

**Tab.5.** Facteurs de sphéricité des capsules fabriquées d'alginate et de différents mélanges

Traitement	dmax (cm)	dmin (cm)	Facteur de sphéricité (FS)
Alginate	0,252 ± 0,007	0,234 ± 0,008	0,035 ± 0,01
Alginate+perlite	0,279 ± 0,009	0,250 ± 0,023	0,056 ± 0,05
Alginate+amidon	0,292 ± 0,01	0,245 ± 0,004	0,086 ± 0,03
Alginate+perlite+amidon	0,318 ± 0,005	0,29 ± 0,017	0,047 ± 0,03
Alginate+talc	0,281 ± 0,005	0,260 ± 0,008	0,037 ± 0,02
Alginate+argile	0,302 ± 0,007	0,277 ± 0,008	0,042 ± 0,002

### 2.3. Effet de l'ajout des additifs sur la croissance bactérienne

Les résultats montrent que la croissance bactérienne des deux souches testées n'est pas significativement affectée par la présence d'alginate, d'alginate+argile et d'alginate+talc dans le milieu de culture LB (Fig.27), la croissance observée est comparable à celle du milieu LB seul, qui sert de contrôle négatif. Cela suggère que ni l'alginate ni ses combinaisons avec l'argile et le talc n'ont d'effet inhibiteur ou promoteur notable sur la croissance des deux bactéries dans le milieu de culture utilisé.



**Fig.27.** La croissance des deux souches testées (Log N (UFC/ml) en présence d’alginate, d’argile et du talc. Les diagrammes à barres représentent l’erreur type moyenne de trois expériences différentes. Les graphiques à barres représentent l’erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

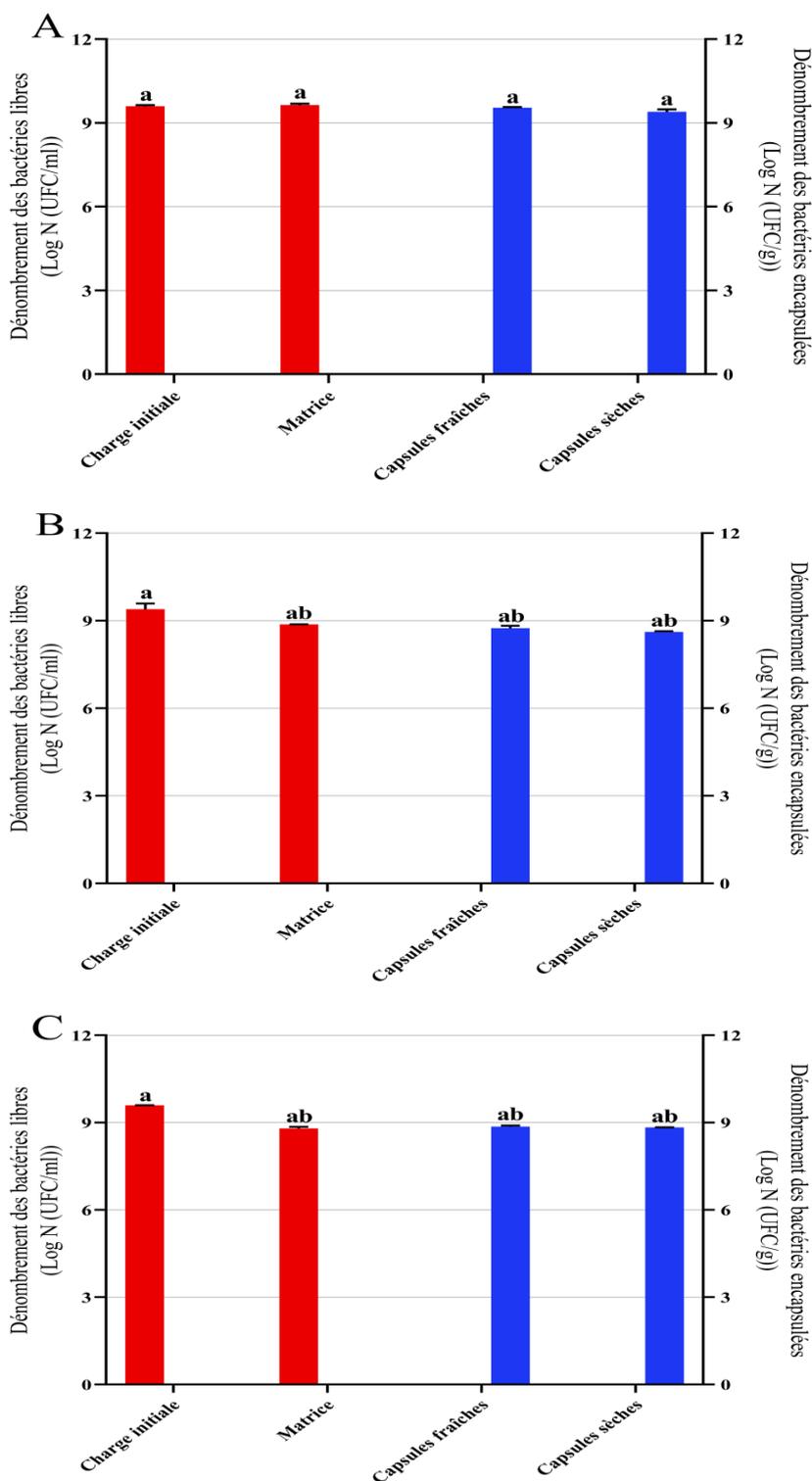
#### 2.4. Bioencapsulation des cellules

Les billes obtenues après gélification à partir des trois matrices testées ont montré une morphologie sphérique uniforme, le diamètre des billes fraîches était maximal pour les billes d’alginate+talc de Pa, atteignant  $3,177 (\pm 0,05)$  mm. Après séchage ce même traitement a conservé le diamètre le plus élevé mesurant  $1,364 (\pm 0,09)$  mm. Le poids sec le plus important a été observé pour les billes de B25 encapsulée dans l’alginate+argile, avec une moyenne de  $2,13 (\pm 0,001)$  mg (Tab.6).

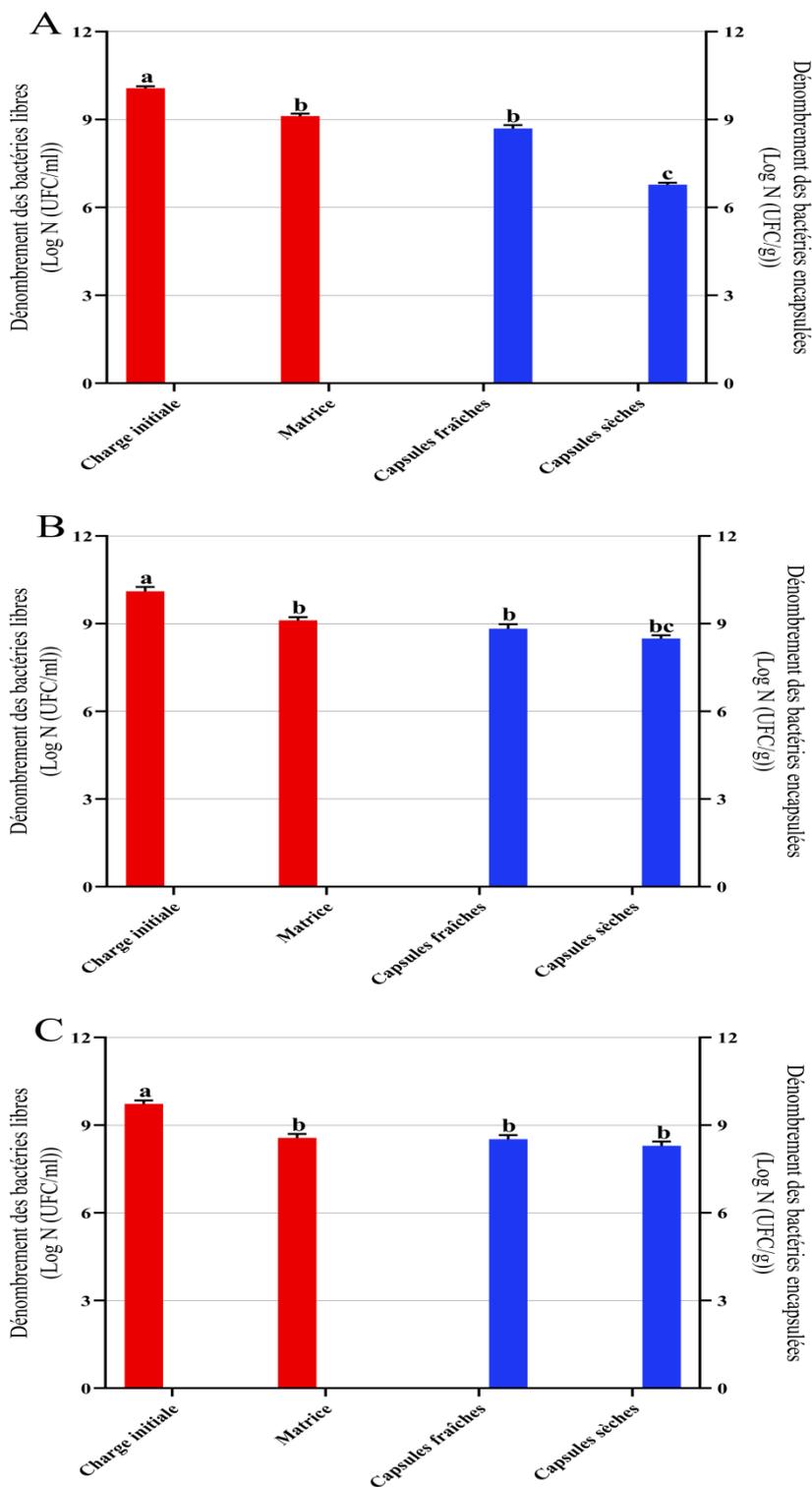
**Tab.6.** Caractéristiques des différentes formulations de capsules d’alginate.

Souche	Traitement	Poids frais (mg)	Poids sec (mg)	Diamètre des billes fraîches (mm)	Diamètre des billes sèches (mm)	Taux de survie (%)	Efficacité d’encapsulation (%)
B25	Alginate	17,11 ± 0,5	0,77 ± 0,06	3,005 ± 0,11	0,897 ± 0,06	98,5	99,998
	Alginate + argile	18,93 ± 0,4	2,13 ± 0,01	2,763 ± 0,13	1,206 ± 0,07	100	99,999
	Alginate + talc	19,15 ± 0,8	2,06 ± 0,07	3,113 ± 0,05	1,321 ± 0,04	100	99,997
Pa	Alginate	17,86 ± 0,2	0,81 ± 0,04	2,919 ± 0,09	0,917 ± 0,05	77,971	99,978
	Alginate + argile	16,34 ± 0,66	1,85 ± 0,02	2,735 ± 0,11	1,171 ± 0,08	96,22	99,98
	Alginate + talc	18,78 ± 0,73	2,07 ± 0,05	3,177 ± 0,05	1,364 ± 0,09	97,37	99,955

L’encapsulation de B25 dans les matrices d’alginate+argile et alginate+talc a permis d’atteindre un taux de survie de 100%, démontrant une robustesse et une viabilité élevée lors du processus, où le nombre de bactéries viables dans les billes sèches était de  $4,14 \times 10^8$  ( $\pm 0,03 \times 10^8$ ) UFC/g pour l’alginate+argile et de  $6,85 \times 10^8$  ( $\pm 0,01 \times 10^8$ ) UFC/g pour l’alginate+talc (Fig.28A-C) . En revanche, le taux de survie le plus faible a été enregistré pour Pa encapsulée dans l’alginate, à 77,971% où une survie de  $6,06 \times 10^6$  ( $\pm 0,08 \times 10^6$ ) UFC/g a été obtenue après séchage (Fig.29A-C). L’efficacité d’encapsulation, quant à elle, a varié entre 99,955% et 99,999% pour tous les traitements, indiquant une très haute efficacité de piégeage dans les capsules formées.



**Fig.28.** Survie de B25 aux différentes étapes du procédé de bioencapsulation lors de l'encapsulation dans (A) alginate, (B) alginate+argile et (C) alginate+talc. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

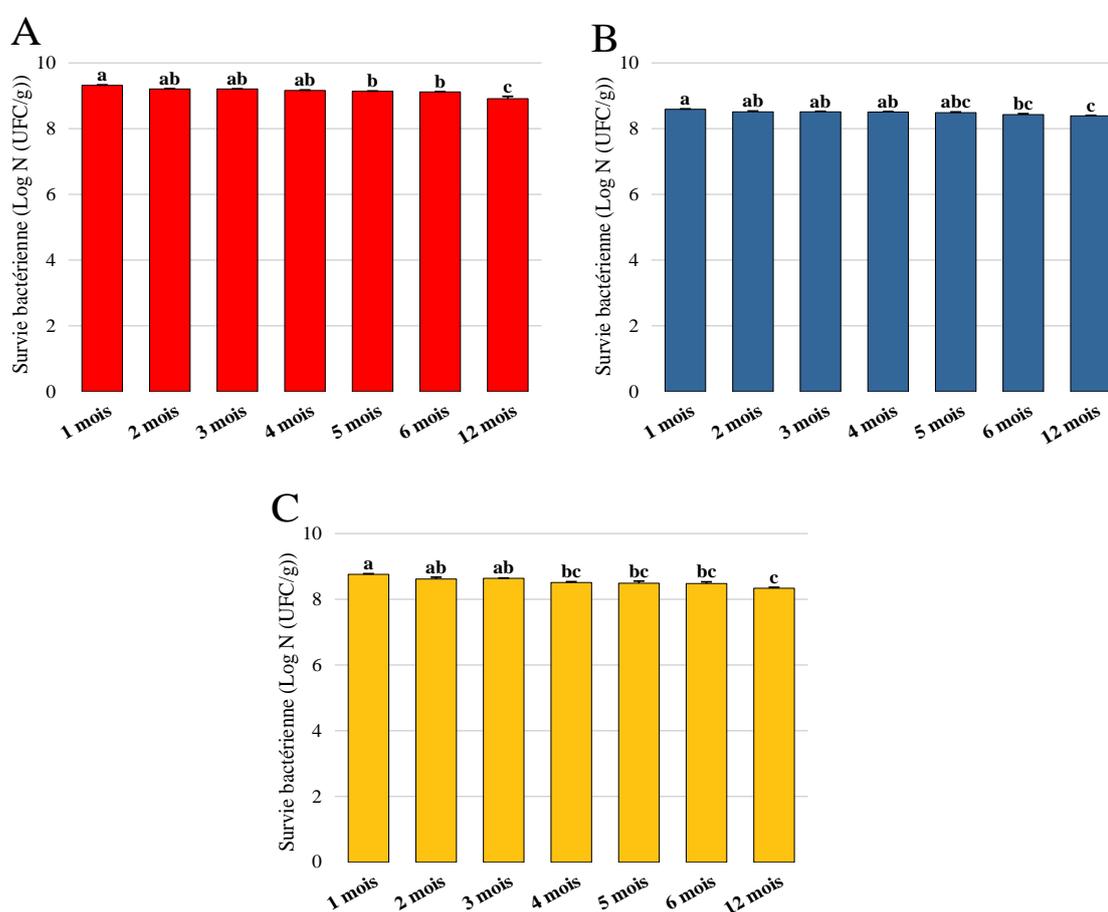


**Fig.29.** Survie de Pa aux différentes étapes du procédé de bioencapsulation lors de l'encapsulation dans (A) alginate, (B) Alginate+argile et (C) Alginate+talc. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

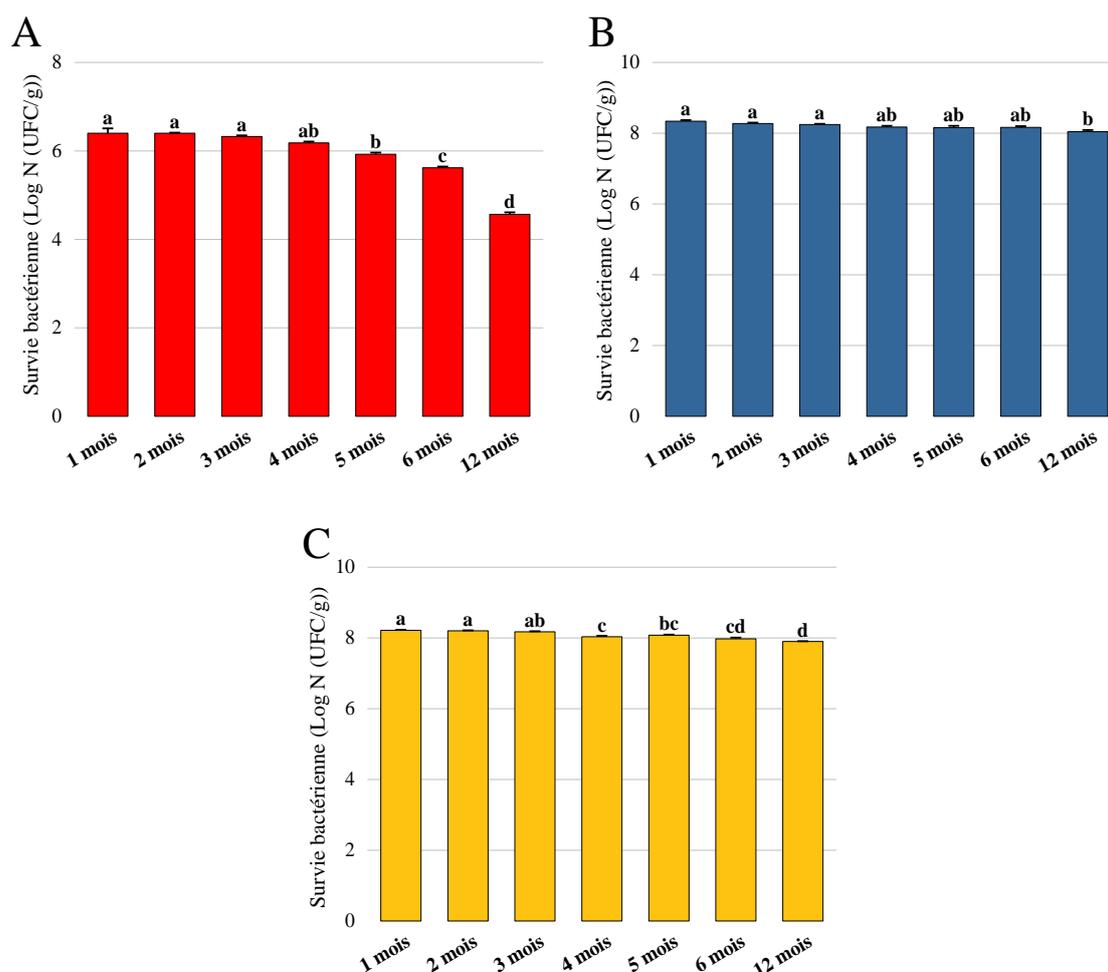
## 2.5. Études du stockage

### 2.5.1. Survie

La survie a été étudiée à partir des billes séchées stockées à une température de 4°C pendant une période de 12 mois. B25 a montré une survie robuste dans les trois matrices où le nombre de cellules viables était de  $8,15 \times 10^8 (\pm 0,09 \times 10^8)$  UFC/g,  $2,46 \times 10^8 (\pm 0,01 \times 10^8)$  UFC/g et  $2,18 \times 10^8 (\pm 0,03 \times 10^8)$  UFC/g dans l'alginate, alginate+argile et alginate+talc respectivement (Fig.30A-C). Pour Pa, la charge bactérienne a été réduite de 98.54% pour la matrice d'alginate, et elle a diminué d'un log dans la matrice d'alginate+talc (Fig.31A,C). Cependant, la survie de Pa n'a pas été modifiée de manière significative dans la matrice d'alginate+argile et s'est stabilisée à  $1,11 \times 10^8 (\pm 0,06 \times 10^8)$  UFC/g après 12 mois de stockage (Fig.31B).



**Fig.30.** Survie de B25 dans les billes (A) d'alginate, (B) d'alginate+argile et (C) d'alginate+talc durant 12 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

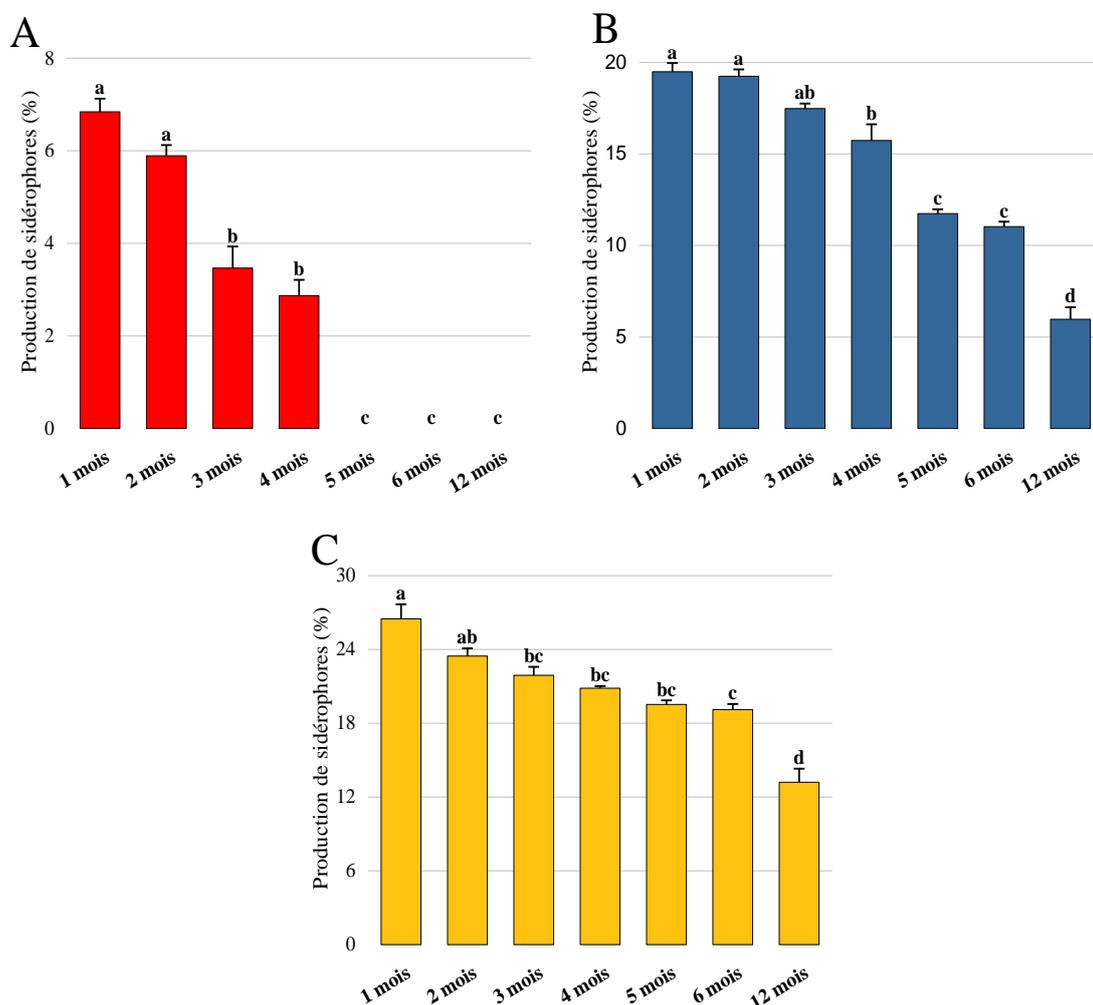


**Fig.31.** Survie de Pa dans les billes (A) d’alginate, (B) d’alginate+argile et (C) d’alginate+talc durant 12 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l’erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

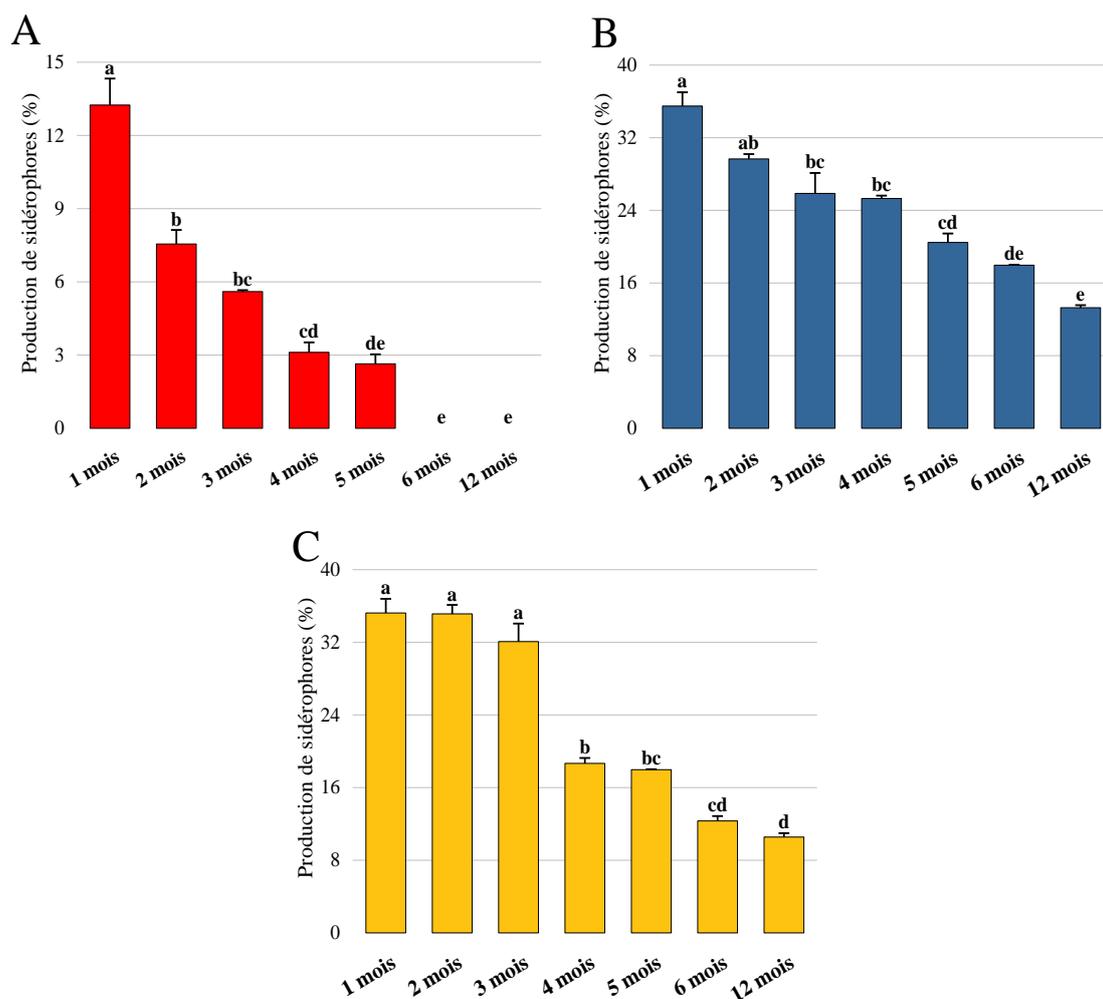
### 2.5.2. Production des sidérophores

Les résultats montrent des tendances distinctes de la production des sidérophores par B25 en fonction de la matrice utilisée. Dans l’alginate seul, la production de sidérophores, initialement de 6,84% après un mois de conservation, a complètement cessé au bout de cinq mois, indiquant une faible préservation de cette activité (Fig.32A). En revanche, la production de sidérophores dans la combinaison de l’alginate avec l’argile a diminué à 5,97% après 12 mois suggérant une perte progressive de l’activité initiale (Fig.32B). B25 encapsulée dans la matrice d’alginate+talc a démontré une meilleure performance, avec une production initiale de 26,49% qui a diminué à 13,2%, représentant une préservation de 49,84% de la production initiale (Fig.32C). Concernant Pa, la production de sidérophores dans l’alginate a

progressivement diminué pour atteindre 0% au 6<sup>ème</sup> mois de conservation (Fig.33A). En comparaison, l'activité de production de sidérophores dans les matrices d'alginate+argile et d'alginate+talc a été préservée à 37,44% et 41,85%, respectivement (Fig.33B,C).



**Fig.32.** Production de sidérophores par B25 encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

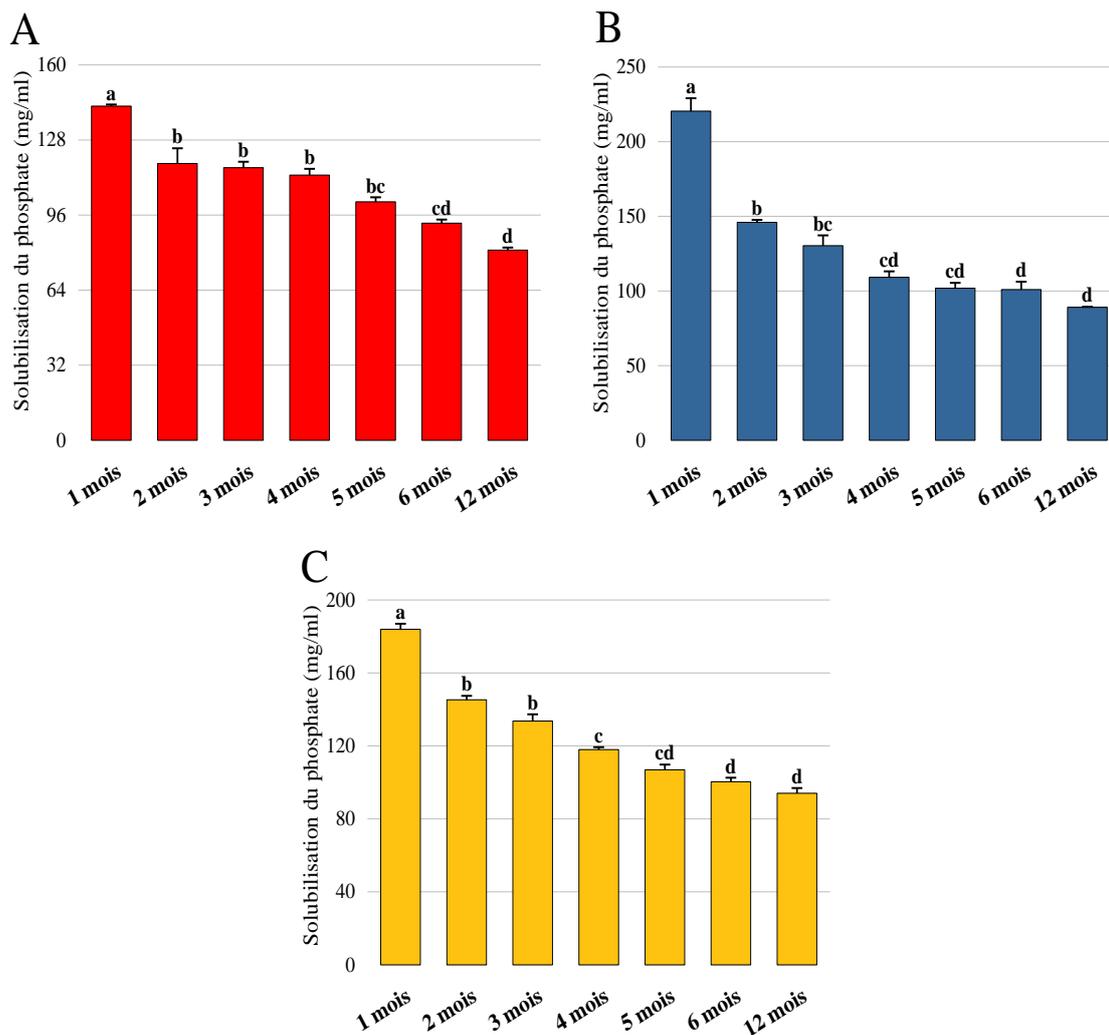


**Fig.33.** Production de sidérophores par Pa encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

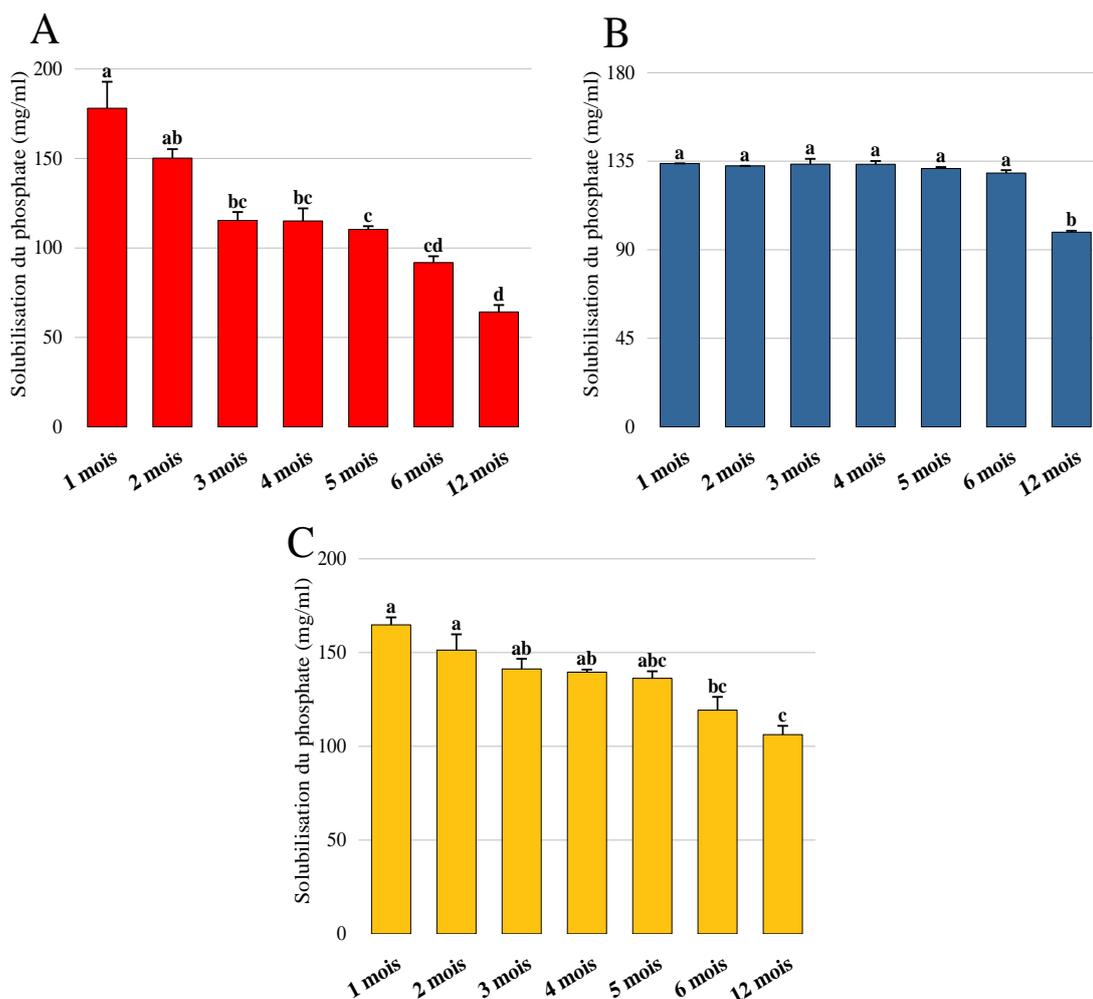
### 2.5.3. Solubilisation du phosphate

La solubilisation de phosphate par B25 dans la matrice d'alginate était stable jusqu'à 4 mois de conservation, puis a connu un déclin progressif pour atteindre 81,08 mg/ml (Fig.34A). Pour les matrices d'alginate+argile et d'alginate+talc, la production initiale était de 220,50 mg/ml et 183,89 mg/ml, respectivement, mais a diminué pour atteindre 89,10 mg/ml et 94,02 mg/ml après 12 mois, suggérant qu'après 12 mois de stockage, l'activité de solubilisation de phosphate est similaire pour les 3 matrices (Fig.34A-C). D'autre part, les résultats révèlent une différence significative dans la solubilisation du phosphate par Pa selon la matrice utilisée. Dans la matrice d'alginate, la quantité de phosphate solubilisé a diminué

jusqu'à 64,28 mg/ml après une année, après qu'elle ait été de 178,05 mg/ml le premier mois de stockage. De même pour la matrice d'alginate+talc, où une diminution progressive de la solubilisation a été enregistrée durant la période de stockage (Fig.35A,C). En revanche, cette activité dans l'alginate+argile est restée stable et élevée jusqu'à 6 mois, puis a atteint 98,94 mg/ml après 12 mois (Fig.35B), ce qui indique que la capacité de solubilisation de phosphate par Pa est presque similaire dans les matrices d'alginate+argile et d'alginate+talc, et nettement meilleure comparée à l'alginate seul.



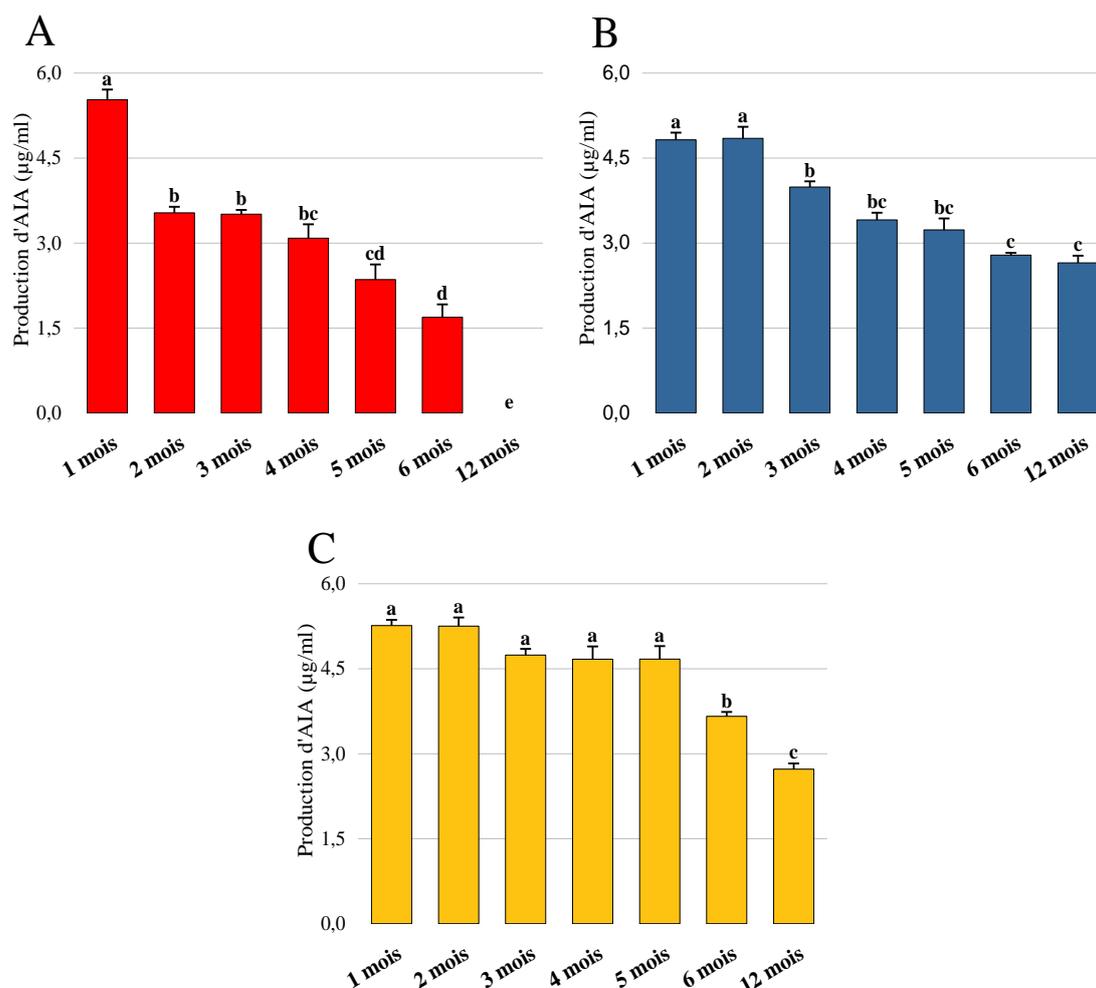
**Fig.34.** Solubilisation de phosphate par B25 encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.



**Fig.35.** Solubilisation de phosphate par Pa encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

#### 2.5.4. Production d'AIA

L'étude statistique montre que la production d'AIA par Pa était relativement faible et similaire dans toutes les matrices d'alginate. Cependant, après 12 mois, les matrices d'alginate+argile et alginate+talc préservent une légère production par rapport à l'alginate seul dont la production était nulle après une année de stockage (Fig.36).

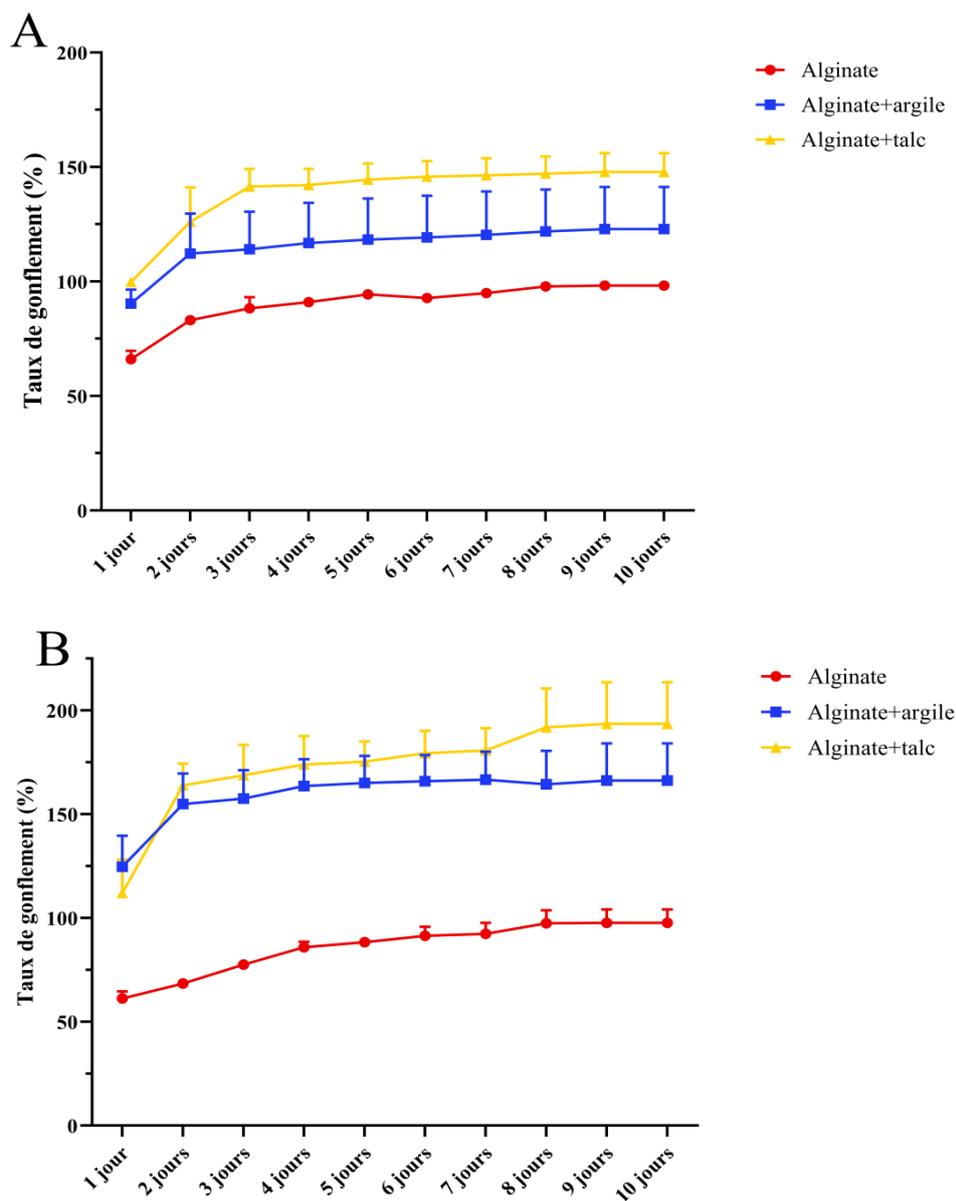


**Fig.36.** Production d'AIA par Pa encapsulée dans (A) l'alginate, (B) l'alginate+argile et (C) l'alginate+talc durant 12 mois de stockage. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

## 2.6. Taux de gonflement

Des variations significatives dans les taux de gonflement des capsules de B25 ont été observées selon la matrice utilisée. Dans les matrices d'alginate+argile et d'alginate+talc, les capsules ont gonflé de 80% et de 79,14% respectivement, le 2<sup>ème</sup> jour par rapport au premier, suivies d'une augmentation négligeable jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour où l'équilibre a été atteint (Fig.37A). En revanche, dans l'alginate seul, le gonflement a été moins important que dans les autres matrices et s'est poursuivi de manière lente et progressive jusqu'à atteindre l'équilibre au 8<sup>ème</sup> jour avec un taux de gonflement de 98,29% (Fig.37A). Les mêmes observations ont été faites pour les capsules de Pa, avec des taux de gonflement respectivement de 49,13% et

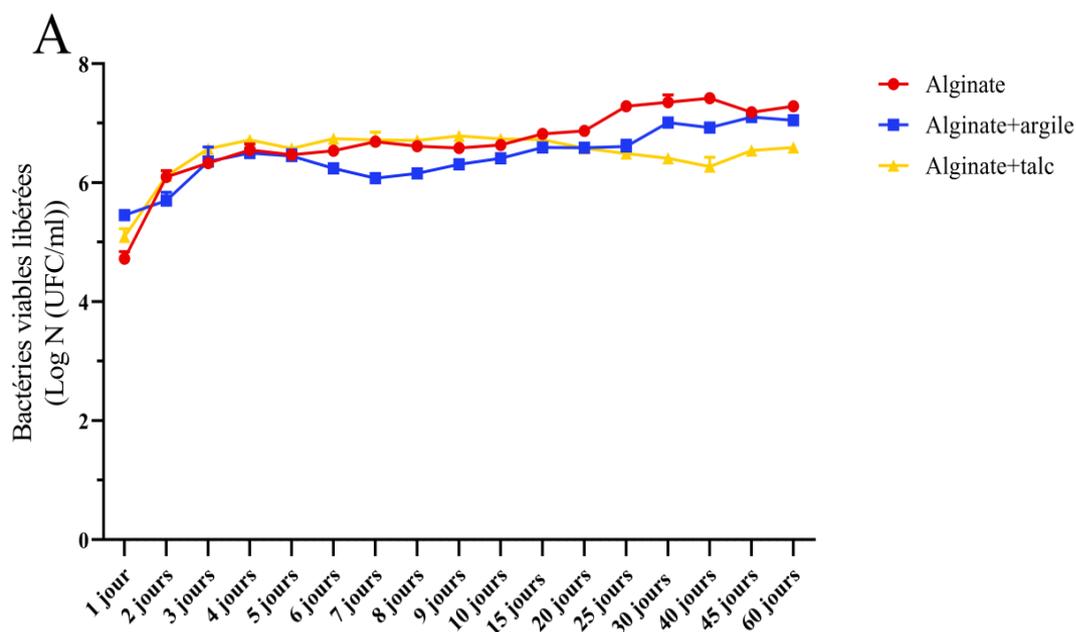
54,67 % plus élevés pour l'alginate+argile et l'alginate+talc par rapport à l'alginate seul, enregistrés dès le premier jour. L'équilibre a été atteint le 8<sup>ème</sup> jour pour les capsules d'alginate avec un taux de 97,7% tandis que les capsules d'alginate+argile d'alginate+talc ont atteint l'équilibre le 9<sup>ème</sup> jour avec des taux de 166,28% et 193,54%, respectivement (Fig.37B).

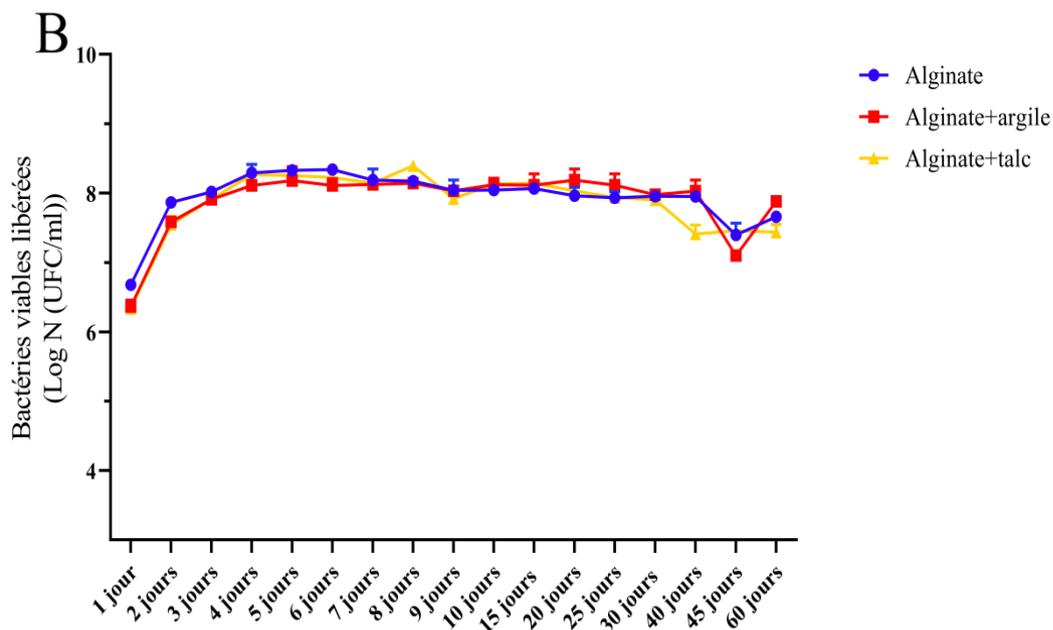


**Fig.37.** Taux de gonflement (%) des capsules sèches de (A) B25 et de (B) Pa durant 10 jours. GraphPad Prism 9.4.0 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, à l'aide d'une corrélation des moyennes de trois répétitions.

## 2.7. Cinétique de libération

La cinétique de libération de B25 dans les 3 matrices a suivi deux phases distinctes. La première phase, rapide et marquée par une libération élevée, a eu lieu entre le 1<sup>er</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, suivie par une seconde phase de stabilisation, qui s'est étendue du 6<sup>ème</sup> au 60<sup>ème</sup> jour où le nombre de bactéries viables et cumulatives a été mesuré à  $1,94 \times 10^7$  ( $\pm 0,02 \times 10^7$ ) UFC/ml à partir des billes d'alginate, à  $1,13 \times 10^7$  ( $\pm 0,02 \times 10^7$ ) UFC/ml à partir des billes d'alginate+argile et à  $3,94 \times 10^6$  ( $\pm 0,1 \times 10^6$ ) UFC/ml (Fig.38A). La libération de Pa quant à elle, a montré une stabilité relative après une première phase d'augmentation jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour. Après 60 jours d'expérience, le nombre de bactéries viables était de  $4,6 \times 10^7$  ( $\pm 0,05 \times 10^7$ ) UFC/ml pour les billes d'alginate, de  $7,61 \times 10^7$  ( $\pm 0,01 \times 10^7$ ) UFC/ml pour les billes d'alginate+argile et de  $2,75 \times 10^7$  ( $\pm 0,11 \times 10^7$ ) UFC/ml pour celles d'alginate+talc (Fig.38B).

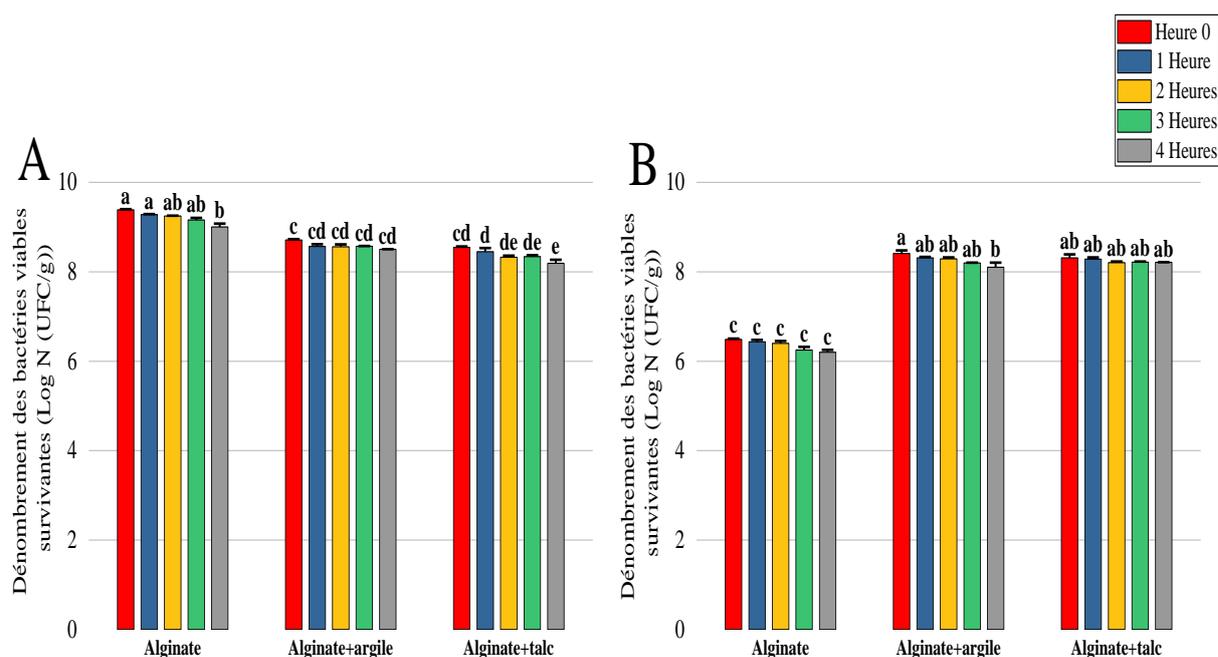




**Fig.38.** Cinétique de diffusion des bactéries à partir des capsules sèches de (A) B25 et de (B) Pa durant 10 jours. GraphPad Prism 9.4.0 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, à l'aide d'une corrélation des moyennes de trois répétitions.

## 2.8. Effets des rayonnements UV sur la survie bactérienne

Le rayonnement UV a été utilisé pour exposer les deux bactéries B25 et Pa immobilisées dans des billes sèches d'alginate, d'alginate+argile et d'alginate+talc. Les bioformulations d'alginate et d'alginate-talc pour B25, et celles d'alginate+argile pour Pa ont montré des variations infimes de viabilité après 4 heures d'exposition, tandis qu'une survie améliorée a été observée pour B25 immobilisée dans l'alginate+argile et pour Pa immobilisée dans l'alginate et l'alginate+talc après la même période d'exposition (Fig.39A,B). Il a donc été conclu que l'alginate assure une protection contre les rayonnements UV et que l'ajout d'argile ou de talc peut renforcer cet effet en agissant comme un écran supplémentaire, limitant davantage l'exposition des bactéries et les protégeant ainsi des effets nuisibles de ces rayonnements.



**Fig.39.** Effet de l'exposition aux rayons ultraviolets sur la survie de (A) B25 et (B) Pa encapsulées dans l'alginate, l'alginate+argile et l'alginate+talc. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

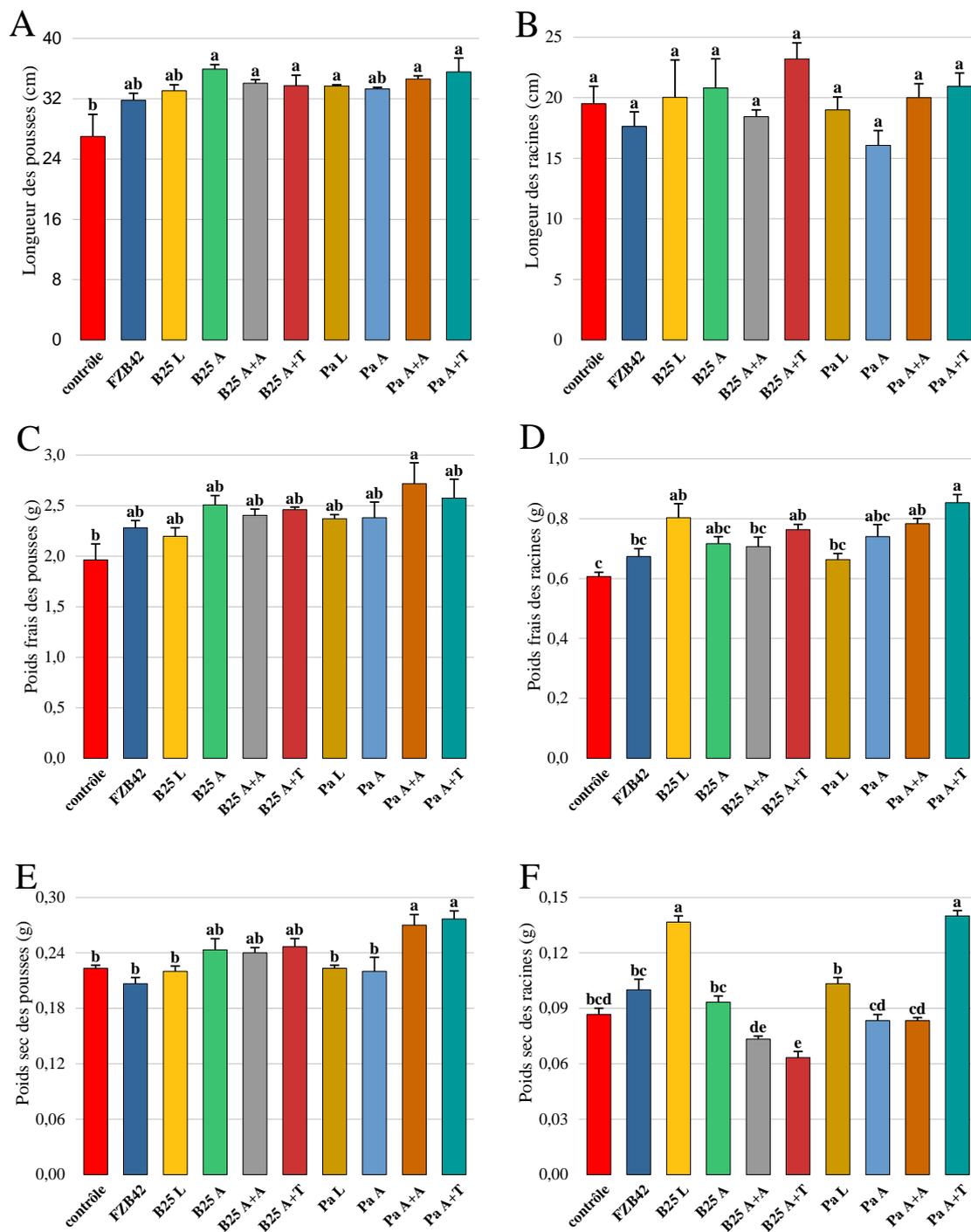
## 2.9. Réponse de la croissance du blé dur aux traitements par les rhizobactéries libres et encapsulées

### 2.9.1. Paramètres morphologiques

Des expériences en pot sous conditions contrôlées ont été menées afin d'évaluer l'impact de l'inoculation des deux souches encapsulées dans différentes matrices sur la croissance des plantes de blé dur (Fig.40). Selon nos résultats, les deux souches ont la capacité de stimuler de manière significative la hauteur, le poids frais et sec des pousses, comparé au contrôle négatif non inoculé et au contrôle positif inoculé par FZB42 (Fig.41A,C,E). Les billes de Pa contenue dans l'alginate+argile ont été les plus performantes pour améliorer la biomasse des plantes (Fig.41C,D,E,F). Toutefois, la longueur des racines n'a pas été significativement affectée par l'inoculation, tandis qu'une augmentation significative du poids frais et sec des racines a été constatée chez les plantes inoculées avec Pa encapsulée dans la matrice d'alginate+talc par rapport aux plantes des deux contrôles (Fig41B,D,F).



**Fig.40.** Effet de l'inoculation de B25 et Pa libres et encapsulées sur la croissance du blé dur.



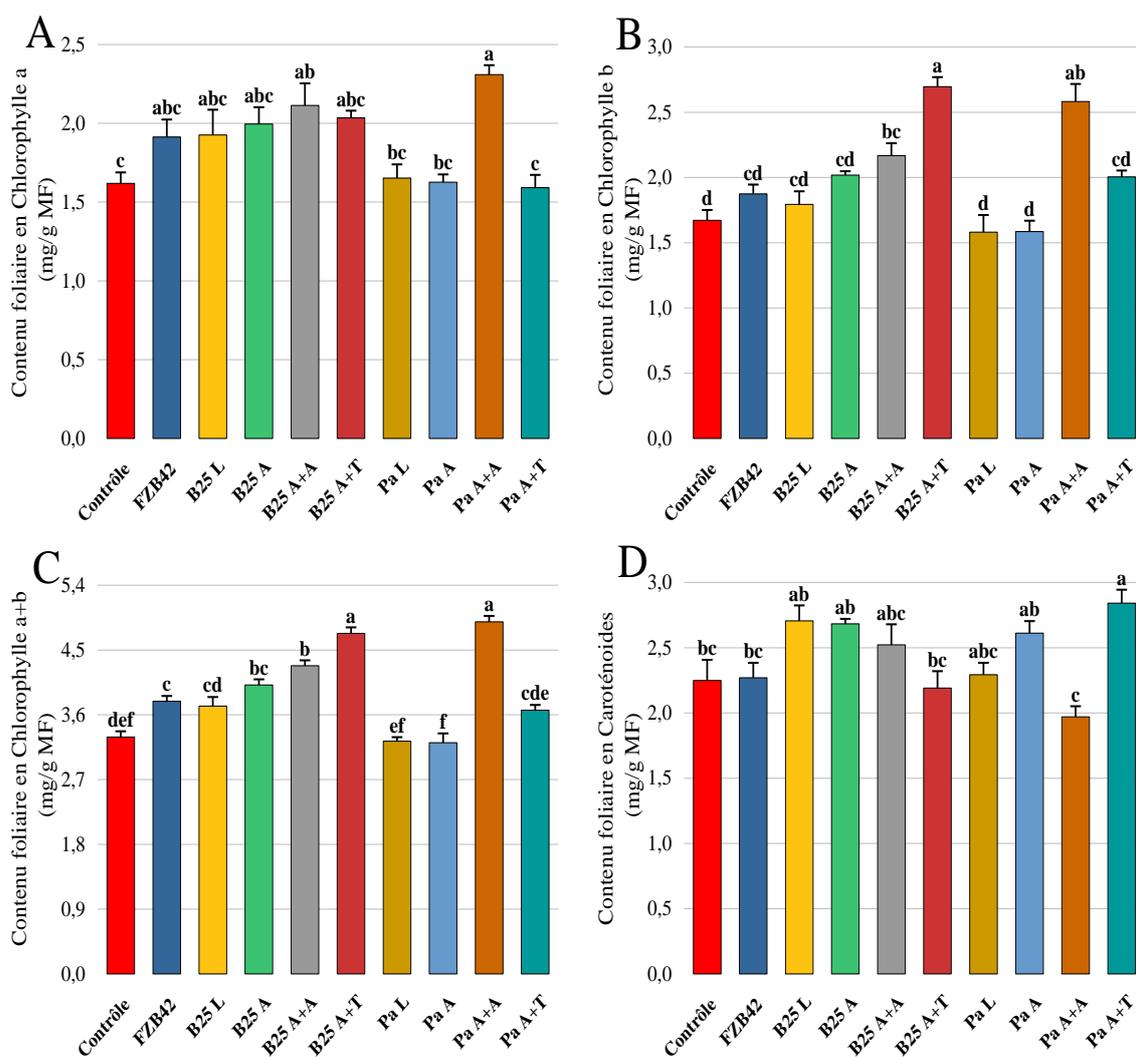
**Fig.41.** Effet de l'inoculation bactérienne par FZB42 et par B25 et Pa libres et encapsulées sur (A, B) la longueur des pousses et des racines (cm), (C, D) le poids frais des pousses et des racines (g) et (E, F) le poids sec des pousses et des racines des plantes de blé dur. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

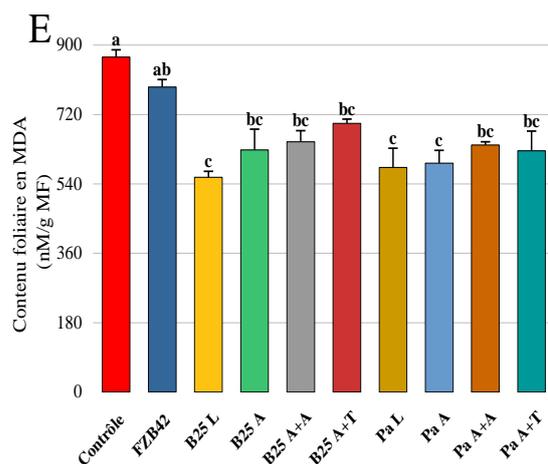
## 2.9.2. Paramètres biochimiques

### 2.9.2.1. Dosage des chlorophylles et de MDA

L'application des différentes billes de B25 et Pa sur le blé dur a entraîné une augmentation des teneurs en pigments chlorophylliens, à des niveaux variables. Les plantes inoculées avec Pa contenue dans les billes d'alginate+argile ont montré une amélioration significative des teneurs en chlorophylles a, b et totale, tandis que ce traitement a également réduit de manière significative les niveaux de caroténoïdes (Fig. 42A-D). Par contre, comparées aux contrôles, les plantes traitées avec Pa libre, ou avec Pa encapsulée dans l'alginate seul ou dans l'alginate+talc, n'ont pas montré d'effet significatif.

Les résultats du dosage de MDA indiquent que tous les traitements ont réussi à réduire sa teneur par rapport aux contrôles négatif et positif. Cette réduction est particulièrement marquée chez les traitements B25 L, Pa L et Pa A qui ont montré les plus fortes diminutions (Fig.42E).



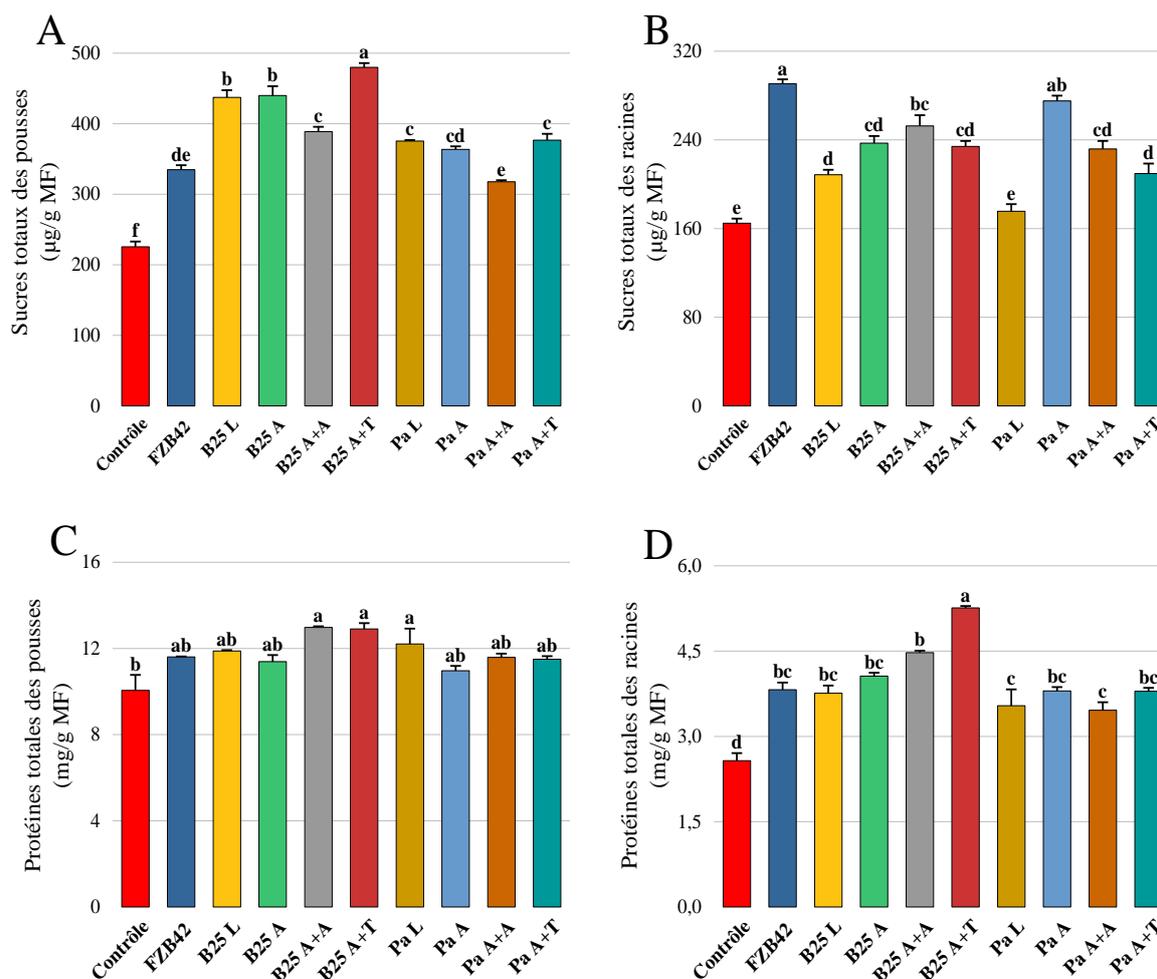


**Fig.42.** Effet de l'inoculation bactérienne par FZB42 et par B25 et Pa libres et encapsulées sur le contenu de (A) la chlorophylle a (mg/g MF), (B) la chlorophylle b (mg/g MF), (C) la chlorophylle a + b (mg/g MF), (D) les caroténoïdes (mg /g MF) et (E) MDA (nM/g MF) des plantes de blé dur. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

### 2.9.2.2. Dosages des sucres solubles et des protéines totales

L'évaluation des teneurs en sucres totaux a révélé que l'inoculation avait induit une augmentation significative des sucres solubles dans les racines et les pousses des plantes traitées, comparativement au contrôle négatif. En particulier, les plantes inoculées avec B25 encapsulée dans l'alginate+talc ont présenté des niveaux de sucres nettement plus élevés que ceux des autres traitements. Par contre, la quantité de sucres dans les racines des plantes inoculées avec Pa libre n'a pas montré de différence significative (Fig. 43A, B).

Concernant les protéines totales, les résultats ont révélé que l'inoculation avait induit une amélioration significative de la teneur en protéines des pousses et des racines par rapport au contrôle. La souche B25 encapsulée dans l'alginate+talc a montré les niveaux les plus élevés d'augmentation des protéines totales, tant dans les pousses que dans les racines (Fig. 43C, D).

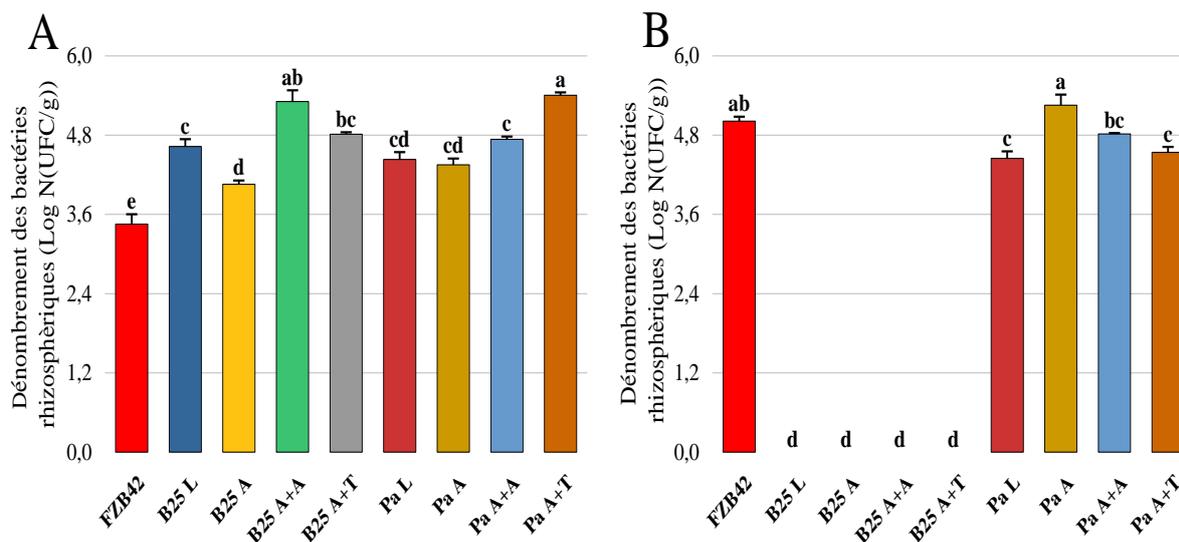


**Fig.43.** Effet de l'inoculation bactérienne par FZB42 et par B25 et Pa libres et encapsulées sur (A, B) la teneur en sucres solubles totaux ( $\mu\text{g/g MF}$ ) et (C, D) la teneur en protéines totales ( $\mu\text{g/g MF}$ ) des pousses et des racines des plantes de blé dur. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

### 2.9.3. Détermination de la colonisation rhizosphérique et endophytique racinaire

La densité bactérienne rhizosphérique endophytique a été analysée. L'évaluation de la charge bactérienne rhizosphérique a révélé que la densité bactérienne de B25 et de Pa est significativement plus élevée après 45 jours chez les traitements encapsulés d'alginate+argile et d'alginate+talc que chez les traitements libres et encapsulés dans l'alginate seul (Fig.44A). L'analyse des endophytes indique l'absence totale de B25, alors que Pa est fortement présente dans les tissus racinaires internes des plantes traitées avec les billes d'alginate seul et

d'alginate+argile par rapport à celles inoculées par Pa libre et Pa contenue dans des billes d'alginate+talc (Fig.44B).



**Fig.44.** Dénombrement des bactéries (Log N (UFC/g)) de (A) la rhizosphère et (B) de l'endosphère racinaire des plantes de blé dur inoculées avec FZB42, B25 et Pa libres et encapsulées. Les graphiques à barres représentent l'erreur standard moyenne de trois répétitions. OriginPro2022 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique, en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le post-test de comparaison multiple de Tukey. Les barres qui ne sont pas étiquetées avec les mêmes lettres sont significativement différentes entre les traitements selon le test HSD post hoc de Tukey.

## 2.10. Discussion

L'utilisation de matrices polymériques pour l'encapsulation des rhizobactéries constitue une approche prometteuse pour améliorer la performance des biostimulants en agriculture. Dans cette étude, différentes combinaisons d'alginate et d'additifs ont été examinées pour optimiser les propriétés des matrices d'encapsulation.

La spectroscopie infra-rouge a révélé des interactions significatives entre l'alginate et les divers additifs. La bande large à  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons O-H, indique la présence de groupes hydroxyles, et est modifiée dans le spectre de l'alginate+argile, ce qui suggère des contributions des groupes hydroxyles de l'argile (da Silva Fernandes et al., 2018). Les bandes dans la région  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ , typiquement associées aux vibrations des liaisons C-H, sont présentes dans tous les mélanges, indiquant l'incorporation de polymères dans la matrice d'alginate (Wulandari et al., 2023). La bande à  $1600\text{ cm}^{-1}$  est associée aux vibrations d'élongation des liaisons C=O (groupes carboxylates) présents dans l'alginate, et sa modification dans les autres spectres suggère une interaction entre les groupes carboxylates de l'alginate et ceux des différents additifs (Barreca et al.,

2014). Les spectres de la perlite et du talc ont montré une bande autour de  $1420\text{ cm}^{-1}$  qui est attribuée aux vibrations asymétriques des groupes carboxylates COO (Wang et al., 2020). La présence des bandes autour de  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques des vibrations C-O et C-O-C de l'alginate en tant que polysaccharide, son intensification dans le spectre de l'amidon est attribuée aux liaisons C-OH lors de l'incorporation de ce polymère avec l'alginate, tandis que la modification dans le spectre du talc est liée aux vibrations Si-O-Si et Mg-O-Si du talc, et celle du spectre de l'argile est associée aux vibrations Si-O des silicates d'aluminium (Lozano-Vazquez et al., 2020). Les petites bandes à  $950\text{ cm}^{-1}$  et  $800\text{ cm}^{-1}$  sont dues aux vibrations d'extension des liaisons C-O-C et des Si-O-Si, respectivement (Banu et al., 2018). L'argile, principalement composée de phyllosilicates, interagit avec l'alginate par des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques (Surya et al., 2019). Les groupes hydroxyles de l'argile peuvent former des ponts hydrogène avec les groupes carboxylates et hydroxyles de l'alginate, améliorant ainsi la cohésion de la matrice (Abd Rahim et al., 2013). De plus, les cations présents dans l'argile peuvent interagir avec les carboxylates de l'alginate, formant des liaisons ioniques qui renforcent la structure du composite (Adzmi et al., 2012). Des études montrent que ces interactions peuvent améliorer la stabilité thermique et mécanique des composites alginate-argile (Adzmi et al., 2012 ; Abd Rahim et al., 2013).

Le talc, un silicate de magnésium, interagit avec l'alginate principalement par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. Les groupes hydroxyles présents sur la surface du talc peuvent interagir avec les groupes carboxylates et hydroxyles de l'alginate, formant des liaisons hydrogène (Landman et Focke, 2006). De plus, les surfaces hydrophobes du talc peuvent s'associer avec les segments hydrophobes de l'alginate, améliorant la dispersion et la stabilité du composite (Tran et al., 2023). Les recherches indiquent que ces interactions peuvent augmenter la cristallinité et améliorer les propriétés de barrière des composites alginate+talc (Landman et Focke, 2006 ; Tran et al., 2023).

L'analyse DRX a révélé des différences significatives dans la cristallinité des échantillons. Les échantillons d'alginate, alginate+perlite, alginate+amidon et alginate+perlite+amidon ont montré une absence des pics distincts, ce qui suggère une absence des phases cristallines ou une faible cristallinité de ces additifs. Seuls les mélanges alginate+talc et alginate+argile montrent des phases cristallines bien définies. Les pics observés pour l'échantillon alginate+talc sont à :  $9,33^\circ$  ;  $28,52^\circ$  ;  $30,88^\circ$  ;  $41,05^\circ$  ;  $44,8^\circ$  ;  $50,42^\circ$  et  $50,99^\circ$  qui sont caractéristiques du plan cristallin du talc dont ceux à  $9,33^\circ$  ;  $28,52^\circ$  et  $30,88^\circ$  sont nets et étroits indiquant une bonne cristallinité et une dispersion homogène des additifs (Wang et al., 2015). Un pic typique des argiles a été observé à  $26,47^\circ$  notamment du

quartz qui est souvent présent dans les argiles naturelles dans l'échantillon de l'alginate+argile (Zhou et *al.*, 2018). Ainsi, le tracé DRX démontre la présence des pics moins intenses et peu larges sur les graphiques de l'alginate+talc et l'alginate+argile, suggérant une dispersion inhomogène ou des particules plus petites mais confirment une bonne incorporation des additifs (Čavajda et *al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que ces combinaisons pourraient offrir des propriétés améliorées à la bioformulation notamment des propriétés mécaniques et thermiques.

L'alginate a une capacité naturelle à former des gels homogènes en présence de cations divalents comme le calcium (Demircan et Oral, 2023). Cette propriété intrinsèque permet la formation des billes sphériques lorsque la solution d'alginate est dispersée dans une solution de chlorure de calcium, assurant une gélification uniforme et rapide (Demircan et Oral, 2023). Les interactions entre les groupes hydroxyles et carboxylates de l'alginate et les composants de l'argile améliorent la cohésion de la matrice, facilitant la formation de structures sphériques, les cations de l'argile peuvent également interagir avec les carboxylates de l'alginate, formant des liaisons ioniques qui renforcent la gélification et stabilisent la forme sphérique (Barreca et *al.*, 2014). Le talc, en tant que matériau inerte avec des surfaces hydrophobes, améliore la dispersion de l'alginate et favorise une gélification homogène. Les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes entre le talc et l'alginate assurent une distribution uniforme des particules de talc dans la matrice d'alginate, ce qui aide à maintenir la forme sphérique des billes (Smrdel et *al.*, 2008).

Afin d'évaluer l'effet des différents additifs sur la croissance bactérienne, *B. thuringiensis* B25 et *P. agglomerans* Pa ont été cultivés sur milieu LB en présence d'alginate, d'alginate+argile et d'alginate+talc. L'alginate à la concentration utilisée, n'a pas d'effet inhibiteur ou promoteur notable sur la croissance des deux bactéries ce qui est conforme aux études antérieures indiquant que l'alginate est une matrice neutre qui ne perturbe pas la croissance des micro-organismes (Adamiak et Sionkowska, 2023). De même, l'ajout de l'argile à l'alginate n'a pas d'impact significatif sur la croissance bactérienne bien que les argiles puissent parfois avoir un effet promoteur de la croissance bactérienne selon la composition et la concentration (Cardoso et *al.*, 2023). Le talc, combiné à l'alginate reste également neutre en terme d'interaction avec les bactéries, ce qui en est en accord avec la littérature sur l'utilisation du talc dans formulations biotechnologiques (Novinscak et Filion, 2020).

L'ensemble des billes obtenues après gélification présentaient une morphologie sphérique uniforme, une forme favorable pour l'application en agriculture assurant une distribution

homogène des biostimulants (Balla et *al.*, 2022). Les billes de Pa encapsulées dans l'alginate+talc avaient le diamètre le plus élevé avant et après séchage. Nos observations sont en accord avec ceux de Berninger et *al.* (2016), qui soulignent que la taille et la forme des billes peuvent être influencées par la méthode d'encapsulation et les additifs utilisés, en particulier, ce qui peut aboutir à une structure plus rigide, stable, conduisant également à des billes de plus grande taille. Le poids sec le plus important a été observé pour les billes d'alginate+argile, ceci peut être attribué à la capacité de l'argile à retenir l'humidité et à sa densité plus élevée par rapport à l'alginate (Wagner, 2013).

L'efficacité d'encapsulation a été très élevée pour toutes les formulations, variant entre 99,955% et 99,999%. Ces résultats concordent avec ceux de He et *al.* (2015), qui ont observé des résultats similaires pour *Raoultella planticola* Rs-2 encapsulée dans des composites de bentonite et d'alginate, ainsi qu'avec ceux de X. Li et *al.* (2017), qui ont rapporté une efficacité de 91,38 % pour *Pseudomonas putida* Rs-198 encapsulée dans la même matrice d'alginate et bentonite. Une efficacité élevée reflète une adhésion optimale des cellules à la matrice, ce qui se traduit par des performances d'encapsulation idéales. Ce résultat confirme la pertinence de la méthode utilisée pour retenir les bactéries dans la matrice d'alginate et ses combinaisons. Par ailleurs, les additifs employés renforcent cette encapsulation, garantissant ainsi une présence suffisante de bactéries viables dans les capsules (Szopa et *al.*, 2022). Les taux de survie des bactéries ont montré des différences notables entre les deux souches et les matrices utilisées. Pour B25, les taux de survie variaient entre 98,5% et 100% pour l'ensemble des matrices. En revanche, Pa encapsulée dans l'alginate seul avait un taux de survie significativement plus faible (77,971%). Ces résultats peuvent s'expliquer par les différences inhérentes entre les souches bactériennes et leurs interactions avec les matrices d'encapsulation. Pour la bactérie gram négative Pa, l'ajout d'argile et du talc en combinaison avec la proline en tant qu'osmoprotecteur a significativement amélioré le taux de survie comparé à l'alginate seul. En plus de son rôle dans la rétention d'eau, la proline aide à atténuer les effets du stress osmotique en agissant comme un osmolyte et une molécule antioxydante efficace (Hussain et *al.*, 2021). L'argile et le talc offrent une protection physique supplémentaire contre le stress environnemental et la dessiccation survenant durant l'étape du séchage des capsules, créant une barrière protectrice autour des bactéries encapsulées (S.Li et *al.*, 2021). Cette barrière peut réduire la perte d'eau rapide et protéger les cellules bactériennes contre les variations de température et d'humidité (Fossum, 2020). En effet, l'argile et le talc ont une capacité de rétention d'eau élevée, ce qui aide à maintenir un microenvironnement hydraté autour des cellules bactériennes pendant le processus de séchage (Goss et *al.*, 2003 ;

Pushpadass et *al.*, 2008). Cette rétention d'eau supplémentaire peut minimiser le stress osmotique et aider à préserver la viabilité cellulaire. De plus, les particules d'argile et de talc possèdent des surfaces chargées qui peuvent interagir avec les membranes bactériennes stabilisant ainsi les cellules en réduisant les dommages pendant le processus de dessiccation (Mueller, 2015 ; Wang et *al.*, 2020).

Les résultats de la survie des bactéries encapsulées après un stockage de 12 mois à 4°C montrent des différences significatives entre les matrices d'encapsulation et les souches bactériennes. B25 a révélé une robustesse et une viabilité élevée dans toutes les matrices avec une survie exceptionnelle dans la matrice d'alginate seul. Les résultats obtenus pour B25 sont comparables à ceux rapportés par W.Zhang et *al.* (2023), où une survie élevée de *Bacillus pumilus* G5 dans des capsules d'alginate-trehalose-kaolin a été observée après 180 jours de stockage à 4°C. L'alginate, l'argile et le talc semble fournir une barrière physique similaire qui protège les bactéries et aide à maintenir un gel hydraté autour des cellules encapsulées. La matrice d'alginate est connue pour ces propriétés biocompatibles et sa capacité à former un gel stable qui protège les bactéries encapsulées des conditions extérieures (Lambrese et *al.*, 2024). Cette protection peut être plus efficace pour les bactéries sporulantes comme *Bacillus* qui possède une résistance naturelle aux conditions de stress (Saber Riseh et *al.*, 2021). La réduction drastique de la survie dans la matrice d'alginate pour Pa peut être due à la sensibilité accrue des gram-négatives à la dessiccation et à d'autres stress liés à la cryoconservation (Berninger et *al.*, 2018). La survie de Pa dans la matrice d'alginate seul est plus en ligne avec les résultats observés par Stella et *al.* (2019), où la population microbienne de quatre bactéries Gram-négatives immobilisées dans l'alginate enrichi en engrais organique a diminué de manière significative après un stockage prolongé, passant de  $10^{12}$  UFC/g à  $10^6$  UFC/g après 413 jours. Le stress osmotique peut endommager les membranes cellulaires, les protéines et l'ADN pendant le stockage suite à la formation des ROS (Poole, 2012), les bactéries encapsulées peuvent être protégées de ce stress oxydatif par la proline qui aide à stabiliser les protéines et les structures cellulaires, comme elle peut agir en tant que piègeur des ROS en cas de leur présence (Rejeb et *al.*, 2014). Pour B25, la formation de spores est un avantage majeur, car les spores sont extrêmement résistantes aux conditions défavorables, y compris à la dessiccation et à la conservation à basse température pendant de longues périodes (Etesami et *al.*, 2023b). En revanche, les bactéries gram-négatives comme Pa sont plus sensibles aux conditions de stockage prolongées à basse température en partie à cause de leur membrane externe plus complexe et vulnérable (Han et *al.*, 2023).

La matrice d'argile a permis de maintenir une survie stable après 12 mois de stockage. Grâce à ces propriétés physiques et chimiques, l'argile semble offrir une protection supplémentaire, particulièrement aux bactéries Gram-négatives. Les minéraux argileux peuvent non seulement fournir des nutriments essentiels mais aussi interagir avec les membranes bactériennes, stabilisant ainsi les cellules et réduisant les dommages oxydatifs pendant le stockage (Sandalci et *al.*, 2021). Le talc, similaire à l'argile, contient des minéraux qui peuvent aider à stabiliser les membranes bactériennes et à réduire les effets de la dessiccation. Les interactions spécifiques entre les particules du talc et les membranes bactériennes pourraient offrir une protection optimale contre le stress osmotique (Bejarano et *al.*, 2017). Des études complémentaires ont montré qu'après 8 mois de stockage, la population de *Pseudomonas fluorescens* Pf1 dans une formulation à base de talc a diminué de  $37,5 \times 10^7$  UFC/g à  $1,3 \times 10^7$  UFC/g (Nakkeeran et *al.*, 2006). De même, *P.putida* dans une formulation à base de talc après 45 jours de conservation ne présentait que  $1,0 \times 10^3$  UFC/g (Amer et Utkhede, 2000). Alors qu'après 6 mois d'incubation à 4°C, les souches *P.kilonensis* PK11 et *P. putida* PP20 présentaient une survie de  $27,4 \times 10^8$  UFC/g et  $2,3 \times 10^8$  UFC/g dans un support d'alginate et de charbon naturel, tandis que dans le support d'alginate+nanoargile elles présentaient respectivement  $22,7 \times 10^8$  UFC/g et  $21,4 \times 10^8$  UFC/g (Safari et *al.*, 2020).

La cryoconservation à 4°C à long terme peut avoir des effets sur la physiologie et le métabolisme des bactéries, la basse température ralentit considérablement les processus métaboliques des bactéries (Dijkstra et *al.*, 2011). De ce fait, la préservation des activités de promotion de la croissance des plantes *in vitro* par les bactéries encapsulées est cruciale pour évaluer leur efficacité après stockage. Les observations sont importantes pour comprendre l'impact des différentes matrices sur la préservation des activités PGP des bactéries encapsulées.

La cessation de production de sidérophores dans la matrice d'alginate après 6 mois peut être attribuée aux effets du stress osmotique. Pendant la cryoconservation, la dessiccation peut induire des modifications dans l'expression des gènes responsables de la synthèse des sidérophores, en altérant les processus métaboliques essentiels (Höper et *al.*, 2006). De plus, le stress osmotique peut générer des ROS qui endommagent l'ADN et réduisent l'expression des gènes PGP (Scales et *al.*, 2023). Les conditions de stress peuvent perturber les mécanismes de régulation génique, diminuant ainsi la capacité des microorganismes à synthétiser des sidérophores de manière efficace (Wu et *al.*, 2023).

Chez Pa, la cessation de la production de sidérophores dans la matrice d'alginate peut également être attribuée à la diminution de la population microbienne dans les capsules au fil

du temps. Cette diminution influence le quorum sensing, un mécanisme de communication bactérienne dépendant de la densité cellulaire (Saiko, 2021). Les sidérophores peuvent agir comme des autoinducteurs de quorum chez certaines bactéries, et une densité réduite peut entraîner une réduction de la production en raison de l'absence de stimulation par ces molécules signal (Guan et al., 2000). La diminution de la densité bactérienne affecte également la synthèse de l'AIA de manière négative (Hanh et Mongkolthanaruk, 2017), qui, en plus de l'effet des conditions stressantes du stockage sur la répression de l'induction de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de l'AIA (Duca et Glick, 2020), expliquent la faible production de cette phytohormone par Pa.

La solubilisation du phosphate par les rhizobactéries dépend largement de l'espèce bactérienne et de sa physiologie, ainsi que des mécanismes utilisés pour la solubilisation, tels que la production d'acides organiques et de phosphatases (Kalayu, 2019 ; Pan et Cai, 2023). Safari et al. (2020) ont montré que la capacité à solubiliser le phosphate est proportionnelle à la densité bactérienne, et qu'il existe une forte corrélation entre cette capacité et la synthèse des phosphatases. Ainsi, l'efficacité des phosphobactéries peut être liée à une production continue d'acides organiques (Rawat et al., 2021)

Le rôle des matrices contenant l'argile et le talc contre les effets néfastes de la dessiccation est évident dans la préservation des activités métaboliques et fonctionnelles des bactéries, nos observations soutiennent l'idée que les matrices enrichies en minéraux comme l'argile et le talc offrent une meilleure préservation des activités PGP. Des études antérieures renforcent ces observations, Young et al. (2006) ont démontré que l'amendement d'une formulation d'alginate avec de l'acide humique améliorerait la capacité de solubilisation du phosphate par *B. subtilis* après 5 mois de stockage. Ainsi l'inclusion des additifs de nanoargile à la matrice d'alginate explique l'effet similaire chez les deux souches *P. putida* et *P. kilonensis* sur la solubilisation du phosphate tricalcique et l'hydroxyapatite (Safari et al., 2020).

Les taux de gonflement obtenus étaient plus importants que ceux rapportés par Meftah Kadmiri et al. (2021), qui variaient entre 61,5% ( $\pm 1,35\%$ ) et 36,5% ( $\pm 5\%$ ), alors que des taux plus élevés ont été obtenus dans d'autres études (Tu et al., 2016 ; He et al., 2017). Les différences de gonflement observées peuvent être attribuées aux propriétés inhérentes des matrices. Les groupes hydroxyles (-OH) présents dans l'alginate de sodium jouent un rôle crucial dans le processus de gonflement des capsules (Ray et al., 2020). Ces groupes -OH peuvent former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau, ce qui entraîne un gonflement du matériau (Ray et al., 2020). Lorsque les capsules entrent en contact avec l'eau,

les liaisons hydrogène entre les groupes -OH de l'alginate et les molécules d'eau entraînent une expansion du réseau polymère, augmentant ainsi le volume des capsules (Rosiak et *al.*, 2021). L'argile et le talc augmentent la capacité d'absorption d'eau de l'alginate en raison de leurs structures minérales poreuses et de leur capacité à retenir l'eau (Hood et *al.*, 2022). Ces additifs augmentent la surface spécifique des capsules, facilitant une absorption d'eau plus rapide et plus importante (Guo et *al.*, 2018).

La densité plus faible et la structure plus lâche des capsules d'alginate seul peuvent entraîner une rétention d'eau moins efficace, conduisant à un gonflement plus étendu mais moins rapide (Lee et *al.*, 2000). En revanche, les matrices alginate+argile et alginate+talc, plus compactes et structurées, atteignent leur capacité maximale d'absorption d'eau plus rapidement et stabilisent leur taille plus tôt (Rashidzadeh et *al.*, 2014).

Les exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries encapsulées B25 et Pa (Cherif-Silini et *al.*, 2016 ; Cherif-Silini et *al.*, 2019) jouent également un rôle important dans l'absorption d'eau et le gonflement des capsules. Ces EPS, qui sont des polymères de sucres excrétés par les bactéries, peuvent créer un environnement hydrophile autour des cellules bactériennes et interagir avec les molécules d'eau et les matrices environnantes, augmentant ainsi la capacité de rétention d'eau des capsules (Silva et *al.*, 2019). Les interactions potentielles entre les EPS et les matrices d'alginate, d'argile ou du talc peuvent également renforcer la structure des capsules et améliorer leur capacité de rétention d'eau (Costa et *al.*, 2018).

La cinétique de libération de B25 et de Pa à partir des différentes matrices montre des phases distinctes et des tendances variées. La libération des bactéries se déroule principalement par un mécanisme de diffusion. Le contact des billes avec l'eau entraîne un gonflement et augmente l'hydratation des billes (He et *al.*, 2015). Ce processus crée un gradient de concentration d'eau entre l'intérieur et l'extérieur des billes (Pérez-Luna et González-Reynoso, 2018). Le déplacement des bactéries est provoqué par la pression osmose créée par l'absorption d'eau. Les bactéries suivent un gradient de concentration, se diffusant de l'intérieur vers l'extérieur des billes (He et *al.*, 2015). Ces résultats mettent en évidence l'impact de la charge bactérienne dans les billes et la composition des matrices sur la dynamique de libération des bactéries. La phase initiale rapide de B25 peut être attribuée à un taux de diffusion plus élevé de l'eau, facilitant le gonflement et la libération des bactéries à partir des matrices plus poreuses (Berninger et *al.*, 2016). La phase de stabilisation suggère que les bactéries restantes sont plus étroitement liées à la matrice (Berninger et *al.*, 2016). Pour Pa, le gonflement progressif des billes en contact d'eau créant un gradient initialement fort favorise une libération rapide des bactéries ce qui explique la phase initiale

d'augmentation de la libération (Colin et *al.*, 2024). Les billes absorbent une quantité maximale d'eau et atteignent leur capacité de gonflement optimale, la saturation en eau à l'intérieur des billes réduit le gradient de concentration, ralentissant ainsi la diffusion des bactéries (Colin et *al.*, 2024).

La charge bactérienne initiale à l'intérieur des billes joue un rôle décisif dans la diffusion du grand nombre de bactéries viables. Une densité bactérienne élevée favorise une libération accrue, garantissant qu'un plus grand nombre de bactéries atteignent l'environnement cible (Wu et *al.*, 2012). Cela est essentiel pour maintenir une concentration effective d'inoculants, ce qui est déterminant pour les applications agricoles où l'efficacité des PGPR dépend de leur capacité à coloniser rapidement les racines des plantes et à exercer leurs effets bénéfiques (Alori et *al.*, 2017).

Le test d'exposition aux rayonnements UV est essentiel pour évaluer la résistance des bioformulations utilisées comme inoculants en agriculture. Les résultats de l'étude montrent que les différentes bioformulations présentent des variations minimales de viabilité après 4 heures d'exposition aux UV. Nos observations concordent bien avec celles de Zohar-Perez et ses collègues (2003), dont l'encapsulation de *Pantoea agglomerans* et de *Trichoderma harzianum* dans des billes d'alginate-glycérol enrichies en kaolin a permis d'obtenir une meilleure survie lors de l'exposition aux rayons UV par rapport aux billes d'alginate-glycérol. Les rayonnements UV sont un facteur de stress environnemental majeur pouvant affecter négativement les inoculants microbiens (Idris et *al.*, 2024). Ces rayonnements sont particulièrement intenses et fréquents dans plusieurs régions du monde, telles que le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient, l'Australie, et certaines parties du continent américain, où les activités agricoles sont répandues (Bornman et *al.*, 2019 ; Grant et *al.*, 2019).

Les rayonnements UV peuvent induire la formation des dimères de thymine dans l'ADN bactérien, conduisant à des mutations et des dysfonctionnements cellulaires (Gaul et Svejstrup, 2021). Ces dommages réduisent la viabilité des inoculants microbiens, compromettant leur capacité à coloniser la rhizosphère et les racines des plantes et à exercer leurs effets bénéfiques (Stark et Hart, 2003 ; Chen et *al.*, 2011). Il est donc crucial de protéger ces bactéries des rayonnements UV pour maintenir leur viabilité et leur efficacité sur le terrain. Les bioformulations testées dans cette étude comprennent l'alginate, l'alginate+argile et l'alginate+talc, offrant chacune une protection contre les rayonnements UV. La structure en réseau de l'alginate offre une protection de base en créant une barrière physique réduisant la pénétration des rayons UV (Saber Riseh et *al.*, 2021). En plus, l'alginate peut absorber les rayonnements UV principalement grâce à ses propriétés chimiques et physiques, sa nature

polysaccharidique composée de résidus d'acide mannuronique (M) et d'acide guluronique (G), qui possèdent des groupes fonctionnels capables d'interagir avec les rayonnements UV (Draget et *al.*, 2006). Les groupes fonctionnels présents dans les unités M et G, tels que les groupements carboxyle (-COOH) et hydroxyle (-OH), peuvent absorber les photons UV (Salgado et *al.*, 2007). Ces groupes sont capables de transférer l'énergie des photons absorbés à la structure du polymère (Salgado et *al.*, 2007), ce qui peut réduire l'intensité du rayonnement qui atteint les bactéries encapsulées. L'alginate peut former des complexes avec des cations tels que  $\text{Ca}^{2+}$  utilisés dans la gélification des capsules d'alginate. Ces complexes peuvent également contribuer à l'absorption des UV en modifiant les propriétés optiques du matériau (Cendon et *al.*, 2021).

L'ajout d'argile ou de talc à la matrice d'alginate améliore les propriétés protectrices. Les particules d'argile au sein de la matrice d'alginate dispersent et absorbent les rayonnements UV, réduisant ainsi la quantité de lumière UV qui pénètre dans la capsule et atteint les bactéries (Oleyaei et *al.*, 2016). Cet effet de dispersion est dû à la composition minérale de l'argile, capable de refléter et d'absorber différentes longueurs d'onde de la lumière UV (Oleyaei et *al.*, 2016). De même, les silicates de magnésium hydratés du talc contribuent également à la protection contre les UV. Les fines particules du talc dispersées dans la matrice d'alginate augmentent l'effet de protection contre les UV en réfléchissant et en absorbant les rayons UV (López-galindo et Viseras, 2004). Cette double action de dispersion et d'absorption aide à protéger efficacement les bactéries encapsulées. Les résultats de la résistance à l'exposition de 4 heures aux UV suggèrent une bonne indication de la robustesse des capsules. L'alginate et ces combinaisons avec l'argile et le talc peuvent garantir une proportion élevée de bactéries viables survivant dans des conditions de terrain.

Les expériences en pots sous conditions contrôlées permettent d'évaluer précisément l'impact des traitements expérimentaux sur la croissance des plantes, en minimisant les variations environnementales tout en contrôlant les facteurs de croissance. Cela garantit que les différences observées dans les paramètres de croissance des plantes sont principalement dues aux traitements appliqués (Junker et *al.*, 2015). Dans ce contexte, nos expériences en pot ont été réalisées sur le blé dur vu sa grande importance économique et son implication dans la sécurité alimentaire et l'agriculture durable.

Nos résultats ont démontré que les matrices d'encapsulation ont un impact crucial sur l'efficacité des bactéries inoculées. Les bactéries encapsulées dans les matrices d'alginate+argile et d'alginate+talc ont montré des performances supérieures par rapport aux autres traitements. Les billes d'alginate+argile de Pa ont été les plus performantes pour

améliorer la biomasse des plantes, notamment celle du système aérien. Les pousses du blé sont essentielles pour la photosynthèse et la production de biomasse, influençant directement le rendement final de la plante. Une augmentation de la hauteur et de la biomasse des pousses se traduit par une plus grande surface foliaire pour la photosynthèse, conduisant à une croissance plus vigoureuse et potentiellement à un rendement accru (Simkin et al., 2019). La supériorité de Pa peut être due d'une part à sa capacité de promouvoir la croissance des plantes, et, d'autre part aux propriétés nutritives de l'argile.

Les mécanismes de promotion de la croissance du blé par *P. agglomerans* et *B. thuringiensis* diffèrent. Pa produit de l'AIA, une auxine qui stimule la division et l'élongation cellulaire, augmentant ainsi la hauteur des plantes (Luziatelli et al., 2020). La production de cytokinine et de l'acide phenylacétique par Pa peut également jouer un rôle dans la croissance des pousses. Les cytokinines peuvent promouvoir la division cellulaire en retardant la sénescence (Yang et al., 2021). De même, l'acide phenylacétique influence positivement les parties aériennes végétales, comme il peut avoir un impact sur la germination des graines en stimulant l'élongation de la coléoptile du blé (Perez et al., 2023). Pa a prouvé sa grande capacité à solubiliser le phosphate insoluble, augmentant ainsi sa disponibilité essentielle pour les plantes. Le phosphate est déterminant pour le développement des plantes, il se trouve dans tous les tissus végétaux et rentre dans la composition des acides nucléiques, des enzymes, des coenzymes et des phospholipides (Timofeeva et al., 2022a). Les sidérophores produits par Pa rendent le fer plus disponible pour la plante, ce qui est essentiel pour de nombreux processus métaboliques comme la respiration et la photosynthèse (Timofeeva et al., 2022b). Pour B25, sa capacité à fixer l'azote et à solubiliser le phosphate en plus de sa production de sidérophores expliquent son effet probiotique sur le blé (Saadaoui et al., 2022). De plus, *B. thuringiensis* peut induire une résistance systémique chez les plantes, les rendant plus résistantes aux stress biotiques et abiotiques, ce qui peut indirectement favoriser une meilleure croissance (Wang et al., 2020).

L'ajout d'argile et du talc à la matrice d'alginate améliore les propriétés protectrices et l'apport en nutriments des capsules. Lors de l'arrosage, les billes absorbent de l'eau, gonflent et relâchent le réseau d'alginate, facilitant la diffusion des bactéries la dissolution et la libération progressive des nutriments dans le sol environnant (Wu et al., 2012). Les minéraux libérés des capsules comme le calcium, le magnésium, le potassium et le zinc jouent des rôles spécifiques dans les processus métaboliques des plantes (Murray, 2006). Le calcium (Ca) est essentiel pour la structure des parois cellulaires et le fonctionnement des membranes cellulaires (Hepler et Winship, 2010), alors que le magnésium (Mg) constitue un composant

central de la chlorophylle et un élément déterminant pour la photosynthèse (Bohn et *al.*, 2004). Le potassium (K) régule l'ouverture et la fermeture des stomates, affectant la transpiration et l'absorption des nutriments (Rawat et *al.*, 2022). Le fer (Fe) et le zinc (Zn) sont essentiels pour la synthèse de la chlorophylle, des protéines et des enzymes (Clemens, 2022 ; Zia-ur-Rehman et *al.*, 2023). Le silicium (Si) contenu dans le talc renforce la structure cellulaire des plantes, améliorant leur résistance aux stress abiotiques et biotiques (Bybordi, 2012).

Il est important de noter que nos souches ont montré une robustesse et une efficacité supérieure par rapport à *B.velezensis* FZB42, un biofertilisant commercial bien établi, réputé pour produire des phytohormones, des sidérophores et des antibiotiques naturels, ce qui en fait un agent efficace pour améliorer la croissance végétale (Fan et *al.*, 2018). Il a été rapporté que le FZB42 a des effets positifs sur le biocontrôle et l'amélioration de la croissance dans des essais au champ sur le blé (Talboys et *al.*, 2014 ; Gu et *al.*, 2017). Cette performance accrue résulte de mécanismes optimisés de libération des bactéries encapsulées, d'une protection renforcée contre les stress environnementaux et d'une efficacité supérieure des activités favorisant la croissance des plantes. Par conséquent, les résultats révèlent une augmentation significative du poids frais et sec des racines des plantes inoculées avec Pa encapsulée dans une matrice d'alginate et de talc. L'effet combiné des phytohormones secrétées par Pa et des minéraux de la matrice sont à l'origine de cette augmentation. Le poids des racines est un indicateur clé de la santé et de la vigueur des plantes. Des racines plus développées peuvent explorer un plus grand volume du sol, absorbant plus d'eau et de nutriments, ce qui stimule une croissance robuste des pousses (Fageria et Moreira, 2011).

Les plantes inoculées avec Pa encapsulée dans l'alginate+argile ont montré une amélioration significative des teneurs en pigments chlorophylliens. Cette augmentation indique une amélioration de l'activité photosynthétique. Il a été rapporté que l'amélioration de la nutrition minérale de la plante en solubilisant le phosphate et le zinc ou en synthétisant des sidérophores favorise la synthèse des chlorophylles. Le fer est impliqué dans la formation de plusieurs complexes chlorophyllo-protéiques nécessaires à la photosynthèse. Une carence en fer peut entraîner une chlorose (jaunissement des feuilles) (Z.Zhang et *al.*, 2023). Le phosphore est vital pour le transfert d'énergie chez les plantes et est directement impliqué dans la synthèse de la chlorophylle. Il aide à la formation d'ATP et de NADPH, nécessaire au processus de la photosynthèse et une carence de cet élément peut limiter l'approvisionnement en énergie pour la synthèse de la chlorophylle, entraînant une croissance médiocre des plantes (Frydenvang et *al.*, 2015). En outre, le zinc constitue une composante structurelle de plusieurs

protéines et enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle, ce qui améliore l'efficacité photosynthétique (Umair Hassan et *al.*, 2020). Ainsi, l'induction des réponses antioxydantes chez les plantes peut également influencer la teneur en chlorophylles, les bactéries peuvent réduire les dommages oxydatifs dans les cellules chlorophylliennes en augmentant la stabilité et la concentration des pigments (Fukami et *al.*, 2018). L'amélioration de la nutrition et la réduction du stress oxydatif contribuent à l'augmentation de la surface foliaire, offrant plus d'espace pour la synthèse et l'accumulation des chlorophylles. Une plus grande surface foliaire permet une meilleure capture de la lumière et augmente l'efficacité de la photosynthèse (Evans, 2013).

La réduction de la teneur en MDA indique une diminution des dommages oxydatifs. Tous les traitements ont réussi à réduire les niveaux de MDA par rapport aux contrôles négatif et positif, avec des réductions particulièrement marquées chez B25 et Pa libres et Pa encapsulée dans l'alginate. La production des enzymes antioxydantes, l'induction des réponses de défense systémiques et des mécanismes de réparation et protection cellulaires sont impliquées dans la réduction de la teneur en MDA chez les plantes par les rhizobactéries (Gomathi et *al.*, 2012 ; H.Q.Li et *al.*, 2017). La diminution des niveaux de MDA permet aux plantes de blé de mieux résister aux stress environnementaux augmentant leur croissance et leur rendement (HongBo et *al.*, 2005).

La teneur accrue en sucres dans les racines et les pousses indique une meilleure nutrition et un métabolisme actif, favorisant la croissance et la résilience des plantes. Les sucres sont des composants clés du métabolisme énergétique et sont essentiels pour la formation des parois cellulaires et des structures végétales (Chen et *al.*, 2021). L'augmentation de la disponibilité des nutriments et l'amélioration de la photosynthèse conduisent à une production accrue des sucres (Iqbal et *al.*, 2024), une meilleure photosynthèse permet aux plantes de synthétiser et d'accumuler plus de glucides, essentiels pour la croissance et le métabolisme (Iqbal et *al.*, 2024). Ainsi, la sécrétion des enzymes hydrolytiques facilite la décomposition de la matière organique et la libération des sucres solubles, qui peuvent être absorbés par les plantes et utilisés comme source d'énergie et de carbone (Neemisha et Sharma, 2022). Par ailleurs, les améliorations observées dans les teneurs des protéines sont attribuées à une combinaison de mécanismes physiologiques et biochimiques induits par les deux bactéries testées. L'amélioration de l'absorption de l'azote, du fer et d'autres nutriments favorise la biosynthèse des protéines (Rochlani et *al.*, 2022). De plus, en réduisant le stress oxydatif, les bactéries inoculées permettent une allocation plus

efficace des ressources métaboliques vers la synthèse des protéines plutôt que vers la réparation des dommages cellulaires (Desoky et *al.*, 2020).

Le processus de colonisation est fortement influencé par l'affinité spécifique entre la bactérie et la plante hôte (Ahmad et *al.*, 2011). Nos résultats mettent en évidence la compatibilité entre les deux souches testées, FZB42 et le blé dur. Les résultats de la colonisation endophytique ont montré que Pa encapsulée dans les billes d'alginate seul et d'alginate+argile présente une meilleure colonisation par rapport aux autres traitements. La littérature a rapporté que *P. agglomerans* est souvent retrouvée à des densités de  $10^6$  à  $10^9$  UFC/g dans la rhizosphère et de  $10^4$  à  $10^8$  UFC/g dans les tissus internes des racines (Soluch et *al.*, 2021). Dans une autre étude, la souche *P. agglomerans*YS19 a colonisé l'endosphère racinaire du riz à une densité de  $3,6 \times 10^7$  UFC/g (Zhang et *al.*, 2010). *P. agglomerans* est très connue pour sa capacité à coloniser efficacement la rhizosphère et les tissus internes du blé (Soluch et *al.*, 2021). Son succès en tant qu'endophyte s'explique par plusieurs mécanismes dont le chimiotactisme et le quorum sensing (Zhang et *al.*, 2010). Le chimiotactisme permet à Pa de détecter et de se déplacer en réponse à des gradients chimiques provenant des exsudats racinaires (Sun et *al.*, 2022). Ces exsudats racinaires, composés de sucres, d'acides organiques et d'autres métabolites, attirent les bactéries vers les racines et favorisent leur colonisation en fournissant les nutriments essentiels (Sun et *al.*, 2022). Le quorum sensing quant à lui, permet à Pa de réguler l'expression de gènes impliqués dans la colonisation, la formation de biofilm et à la production de métabolites secondaires bénéfiques (Zouagui et *al.*, 2024). Ces deux mécanismes de communication cellulaire permettent une coordination collective, essentielle pour la formation de biofilms protecteurs et la colonisation réussie.

B25, bien qu'elle soit très efficace en tant que PGPR, n'est pas endophyte typique du blé. B25 ne pénètre pas facilement dans les tissus internes des racines de blé. Cela peut être dû à des différences dans les mécanismes d'adhésion cellulaire et de reconnaissance par les plantes hôtes, ou à une incapacité à surmonter les barrières physiques et chimiques des tissus végétaux (Al-Hawamdeh et *al.*, 2024). Sa colonisation de la rhizosphère est facilitée par sa production de spores résistantes et sa capacité à former des biofilms sur le système racinaire en plus de sa grande capacité à communiquer avec la plante *via* les chimio-effecteurs émis par les exsudats racinaires (Tsotetsi et *al.*, 2022).

Les bactéries encapsulées bénéficient d'une protection physique contre les conditions environnementales défavorables d'une libération lente et progressive, assurant une colonisation plus efficace et soutenue et une présence prolongée dans la rhizosphère (Saberri Riseh et *al.*, 2021). Les bactéries encapsulées ont un potentiel de multiplication plus élevé

grâce à une libération progressive assurant une colonisation continue (Saberri Riseh et *al.*, 2021). En revanche, les bactéries libres peuvent être rapidement dispersées et exposées à des conditions défavorables, réduisant leur nombre (Santoyo et *al.*, 2021).

**CONCLUSION GÉNÉRALE ET  
PERSPECTIVES**

Cette recherche a démontré la faisabilité de développer des bioinoculants microbiens en encapsulant deux souches bactériennes, *B. thuringiensis* B25 et *P. agglomerans* Pa, dans des matrices d'alginate. En utilisant la technique de gélification ionique, des formulations innovantes ont été élaborées, offrant des systèmes robustes pour piéger et libérer progressivement les bactéries encapsulées.

L'ajout de la proline s'est révélé déterminant, améliorant significativement la survie bactérienne lors du processus de séchage. Cette amélioration s'est également maintenue pendant le stockage de longue durée, en particulier pour la bactérie Gram-négative *P. agglomerans*, connue pour sa sensibilité accrue aux contraintes environnementales. Par ailleurs, les activités PGP des bactéries ont été globalement préservées tout au long de la période de stockage, un aspect innovant et rarement abordé dans les études antérieures. L'analyse physico-chimique a mis en évidence des interactions structurales spécifiques entre l'alginate et les additifs (argile et talc), influençant favorablement la stabilité et les performances des capsules. De plus, ces additifs ont joué un rôle clé dans l'amélioration des formulations, en stabilisant les capsules et en augmentant de manière significative la survie à long terme et la performance *in vivo* de *P. agglomerans*, ce qui démontre que l'incorporation d'additifs peut pallier les faiblesses des bactéries Gram-négatives. Ces bioformulations ont également offert une protection substantielle contre les effets néfastes des rayonnements UV, garantissant ainsi la persistance et l'efficacité des bactéries dans des conditions potentiellement hostiles.

Les bactéries encapsulées ont démontré une capacité notable à coloniser efficacement les racines d'*Arabidopsis thaliana* et du blé dur, grâce à une libération progressive et contrôlée des cellules viables à partir des capsules. Cette libération maîtrisée a permis d'assurer une interaction optimale entre les bactéries encapsulées et les plantes. Par comparaison, bien que l'inoculation par des bactéries libres ait montré des effets positifs sur la croissance végétale, elle a été limitée par une colonisation moins stable et une moindre efficacité dans l'amélioration des paramètres morpho-biochimiques des plantes. En revanche, les bactéries encapsulées ont montré une capacité supérieure à coloniser les racines et à maintenir des niveaux élevés d'efficacité. Ces résultats confirment l'efficacité des bioformulations développées dans la promotion d'une agriculture durable.

Pour les perspectives, des essais à grande échelle en conditions réelles de champs sont nécessaires pour valider d'avantages ces formulations et optimiser leur performance. Une attention particulière pourrait être portée à l'étude de l'effet des bactéries encapsulées sur la modulation du microbiome indigène, afin de mieux comprendre leur rôle dans la structuration

et la dynamique des communautés microbiennes. Il serait également pertinent d'étendre ces travaux à d'autres céréales, plantes à haute valeur économique, ou encore à des cultures ayant une importance environnementale ou alimentaire majeure. L'optimisation des formulations pour différents types de sols et environnements agroclimatiques pourrait également être explorée, afin de garantir leur efficacité dans des systèmes agricoles variés. Enfin, l'intégration de ces bioformulations dans des approches combinées, telles que l'agriculture de précision ou les systèmes de cultures intégrés. Ces investigations permettraient de diversifier les applications potentielles de ces bioformulations et d'assurer leur intégration dans des systèmes agricoles variés.

**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abd Rahim, S. N., Sulaiman, A., Hamzah, F., Hamid, K. H. K., Rodhi, M. N. M., Musa, M., & Edama, N. A. (2013).** Enzymes encapsulation within calcium alginate-clay beads: characterization and application for cassava slurry saccharification. *Procedia Engineering*, 68, 411-417.
- Abdellatif, A. A., Gebily, D. A., Elmaghraby, M. M., Sahu, P. K., Thakur, B., & Kaur, S. (2024).** Transforming Roles of Actinobacteria in Sustainable Agriculture: From Soil Health and Plant Productivity Perspective. *Metabolomics, Proteomics and Gene Editing Approaches in Biofertilizer Industry: Volume II*, 299-338.
- Abdul Rahman, N. S. N., Abdul Hamid, N. W., & Nadarajah, K. (2021).** Effects of abiotic stress on soil microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9036.
- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., Sahebi, M., ... & Hanafi, M. M. (2017).** Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 134, 33-44.
- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J., & Hernandez, J. A. (2017).** Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18.
- Adamiak, K., & Sionkowska, A. (2023).** State of innovation in alginate-based materials. *Marine Drugs*, 21(6), 353.
- Adzmi, F., Meon, S., Musa, M. H., & Yusuf, N. A. (2012).** Preparation, characterisation and viability of encapsulated *Trichoderma harzianum* UPM40 in alginate-montmorillonite clay. *Journal of microencapsulation*, 29(3), 205-210.
- Ahmad, F., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2011).** Rhizosphere and root colonization by bacterial inoculants and their monitoring methods: a critical area in PGPR research. *Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications*, 363-391.
- Ahmad, M., Nadeem, S. M., Naveed, M., & Zahir, Z. A. (2016).** Potassium-solubilizing bacteria and their application in agriculture. *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture*, 293-313.
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., & Temprano, F. J. (2008).** Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2771-2779.
- Al-Hawamdeh, F., Ayad, J. Y., Alananbeh, K. M., & Akash, M. W. (2024).** Bacterial Endophytes and Their Contributions to Alleviating Drought and Salinity Stresses in Wheat: A Systematic Review of Physiological Mechanisms. *Agriculture*, 14(5), 769.

- Ali, M., Cybulska, J., Fraç, M., & Zdunek, A. (2023).** Application of polysaccharides for the encapsulation of beneficial microorganisms for agricultural purposes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 244, 125366.
- Ali, S., Hameed, S., Shahid, M., Iqbal, M., Lazarovits, G., & Imran, A. (2020).** Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiological Research*, 232, 126389.
- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., L'Úcuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J. F., Garneau, D., ... & Beauregard, P. B. (2016).** *Bacillus subtilis* early colonization of Arabidopsis thaliana roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio*, 7(6), 10-1128.
- Aloo, B. N., Tripathi, V., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2022).** Plant growth-promoting rhizobacterial biofertilizers for crop production: The past, present, and future. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1002448.
- Al-Qaysi, S. A., Al-Haideri, H., Al-Shimmary, S. M., Abdulhameed, J. M., Alajrawy, O. I., Al-Halbosiy, M. M., ... & Farahat, M. G. (2021).** Bioactive levan-type exopolysaccharide produced by *Pantoea agglomerans* ZMR7: characterization and optimization for enhanced production. *Journal of microbiology and biotechnology*, 31(5), 696.
- Alzate Zuluaga, M. Y., Fattorini, R., Cesco, S., & Pii, Y. (2024).** Plant-microbe interactions in the rhizosphere for smarter and more sustainable crop fertilization: the case of PGPR-based biofertilizers. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1440978.
- Amer, G. A., & Utkhede, R. S. (2000).** Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian journal of microbiology*, 46(9), 809-816.
- Anandhakumar, S., Krishnamoorthy, G., Ramkumar, K. M., & Raichur, A. M. (2017).** Preparation of collagen peptide functionalized chitosan nanoparticles by ionic gelation method: An effective carrier system for encapsulation and release of doxorubicin for cancer drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 378-385.
- Ansari, F. A., Ahmad, I., Pichtel, J., & Husain, F. M. (2024).** *Pantoea agglomerans* FAP10: A novel biofilm-producing PGPR strain improves wheat growth and soil resilience under salinity stress. *Environmental and Experimental Botany*, 222, 105759.
- Ansari, R. A., Mahmood, I., Rizvi, R., Sumbul, A., & Safiuddin. (2017).** Siderophores: augmentation of soil health and crop productivity. *Probiotics in agroecosystem*, 291-312.
- Anwar, M. S., Paliwal, A., Firdous, N., Verma, A., Kumar, A., & Pande, V. (2019).** Co-culture development and bioformulation efficacy of psychrotrophic PGPRs to promote growth

and development of pea (*Pisum sativum*) plant. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 65(2), 88-95.

**Asghari, B., Khademian, R., & Sedaghati, B. (2020).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) confer drought resistance and stimulate biosynthesis of secondary metabolites in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) under water shortage condition. *Scientia Horticulturae*, 263, 109132.

**Ashry, N. M., Alaidaroos, B. A., Mohamed, S. A., Badr, O. A., El-Saadony, M. T., & Esmael, A. (2022).** Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1760-1769.

**Azaroual, S. E., El Mernissi, N., Zeroual, Y., Bouizgarne, B., & Meftah Kadmiri, I. (2022).** Effect of *Bacillus* spp. strains on wheat nutrient assimilation and bioformulation by new spray drying approach using natural phosphate powder. *Drying technology*, 40(13), 2630-2644.

**Aziz, A., Verhagen, B., Magnin-Robert, M., Couderchet, M., Clément, C., Jeandet, P., & Trotel-Aziz, P. (2016).** Effectiveness of beneficial bacteria to promote systemic resistance of grapevine to gray mold as related to phytoalexin production in vineyards. *Plant and Soil*, 405, 141-153.

**Azizoglu, U. (2019).** *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology*, 76(11), 1379-1385.

**Bajguz, A., & Piotrowska-Niczyporuk, A. (2023).** Biosynthetic pathways of hormones in plants. *Metabolites*, 13(8), 884.

**Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022).** Recent advances in encapsulation techniques of plant growth-promoting microorganisms and their prospects in the sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 12(18), 9020.

**Banu, H. T., Karthikeyan, P., & Meenakshi, S. (2018).** Lanthanum (III) encapsulated chitosan-montmorillonite composite for the adsorptive removal of phosphate ions from aqueous solution. *International journal of biological macromolecules*, 112, 284-293.

**Barnawal, D., Singh, R., & Singh, R. P. (2019).** Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture* (pp. 107-128). Woodhead Publishing.

- Barreca, S., Orecchio, S., & Pace, A. (2014).** The effect of montmorillonite clay in alginate gel beads for polychlorinated biphenyl adsorption: Isothermal and kinetic studies. *Applied Clay Science*, *99*, 220-228.
- Bashan, N. O. G. A. (2016).** Inoculant formulations are essential for successful inoculation with plant growth-promoting bacteria and business opportunities. *Indian Phytopathol*, *69*, 739-743.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014).** Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil*, *378*, 1-33.
- Bashan, Y., Hernandez, J. P., Leyva, L. A., & Bacilio, M. (2002).** Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, *35*, 359-368.
- Bashir, Z., Zargar, M. Y., Husain, M., Mohiddin, F. A., Kousar, S., Zahra, S. B., ... & Rathore, J. P. (2017).** Potassium solubilizing microorganisms: mechanism and diversity. *Inter J Pure Appl Biosci*, *5*(5), 653-660.
- Beaumelle, L., Tison, L., Eisenhauer, N., Hines, J., Malladi, S., Pelosi, C., ... & Phillips, H. R. (2023).** Pesticide effects on soil fauna communities—a meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, *60*(7), 1239-1253.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013).** *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(17), E1621-E1630.
- Becquer, C. J. (2022).** Rhizobacteria and their contribution to plant tolerance to drought and salinity. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *56*(2).
- Bejarano, A., Sauer, U., Mitter, B., & Preininger, C. (2017).** Parameters influencing adsorption of *Paraburkholderia phytotfirmans* PsJN onto bentonite, silica and talc for microbial inoculants. *Applied Clay Science*, *141*, 138-145.
- Bekele, M., & Yilma, G. (2021).** Nitrogen Fixation Using Symbiotic and Non-Symbiotic Microbes: A Review Article. *Biochemistry and Molecular Biology*, *6*(4), 92-98.
- Belete, T., & Yadete, E. (2023).** Effect of Mono Cropping on Soil Health and Fertility Management for Sustainable Agriculture Practices: A Review. *J. Plant Sci*, *11*, 192-197.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Karlović, S., Djaković, S., Špoljarić, I., Mršić, G., & Ježek, D. (2015).** Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. *Food chemistry*, *167*, 378-386.

- Berger, B., Patz, S., Ruppel, S., Dietel, K., Faetke, S., Junge, H., & Becker, M. (2018).** Successful formulation and application of plant growth-promoting *Kosakonia radicincitans* in maize cultivation. *BioMed research international*, 2018(1), 6439481.
- Berninger, T., González López, Ó., Bejarano, A., Preininger, C., & Sessitsch, A. (2018).** Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microbial biotechnology*, 11(2), 277-301.
- Berninger, T., Mitter, B., & Preininger, C. (2016).** The smaller, the better? The size effect of alginate beads carrying plant growth-promoting bacteria for seed coating. *Journal of microencapsulation*, 33(2), 127-136.
- Bhattacharjee, A., Dubey, S., & Sharma, S. (2023).** “Next-generation bioformulations” for plant growth promotion and stress mitigation: A promising approach for sustainable agriculture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(10), 6741-6759.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Bhise, K. K., & Dandge, P. B. (2019).** Alleviation of salinity stress in rice plant by encapsulated salt tolerant plant growth promoting bacteria *Pantoea agglomerans* strain KL and its root colonization ability. *Archives of Agronomy and Soil Science*.
- Bohn, T., Walczyk, T., Leisibach, S., & Hurrell, R. F. (2004).** Chlorophyll-bound magnesium in commonly consumed vegetables and fruits: relevance to magnesium nutrition. *Journal of Food Science*, 69(9), S347-S350.
- Bomfim, C. A., Coelho, L. G. F., do Vale, H. M. M., de Carvalho Mendes, I., Megías, M., Ollero, F. J., & dos Reis Junior, F. B. (2021).** Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. *Brazilian journal of microbiology*, 52(4), 2215-2232.
- Brahmaprakash, G. P., Sahu, P. K., Lavanya, G., Gupta, A., Nair, S. S., & Gangaraddi, V. (2020).** Role of additives in improving efficiency of bioformulation for plant growth and development. In *Frontiers in soil and environmental microbiology* (pp. 1-10). CRC Press.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006).** Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process biochemistry*, 41(2), 323-342.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011).** *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 423-431.

- Bueno Batista, M., & Dixon, R. (2019).** Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. *Biochemical Society Transactions*, 47(2), 603-614.
- Bybordi, A. (2012).** Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in canola exposure to salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(10), 1610-1620.
- Çakmakçı, R. (2019).** A review of biological fertilizers current use, new approaches, and future perspectives. *International Journal of Innovative Studies in Sciences and Engineering Technology*, 5(7), 83-92.
- Cardoso, R., Borges, I., Vieira, J., Duarte, S. O., & Monteiro, G. A. (2023).** Interactions between clay minerals, bacteria growth and urease activity on biocementation of soils. *Applied Clay Science*, 240, 106972.
- Carlos, E., Lerma, T. A., & Martínez, J. M. (2021).** Phytohormones and plant growth regulators—a review. *J Sci with Technol Appl*, 10, 27-65.
- Carroll, L. M., Cheng, R. A., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2022).** Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(28), 7677-7702.
- Castro-Camba, R., Sánchez, C., Vidal, N., & Vielba, J. M. (2022).** Interactions of gibberellins with phytohormones and their role in stress responses. *Horticulturae*, 8(3), 241.
- Čavajda, V., Uhlík, P., Derkowski, A., Čaplovičova, M., Madejová, J., Mikula, M., & Ifka, T. (2015).** Influence of grinding and sonication on the crystal structure of talc. *Clays and Clay Minerals*, 63, 311-327.
- Cendon, F. V., Salomão, B. B., Jorge, R. M. M., & Mathias, A. L. (2021).** Mechanical and optical evaluation of alginate hydrospheres produced with different cross-linking salts for industrial application. *Colloid and Polymer Science*, 299(4), 693-703.
- Chandran, H., Meena, M., & Swapnil, P. (2021).** Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. *Sustainability*, 13(19), 10986.
- Chaney, R. L. (2012).** Food safety issues for mineral and organic fertilizers. *Advances in agronomy*, 117, 51-116.
- Chaudhary, T., Dixit, M., Gera, R., Shukla, A. K., Prakash, A., Gupta, G., & Shukla, P. (2020).** Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech*, 10, 1-9.
- Chen, M., Wang, J., Liu, B., Zhu, Y., Xiao, R., Yang, W., ... & Chen, Z. (2020).** Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC microbiology*, 20, 1-12.

- Chen, S., Hu, Z., Li, H., Ji, Y., & Yang, Y. (2011).** Effects of elevated UV-B radiation on ecosystem and soil respiration in a winter wheat farmland. *European journal of soil biology*, 47(1), 16-23.
- Chen, T., Zhang, Z., Li, B., Qin, G., & Tian, S. (2021).** Molecular basis for optimizing sugar metabolism and transport during fruit development. *Abiotech*, 1-11.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I., & Boudabous, A. (2016).** Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology*, 66, 1087-1097.
- Cherif-Silini, H., Thissera, B., Bouket, A. C., Saadaoui, N., Silini, A., Eshelli, M., ... & Belbahri, L. (2019).** Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3989.
- Chi, Y., Wang, D., Jiang, M., Chu, S., Wang, B., Zhi, Y., ... & Zhang, D. (2020).** Microencapsulation of *Bacillus megaterium* NCT-2 and its effect on remediation of secondary salinization soil. *Journal of Microencapsulation*, 37(2), 134-143.
- Chittora, D., Meena, M., Barupal, T., Swapnil, P., & Sharma, K. (2020).** Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. *Biochemistry and biophysics reports*, 22, 100737.
- Clemens, S. (2022).** The cell biology of zinc. *Journal of Experimental Botany*, 73(6), 1688-1698.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010).** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
- Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N., & Vinas, I. (2000).** Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 793-800.
- Costa, O. Y., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018).** Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1636.
- da Silva Fernandes, R., de Moura, M. R., Glenn, G. M., & Aouada, F. A. (2018).** Thermal, microstructural, and spectroscopic analysis of Ca<sup>2+</sup> alginate/clay nanocomposite hydrogel beads. *Journal of Molecular Liquids*, 265, 327-336.

- Daffonchio, D., Hirt, H., & Berg, G. (2015).** Plant-microbe interactions and water management in arid and saline soils. *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, 265-276.
- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011).** Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1402-1419.
- de Almeida Leite, R., Martins da Costa, E., Cabral Michel, D., do Amaral Leite, A., de Oliveira-Longatti, S. M., de Lima, W., ... & de Souza Moreira, F. M. (2024).** Genomic insights into organic acid production and plant growth promotion by different species of phosphate-solubilizing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(10), 1-14.
- de Melo, B. A. G., Motta, F. L., & Santana, M. H. A. (2016).** Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 967-974.
- Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., ... & Brisse, S. (2009).** Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 47(2), 300-310.
- Demircan, H., & Oral, R. A. (2023).** Parameters affecting calcium-alginate bead characteristics: viscosity of hydrocolloids and water solubility of core material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 236, 124011.
- 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.
- Devi, R., Kaur, T., Kour, D., Yadav, A., Yadav, A. N., Suman, A., ... & Saxena, A. K. (2022).** Minerals solubilizing and mobilizing microbiomes: A sustainable approach for managing minerals' deficiency in agricultural soil. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1245-1272.
- Diamond, S., Andeer, P. F., Li, Z., Crits-Christoph, A., Burstein, D., Anantharaman, K., ... & Banfield, J. F. (2019).** Mediterranean grassland soil C–N compound turnover is dependent on rainfall and depth, and is mediated by genomically divergent microorganisms. *Nature microbiology*, 4(8), 1356-1367.
- Dijkstra, P., Thomas, S. C., Heinrich, P. L., Koch, G. W., Schwartz, E., & Hungate, B. A. (2011).** Effect of temperature on metabolic activity of intact microbial communities:

evidence for altered metabolic pathway activity but not for increased maintenance respiration and reduced carbon use efficiency. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), 2023-2031.

**Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., & Dragović-Uzelac, V. (2020).** Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Marine drugs*, 18(3), 168.

**Donati, I., Holtan, S., Mørch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M., & Skjåk-Bræk, G. (2005).** New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium– alginate gels. *Biomacromolecules*, 6(2), 1031-1040.

**Doornbos, R. F., Geraats, B. P., Kuramae, E. E., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2011).** Effects of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(4), 395-407.

**dos Reis, G. A., Martínez-Burgos, W. J., Pozzan, R., Pastrana Puche, Y., Ocán-Torres, D., de Queiroz Fonseca Mota, P., ... & Soccol, C. R. (2024).** Comprehensive Review of Microbial Inoculants: Agricultural Applications, Technology Trends in Patents, and Regulatory Frameworks. *Sustainability*, 16(19), 8720.

**dos Santos Silva, M., Cocenza, D. S., Grillo, R., de Melo, N. F. S., Tonello, P. S., de Oliveira, L. C., ... & Fraceto, L. F. (2011).** Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), 366-374.

**dos Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., & Rigobelo, E. C. (2020).** Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: characteristics and applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 136.

**DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

**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.

**Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jaćević, V. (2021).** The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in plant science*, 11, 552969.

**Dunn, M. F., & Becerra-Rivera, V. A. (2023).** The Biosynthesis and functions of polyamines in the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria with plants. *Plants*, 12(14), 2671.

- Dunyashev, T. P., Laptev, G. Y., Yildirim, E. A., Ilina, L. A., Filippova, V. A., Tiurina, D. G., ... & Platonov, A. V. (2021).** Identification of genes associated with the synthesis of siderophores by the *Bacillus subtilis*. *Journal of Livestock Science*, *12*(4), 287-291.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., & Milanowski, J. (2016).** *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *23*(2).
- Dutta, S., & Podile, A. R. (2010).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical reviews in microbiology*, *36*(3), 232-244.
- Ehrlich, P. R., & Harte, J. (2015).** To feed the world in 2050 will require a global revolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(48), 14743-14744.
- El-Nahhal, I., & El-Nahhal, Y. (2021).** Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options. *Journal of Environmental Management*, *299*, 113611.
- Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2018).** Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. *Trends in food science & technology*, *71*, 121-131.
- Erenstein, O., Jaleta, M., Mottaleb, K. A., Sonder, K., Donovan, J., & Braun, H. J. (2022).** Global trends in wheat production, consumption and trade. In *Wheat improvement: food security in a changing climate* (pp. 47-66). Cham: Springer International Publishing.
- Etesami, H. (2022).** Root nodules of legumes: a suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. *Current Research in Biotechnology*, *4*, 78-86.
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017).** Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. *Journal of soil science and plant nutrition*, *17*(4), 897-911.
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2023a).** Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *126*, 102048.
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2023b).** Potential use of *Bacillus* spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. *Current Research in Biotechnology*, *5*, 100128.
- Evans, J. R. (2013).** Improving photosynthesis. *Plant physiology*, *162*(4), 1780-1793.
- Ewert, F., Baatz, R., & Finger, R. (2023).** Agroecology for a sustainable agriculture and food system: from local solutions to large-scale adoption. *Annual Review of Resource Economics*, *15*(1), 351-381.

- Fadiji, A. E., Xiong, C., Egidi, E., & Singh, B. K. (2024).** Formulation challenges associated with microbial biofertilizers in sustainable agriculture and paths forward. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 3(3), e70006.
- Fageria, N. K., & Moreira, A. (2011).** The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. *Advances in agronomy*, 110, 251-331.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., ... & Borriss, R. (2018).** *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in microbiology*, 9, 2491.
- Fan, D., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2020).** Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, 10(1), 12740.
- FAO. (2021).** Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators. Global, regional and country trends, 1990–2019. *FAOSTAT Anal Brief Ser No 29 Rome*, 22.
- Fariduddin, Q., Saleem, M., Khan, T. A., & Hayat, S. (2022).** Zinc as a versatile element in plants: an overview on its uptake, translocation, assimilatory roles, deficiency and toxicity symptoms. *Microbial Biofertilizers and Micronutrient Availability: The Role of Zinc in Agriculture and Human Health*, 137-158.
- Fessia, A., Barra, P., Barros, G., & Nesci, A. (2022).** Could *Bacillus* biofilms enhance the effectivity of biocontrol strategies in the phyllosphere?. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2148-2166.
- Fomina, M., & Skorochood, I. (2020).** Microbial interaction with clay minerals and its environmental and biotechnological implications. *Minerals*, 10(10), 861.
- Fossum, J. O. (2020).** Clay nanolayer encapsulation, evolving from origins of life to future technologies. *The European Physical Journal Special Topics*, 229, 2863-2879.
- Franchi, E., Agazzi, G., Rolli, E., Borin, S., Marasco, R., Chiaberge, S., ... & Petruzzelli, G. (2016).** Exploiting Hydrocarbon-Degrading Indigenous Bacteria for Bioremediation and Phytoremediation of a Multicontaminated Soil. *Chemical Engineering & Technology*, 39(9), 1676-1684.
- Freeman, B. C., Chen, C., & Beattie, G. A. (2010).** Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environmental microbiology*, 12(6), 1486-1497.
- Frydenvang, J., van Maarschalkerweerd, M., Carstensen, A., Mundus, S., Schmidt, S. B., Pedas, P. R., ... & Husted, S. (2015).** Sensitive detection of phosphorus deficiency in plants using chlorophyll a fluorescence. *Plant physiology*, 169(1), 353-361.

- Fukami, J., Ollero, F. J., de la Osa, C., Valderrama-Fernández, R., Nogueira, M. A., Megías, M., & Hungria, M. (2018).** Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archives of microbiology*, *200*, 1191-1203.
- Gamalero, E., Lingua, G., Giusy Caprì, F., Fusconi, A., Berta, G., & Lemanceau, P. (2004).** Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS microbiology ecology*, *48*(1), 79-87.
- García, A. H. (2011).** Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications. *Journal of biosciences*, *36*, 939-950.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015).** Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Aims Bioengineering*, *2*(3), 183-205.
- Gaul, L., & Svejstrup, J. Q. (2021).** Transcription-coupled repair and the transcriptional response to UV-Irradiation. *DNA repair*, *107*, 103208.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A. M. O. R., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., & De Ley, J. (1989).** Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *39*(3), 337-345.
- Gebaska, M., Grontkowska, A., Swiderek, W., & Golebiewska, B. (2020).** Farmer awareness and implementation of sustainable agriculture practices in different types of farms in Poland. *Sustainability*, *12*(19), 8022.
- Golaś, M., Sulewski, P., Waś, A., Kłoczko-Gajewska, A., & Pogodzińska, K. (2020).** On the way to sustainable agriculture—eco-efficiency of polish commercial farms. *Agriculture*, *10*(10), 438.
- Gomathi, R., Manohari, G., & Rakkiyappan, P. (2012).** Antioxidant enzymes on cell membrane integrity of sugarcane varieties differing in flooding tolerance. *Sugar Tech*, *14*, 261-265.
- Gomes, G. L. B., & Scortecci, K. C. (2021).** Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology*, *23*(6), 894-904.
- Gomis-Cebolla, J., & Berry, C. (2023).** *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer in crops and their implications in the control of phytopathogens and insect pests. *Pest Management Science*, *79*(9), 2992-3001.

- Gond, S. K., Torres, M. S., Bergen, M. S., Helsel, Z., & White Jr, J. F. (2015).** Induction of salt tolerance and up-regulation of aquaporin genes in tropical corn by rhizobacterium *Pantoea agglomerans*. *Letters in Applied Microbiology*, 60(4), 392-399.
- Goss, G. R., Baldwin, H. M., & Riepl, R. G. (2003).** Clays as biological carriers. In *Pesticide formulations and delivery systems: meeting the challenges of the current crop protection industry*. ASTM International.
- Gowtham, H. G., Singh, S. B., Shilpa, N., Aiyaz, M., Nataraj, K., Udayashankar, A. C., ... & Sayyed, R. Z. (2022).** Insight into recent progress and perspectives in improvement of antioxidant machinery upon PGPR augmentation in plants under drought stress: a review. *Antioxidants*, 11(9), 1763.
- Graça, A. T., Hall, M., Persson, K., & Schröder, W. P. (2021).** High-resolution model of *Arabidopsis* photosystem II reveals the structural consequences of digitonin-extraction. *Scientific reports*, 11(1), 15534.
- Grosse-Heilmann, M., Cristiano, E., Deidda, R., & Viola, F. (2024).** Durum wheat productivity today and tomorrow: A review of influencing factors and climate change effects. *Resources, Environment and Sustainability*, 100170.
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., ... & Gao, X. (2017).** Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and environmental microbiology*, 83(19), e01075-17.
- Guan, L. L., Onuki, H., & Kamino, K. (2000).** Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2797-2803.
- Guo, F., Aryana, S., Han, Y., & Jiao, Y. (2018).** A review of the synthesis and applications of polymer–nanoclay composites. *Applied Sciences*, 8(9), 1696.
- Guo, L., Wu, Z., Rasool, A., & Li, C. (2012).** Effects of free and encapsulated co-culture bacteria on cotton growth and soil bacterial communities. *European Journal of soil biology*, 53, 16-22.
- Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., ... & Imran, A. (2021).** Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 617157.
- Hamid, B., & Bashir, Z. (2019).** Potassium solubilizing microorganisms: an alternative technology to chemical fertilizers. *J Resear Develop*, 19, 79-84.

- Han, R., Feng, X. Q., Vollmer, W., Stoodley, P., & Chen, J. (2023).** Deciphering the adaptation of bacterial cell wall mechanical integrity and turgor to different chemical or mechanical environments. *Journal of Colloid and Interface Science*, *640*, 510-520.
- Han, Y., Wang, C., Li, X., Cao, X., Cao, A., & Zhao, N. (2014).** Isolation and identification of saline tolerance phosphate-solubilizing bacteria derived from salt-affected soils and their mechanisms of p-solubilizing. In *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012) Volume 2* (pp. 1259-1266). Springer Berlin Heidelberg.
- Hanh, H. T. T., & Mongkolthanaruk, W. (2017).** Correlation of growth and IAA production of *Lysinibacillus fusiformis* UD 270. *Journal of Applied and Physical Sciences*, *3*(3), 98-106.
- Hannay, C. L., & Fitz-James, P. (1955).** The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Canadian Journal of Microbiology*, *1*(8), 694-710.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015).** The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews*, *79*(3), 293-320.
- Hariram, N. P., Mekha, K. B., Suganthan, V., & Sudhakar, K. (2023).** Sustainalism: An integrated socio-economic-environmental model to address sustainable development and sustainability. *Sustainability*, *15*(13), 10682.
- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008).** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and soil*, *312*, 7-14.
- 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. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 3154.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012).** Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, *7*(11), 1456-1466.
- He, Y., Wu, Z., Tu, L., & Shan, C. (2017).** Effect of encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 strain on alleviating salt stress of cotton. *Journal of Plant Nutrition*, *40*(8), 1180-1189.
- He, Y., Wu, Z., Tu, L., Han, Y., Zhang, G., & Li, C. (2015).** Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*, *109*, 68-75.

- He, Y., Wu, Z., Ye, B. C., Wang, J., Guan, X., & Zhang, J. (2016).** Viability evaluation of alginate-encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 under simulated salt-stress conditions and its effect on cotton growth. *European journal of soil biology*, 75, 135-141.
- Hepler, P. K., & Winship, L. J. (2010).** Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. *Journal of integrative plant biology*, 52(2), 147-160.
- Herrera, S. D., Grossi, C., Zawoznik, M., & Groppa, M. D. (2016).** Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological research*, 186, 37-43.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010).** Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, 27(5), 637-657.
- HongBo, S., ZongSuo, L., & MingAn, S. (2005).** Changes of anti-oxidative enzymes and MDA content under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at maturation stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(1), 7-13.
- Hood, C., & Pensini, E. (2022).** Alginate-bentonite clay composite porous sorbents for Cu (II) and Zn (II) removal from water. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(4), 137.
- Höper, D., Bernhardt, J., & Hecker, M. (2006).** Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics*, 6(5), 1550-1562.
- Hossain, M. A., Hossain, M. S., & Akter, M. (2023).** Challenges faced by plant growth-promoting bacteria in field-level applications and suggestions to overcome the barriers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 126, 102029.
- Hubballi, M., Rajamanickam, S., Mawar, R., Tuladhar, R., Singh, A., Sayyed, R. Z., & Nakkeeran, S. (2023).** PGPM: Fundamental, Bioformulation, Commercialization, and Success at Farmer's Field. In *Plant Growth Promoting Microorganisms of Arid Region* (pp. 257-301). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Hudson, D., & Margaritis, A. (2014).** Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. *Critical reviews in biotechnology*, 34(2), 161-179.
- Hudson, S. M., & Jenkins, D. W. (2001).** Chitin and chitosan, encyclopedia of polymer science and technology. *New York: Wiley Interscience*. DOI, 10, 0471440264.
- Hussain, A., & Hasnain, S. (2011).** Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2645-2654.
- Hussain, R., Ayyub, C. M., Shaheen, M. R., Rashid, S., Nafees, M., Ali, S., ... & Mora-Poblete, F. (2021).** Regulation of osmotic balance and increased antioxidant activities under

heat stress in *Abelmoschus esculentus* L. triggered by exogenous proline application. *Agronomy*, 11(4), 685.

**Ibrahim, N., Nesbitt, D., Guo, Q., Lin, J., Svircev, A., Wang, Q., ... & Anany, H. (2024).** Improved Viability of Spray-Dried *Pantoea agglomerans* for Phage-Carrier Mediated Control of Fire Blight. *Viruses*, 16(2), 257.

**Ingle, K. P., & Padole, D. A. (2017).** Phosphate solubilizing microbes: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 844-852.

**Intisar, A., Ramzan, A., Sawaira, T., Kareem, A. T., Hussain, N., Din, M. I., ... & Iqbal, H. M. (2022).** Occurrence, toxic effects, and mitigation of pesticides as emerging environmental pollutants using robust nanomaterials—A review. *Chemosphere*, 293, 133538.

**Iqbal, A., Mo, Z., Hua, T., Hussain, Q., Adnan, M., Abid, I., ... & Tang, X. (2024).** Vermicompost Application Enhances Soil Health and Plant Physiological and Antioxidant Defense to Conferring Heavy Metals Tolerance in Fragrant Rice. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 1418554.

**Jadhav, N. R., Paradkar, A. R., Salunkhe, N. H., Karade, R. S., & Mane, G. G. (2013).** Talc: A versatile pharmaceutical excipient. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(2013), 4639-4660.

**Jallouli, W., Driss, F., Fillaudeau, L., & Rouis, S. (2020).** Review on biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* since 1990: Focus on bioprocess parameters. *Process Biochemistry*, 98, 224-232.

**Ji, J., Yuan, D., Jin, C., Wang, G., Li, X., & Guan, C. (2020).** Enhancement of growth and salt tolerance of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by regulating ethylene production with a novel halotolerant PGPR strain *Glutamicibacter* sp. YD01 containing ACC deaminase activity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-17.

**Jiang, S., Zhang, D., Wang, L., Pan, J., Liu, Y., Kong, X., ... & Li, D. (2013).** A maize calcium-dependent protein kinase gene, ZmCPK4, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant physiology and biochemistry*, 71, 112-120.

**John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Prévost, D., & Surampalli, R. Y. (2013).** Effect of emulsion formulation of *Sinorhizobium meliloti* and pre-inoculated seeds on alfalfa nodulation and growth: a pouch study. *Journal of plant nutrition*, 36(2), 231-242.

- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011).** Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 211-226.
- Joshi, M., Srivastava, R., Sharma, A. K., & Prakash, A. (2015).** Screening of resistant varieties and antagonistic *Fusarium oxysporum* for biocontrol of *Fusarium* wilt of chilli. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*.
- Junker, A., Muraya, M. M., Weigelt-Fischer, K., Arana-Ceballos, F., Klukas, C., Melchinger, A. E., ... & Altmann, T. (2015).** Optimizing experimental procedures for quantitative evaluation of crop plant performance in high throughput phenotyping systems. *Frontiers in plant science*, 5, 770.
- Kalayu, G. (2019).** Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019(1), 4917256.
- Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A. K., Singh, R. K., & Kumar, P. (2020).** Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens. *Fungal biotechnology and bioengineering*, 457-470.
- Kanagendran, A., Chatterjee, P., Liu, B., Sa, T., Pazouki, L., & Niinemets, Ü. (2019).** Foliage inoculation by *Burkholderia vietnamiensis* CBMB40 antagonizes methyl jasmonate-mediated stress in *Eucalyptus grandis*. *Journal of plant physiology*, 242, 153032.
- Karnwal, A., Dohroo, A., & Malik, T. (2023).** Unveiling the potential of bioinoculants and nanoparticles in sustainable agriculture for enhanced plant growth and food security. *BioMed Research International*, 2023(1), 6911851.
- Kaur, R., & Kaur, S. (2018).** Biological alternates to synthetic fertilizers: efficiency and future scopes. *Indian Journal of Agricultural Research*, 52(6), 587-595.
- Kaur, R., Kaur, S., Dwibedi, V., Kaur, C., Akhtar, N., & Alzahrani, A. (2023).** Development and characterization of rice bran-gum Arabic based encapsulated biofertilizer for enhanced shelf life and controlled bacterial release. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1267730.
- Kerbab, S., Silini, A., Chenari Bouket, A., Cherif-Silini, H., Eshelli, M., El Houda Rabhi, N., & Belbahri, L. (2021).** Mitigation of NaCl stress in wheat by rhizosphere engineering using salt habitat adapted PGPR halotolerant bacteria. *Applied Sciences*, 11(3), 1034.
- Keswani, C., Singh, S. P., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., ... & Sansinenea, E. (2022).** Biosynthesis and beneficial effects of microbial

gibberellins on crops for sustainable agriculture. *Journal of applied microbiology*, 132(3), 1597-1615.

**Ketehouli, T., Idrice Carther, K. F., Noman, M., Wang, F. W., Li, X. W., & Li, H. Y. (2019).** Adaptation of plants to salt stress: characterization of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters and role of CBL gene family in regulating salt stress response. *Agronomy*, 9(11), 687.

**Khan, A., Singh, A. V., Gautam, S. S., Agarwal, A., Punetha, A., Upadhyay, V. K., ... & Goel, R. (2023).** Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1270039.

**Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Jan, R., Kang, S. M., Kim, K. M., & Lee, I. J. (2020).** Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with SA1 isolate of *Bacillus cereus* and comparison with exogenous humic acid application. *PLoS One*, 15(4), e0232228.

**Khatri, P., Kumar, P., Shakya, K. S., Kirlas, M. C., & Tiwari, K. K. (2024).** Understanding the intertwined nature of rising multiple risks in modern agriculture and food system. *Environment, Development and Sustainability*, 26(9), 24107-24150.

**Khourchi, S., Elhaisoufi, W., Loum, M., Ibnyasser, A., Haddine, M., Ghani, R., ... & Bargaz, A. (2022).** Phosphate solubilizing bacteria can significantly contribute to enhance P availability from polyphosphates and their use efficiency in wheat. *Microbiological Research*, 262, 127094.

**Koza, N. A., Adedayo, A. A., Babalola, O. O., & Kappo, A. P. (2022).** Microorganisms in plant growth and development: Roles in abiotic stress tolerance and secondary metabolites secretion. *Microorganisms*, 10(8), 1528.

**Kruse-Platz, M., Hofmann, F., Wosniok, W., Schlechtriemen, U., & Kohlschütter, N. (2021).** Pesticides and pesticide-related products in ambient air in Germany. *Environmental Sciences Europe*, 33, 1-21.

**Kudo, T., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2010).** Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 53-60.

**Kumar, A., Dewangan, S., Lawate, P., Bahadur, I., & Prajapati, S. (2019).** Zinc-solubilizing bacteria: a boon for sustainable agriculture. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 1: Rhizobacteria in Abiotic Stress Management*, 139-155.

**Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011).** *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems* (pp. 37-59). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Kumar, A., Singh, V. K., Tripathi, V., Singh, P. P., & Singh, A. K. (2018).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): perspective in agriculture under biotic and abiotic stress. In *Crop improvement through microbial biotechnology* (pp. 333-342). Elsevier.
- Kumar, P., Kamle, M., Borah, R., Mahato, D. K., & Sharma, B. (2021).** *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 95.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C., & Kembel, S. W. (2016).** Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome*, 4, 1-10.
- Lambrese, Y. S., Illanes, C. O., & Ochoa, N. A. (2024).** Advancing bacterial endophyte encapsulation in alginate for sustainable agriculture: Method comparisons, morphology and viability assessment. *Journal of Cleaner Production*, 457, 142473.
- Landman, E. P., & Focke, W. W. (2006).** Stearate intercalated layered double hydroxides: effect on the physical properties of dextrin-alginate films. *Journal of materials science*, 41(8), 2271-2279.
- Lanteigne, C., Gadkar, V. J., Wallon, T., Novinscak, A., & Filion, M. (2012).** Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. *Phytopathology*, 102(10), 967-973.
- Latif, A., Ahmad, R., Ahmed, J., Mueen, H., Khan, S. A., Bibi, G., ... & Hassan, A. (2024).** Novel halotolerant PGPR strains alleviate salt stress by enhancing antioxidant activities and expression of selected genes leading to improved growth of *Solanum lycopersicum*. *Scientia Horticulturae*, 338, 113625.
- Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir, K. H., & Mooney, D. J. (2000).** Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules*, 33(11), 4291-4294.
- Li, H. Q., & Jiang, X. W. (2017).** Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64, 235-241.
- Li, J., Lu, J., & Li, Y. (2009).** Carboxymethylcellulose/bentonite composite gels: water sorption behavior and controlled release of herbicide. *Journal of applied polymer science*, 112(1), 261-268.
- Li, S. M., Zheng, H. X., Zhang, X. S., & Sui, N. (2021).** Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant cell reports*, 40, 271-282.
- Li, S., Mu, B., Wang, X., & Wang, A. (2021).** Recent researches on natural pigments stabilized by clay minerals: A review. *Dyes and Pigments*, 190, 109322.

- Li, X., Wu, Z., He, Y., Ye, B. C., & Wang, J. (2017).** Preparation and characterization of monodisperse microcapsules with alginate and bentonite via external gelation technique encapsulating *Pseudomonas putida* Rs-198. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(14), 1556-1571.
- Liew, C. V., Chan, L. W., Ching, A. L., & Heng, P. W. S. (2006).** Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *International journal of pharmaceutics*, 309(1-2), 25-37.
- Liffourrena, A. S., & Lucchesi, G. I. (2018).** Alginate-perlite encapsulated *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells: Preparation, characterization and potential use as plant inoculants. *Journal of Biotechnology*, 278, 28-33.
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003).** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 1875-1883.
- Liu, B., Luo, J., Wang, X., Lu, J., Deng, H., & Sun, R. (2013).** Alginate/quaternized carboxymethyl chitosan/clay nanocomposite microspheres: preparation and drug-controlled release behavior. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24(5), 589-605.
- Liu, L., Zheng, X., Wei, X., Kai, Z., & Xu, Y. (2021).** Excessive application of chemical fertilizer and organophosphorus pesticides induced total phosphorus loss from planting causing surface water eutrophication. *Scientific Reports*, 11(1), 23015.
- Liu, W., Xu, H., Zhou, J., He, Y., Zou, D., Bai, Y., & Zhang, J. (2024).** The plant microbiota: From theoretical advances to applications. *Fundamental Research*.
- Liu, Y., Kyle, S., & Straight, P. D. (2018).** Antibiotic stimulation of a *Bacillus subtilis* migratory response. *MSphere*, 3(1), 10-1128.
- Ljubej, V., Karalija, E., Salopek-Sondi, B., & Šamec, D. (2021).** Effects of short-term exposure to low temperatures on proline, pigments, and phytochemicals level in kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Horticulturae*, 7(10), 341.
- Lobo, C. B., Tomás, M. S. J., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019).** Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological research*, 219, 12-25.
- LÓPEZ-GALINDO, A., & Viseras, C. (2004).** Pharmaceutical and cosmetic applications of clays. In *Interface science and technology* (Vol. 1, pp. 267-289). Elsevier.
- Lorenzi, A. S., Bonatelli, M. L., Chia, M. A., Peressim, L., & Quecine, M. C. (2022).** Opposite sides of *Pantoea agglomerans* and its associated commercial outlook. *Microorganisms*, 10(10), 2072.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*(1), 265-275.
- Lozano-Vazquez, G., Alvarez-Ramirez, J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., & Hernández-Marín, N. Y. (2021).** Characterization of corn starch-calcium alginate xerogels by microscopy, thermal, XRD, and FTIR analyses. *Starch-Stärke*, *73*(7-8), 2000282.
- Luziatelli, F., Ficca, A. G., Bonini, P., Muleo, R., Gatti, L., Meneghini, M., ... & Ruzzi, M. (2020).** A genetic and metabolomic perspective on the production of indole-3-acetic acid by *Pantoea agglomerans* and use of their metabolites as biostimulants in plant nurseries. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1475.
- lv, L., Luo, J., Ahmed, T., Zaki, H. E., Tian, Y., Shahid, M. S., ... & Li, B. (2022).** Beneficial effect and potential risk of *Pantoea* on rice production. *Plants*, *11*(19), 2608.
- Maçik, M., Gryta, A., & Fraç, M. (2020).** Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in agronomy*, *162*, 31-87.
- Mahanayak, B. (2024).** Meaning and concept of sustainable development for the protection of environment and the role of India. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, *22*(3), 1460-1465.
- Mahapatra, R., Mishra, P., & Patel, Z. M. (2023).** The molecular architecture of *rhizobium*–plant symbiosis in nitrogen fixation. In *The Chemical Dialogue Between Plants and Beneficial Microorganisms* (pp. 137-144). Academic Press.
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020).** Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, *9*(1), 97.
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. J. T. S. W. J. (2012).** Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The scientific world journal*, *2012*(1), 491206.
- Mardaneh, J., & Dallal, M. M. S. (2013).** Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea (Enterobacter) agglomerans* isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iranian journal of microbiology*, *5*(3), 263.
- Martínez-Romero, E. (2009).** Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis?. *DNA and cell biology*, *28*(8), 361-370.
- Massaro, M., Colletti, C. G., Lazzara, G., & Riela, S. (2018).** The use of some clay minerals as natural resources for drug carrier applications. *Journal of functional biomaterials*, *9*(4), 58.

- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013).** The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.
- Mirskaya, G. V., Khomyakov, Y. V., Rushina, N. A., Vertebny, V. E., Chizhevskaya, E. P., Chebotar, V. K., ... & Pishchik, V. N. (2022).** Plant development of early-maturing spring wheat (*Triticum aestivum* L.) under inoculation with *Bacillus* sp. V2026. *Plants*, 11(14), 1817.
- Mishra, S., Kumar, P., & Malik, A. (2013).** Preparation, characterization, and insecticidal activity evaluation of three different formulations of *Beauveria bassiana* against *Musca domestica*. *Parasitology research*, 112, 3485-3495.
- Moitinho, M. A., Souza, D. T., Chiaramonte, J. B., Bononi, L., Melo, I. S., & Taketani, R. G. (2020).** The unexplored bacterial lifestyle on leaf surface. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1233-1240.
- Mondal, S., Halder, S. K., Yadav, A. N., & Mondal, K. C. (2020).** Microbial consortium with multifunctional plant growth-promoting attributes: future perspective in agriculture. *Advances in plant microbiome and sustainable agriculture: functional annotation and future challenges*, 219-258.
- Montanucci, P., Terenzi, S., Santi, C., Pennoni, I., Bini, V., Pescara, T., ... & Calafiore, R. (2015).** Insights in behavior of variably formulated alginate-based microcapsules for cell transplantation. *BioMed research international*, 2015(1), 965804.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006).** Preservation of microorganisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods*, 66(2), 183-193.
- Mueller, B. (2015).** Experimental interactions between clay minerals and bacteria: a review. *Pedosphere*, 25(6), 799-810.
- Murray, H. H. (2006).** *Applied clay mineralogy: occurrences, processing and applications of kaolins, bentonites, palygorskitesepiolite, and common clays*. Elsevier.
- Nakkeeran, S., Fernando, W. D., & Siddiqui, Z. A. (2006).** Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *PGPR: biocontrol and biofertilization*, 257-296.
- Nardi, S., Ertani, A., & Francioso, O. (2017).** Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(1), 5-13.
- Naveed, M., Phil, L., Sohail, M., Hasnat, M., Baig, M. M. F. A., Ihsan, A. U., ... & Zhou, Q. G. (2019).** Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. *International journal of biological macromolecules*, 129, 827-843.

- Nawaz, A., Shahbaz, M., Asadullah, Imran, A., Marghoob, M. U., Imtiaz, M., & Mubeen, F. (2020).** Potential of salt tolerant PGPR in growth and yield augmentation of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2019.
- Neemisha, & Sharma, S. (2022).** Soil enzymes and their role in nutrient cycling. In *Structure and functions of Pedosphere* (pp. 173-188). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Negi, R., Sharma, B., Jan, T., Kaur, T., Chowdhury, S., Kapoor, M., ... & Yadav, A. N. (2024).** Microbial Consortia: Promising Tool as Plant Bioinoculants for Agricultural Sustainability. *Current Microbiology*, *81*(8), 222.
- Novinscak, A., & Fillion, M. (2020).** Long term comparison of talc-and peat-based phytobeneficial *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas synxantha* bioformulations for promoting plant growth. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *4*, 602911.
- Nuccio, E. E., Starr, E., Karaoz, U., Brodie, E. L., Zhou, J., Tringe, S. G., ... & Pett-Ridge, J. (2020).** Niche differentiation is spatially and temporally regulated in the rhizosphere. *The ISME journal*, *14*(4), 999-1014.
- Nulkar, G. (2024).** Intensive Farming and Its Effects on Natural Ecosystems. In *The Economics of Sustainable Development: A Machine-generated Literature Overview* (pp. 1-28). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Olaniyani, F. T., Alori, E. T., Adekiya, A. O., Ayorinde, B. B., Daramola, F. Y., Osemwegie, O. O., & Babalola, O. O. (2022).** The use of soil microbial potassium solubilizers in potassium nutrient availability in soil and its dynamics. *Annals of Microbiology*, *72*(1), 45.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017).** Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*, 1-16.
- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020).** Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*, *743*, 140682.
- Oleyaei, S. A., Almasi, H., Ghanbarzadeh, B., & Moayedi, A. A. (2016).** Synergistic reinforcing effect of TiO<sub>2</sub> and montmorillonite on potato starch nanocomposite films: thermal, mechanical and barrier properties. *Carbohydrate polymers*, *152*, 253-262.
- Olivares, F. L., Busato, J. G., de Paula, A. M., da Silva Lima, L., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2017).** Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop

promotion and mechanisms of action. *Chemical and biological technologies in agriculture*, 4, 1-13.

**Orczewska, A., Dulik, A., Długosz, P., & Depa, Ł. (2024).** Intensive Agriculture vs. Invertebrate Biodiversity: A Case Study of Woodland Islets in a Matrix of Arable Land. *Agriculture*, 14(8), 1400.

**Orozco-Mosqueda, M. D. C., Santoyo, G., & Glick, B. R. (2023).** Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth. *Plants*, 12(3), 606.

**Ozidal, M., Ozidal, O. G., Sezen, A., Algur, O. F., & Kurbanoglu, E. B. (2017).** Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *3 Biotech*, 7, 1-6.

**Pan, L., & Cai, B. (2023).** Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. *Microorganisms*, 11(12), 2904.

**Panichikkal, J., Prathap, G., Nair, R. A., & Krishnankutty, R. E. (2021).** Evaluation of plant probiotic performance of *Pseudomonas* sp. encapsulated in alginate supplemented with salicylic acid and zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 138-143.

**Park, J. H., Lee, H. H., Han, C. H., Yoo, J. A., & Yoon, M. H. (2016).** Synergistic effect of co-inoculation with phosphate-solubilizing bacteria. *Korean Journal of Agricultural Science*, 43(3), 401-414.

**Patel, D. K., Archana, G., & Kumar, G. N. (2008).** Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Current Microbiology*, 56, 168-174.

**Patil, H. J., & Solanki, M. K. (2016).** Microbial inoculant: modern era of fertilizers and pesticides. *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: vol. 1: research perspectives*, 319-343.

**Perez, J. J., Francois, N. J., Maroniche, G. A., Borrajo, M. P., Pereyra, M. A., & Creus, C. M. (2018).** A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate polymers*, 202, 409-417.

**Perez, V. C., Zhao, H., Lin, M., & Kim, J. (2023).** Occurrence, function, and biosynthesis of the natural auxin phenylacetic acid (PAA) in plants. *Plants*, 12(2), 266.

**Pérez-Luna, V. H., & González-Reynoso, O. (2018).** Encapsulation of biological agents in hydrogels for therapeutic applications. *Gels*, 4(3), 61.

**Pishchik, V. N., Filippova, P. S., Mirskaya, G. V., Khomyakov, Y. V., Vertebny, V. E., Dubovitskaya, V. I., ... & Chebotar, V. K. (2021).** Epiphytic PGPB *Bacillus megaterium*

AFI1 and *Paenibacillus nicotianae* AFI2 improve wheat growth and antioxidant status under Ni stress. *Plants*, 10(11), 2334.

**Polisetti, S., Bible, A. N., Morrell-Falvey, J. L., & Bohn, P. W. (2016).** Raman chemical imaging of the rhizosphere bacterium *Pantoea* sp. YR343 and its co-culture with *Arabidopsis thaliana*. *Analyst*, 141(7), 2175-2182.

**Poole, K. (2012).** Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends in microbiology*, 20(5), 227-234.

**Poppeliers, S. W., Sánchez-Gil, J. J., & de Jonge, R. (2023).** Microbes to support plant health: understanding bioinoculant success in complex conditions. *Current opinion in microbiology*, 73, 102286.

**Potshangbam, M., Devi, S. I., Sahoo, D., & Strobel, G. A. (2017).** Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. *Frontiers in microbiology*, 8, 325.

**Pour, M. M., Saberi-Riseh, R., Mohammadinejad, R., & Hosseini, A. (2019).** Investigating the formulation of alginate-gelatin encapsulated *Pseudomonas fluorescens* (VUPF5 and T17-4 strains) for controlling *Fusarium solani* on potato. *International journal of biological macromolecules*, 133, 603-613.

**Power, B., Liu, X., Germaine, K. J., Ryan, D., Brazil, D., & Dowling, D. N. (2011).** Alginate beads as a storage, delivery and containment system for genetically modified PCB degrader and PCB biosensor derivatives of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of applied microbiology*, 110(5), 1351-1358.

**Prasad, A. A., & Babu, S. (2017).** Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(02), 1027-1040.

**Pushpadass, H. A., Babu, G. S., Weber, R. W., & Hanna, M. A. (2008).** Extrusion of starch-based loose-fill packaging foams: effects of temperature, moisture and talc on physical properties. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 21(3), 171-183.

**Qu, B., & Luo, Y. (2020).** Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors—A review. *International journal of biological macromolecules*, 152, 437-448.

**Quecine, M. C., Araújo, W. L. D., Rossetto, P. B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P. T., ... & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2012).** Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7511-7518.

- Rai, S., Mago, Y., Aggarwal, G., Yadav, A., & Tewari, S. (2023).** Liquid Bioformulation: A Trending Approach Towards Achieving Sustainable Agriculture. *Molecular Biotechnology*, 1-26.
- Rai, S., Mago, Y., Aggarwal, G., Yadav, A., & Tewari, S. (2024).** Liquid bioformulation: a trending approach towards achieving sustainable agriculture. *Molecular Biotechnology*, 66(10), 2725-2750.
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021).** An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of cleaner production*, 283, 124657.
- Rani, U., & Kumar, V. (2019).** Microbial bioformulations: present and future aspects. *Nanobiotechnology in bioformulations*, 243-258.
- Rao, C. S., & Srinivas, K. (2017).** Potassium dynamics and role of non-exchangeable potassium in crop nutrition. *Indian J. Fertil*, 13(4), 80-94.
- Rashidzadeh, A., Olad, A., Salari, D., & Reyhanitabar, A. (2014).** On the preparation and swelling properties of hydrogel nanocomposite based on sodium alginate-g-poly (acrylic acid-co-acrylamide)/clinoptilolite and its application as slow release fertilizer. *Journal of Polymer Research*, 21, 1-15.
- Rawat, J., Pandey, N., & Saxena, J. (2022).** Role of potassium in plant photosynthesis, transport, growth and yield. *Role of potassium in abiotic stress*, 1-14.
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021).** Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(1), 49-68.
- Ray, P., Maity, M., Barik, H., Sahoo, G. S., Hasnain, M. S., Hoda, M. N., & Nayak, A. K. (2020).** Alginate-based hydrogels for drug delivery applications. In *Alginates in drug delivery* (pp. 41-70). Academic Press.
- Rejeb, K. B., Abdelly, C., & Savouré, A. (2014).** How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278-284.
- Rekha, P. D., Lai, W. A., Arun, A. B., & Young, C. C. (2007).** Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource technology*, 98(2), 447-451.
- Riseh, R. S., Hassanisaadi, M., Vatankhah, M., Soroush, F., & Varma, R. S. (2022).** Nano/microencapsulation of plant biocontrol agents by chitosan, alginate, and other important biopolymers as a novel strategy for alleviating plant biotic stresses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 1589-1604.

- Rochlani, A., Dalwani, A., Shaikh, N., Shaikh, N., Sharma, S., & Saraf, M. (2022).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers: application in agricultural sustainability. *Acta Scientific MICROBIOLOGY (ISSN: 2581-3226)*, 5(4).
- Rohman, S., Kaewtatip, K., Kantachote, D., & Tantirungkij, M. (2021).** Encapsulation of *Rhodopseudomonas palustris* KTSSR54 using beads from alginate/starch blends. *Journal of applied polymer science*, 138(12), 50084.
- Rojas-Padilla, J., De-Bashan, L. E., Parra-Cota, F. I., Rocha-Estrada, J., & de Los Santos-Villalobos, S. (2022).** Microencapsulation of *Bacillus* strains for improving wheat (*Triticum turgidum* Subsp. *durum*) growth and development. *Plants*, 11(21), 2920.
- Rojas-Sánchez, B., Guzmán-Guzmán, P., Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Saucedo-Martínez, B. C., Sánchez-Yáñez, J. M., ... & Santoyo, G. (2022).** Bioencapsulation of microbial inoculants: mechanisms, formulation types and application techniques. *Applied Biosciences*, 1(2), 198-220.
- Rosiak, P., Latanska, I., Paul, P., Sujka, W., & Kolesinska, B. (2021).** Modification of alginates to modulate their physic-chemical properties and obtain biomaterials with different functional properties. *Molecules*, 26(23), 7264.
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020).** Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 11, 40.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008).** Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148(3), 1547-1556.
- Saadaoui, N., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Alenezi, F. N., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2022).** Semi-arid-habitat-adapted plant-growth-promoting rhizobacteria allows efficient wheat growth promotion. *Agronomy*, 12(9), 2221.
- Sabaratnam, S., & Traquair, J. A. (2002).** Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological control*, 23(3), 245-253.
- Saberi Riseh, R., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Moradi Pour, M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021).** Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11165.
- Saberi-Rise, R., & Moradi-Pour, M. (2020).** The effect of *Bacillus subtilis* Vru1 encapsulated in alginate–bentonite coating enriched with titanium nanoparticles against *Rhizoctonia solani* on bean. *International journal of biological macromolecules*, 152, 1089-1097.

- Safari, M., Motamedi, E., Dolatabad, H. K., & Sanavy, S. A. M. M. (2020).** Nano-carriers effects on the viability and efficiency of *Pseudomonas* strains as phosphate solubilizing bacteria. *Heliyon*, 6(10).
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011).** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
- Saidi, S., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Silini, A., Eshelli, M., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2021).** Improvement of *Medicago sativa* crops productivity by the co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*-actinobacteria under salt stress. *Current microbiology*, 78, 1344-1357.
- Saiko, G. (2021).** Bacterial Growth and Siderophore Production in Bacteria: An Analytical Model. In *Bioimaging* (pp. 188-192).
- Salgado, L. T., Tomazetto, R., Cinelli, L. P., Farina, M., & Amado Filho, G. M. (2007).** The influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of ultraviolet radiation absorption in vitro. *Brazilian journal of oceanography*, 55, 145-154.
- Sandalci, I., Tezer, M. M., & Basaran Bundur, Z. (2021).** Immobilization of bacterial cells on natural minerals for self-healing cement-based materials. *Frontiers in Built Environment*, 7, 655935.
- Sandhya, V. Z. A. S., SK. Z. A., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. S. S. S. (2009).** Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and fertility of soils*, 46, 17-26.
- Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019).** Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *Amb Express*, 9(1), 205.
- Santoyo, G. (2022).** How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of advanced research*, 40, 45-58.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016).** Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.
- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021).** Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475.
- Saranraj, P., Al-Tawaha, A. R. M., Sivasakthivelan, P., Al-Tawaha, A. R. M., Amala, K., Thangadurai, D., & Sangeetha, J. (2022).** *Azospirillum* Bioinoculant Technology: Past To Current Knowledge And Future Prospects. *Organic Farming for Sustainable Development*, 51-76.

- Sarı, A., Şahinoğlu, G., & Tüzen, M. (2012).** Antimony (III) adsorption from aqueous solution using raw perlite and Mn-modified perlite: equilibrium, thermodynamic, and kinetic studies. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(19), 6877-6886.
- Sarkar, J., Chakraborty, B., & Chakraborty, U. (2018).** Plant growth promoting rhizobacteria protect wheat plants against temperature stress through antioxidant signalling and reducing chloroplast and membrane injury. *Journal of plant growth regulation*, 37(4), 1396-1412.
- Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Yaseen, M., ... & Meena, H. N. (2019).** Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Applied soil ecology*, 133, 146-159.
- Saxena, J. (2011).** Efficacy of rhizobacterial strains encapsulated in nontoxic biodegradable gel matrices to promote growth and yield of wheat plants. *Applied soil ecology*, 48(3), 301-308.
- Scales, N. C., Huynh, K. T., Weihe, C., & Martiny, J. B. H. (2023).** Desiccation induces varied responses within a soil bacterial genus. *Environmental Microbiology*, 25(12), 3075-3086.
- Schoebitz, M., & López Belchí, M. D. (2016).** Encapsulation techniques for plant growth-promoting rhizobacteria. *Bioformulations: for sustainable agriculture*, 251-265.
- Schoebitz, M., Simonin, H., & Poncelet, D. (2012).** Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *Journal of microencapsulation*, 29(6), 532-538.
- Schultz, B., & Boyle, C. (2005).** The endophytic continuum. *Mycol. Res*, 109(6), 661-686.
- Seetharaman, K., & Bertoft, E. (2012).** Perspectives on the history of research on starch Part IV: On the visualization of granule architecture. *Starch-Stärke*, 64(12), 929-934.
- Sehrawat, R., Abdullah, S., Khatri, P., Kumar, L., Kumar, A., & Mujumdar, A. S. (2022).** Role of drying technology in probiotic encapsulation and impact on food safety. *Drying Technology*, 40(8), 1562-1581.
- Selwyn, B. (2021).** A green new deal for agriculture: for, within, or against capitalism?. *The Journal of Peasant Studies*, 48(4), 778-806.
- Silini, A., Cherif-Silini, H., & Yahiaoui, B. (2016).** Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *African Journal of Microbiology Research*, 10(12), 387-399.

- Silva, L. A., Lopes Neto, J. H. P., & Cardarelli, H. R. (2019).** Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of microbiology*, *69*, 321-328.
- Silva, L. I. D., Pereira, M. C., Carvalho, A. M. X. D., Buttrós, V. H., Pasqual, M., & Dória, J. (2023).** Phosphorus-solubilizing microorganisms: a key to sustainable agriculture. *Agriculture*, *13*(2), 462.
- Simkin, A. J., López-Calcano, P. E., & Raines, C. A. (2019).** Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *Journal of Experimental Botany*, *70*(4), 1119-1140.
- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017).** Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydrate polymers*, *170*, 1-14.
- Sindhu, S. S., Sharma, R., Sindhu, S., & Phour, M. (2019).** Plant nutrient management through inoculation of zinc-solubilizing bacteria for sustainable agriculture. *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment*, 173-201.
- Singh, B. K., Trivedi, P., Egidi, E., Macdonald, C. A., & Delgado-Baquerizo, M. (2020).** Crop microbiome and sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 601-602.
- Singh, K., Guleria, V., & Kaushal, S. (2023).** Utilization of Biofertilizers and plant growth promoters in hydroponic production system. *Current Journal of Applied Science and Technology*, *42*(37), 13-23.
- Singh, S., Chhabra, R., Sharma, A., & Bisht, A. (2024).** Harnessing the Power of Zinc-Solubilizing Bacteria: A Catalyst for a Sustainable Agrosystem. *Bacteria*, *3*(1), 15-29.
- Singh, V., & Kumar, B. (2023).** A review of agricultural microbial inoculants and their carriers in bioformulation. *Rhizosphere*, 100843.
- Slama, H. B., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., ... & Belbahri, L. (2019).** Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3236.
- Srmdel, P., Bogataj, M., Zega, A., Planinšek, O., & Mrhar, A. (2008).** Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*, *25*(2), 90-105.
- Solanki, M. K., Malviya, M. K., & Wang, Z. (2016).** Actinomycetes bio-inoculants: A modern prospectus for plant disease management. *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*, 63-81.

- Soluch, R., Hülder, N. F., Romero Picazo, D., Özkurt, E., Stukenbrock, E. H., & Dagan, T. (2021).** Colonization dynamics of *Pantoea agglomerans* in the wheat root habitat. *Environmental Microbiology*, 23(4), 2260-2273.
- Song, S., Liu, Y., Wang, N. R., & Haney, C. H. (2021).** Mechanisms in plant–microbiome interactions: lessons from model systems. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102003.
- Sood, G., Kaushal, R., & Sharma, M. (2020).** Significance of inoculation with *Bacillus subtilis* to alleviate drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Vegetos*, 33(4), 782-792.
- Sosnik, A. (2014).** Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. *International Scholarly Research Notices*, 2014(1), 926157.
- Sosnowski, J., Truba, M., & Vasileva, V. (2023).** The impact of auxin and cytokinin on the growth and development of selected crops. *Agriculture*, 13(3), 724.
- Stark, J. M., & Hart, S. C. (2003).** UV-B radiation and soil microbial communities. *Nature*, 423(6936), 137-138.
- Stella, M., Theeba, M., & Illani, Z. I. (2019).** Organic fertilizer amended with immobilized bacterial cells for extended shelf-life. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101248.
- Stone, B. W., Weingarten, E. A., & Jackson, C. R. (2018).** The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. *Annual plant reviews online*, 533-556.
- Streeter, J. G. (2003).** Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 484-491.
- Stroparo, T. R., & Floriani, N. (2024).** Agroecology, slow food and sustainable development goals (SDGs): resilience of agro-food systems, combat hunger, and local governance. *Revista Engenharia na Agricultura-REVENG*, 32(Contínua), 27-36.
- Subramaniam, N., & Sundaram, L. (2020).** Siderophore producing *Pseudomonas* spp. isolated from rhizospheric soil and enhancing iron content in *Arachis hypogaea* L. plant.
- Suleimanova, A. D., Beinbauer, A., Valeeva, L. R., Chastukhina, I. B., Balaban, N. P., Shakirov, E. V., ... & Sharipova, M. R. (2015).** Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5. 1. *Applied and environmental microbiology*, 81(19), 6790-6799.
- Suman, A., Govindasamy, V., Ramakrishnan, B., Aswini, K., SaiPrasad, J., Sharma, P., ... & Annapurna, K. (2022).** Microbial community and function-based synthetic bioinoculants: a perspective for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 805498.

- Suman, A., Shukla, L., Marag, P. S., Verma, P., Gond, S., & Prasad, J. S. (2020).** Potential use of plant colonizing *Pantoea* as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops. *Journal of Environmental Biology*, *41*(5), 987-994.
- Sun, L., Cheng, L., Ma, Y., Lei, P., Wang, R., Gu, Y., ... & Xu, H. (2022).** Exopolysaccharides from *Pantoea alhagi* NX-11 specifically improve its root colonization and rice salt resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*, *209*, 396-404.
- Surya, R., Mullassery, M. D., Fernandez, N. B., & Thomas, D. (2019).** Synthesis and characterization of a clay-alginate nanocomposite for the controlled release of 5-Fluorouracil. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, *4*(3), 432-441.
- Suyamud, B., Thiravetyan, P., Panyapinyopol, B., & Inthorn, D. (2018).** *Dracaena sanderiana* endophytic bacteria interactions: effect of endophyte inoculation on bisphenol A removal. *Ecotoxicology and environmental safety*, *157*, 318-326.
- Szopa, D., Mielczarek, M., Skrzypczak, D., Izydorczyk, G., Mikula, K., Chojnacka, K., & Witek-Krowiak, A. (2022).** Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix—A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial crops and products*, *181*, 114846.
- Tak, H. I., Ahmad, F., & Babalola, O. O. (2012).** Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 223*, 33-52.
- Takahashi, H., Nakaho, K., Ishihara, T., Ando, S., Wada, T., Kanayama, Y., ... & Hyakumachi, M. (2014).** Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant cell reports*, *33*, 99-110.
- Takehara, S., & Ueguchi-Tanaka, M. (2018).** Gibberellin. *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*, 83-95.
- Talboys, P. J., Owen, D. W., Healey, J. R., Withers, P. J., & Jones, D. L. (2014).** Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biology*, *14*, 1-9.
- Tallapragada, P., & Seshagiri, S. (2017).** Application of bioinoculants for sustainable agriculture. In *Probiotics and plant health* (pp. 473-495). Singapore: Springer Singapore.
- Tang, J., Li, Y., Zhang, L., Mu, J., Jiang, Y., Fu, H., ... & Ye, Z. (2023).** Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms. *Microorganisms*, *11*(8), 2077.

- Tariq, M., Noman, M., Ahmed, T., Hameed, A., Manzoor, N., & Zafar, M. (2017).** Antagonistic features displayed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, *1*(1), 038-043.
- Thakur, S., Sharma, B., Verma, A., Chaudhary, J., Tamulevicius, S., & Thakur, V. K. (2018).** Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications. *Journal of cleaner production*, *198*, 143-159.
- Thomas, P., & Sekhar, A. C. (2014).** Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. *AoB Plants*, *6*, plu002.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A. C. (2017).** Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in plant science*, *8*, 49.
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022b).** Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants*, *11*(22), 3065.
- Timofeeva, A., Galyamova, M., & Sedykh, S. (2022a).** Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. *Plants*, *11*(16), 2119.
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002).** Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, *28*(6), 621-630.
- Toromade, A. S., Soyombo, D. A., Kupa, E., & Ijomah, T. I. (2024).** Reviewing the impact of climate change on global food security: Challenges and solutions. *International Journal of Applied Research in Social Sciences*, *6*(7), 1403-1416.
- Tran, B. N., Tran, K. L., Nguyen, T. T., Bui, L. P. T., & Nguyen, C. N. (2023).** A Novel Alginate Film based on Nanocoating Approach for enteric-release tablets. *AAPS PharmSciTech*, *24*(4), 99.
- Trigo, A., Marta-Costa, A., & Fragoso, R. (2021).** Principles of sustainable agriculture: Defining standardized reference points. *Sustainability*, *13*(8), 4086.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2004).** Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*, *73*, 710-715.
- Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., & Tugizimana, F. (2022).** *Bacillus* for plant growth promotion and stress resilience: what have we learned?. *Plants*, *11*(19), 2482.
- Tsukanova, K. A., Meyer, J. J. M., & Bibikova, T. N. (2017).** Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African journal of botany*, *113*, 91-102.

- Tu, L., He, Y., Shan, C., & Wu, Z. (2016).** Preparation of microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 seed coating agents and their effects on the growth of cotton seedlings. *BioMed Research International*, 2016(1), 3251357.
- Umair Hassan, M., Aamer, M., Umer Chattha, M., Haiying, T., Shahzad, B., Barbanti, L., ... & Guoqin, H. (2020).** The critical role of zinc in plants facing the drought stress. *Agriculture*, 10(9), 396.
- Upadhayay, V. K., Singh, A. V., & Khan, A. (2022).** Cross talk between zinc-solubilizing bacteria and plants: A short tale of bacterial-assisted zinc biofortification. *Frontiers in Soil Science*, 1, 788170.
- Vandana, U. K., Rajkumari, J., Singha, L. P., Satish, L., Alavilli, H., Sudheer, P. D., ... & Pandey, P. (2021).** The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion. *Biology*, 10(2), 101.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Garcia del Moral, L. F., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020).** Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. *Frontiers in plant science*, 11, 270.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016).** Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, 21(5), 573.
- Vejan, P., Khadiran, T., Abdullah, R., Ismail, S., & Dadrasnia, A. (2019).** Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria—prospects and potential in agricultural sector: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 42(19), 2600-2623.
- Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013).** Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological control*, 67(3), 380-389.
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., Lavakush, S., & Singh, V. (2010).** Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International journal of agricultural research*, 5(11), 954-983.
- Vetterlein, D., Carminati, A., Kögel-Knabner, I., Bienert, G. P., Smalla, K., Oburger, E., ... & Schlüter, S. (2020).** Rhizosphere spatiotemporal organization—a key to rhizosphere functions. *Frontiers in agronomy*, 2, 8.
- Vishnu, M., Malaisamy, K., Soundararajan, R. P., Suganthi, A., Subramanian, A., Senthilkumar, M., ... & Kasivelu, G. (2024).** Nano-bioformulations: emerging trends and potential applications in next generation crop protection. *Environmental Science: Nano*.

- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., ... & Tilman, D. G. (1997).** Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737-750.
- Vocciante, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022).** The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied Sciences*, 12(3), 1231.
- Vorholt, J. A. (2012).** Microbial life in the phyllosphere. *Nature reviews microbiology*, 10(12), 828-840.
- Wagner, J. F. (2013).** Mechanical properties of clays and clay minerals. In *Developments in clay science* (Vol. 5, pp. 347-381). Elsevier.
- Wahab, S., Muzammil, K., Nasir, N., Khan, M. S., Ahmad, M. F., Khalid, M., ... & Busayli, A. M. (2022).** Advancement and new trends in analysis of pesticide residues in food: A comprehensive review. *Plants*, 11(9), 1106.
- Wang, B., Zhang, W., Li, L., Guo, W., Xing, J., Wang, H., ... & Hong, Z. (2020).** Novel talc encapsulated lanthanum alginate hydrogel for efficient phosphate adsorption and fixation. *Chemosphere*, 256, 127124.
- Wang, D., Yi, L., Huang, B., & Liu, C. (2015).** High-temperature dehydration of talc: a kinetics study using in situ X-ray powder diffraction. *Phase Transitions*, 88(6), 560-566.
- Wang, J. J., Yan, A. H., Wang, W., Li, J. Q., & Li, Y. L. (2016).** Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of phosphate-solubilizing bacteria strain D2 (*Pantoea* sp.) in rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* in iron tailings yard. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, 27(11), 3705-3711.
- Wang, M., Geng, L., Sun, X., Shu, C., Song, F., & Zhang, J. (2020).** Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L. *Biological control*, 145, 104262.
- Wang, M., Geng, L., Xue, B., Wang, Z., Xu, W., Shu, C., & Zhang, J. (2021).** Structure characteristics and function of a novel extracellular polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* strain 4D19. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 956-964.
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015).** Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 2955-2965.

- White, J. F., Crawford, H., Torres, M. S., Mattera, R., Irizarry, I., & Bergen, M. (2012).** A proposed mechanism for nitrogen acquisition by grass seedlings through oxidation of symbiotic bacteria. *Symbiosis*, 57, 161-171.
- Wolde, Z. (2016).** A review on evaluation of soil potassium status and crop response to potassium fertilization. *Journal of Environment and Earth Science*, 6(8), 37-44.
- Wu, J. J., Wu, P. C., Yago, J. I., & Chung, K. R. (2023).** The regulatory hub of siderophore biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Journal of Fungi*, 9(4), 427.
- Wu, Z., Guo, L., Qin, S., & Li, C. (2012).** Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 317-327.
- Wu, Z., Li, X., Liu, X., Dong, J., Fan, D., Xu, X., & He, Y. (2020).** Membrane shell permeability of Rs-198 microcapsules and their ability for growth promoting bioactivity compound releasing. *Rsc Advances*, 10(2), 1159-1171.
- Wu, Z., Zhao, Y., Kaleem, I., & Li, C. (2011).** Preparation of calcium–alginate microcapsuled microbial fertilizer coating *Klebsiella oxytoca* Rs-5 and its performance under salinity stress. *European journal of soil biology*, 47(2), 152-159.
- Wulandari, W., Islami, D. M., Wellia, D. V., Emriadi, E., Sisca, V., & Jamarun, N. (2023).** The effect of alginate concentration on crystallinity, morphology, and thermal stability properties of hydroxyapatite/alginate composite. *Polymers*, 15(3), 614.
- Xiong, L., Shah, F., & Wu, W. (2022).** Environmental and socio-economic performance of intensive farming systems with varying agricultural resource for maize production. *Science of the Total Environment*, 850, 158030.
- Yadav, A. N. (2022).** Phosphate-solubilizing microorganisms for agricultural sustainability. *J Appl Biol Biotechnol*, 10(03), 1-6.
- Yadav, A. N., Kumar, V., Dhaliwal, H. S., Prasad, R., & Saxena, A. K. (2018).** Microbiome in crops: diversity, distribution, and potential role in crop improvement. In *Crop improvement through microbial biotechnology* (pp. 305-332). Elsevier.
- Yadav, A. N., Rastegari, A. A., Yadav, N., & Kour, D. (2020).** *Advances in plant microbiome and sustainable agriculture*. Singapore: Springer Singapore.
- Yaghoubi Khangahi, M., Leoni, B., & Crecchio, C. (2021).** Photosynthetic responses of durum wheat to chemical/microbiological fertilization management under salt and drought stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(8), 123.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018).** Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.

- Yang, P., Condrich, A., Scranton, S., Hebner, C., Lu, L., & Ali, M. A. (2024).** Utilizing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) to Advance Sustainable Agriculture. *Bacteria*, 3(4), 434-451.
- Yang, W., Cortijo, S., Korsbo, N., Roszak, P., Schiessl, K., Gurzadyan, A., ... & Meyerowitz, E. (2021).** Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis*. *Science*, 371(6536), 1350-1355.
- Yong, J. W. H., Ng, Y. F., Tan, S. N., & Chew, A. Y. L. (2010).** Effect of fertilizer application on photosynthesis and oil yield of *Jatropha curcas* L. *Photosynthetica*, 48, 208-218.
- Young, C. C., Rekha, P. D., Lai, W. A., & Arun, A. B. (2006).** Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1), 76-83.
- Yu, X., Lund, S. P., Scott, R. A., Greenwald, J. W., Records, A. H., Nettleton, D., ... & Beattie, G. A. (2013).** Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), E425-E434.
- Zacky, F. A., & Ting, A. S. Y. (2015).** Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 by formulated cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* in sterile soil environment. *Biocontrol Science and Technology*, 25(6), 685-696.
- Zago, S. L., Santos, M. F. D., Konrad, D., Fiorini, A., Rosado, F. R., Missio, R. F., & Vendruscolo, E. C. G. (2019).** Shelf life of *Azospirillum brasilense* in alginate beads enriched with trehalose and humic acid. *Journal of Agricultural Science*, 11(6), 269.
- Zhang, W., Zheng, L., Lang, D., Zhang, X., Ma, X., Li, X., & Zhang, X. (2023).** Eco-friendly bio-encapsulation from sodium alginate-trehalose-kaolin and its performance evaluation in improving plant growth under salt or/and drought conditions. *International journal of biological macromolecules*, 225, 123-134.
- Zhang, X., Li, E., Xiong, X., Shen, D., & Feng, Y. (2010).** Colonization of endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 on host rice, with formation of multicellular symplasmata. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1667-1673.
- Zhang, Z., Peng, R., Xia, X., Liu, P., Chen, S., Xia, R., ... & Lin, J. (2023).** Effects of iron on the growth, chlorophyll a, total lipids, and fatty acids of *Chaetoceros lorenzianus*. *Journal of Applied Phycology*, 35(2), 639-647.
- Zhou, X., Liu, D., Bu, H., Deng, L., Liu, H., Yuan, P., ... & Song, H. (2018).** XRD-based quantitative analysis of clay minerals using reference intensity ratios, mineral intensity

factors, Rietveld, and full pattern summation methods: A critical review. *Solid Earth Sciences*, 3(1), 16-29.

**Zia-ur-Rehman, M., Mfarrej, M. F. B., Usman, M., Anayatullah, S., Rizwan, M., Alharby, H. F., ... & Ali, S. (2023).** Effect of iron nanoparticles and conventional sources of Fe on growth, physiology and nutrient accumulation in wheat plants grown on normal and salt-affected soils. *Journal of Hazardous Materials*, 458, 131861.

**Zohar-Perez, C., Chernin, L., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2003).** Structure of dried cellular alginate matrix containing fillers provides extra protection for microorganisms against UVC radiation. *Radiation research*, 160(2), 198-204.

**Zouagui, R., Zouagui, H., Aurag, J., Ibrahimi, A., & Sbabou, L. (2024).** Functional analysis and comparative genomics of *Rahnella perminowiae* S11P1 and *Variovorax* sp. S12S4, two plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Crocus sativus* L.(saffron) rhizosphere. *BMC genomics*, 25(1), 289.

# **Annexes**

### **Annexe 1 : Composition du Milieu Luria-Bertani (LB)**

Tryptone 10 g/l

Extrait de levure 5 g/l

NaCl 5 g/l

### **Annexe 2 : Réactif de Salkowski**

-50ml d'acide perchlorique 35%

-1ml de FeCl<sub>3</sub> à 0.5 M

- Quelques gouttes d'acide ortho-phosphorique.

### **Annexe 3 : Composition du Milieu King B**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g/l

MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 1,5 g/l

Peptone 20 g/l

Glycérol 10 ml/l

### **Annexe 4 : Solution Chrome Azurol S (CAS)**

- Mettre 6 ml de HDTMA (Hexamethylammoniumbromure) 10mM dans une éprouvette de 100 ml et diluer à 50 ml avec de l'eau désionisée. (1)

-Mélanger 1,5 ml de FeCl<sub>3</sub><sup>+</sup> (1mM FeCl<sub>3</sub><sup>+</sup> .6 H<sub>2</sub>O; 10 mM HCL) et 7,5 ml de CAS 2mM(2)

-Ajouter (2) à (1).

- Dissoudre 4,307 g de piperazine anhydre dans de l'eau et ajouter 6,25 ml de HCL 12 M (Solution tampon pH = pKa = 5.6).

- Ajouter la solution tampon et continuer avec de l'eau jusqu'à 100 ml.

### **Annexe 5 : Composition du Milieu Pikovskaya PVK**

D – Glucose 10 g/l

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0.5 g/l

NaCl 0.2 g/l

MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0.1 g/l

KCl 0.2 g/l

Extrait de levure 0,5 g/l

MnSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O 0.002 g/l

FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0.002 g/l

Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 g/l

### **Annexe 6 : Composition du tampon PBS (pH7.2)**

NaCl 8 g/l

KCl 0.2 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42 g/l

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24 g/l

### **Annexe 7 : Composition du milieu Murashige et Skoog (MS ½) (pH 5.7)**

#### **Macroéléments**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mg/l

$\text{CaCl}_2$  332 mg/l

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650 mg/l

$\text{KNO}_3$  1900 mg/l

$\text{MgSO}_4$  180.54 mg/l

Les concentrations des macroéléments doivent être diluées au ½ pour le MS ½

#### **Microéléments**

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/l

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/l

$\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 mg/l

KI 0.83 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  16.9 mg/l

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/l

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  8.6 mg/l

**FeNaEDTA** 36.7 mg/l

#### **Préparation**

Solution Macro-élément 5ml

Solution Micro-éléments 2.5ml

Solution Fer –EDTA 2.5ml

Eau distillée 1000ml

#### **Agar (7g/l)**

### **Annexe 8 : Composition de la solution d'Hoagland (pH 5.9)**

#### **Macroéléments**

$\text{KNO}_3$  505 mg/l

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  136 mg/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  493 mg/l

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1181 mg/l

#### **Microéléments**

$\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.13 mg/l

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.22 mg/l

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.08 mg/l

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.025 mg/l

**Chélate de Fer (mg/l)**

Fe-EDTA\* 5.57 mg/l

Préparation du Fe-EDTA\* : 33.2 g NA-EDTA dans 89.2 ml de NaOH 1N, 24, 9 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dissoute dans 700 ml d'eau. On mélange les deux solutions et on garde le mélange pendant une nuit à l'obscurité dans un endroit aéré. Puis on complète à 1l. La solution de Fe-EDTA est stockée à une faible température et à l'obscurité.



---

*Research article*

## Root colonization dynamics of alginate encapsulated rhizobacteria: implications for *Arabidopsis thaliana* root growth and durum wheat performance

Amel Balla<sup>1</sup>, Allaoua Silini<sup>1,\*</sup>, Hafsa Cherif-Silini<sup>1</sup>, Francesca Mapelli<sup>2</sup> and Sara Borin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas of Setif -1, 19000 Setif, Algeria

<sup>2</sup> Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), University of Milan, 20133 Milan, Italy

\* **Correspondence:** Email: siliniallaoua@univ-setif.dz; Tel: +213(0)775133491.

**Abstract:** Bioencapsulation in alginate capsules offers an interesting opportunity for the efficient delivery of microbial inoculants for agricultural purposes. The present study evaluated the ionic gelation technique to prepare beads loaded with two plant growth-promoting bacteria (PGPB), *Bacillus thuringiensis* strain B25 and *Pantoea agglomerans* strain Pa in 1% alginate supplemented with 5mM proline as an osmoprotectant. Capsule morphology, survival rate, encapsulation efficiency, and viability during 24 months of storage as well as the stability of PGP activities were studied. Our results indicate that more than 99% of bacteria were effectively trapped in the alginate beads, which successfully released live bacteria after 60 days of storage at room temperature. A considerable survival of *B. thuringiensis* B25 throughout the storage period was detected, while the inoculated concentration of  $8.72 \times 10^9 (\pm 0.04 \times 10^9)$  CFU/mL was reduced to 99.9% for *P. agglomerans* Pa after 24 months of storage. Notably, a higher survival of individually encapsulated bacteria was observed compared to their co-inoculation. The colonization capacity of model plant *Arabidopsis thaliana* roots by free and encapsulated bacteria was detected by the triphenyltetrazolium chloride test. Moreover, both strains effectively colonized the rhizosphere, rhizoplane, and endosphere of durum wheat plants and exerted a remarkable improvement in plant growth, estimated as a significant increase in the quantities of total proteins, sugars, and chlorophyll pigments, besides roots and shoots length. This study demonstrated that alginate-encapsulated *B. thuringiensis* B25 and *P. agglomerans* Pa could be used as inoculants in agriculture, as their encapsulation ensures robust protection, maintenance of viability and PGP activity,

and controlled bacterial biostimulant release into the rhizosphere.

**Keywords:** bioencapsulation; sodium alginate; PGPB; *Arabidopsis thaliana*; durum wheat; root colonization

---

## 1. Introduction

It is predicted that approximately 9.7 billion people will inhabit Earth by 2050 [1]; this demographic expansion, inextricably combined with massive industrialization and climate change, poses major threats to global food security [2]. In response to the growing food needs and desires of the population, the use of fertilizers and pesticides is an inevitable approach to ensure crop productivity and yield. Around 2.7 million tons of pesticides [3] and 190 million tons of synthetic chemical fertilizers [2] are used yearly worldwide. However, overexploitation of agricultural land and the increased and uncontrolled use of chemicals endanger the entire terrestrial ecosystem, causing problems to human and animal health [4]. Furthermore, the contamination of soil, water, and food and the degradation of soil fertility and biological balance of the entire ecosystem [5], as well as a reduction in soil nutrient content and a weakening of crops against various pathogens and pests [6], can be generated. To manage these threats, the scientific community is exploring solutions to protect the environment and minimize the use of synthetic chemicals in agricultural practices. Sustainable agriculture via microbial bioengineering has attracted significant attention in the last decade as a non-invasive and environmentally friendly alternative [7]. The application of PGPB (plant growth-promoting bacteria) as bioinoculants (biofertilizers, biostimulants, or biopesticides) is a promising approach aimed at ensuring healthy production and maintenance of soil quality and biodiversity [8]. PGPBs have immense potential to improve plant growth, abiotic stress tolerance, and pathogen suppression. Such potential is related to their ability to boost plant access to nutrients, for instance by recycling and solubilizing minerals [9] and to produce phytohormones and growth regulators [10]. PGPBs can also control diseases spread in the soil by induced systemic resistance (ISR) and by secreting various antimicrobial molecules [11].

A large number of bacteria are known for their ability to exert plant probiotic effects. *Pantoea agglomerans* is one of the most promising bacteria in agriculture, being known as a colonizer of various cereals, notably wheat [12] and maize [13]. *Pantoea agglomerans* has an arsenal of attributes that make it a robust PGPB such as phytohormone production [14], phosphate solubilization, ammonia production [15], secretion of various proteins and enzymes [16], and the stimulation of the plant immune system, as it has the capacity to fight against various fungal phytopathogens [17]. The bacterial species *Bacillus thuringiensis* is a marketed biopesticide known as a biocontrol agent effective against several pests [18]. This sporulating bacterium also has remarkable biofertilization and biostimulation properties: it produces phytohormones, ACC deaminase, and siderophores, solubilizes phosphate, and synthesizes volatile organic compounds [19].

Despite literature reports on the immense potential of PGPBs in improving plant growth and yield and mitigating the effects of biotic and abiotic stress, and despite the successful development of liquid bioformulations, the market share of biofertilizers represents only 5% of the global fertilizer market [20]. The application and commercialization of bioformulations encounter many challenges, such as conservation, viability, and contamination issues, cost, and sensitivity to environmental factors [21].

The encapsulation of bacterial cells or immobilization in biodegradable, biocompatible, non-toxic, and low-cost biopolymers such as alginate aims to protect bacteria introduced into the soil against biotic and abiotic stress in order to ensure the preservation of their activities. This strategy can also guarantee maximum viability and progressive cell release into the rhizosphere for efficient root colonization [22], according to the principle of precision agriculture. However, current literature offers limited information on the persistence and effectiveness of activities related to plant growth promotion after bacterial cell encapsulation. This process may face major challenges; hence, clarifications are necessary.

In this study, *Arabidopsis thaliana* and *Triticum durum* (durum wheat) were selected to evaluate the efficacy of encapsulated bacteria. *Arabidopsis thaliana*, as a universal model plant, offers a rapid and controlled experimental platform to study plant–microbe interactions [23], while durum wheat, a strategic crop in Algeria and throughout the Mediterranean region, allows the evaluation of the impact of bioinoculants in a real agricultural context [24], especially as the bacterial strains used in this study were originally isolated from its rhizosphere, thus reinforcing their suitability for this culture.

In this context, the general objective of this study was to develop alginate capsules loaded with two plant probiotic agents (*Bacillus thuringiensis* strain B25 and *Pantoea agglomerans* strain Pa), ensuring prolonged viability, preservation of PGP activities, and controlled delivery of strains. The encapsulation efficiency, survival rate, release kinetics, colonization capacity of *Arabidopsis thaliana* in a hydroponic medium, and the effect of encapsulated bacteria on the growth of durum wheat were studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains

The two bacterial strains used in this study were *Pantoea agglomerans* strain Pa and *Bacillus thuringiensis* strain B25. Both strains were selected from a previous study [25]. The Pa strain was isolated from the rhizosphere of durum wheat fields in the Bou-Saâda region, Algeria, while B25 was isolated from the rhizosphere of durum wheat in the North Sétif region, Algeria. Both strains were previously tested for their plant growth-promoting activities and for the absence of antagonism between them [25].

### 2.2. Bacterial growth under drought stress

Luria-Bertani broth (LB) medium was prepared by adding polyethylene glycol (PEG<sub>6000</sub>) at different concentrations (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, and 50%) and inoculating with 1% pre-cultures of the two bacterial strains [24-h cultures with OD = 1.4,  $1.99 \times 10^8 (\pm 0.11 \times 10^8)$  CFU/mL for B25, and OD = 0.78,  $2.22 \times 10^8 (\pm 0.11 \times 10^8)$  CFU/mL for Pa]. After incubation at 30 °C with shaking (200 rpm) for 48 h, growth was estimated by measuring optical density at 600 nm after 24 and 48 h using a spectrophotometer. The growth of the two bacterial strains at different PEG<sub>6000</sub> concentrations was measured. The direct relationship between water potential and its growth inhibitory effect was deduced.

### 2.3. Effect of osmoprotectants on bacterial survival

In order to test the effect of osmoprotectants on the growth and survival of the two tested strains, LB medium with 50% PEG<sub>6000</sub> was supplemented with different osmoprotectants (glycine, betaine, choline, glutamate, mannitol, and proline). Osmoprotectants are added to the medium at a final concentration of 5 mM. Media inoculated with 1% pre-culture were incubated with shaking (200 rpm) at 30 °C for 48 h. Growth was measured at 600 nm using a spectrophotometer.

### 2.4. Microorganisms and culture conditions

Bacteria, previously preserved in 15% glycerol at –20 °C, were cultured in 500 mL of sterile LB medium adjusted to pH 7. Cultures were incubated with shaking (200 rpm) at 30 °C to harvest the cells after 48 h of incubation. Cultures were then centrifuged at 3000 rpm for 30 min. The pellet of each strain was suspended in 10 mL of tryptone-salt broth. For co-inoculation, an individual inoculum of each strain was prepared and centrifuged, and the two pellets were jointly resuspended in 10 mL of tryptone-salt broth. Bacterial concentrations in the final tryptone-salt solution were estimated at  $8.15 \times 10^{10}$  ( $\pm 0.01 \times 10^{10}$ ) CFU/mL for Pa and  $1.42 \times 10^9$  ( $\pm 0.32 \times 10^9$ ) CFU/mL for B25. The bacterial mixture included  $9.17 \times 10^7$  ( $\pm 0.01 \times 10^7$ ) CFU/mL of Pa and  $8.48 \times 10^8$  ( $\pm 0.33 \times 10^8$ ) CFU/mL of B25. The dilution plating technique on LB agar plates at 30°C for 24 h was used for the estimation of bacterial concentration.

### 2.5. Cell bioencapsulation

The extrusion method (ionic gelation) was used as a bioformulation technique following the method described by Wu et al. [26]. The matrix solution was prepared by mixing 1% alginic acid (A-7128 Sigma, Steinheim, Germany; high viscosity (14,000 cps at 2%)) and proline 5mM in distilled water. Then, 10 mL of the previously prepared bacterial suspensions were mixed with 100 mL of sterile matrix solution and stirred for 30 min to obtain a homogeneous solution. The mixture was transferred into a sterile syringe and placed on a sterile CaCl<sub>2</sub> solution (2%) with stirring (150 rpm). After 30 min of contact with the calcium solution, the gelled beads were recovered, washed 5–6 times with sterile distilled water, placed on filter paper in a Petri dish, and dried sterilely under flow for 24 h at room temperature. The dried beads were stored at 4 °C until further use.

### 2.6. Encapsulation efficiency (EE)

The encapsulation efficiency (EE) of bacteria was evaluated using Eq 1 according to Panichikkal et al. [27]:

$$EE = (N_0 - N_e)/N_0 \times 100 \quad (1)$$

Where  $N_0$  is the number of bacteria contained in the alginate solution, and  $N_e$  represents the number of bacteria present in the CaCl<sub>2</sub> solution.

Bacterial enumeration on nutrient agar (NA) from different dilutions was used to determine the number of bacteria in both solutions. All plated nutrient agar plates were incubated at 30 °C for 24 h.

## 2.7. Survival rate

The survival rate of bacteria during the encapsulation process was determined according to Chi et al. [28] by dividing the number of bacteria contained in the dried beads (N) by the number of bacteria contained in the fresh beads (N<sub>0</sub>) according to Eq 2 and expressed as a percentage:

$$\text{Survival rate} = (N/N_0) \times 100 \quad (2)$$

## 2.8. Verification of cell viability and PGP activities during storage

Every month, 1 g of dried beads, stored at 4 °C, was collected and dissolved in 10 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at 30 °C for 1 h in a rotary shaker at 200 rpm. These beads were then sterilely ground in the same solution, and the released bacteria were counted using the conventional nutrient agar (NA) plate enumeration method. Briefly, a series of dilutions of each bioformulation was prepared in 0.85% sterile saline solution; then, 0.1 mL of each dilution was plated on NA plates. Colony forming units (CFU/g) were calculated after incubation at 30 °C for 24 h.

To analyze the production of indole acetic acid (IAA) by the bacteria trapped in the dried capsules, 100 µL of the ground material of each bioformulation was inoculated into 10 mL of nutrient broth supplemented with 0.2% L-tryptophan; the tubes were incubated at 30 °C for 4 days. After incubation, the supernatant was collected by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min, and 0.5 mL of supernatant was mixed with 1 mL of Salkowski reagent. Then, the tubes were kept in the dark for 30 min. The development of a red color indicated IAA production and the absorbance was read at 530 nm. The quantity of IAA (µg/mL) was calculated according to a previously determined pure IAA calibration curve [29].

The production of siderophores was assessed by the Chrome Azurol S (CAS) medium according to Saidi et al. [30]. 10 mL of iron-restricted King B medium was inoculated with 100 µL of the ground material from each bioformulation and incubated at 30 °C for 4 days. After centrifugation of the cultures at 12,000 rpm for 10 min, 500 µL of the CAS reagent was added to 500 µL of the supernatant. The mixture was then incubated in the dark for 30 min. A color change from blue to orange indicated the production of siderophores, and their production was read at 630 nm. The percentage of siderophore units was determined according to Eq 3:

$$\text{Discoloration (\%)} = [(Ar \times As)/Ar] 100 \quad (3)$$

Where Ar is the absorbance of the control, and As is the absorbance of the sample.

The quantitative estimation of phosphate solubilization by encapsulated bacteria was determined on liquid Pikovskaya (PVK) medium, containing insoluble phosphate. 10 mL of liquid PVK were inoculated with 100 µL of grounded bacterial homogenate and incubated at 30 °C for 7 days. Cultures were harvested by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min, and in-culture phosphorus was estimated using the method described by Slama et al. [31]. 500 µL of supernatant was mixed with 500 µL of 10% (w/v) trichloroacetic acid in a test tube to which 4 mL of color reagent was added (1:1:1:2 ratio of 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5% (w/v) ammonium molybdate, 10% (w/v) ascorbic acid, and distilled water) and incubated at room temperature for 30 min. The absorbance of blue color was measured at 630 nm. The amount of soluble phosphate was detected from the standard curve of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

## 2.9. Swelling properties

The study of capsule swelling was carried out according to Wu et al. [26]. 1 g of dried beads was immersed in a solution of 10 mL of 0.85% NaCl for 10 days. Swollen beads were removed each day, and excess solution was removed by gently pressing the beads between two pieces of absorbent paper. The inflated beads were then weighed using an electronic precision balance. The swelling rate was estimated according to Eq 4:

$$\text{Swelling ratio (SR)} = W_s/W_d \times 100 \quad (4)$$

Where  $W_s$  is the weight of the inflated beads at time  $t$ , and  $W_d$  is the weight of the initial dry beads at  $t_0$ . All experiments were carried out in triplicate.

## 2.10. Release properties

The cumulative release of viable bacterial cells released from the bioformulated capsules was measured by immersing 1 g of capsules from the stock after 6 months of storage at 4 °C in 10 mL of PBS (pH 7.2) and incubating them for 60 days at room temperature. Volumes were taken at different intervals, and the cell number in the collected solution was determined by the counting method on nutrient agar (NA) plates. All experiments were carried out in triplicate.

## 2.11. *Arabidopsis thaliana* test

### 2.11.1. Growing conditions

In order to evaluate the effect of root colonization of free and encapsulated tested bacteria on the growth and development of *Arabidopsis thaliana*, the seeds of the wild-type *Arabidopsis thaliana* Columbia Col-0 obtained from Lehle Seeds (USA) were surface sterilized first for 1 min in 70% ethanol and then in sodium hypochlorite (1%, 5 min) and rinsed (6 times) with sterile distilled water. For germination on agar medium, seeds were sown on the surface of ½ Murashige and Skoog (MS) medium (pH 5.7) devoid of sucrose and supplemented with 0.8% (w/v) agar. All plates were covered and sealed with Parafilm paper and placed in a germination chamber maintained at  $22 \pm 2$  °C with a 16/8 h light/dark photoperiod. Four days after germination, 10 seedlings were transferred to half of a Petri dish containing MS (½). For free cultures, each bacterium was inoculated individually with a cell concentration of  $1 \times 10^8$  ( $\pm 0.2 \times 10^8$ ) CFU/mL in the opposite half of the Petri dish, while 50 dried beads were placed in the opposite half of the Petri dish for each of the encapsulated bioformulations.

Each treatment included five replicates with a total of 50 seedlings. The plates were incubated for 11 days under the same germination conditions. At the end of this period, root length and root and leaf biomass were recorded.

The ability of free and encapsulated strains to attach and colonize seedling roots was estimated visually using the triphenyltetrazolium chloride (TTC) procedure [32], while ImageJ software was used to analyze the leaf surface.

The plates were divided into five groups representing the five treatments, as follows: (1) uninoculated seedlings (negative control); (2) seedlings inoculated with free B25 (B25 F); (3) seedlings

inoculated with encapsulated B25 (B25 E); (4) seedlings inoculated with free Pa (Pa F); and (5) seedlings inoculated with encapsulated Pa (Pa E).

### 2.11.2. Chlorophyll and carotenoid estimation

Chlorophylls a, b, and total and carotenoid estimation were carried out according to Kerbab et al. [29]. 0.5 g of leaves from each sample was cut into small segments (0.5 cm), homogenized in 10 mL of 80% acetone, and stored at  $-10^{\circ}\text{C}$  overnight. The organic extract was centrifuged at 14,000 rpm/5 min, and the absorbance of the supernatant was measured by spectrophotometer at 663 nm for chlorophylls a (chl<sub>a</sub>) (Eq 5), at 645 nm for chlorophylls b (chl<sub>b</sub>) (Eq 6), total chlorophyll (Chl<sub>a+b</sub>) (Eq 7), and at 470 nm to determine carotenoids (Eq 8).

$$\text{Chla} = 12.70 A_{663} - 2.69 A_{645} \quad (5)$$

$$\text{Chlb} = 22.90 A_{645} - 4.68 A_{663} \quad (6)$$

$$\text{Chla+b} = 20.21 A_{645} + 8.02 A_{663} \quad (7)$$

$$\text{Carotenoids} = (1000 A_{470} - 1.9 \text{ Chla} - 63.14 \text{ Chlb})/214 \quad (8)$$

## 2.12. Effects of application of free and encapsulated rhizobacteria on durum wheat growth

### 2.12.1. Disinfection and germination of seeds

Wheat seeds of the Bousselam variety (*Triticum durum* L.c.v Bousselam) (Pedigree: Heider/Marli/Heider-Cro ICD-414-1BLCTR-4AP) were surface-disinfected with ethanol (70% for 1 min) and then with sodium hypochlorite (1% for 30 min) and rinsed several times with sterile distilled water. Sterilized seeds were germinated on filter paper in Petri dishes containing 10 mL of sterile distilled water at  $22^{\circ}\text{C}$  for 48 h in the dark.

### 2.12.2. Preparation of free bacterial inoculums

Both strains were inoculated into LB broth with constant stirring at 150 rpm for 48 h at  $30^{\circ}\text{C}$ . Cultures were centrifuged at 3000 rpm for 30 min. The pellet of each strain was suspended in 0.85% sterile saline and adjusted to  $1 \times 10^8$  ( $\pm 0.2 \times 10^8$ ) CFU/mL.

### 2.12.3. Sowing and seed growth

Plastic pots (9 cm in diameter and 10 cm in height) were disinfected with a sodium hypochlorite solution and filled with 550 g of sand sterilized at  $180^{\circ}\text{C}$  for 1 h for 3 alternate days. These pots were watered with 10% (v/w) of a  $\frac{1}{2}$  Hoagland solution before sowing. For samples inoculated with free strains, sowing of seeds was carried out by taking germinated seeds (3 mm radicle), sowing them (5 seeds/pot) at a depth of 1 cm from the surface in each pot, and inoculating with 1 mL/pot of suspension of a fresh culture prepared as described previously. For encapsulated samples, 1 g of capsules

containing  $3.05 \times 10^7 (\pm 0.15 \times 10^7)$  CFU/g for B25 and  $5.7 \times 10^6 (\pm 0.04 \times 10^6)$  CFU/g for Pa were removed from the stock after 6 months of storage at 4 °C and placed at a depth of 1 cm near the sown seeds. The pots were divided into five groups representing the five treatments: (1) uninoculated seeds (negative control); (2) seeds inoculated with free B25 (B25 F); (3) seeds inoculated with encapsulated B25 (B25 E); (4) seeds inoculated with free Pa (Pa F); and (5) seeds inoculated with encapsulated Pa (Pa E).

The pots were kept for 45 days in a growth chamber at an average day/night temperature of 25 and 16 °C, respectively, and a light photoperiod of 16 h. The humidity of the pots was controlled by periodic watering with constant doses of sterile water [33].

Plants were harvested after 45 days, roots were washed with distilled water, and shoots were separated. Morphological (shoot and root lengths, fresh and dry weights) and biochemical parameters (chlorophyll pigments, total sugars, and total proteins) were analyzed. Bacterial survival was determined by analyzing the rhizospheric and root colonization ability of the inoculated bacteria. During treatment, plants were removed at two different time points (after 15 and 30 days) before the final harvest for the analysis of morphological parameters and rhizospheric, epiphytic, and endophytic bacterial enumerations.

#### 2.12.4. Evaluation of morphological parameters

Shoot and root lengths (cm) and fresh and dry weight of shoots and roots (g) were measured. Morphological measurements were carried out in triplicate.

#### 2.12.5. Dosage of chlorophylls and carotenoids

The contents of chlorophyll a, b, total, and carotenoids were determined in triplicate, as described previously.

#### 2.12.6. Total sugar estimation

The extraction of total sugars from fresh leaf and root material was carried out according to the following protocol: 3 mL of ethanol (80%) was added to 0.1 g of leaves. The mixture was incubated at room temperature in the dark for 48 h. Then, the mixture was heated to 80 °C in a water bath to evaporate the ethanol, and then 20 mL of distilled water was added to the mixture. Total sugars were determined according to the method of Dubois et al. [34]. The reaction mixture contained 0.5 mL of the sample, 0.5 mL of a phenol solution (5%), and 2.5 mL of 12 M sulfuric acid. The color intensity proportional to the sugar concentration was measured by spectrophotometer at OD 490 nm. The values obtained were translated into glucose concentrations in reference to a previously established calibration curve. All biochemical parameters were carried out in triplicate.

#### 2.12.7. Total protein estimation

Soluble protein content was estimated by grinding 0.25 g of the fresh tissue samples (shoots and roots) in liquid nitrogen. The resulting powder was solubilized in 5 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0. After centrifugation of the homogenate at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C, the

concentration of supernatant soluble proteins was determined spectrophotometrically according to Lowry et al. [35].

#### 2.12.8. Enumeration of rhizospheric bacteria

1 g of rhizospheric sand was homogenized in 10 mL of sterile physiological water and stirred for 10 min. 100  $\mu\text{L}$  of the sample and of each decimal dilution ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  was spread in duplicate on nutrient agar and incubated at 30 °C for 48 h. Bacterial counts were expressed in CFU/g of soil.

#### 2.12.9. Enumeration of root epiphytic bacteria

1 g of roots from each treatment was washed three times with sterile distilled water in order to remove all attached sand; roots were then transferred into 10 mL of sterile physiological water and stirred for 15 min. Dilutions ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  were prepared, and the number of epiphytes attached to the roots was determined by spreading 100  $\mu\text{L}$  of each dilution on nutrient agar medium. Incubation was carried out at 30 °C for 48 h, and bacterial counts were expressed in CFU/g of roots.

#### 2.12.10. Enumeration of root endophytic bacteria

The root surface was first disinfected by immersing the roots in 70% ethanol for 1 min and then in 1% sodium hypochlorite for 20 min and rinsing several times with sterile distilled water. To check the effectiveness of root disinfection, the final wash water was spread on nutrient agar, and plates were incubated at 30 °C for 48 h. 1 g of disinfected roots was crushed and homogenized in 10 mL of sterile physiological water. 100  $\mu\text{L}$  serial dilutions up to  $10^{-6}$  of the samples were spread on the surface of NA medium and incubated at 30 °C for 48 h. Bacterial counts were expressed in CFU/g of roots.

#### 2.13. *Statistical analysis*

Statistical analysis of the data was performed using analysis of variance (ANOVA). When significant effects were detected, groups were compared using a post-hoc Tukey's HSD test. The significance level used for all statistical tests was 5% ( $p < 0.05$ ). The statistical programs used in the analysis were GraphPad Prism 9.4.0 and OriginPro 2022.

### 3. Results

#### 3.1. *Response of bacterial strains to drought stress and osmoprotectants addition*

In order to evaluate which level of water stress affected bacterial growth, strains were cultured in liquid LB medium supplemented with different concentrations of PEG<sub>6000</sub> (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, and 50%). The PEG presence produced a significant effect on growth after 48 h of incubation (Figure S1A), with 50% concentration inducing a maximum decline in the growth of the two tested strains. Therefore, this concentration was selected for the osmoprotectant application study. Both strains showed the same behavior in response to drought stress. The application of osmoprotectants showed

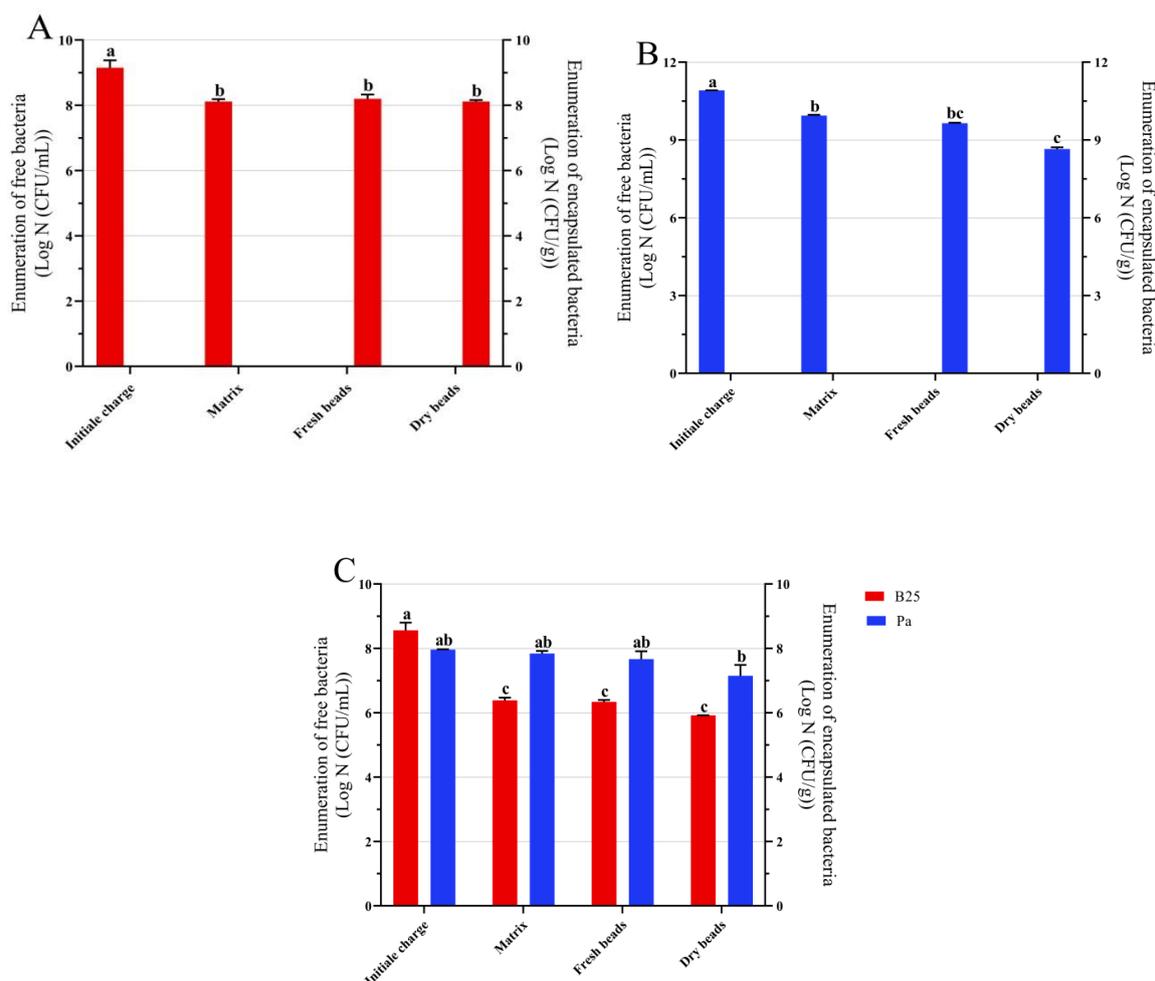
that no significant improvement in growth was recorded with the exception of mannitol for B25 and proline for the two strains (Figure S1B); the addition of both compounds allowed considerably higher cell density in 48h, up to an OD value of 0.27 and 0.19 compared to 0.145 and 0.158 in the control for B25 and Pa, respectively.

### 3.2. Bioencapsulation

The formed beads after gelation had a spherical shape whose diameter varies between 2.48 ( $\pm 0.18$ ) and 3.17 ( $\pm 0.18$ ) mm, while the largest diameter after drying was attributed to B25 beads ( $1.11 \pm 0.06$  mm) (Table 1). The total number of viable cells was calculated at each step of the encapsulation process. The starting cell concentration of B25 was  $1.42 \times 10^9$  ( $\pm 0.32 \times 10^9$ ) CFU/mL and that of Pa was  $8.15 \times 10^{10}$  ( $\pm 0.01 \times 10^{10}$ ) CFU/mL; a concentration of  $3.66 \times 10^8$  ( $\pm 0.33 \times 10^8$ ) CFU/mL for B25 and  $9.18 \times 10^7$  ( $\pm 0.01 \times 10^7$ ) CFU/mL for Pa was added to the alginate matrix solution for their mixture (Figure 1A–C). After bioencapsulation, cell viability was not significantly modified for B25 when encapsulated alone or in mixture; this resulted in a survival rate of 98.60% after drying (Table 1). The number of bacteria in the dried encapsulated Pa beads was found to be  $4.48 \times 10^8$  ( $\pm 0.09 \times 10^8$ ) CFU/g and  $1.407 \times 10^7$  ( $\pm 0.34 \times 10^7$ ) CFU/g when encapsulated alone and in combination, respectively (Figure 1A–C). These results correspond to an excellent encapsulation efficiency (EE) where more than 99% of cells were effectively trapped in the gel capsules for all treatments.

**Table 1.** Characteristics of the different alginate beads.

Treatment	Fresh weight (mg)	Dry weight(mg)	Fresh beads size (mm)	Dry beads size (mm)	Survival rate (%)	Entrapment efficiency (EE) (%)
B25	$17.18 \pm 1.17$	$0.24 \pm 0.05$	$3.17 \pm 0.18$	$1.11 \pm 0.06$	98.60	99.97
Pa	$12.64 \pm 0.68$	$0.55 \pm 0.07$	$2.61 \pm 0.1$	$1.06 \pm 0.08$	89.68	99.92
B25+Pa	$17.84 \pm 1.21$	$0.51 \pm 0.06$	$2.48 \pm 0.18$	$1.08 \pm 0.04$	93.23	99.92



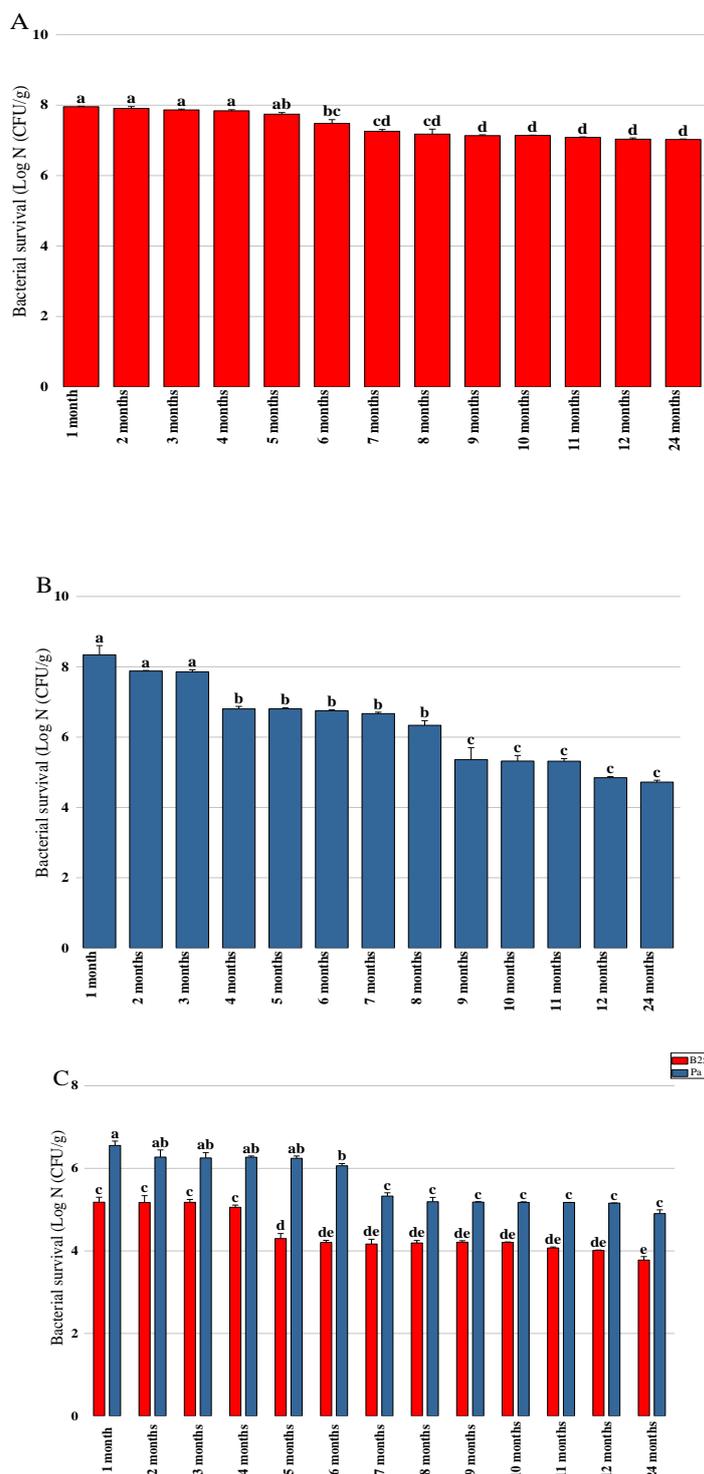
**Figure 1.** Survival of (A) B25, (B) Pa, and (C) B25+Pa at different stages of the bioencapsulation process. Bar plots represent the average standard error of three different experiments. GraphPad Prism9.4.0 was used to perform statistical analysis using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The CFUs corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

### 3.3. Bead storage studies

#### 3.3.1. Survival of encapsulated strains

Survival analysis was carried out every month after storing the dried beads at 4 °C for 24 months. The number of viable cells in B25 beads remained almost constant during the 24 months of storage (Figure 2A). Pa beads showed a lower survival rate: the number of viable cells reached  $7 \times 10^4$  ( $\pm 0.04 \times 10^4$ ) CFU/g after 12 months and  $5.3 \times 10^4$  ( $\pm 0.07 \times 10^4$ ) CFU/g after 24 months of storage (Figure 2B). For bacterial mixture beads, the bacterial load of the two strains decreased by one log during the first storage phase (from 1 month to 6 months) and then stabilized and reached  $5.9 \times 10^3$  ( $\pm 0.11 \times 10^3$ ) CFU/g for B25 and  $8 \times 10^4$  ( $\pm 0.13 \times 10^4$ ) CFU/g for Pa after 24 months of storage (Figure 2C). The

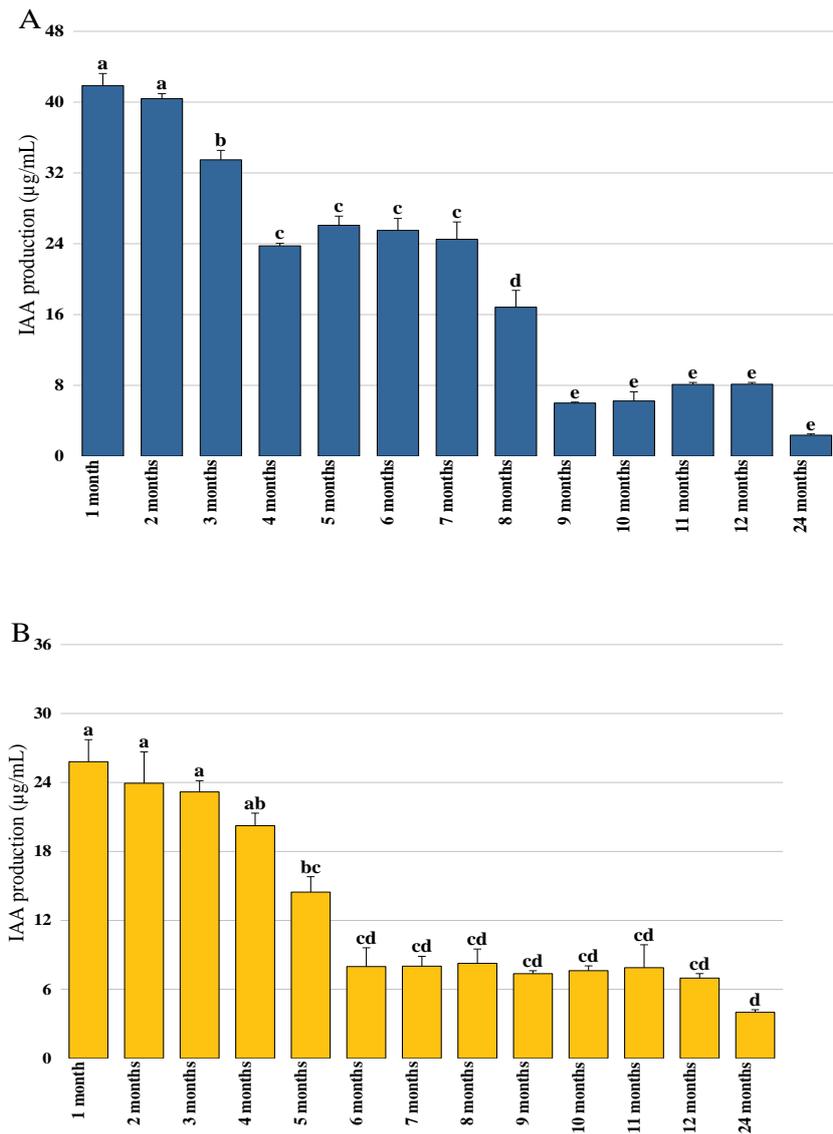
survival parameter can be useful in the selection of bioformulations for crop inoculation.



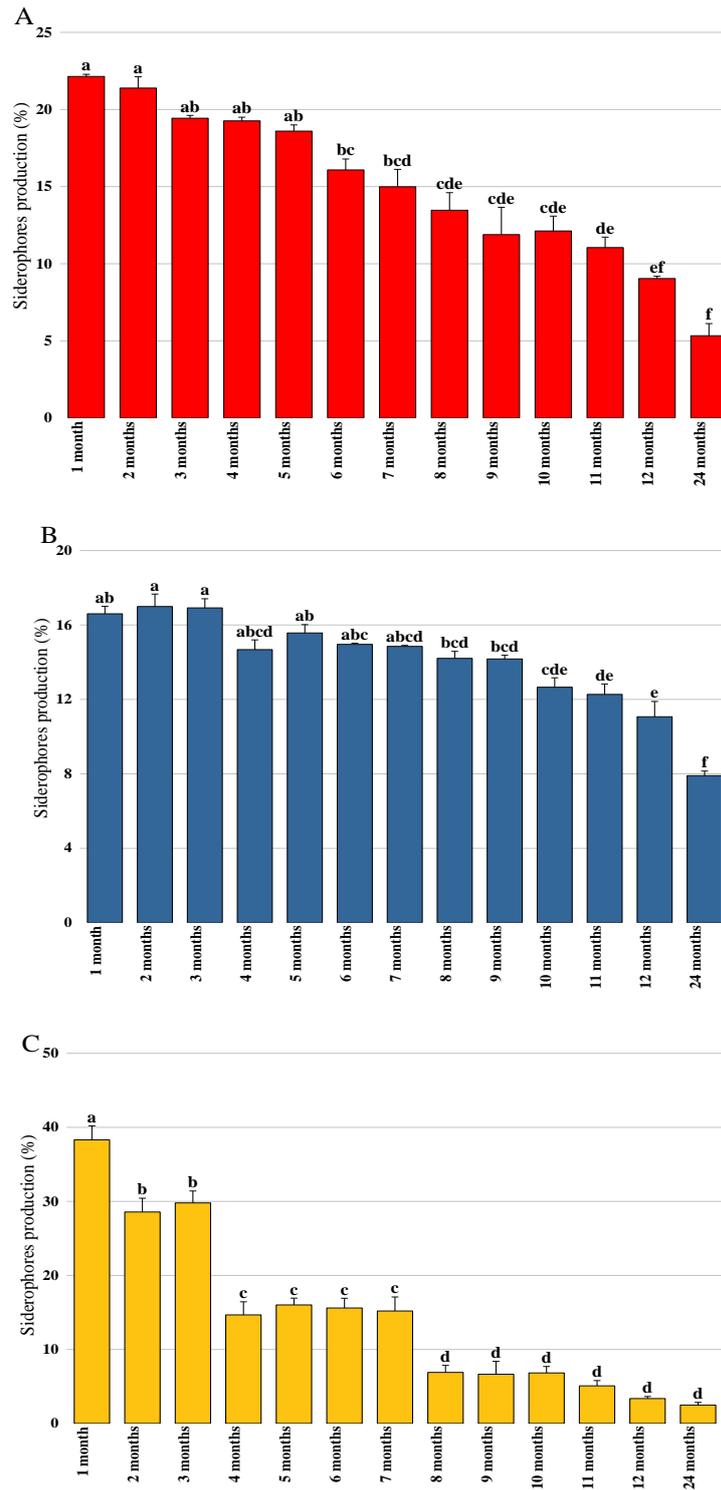
**Figure 2.** Survival of (A) B25, (B) Pa, and (C) B25+Pa during 24 months of storage. Bar plots represent the average standard error of three different experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. CFUs corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

### 3.3.2. Maintenance of PGP traits by encapsulated strains over time

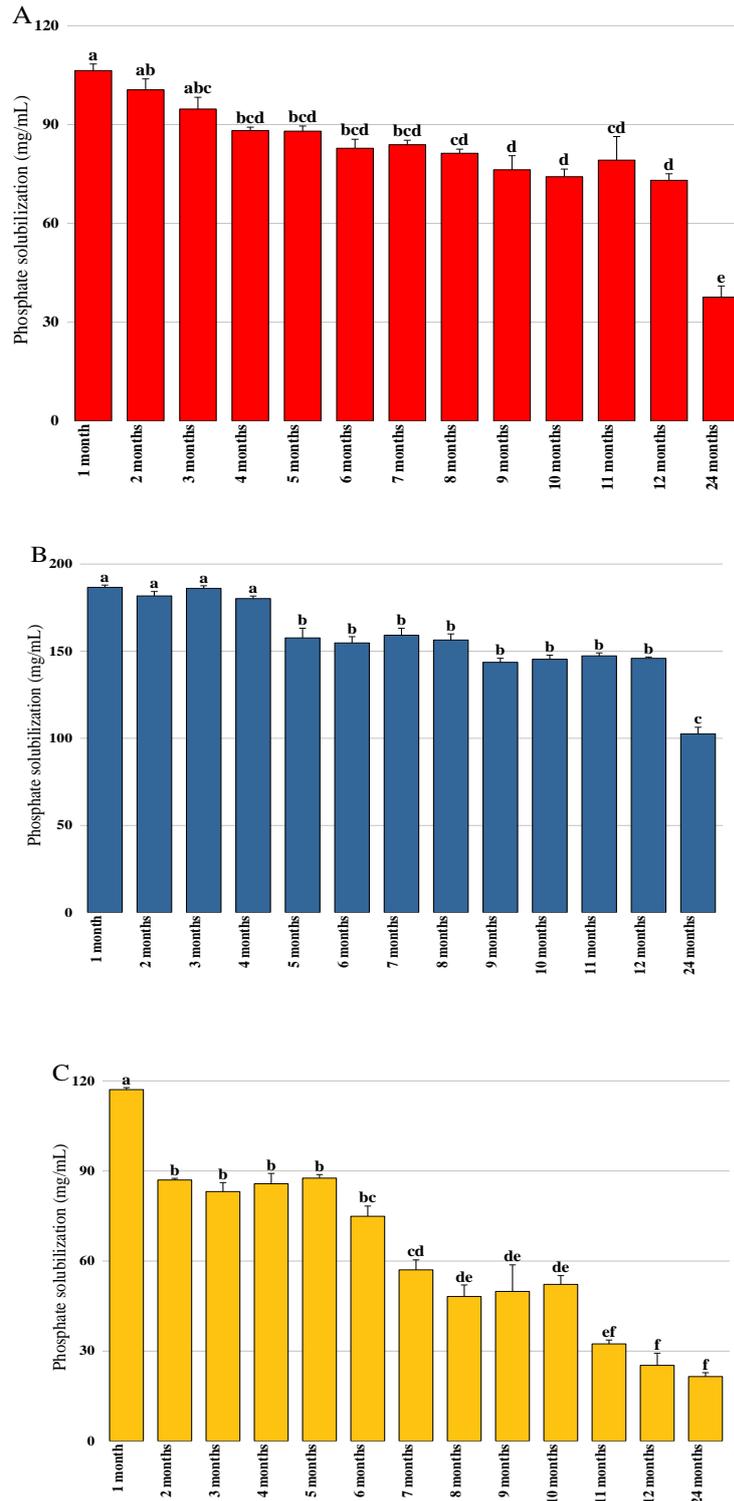
In order to verify the conservation of plant growth-promoting properties during storage, activities linked to phytostimulation (IAA production), biocontrol (siderophore production), and biofertilization (phosphate solubilization) were quantified each month. The obtained results confirmed that Pa retained its capacity to produce IAA in its encapsulated state, where its production proved to be stable during the first three months and reached 18.88  $\mu\text{g/mL}$  after eight months of storage (Figure 3A). IAA production by the bacterial mixture beads experienced a significant initial decline after the first month and reached 25.8  $\mu\text{g/mL}$ . A second decline was recorded after six months when the production was 7.98  $\mu\text{g/mL}$ . After this decline, IAA production by Pa remained low and constant for up to 24 months of storage (Figure 3B). Siderophore production was detected in all bioformulations at varying levels. A stable and significant activity was observed by the Pa beads even after 12 months of storage (Figure 4B), while a progressive decrease in production was recorded by encapsulated B25, which reached 9.04% after one year of storage (Figure 4A). Bacterial mixture siderophore production reached activity levels of 15.6%, 3.36%, and 2.49% after 6, 12, and 24 months of storage, respectively (Figure 4C). Phosphate solubilization was found to be high in the case of Pa bioformulation, followed by B25 and their mixture. The statistical study revealed that phosphate solubilization remained stable by Pa, which reached 102.58 mg/mL after 24 months (Figure 5B). For B25, the quantity of phosphate remained constant from the first month to 12 months of storage, where it was found to be 73.09 mg/mL (Figure 5A). A notable decrease in solubilized phosphate over time by the encapsulated mixture was recorded, where an amount of 21.5 mg/mL was detected after 24 months of storage (Figure 5C).



**Figure 3.** IAA production by (A) Pa and (B) B25+Pa during 24 months of storage. Bar plots represent the average standard error of three different experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The quantities of IAA corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.



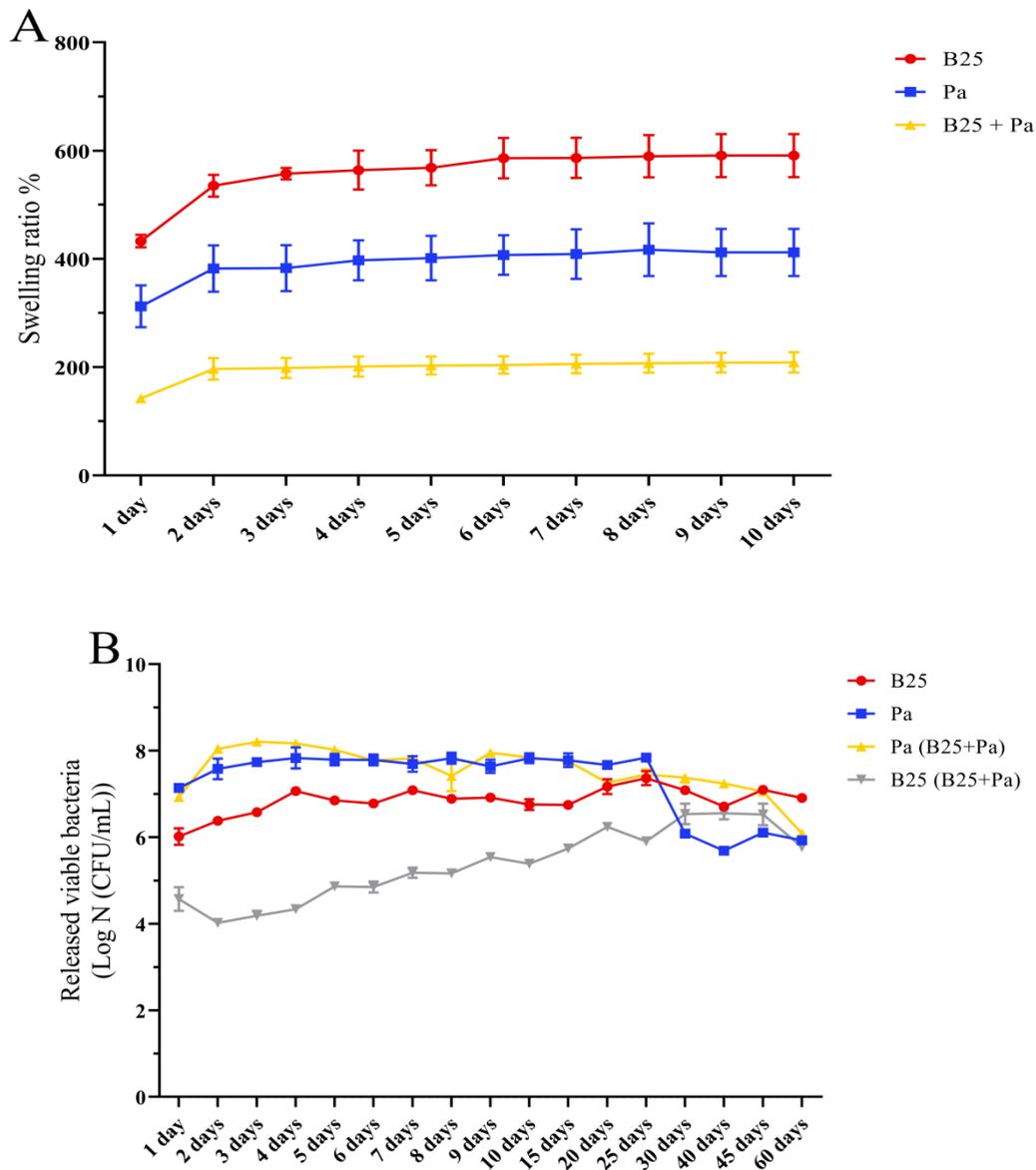
**Figure 4.** Siderophores production by (A) B25, (B) Pa, and (C) B25+Pa during 24 months of storage. Bar plots represent the average standard error of three different experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The quantities of siderophores corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's post-hoc HSD test.



**Figure 5.** Phosphate solubilization by (A) B25, (B) Pa, and (C) B25+Pa during 24 months of storage. Bar plots represent the average standard error of three different experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The quantities of phosphate corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

### 3.4. Swelling study and release kinetics

The swelling rate was studied at room temperature for 10 days. The capsules of all formulations swelled rapidly on the first day; a gradual but negligible increase was noted from the second to the eighth day of the study. Swelling equilibrium was reached after the ninth day where rates of 590.98%, 412.06%, and 209% were recorded for the B25 and Pa capsules and their combination, respectively (Figure 6A). The number of released cumulative bacteria by the dry B25 capsules was significantly higher on the seventh day compared to the first day (Figure 6B). This number also increased after 25 days and reached  $8.1 \times 10^6 (\pm 0.11 \times 10^6)$  CFU/mL on the 60th day of the experiment. The release kinetics of Pa was divided into two phases: the first, between the 1st and the 25th day, was regular and high, with the number of viable released and accumulated bacteria varying between  $1.38 \times 10^7 (\pm 0.1 \times 10^7)$  CFU/mL and  $7 \times 10^7 (\pm 0.06 \times 10^7)$  CFU/mL. The second phase was short and experienced a rapid decline on the 30th day, from where the release rate decreased and reached  $8.5 \times 10^5 (\pm 0.03 \times 10^5)$  CFU/mL on the 60th day. Regarding the bacterial mixture, the release rate of Pa was significantly higher than that of B25. The number of live B25 cells released from the capsules increased steadily with time and reached the highest release equilibrium of  $3.4 \times 10^6 (\pm 0.33 \times 10^6)$  CFU/mL after 30 days (Figure 6B). The release of Pa progressively declined from the 5th day, reaching the lowest release rate of  $1.2 \times 10^6 (\pm 0.02 \times 10^6)$  CFU/mL after 60 days (Figure 6B). The two strains released from the bacterial mixture beads were distinguished on the agar plate by their distinctive phenotypes: Pa forms yellow, round, regular colonies around 3 mm in diameter and smooth in texture, while B25 is characterized by larger colonies of approximately 8–12 mm in diameter, slightly irregular in shape, white in color, and powdery in texture.



**Figure 6.** (A) Swelling rate (%) of dry capsules of B25, Pa, and B25+Pa and (B) release kinetics of bacteria from dry capsules of B25, Pa, and B25+Pa. GraphPad Prism9.4.0 was used to perform statistical analysis, using a correlation of the means from three different experiments.

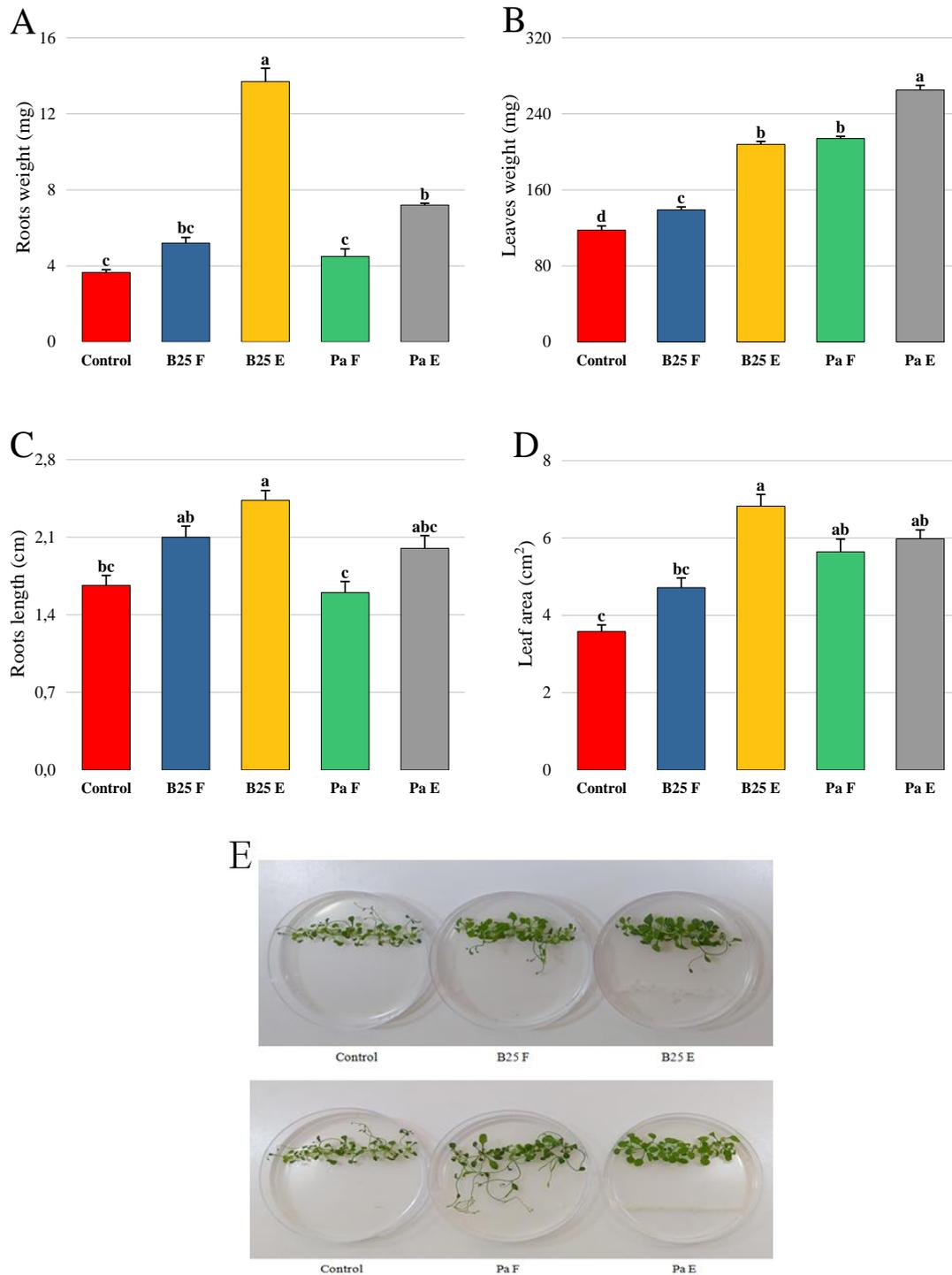
### 3.5. Inoculation test on *Arabidopsis thaliana*: effects on morphological, colonization, and biochemical parameters

#### 3.5.1. Morphological parameters and leaf area analysis

To evaluate the effect of inoculation of the two tested bacterial strains on the growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings, Petri dishes supplied with  $\frac{1}{2}$  MS medium were used. Our results show that the two strains used in the free and encapsulated form are capable of stimulating the length of the

root system and the production of plant biomass (Figure 7A–C). B25 beads increased root fresh weight by three times compared to non-inoculated seedlings (Figure 7A). A significant increase in leaf weight was observed in seedlings inoculated with encapsulated B25 and Pa compared to the same treatments freely inoculated (Figure 7B). Leaf area analysis revealed that this parameter increased significantly in seedlings inoculated with B25 and Pa compared to non-inoculated seedlings (Figure 7D), indicating that the inoculated plants produced larger-sized leaves than the control plants. A more pronounced increase was noted in seedlings inoculated with encapsulated B25, whose leaf area was 91% higher than that of control seedlings (Figure 7D). Thus, a visual analysis with the naked eye of the Ms plates allowed us to observe a more accentuated green color of the rosettes of inoculated treatments compared to that of non-inoculated control (Figure 7E).

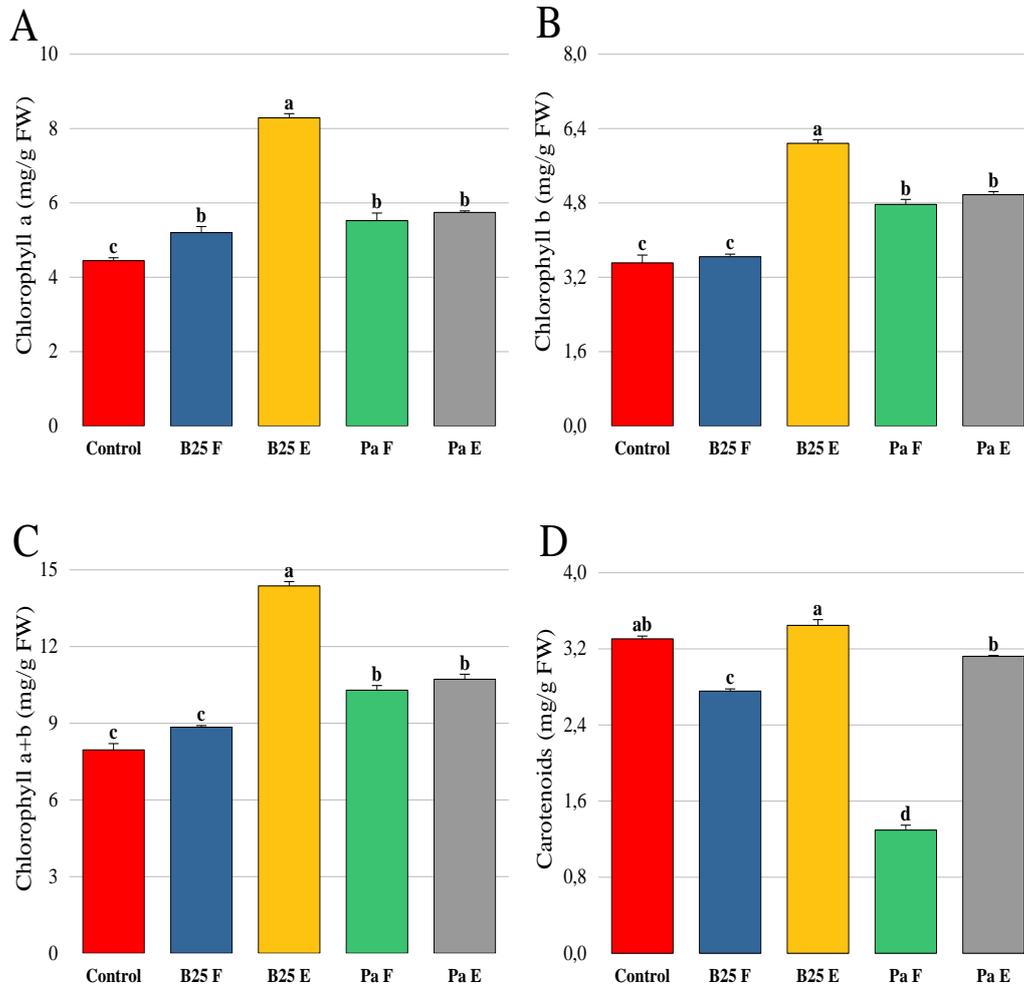
The revelation of *Arabidopsis thaliana* root colonization by free and encapsulated rhizobacteria was carried out aseptically using triphenyltetrazolium chloride (TTC), and roots were photographed (Figure S2). Qualitative root colonization of the inoculated seedlings was noted by a significant difference between the roots of the free and encapsulated inocula, which were more colorful. This strongly suggests that the level of attraction between roots and bacteria is greater in encapsulated strains and that adhesion to roots is stronger.



**Figure 7.** Effect of free (F) and encapsulated (E) bacteria inoculation on (A, B) fresh weight of roots and shoots (g), (C) roots length (cm), (D) leaf surface, and (E) rosette color of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown on  $\frac{1}{2}$  MS medium. Bar plots represent the mean  $\pm$  standard error of three experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The weight, length, and leaf area values corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

### 3.5.2. Dosage of chlorophyll pigments

The application of B25 and Pa beads on *Arabidopsis thaliana* showed a significant increase in the content of chlorophyll pigments. Chlorophylls a, b, and total were significantly improved in plants inoculated with encapsulated B25 and Pa, while treatment with free strains had a non-significant effect on carotenoid content, whose levels were lower than control levels (Figure 8A–D).



**Figure 8.** Effect of free and encapsulated bacterial inoculation on the content of (A) chlorophyll a (mg/g FW), (B) chlorophyll b (mg/g FW), (C) chlorophyll a + b (mg/g FW), and (D) carotenoids (mg/g FW) of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown on  $\frac{1}{2}$  MS medium. Bar plots represent the mean  $\pm$  standard error of three experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The values corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

### 3.6. Potential of encapsulated bacterial strains on durum wheat growth

#### 3.6.1. Morphological parameters

The evaluation of the application effect of the encapsulated bacterial strains on durum wheat plants was carried out using pot experiments under controlled conditions (Figure S3). The results of plant height and root and shoot fresh and dry weight are shown in Figure 9. Inoculation with the encapsulated strains significantly increased shoot height and fresh and dry weight compared to the negative control (Figure 9B,D,F). However, after examining the results of biomass and root elongation, this inoculation was found to have no significant effect (Figure 9A,C,E).

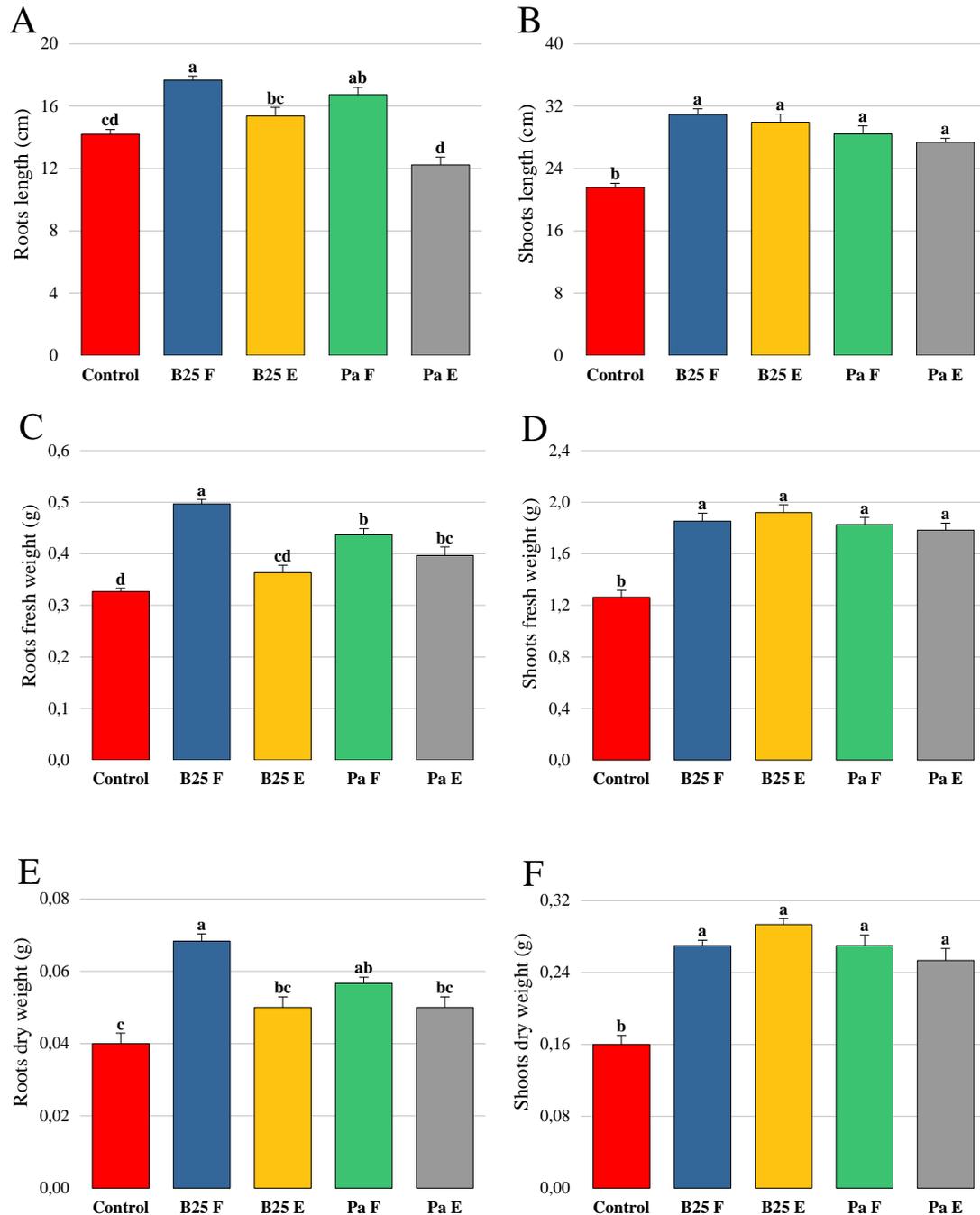
#### 3.6.2. Biochemical parameters

##### 3.6.2.1. Chlorophyll pigments

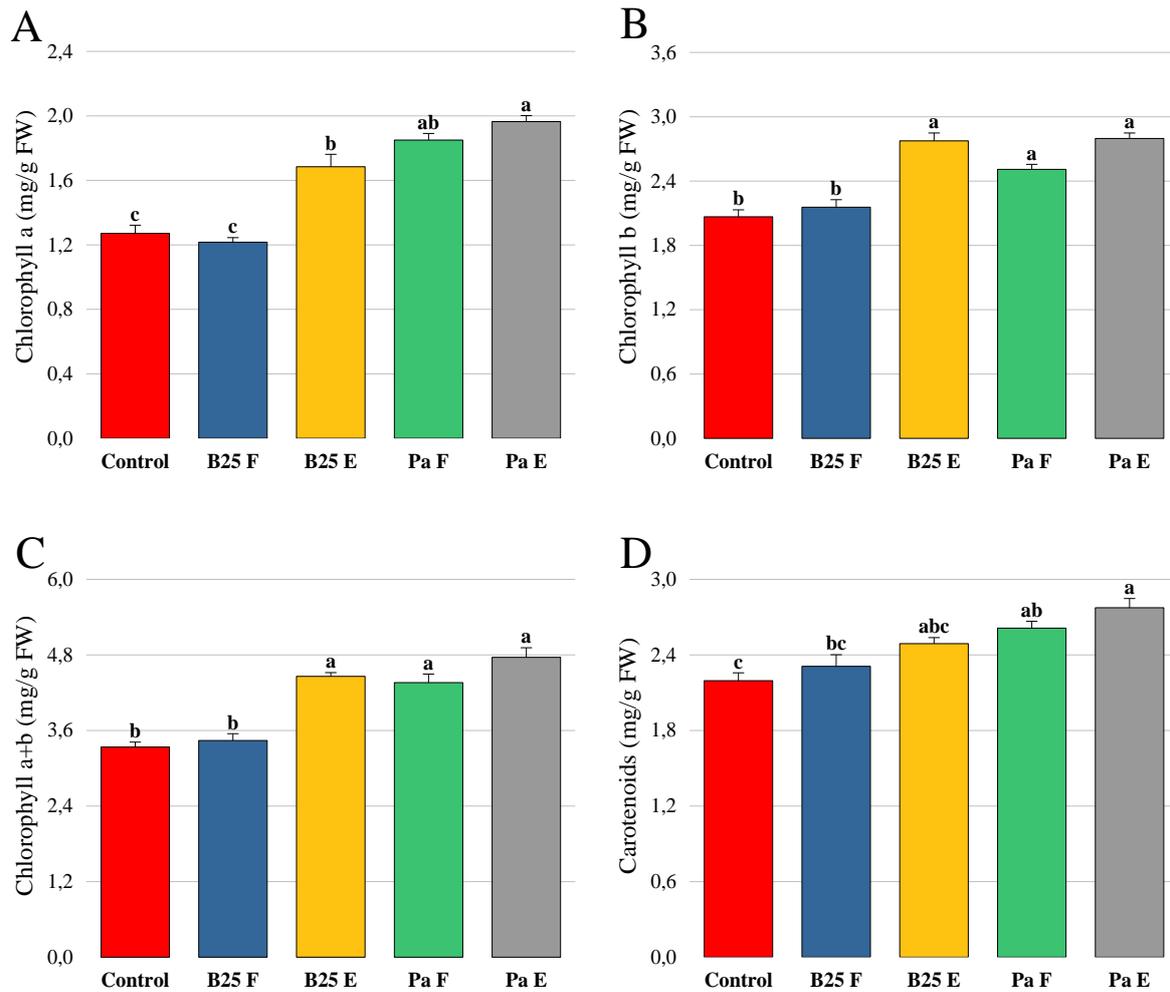
Bacterial inoculation significantly improved the levels of chlorophyll pigments. The levels of chlorophyll a, b, total, and carotenoids were significantly lower in plants inoculated with the free strains than those inoculated with the encapsulated strains (Figure 10A–D). However, treatment with B25 in its free state had a non-significant effect compared to the negative control.

##### 3.6.2.2. Total sugars and proteins

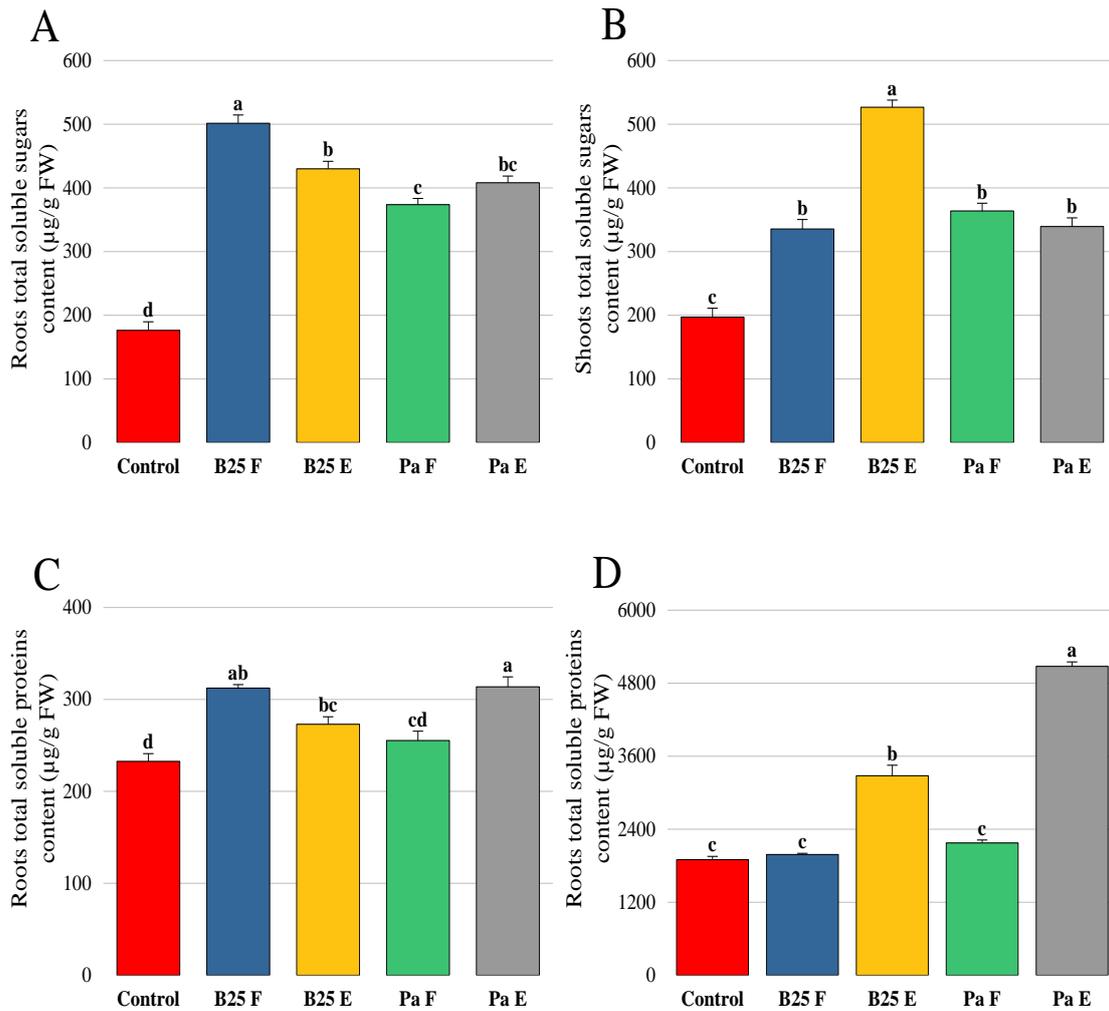
The total soluble sugar content of roots and shoots was significantly improved with inoculation compared to the control. This effect was not significant between the roots of plants treated with strains inoculated with free bacterial strains and those inoculated with encapsulated strains; on the other hand, the sugar content of shoots of plants inoculated with encapsulated B25 was significantly higher than those of any other treatment (Figure 11A,B). Concerning total proteins, our results indicate that the encapsulated strains strongly improved shoots' total proteins compared to free strains, while the free strain B25 and encapsulated Pa presented the best results regarding roots' total proteins (Figure 11C,D).



**Figure 9.** Effect of free and encapsulated bacterial inoculation on (A, B) roots and shoots length (cm), (C, D) roots and shoots fresh weight (g), and (E, F) roots and shoots dry weight of wheat plants. Bar plots represent the mean  $\pm$  standard error of three experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The values corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.



**Figure 10.** Effect of free and encapsulated bacterial inoculation on the content of (A) chlorophyll a (mg/g FW), (B) chlorophyll b (mg/g FW), (C) chlorophyll a+b (mg/g FW), and (D) carotenoids (mg/g FW) of wheat plants. Bar plots represent the mean  $\pm$  standard error of three experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The values corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

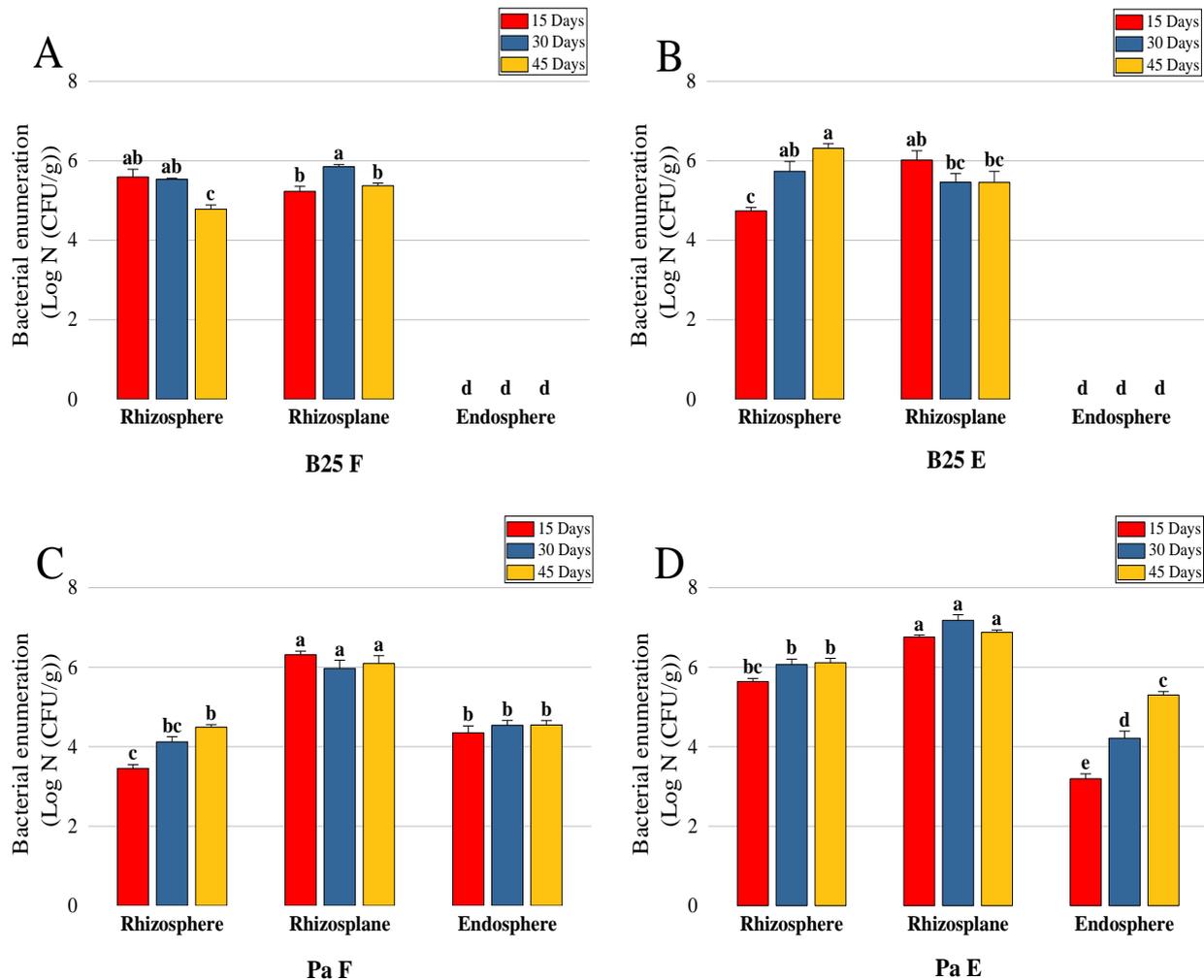


**Figure 11.** Effect of free and encapsulated bacterial inoculation on (A, B) the total soluble sugar content of roots and shoots ( $\mu\text{g/g FW}$ ) and (C, D) the total protein content of roots and shoots ( $\mu\text{g/g FW}$ ) of wheat plants. Bar plots represent the mean  $\pm$  standard error of three experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The values corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

### 3.6.3. Enumeration of rhizospheric, root epiphytic, and endophytic bacteria

Rhizospheric, root epiphytic, and endophytic bacterial density was analyzed after 15, 30, and 45 days of treatment. The results indicate a considerable decrease in the B25 load in the rhizosphere over time when freely inoculated, whereas it increased significantly after 45 days and reached  $2.06 \times 10^6$  ( $\pm 0.18 \times 10^6$ ) CFU/g in the case of encapsulated B25 (Figure 12A,B). Looking at rhizoplane-colonizing bacteria, the analysis revealed that there were no significant differences between the treatment of free and encapsulated B25; in both cases, endophytes could not be reisolated (Figure 12A,B). The bacterial survival of Pa in the rhizosphere was found to be lower when inoculated in the

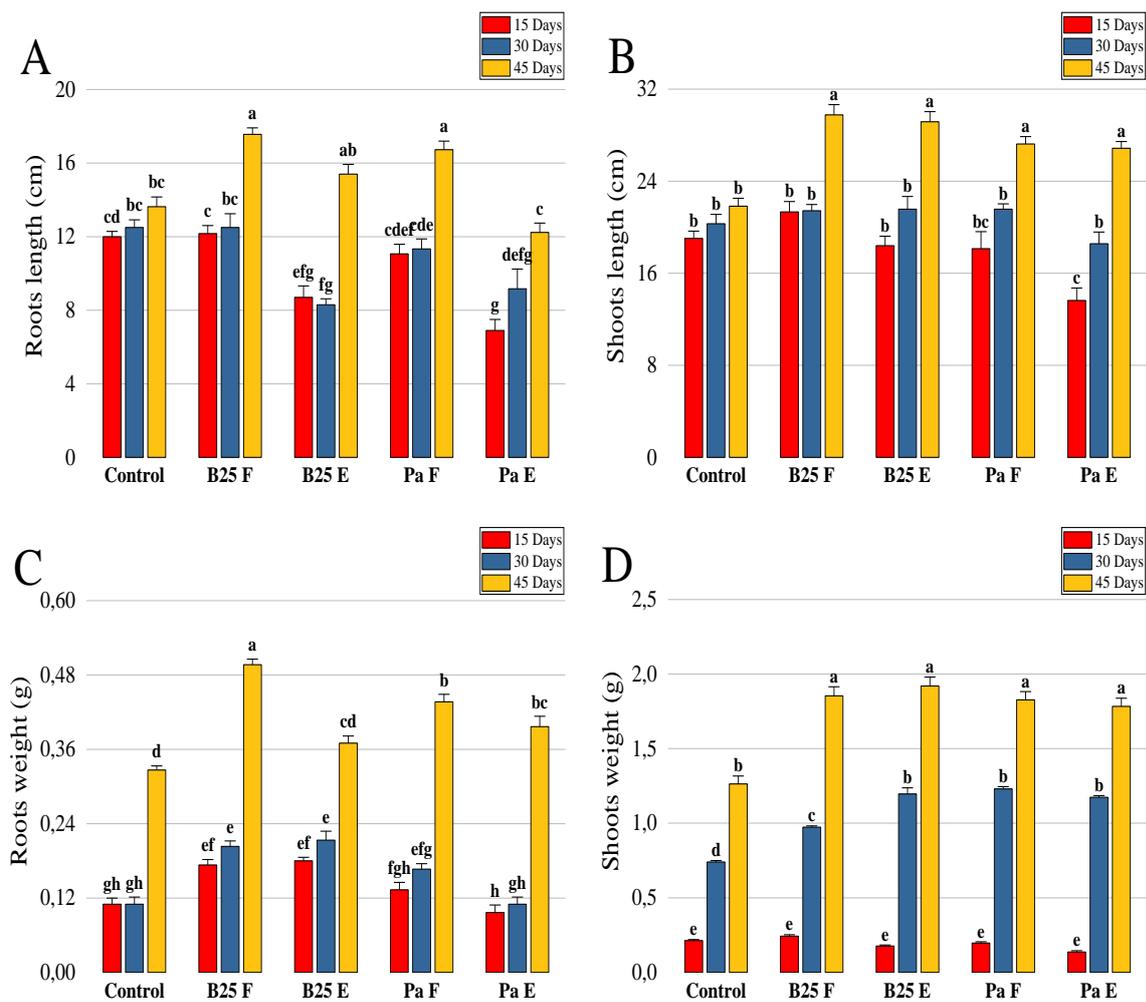
free form compared to the encapsulated form, which reached  $3.1 \times 10^4 (\pm 0.14 \times 10^4)$  CFU/g and  $1.3 \times 10^6 (\pm 0.02 \times 10^6)$  CFU/g, respectively (Figure 12C,D). The rhizoplane load of free and encapsulated Pa and the endophytes of free Pa were not modified as a function of time, while the endophytes of the encapsulated treatment increased notably, the enumeration of which was  $2.01 \times 10^5 (\pm 0.08 \times 10^5)$  CFU/g (Figure 12C,D).



**Figure 12.** Bacterial enumerations (Log N (CFU/g)) of the rhizosphere, rhizoplane and endosphere of wheat plants inoculated with (A) free B25, (B) encapsulated B25, (C) free Pa, and (D) encapsulated Pa. Bar plots represent the mean  $\pm$  standard error of three experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The values corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

### 3.6.4. Evolution of weight and length of roots and shoots

Length analysis of shoots and roots over time indicates a non-significant difference between the inoculated treatments and the control after 15 and 30 days (Figure 13). The effects of the treatments were more marked after 45 days, where both strains, whether free or encapsulated, significantly improved the weight and length of the roots compared to the control (Figure 13A,C). The encapsulated B25 treatment (B25 E) showed more pronounced effects on roots' length than the same treatment of Pa. For shoots, all treatments improved length and weight compared to the control, without a significant difference between free and encapsulated strains (Figure 13B,D).



**Figure 13.** Effects of inoculation with free B25, encapsulated B25, free Pa, and encapsulated Pa on the length (A) of roots and (B) shoots, and the weight (C) of roots and (D) shoots of wheat plants after 15, 30, and 45 days of treatment. Bar plots represent the mean  $\pm$  standard error of three experiments. OriginPro2022 was used to perform statistical analysis, using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test. The values corresponding to each treatment and not sharing the same letters are significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test.

#### 4. Discussion

In order to develop an encapsulated bioinoculant, *Bacillus thuringiensis* strain B25 and *Pantoea agglomerans* strain Pa were encapsulated in a sodium alginate matrix. Encapsulation allows for an improved distribution of bacteria in the rhizosphere, thereby stimulating plant growth and health while reducing the harmful use of chemical fertilizers.

Since drying is the central step of the bioencapsulation process, a step that particularly impacts the viability of non-spore-forming bacteria [36], the addition of osmoprotectants could play a crucial role in improving cell survival during this process. Various osmoprotectants were tested in the presence of 50% PEG<sub>6000</sub>, which was used here to create artificial drought stress similar to the drying stage of the encapsulation process, and proline, which significantly improved the growth of the two tested strains. Proline is known to be a very good osmolyte and a key osmoprotectant against water stress [37], and it has been shown to effectively maintain cellular integrity by interfering with membrane enzymes and proteins during water shortage [38]. Moreover, proline is an excellent stress-signaling molecule and antioxidant [38]. For these reasons, proline was added as a co-formulant in beads for the delivery of the two strains *B. thuringiensis* strain B25 and *P. agglomerans* strain Pa.

The introduction of the matrix solution containing sodium alginate, proline, and the B25 or Pa bacteria or their consortium in a CaCl<sub>2</sub> solution successfully resulted in the formation of spherical and insoluble capsules, which confirms that alginate constitutes an effective matrix for trapping bacterial cells and proves that ionic gelation is a valid, safe, and successful method for the encapsulation of PGPR. A remarkable encapsulation efficiency was obtained (over 99%) for all treatments; these rates are significantly higher than those reported by Panichikhal et al. [27], Wu et al. [39], and Kaur et al. [40], which are 90%, 93%, and 94.11%, respectively. The combination of optimized encapsulation conditions, favorable characteristics of the bacterial strains, and precise handling techniques in our study seems to have been more optimized compared to previously mentioned studies and to have contributed to a higher efficiency of encapsulation. The optimal concentration of alginate can ensure a more homogeneous gel formation, capable of effectively retaining bacterial cells. The method of incorporation of the bacteria into the alginate and the solidification conditions, such as agitation speed during bead preparation and incubation duration in the presence of CaCl<sub>2</sub>, can also optimize the process and favor a better crosslinking of the alginate gel, thus reducing cell losses during encapsulation. Analysis of bacterial load in the dried beads showed that considerable survival rates were obtained after drying, higher than those of several previous studies. For instance, rates varying between 71.6% and 72.4% were obtained by Chi et al. [28]. This indicates that dehydration of the beads resulted in only a small cell loss. Berninger et al. [36] observed that bacterial survival during drying in the presence of osmoprotectants is much greater than in their absence; as such, we hypothesize that the higher survival reported by our study can be attributed to the presence of proline, which reduced cell loss and maintained water balance during the drying stage, particularly for the Gram-negative bacteria Pa.

The choice of drying protocol is also critical for the non-spore-forming survival, given the temperature and processing time. Deleterious lesions can occur, ranging from the formation of reactive oxygen species (ROS) to oxidative damage [41], depending on the technique used, knowing that the processing speed is proportional to the temperature [36]. Our results demonstrate that despite the considerable time of air drying (12 hours on average), our technique turns out to be profitable in terms of yield and cost, especially since it does not require any special equipment, unlike other techniques such as spray-drying, fluidized bed-drying, or vacuum-drying. Also, the addition of proline as an

osmoprotectant provided a protective effect as an antioxidant and ROS inhibitor [38]. These findings are confirmed by the results of Berninger et al. [36], who reported that the addition of gum arabic and yeast extract as osmoprotectants significantly improved the viability of *Paraburkholderia phytofirmans* during drying.

In this work, bacterial cell survival in dry beads during storage at 4 °C was monitored. Our data showed that the number of viable cells of B25 remained constant at  $2.76 \times 10^7 (\pm 0.68 \times 10^7)$  CFU/g, while Pa showed a progressive decline in cell survival upon storage. On the other hand, the survival rate was lower for the two strains when encapsulated together rather than alone. These findings are in agreement with the literature since cell viability after encapsulation differs depending on the microorganism [42]. Storage temperature is another key factor that influences survival during storage [36]. Low temperatures have been shown to preserve the metabolism and energy of formulated bacteria, as evidenced by results obtained by Liffourrena and Lucchesi [43], where no significant loss of viability of the *Pseudomonas putida* bacteria was observed after 150 days of storage at 4 °C encapsulated in an alginate and perlite matrix. However, these findings cannot be generalized; in another study, the same *P.putida* bacteria encapsulated in 1.5% alginate and stored at 4 °C for 90 days presented a survival of only 0.3% [39], while a survival rate of 46% was observed in a bioformulation of *Bacillus megaterium* obtained by freeze drying stored at 4 °C for 6 months [28]. Other factors are involved in the stability during storage such as exposure to light, oxygenation, and packaging conditions, and their optimization should be taken into consideration [36]. It is important to point out that unlike in our study; few studies have reported the monitoring of viability over long periods even though this is necessary for the commercialization of bioinoculants [44]. Likewise, previous studies have reported encapsulation of mixed cultures [45,46] but no investigation of long-term survival has been reported. The development of mixed bioinoculants should consider several issues, namely the absence of antagonism between the selected strains, similarity of physiological adaptation, adequate cellular concentrations, and compatibility with the genotype of the host plant [47]. Our study intended to contribute to this knowledge gap, developing encapsulated bacterial mixture formulations and investigating their long-term survival.

Another very important point addressed in this study regarding the application of biofertilizers in the field is demonstrating that the encapsulated bacteria can maintain their PGP activities during storage. The ability of Pa to produce IAA has been described previously [14]. Pa cells immobilized in alginate beads partially retain their IAA production capacities; this is in agreement with the observations of Ozdal et al. [48] and Panichikkal et al. [27]. There are no reports in the literature of monitoring this activity after storage of encapsulated PGP strains. The decline recorded is probably due to stressful storage conditions; the effect of lack of water on IAA synthesis has been previously discussed [49]. In addition, IAA is synthesized by very complex pathways and involves the intervention of several inducible enzymes, some of which can be repressed by environmental conditions [50].

The ability to produce siderophores was tested for both the bacterial strains B25 and Pa. They showed such ability during storage at variable rates with a decrease in production for B25. This could be likely explained by the inhibitory effect of osmotic stress on the gene responsible for bacillibactin synthesis [51], which are the predominant siderophores in *Bacillus* species [52].

*Bacillus* and *Pantoea*, the genera to which our strains belong, include the most efficient bacteria in phosphate solubilization [53]. The difference in phosphate solubilization recorded between B25 and Pa can be attributed to the physiological and molecular state of the two bacteria and to the diversity

and efficiency of the solubilization mechanisms, which are intrinsically linked to the bacterial species [54]. The ability of Pa to maintain a bacterial concentration capable of producing secondary metabolites and to produce a diverse and efficient range of organic acids explains its superior performance in phosphate solubilization compared to B25. *Pantoea* species produce a variety of organic acids including citric, malic, succinic, acetic, oxalic, and formic acids [55]. These acids, which are mainly tricarboxylic and dicarboxylic, are generally more effective in solubilizing phosphates than mono and aromatic acids [56]. In comparison, a *Bacillus* strain isolated from wheat rhizosphere soil mainly produces glycolic acid, which is less effective for phosphate solubilization compared to other acids produced by *Pantoea* strains [57]. In addition, *Pantoea* also produces the phosphate hydrolysis enzyme phytase, adding another mechanism for the solubilization of phosphate that is not observed in *Bacillus* [58]. Also, Park et al. (2016) reported that no significant effect of co-inoculation compared to single inoculation was observed regarding phosphate solubilization [59].

The study of swelling properties revealed variable rates ranging from 209% up to 591%. These rates are similar to those obtained by Tu et al. (2016), which varied between 182% and 454% in an alginate and bentonite formulation [60]. The swelling kinetics is mediated by the water diffusion inside the bead and causes the release of alginate network chains [26]. Our observations indicate that the capsules rapidly absorb water, resulting in rapid swelling after the first day, and the interactions of the –OH groups of sodium alginate with water molecules progressively increase the rate of swelling of the beads due to the hydrophilic nature of alginate until saturation, which results in equilibrium after day 9 [61]. The swelling rates obtained in our study are relatively higher than those reported by He et al. [62] and Pour et al. [63]. Additionally, *Pantoea agglomerans* and *Bacillus thuringiensis* have been studied for their ability to produce exopolysaccharides (EPS) under standard culture conditions [64,65]. These EPS, having hydrophilic properties, can amplify the beads' ability to absorb and retain water. According to Donati et al. (2005), the incorporation of hydrophilic substances into an alginate matrix can increase its swelling capacity due to increased water retention by EPS [66].

The release kinetics and cumulative survival of the encapsulated strains over a period of 60 days were carried out at room temperature. The obtained results are in agreement with those of Pour et al. (2019) [63]; the bacterial release is rapid for the first days and increases over time, the rapid diffusion of water inside the beads leads to expansion, and bacteria diffuse in the opposite direction of water dynamics [62]. This suggests that swelling contributes to this release by acting on the relaxation of the alginate matrix network by increasing pores size through which bacteria will pass from the interior of the bead to the exterior environment. The release slows down and then stabilizes due to the swelling balance and saturation of the capsules with water, which leads to a reduction of the channels at the level of the alginate envelope [67]. Encapsulation efficiency also influences release, according to Pour et al. [63] and Wu et al. [26], since a high cell density in the beads results in the release of a significant number of live bacteria.

The decrease in release rate can be attributed to environmental conditions and possible bacterial mortality [63]. The described ability of the capsules to effectively retain and release the bacteria object of this study suggests that the setup bioformulation could be successfully applied in the real scenario.

To the best of our knowledge, our study was the first to propose a model system to study the capacity to promote plant growth and the dynamics of root colonization of encapsulated bacteria in short-term experiments. Our investigations on *Arabidopsis thaliana* morphological parameters, root colonization, leaf area, and chlorophyll pigment dosage indicate that bacterial bioformulation in alginate beads provides a successful bioinoculant system.

It is important to point out that according to the literature, the exercise of PGP effects requires that bacteria come out of the bead and move toward the roots due to their ability to communicate with the plant via root exudates [68]. This communication is called chemotaxis and leads to root colonization [68]. Several factors are involved in the success of root colonization by favorable microbes, such as the biochemistry of the root surface and the biochemical composition of root exudates [69]. Thus, it was demonstrated during a study on the colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by the rhizospheric bacterium *Pantoea* sp. YR343 that active metabolites such as auxins would be involved in the colonization process [70]. Similarly, some plant hormones can travel from the root to the leaves while enhancing the leaf growth process [68]. These data lead us to explain the improvement in weight, leaf surface, and chlorophyll pigment content in the leaves of inoculated *Arabidopsis thaliana* seedlings compared to those of the control, particularly in Pa whose profile of hormones and auxins such as cytokinins, indole acetic acid, and phenylacetic acid has already been described [14]. Nevertheless, the mobility of bacteria is necessary to adhere to the roots, and this mobility is induced by root exudates that serve as attraction molecules [68]. Parallel to this, a previous study has established that biofilm formation is essential for root colonization in *Bacillus* and that it is triggered by polysaccharides and other metabolites released by the plant [71]. Our data show that encapsulated bacteria significantly improve *Arabidopsis thaliana* growth compared to free inoculated strains, and this improvement is probably attributed to the increased efficiency of encapsulated bacteria in terms of colonization, mobility, and survival.

The rosette color of seedlings was darker under treatment with encapsulated bacterial strains compared to non-inoculated treatment. This is directly related to the process of photosynthesis, which is essential in plants to obtain energy, and its efficiency is positively correlated to chlorophyll content [72]. The darkening of the shoots of inoculated seedlings will therefore be explained by the increased action of encapsulated bacteria on the photosystem of *Arabidopsis thaliana*, whose chlorophyll pigments absorb light and convert it into chemical energy [73].

Before recommendation for field application, it is important to prove the plant probiotic functions of the developed formulations on a crop of high agriculture relevance. As such, we focused on durum wheat as the model crop. Our results confirm the previously studied biofertilizing capacity of the two tested strains [25]. A direct stimulation of plant growth was noted, in particular of the aerial system of the vegetative apparatus where a significant increase in length and weight of shoots was observed in plants treated with Pa and B25 in both free and encapsulated forms compared to control plants. These results validate the beneficial interactions between the tested bacteria and the host plant and describe that such capacity is maintained when the strains are delivered to plants as encapsulated cells in beads. Since shoot growth is the most important parameter for wheat yield, our study clearly demonstrates that the application of suspended or encapsulated strains similarly improves shoot growth; we can hypothesize that it would also improve wheat yield. In *Bacillus* species, this effect is directly linked not only to the production of phytohormones, siderophores, lipopeptides, polysaccharides, and enzymes [74] but also to the regulation of homeostasis and antioxidant enzymes in natural plant growth conditions and under various stresses [75]. In this sense, the capacity of B25 to fix nitrogen, produce  $\text{NH}_3$ , ACC deaminase, and siderophores, and solubilize phosphate has already been discussed [25]. A similar study on the inoculation of encapsulated strains of *Bacillus* reported improved growth and development of durum wheat plants by increasing aboveground biomass and plant height; this benefit is mainly attributed to two key mechanisms: improved nutrient and mineral uptake (mainly N) from the soil, and the increased stimulation of the production of phytohormones involved in cell division

and shoot elongation such as cytokinins and auxins [76]. Likewise, Pa proves effective in the production of siderophores, IAA, ACC deaminase,  $\text{NH}_3$  and HCN and in phosphate solubilization and nitrogen fixation [27]. In addition, *Pantoea* plays a stimulating role in the growth of cereal crops by increasing the availability and assimilation of nutrients while promoting more efficient regulation of endogenous phytohormones [77]. Moreover, it was found that even if the bacteria produces little or no phytohormones, its inoculation with wheat can induce and regulate phytohormone production by the inoculated plant [74]. Similarly, a previous study reported that the inoculation of a strain of *Bacillus* sp. V2026 altered endogenous IAA levels in shoot and root tissues and boosted wheat plant productivity and yield [74]. Another study revealed a strong correlation between the presence of cytokinin and shoot length, fresh weight, and dry weight, while bacterial IAA was negatively correlated with root length [78].

High concentrations of chlorophyll pigments indicate active metabolism and proper functioning of the plant's photosynthetic apparatus [74]. Inoculation of encapsulated bacteria improved the photosynthetic performance of durum wheat; this is probably associated with the effects of these bacteria in improving water and nutrient absorption, which play an important role in the structural construction of the photosynthetic machinery [79], and ensuring gas exchange and electron transport [80]. Thus, the production of IAA and ACC deaminase and the increase in plant biomass would also be involved in chlorophyll biosynthesis [81]. Indeed, the increase in carotenoid contents is linked to the collection of light energy necessary for photosynthesis [82].

Colonization capacity is an important trait that determines the ability of the bacteria to survive and compete with other microbes and defines the effectiveness and performance of PGPB during its inoculation in the field [83]. It is also considered the main survival factor of bacteria [83]. For this purpose, the colonization capacities of the rhizosphere, the rhizoplane, and the root internal tissues were analyzed. Our results demonstrate that both bacterial strains survived effectively in a sterile and relatively nutrient-poor medium and indicate an increase in the number of rhizospheric and endophytic bacteria over time in the treatments of encapsulated formulations, while a considerable decrease was observed in liquid formulations. These observations are consistent with those of Bhise and Dandge (2019), who found increased colonization of rice roots by a strain of *Pantoea agglomerans* encapsulated in alginate after 20 and 30 days compared to the same free inoculums [84]. In a different study focusing on cotton root colonization, the capacity of encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 to colonize the roots significantly increased over time when compared with the inoculum of free cells [85]. Likewise, the analysis of the enumeration revealed that bacterial Pa loads are in agreement with the literature reports, being  $10^6$  up to  $10^9$  CFU/g in the rhizosphere and  $10^4$  up to  $10^8$  CFU/g in the root endosphere [86]. Considering that colonization is a complex process that involves the mobility of bacteria and their ability to chemotaxis with the host plant [87], the maintenance of these interactions is crucial to establish long-term stable bacterial associations with the host plant [86]. This ability to persist is strongly pronounced in encapsulated bacteria, which are slowly released into the soil, thus ensuring their survival and ability to promote plant growth, which guarantees their long-term yield. On the other hand, the capacity for rhizospheric and root colonization can be limited by the affinity to the genotype of the host plant and by competition with its internal microbiota when it comes to the endosphere of the plant [88]. The absence of B25 cells in the internal tissues of durum wheat suggests that the root endosphere does not belong to the privileged ecological zones of this strain. Furthermore, the analysis of morphological parameters over time suggests that the effect of inoculation on growth stimulation may be affected after more than 30 days of plant growth.

## 5. Conclusions

This work demonstrated the feasibility of developing a microbial biostimulant by the encapsulation of two bacterial strains, namely *Bacillus thuringiensis* strain B25 and *Pantoea agglomerans* strain Pa, in sodium alginate using the ionic gelation technique. Our results indicate that the addition of proline boosts bacterial survival during the drying process and storage and that alginate constitutes a sovereign system to trap and slowly release encapsulated bacteria. The bioformulations developed showed a notable survival rate over a 24-month storage period and demonstrated to effectively preserve plant probiotic activities played by the strains after being encapsulated in dry alginate beads for up to 24 months, both alone and in combination. The effectiveness of encapsulated bacteria in promoting the growth of *Arabidopsis thaliana* and durum wheat as well as their colonization capacity and kinetics were elucidated, moving forward in the direction of sustainable agriculture. Future research on field trials and natural conditions could further clarify the effectiveness of the setup delivery system under real scenarios.

### Use of AI tools declaration

The authors declare they have not used Artificial Intelligence (AI) tools in the creation of this article.

### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Author contributions

Conceptualization, A.B., HCS., and A.S.; methodology, A.S., and H.C-S.; software, A.B.; validation, A.S., HCS., F.M. and S.B.; formal analysis, F.M., and S.B.; investigation, A.B., and F.M.; data curation, A.B., and A.S.; writing—original draft preparation, A.B.; writing—review and editing, A.S., HCS., F.M., and S.B.; visualization, A.B.; supervision, A.S., and H.C-S.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Funding

This research received no external funding.

### References

1. Ehrlich PR, Harte J (2015) To feed the world in 2050 will require a global revolution. *Proc Natl Acad Sci* 112: 14743–14744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519841112>
2. Ali M, Cybulska J, Fraç M, et al. (2023) Application of polysaccharides for the encapsulation of beneficial microorganisms for agricultural purposes: A review. *Int J Biol Macromol* 125366. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125366>
3. FAO. Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators. Global, regional and country trends, 1990–2019. *FAOSTAT Anal Brief Ser No 29 Rome*, 2021.

4. Rani L, Thapa K, Kanojia N, et al. (2021) An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J Cleaner Prod* 283: 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>
5. Intisar A, Ramzan A, Sawaira T, et al. (2022) Occurrence, toxic effects, and mitigation of pesticides as emerging environmental pollutants using robust nanomaterials—A review. *Chemosphere* 293: 133538. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133538>
6. Sharma N, Singhvi R (2017) Effects of chemical fertilizers and pesticides on human health and environment: a review. *Int J Agric Environ Biotechnol* 10: 675–680. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2017.00083.3>
7. Kaur R, Kaur S (2018) Biological alternates to synthetic fertilizers: efficiency and future scopes. *Indian J Agric Res* 52: 587–595. <https://doi.org/10.18805/IJARE.A-5117>
8. Hossain MA, Hossain MS, Akter M (2023) Challenges faced by plant growth-promoting bacteria in field-level applications and suggestions to overcome the barriers. *Physiol Mol Plant Pathol* 102029. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102029>
9. Singh K, Guleria V, Kaushal S (2023) Utilization of Biofertilizers and plant growth promoters in hydroponic production system. *Curr J Appl Sci Technol* 42: 13–23. <https://doi.org/10.9734/cjast/2023/v42i374243>
10. Orozco-Mosqueda MDC, Santoyo G, Glick BR (2023) Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth. *Plants* 12: 606. <https://doi.org/10.3390/plants12030606>
11. Etesami H, Jeong BR, Glick BR (2023) Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. *Physiol Mol Plant Pathol* 102048. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102048>
12. Remus R, Ruppel S, Jacob HJ, et al. (2000) Colonization behaviour of two enterobacterial strains on cereals. *Biol Fertil Soils* 30: 550–557. <https://doi.org/10.1007/s003740050035>
13. Mishra A, Chauhan PS, Chaudhry V, et al. (2011) Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100: 405–413. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9596-8>
14. Cherif-Silini H, Thissera B, Bouket AC, et al. (2019) Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *Int J Mol Sci* 20: 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms20163989>
15. Lorenzi AS, Bonatelli ML, Chia MA, et al. (2022) Opposite sides of *Pantoea agglomerans* and its associated commercial outlook. *Microorganisms* 10: 2072. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102072>
16. Torres AR, Araújo WL, Cursino L, et al. (2013) Colonization of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*), by endophytes encoding gfp marker. *Arch Microbiol* 195: 483–489. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0897-3>
17. Herrera SD, Grossi C, Zawoznik M, et al. (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiol Res* 186: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>
18. Gomis-Cebolla J, Berry C (2023) *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer in crops and their implications in the control of phytopathogens and insect pests. *Pest Manage Sci* 79: 2992–3001. <https://doi.org/10.1002/ps.7560>
19. Azizoglu U (2019) *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Curr Microbiol* 76: 1379–1385. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>

20. Maçik M, Gryta A, Fraç M (2020) Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Adv Agron* 162: 31–87. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>
21. Rai S, Mago Y, Aggarwal G, et al. (2023) Liquid bioformulation: a trending approach towards achieving sustainable agriculture. *Mol Biotechnol* 1–26. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00901-0>
22. Balla A, Silini A, Cherif-Silini H, et al. (2022) Recent advances in encapsulation techniques of plant growth-promoting microorganisms and their prospects in the sustainable agriculture. *Appl Sci* 12: 9020. <https://doi.org/10.3390/app12189020>
23. Song S, Liu Y, Wang NR, et al. (2021) Mechanisms in plant–microbiome interactions: lessons from model systems. *Curr Opin Plant Biol* 62: 102003. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102003>
24. Grosse-Heilmann M, Cristiano E, Deidda R, et al. (2024) Durum wheat productivity today and tomorrow: A review of influencing factors and climate change effects. *Resour Environ Sustainability* 100170. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2024.100170>
25. Saadaoui N, Silini A, Cherif-Silini H, et al. (2022) Semi-arid-habitat-adapted plant-growth-promoting rhizobacteria allows efficient wheat growth promotion. *Agronomy* 12: 2221. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092221>
26. Wu Z, Zhao Y, Kaleem I, et al. (2011) Preparation of calcium–alginate microcapsuled microbial fertilizer coating *Klebsiella oxytoca* Rs-5 and its performance under salinity stress. *Eur J Soil Biol* 47: 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.008>
27. Panichikkal J, Prathap G, Nair RA, et al. (2021) Evaluation of plant probiotic performance of *Pseudomonas* sp. encapsulated in alginate supplemented with salicylic acid and zinc oxide nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 166: 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.110>
28. Chi Y, Wang D, Jiang M, et al. (2020) Microencapsulation of *Bacillus megaterium* NCT-2 and its effect on remediation of secondary salinization soil. *J Microencapsulation* 37: 134–143. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1705409>
29. Kerbab S, Silini A, Chenari Bouket A, et al. (2021) Mitigation of NaCl stress in wheat by rhizosphere engineering using salt habitat adapted PGPR halotolerant bacteria. *Appl Sci* 11: 1034. <https://doi.org/10.3390/app11031034>
30. Saidi S, Cherif-Silini H, Chenari Bouket A, et al. (2021) Improvement of *Medicago sativa* crops productivity by the co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*–actinobacteria under salt stress. *Curr Microbiol* 78: 1344–1357. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02394-z>
31. Slama HB, Cherif-Silini H, Chenari Bouket A, et al. (2019) Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Front Microbiol* 9: 3236. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
32. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2004) Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology* 73: 710–715. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0013-z>
33. Silini A, Cherif-Silini H, Yahiaoui B (2016) Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *Afr J Microbiol Res* 10: 387–399. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7723>
34. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

36. Berninger T, González López Ó, Bejarano A, et al. (2018) Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microb Biotechnol* 11: 277–301. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12880>
37. Daffonchio D, Hirt H, Berg G (2015) Plant-microbe interactions and water management in arid and saline soils. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, Springer, Cham, 265–276. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_28](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_28)
38. Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, et al. (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling Behav* 7: 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
39. Wu Z, Li X, Liu X, et al. (2020) Membrane shell permeability of Rs-198 microcapsules and their ability for growth promoting bioactivity compound releasing. *RSC Adv* 10: 1159–1171. <https://doi.org/10.1039/C9RA06935F>
40. Kaur R, Kaur S, Dwibedi V, et al. (2023) Development and characterization of rice bran-gum Arabic based encapsulated biofertilizer for enhanced shelf life and controlled bacterial release. *Front Microbiol* 14: 1267730. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267730>
41. García AH (2011) Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications. *J Biosci* 36: 939–950. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9107-0>
42. Schoebitz M, Simonin H, Poncelet D (2012) Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *J Microencapsulation* 29: 532–538. <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.665090>
43. Liffourrena AS, Lucchesi GI (2018) Alginate-perlite encapsulated *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells: Preparation, characterization and potential use as plant inoculants. *J Biotechnol* 278: 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.019>
44. Timmusk S, Behers L, Muthoni J, et al. (2017) Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Front Plant Sci* 8: 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
45. Guo L, Wu Z, Rasool A, et al. (2012) Effects of free and encapsulated co-culture bacteria on cotton growth and soil bacterial communities. *Eur J Soil Biol* 53: 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.08.003>
46. Anwar MS, Paliwal A, Firdous N, et al. (2019) Co-culture development and bioformulation efficacy of psychrotrophic PGPRs to promote growth and development of pea (*Pisum sativum*) plant. *J Gen Appl Microbiol* 65: 88–95. <https://doi.org/10.2323/jgam.2018.05.007>
47. Santos MS, Nogueira MA, Hungria M (2019) Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *Amb Express* 9: 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
48. Ozdal M, Ozdal OG, Sezen A, et al. (2017) Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *3 Biotech* 7: 1–6. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0605-0>
49. Sandhya VZAS, SK ZA, Grover M, et al. (2009) Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol Fertil Soils* 46: 17–26. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0401-z>
50. Duca DR, Glick BR (2020) Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 8607–8619. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10869-5>
51. Höper D, Bernhardt J, Hecker M (2006) Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics* 6: 1550–1562. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500197>
52. Dnyashev TP, Laptev GY, Yildirim EA, et al. (2021) Identification of genes associated with the synthesis of siderophores by the *Bacillus subtilis*. *J Livestock Sci* 12: 287–291. <https://doi.org/10.33259/JLivestSci.2021.287-291>

53. Yadav AN, Kumar V, Dhaliwal HS, et al. (2018) Microbiome in crops: diversity, distribution, and potential role in crop improvement. In: *Crop improvement through microbial biotechnology*, Elsevier, 305–332. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00015-3>
54. Pan L, Cai B (2023) Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. *Microorganisms* 11: 2904. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>
55. Wang JJ, Yan AH, Wang W, et al. (2016) Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of phosphate-solubilizing bacteria strain D2 (*Pantoea* sp.) in rhizosphere of *Pinus tabuliformis* in iron tailings yard. *Ying Yong Sheng tai xue bao=The Journal of Applied Ecology* 27: 3705–3711.
56. Kalayu G (2019) Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *Int J Agron* 4917256. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
57. Khourchi S, Elhaisoufi W, Loum M, et al. (2022) Phosphate solubilizing bacteria can significantly contribute to enhance P availability from polyphosphates and their use efficiency in wheat. *Microbiol Res* 262: 127094. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127094>
58. Suleimanova AD, Beinhauer A, Valeeva LR, et al. (2015) Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5. 1. *Appl Environ Microbiol* 81: 6790–6799. <https://doi.org/10.1128/AEM.01384-15>
59. Park JH, Lee HH, Han CH, et al. (2016) Synergistic effect of co-inoculation with phosphate-solubilizing bacteria. *Korean J Agric Sci* 43: 401–414. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20160043>
60. Tu L, He Y, Shan C, et al. (2016) Preparation of microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 seed coating agents and their effects on the growth of cotton seedlings. *BioMed Res Int* 16. <https://doi.org/10.1155/2016/3251357>
61. Liu B, Luo J, Wang X, et al. (2013) Alginate/quaternized carboxymethyl chitosan/clay nanocomposite microspheres: preparation and drug-controlled release behavior. *J Biomater Sci Polym Ed* 4: 589–605. <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.701160>
62. He Y, Wu Z, Tu L, et al. (2015) Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Appl Clay Sci* 109: 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.02.001>
63. Pour MM, Saberi-Riseh R, Mohammadinejad R, et al. (2019) Investigating the formulation of alginate-gelatin encapsulated *Pseudomonas fluorescens* (VUPF5 and T17-4 strains) for controlling *Fusarium solani* on potato. *Int J Biol Macromol* 133: 603–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.071>
64. Al-Qaysi SA, Al-Haideri H, Al-Shimmary SM, et al. (2021) Bioactive levan-Type exopolysaccharide produced by *Pantoea agglomerans* ZMR7: Characterization and optimization for enhanced production. *J Microbiol Biotechnol* 31: 696. <https://doi.org/10.4014/jmb.2101.01025>
65. Wang M, Geng L, Xue B, et al. (2021) Structure characteristics and function of a novel extracellular polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* strain 4D19. *Int J Biol Macromol* 189: 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.193>
66. Donati I, Holtan S, Mørch YA, et al. (2005) New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium–alginate gels. *Biomacromolecules* 6: 1031–1040. <https://doi.org/10.1021/bm049306e>
67. Liew CV, Chan LW, Ching AL, et al. (2006) Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *Int J Pharm* 309: 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.040>

68. Allard-Massicotte R, Tessier L, Lécuyer F, et al. (2016) *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio* 7: 10–1128. <https://doi.org/10.1128/mBio.01664-16>
69. Doornbos RF, Geraats BP, Kuramae EE, et al. (2011) Effects of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 395–407. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0115>
70. Poliseti S, Bible AN, Morrell-Falvey JL, et al. (2016) Raman chemical imaging of the rhizosphere bacterium *Pantoea* sp. YR343 and its co-culture with *Arabidopsis thaliana*. *Analyst* 141: 2175–2182. <https://doi.org/10.1039/C6AN00080K>
71. Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, et al. (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci* 110: 1621–1630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
72. Fan D, Subramanian S, Smith DL (2020) Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 10: 12740. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69713-5>
73. Graça AT, Hall M, Persson K, et al. (2021) High-resolution model of *Arabidopsis* photosystem II reveals the structural consequences of digitonin-extraction. *Sci Rep* 11: 15534. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94914-x>
74. Mirskaya GV, Khomyakov YV, Rushina NA, et al. (2022) Plant development of early-maturing spring wheat (*Triticum aestivum* L.) under inoculation with *Bacillus* sp. V2026. *Plants* 11: 1817. <https://doi.org/10.3390/plants11141817>
75. Sood G, Kaushal R, Sharma M (2020) Significance of inoculation with *Bacillus subtilis* to alleviate drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Vegetos* 33: 782–792. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00149-y>
76. Rojas-Padilla J, de-Bashan LE, Parra-Cota FI, et al. (2022) Microencapsulation of *Bacillus* Strains for Improving Wheat (*Triticum turgidum* Subsp. *durum*) Growth and Development. *Plants* 11: 2920. <https://doi.org/10.3390/plants11212920>
77. Suman A, Shukla L, Marag PS, et al. (2020) Potential use of plant colonizing *Pantoea* as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops. *J Environ Biol* 41: 987–994. <https://doi.org/10.22438/jeb/41/5/MRN-1250>
78. Hussain A, Hasnain S (2011) Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 2645–2654. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0738-y>
79. Yaghoubi Khangahi M, Leoni B, Crecchio C (2021) Photosynthetic responses of durum wheat to chemical/microbiological fertilization management under salt and drought stresses. *Acta Physiol Plant* 43: 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03289-z>
80. Yong JWH, Ng YF, Tan SN, et al. (2010) Effect of fertilizer application on photosynthesis and oil yield of *Jatropha curcas* L. *Photosynthetica* 48: 208–218. <https://doi.org/10.1007/s11099-010-0026-3>
81. Kanagendran A, Chatterjee P, Liu B, et al. (2019) Foliage inoculation by *Burkholderia vietnamiensis* CBMB40 antagonizes methyl jasmonate-mediated stress in *Eucalyptus grandis*. *J Plant Physiol* 242: 153032. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153032>
82. Acosta-Motos JR, Ortuño MF, Bernal-Vicente A, et al. (2017) Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy* 7: 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
83. Singh BK, Trivedi P, Egidio E, et al. (2020) Crop microbiome and sustainable agriculture. *Nat Rev Microbiol* 18: 601–602. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00446-y>

84. Bhise KK, Dandge PB (2019) Alleviation of salinity stress in rice plant by encapsulated salt tolerant plant growth promoting bacteria *Pantoea agglomerans* strain KL and its root colonization ability. *Arch Agron Soil Sci* 65: 1955–1968. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1584395>
85. He Y, Wu Z, Ye BC, et al. (2016) Viability evaluation of alginate-encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 under simulated salt-stress conditions and its effect on cotton growth. *Eur J Soil Biol* 75: 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.05.002>
86. Soluch R, Hüter NF, Romero Picazo D, et al. (2021) Colonization dynamics of *Pantoea agglomerans* in the wheat root habitat. *Environ Microbiol* 23: 2260–2273. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15430>
87. Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42: 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
88. Kumar A, Prakash A, Johri BN (2011) *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: *Bacteria in agrobiological: crop ecosystems*, Berlin Heidelberg: Springer, 37–59. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2)



AIMS Press

©2025 the Author(s), licensee AIMS Press. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Review

# Recent Advances in Encapsulation Techniques of Plant Growth-Promoting Microorganisms and Their Prospects in the Sustainable Agriculture

Amel Balla <sup>1</sup>, Allaoua Silini <sup>1</sup>, Hafsa Cherif-Silini <sup>1</sup>, Ali Chenari Bouket <sup>2</sup>, Faizah N. Alenezi <sup>3</sup>  
and Lassaad Belbahri <sup>4,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas of Setif, Setif 19000, Algeria
  - <sup>2</sup> East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, Plant Protection Research Department, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz 5355179854, Iran
  - <sup>3</sup> Marine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Old Aberdeen, Scotland AB24 3UE, UK
  - <sup>4</sup> Laboratory of Soil Biology, University of Neuchâtel, 11 Rue Emile Argand, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland
- \* Correspondence: lassaad.belbahri@unige.ch

**Abstract:** In addition to changing global demography and global warming, agricultural production systems around the world are threatened by intensive agricultural practices (overuse of land and excessive use of chemical fertilizers and pesticides) that deplete soils by affecting their dynamics and their fertility, pollute the environment, lower production, and alter biodiversity on a large scale. The use of bioformulations based on PGPMs (plant growth-promoting microorganisms) seems to be a promising and sustainable strategy to overcome these threats, thanks to their tolerance to various biotic and abiotic stresses and via their beneficial effects in promising plant growth, pest protection, bioremediation, and restoration of degraded lands. In recent years, particular attention has been paid to encapsulated formulations because they offer several advantages over conventional bioformulation (liquid and solid) related to shelf life, problems of survival and viability in the environment, and the efficiency of rhizospheric colonization. This review focuses on the types of encapsulations and the different technologies used in this process as well as the most commonly used substrates and additives. It also provides an overview on the application of encapsulated bioformulations as biofertilizers, biopesticides, or other biostimulators and summarizes the knowledge of the scientific literature on the development of nanoencapsulation in this sector.

**Keywords:** PGPMs; bioformulation; encapsulation; sodium alginate; nanotechnology



**Citation:** Balla, A.; Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Alenezi, F.N.; Belbahri, L. Recent Advances in Encapsulation Techniques of Plant Growth-Promoting Microorganisms and Their Prospects in the Sustainable Agriculture. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 9020. <https://doi.org/10.3390/app12189020>

Academic Editor: Catarina Guerreiro Pereira

Received: 22 August 2022

Accepted: 6 September 2022

Published: 8 September 2022

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



**Copyright:** © 2022 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

Current agricultural activities, through the excessive and uncontrolled use of toxic and harsh fertilizers and pesticides, cause significant economic and ecological damage and risks to animal and human health [1]. In recent decades, the use of PGPMs (plant growth-promoting microorganisms) in the form of inoculants as alternatives to chemicals has received increasing attention from researchers in the field due to their ability to stimulate plant growth and protect against pathogen attacks and stressful abiotic factors [2]. Adverse environmental conditions and the presence of toxic compounds and competition with native flora limit the effectiveness and performance of PGPMs [3]. In order to develop a protective tool, various formulations have been designed depending on the application conditions. Immobilization of PGPMs inside biodegradable polymers or encapsulation is a promising bioformulation that preserves their activities related to plant growth promotion, thus leading to maximum cell viability and survival and increased colonization of the rhizosphere and roots of plants [3]. The objective of this review is to highlight the different

## Article

# Screening of Cellulolytic Bacteria from Various Ecosystems and Their Cellulases Production under Multi-Stress Conditions

Amel Balla <sup>1</sup>, Allaoua Silini <sup>1</sup>, Hafsa Cherif-Silini <sup>1</sup>, Ali Chenari Bouket <sup>2</sup>, Amel Boudechicha <sup>1</sup>, Lenka Luptakova <sup>3</sup>, Faizah N. Alenezi <sup>4</sup> and Lassaad Belbahri <sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas of Setif, Setif 19000, Algeria; amelballa4@gmail.com (A.B.); siliniallaoua@univ-setif.dz (A.S.); cherifhafsa@yahoo.fr (H.C.-S.); amelboudechicha@univ-setif.dz (A.B.)

<sup>2</sup> East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, Plant Protection Research Department, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz 5355179854, Iran; a.chenari@areeo.ac.ir

<sup>3</sup> Department of Biology and Genetics, Institute of Biology, Zoology and Radiobiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, 04181 Kosice, Slovakia; lenka.luptakova@uvlf.sk

<sup>4</sup> Marine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Old Aberdeen AB24 3UE, UK; faizah.alenezi@abdn.ac.uk

<sup>5</sup> Laboratory of Soil Biology, University of Neuchatel, 11 Rue Emile Argand, CH-2000 Neuchatel, Switzerland

\* Correspondence: lassaad.belbahri@unige.ch



**Citation:** Balla, A.; Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Bouket, A.C.; Boudechicha, A.; Luptakova, L.; Alenezi, F.N.; Belbahri, L. Screening of Cellulolytic Bacteria from Various Ecosystems and Their Cellulases Production under Multi-Stress Conditions. *Catalysts* **2022**, *12*, 769. <https://doi.org/10.3390/catal12070769>

Academic Editors: Irina L. Simakova, Dmitry Y. Murzin and Changzhi Li

Received: 17 May 2022

Accepted: 9 July 2022

Published: 11 July 2022

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



**Copyright:** © 2022 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/>).

**Abstract:** Cellulose represents the most abundant component of plant biomass on earth; it is degraded by cellulases, specific enzymes produced by microorganisms. However, cellulases of bacterial origin attract more interest due to their natural diversity and ability to inhabit a variety of niches, allowing the selection of cellulolytic strains resistant to environmental stresses. The screening of the cellulolytic activity of 398 bacteria isolated from various ecosystems in Algeria (cave, ruins, chott, thermal station, and rhizosphere of arid and semi-arid regions) was performed by the appearance of a hydrolysis zone on carboxymethylcellulose (CMC) medium. The cellulase activity on CMC (1%) broth allowed to select 26 strains among which 12 had the best activity (0.3 U/mL to 2.2 U/mL). Optimization of physicochemical parameters (salinity: 0–1 M NaCl; pH: 3, 4, 7, 9, and 11; temperature: 30, 45, and 50 °C; PEG<sub>8000</sub>: 0 and 30%) involved in growth and cellulose production showed that the majority of strains were mesophilic, neutrophilic, or alkali-tolerant and tolerant to 30% of PEG<sub>8000</sub>. The cellulase activity and stability under different stress allowed to retain five strains, which the most efficient. Based on the 16S-rRNA sequencing results, they belonged to the genus *Bacillus*. The physicochemical properties of cellulases (crude extract) showed a CMCase active over a wide range of pH (4 to 11), optimal at 50 °C and 60 °C. The inhibiting salinity effect on the activity was not detected and was negligible on the enzymatic stability. The residual CMCase activity remained between 40 and 70% in a temperature range between 40 and 70 °C, was stable over a wide range of saline concentrations (0–2000 mM), and was weakly affected at 30% of PEG<sub>8000</sub>. The crude enzyme extract was able to hydrolyze both soluble and insoluble cellulosic substrates. The evaluation of the hydrolysis capacity of lignocellulosic waste revealed the ability of tested strains to degrade wheat bran, barley bran, and corncob. In addition, the enzyme showed significant multi-stress resistance on solid and liquid media. By these characteristics, these cellulolytic bacteria could be attractive to be used in various industrial and biotechnology applications.

**Keywords:** cellulolytic bacteria; carboxymethylcellulose; cellulase activity; enzymatic stability; multi-stress tolerance

## 1. Introduction

Each year, approximately 998 million tons of lignocellulosic waste are generated by agricultural activities [1,2]. In terrestrial environments, Lignocellulose is the main product of photosynthesis and represents on average the most abundant renewable plant

## Review

# The Threat of Pests and Pathogens and the Potential for Biological Control in Forest Ecosystems

Amel Balla <sup>1</sup>, Allaoua Silini <sup>1</sup>, Hafsa Cherif-Silini <sup>1</sup>, Ali Chenari Bouket <sup>2</sup>, Warren Keith Moser <sup>3</sup>, Justyna Anna Nowakowska <sup>4</sup>, Tomasz Oszako <sup>5,6</sup>, Farida Benia <sup>7</sup> and Lassaad Belbahri <sup>8,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, Ferhat Abbas University, Setif 19000, Algeria; amelballa4@gmail.com (A.B.); siliniallaoua@univ-setif.dz (A.S.); cherifhafsa@yahoo.fr (H.C.-S.)
- <sup>2</sup> Plant Protection Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tabriz 5355179854, Iran; a.chenari@areeo.ac.ir
- <sup>3</sup> Rocky Mountain Research Station, U.S.D.A. Forest Service, Flagstaff, AZ 86001, USA; warren.k.moser@usda.gov
- <sup>4</sup> Institute of Biological Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw, Wóycickiego 1/3 Street, 01-938 Warsaw, Poland; j.nowakowska@uksw.edu.pl
- <sup>5</sup> Department of Forest Protection, The Forest Research Institute in Sekocin Stary, 05-090 Raszyn, Poland; T.Oszako@ibles.waw.pl
- <sup>6</sup> Faculty of Civil Engineering and Environmental Sciences, Institute of Forest Sciences, Białystok University of Technology, Wiejska 45E, 15-351 Białystok, Poland
- <sup>7</sup> Plant and Animal Production Improvement and Development Laboratory, Faculty of Natural and Life Sciences, Ferhat Abbas University, Setif 19000, Algeria; f.benia@univ-setif.dz
- <sup>8</sup> Laboratory of Soil Biology, University of Neuchâtel, 2000 Neuchâtel, Switzerland
- \* Correspondence: lassaad.belbahri@unine.ch



**Citation:** Balla, A.; Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Moser, W.K.; Nowakowska, J.A.; Oszako, T.; Benia, F.; Belbahri, L. The Threat of Pests and Pathogens and the Potential for Biological Control in Forest Ecosystems. *Forests* **2021**, *12*, 1579. <https://doi.org/10.3390/f12111579>

Academic Editor: Young-Seuk Park

Received: 17 October 2021

Accepted: 15 November 2021

Published: 17 November 2021

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



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

**Abstract:** Forests are an essential component of the natural environment, as they support biodiversity, sequester carbon, and play a crucial role in biogeochemical cycles—in addition to producing organic matter that is necessary for the function of terrestrial organisms. Forests today are subject to threats ranging from natural occurrences, such as lightning-ignited fires, storms, and some forms of pollution, to those caused by human beings, such as land-use conversion (deforestation or intensive agriculture). In recent years, threats from pests and pathogens, particularly non-native species, have intensified in forests. The damage, decline, and mortality caused by insects, fungi, pathogens, and combinations of pests can lead to sizable ecological, economic, and social losses. To combat forest pests and pathogens, biocontrol may be an effective alternative to chemical pesticides and fertilizers. This review of forest pests and potential adversaries in the natural world highlights microbial inoculants, as well as research efforts to further develop biological control agents against forest pests and pathogens. Recent studies have shown promising results for the application of microbial inoculants as preventive measures. Other studies suggest that these species have potential as fertilizers.

**Keywords:** forest pests and pathogens; forest diseases; biocontrol; invasive species

## 1. Introduction

Forests cover about 30% of the world's land area [1] and provide an array of ecosystem services and goods that are essential to the functioning of the Earth and human society. For example, they are a vital resource for modulating climate and hydrologic systems. They also contribute directly and indirectly to the world economy by providing multiple products and services that support human health and livelihoods.

As global demand for forest products continues to rise, there is a need to manage forests for greater productivity, with ever-closer attention to the multifaceted services that forests deliver. The forestry profession faces several challenges toward that end. For example, enhancing forest health is an increasingly important goal in managing natural



LABORATOIRE  
DE MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE  
UNIVERSITÉ A. MIRAL - BEJAIA

International Conference  
on Applied Microbiology  
and Biotechnology  
1<sup>st</sup> ICAMB-2024



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

## Certificate of Participation

The Scientific Committee of the First International Conference on Applied Microbiology and Biotechnology (ICAMB-2024) held in Bejaia, Algeria on the 16<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> of October 2024 certifies that :

**Amel BALLA**

Has participated actively to the conference with a **POSTER** titled :

Encapsulation of *Bacillus thuringiensis* and *Pantoea agglomerans* for enhanced biofertilization in durum wheat

Co-authors : Allaoua Silini and Hafsa Cherif-Silini



President of the Conference

**Prof. Mouloud KECHA**



**ICAMB-2024**

President of the organizing Committee

**Prof. Farida BENDALI**



## Participation Certificate

The organizers of the 20<sup>th</sup> International Days of Biotechnology (IDB2022) certify that Mr. /Ms. **Amel BALLA** participated in this scientific event with poster communication entitled «*Bacterial cellulases production under multi stress conditions*».

**Chairman**

**Prof. Samir BEJAR**

Number: 242

ID : 223



*Gasmine Hammami, Tunisia, 19<sup>th</sup>-22<sup>nd</sup> December 2022*