

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des sciences et de la nature et de la vie  
Département de Microbiologie  
Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables/Equipe de Biomasse et Environnement

**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie      **Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Microbiologie

**Présentée par**

**M<sup>lle</sup> BELKEBLA Nadia**

*Thème*

**Effet de la salinité sur la variation du NPKSi dans le sol et l'impact de certaines bactéries sur la restauration de ces éléments dans les sols salés**

**Soutenue le : 05 Février 2026**

**Devant le Jury composé de :**

**Nom et Prénom**

**Grade**

<b>Mr. DJOUDI Ferhat</b>	Professeur	Univ. de Bejaia	Président
<b>Mr. NABTI El-Hafid</b>	Professeur	Univ. de Bejaia	Rapporteur
<b>Mme. Cruz Cristina</b>	Professeur	Univ. de Lisbonne	Co-encadreur
<b>Mme.SOUAGUI Samiha</b>	MCA	Univ. de Bejaia	Examinatrice
<b>Mme. GHAROUT Alima</b>	MCA	Univ. de Bejaia	Examinatrice
<b>Mr. MOKRANI Slimane</b>	MCA	Univ. de Mascara	Examineur

**Année Universitaire 2025/2026**

## Remerciements

En premier lieu, j'exprime ma profonde gratitude au professeur NABTI El-Hafid, directeur de cette thèse, pour avoir dirigé activement ce travail. Je vous remercie, Monsieur, pour votre soutien constant, votre disponibilité, votre confiance, votre optimisme et votre professionnalisme. Vos qualités scientifiques et humaines, ainsi que vos conseils avisés, m'ont été d'une aide précieuse tout au long de ce parcours.

J'adresse également mes sincères remerciements à Madame Gharout-Sait Alima, Madame Souagui Samiha et Monsieur Mokrani Slimane pour l'examen attentif de ce manuscrit et pour leur contribution à la réussite de la soutenance, ainsi qu'à Monsieur Djoudi Ferhat. pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant ce jury. Vos efforts participeront, sans aucun doute, à la valorisation et à l'amélioration de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au professeur Cristina CRUZ, cheffe du laboratoire *CE3C – Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes* à Lisbonne (Portugal), pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe. Merci, Professeur, pour votre disponibilité et pour vos précieux conseils.

Mes remerciements les plus chaleureux vont également à mon amie AIT BESSAI Sylia, pour sa présence constante et son soutien indéfectible, ainsi qu'à mon amie et collègue ABDOUNE Ahlam, dont l'accompagnement m'a été d'un grand réconfort.

Je souhaite aussi remercier les membres du Laboratoire de Maîtrise des Énergies Renouvelables, et plus particulièrement ceux de notre équipe *Biomasse et Environnement* : Dahdah Kamel, Tabli Nacera, Bensidhoum Leila, Khelloufi Noria, Abassi Houcine et Mokrane Fatima. Merci à vous pour votre disponibilité et votre esprit d'équipe.

Je n'oublie pas non plus tous les membres du laboratoire CE3C : Philipa Joana, Paolo, Manuella, Margarida, Paola, Juliana, Ines, Marta, Teresa, Rute, ainsi que l'ensemble des collaborateurs, pour leur aide scientifique, leur générosité et leur sympathie.

Enfin, que toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de cette thèse trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mes remerciements.

Merci à toutes et à tous.

## **Dédicace**

À mes très chers parents, aucun mot ne saurait traduire l'immensité de mon amour, de mon respect et de ma profonde gratitude.

À mon frère Bouzid, à ma belle-sœur Biba, ainsi qu'à mes nièces Nayla et Dina, je souhaite tout le bonheur et la réussite dans vos vies.

À ma sœur Lidya, je souhaite une longue vie emplie de joie et de sérénité.

À ma petite sœur Ferial, ne change rien : tu es et resteras la meilleure.

Nadia

# TABLE DE MATIERES

<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b>	<b>7</b>
<b><u>LISTE DES TABLEAUX</u></b>	<b>8</b>
<b><u>LISTE DES FIGURES</u></b>	<b>9</b>
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>1</b>
<b><u>1 IMPACT DE LA SALINITE SUR LA PRODUCTION AGRICOLE</u></b>	<b>4</b>
1.1 SOL ET RHIZOSPHERE	4
1.1.1 LE SOL	4
1.1.2 LA RHIZOSPHERE	4
1.2 PRODUCTION AGRICOLE ET SALINITE	5
1.2.1 INFLUENCE DU STRESS ABIOTIQUE SUR LA PRODUCTION AGRICOLE	5
1.2.2 DEFINITION DE LA SALINITE	6
1.2.3 3.3. FACTEURS NATURELS DE SALINISATION DES SOLS	7
1.2.4 FACTEURS ANTHROPIQUES CONDUISANT A LA SALINISATION DES SOLS	7
<b><u>2 LES BACTERIES FAVORISANT LA CROISSANCE DES PLANTES (PGPB)</u></b>	<b>9</b>
2.1 DEFINITIONS	9
2.2 LES PRINCIPAUX ROLES DES PGPB	9
2.2.1 BIO-STIMULATION	10
2.2.1.1 Production de phytohormones	10
2.2.1.2 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	10
2.2.2 BIO-CONTROLE	11
2.2.3 BIO-FERTILISATION	12
2.2.3.1 Fixation de l'azote	12
2.2.3.2 Solubilisation du phosphate	15
2.2.3.3 Solubilisation du potassium	16
2.2.3.4 Solubilisation du silicium	17
2.3 INFLUENCE DE LA SALINITE SUR LES MICROORGANISMES DU SOL ET SUR LES INTERACTIONS PLANTES–MICROORGANISMES	19
2.4 ROLES DES PGPB DANS L'AMELIORATION DE LA TOLERANCE AU STRESS	20

<b>2.5</b>	<b>APPLICATION DES PGPB DANS LA RESTAURATION DES SOLS SALINS</b>	<b>21</b>
<b>1</b>	<b><u>ISOLEMENT DE BACTERIES TELLURIQUES, ETUDE DE LEURS PROPRIETES D'INTERET AGRICOLE ET EVALUATION DE L'IMPACT DE LA SALINITE SUR LA DISTRIBUTION DE CES PROPRIETES</u></b>	<b>23</b>
<b>1.1</b>	<b>ÉCHANTILLONNAGE</b>	<b>23</b>
<b>1.2</b>	<b>PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES ECHANTILLONS DE SOL</b>	<b>24</b>
1.2.1	PH	24
1.2.2	CONDUCTIVITE ELECTRIQUE	25
1.2.3	CONTENU EN EAU GRAVIMETRIQUE	25
1.2.4	MATIERE ORGANIQUE TOTALE	25
<b>1.3</b>	<b>ISOLEMENT ET PURIFICATION DES BACTERIES TELLURIQUES</b>	<b>26</b>
<b>1.4</b>	<b>HALOTOLERANCE DES ISOLATS SELECTIONNES</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b><u>RECHERCHE DE PROPRIETES D'INTERET AGRICOLE ET ETUDE DE L'IMPACT DE LA SALINITE SUR CES PROPRIETES</u></b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>PRODUCTION DE PHYTOHORMONE (AIA)</b>	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>PRODUCTION D'ENZYMES D'INTERET AGRICOLE</b>	<b>29</b>
2.2.1	CELLULASE	30
2.2.2	CHITINASE	30
2.2.3	AMYLASE	31
2.2.4	PROTEASE	31
2.2.5	ESTERASE	31
2.2.6	LIPASE	31
2.2.7	UREASE	32
<b>3</b>	<b><u>EFFET DE LA SALINITE SUR LA FIXATION D'AZOTE, LA SOLUBILISATION DU PHOSPHATE, DU POTASSIUM ET DU SILICATE</u></b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>EFFETS SUR LA FIXATION DE L'AZOTE</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>EFFETS SUR LA SOLUBILISATION DU PHOSPHATE INORGANIQUE</b>	<b>33</b>
3.2.1	SUR MILIEU SOLIDE	33
3.2.2	QUANTIFICATION EN MILIEU LIQUIDE	34
<b>3.3</b>	<b>EFFETS SUR LA PRODUCTION DE PHYTASE</b>	<b>34</b>
3.3.1	SUR MILIEU SOLIDE	34

3.3.2	ANALYSE QUANTITATIVE	35
<b>3.4</b>	<b>EFFETS SUR LA SOLUBILISATION DU POTASSIUM</b>	<b>36</b>
3.4.1	SUR MILIEU SOLIDE	36
3.4.2	EN MILIEU LIQUIDE	36
<b>3.5</b>	<b>EFFETS SUR LA SOLUBILISATION DU SILICATE</b>	<b>36</b>
3.5.1	ÉVALUATION QUALITATIVE	36
3.5.2	ÉVALUATION QUANTITATIVE	37

#### **4 EFFET D'UNE SOUCHE PGPB SUR LA GERMINATION, LA CROISSANCE DES PLANTULES DE BLE (TRITICUM AESTIVUM) ET LA RESTAURATION DU PHOSPHATE SOUS STRESS SALIN INDUIT**

<b>4.1</b>	<b>IDENTIFICATION MOLECULAIRE</b>	<b>38</b>
4.1.1	EXTRACTION DE L'ADN TOTAL	38
4.1.2	AMPLIFICATION DU GENE CODANT POUR L'ARN 16S	38
4.1.3	ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	39
4.1.4	SEQUENÇAGE	39
4.1.5	ANALYSE PHYLOGENETIQUE	40
<b>4.2</b>	<b>PREPARATION DES CULTURES BACTERIENNES</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>ORIGINE DES GRAINES ET STERILISATION DE SURFACE</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>INOCULATION DES GRAINES DE BLE PAR LES SOUCHES SELECTIONNEES</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>PROTOCOLE EXPERIMENTAL</b>	<b>41</b>
<b>4.6</b>	<b>FACTEURS FAVORISANT LA CROISSANCE DES PLANTULES DE BLE</b>	<b>42</b>
<b>4.7</b>	<b>EFFET DES SOUCHES SUR LA RESTAURATION DU PHOSPHATE</b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>ANALYSE STATISTIQUE</b>	<b>44</b>

#### **1 ISOLEMENT DE BACTERIES TELLURIQUES, RECHERCHE DE LEURS PROPRIETES D'INTERET AGRICOLE ET ETUDE DE L'IMPACT DE LA SALINITE SUR LA DISTRIBUTION DE CES PROPRIETES**

<b>1.1</b>	<b>PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ECHANTILLONS DE SOL</b>	<b>45</b>
<b>1.2</b>	<b>ISOLEMENT BACTERIEN</b>	<b>47</b>
<b>1.3</b>	<b>HALOTOLERANCE DES ISOLATS</b>	<b>47</b>
<b>1.4</b>	<b>RECHERCHE DES ACTIVITES D'INTERET AGRICOLE</b>	<b>48</b>
1.4.1	PRODUCTION D'AIA	48
1.4.2	ACTIVITES ENZYMATIQUES	50

**2 EFFET DE LA SALINITE SUR LA FIXATION DE L'AZOTE, LA SOLUBILISATION DU PHOSPHATE, DU POTASSIUM ET DU SILICATE** **54**

2.1	FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE	54
2.2	SOLUBILISATION DU PHOSPHATE INORGANIQUE	56
2.3	SOLUBILISATION DU PHOSPHATE ORGANIQUE	58
2.4	SOLUBILISATION DU POTASSIUM	61
2.5	SOLUBILISATION DU SILICATE	62

**3 EFFET D'UNE SOUCHE PGPB SUR LA GERMINATION, LA CROISSANCE DES PLANTULES DE BLE (*TRITICUM AESTIVUM*) ET LA RESTAURATION DE PHOSPHATE SOUS STRESS SALIN INDUIT** **65**

3.1	IDENTIFICATION MOLECULAIRE	65
3.2	EFFET DE <i>PSEUDOMONAS AZOTOFORMANS</i> SUR LA GERMINATION DES GRAINES DE BLE	65
3.3	EFFET DE <i>P. AZOTOFORMANS</i> SUR LA CROISSANCE DES SEMIS DE BLE	67
3.4	ESTIMATION QUANTITATIVE DU PHOSPHATE SOLUBLE DANS LE SOL	70

## Liste des abréviations

**AIA** : Acide indole-3-acétique

**ANOVA** : Analyse de variance

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNr 16S** : ARN ribosomique 16S

**CE** : Conductivité électrique

**CE3C** : Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (Université de Lisbonne)

**DNA/ADN** : Acide désoxyribonucléique

**DO600** : Densité optique mesurée à 600 nm

**GMM** : Glucose Minimal Medium

**GN** : Gélose nutritive

**LB** : Luria–Bertani (milieu de culture)

**MS** : Matière sèche

**MOT** : Matière organique totale

**NaCl** : Chlorure de sodium

**PBS** : Phosphate Buffered Saline (solution saline tamponnée au phosphate)

**PGPB** : Plant Growth-Promoting Bacteria (bactéries favorisant la croissance des plantes)

**PGPR** : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes)

**pH** : Potentiel hydrogène

**ppm** : Parties par million

**SOM** : Soil Organic Matter (matière organique du sol)

**TE** : Tampon Tris-EDTA (Tris-HCl + EDTA)

**θg** : Teneur en eau gravimétrique

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. Processus métaboliques assurés par les microorganismes dans le sol (d'après Prescott, 2002).</b> .....	5
<b>Tableau 2. Réponse microbienne à la salinité (Ghoul, 1990 ; Prescott, 2002)</b> .....	8
<b>Tableau 3. Localisation géographique des échantillons de sol</b> .....	23
<b>Tableau 4. Propriétés physicochimiques des échantillons de sol</b> .....	45
<b>Tableau 5. Solubilisation du phosphore inorganique par l'isolat N76 sur milieux solides et liquides</b> .....	57
<b>Tableau 6. Minéralisation du phosphate organique par l'isolat N76 sur milieux solides et liquides</b> .....	59
<b>Tableau 7. Disponibilité du phosphore (ppm) dans les sols témoins et les sols contenant des graines inoculées avec P. azotoformans</b> .....	70

## Liste des figures

Figure 1. Pertes agricoles dues aux facteurs biotiques et abiotiques au niveau planétaire (Ashraf et al., 2012).....	6
Figure 2. Mécanisme d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stresses abiotiques (Saravanakumar, 2012).....	11
Figure 3. Effet de la salinité sur la plante et le rôle des PGPB dans l'atténuation de ces effets et la stimulation de la croissance végétale sous conditions de stress salin (Belkebla et al., 2022).....	16
Figure 4. Schéma illustratif de la procédure d'isolement bactérien à partir des échantillons du sol.....	26
Figure 5. Schéma illustratif de test de holotolérance des isolats sur milieu GMM.....	27
Figure 6. Test de production d'Acide Indole 3-Acétique.....	29
Figure 7. Schéma récapitulative de la méthode des disques d'agar (original).....	30
Figure 8. Illustration des étapes de préparation d'inoculum bactérien, de la stérilisation des graines du blé ( <i>Triticum aestivum</i> ) et leur inoculation.....	41
Figure 9. Quelques étapes d'évaluation des paramètres de la croissance des plantules du blé.....	43
Figure 10. Aspect d'un résultat positif pour la production d'AIA.....	49
Figure 11. Aspect des résultats positif des activités enzymatiques testées.....	51
Figure 12. Aspect de la zone de solubilisation du phosphate tricalcique par un de nos isolats sur le milieu de Pikovskaya après 48h d'incubation.....	56
Figure 13. Effet de <i>P. azotoformans</i> sur la germination des graines de blé sous différentes concentrations de NaCl.....	66
Figure 14. Effet de <i>P. azotoformans</i> sur le poids frais des plantules de blé sous différentes concentrations de NaCl.....	67
Figure 15. Effet de <i>P. azotoformans</i> sur le poids sec des semis de blé sous différentes concentrations de NaCl.....	68
Figure 16. Effet de <i>P. azotoformans</i> sur la longueur des pousses des plantules de blé sous différentes concentrations de NaCl.....	69
Figure 17. Effet de <i>P. azotoformans</i> sur la longueur des racines des plantules de blé sous différentes concentrations de NaCl.....	70



## **Introduction**

L'un des principaux défis de ce siècle pour l'humanité est de garantir une production alimentaire suffisante pour une population mondiale en forte expansion, tout en préservant les ressources écologiques et énergétiques de notre planète. Selon la révision des Nations Unies de 2006, la population mondiale devrait atteindre 8,9 milliards d'habitants en 2050, soit une augmentation d'environ 47 %. En 2011, l'ONU annonçait déjà que la population mondiale avait franchi le seuil des 7 milliards. Toutefois, ces prévisions ont été révisées à la fin de l'année 2015 : la planète devrait accueillir entre 9,725 et 11,213 milliards d'habitants d'ici 2050 et 2100 respectivement (UN, 2004 ; Ashraf et al., 2012 ; UN, 2015).

Face à cette croissance démographique, particulièrement marquée en Asie (60 %) et en Afrique (16 %), l'augmentation de la production agricole est devenue une nécessité afin de répondre aux besoins alimentaires mondiaux (Waughray, 2011). Ainsi, la production de blé devra passer de 3,1 à 3,5 tonnes par hectare dans les pays en développement entre 2015 et 2030 pour satisfaire les besoins nutritionnels (FAO, 2012 ; UN, 2015).

Les engrais chimiques sont largement utilisés pour accroître la croissance et le rendement des cultures. Cependant, l'usage intensif des pesticides, herbicides et l'irrigation excessive ont conduit à l'accumulation de quantités importantes de substances toxiques, provoquant une dégradation sans précédent des sols agricoles (Tak et al., 2013). Ces pratiques aggravent les changements climatiques, entraînent une perte de biodiversité, réduisent les réserves planétaires en eau douce et favorisent la salinisation des sols (Shahbaz et Ashraf, 2013).

On estime qu'environ 6 % de la surface terrestre est affectée par la salinité, ce qui correspond à 20 % des terres irriguées dans le monde. Chaque année, la salinité dégrade près de 10 millions d'hectares de terres agricoles (Silini et al., 2016). Ces zones se situent principalement dans les régions arides et semi-arides, où les précipitations insuffisantes ne permettent pas le lessivage des sels accumulés dans les couches superficielles du sol. De plus, il est prévu que plus de 50 % des terres agricoles mondiales seront touchées par la salinité d'ici 2050 (Jamil et al., 2011 ; Dikilitas et Karakas, 2012 ; Stanković et al., 2015). En Algérie, entre 10 et 15 % des terres irriguées sont affectées, soit près de 3,2 millions d'hectares, répartis aussi bien au Nord qu'au Sud du pays (Silini et al., 2016).

La salinité altère négativement les propriétés physico-chimiques du sol, notamment le pH, la capacité d'échange cationique et la teneur en carbone organique. Le stress salin limite fortement la croissance et le développement des plantes. Il perturbe la production hormonale, la transpiration, la photosynthèse, la translocation des nutriments, et accroît la production d'éthylène au niveau racinaire, affectant ainsi divers processus métaboliques (Liu et al., 2021).

Pour améliorer la tolérance des plantes au stress salin, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre : sélection de variétés tolérantes au sel, adoption de systèmes de culture alternatifs et de pratiques de gestion spécifiques (telles que l'irrigation goutte-à-goutte), développement de cultures génétiquement modifiées ou encore application exogène de solutés compatibles à propriétés osmoprotectrices. Toutefois, ces approches demeurent coûteuses et peu durables (Kumar et al., 2020). Une alternative prometteuse repose sur l'utilisation de bactéries promotrices de croissance des plantes halotolérantes (PGPB), une stratégie écologique, durable et économiquement avantageuse (Singh et al., 2017).

Les PGPB exercent leurs effets bénéfiques sur le sol et les plantes à travers divers mécanismes : production de phytohormones (Ait Bessai et al., 2022), lutte biologique contre les agents phytopathogènes (Mojgani et al., 2017), dégradation des polluants organiques (Gamalero et al., 2009), augmentation de la disponibilité des nutriments par fixation biologique de l'azote (Padda et al., 2016), solubilisation des formes insolubles de phosphates, potassium et silicates (Gupta et al., 2015), et amélioration de la tolérance des plantes au stress salin (Singh et al., 2017).

L'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) constituent les macronutriments essentiels à la croissance et au développement des plantes (Vessey et al., 2003). Ils interviennent dans des processus physiologiques clés tels que l'activation enzymatique, la synthèse protéique, la photosynthèse, la résistance aux maladies et aux ravageurs, ainsi que l'osmorégulation (Marschner et al., 2001). Si l'azote est disponible dans l'atmosphère, le phosphore et le potassium sont en grande partie immobilisés dans le sol par précipitation chimique, devenant ainsi peu solubles et donc difficilement accessibles aux racines. Le silicium (Si), bien que non essentiel, joue un rôle important dans la régulation de la conductivité électrique du sol, la stabilisation du pH, l'amélioration des échanges cationiques et la réduction des effets du stress salin (Cornelis et al., 2011).

Dans le cadre de cette étude, les objectifs fixés sont les suivants :

1. Isoler des bactéries telluriques à partir de différents sols prélevés dans plusieurs régions d'Algérie.
2. Évaluer *in vitro* les profils métaboliques présentant un intérêt agronomique chez les isolats obtenus.
3. Étudier la capacité de ces bactéries à fixer l'azote atmosphérique et à solubiliser le phosphate, le potassium et le silicium en présence de différentes concentrations de NaCl.
4. Identifier les bactéries présentant le plus fort potentiel en termes de fixation de l'azote atmosphérique et de solubilisation des nutriments (P, K, Si).
5. Évaluer l'effet des isolats sélectionnés sur la germination, la croissance et la solubilisation du phosphate chez les plantules de blé cultivées sous stress salin.

# **1 Impact de la salinité sur la production agricole**

## **1.1 Sol et rhizosphère**

### **1.1.1 Le sol**

Le sol constitue la couche superficielle vivante et dynamique de la lithosphère terrestre, d'une épaisseur variant de quelques centimètres à plusieurs mètres. Il est formé d'une matrice solide (organique et minérale), de liquides et de gaz. Son organisation en horizons distincts reflète l'influence des matériaux originels, des pertes et transformations de matière, ainsi que des flux d'énergie (Barles et al., 1999).

Support de vie indispensable, le sol abrite une grande diversité d'organismes en interactions continues : plantes, vers, nématodes, acariens, protozoaires, algues, champignons, eubactéries, archées, entre autres (Scow, 2004). Cette richesse biologique lui confère un rôle central dans le fonctionnement des écosystèmes et la productivité agricole.

### **1.1.2 La rhizosphère**

Le terme rhizosphère fut introduit en 1904 par Lorenz Hiltner pour désigner la zone du sol directement associée aux racines, caractérisée par une densité microbienne plus élevée que celle observée dans les sols non cultivés. Depuis, plusieurs définitions ont été proposées, mais celle de Hiltner demeure la plus universellement admise (Hartmann et al., 2008).

Les racines libèrent une grande diversité de composés (alcools, éthylène, sucres, acides aminés, acides organiques, vitamines, nucléotides, polysaccharides et enzymes). Cette exsudation racinaire façonne fortement les communautés microbiennes du sol, créant un écosystème spécifique – la rhizosphère – particulièrement favorable à leur développement (Prescott, 2002).

En retour, de nombreux microorganismes de la rhizosphère contribuent au bon fonctionnement des plantes par des interactions mutualistes : fixation de l'azote atmosphérique, dégradation de la matière organique, stimulation de la croissance et protection contre divers stress biotiques et abiotiques (Schmitt-Kopplin et al., 2007).

**Tableau 1. Processus métaboliques assurés par les microorganismes dans le sol (d'après Prescott, 2002).**

<b>Processus</b>	<b>Description</b>
Fixation biologique de l'azote	Conversion de l'azote moléculaire en ammoniac par les bactéries.
Immobilisation	Absorption et assimilation de l'ammonium ou du nitrate par les microorganismes.
Ammonification	Catabolisme bactérien et fongique de la matière organique azotée en ammonium.
Nitrification	Oxydation bactérienne de l'ammonium en nitrites puis en nitrates.
Dénitrification	Conversion bactérienne du nitrate en oxyde nitreux et en azote moléculaire.
Minéralisation	Transformation microbienne de la matière organique en azote minéral via ammonification ou nitrification.

## **1.2 Production agricole et salinité**

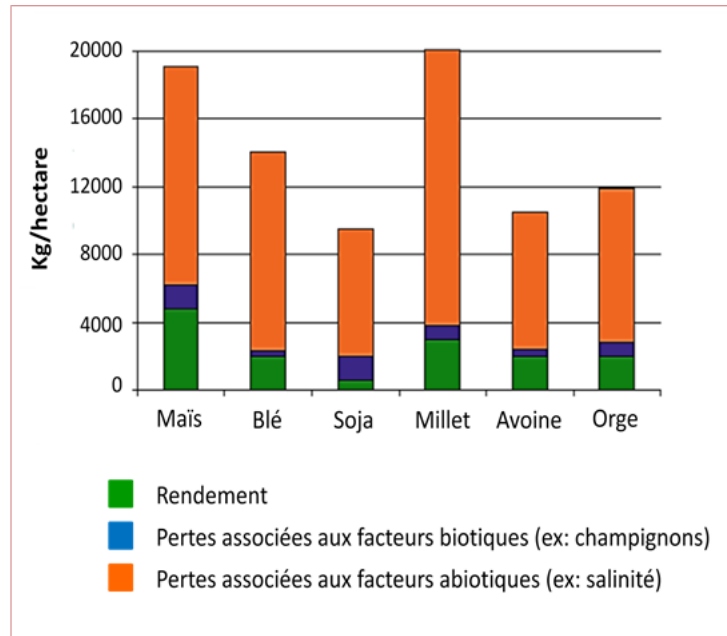
La croissance démographique mondiale soulève des défis majeurs en matière de sécurité alimentaire. La dégradation des écosystèmes, la perte de biodiversité et la diminution de la disponibilité des nutriments imposent une gestion raisonnée des ressources naturelles et le recours à des outils innovants pour limiter l'impact des facteurs environnementaux (Ashraf et al., 2012).

### **1.2.1 Influence du stress abiotique sur la production agricole**

Divers facteurs environnementaux réduisent le rendement et la qualité des productions agricoles : sécheresse, températures extrêmes, déséquilibre des nutriments (toxicité ou carences), pH défavorable et salinité. Ces stress abiotiques sont considérés comme les principales contraintes limitant la productivité des cultures (Ashraf et Foolad, 2007).

La salinité, en particulier, constitue une cause majeure de pertes agricoles, responsables d'environ 20 % des diminutions de rendement (Athar et Ashraf, 2009). Elle perturbe la germination et la densité des peuplements, limite la croissance végétative et réduit la productivité. Dans les cas les plus sévères, elle entraîne la mort des plantes. La salinité restreint l'absorption des nutriments, altère la qualité de l'eau disponible et affecte le métabolisme des organismes du sol, ce qui compromet la fertilité. Elle favorise également l'imperméabilisation des horizons profonds, rendant certaines terres incultivables.

Indirectement, la salinisation dégrade la structure du sol, induisant un compactage et une réduction de la porosité. Les sols salins se caractérisent par une faible perméabilité, une faible conductivité hydraulique et une instabilité des agrégats (Freire et al., 2009 ; Silva et al., 2012).



**Figure 1. Pertes agricoles dues aux facteurs biotiques et abiotiques au niveau planétaire (Ashraf et al., 2012)**

## 1.2.2 Définition de la salinité

La salinité des sols fait partie intégrante des écosystèmes naturels des régions arides et semi-arides. Elle constitue un problème mondial, affectant gravement plus de 800 millions d'hectares de terres arables (van Bruggen et al., 2006).

Un sol est défini comme « salin » lorsque la conductivité électrique de son extrait de saturation, mesurée à 25 °C, est supérieure à 4 dS/m, que sa concentration en sels est  $\geq 0,25$  %, et que son pH est inférieur à 8,5. Cette salinité est principalement due au chlorure de sodium (NaCl), mais également à l'accumulation d'autres sels hydrosolubles tels que les ions  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$  et  $HCO_3^-$  (Blaylock, 1994).

Lorsque les précipitations sont insuffisantes pour lixivier ces ions, les sels s'accumulent et entraînent la salinisation du sol. L'excès de sodium, appelé sodification, provoque la destruction de la structure du sol, réduisant la disponibilité en oxygène et compromettant la croissance des plantes (Silva et al., 2012). Outre le sodium, les carbonates et sulfates de

calcium, magnésium et potassium peuvent également s'accumuler en quantités importantes (Munns & Tester, 2008 ; Rengasamy, 2010).

### **1.2.3 3.3. Facteurs naturels de salinisation des sols**

La salinisation peut être d'origine naturelle (salinisation primaire), sous l'influence de divers facteurs environnementaux (Silva et al., 2012) :

- phénomènes géologiques augmentant la concentration en sels des eaux souterraines ;
- remontée capillaire d'eaux souterraines riches en sels ;
- infiltration dans des zones situées sous le niveau de la mer (micro-dépressions mal drainées) ;
- drainage d'eaux issues de substrats géologiques riches en sels ;
- transport éolien de sels depuis les zones côtières vers l'intérieur des terres.

La météorisation des minéraux primaires des roches constitue la source indirecte de la majorité des sels présents dans les sols. Toutefois, seuls quelques cas entraînent une accumulation suffisante pour générer des sols salins. À l'échelle mondiale, l'extension des terres salinisées par des processus naturels reste faible en comparaison de celle induite par les activités humaines (Shahid et al., 2018).

En général, la salinisation affecte les sols des régions à faibles précipitations et à nappes phréatiques peu profondes. Dans les zones côtières, elle peut résulter de la surexploitation des eaux souterraines, favorisant l'intrusion marine (Nachshon, 2018 ; Silva et al., 2012).

### **1.2.4 Facteurs anthropiques conduisant à la salinisation des sols**

La salinisation secondaire est largement due aux activités humaines, notamment (Silva et al., 2012) :

- l'irrigation avec des eaux riches en sels ;
- l'élévation du niveau phréatique par infiltration (canaux non revêtus, drainage inadéquat, irrigation déficiente) ;
- l'agriculture intensive sur sols à faible perméabilité, limitant le lessivage des sels ;
- la contamination des sols par des eaux industrielles salines et sous-produits.

Dans les régions arides et semi-arides, l'irrigation est indispensable pour pallier l'insuffisance des précipitations (ex. nord-est du Brésil). Toutefois, comme toutes les eaux naturelles contiennent des sels dissous, leur usage entraîne nécessairement une accumulation progressive de sels dans le profil du sol (Fernández García et al., 2020).

La sévérité de la salinisation dépend de :

- la qualité de l'eau d'irrigation,
- la présence et l'efficacité du drainage naturel ou artificiel,
- la profondeur de la nappe phréatique,
- la teneur initiale en sels du sol.

Le déséquilibre entre l'apport en sels par l'irrigation et leur élimination par le drainage est le mécanisme central de la salinisation. Dans les climats arides, la forte évapotranspiration et la faible perméabilité des sols aggravent l'accumulation des sels en surface (Mohanavelu et al., 2021).

La salinisation modifie profondément les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols, affectant la minéralisation de l'azote et du carbone, ainsi que l'activité enzymatique microbienne, essentielle au recyclage des nutriments (Tejada et al., 2006 ; Wong et al., 2008).

Enfin, l'apport répété d'engrais organiques (fumier animal), bien que bénéfique pour la fertilité, peut introduire des sels en quantités significatives, contribuant à long terme à la salinisation et à la pollution diffuse (Allen et al., 2006 ; Garbarino et al., 2003).

**Tableau 2. Réponse microbienne à la salinité (Ghoul, 1990 ; Prescott, 2002)**

<b>Catégorie</b>	<b>Conditions de croissance</b>
Non-halophiles	Croissance optimale à < 0,2 M NaCl
Halophiles faibles	Croissance optimale entre 0,2 et 0,5 M NaCl
Halophiles modérés	Croissance optimale entre 0,5 et 2,5 M NaCl
Halophiles extrêmes	Croissance optimale entre 2,5 et 5,2 M NaCl
Halotolérants	Non-halophiles pouvant tolérer le sel
Alcalophiles	Croissance optimale à pH 8,5–11,5

## 2 Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB)

Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin d'accroître la production agricole, aussi bien dans les zones affectées que non affectées par le stress salin. Parmi celles-ci, l'utilisation de microorganismes capables de protéger et de stimuler la croissance des plantes constitue une approche majeure en faveur d'une agriculture durable. Au cours des trois dernières décennies, l'application des PGPB dans la protection des plantes contre la salinité et dans l'amélioration du rendement des cultures a fait l'objet de nombreux travaux. Les résultats obtenus sont prometteurs et encouragent à poursuivre les recherches dans cette voie (Figueiredo et al., 2010).

### 2.1 Définitions

1. **PGPB** : Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) sont généralement définies comme des bactéries libres du sol capables d'interagir de manière bénéfique avec les végétaux.
2. **PGPR** : Kloepper et Schroth (1978) ont introduit le terme « rhizobactéries » pour désigner la communauté bactérienne colonisant de façon compétitive les racines des plantes tout en améliorant leur croissance (Bhattacharyya et Jha, 2012). Les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) correspondent donc aux bactéries de la rhizosphère. Ainsi, une rhizobactérie est qualifiée de PGPR si, inoculée dans la rhizosphère d'une plante, elle est capable de lui conférer un effet bénéfique (Darrah, 1993 ; Barriuso et al., 2008).

### 2.2 Les principaux rôles des PGPB

En fonction de leurs activités, les PGPB sont classées en plusieurs catégories :

- **Biofertilisants** : ils améliorent la disponibilité des éléments nutritifs pour les plantes.
- **Phyostimulateurs** : ils favorisent la croissance des végétaux, notamment par la production de phytohormones.
- **Bioremédiateurs** : ils dégradent les polluants organiques.
- **Biopesticides** : ils protègent contre les stress biotiques, principalement via la production de métabolites antibiotiques et antifongiques (Somers et al., 2004).

Les PGPB stimulent la croissance et le rendement des cultures par la production de divers métabolites d'intérêt agronomique, tels que les phytohormones, certaines enzymes et des substances antifongiques. Les effets de ces composés bactériens se manifestent à plusieurs niveaux et à différents stades du développement végétal.

## **2.2.1 Bio-stimulation**

### **2.2.1.1 Production de phytohormones**

Cinq grandes classes de régulateurs de la croissance végétale ont été identifiées : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir et al., 2004 ; Morrone et al., 2009 ; Reddy, 2014). Parmi elles, l'acide indole-3-acétique (AIA) constitue la phytohormone la plus répandue et la mieux étudiée, en raison de son rôle majeur dans la stimulation de la croissance des plantes en conditions normales comme en conditions de stress.

Il est désormais bien établi que les phytohormones disponibles pour les plantes proviennent de deux sources :

1. la production endogène par les tissus végétaux ;
2. la production exogène par des microorganismes associés, incluant les PGPR (Baca et Elmerich, 2007).

De nombreuses bactéries produisent l'AIA dans le cadre de leur métabolisme (Ait Bessai et al., 2022b). La synthèse d'AIA par les PGPR représente l'un des mécanismes directs les plus importants de promotion de la croissance. L'AIA exerce des effets positifs sur la germination des graines, la division et l'élargissement cellulaires, la différenciation tissulaire, l'initiation et le développement des racines, le nombre de ramifications racinaires, la surface racinaire en contact avec le sol, l'allongement des tiges et la tolérance aux stress abiotiques. Ces effets ont été largement documentés (Zahir et al., 2004 ; Nabti et al., 2007 ; Jha et Saraf, 2012 ; Egamberdieva et al., 2015 ; Raheem et al., 2018).

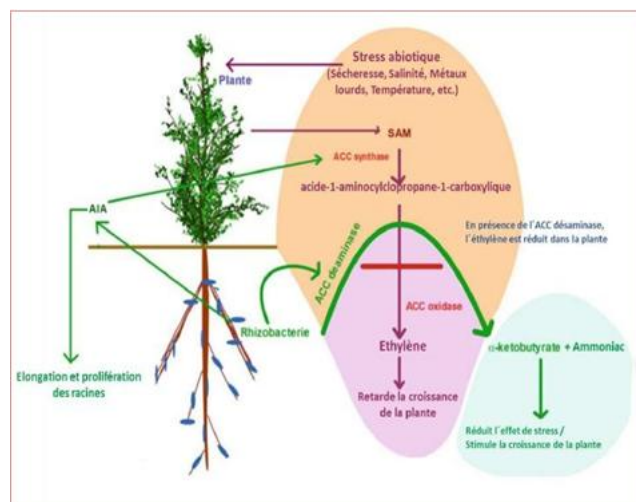
### **2.2.1.2 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase**

Outre son rôle dans la stimulation de la croissance, l'AIA active l'ACC-synthase, enzyme qui convertit la S-adénosylméthionine en ACC, précurseur de l'éthylène (Penrose et Glick, 2001). L'éthylène, bien que régulateur essentiel de nombreuses activités métaboliques,

voit sa biosynthèse fortement augmentée en conditions de stress abiotiques, ce qui affecte négativement la croissance et le rendement des plantes (Ait Bessai et al., 2022a).

Le stress induit par une surproduction d'éthylène peut être atténué grâce à l'action de l'enzyme ACC désaminase, synthétisée par certaines PGPB. Cette enzyme hydrolyse l'ACC, précurseur immédiat de l'éthylène, réduisant ainsi son accumulation dans les tissus végétaux (Vurukonda et al., 2018).

Les PGPB productrices d'ACC désaminase contribuent à améliorer la tolérance des plantes face à la salinité et à la sécheresse (Mayak et al., 2004 ; Saleem et al., 2007 ; Zahir et al., 2009 ; Chandra et al., 2019). Ces bactéries se fixent sur les racines et dégradent l'ACC excrété par les exsudats racinaires en ammoniac et en  $\alpha$ -cétobutyrate, deux composés rapidement métabolisés par les microorganismes et la plante, servant respectivement de sources d'azote et d'énergie (Holguin et Glick, 2001).



**Figure 2. Mécanisme d'action de l'ACC désaminase sur la production de l'éthylène par la plante sous stress abiotiques (Saravanakumar, 2012)**

### 2.2.2 Bio-contrôle

Les champignons phytopathogènes constituent la principale cause de maladies chez les plantes, responsables d'environ 70 % des affections des cultures (Deacon, 2005). Parmi eux, *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise, représente un champignon pathogène particulièrement redoutable. Il provoque des dégâts considérables à tous les stades de développement des cultures, avant et après la récolte, ainsi que durant le stockage (Ajouz, 2009).

L'utilisation de microorganismes bénéfiques comme agents de biocontrôle apparaît aujourd'hui comme une alternative prometteuse à la lutte chimique. En plus de limiter le recours aux pesticides, cette approche réduit leurs impacts néfastes sur l'environnement et la santé publique. Les PGPB antagonistes suscitent un intérêt croissant en raison de leur potentiel antiphytopathogène. De nombreuses études ont montré que leur emploi comme substitut partiel ou total aux pesticides chimiques joue un rôle essentiel dans la protection des cultures et l'amélioration des rendements.

Les PGPB exercent leur activité antagoniste par divers mécanismes, parmi lesquels :

- la production de substances antimicrobiennes (Raaijmakers et al., 2002) ;
- la compétition pour les nutriments et/ou l'espace (Antoun et Prévost, 2005) ;
- l'inactivation des facteurs de germination des pathogènes ;
- la dégradation de facteurs de pathogénicité tels que les toxines ;
- la stimulation des défenses naturelles de la plante ;
- la capacité de certaines souches à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes (Ahmadzadeh et Tehrani, 2009 ; Beneduzi et al., 2012).

Cependant, l'efficacité des agents de biocontrôle est fortement conditionnée par divers facteurs :

- **abiotiques** (oxygène, température, pH, disponibilité de sources spécifiques de carbone, d'azote et de micro-éléments, etc.) ;
- **biotiques** (plante hôte, nature du pathogène, composition de la microflore indigène, densité cellulaire de l'agent antagoniste, etc.) ;
- **physiologiques**, tels que les mécanismes de *quorum sensing*, qui régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'antagonisme (Adam, 2008).

Ces interactions complexes déterminent la survie, l'efficacité et la performance des souches bactériennes lorsqu'elles sont appliquées comme agents de lutte biologique.

### **2.2.3 Bio-fertilisation**

#### **2.2.3.1 Fixation de l'azote**

L'azote constitue l'un des nutriments les plus essentiels à la croissance et au rendement des plantes. Bien qu'il soit très abondant dans l'atmosphère sous forme de diazote (N<sub>2</sub>), il n'est pas directement assimilable par les végétaux. Toutefois, certains microorganismes

spécialisés sont capables de convertir le  $N_2$  en ammoniac grâce à l'activité de l'enzyme nitrogénase, rendant ainsi l'azote disponible pour les plantes (Fisher et Newton, 2004).

### **2.2.3.1.1 Principales sources d'azote**

Après le carbone, l'azote est généralement considéré comme le principal élément limitant de la croissance végétale (Vitousek et al., 2010). On le retrouve dans différents réservoirs naturels :

- **Le sol** : premier réservoir exploité par les plantes, l'azote s'y trouve majoritairement sous forme organique. L'azote minéral, essentiellement représenté par les nitrates ( $NO_3^-$ ) et l'ammonium ( $NH_4^+$ ), directement assimilables par les plantes, ne constitue qu'une faible fraction de l'azote total (2 à 5 %) (Newton, 1998).
- **Les amendements organiques** : l'apport de fumier ou de compost enrichit le sol en matière organique, source à la fois d'azote et d'humus.
- **Les engrais minéraux azotés** : couramment utilisés en agriculture, ils fournissent un complément d'azote visant à accroître le rendement (Newton, 1998).
- **L'atmosphère** : principal réservoir d'azote (environ 78 %), sous forme de diazote ( $N_2$ ), de dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) ou d'ammoniac ( $NH_3$ ), notamment issu des activités industrielles et automobiles.

### **2.2.3.1.2 Fixation biologique de l'azote**

La fixation biologique de l'azote est un processus enzymatique permettant de convertir l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en formes assimilables par les plantes et les animaux, principalement les nitrates et l'ammoniac (Tortora et al., 2003 ; Dupont et al., 2012). Ce processus est crucial dans les écosystèmes naturels, ainsi que dans les systèmes agricoles où les engrais de synthèse sont coûteux ou peu accessibles (Vincent, 2002).

Trois mécanismes naturels assurent la transformation du  $N_2$  en azote utilisable par les plantes (Hopkins, 2003) :

1. **Les orages** : les éclairs génèrent des températures et pressions élevées favorisant la formation d'oxydes nitreux ( $N_2O$ ), qui retombent au sol avec la pluie.
2. **Les bactéries libres et cyanobactéries fixatrices d'azote** : qualifiées de « fixateurs libres » car non associées directement aux plantes, elles appartiennent

notamment aux genres *Azospirillum*, *Clostridium*, *Klebsiella*, ainsi qu'aux bactéries photosynthétiques et aux cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*), capables de réduire le N<sub>2</sub> en ammoniac (Berman-Frank et al., 2007).

3. **La symbiose rhizobienne** : la relation établie entre les *Rhizobium* et les racines des légumineuses est l'une des mieux étudiées. Dans ce partenariat, les bactéries fournissent de l'azote fixé en échange de composés carbonés, créant ainsi un environnement favorable à l'activité de la nitrogénase (Backer et al., 2018 ; Sharma et al., 2016). Parmi les fixateurs libres, on retrouve notamment les genres *Azospirillum* et *Azotobacter*. Chez les symbiotes, les membres de la famille des *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*) s'associent aux légumineuses, tandis que les bactéries du genre *Frankia* établissent des symbioses avec d'autres familles végétales, telles que les *Betulaceae* (Tao et al., 2019).

Le dialogue moléculaire entre les rhizobia et les légumineuses, médié par les lipochitooligosaccharides bactériens (facteurs Nod) et les flavonoïdes végétaux, conduit à la formation de nodules racinaires. Ces nodules sont colonisés par les rhizobia, qui se différencient en bactéroïdes de morphologies et d'activités métaboliques variées. C'est à l'intérieur de ces structures que la nitrogénase assure la réduction de l'azote atmosphérique (Tao et al., 2019).

La fixation du N<sub>2</sub> repose sur un complexe enzymatique hautement spécialisé : la nitrogénase. Cette métallo-enzyme comprend deux composants :

1. **la dinitrogénase réductase** (protéine à fer), qui fournit les électrons nécessaires ;
2. **la dinitrogénase**, qui contient un cofacteur métallique et utilise ces électrons pour réduire le N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub>.

En fonction du cofacteur métallique, trois systèmes de nitrogénase ont été identifiés : la Mo-nitrogénase (à molybdène), la V-nitrogénase (à vanadium) et la Fe-nitrogénase (à fer). La majorité des fixations biologiques de l'azote sont réalisées par la Mo-nitrogénase, présente chez la plupart des diazotrophes (Ahemad et Kibret, 2014).

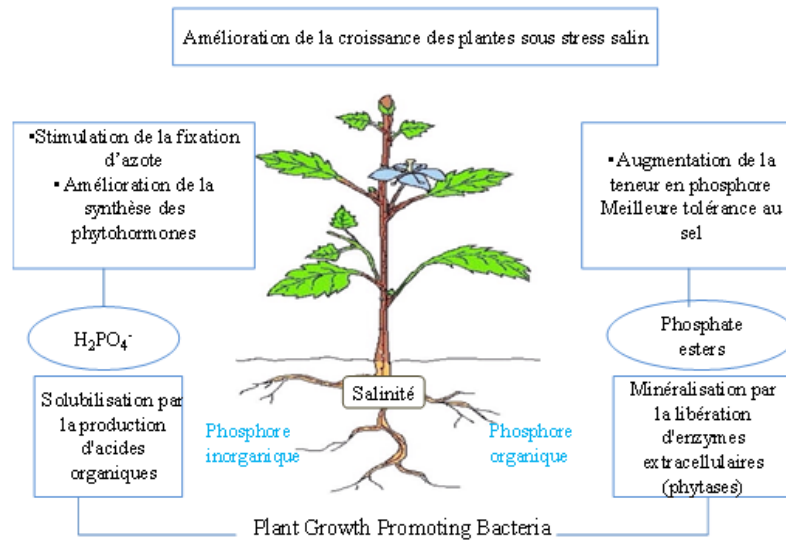
### **2.2.3.2 Solubilisation du phosphate**

Tout comme l'azote (N), le phosphore (P) est très abondant dans le sol, mais sa biodisponibilité demeure extrêmement faible. Le phosphore y est présent principalement sous deux formes insolubles : (i) des formes minérales telles que l'apatite, l'hydroxyapatite et l'oxyapatite, et (ii) des formes organiques comprenant le phosphate d'inositol (phytate du sol), les phosphomonoesters, les phosphodiesteres et les phosphotriesters. On estime que la teneur moyenne en P des sols est d'environ 0,05 % (p/p), dont seulement 0,1 % est directement disponible pour les plantes (Khan et al., 2007).

L'utilisation de bactéries solubilisant le phosphate représente une solution durable et respectueuse de l'environnement pour accroître la disponibilité du phosphore, en particulier dans les sols pauvres. Le phosphate inorganique est rendu accessible grâce à la synthèse d'acides organiques de faible poids moléculaire (par ex. acide gluconique, acide citrique), à la libération de protons et à la production de substances chélatrices. En parallèle, la minéralisation du phosphore organique résulte de la production d'enzymes telles que les phosphomonoestérases, phosphodiesterases et phosphotriesterases, capables d'hydrolyser divers esters phosphoriques.

Il a été démontré que la capacité de solubilisation du phosphate est souvent plus marquée chez les micro-organismes isolés de sols soumis à des conditions extrêmes (salinité, alcalinité, carence en nutriments) que chez ceux provenant de sols modérés (Alori et al., 2017 ; Zhu et al., 2011). Dans des environnements salins, les PGPB contribuent non seulement à la croissance végétale, mais aussi à l'absorption et à l'utilisation des nutriments minéraux. Des genres bactériens tels qu'*Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* produisent des substances acides permettant d'acidifier la rhizosphère et d'améliorer l'utilisation du phosphore par chélation et échanges d'ions (Rodríguez et Fraga, 1999).

En outre, le phosphate soluble produit par ces bactéries peut interagir avec les métaux lourds pour former des complexes insolubles, contribuant ainsi à réduire leur biodisponibilité et leur toxicité dans le sol (Wan et al., 2020).



**Figure 3. Effet de la salinité sur la plante et le rôle des PGPB dans l'atténuation de ces effets et la stimulation de la croissance végétale sous conditions de stress salin (Belkebla et al., 2022)**

### 2.2.3.3 Solubilisation du potassium

Après l'azote (N) et le phosphore (P), le potassium (K) constitue le troisième nutriment essentiel pour les plantes, jouant un rôle central dans leur croissance, leur métabolisme et leur développement. En plus de renforcer la tolérance des plantes face aux maladies, aux ravageurs et aux stress abiotiques, le potassium est indispensable à l'activation de plus de 80 enzymes impliquées dans des processus physiologiques majeurs, tels que le métabolisme énergétique, la synthèse de l'amidon, la réduction des nitrates, la photosynthèse et la dégradation des sucres (Almeida et al., 2015).

Le potassium est le septième élément le plus abondant de la croûte terrestre, avec une teneur totale dans les sols comprise entre 0,04 et 3 %. Toutefois, malgré son abondance, seule une fraction très limitée (1 à 2 %) est directement disponible pour l'absorption par les plantes (Etesami et al., 2017).

Dans le sol, le potassium se présente sous différentes formes : le K minéral, le K non échangeable, le K échangeable et le K en solution. Selon la nature du sol, entre 90 et 98 % du potassium total est contenu dans les minéraux primaires, principalement les feldspaths (orthoclase, microcline) et les micas (biotite, muscovite), formes généralement indisponibles pour les plantes. La fraction non échangeable (environ 1 à 10 % du potassium total) est piégée

entre les feuillets de certains minéraux argileux. Le potassium en solution, bien que quantitativement très faible, représente la forme directement assimilable par les plantes et les microorganismes, mais c'est aussi la plus exposée au lessivage. Dans les sols agricoles, sa concentration varie généralement entre 2 et 5 mg/L (Sparks et Huang, 1985 ; Sparks, 1987).

Plusieurs travaux ont montré que certains microorganismes du sol étaient capables de solubiliser les formes insolubles de potassium et de les convertir en formes assimilables, par divers mécanismes incluant la production d'acides organiques et inorganiques, l'acidolyse, la complexolyse, la chélation, ainsi que des réactions d'échange ionique (Etesami et al., 2017). Parmi ces microorganismes, les bactéries solubilisatrices de potassium (KSB, *Potassium-Solubilizing Bacteria*) suscitent un intérêt croissant comme inoculants du sol pour stimuler la croissance et le rendement des cultures. Ces bactéries sont particulièrement efficaces pour mobiliser le potassium des réservoirs inorganiques et insolubles du sol (Xiao et al., 2017).

Les connaissances actuelles sur les mécanismes précis de solubilisation du potassium par les KSB demeurent limitées. Toutefois, il est admis que la libération d'ions  $K^+$  à partir des minéraux riches en potassium repose sur plusieurs voies. La principale est l'acidolyse, au cours de laquelle la production d'acides organiques et inorganiques entraîne un abaissement du pH et la libération de protons ( $H^+$ ), capables de déstabiliser les structures minérales et de solubiliser des minéraux tels que la muscovite, la biotite ou les feldspaths, transformant ainsi le potassium insoluble en formes directement assimilables (Etesami et al., 2017 ; Meena et al., 2014).

Divers acides organiques, notamment l'acide oxalique, l'acide tartrique, l'acide gluconique et l'acide propionique, ont été identifiés comme particulièrement efficaces pour libérer le potassium des minéraux. Le type d'acide produit varie selon la souche bactérienne, mais parmi les plus importants figurent l'acide tartrique, l'acide citrique, l'acide succinique, l'acide  $\alpha$ -cétogluconique et l'acide oxalique (Meena et al., 2014 ; Etesami et al., 2017).

#### **2.2.3.4 Solubilisation du silicium**

Le silicium (Si), deuxième élément le plus abondant de la croûte terrestre (~27 %) après l'oxygène (~47 %), est principalement présent sous forme de silicates insolubles tels que le silicate de magnésium, d'aluminium, de fer, de calcium, de sodium et de potassium (Bist et al., 2020). D'autres formes de Si sont également retrouvées dans les sols, notamment les

argiles (kaolinite, smectite, vermiculite), le quartz, la silice amorphe, ainsi que des formes cristallines comme le feldspath, l'orthoclase et le plagioclase (Sahebi et al., 2015).

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle bénéfique du silicium dans la croissance et le développement des plantes vasculaires. Son accumulation est généralement plus importante chez les fougères et les monocotylédones que chez les dicotylédones (Farooq et Dietz, 2015). Les bénéfices liés à l'apport en silicium sont particulièrement marqués chez les espèces dites « accumulatrices » de Si. Il a été démontré que la supplémentation en silicium améliore la tolérance des plantes cultivées dans des conditions défavorables (Sathe et al., 2021). En plus de renforcer les défenses contre les stress biotiques, le Si contribue à atténuer les effets négatifs de divers stress abiotiques tels que la toxicité des métaux lourds et métalloïdes, la sécheresse, la salinité, les rayonnements et les déséquilibres nutritionnels (Ma, 2004).

Le silicium n'agit pas uniquement comme un agent de résistance au stress : il améliore également la fertilité des sols en augmentant la capacité de rétention d'eau, en favorisant un meilleur équilibre nutritionnel et en maintenant les propriétés physico-chimiques des sols (Meena et al., 2014). De nombreuses observations expérimentales confirment le rôle crucial du silicium dans la productivité végétale (Raturi et al., 2021).

Dans les sols, le silicium est présent sous différentes phases : liquide, solide et adsorbée. Sa disponibilité est cependant fortement influencée par des facteurs environnementaux tels que la température, le pH, la teneur en matière organique, la texture et la nature du sol, l'altération des minéraux ainsi que l'activité microbienne. Par ailleurs, la cinétique de dissolution du silicium peut être modifiée par le potentiel redox, l'humidité du sol et la présence de sesquioxydes (Savant et al., 1996).

L'extraction microbienne du silicium à partir des silicates insolubles repose sur un processus de bioweathering (altération biogéochimique), qui consiste en la désintégration et la mobilisation de minéraux initialement inaccessibles grâce à l'action d'organismes vivants. Ce cycle implique un large éventail de bactéries saprophytes, d'actinomycètes et de champignons du sol. Ces microorganismes participent à la solubilisation de nutriments essentiels dans l'interface sol-plante, contribuant ainsi directement à la fertilité des sols et à la santé des plantes (Gadd, 2007 ; Li et al., 2006).

## 2.3 Influence de la salinité sur les microorganismes du sol et sur les interactions plantes–microorganismes

La salinité affecte négativement les propriétés physico-chimiques du sol, notamment le pH, la disponibilité des nutriments pour les plantes, la capacité d'échange cationique et l'apport en carbone organique. Ces altérations influencent fortement la composition et l'activité des communautés microbiennes du sol. Or, ces communautés jouent un rôle central dans le cycle des nutriments, la transformation de la matière organique et le maintien de la productivité végétale. Comprendre leur réponse aux stress environnementaux, tels que la teneur en eau, le pH ou les fortes concentrations en sels, est donc essentiel.

Sous stress salin, l'activité métabolique des microorganismes est généralement réduite, en raison du coût énergétique élevé lié à la mise en place de mécanismes de tolérance à la salinité (Chowdhury et al., 2011). L'effet est particulièrement marqué dans la rhizosphère, où la transpiration des plantes intensifie le flux d'eau et accroît la concentration en sels. Face à une salinité élevée, les microorganismes doivent maintenir leur équilibre osmotique interne en excluant activement les ions sodium du cytoplasme, ce qui nécessite une dépense énergétique importante pour l'adaptation osmotique (Jiang et al., 2007).

La salinité affecte également les interactions symbiotiques, en particulier la fixation biologique de l'azote (FBN). Toutes les étapes de la nodulation et de la fixation du N<sub>2</sub> chez les légumineuses sont sensibles au sel. L'amélioration de la tolérance au sel chez certains diazotrophes, tels qu'*Azospira*, peut augmenter le rendement de diverses cultures céréalières (Backer et al., 2018 ; Sharma et al., 2016). La salinité réduit l'accumulation d'azote dans les tissus végétaux, notamment par une augmentation de l'absorption de Cl<sup>-</sup> concomitante à une diminution de l'absorption de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les pousses. Elle compromet aussi la fixation symbiotique du N<sub>2</sub> en diminuant la densité des rhizobia dans le sol et leur capacité à coloniser les poils absorbants. Même lorsque la symbiose est établie, le ralentissement de la croissance de la plante hôte en conditions salines réduit l'apport de photosynthétats vers les nodules, limitant ainsi leur activité fixatrice (Fageria et al., 2011).

Outre les microorganismes, l'activité enzymatique du sol est également perturbée par la salinité. Certaines enzymes jouent un rôle clé dans la dynamique des nutriments :

- la **déshydrogénase**, indicateur majeur de l'activité oxydative et de la viabilité microbienne (Nannipieri et al., 1990) ;

- les **phosphatases**, impliquées dans la minéralisation du phosphore organique en formes inorganiques disponibles (Nannipieri et al., 2017) ;
- l'**uréase**, enzyme centrale du cycle de l'azote, qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac ou en ions ammonium ;
- la **catalase** et l'**uréase**, qui participent à la décomposition des résidus végétaux et à leur transformation en humus ;
- l'**amylase**, qui hydrolyse les polysaccharides en sucres simples, favorisant une productivité accrue des cultures (Ahmad et al., 2011 ; Cookson, 1999).

La salinité exerce un effet inhibiteur sur ces enzymes, avec une intensité variable selon leur nature. L'activité des déshydrogénases est fortement réduite, alors que les hydrolases (phosphatases, amylase, etc.) présentent une inhibition plus modérée. Cette diminution peut être attribuée à la déshydratation osmotique des cellules microbiennes, entraînant la libération d'enzymes intracellulaires vulnérables aux protéases du sol. De plus, la salinité peut altérer la conformation ionique des sites actifs enzymatiques, provoquant une perte d'activité. Enfin, la toxicité ionique spécifique induit des déséquilibres nutritionnels défavorables à la croissance microbienne et à la synthèse enzymatique (Rietz et Haynes, 2003).

## **2.4 Rôles des PGPB dans l'amélioration de la tolérance au stress**

Parmi les rôles des micro-organismes promoteurs de croissance végétale (PGPB), l'amélioration de la nutrition minérale des plantes occupe une place centrale, notamment pour l'absorption de l'azote (N), du phosphore (P), du potassium (K), du fer (Fe) et du silicate (Si). Cette optimisation de l'acquisition de N, P et K, en particulier au niveau des pousses, contribue à réduire l'accumulation de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{2+}$ , un processus déterminant pour les plantes croissant dans des sols salins ou arides (Pii et al., 2015). Plusieurs études suggèrent que l'utilisation de PGPB constitue une alternative prometteuse pour atténuer les effets de la salinité sur les plantes, renforçant ainsi l'importance croissante du rôle des microbes dans la gestion des stress abiotiques (Yao et al., 2010).

Les PGPB améliorent la tolérance des plantes au sel par différents mécanismes :

- Induction du système antioxydant ;
- Maintien de l'équilibre hydrique et amélioration de la biodisponibilité des nutriments (P et K), chélation du Fe et fixation de l'azote atmosphérique ;

- Absorption sélective du  $K^+$  et exclusion du  $Na^+$ , permettant de maintenir un rapport  $K^+/Na^+$  élevé ;
- Production d'exopolysaccharides (EPS) favorisant la formation de biofilms protecteurs et réduisant la toxicité du  $Na^+$  ;
- Régulation des niveaux d'hormones végétales ;
- Augmentation des substances osmoprotectrices (Santoyo et al., 2016 ; Timmusk et al., 2014).

Au-delà de la tolérance à la salinité, certains PGPB confèrent également aux plantes une résistance accrue à d'autres stress abiotiques tels que la sécheresse, le froid, la toxicité métallique et les températures élevées. Au cours de la dernière décennie, plusieurs genres bactériens ont été identifiés comme bénéfiques dans ce contexte, notamment *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Variovorax* et *Enterobacter* (Grover et al., 2003).

## **2.5 Application des PGPB dans la restauration des sols salins**

Les PGPB représentent une stratégie réaliste pour préserver le rendement des cultures même en conditions de stress salin, grâce à leur effet positif sur la fertilité du sol. En situation de stress environnemental, ces bactéries modulent leurs activités en interagissant avec les mécanismes de tolérance des plantes (Gamalero et al., 2020).

Un effet essentiel de cette interaction plante-bactérie est l'apport supplémentaire d'azote sous forme d'ammoniac. Bien que les mécanismes exacts de ce processus soient encore peu connus, des preuves suggèrent que les PGPB renforcent la tolérance des plantes au sel en modulant l'état hormonal endogène. Leur utilisation permet d'améliorer la fertilité du sol, d'optimiser l'absorption des nutriments, d'exprimer des traits physiologiques bénéfiques pour les plantes et de réduire les maladies transmises par le sol (Esitken et al., 2010 ; Hardoim et al., 2008).

L'inoculation de PGPB accroît la tolérance des plantes au sel par divers processus, notamment :

- la fixation de l'azote,
- la modulation des hormones végétales (auxines, cytokinines, éthylène, gibbérellines),

- la solubilisation du phosphate, du potassium et du silicate,
- la synthèse de métabolites secondaires,
- l'activité antibiose contre les pathogènes du sol,
- et l'amélioration de la photosynthèse (Rajini et al., 2020).

# 1 Isolement de bactéries telluriques, étude de leurs propriétés d'intérêt agricole et évaluation de l'impact de la salinité sur la distribution de ces propriétés

## 1.1 Échantillonnage

Dans le cadre de la recherche de bactéries halotolérantes fixatrices d'azote et capables de solubiliser le phosphate, le potassium et le silicate, 26 échantillons de sol ont été collectés entre avril 2017 et mai 2018. Les prélèvements ont été réalisés de manière aseptique dans des sites agricoles et non agricoles répartis sur 20 wilayas algériennes : Adrar, Aghouat, Batna, Béchar, Béjaïa, Biskra, Bordj Bou-Argeridj, Bordj Badji Mokhtar, Bouira, Bou Saâda, Djelfa, El Menia, Ghardaïa, Illizi, M'Sila, Ouargla, Oued Souf, Tamanrasset, Touggourt et Tindouf.

Une quantité de 500 g de sol a été prélevée sur chaque site à l'aide de carottiers métalliques stériles, à une profondeur comprise entre 10 et 30 cm. Avant l'échantillonnage, la surface du sol a été désinfectée et retirée à l'éthanol (70 %). Il convient de noter que les 26 sites se distinguent par leur éloignement variable de la Méditerranée, leur altitude et leurs conditions climatiques spécifiques. Les échantillons ont été placés dans des sacs stériles et transportés au laboratoire dans des glacières.

**Tableau 3. Localisation géographique des échantillons de sol**

Échantillon	Wilaya	Localisation géographique
S001	Béjaïa	36°40'51.7"N 4°52'32.9"E
S002	Bordj Bou-Argeridj	36°02'24.4"N 4°45'20.1"E
S003	Bouira	36°24'36.0"N 3°48'22.6"E
S004	Bouira	36°24'36.0"N 3°48'35.3"E
S005	Aghouat	33°46'37.5"N 2°52'36.7"E
S006	Batna	35°45'33.9"N 6°25'05.1"E
S007	M'Sila	35°47'09.8"N 4°33'24.1"E
S008	Ghardaïa	32°32'58.5"N 3°37'31.7"E

S009	Béjaïa (Feraoun)	36°33'37.4"N 4°50'59.3"E
S010	El Menia	30°34'30.5"N 2°53'53.9"E
S011	Djelfa	34°41'37.8"N 3°14'19.1"E
S012	Béchar	30°07'19.0"N 2°10'13.4"W
S013	Adrar	27°49'28.7"N 0°17'08.0"W
S014	Ghardaïa	32°15'21.9"N 3°38'01.6"E
S015	Ghardaïa	32°16'39.5"N 3°46'15.2"E
S016	Illizi (Aïn Amenas)	28°02'41.9"N 9°33'04.6"E
S017	Tamanrasset	27°18'51.3"N 2°31'09.7"E
S018	Bordj Badji Mokhtar	21°18'55.6"N 0°58'19.8"E
S019	Ouargla	30°58'42.3"N 5°44'45.1"E
S020	Tamanrasset	22°46'38.1"N 5°32'33.0"E
S021	Ouargla	32°07'59.8"N 5°18'38.4"E
S022	Oued Souf	33°25'00.2"N 6°52'47.4"E
S023	Biskra	34°51'20.3"N 5°48'04.7"E
S024	Bou Saâda	35°13'24.6"N 4°13'39.7"E
S025	Touggourt	33°11'11.4"N 6°03'52.2"E
S026	Tindouf	27°41'14.1"N 8°09'14.4"W

## 1.2 Propriétés physiques et chimiques des échantillons de sol

### 1.2.1 pH

L'acidité d'un sol est déterminée par sa teneur en ions  $H^+$ . Les valeurs de pH-eau (acidité active) et de pH-KCl (acidité de réserve) des échantillons ont été déterminées selon le protocole suivant : 10 g de sol tamisé (< 2 mm) et séché à 40 °C sont placés dans un bécher, puis mélangés à 25 mL d'eau distillée (pH-eau) ou à 25 mL d'une solution de KCl 1 N (pH-

KCl). Après agitation pendant une minute et décantation d'une heure, la mesure du pH est effectuée à l'aide d'un pH-mètre (Hanna Instruments HI 2210) (Rouiller et al., 1994).

### 1.2.2 Conductivité électrique

La conductivité électrique (CE) d'un sol constitue un indicateur direct de sa salinité : plus le sol est salé, plus sa conductivité est élevée. Pour chaque échantillon, 10 g de sol ont été ajoutés à 50 mL d'eau distillée. Après agitation de 30 minutes et décantation, la CE est mesurée dans le surnageant à l'aide d'un conductimètre (Hanna Instruments HI 98129) (Hardie & Doyle, 2012).

### 1.2.3 Contenu en eau gravimétrique

Dans les analyses microbiologiques, l'humidité du sol est souvent exprimée sous forme de contenu en eau gravimétrique ( $\theta_g$ ), correspondant au rapport entre la masse du sol humide et celle du sol sec. Pour sa détermination, une masse connue de chaque échantillon a été séchée en étuve entre 165 et 175 °C, puis pesée à intervalles réguliers jusqu'à stabilisation du poids (Pepper & Gerba, 2004). La formule utilisée est la suivante :

$$\theta_g = \frac{m - d}{d}$$

où :

- $\theta_g$  : contenu en eau gravimétrique,
- m : masse initiale du sol humide,
- d : masse du sol après séchage.

### 1.2.4 Matière organique totale

Un gramme d'échantillon a été placé dans un bécher de 250 mL contenant 10 mL d'eau distillée et 10 mL de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %). Le bécher a été recouvert d'une feuille d'aluminium, puis placé dans un bain de vapeur jusqu'à l'arrêt de la réaction (disparition des bulles). Le mélange a été occasionnellement agité pour favoriser le contact de la matière organique avec la solution. Après digestion ( $\approx$  1 h), l'échantillon a été séché à 105 °C et pesé à plusieurs reprises jusqu'à stabilisation du poids (Huang et al., 2009).

La proportion de matière organique totale (MOT) a été calculée selon la formule :

$$MOT(\%) = \frac{P_{sec}}{P_{original}}$$

où :

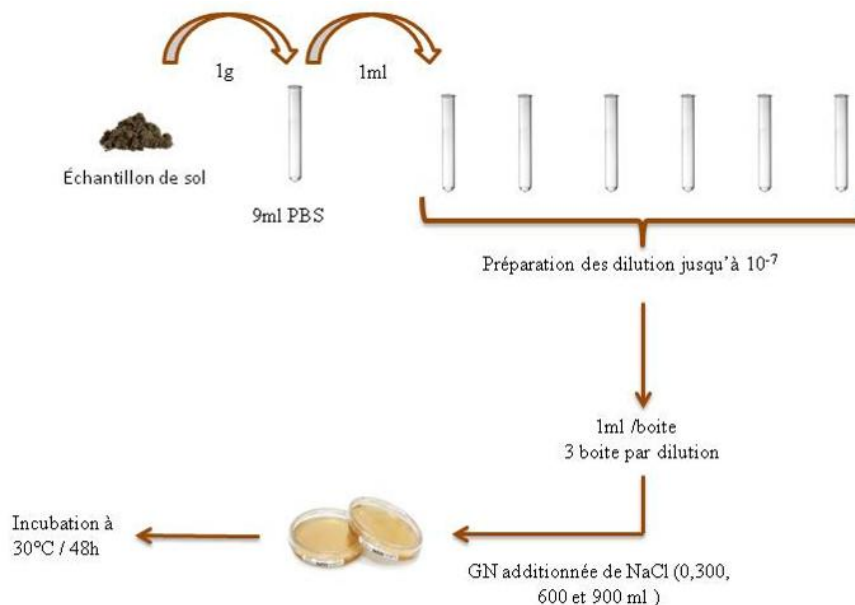
- MOT : matière organique totale,
- $P_{\text{sec}}$  : masse de l'échantillon avant traitement,
- $P_{\text{original}}$  : masse de l'échantillon après traitement et séchage.

### 1.3 Isolement et purification des bactéries telluriques

Pour chaque échantillon, 1 g de sol a été suspendu dans 9 mL d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), préparée avec : NaCl (8 g), KCl (0,2 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,24 g) et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,44 g) pour 1 L d'eau distillée. Ce mélange correspond à la première dilution ( $10^{-1}$ ). À partir de celle-ci, des dilutions décimales successives ont été préparées jusqu'à  $10^{-7}$ .

Un millilitre de chaque dilution a étéensemencé par ensemencement en surface sur gélose nutritive (GN) supplémentée avec différentes concentrations de NaCl (300, 600 et 900 mM). Après incubation à 30 °C pendant 48 h, dix colonies morphologiquement distinctes ont été sélectionnées sur chacun des milieux salins. Celles-ci ont fait l'objet de repiquages successifs sur GN jusqu'à obtention de cultures pures.

Au terme de ce processus, un total de 260 isolats bactériens ont été obtenus à partir des 26 échantillons de sol.



**Figure 4. Schéma illustratif de la procédure d'isolement bactérien à partir des échantillons du sol**

## 1.4 Halotolérance des isolats sélectionnés

L'halotolérance des 260 isolats bactériens a été évaluée sur milieu GMM (Glucose Minimal Medium), dont la composition est la suivante (par litre) : glucose (5 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2,4 g),  $\text{NaCl}$  (0,5 g) et  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g), ajusté à un pH de  $7,0 \pm 0,2$ . Ce milieu a été supplémenté avec différentes concentrations croissantes de  $\text{NaCl}$  : 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 et 1600 mM.

Chaque test a été réalisé en inoculant 20  $\mu\text{L}$  de culture bactérienne ( $\text{DO}_{600} = 0,2$ , mesurée avec un spectrophotomètre SPECTRONIC 20 D) dans 2 mL de GMM contenant la concentration de  $\text{NaCl}$  testée. Un milieu non inoculé a servi de témoin négatif. L'expérimentation a été conduite en trois répétitions indépendantes.

Après 48 heures d'incubation à 30 °C sous agitation (100 tr/min), la croissance bactérienne a été estimée en mesurant la densité optique à 600 nm (Tarrand et al., 1978 ; Hartmann et al., 1991).

Sur l'ensemble des 260 isolats, 89 ont été éliminés, leur tolérance au  $\text{NaCl}$  étant inférieure à 300 mM.

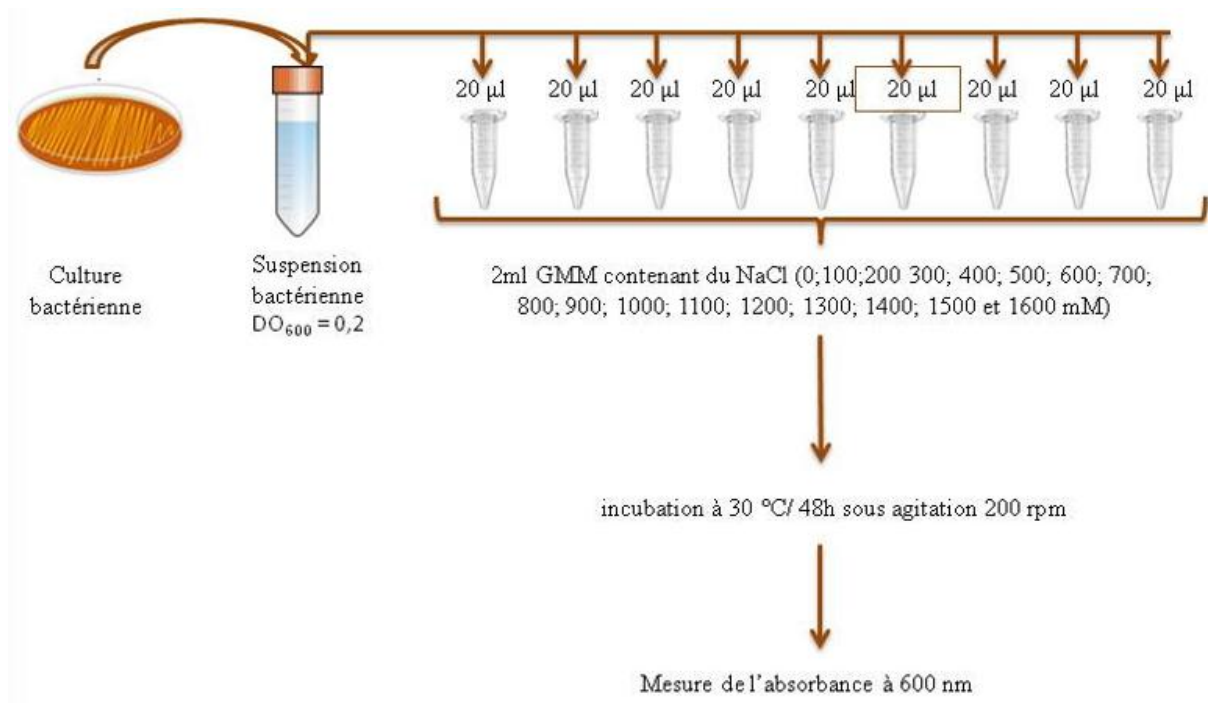


Figure 5. Schéma illustratif de test de halotolérance des isolats sur milieu GMM

## **2 Recherche de propriétés d'intérêt agricole et étude de l'impact de la salinité sur ces propriétés**

Les isolats bactériens sélectionnés ont été évalués pour leur capacité à produire la phytohormone acide indole-3-acétique (AIA) ainsi que certaines enzymes d'intérêt agronomique, et ce, sous conditions de stress salin. Dans l'ensemble des tests de mise en évidence de ces activités, la souche *Serratia sp.* isolée par Tabli et al. (2018) a été utilisée comme témoin positif, à l'exception du test de l'amylase où elle a servi de témoin négatif.

### **2.1 Production de phytohormone (AIA)**

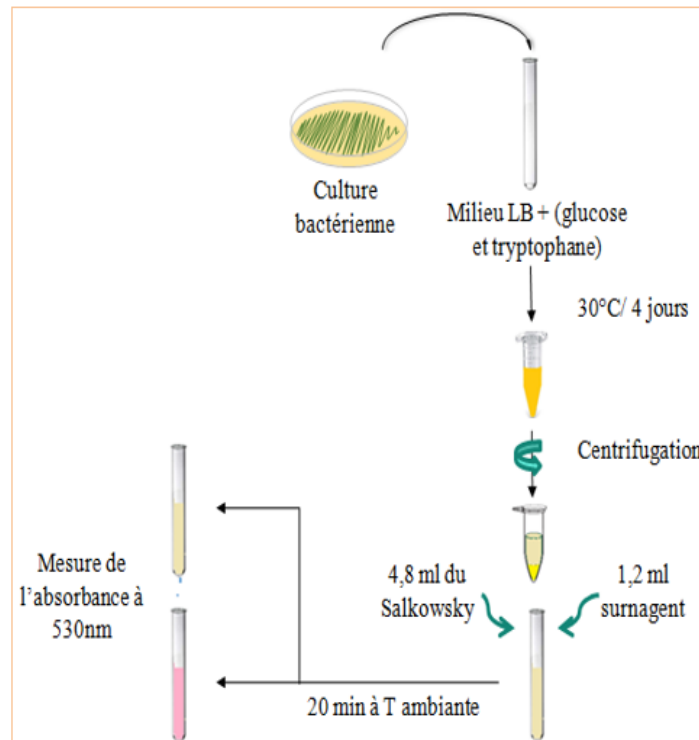
La production d'AIA par les isolats bactériens a été déterminée selon la méthode décrite par Bric et al. (1991).

La quantification a été réalisée sur milieu Luria-Bertani (LB) (voir annexe), supplémenté avec 0,5 % de glucose et 0,5 mg·mL<sup>-1</sup> de tryptophane, stérilisés par filtration à travers une membrane millipore (0,22 µm). Le milieu a étéensemencé avec les isolats testés puis incubé à 30 °C pendant 96 h.

Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 10 000 tr·min<sup>-1</sup> pendant 20 minutes, puis 1,2 mL du surnageant a été prélevé et mélangé à 4,8 mL du réactif de Salkowski (préparé à partir de 150 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98 %, 250 mL d'H<sub>2</sub>O distillée et 7,5 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M). Le mélange a été incubé à température ambiante, à l'obscurité.

Après 20 minutes, l'apparition d'une coloration rose, indicatrice de la production d'AIA, a été mesurée au spectrophotomètre à 530 nm (SHIMADZU UV-1800). Chaque test a été réalisé en trois répétitions indépendantes.

La concentration d'AIA a été déterminée par extrapolation sur une courbe standard établie à l'aide d'AIA pur (BIOCHEM Chemopharma), exprimée en µg·mL<sup>-1</sup>.



**Figure 6. Test de production d'Acide Indole 3-Acétique**

## 2.2 Production d'enzymes d'intérêt agricole

Certaines enzymes produites par les bactéries du sol, telles que la cellulase, la chitinase ou encore la protéase, jouent un rôle fondamental dans la dégradation de la matière organique. Elles participent ainsi à l'amélioration de la fertilité des sols et à la libération d'éléments minéraux essentiels pour la nutrition des plantes.

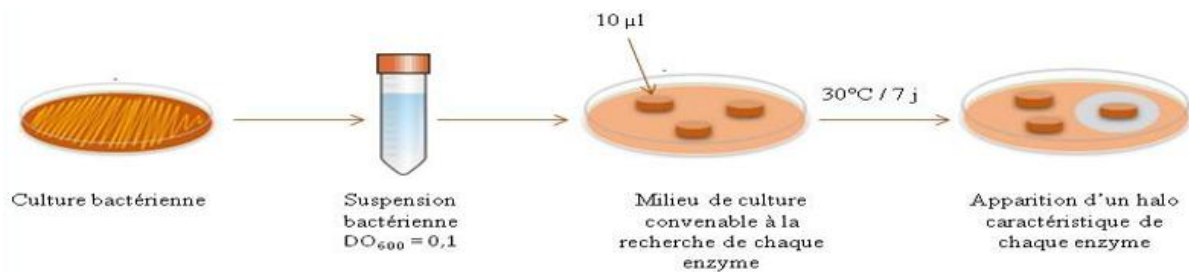
La capacité des isolats bactériens sélectionnés à produire des enzymes d'intérêt agricole a été évaluée en déposant trois spots de 10  $\mu$ l d'une culture bactérienne (âgée de 18 h, DO = 0,1) à la surface des milieux sélectifs adaptés à la mise en évidence de chaque enzyme. Ces milieux ont été préparés en l'absence et en présence de différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM), afin d'étudier l'effet du stress salin sur l'activité enzymatique.

L'incubation a été réalisée à 30 °C pendant une durée variant de 48 h à 7 jours, en fonction du protocole spécifique à chaque enzyme. Tous les tests ont été effectués en duplicata et en parallèle avec la souche *Serratia* sp. (Tabli et al., 2018) utilisée comme témoin positif, sauf dans le cas du test de l'amylase où elle constitue un témoin négatif.

### 2.2.1 Cellulase

L'activité cellulasique a été évaluée sur le milieu de Carder (1986) composé (g/L) de :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3),  $\text{NaCl}$  (0,5),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1), extrait de levure (3), CMC (carboxyméthyl cellulose) (7) et agar (15), ajusté à un pH de  $7,2 \pm 0,2$ . Les boîtes de Petriensemencées ont été incubées à  $30^\circ\text{C}$  pendant 7 jours (Carrim et al., 2006).

Après incubation, une solution de rouge Congo (1%) a été appliquée à la surface des colonies. Vingt minutes plus tard, les boîtes ont été rincées avec une solution de  $\text{NaCl}$  1 M puis laissées au repos pendant une nuit. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique la dégradation de la CMC, traduisant ainsi la production d'une cellulase extracellulaire.



**Figure 7. Schéma récapitulative de la méthode des disques d'agar (original)**

### 2.2.2 Chitinase

L'activité chitinasique a été recherchée sur le milieu de Kopečný et al. (1996), dont la composition (g/L) est : chitine colloïdale (0,8),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2,7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,3),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,7),  $\text{NaCl}$  (0,5),  $\text{KCl}$  (0,5), extrait de levure (0,13) et agar (15), ajusté à un pH de  $7,2 \pm 0,02$ .

La chitine colloïdale a été préparée en suspendant 1 g de chitine dans 9 ml de  $\text{HCl}$  concentré (37 %), la solution étant maintenue sous agitation pendant 2 h jusqu'à dissolution (coloration brune). Après dilution dans 250 ml d'eau distillée, la suspension a été laissée au repos une nuit, puis le culot a été lavé et décanté six fois à l'eau distillée. Enfin, la chitine a été filtrée à travers un tamis métallique de 0,5 mm, et l'effluent stocké à  $4^\circ\text{C}$  dans une bouteille opaque.

Les boîtesensemencées ont été incubées à  $30^\circ\text{C}$  pendant 7 jours. La production de chitinase extracellulaire a été mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

### **2.2.3 Amylase**

L'activité amylasique a été testée sur un milieu à base d'amidon décrit par Vinoth et al. (2009), composé (g/L) de : KNO<sub>3</sub> (0,5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub> (0,2), CaCl<sub>2</sub> (0,1), FeCl<sub>3</sub> (0,001), amidon soluble (10) et agar (15), pH ajusté à  $7,2 \pm 0,02$ .

Après incubation à 30 °C pendant 48 h, les boîtes ont été inondées avec une solution de lugol (1 g d'iode cristallin + 2 g de KI dans 300 ml d'eau distillée). Après quelques minutes de contact puis rinçage à l'eau distillée, la dégradation de l'amidon a été révélée par l'apparition de zones claires autour des colonies, tandis que les zones non hydrolysées prenaient une coloration bleu-noirâtre.

### **2.2.4 Protéase**

L'activité protéasique a été évaluée selon la méthode de Kavitha et al. (2013), sur un milieu contenant (g/L) : caséine pancréatique (5), extrait de levure (2,5), glucose (1) et agar (15), ajusté à pH 7.

Le milieu a été autoclavé (120 °C, 20 min), puis additionné de 100 ml de solution de lait écrémé stérilisée séparément (120 °C, 10 min). Après ensemencement, les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 48 h. La présence d'une activité protéasique a été mise en évidence par la formation d'un halo transparent autour des colonies.

### **2.2.5 Estérase**

L'activité estérasique a été recherchée sur le milieu de Sierra (1957), composé (g/L) de : peptone (10), NaCl (5), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,1), Tween 80 (1 %, v/v) et agar (18), ajusté à pH 7,4.

Après ensemencement, les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 48 h. La production d'estérase a été confirmée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

### **2.2.6 Lipase**

L'activité lipasique a été évaluée selon le même protocole que celui de l'estérase, à l'exception du Tween 80 remplacé par du Tween 20 dans le milieu (Sierra, 1957 ; Carrim et al., 2006). La présence d'un halo clair autour des colonies a été considérée comme un résultat positif.

### **2.2.7 Uréase**

L'activité uréasique a été détectée sur le milieu de Christensen (1946), dont la composition (g/950 ml) est : peptone (1), glucose (1), NaCl (5), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8), rouge de phénol (0,012) et agar (15), ajusté à un pH de 6,8.

Après autoclavage, 50 ml d'une solution d'urée 40 % stérilisée par filtration (0,22 µm) ont été ajoutés au milieu. Les boîtesensemencées et incubées ont révélé l'activité uréasique par la formation d'un halo rose autour des colonies.

## **3 Effet de la salinité sur la fixation d'azote, la solubilisation du phosphate, du potassium et du silicate**

### **3.1 Effets sur la fixation de l'azote**

La fixation de l'azote est le processus biologique par lequel l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) est converti en ammoniac ( $NH_3$ ). La capacité des isolats à fixer l'azote a été évaluée sur le milieu NFB, préparé par litre d'eau distillée avec les constituants suivants : acide malique (2,5 g),  $K_2HPO_4$  (0,5 g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,2 g), NaCl (0,1 g),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,002 g), 2 mL d'une solution de micronutriments [ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,4 g),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,12 g),  $H_3BO_3$  (1,4 g),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (1 g),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (1,5 g), complétés à 1 000 mL d'eau distillée], 2 mL de bleu de bromothymol (0,5 % dans KOH 0,2 N), 4 mL de  $Fe^{3+}$ -EDTA (1,64 %) et 15 g d'agar. Le pH du milieu a été ajusté à 6,8. Après autoclavage à 121 °C pendant 15 min, 1 mL d'une solution vitaminique [biotine (10 mg), pyridoxol-HCl (20 mg) dissous dans 100 mL d'eau distillée] a été ajouté.

Le milieu a été préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Un volume de 5  $\mu$ L de chaque suspension bactérienne a été ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu, puis incubées à 30 °C pendant trois jours. La capacité d'un isolat à fixer l'azote a été indiquée par la croissance de colonies sur le milieu (Hartmann, 2006). Chaque expérience a été réalisée en triplicata.

### **3.2 Effets sur la solubilisation du phosphate inorganique**

#### **3.2.1 Sur milieu solide**

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate inorganique [ $Ca_3(PO_4)_2$ ] a été testée sur le milieu de Pikovskaïa, composé par litre d'eau distillée de : glucose (10 g),  $Ca_3(PO_4)_2$  (5 g),  $(NH_4)_2SO_4$  (0,5 g), NaCl (0,2 g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,1 g), KCl (0,2 g), extrait de levure (0,5 g),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0,002 g),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,002 g) et agar (15 g).

Le milieu a été préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Un volume de 5  $\mu$ L de chaque suspension bactérienne a été ensemencé dans des boîtes de Pétri (trois par isolat) et incubé à 28 °C. La solubilisation du phosphate a été indiquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Sagervanshi et al., 2012).

L'indice de solubilisation (IS) a été calculé aux 2<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup>, 15<sup>e</sup> et 21<sup>e</sup> jours d'incubation selon la formule d'Edi-Premono (1996) :

$$IS = \frac{\text{diamètre (colonie + halo)}}{\text{diamètre de la colonie}}$$

### 3.2.2 Quantification en milieu liquide

L'efficacité de solubilisation du phosphate a été estimée dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de bouillon PVK préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Le milieu a été inoculé avec 200  $\mu\text{L}$  ( $6 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de suspension bactérienne et incubé à 28 °C sous agitation (180 tr/min) pendant 2, 7, 15 et 21 jours. Les témoins consistaient en des bouillons stériles non inoculés. Chaque traitement a été répété trois fois.

Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 10 000 tr/min pendant 20 min. Le pH des surnageants a été mesuré, puis ces derniers ont servi à l'estimation du phosphate soluble à l'aide des réactifs suivants :

- **Solution 1 : acide chloromolybdique** – 1,5 g de molybdate d'ammonium dissous dans 40 mL d'eau chaude (45 °C), additionnés de 34,2 mL de HCl (12 N), puis complétés à 100 mL avec de l'eau distillée.
- **Solution 2 : acide chlorostannique** – 2,5 g de  $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dissous dans 10 mL de HCl (12 N), complétés à 100 mL avec de l'eau distillée.

Pour l'analyse, 1 mL de surnageant a été mélangé avec 4,5 mL de solution (1) et 25  $\mu\text{L}$  de solution (2). Après incubation à température ambiante ( $23 \pm 2$  °C) pendant 15 min, la densité optique a été mesurée à 600 nm. La concentration en phosphate soluble a été déterminée à partir d'une courbe standard préparée avec différentes concentrations de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 à 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (Kumar et al., 2013).

## 3.3 Effets sur la production de phytase

### 3.3.1 Sur milieu solide

La capacité des isolats à minéraliser le phytate par production de phytase a été évaluée sur des milieux contenant différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Un volume de 5  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne a été inoculé sur un milieu solide composé, par

litre d'eau distillée, de : glucose (15 g), phytate de sodium (1 g),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (2 g), KCl (0,5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,003 g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,003 g) et agar (20 g). Le pH a été ajusté à 7,5.

Le phytate de sodium a servi de substrat pour la phytase, permettant la libération de phosphore inorganique. Après 48 h d'incubation à 28 °C, des halos clairs ont été observés autour des colonies, confirmant la minéralisation du phytate. L'indice de solubilisation (IS) a été mesuré aux 2<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours d'incubation selon la formule d'Edi-Premono (1996) (Jha et al., 2009).

### 3.3.2 Analyse quantitative

L'évaluation quantitative de la production de phytase a été réalisée en inoculant 200  $\mu\text{L}$  ( $6 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de suspension bactérienne dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu liquide constitué, par litre d'eau distillée, de : phytate de sodium (1 g), peptone (10 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2 g), KCl (0,5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,003 g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,003 g). Le milieu a été ajusté à pH 7,5 et supplémenté avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM).

Après incubation à 28 °C sous agitation (200 tr/min) pendant 2, 7 et 10 jours, les cultures ont été centrifugées à  $10\,000 \times g$  pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont été utilisés pour l'estimation de l'activité extracellulaire de la phytase (Saiyad et al., 2015).

L'activité enzymatique a été mesurée en déterminant la quantité de phosphore inorganique libéré :

- **Mélange 1** : 0,2 mL de surnageant incubé avec 0,5 g de phytate de sodium dissous dans 100 mL de tampon acétate de sodium (0,2 M, pH 5,5), à 28 °C pendant 30 min. La réaction a été stoppée par addition de 1,02 mL d'acide trichloroacétique (15 %).
- **Mélange 2** : 100 mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 M), 100 mL d'acide ascorbique (10 %) et 4 mL de molybdate d'ammonium (2,5 %).

Pour l'analyse, 100  $\mu\text{L}$  de mélange (1) ont été ajoutés à 900  $\mu\text{L}$  de mélange (2), incubés à 28 °C pendant 20 min, puis l'absorbance a été mesurée à 700 nm (Saiyad et al., 2015).

## **3.4 Effets sur la solubilisation du potassium**

### **3.4.1 Sur milieu solide**

La solubilisation du potassium a été testée sur le milieu d'Aleksandrov modifié (Hu et al., 2006), composé par litre d'eau distillée de : glucose (5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g),  $\text{CaCO}_3$  (0,1 g),  $\text{FeCl}_3$  (0,006 g),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (2 g),  $\text{K}_2\text{O}_5\text{Si}_2$  (2 g) et agar (20 g).

Le milieu a été préparé à différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Un volume de 5  $\mu\text{L}$  de chaque suspension bactérienne a été ensemencé dans trois boîtes de Pétri par isolat. Après une semaine d'incubation à 28 °C, les colonies présentant une zone claire ont été retenues. Le diamètre de la zone de solubilisation a été mesuré (en mm) (Hu et al., 2006).

### **3.4.2 En milieu liquide**

Les isolats actifs sur milieu solide ont été cultivés dans 25 mL de bouillon d'Aleksandrov, préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM) et ajusté à pH 7,2. Chaque flacon a été inoculé avec 1 mL de culture bactérienne et incubé à 28 °C pendant une semaine. Les témoins consistaient en bouillons stériles non inoculés. Chaque expérience a été réalisée en triplicata (Sugumaran et Janarthanam, 2007).

Après incubation, les cultures ont été centrifugées à  $10\,000 \times g$  pendant 20 min. Le pH des surnageants a été déterminé, puis 1 mL de surnageant a été dilué dans 49 mL d'eau distillée. La teneur en potassium soluble a été mesurée par photométrie de flamme. La quantification a été effectuée à l'aide d'une courbe standard obtenue avec différentes concentrations de KCl (0–10 ppm) (Sugumaran et Janarthanam, 2007).

## **3.5 Effets sur la solubilisation du silicate**

### **3.5.1 Évaluation qualitative**

La capacité des isolats à solubiliser le silicate a été testée sur le milieu d'Aleksandrov, préparé par litre d'eau distillée avec : glucose (10 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (1,0 g), KCl (0,2 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,1 g), kaolinite [ $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ] (2 g) et agar (15 g), pH ajusté à 7,2.

Le milieu a été préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Après ensemencement avec 5  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne, les boîtes ont été incubées

à 28 °C pendant une semaine. La solubilisation du silicate a été indiquée par un halo clair autour des colonies. L'indice de solubilisation a été calculé selon Edi-Premono (1996).

### 3.5.2 Évaluation quantitative

L'efficacité de solubilisation a été mesurée en milieu liquide (bouillon d'Aleksandrov modifié), préparé avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Chaque Erlenmeyer de 250 mL contenait 50 mL de milieu inoculé avec 200 µL ( $6 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>) de suspension bactérienne. L'incubation a été réalisée à 28 °C sous agitation (180 tr/min) pendant une semaine. Les bouillons stériles non inoculés servaient de témoins.

Après incubation, les cultures ont été centrifugées à  $10\,000 \times g$  pendant 20 min. Le pH des surnageants a été mesuré, puis la teneur en SiO<sub>2</sub> a été estimée en utilisant les solutions suivantes :

- **Solution acide de molybdate d'ammonium** : 89 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O dissous dans 800 mL d'eau distillée, additionnés de 62 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %) dilués dans 80 mL d'eau froide, puis complétés à 1 L.
- **Solution de tartrate de sodium** : 280 g·L<sup>-1</sup>.
- **Solution réductrice** : 2,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> et 14 g de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dissous dans 100 mL d'eau distillée, laissée au repos une semaine.

Pour l'analyse, 20 mL de surnageant ont été transférés dans une fiole jaugée de 100 mL, complétés avec 60 mL d'eau distillée. Après ajout successif de 2,5 mL de solution acide de molybdate (repos 10 min), 2,5 mL de tartrate (repos 5 min) et 2 mL de solution réductrice, le volume final a été ajusté à 100 mL. Le mélange a été chauffé au bain-marie (60 °C, 30 min), puis refroidi sur glace. L'absorbance a été mesurée à 820 nm.

La concentration en SiO<sub>2</sub> soluble a été déterminée à partir d'une courbe standard préparée avec différentes concentrations (100–600 ppm).

## **4 Effet d'une souche PGPB sur la germination, la croissance des plantules de blé (*Triticum aestivum*) et la restauration du phosphate sous stress salin induit**

### **4.1 Identification moléculaire**

L'identification moléculaire d'une souche bactérienne a été réalisée au Centre d'Études sur l'Environnement et la Mer (CESAM), Faculté des Sciences, Université de Lisbonne. La souche sélectionnée a été identifiée sur la base de la séquence de son gène codant pour l'ARN ribosomique 16S.

#### **4.1.1 Extraction de l'ADN total**

L'ADN total bactérien a été extrait par chauffage dans un tampon Tris-EDTA (TE) [1 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4]. Plusieurs colonies d'une culture pure ont été transférées dans un tube Eppendorf contenant 180 µL de tampon TE stérile. La suspension a été chauffée à 100 °C dans un bain-marie pendant 10 min, puis rapidement refroidie sur glace pendant 10 min, afin de provoquer une lyse cellulaire par choc thermique.

Après centrifugation (12 000 tr/min, 10 min, 4 °C), le surnageant a été transféré stérilement dans un nouveau tube Eppendorf et traité avec 0,2 µL d'ARNase. Les échantillons ont été conservés à 4 °C pendant une nuit pour assurer la dégradation complète de l'ARN.

#### **4.1.2 Amplification du gène codant pour l'ARN 16S**

L'ADN total extrait a servi de matrice pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S à l'aide d'amorces universelles :

- **356F** : 5'-ACWCCTACGGGGGCWGC-3'
- **1064R** : 5'-AYCTCACGRCACGAGCTGAC-3'

Le mélange réactionnel (20 µL) contenait :

- 10 µL de MyTaq Red Mix 2× (Bioline, Paris, France),
- 1 µL de chaque amorce (10 µM),
- 1 µL d'ADN matrice,
- 7 µL d'eau ultrapure.

Le programme de PCR comprenait :

- une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min,
- 35 cycles [94 °C, 10 s (dénaturation) ; 55 °C, 10 s (annelage) ; 72 °C, 1 min (élongation)],
- une élongation finale à 72 °C pendant 7 min.

La Taq polymérase, possédant une activité terminale transférase, ajoutait une désoxyadénosine en 3' des fragments amplifiés. La PCR a été réalisée dans un thermocycleur TPersonal Cycler (Whatman Biometra, Göttingen, Allemagne).

Des témoins positifs (ADN d'une souche de référence) et négatifs (sans ADN matrice) ont été inclus dans chaque série d'amplification.

### **4.1.3 Électrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,7 % coloré au bromure d'éthidium, en conditions de migration de 20 min à 100 V. Les fragments amplifiés ont ensuite été purifiés à l'aide du kit Zymoclean DNA Clean-up (Zymo Research, Irvine, CA, USA), conformément aux recommandations du fabricant.

### **4.1.4 Séquençage**

Le séquençage des fragments amplifiés a été réalisé par la méthode de Sanger. Les produits PCR purifiés ont d'abord été traités par une exonucléase I et une Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) afin d'éliminer les amorces et les dNTP libres.

La réaction de séquençage a été effectuée avec le kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), dans un mélange comprenant :

- la Taq polymérase,
- des dNTP,
- des ddNTP marqués par des fluorochromes (« Dye »),
- une amorce reverse (25 µM),
- un tampon (200 mM Tris-HCl, pH 9,0 ; 5 mM MgCl<sub>2</sub>),
- eau ultrapure.

Le programme du thermocycleur comprenait : 1 min à 96 °C, suivi de 25 cycles (96 °C, 10 s ; 50 °C, 5 s ; 60 °C, 4 min), puis un maintien à 4 °C.

L'ADN obtenu a été précipité par addition de 1  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et de 50  $\mu\text{L}$  d'éthanol 95 %. Après centrifugation (4 000 tr/min, 40 min), le culot a été lavé à l'éthanol 70 %, puis centrifugé de nouveau. Après séchage (centrifugation douce), le culot a été repris dans du formamide et analysé sur un séquenceur ABI Prism 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

### **4.1.5 Analyse phylogénétique**

Les séquences obtenues ont été comparées à celles disponibles dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

## **4.2 Préparation des cultures bactériennes**

Des suspensions bactériennes des souches à tester ont été préparées dans 5 mL de bouillon nutritif (BN) et incubées pendant 24 h à 30 °C. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 3 000 tr/min pendant 10 min. Les culots bactériens ont été lavés trois fois avec 5 mL d'une solution saline stérile ( $\text{NaCl}$ , 8,5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), puis remis en suspension dans la même solution, à une densité optique ajustée à  $\text{DO}_{600} = 0,8$ . Ces suspensions bactériennes ont été utilisées pour l'inoculation des graines de blé dans le test de germination.

## **4.3 Origine des graines et stérilisation de surface**

Les graines de blé (*Triticum aestivum*) ont été fournies par le Centre d'Écologie, d'Évolution et de Changements Environnementaux (CE3C), Faculté des Sciences, Université de Lisbonne. La stérilisation de surface a été réalisée selon la méthode décrite par Götz et al. (2006), en trois étapes :

1. Trempage des graines dans de l'éthanol à 70 % pendant 1 min sous agitation douce ;
2. Traitement dans une solution d'hypochlorite de sodium (12 % v/v) pendant 15 min ;
3. Rinçage par six lavages successifs à l'eau distillée stérile (15 min minimum au total) afin d'éliminer toute trace de chlore résiduel.

## 4.4 Inoculation des graines de blé par les souches sélectionnées

Les graines stériles ont été trempées pendant 1 h dans les suspensions bactériennes préparées, sous agitation douce à température ambiante. En parallèle, un lot de graines stériles a été immergé dans la solution saline stérile (NaCl, 8,5 g·L<sup>-1</sup>), servant de témoin négatif.

Les graines de blé ont été réparties en cinq groupes expérimentaux :

- **Graines a** : inoculées avec la souche S1 (N76)
- **Graines e** : non inoculées (témoin)

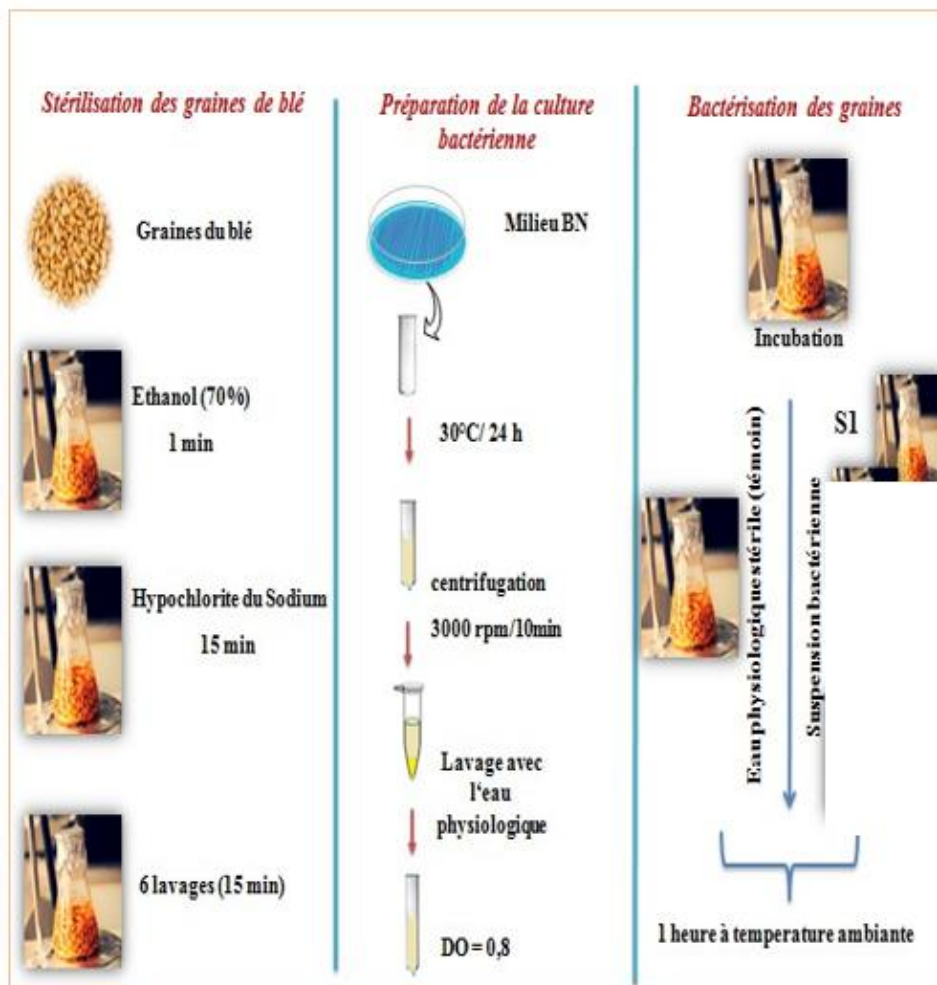


Figure 8. Illustration des étapes de préparation d'inoculum bactérien, de la stérilisation des graines de blé (*Triticum aestivum*) et leur inoculation

## 4.5 Protocole expérimental

Le protocole a été adapté de Ramados et al. (2013). Des disques de papier filtre standard, d'un diamètre équivalent à celui des boîtes de Pétri, ont été stérilisés dans un four

Pasteur à 180 °C pendant 15 min, puis placés par paire dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Dans chaque boîte, le papier filtre a été imbibé avec 2 mL d'une solution saline stérile (eau distillée stérile + NaCl) aux concentrations suivantes : 0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM.

Les graines inoculées avec les souches bactériennes ainsi que les graines témoins ont ensuite été placées dans les boîtes, à raison de 15 graines par boîte et par traitement salin. L'expérience a été conduite en triplicata, soit trois boîtes de Pétri par concentration de NaCl.

L'incubation a été réalisée à l'obscurité, à une température moyenne de 25 °C. Le nombre de graines germées a été relevé tous les deux jours jusqu'au 14<sup>e</sup> jour, après quoi aucune nouvelle germination n'a été observée. Une graine était considérée comme germée dès l'apparition de la radicule hors de la cuticule, avec une longueur minimale de 3 mm. Aucun arrosage supplémentaire n'a été nécessaire durant l'essai. À la fin de l'expérience, le pourcentage final de germination a été calculé.

#### **4.6 Facteurs favorisant la croissance des plantules de blé**

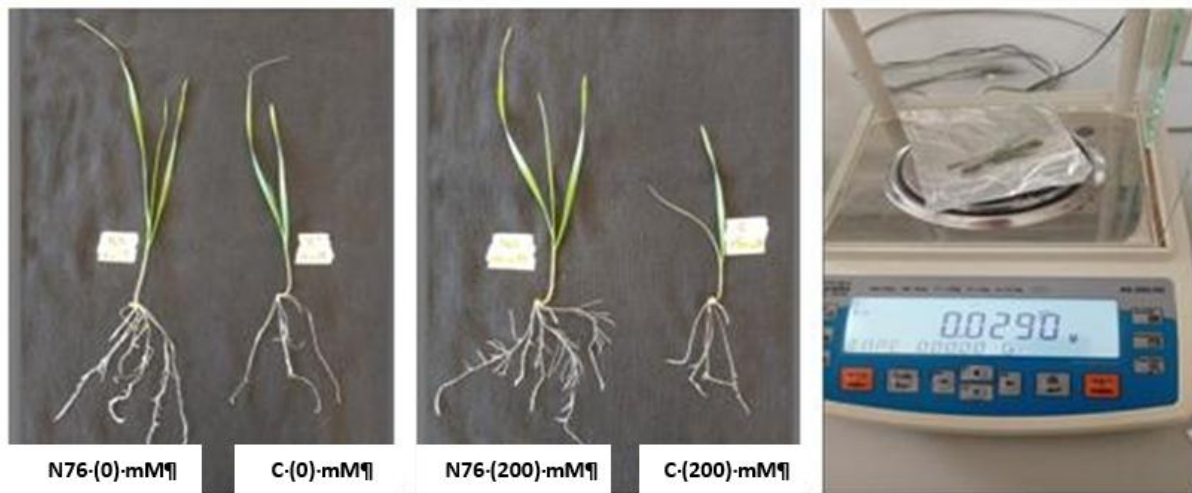
Le sol utilisé, caractérisé par une faible teneur en minéraux, a été fourni par le Centre d'Écologie, d'Évolution et de Changements Environnementaux (CE3C), Faculté des Sciences, Université de Lisbonne. Ce sol a été mélangé à de la vermiculite (50/50, v/v) puis stérilisé par autoclavage.

Les graines germées (inoculées et témoins) ont été semées dans des pots (7 × 12 cm) contenant le mélange sol-vermiculite, à raison de deux graines par pot, à une profondeur d'environ 1 cm. Les pots ont été irrigués tous les trois jours avec 20 mL de solution saline stérile (NaCl : 0, 100, 200 et 300 mM), en cohérence avec les traitements appliqués lors de la phase de germination.

Chaque traitement a été répété six fois (six pots). Les pots ont été placés dans une chambre de croissance programmée avec une photopériode de 16 h lumière / 8 h obscurité, une température de 25/20 °C (jour/nuit) et une humidité relative de 70 %/50 % (jour/nuit).

Après 15 jours, les paramètres de croissance ont été mesurés : longueur des pousses et des racines, poids frais et poids sec des pousses et racines. De plus, la teneur en phosphore et en potassium solubles du sol ayant hébergé les plantules a été quantifiée. L'expérience a été

arrêtée au 15<sup>e</sup> jour, car au-delà de cette période les plantules témoins présentaient des dommages irréversibles.



**Figure 9.** Quelques étapes d'évaluation des paramètres de la croissance des plantules du blé

#### **4.7 Effet des souches sur la restauration du phosphate**

La capacité des isolats à libérer le phosphate dans le sol a été déterminée en mesurant les quantités de phosphate soluble avant et après chaque traitement (bactérien et NaCl). L'azote, le potassium et le silicate n'ont pas été quantifiés en raison du manque de certains réactifs chimiques.

Afin de déterminer la quantité de phosphate dans le sol, plusieurs solutions ont été préparées :

- **Solution d'extraction** : 42 g de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) dissous dans 1000 ml d'eau distillée, pH ajusté à 8,5.
- **Acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )** : 60 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N ajoutés à 2000 ml d'eau distillée.
- **Solution de molybdate d'ammonium à 1 %** :
  - Dissoudre 10 g de molybdate d'ammonium dans 250 ml d'eau distillée (45 °C) et laisser refroidir (solution 1).
  - Dans un second récipient, introduire 112 ml d'acide sulfurique dans 500 ml d'eau distillée et laisser refroidir (solution 2).

- Sous agitation, mélanger la solution 1 et la solution 2, puis ajuster le volume final à 1000 ml avec de l'eau distillée.
- **Solution de chlorure stanneux (SnCl<sub>2</sub>) 0,1 M** : dissoudre 2,5 g de SnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O dans 100 ml de HCl 12 N. Prélever 1 ml de cette solution et le diluer dans 9 ml d'eau distillée. Conserver à 5 °C.

Dans des fioles de 50 ml, 1 g de sol a été mis en suspension dans 20 ml de la solution d'extraction. Après agitation à 200 rpm pendant 30 min, la solution a été filtrée à travers du papier Whatman. Dix ml de filtrat ont été transférés dans un bécher de 50 ml et complétés avec 5 ml d'acide sulfurique. Le mélange a été maintenu sous agitation (200 rpm) pendant 1 h.

Ensuite, 10 ml d'eau distillée, 5 ml de solution de molybdate d'ammonium et 250 µl de solution de chlorure stanneux ont été ajoutés. Le volume a été ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 660 nm. La concentration en phosphate soluble a été déterminée à partir d'une courbe étalon préparée avec des concentrations croissantes de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0, 1, 2, 3, 4 et 5 ppm) (Sigma, États-Unis).

## **4.8 Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. Les résultats de germination du blé et les données des paramètres de croissance des plantules ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA) avec un intervalle de confiance fixé à 95 %.

# 1 Isolement de bactéries telluriques, recherche de leurs propriétés d'intérêt agricole et étude de l'impact de la salinité sur la distribution de ces propriétés

## 1.1 Propriétés physicochimiques des échantillons de sol

Les analyses physicochimiques réalisées sur les différents échantillons de sol ont révélé une grande diversité de caractéristiques (Tableau IV). Trois échantillons, à savoir S007, S009 et S023, prélevés respectivement à M'sila, Béjaïa (Feraoun) et Biskra, se sont révélés salins ( $CE > 4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Pour les autres échantillons, la conductivité électrique varie de  $0,14 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (S002) à  $3,35 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (S018).

Les sols collectés à Béjaïa (Souk El-Tnine) se distinguent par une teneur plus élevée en matière organique (7,7 %), tandis que ceux prélevés à M'sila, Ouargla, Oued Souf et Saïda présentent des teneurs plus faibles.

En ce qui concerne le pH, la valeur la plus élevée a été enregistrée pour l'échantillon S025 ( $\text{pH} = 9,12$ ), alors que la plus faible correspond à l'échantillon S005 ( $\text{pH} = 6,62$ ). Par ailleurs, l'échantillon S010 présente la teneur en eau gravimétrique la plus élevée ( $\theta_g = 0,40$ ), tandis que l'échantillon S014 affiche la plus faible ( $\theta_g = 0,06$ ).

**Tableau 4. Propriétés physicochimiques des échantillons de sol**

Échantillon	pH	Conductivité électrique CE ( $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ )	Humidité ( $\theta_g$ )	Matière organique totale SOM (%)
S001	8,15	3,4	0,232	1,1
S002	8,09	3,2	0,237	1,2
S003	8,45	2,9	0,200	0,8
S004	8,12	3,3	0,241	1,3
S005	8,19	3,8	0,211	1,1
S006	8,24	3,5	0,254	1,5
S007	8,68	4,6	0,119	0,5
S008	8,05	3,7	0,205	0,9
S009	8,18	4,5	0,158	0,6
S010	8,01	3,4	0,225	1,3
S011	7,83	3,2	0,248	1,3
S012	7,60	3,7	0,210	0,7

S013	8,04	3,3	0,222	0,9
S014	8,25	3,8	0,243	1,2
S015	8,13	3,8	0,238	1,2
S016	7,56	2,7	0,224	0,6
S017	7,34	2,5	0,288	1,6
S018	7,40	2,9	0,266	1,5
S019	7,52	3,1	0,240	1,2
S020	7,83	2,6	0,239	1,2
S021	7,71	3,4	0,207	0,8
S022	8,03	3,0	0,252	1,4
S023	8,00	4,4	0,128	1,1
S024	7,65	3,5	0,215	1,0
S025	7,93	2,8	0,231	1,1
S026	7,50	2,5	0,246	1,2

Un document publié en janvier 1998 par le Natural Resources Conservation Service (NRCS, États-Unis) propose une classification des sols en fonction de leurs valeurs de pH mesurées dans une solution de KCl. Cette classification distingue les catégories suivantes :

- Sol extrêmement acide : pH 3,5 – 4,4
- Sol très fortement acide : pH 4,5 – 5,0
- Sol fortement acide : pH 5,1 – 5,5
- Sol modérément acide : pH 5,6 – 6,0
- Sol légèrement acide : pH 6,1 – 6,5
- Sol neutre : pH 6,6 – 7,3
- Sol légèrement alcalin : pH 7,4 – 7,8
- Sol modérément alcalin : pH 7,9 – 8,4
- Sol fortement alcalin : pH 8,5 – 9,0

Selon cette classification, les échantillons étudiés se situent dans les catégories suivantes : neutres, légèrement acides, légèrement alcalins et modérément alcalins.

Le pH est un facteur déterminant, car il influence non seulement les paramètres physicochimiques du sol, mais aussi les processus biologiques tels que la décomposition de la matière organique. Par conséquent, une valeur de pH non optimale limite la croissance des cultures agricoles et réduit leur rendement.

Le pH mesuré dans KCl reflète la teneur en ions hydrogène échangeables dans le sol. Il permet d'estimer le « pH plancher », c'est-à-dire la valeur vers laquelle tend le sol en raison des processus d'acidification (Rouiller et al., 1994 ; Niklińska et al., 2005 ; Lapinskas et Motuzienė, 2006 ; Rousk et al., 2009).

Dans les analyses microbiologiques, la teneur en eau d'un sol est généralement exprimée en teneur en humidité gravimétrique ( $\theta_g$ ), définie comme la masse d'eau par unité de masse de sol sec (Pepper et Gerba, 2004). L'humidité conditionne la structure, la porosité et d'autres propriétés physicochimiques du sol. Elle joue également un rôle central dans la croissance des plantes et le développement de la biomasse microbienne de la rhizosphère (Hagan, 1955).

La matière organique du sol constitue un indicateur majeur de sa qualité. Elle assure la disponibilité des éléments minéraux nécessaires à la croissance des végétaux et au développement de la biomasse tellurique (Reeves, 1997). Sa dynamique est étroitement liée à d'autres propriétés physicochimiques telles que le pH, la salinité et l'humidité. En général, la teneur en matière organique tend à augmenter avec l'humidité en raison d'une aération réduite lors de la saturation en eau. À l'inverse, une salinité élevée et des valeurs de pH extrêmes limitent la dégradation de l'humus et, par conséquent, réduisent l'apport en matière organique disponible dans le sol (Bot et Benites, 2005).

## **1.2 Isolement bactérien**

À partir des 26 échantillons de sol collectés dans différentes wilayas d'Algérie, un total de 260 isolats bactériens a été obtenu. Ces isolats ont été purifiés sur milieu nutritif (NA) supplémenté en NaCl à différentes concentrations (300, 600 et 900 mM).

## **1.3 Halotolérance des isolats**

Les 260 isolats correspondent à des colonies bactériennes morphologiquement distinctes issues des 26 sites agricoles explorés. La tolérance au sel de ces isolats a été évaluée sur un milieu GMM préparé avec différentes concentrations de NaCl.

Les résultats de croissance ont montré une diminution progressive du nombre d'isolats capables de se développer avec l'augmentation de la concentration saline. Ainsi :

- 100 % des isolats se sont développés à 0 et 100 mM,
- 162 isolats (62 %) ont toléré des concentrations allant jusqu'à 500 mM,

- 89 isolats (34 %) ont poussé entre 500 et 1000 mM,
- seuls 20 isolats (8 %) ont été capables de croître au-delà de 1000 mM. Ces 20 isolats halotolérants ont été retenus pour l'évaluation de leurs activités d'intérêt agricole.

Les bactéries promotrices de croissance végétale (PGPB) améliorent la santé, la croissance et le rendement des cultures par divers mécanismes directs et indirects, notamment sous conditions de stress biotiques et abiotiques (Ait Bessai et al., 2022a). Leur utilisation en agriculture représente une alternative prometteuse à l'emploi excessif et incontrôlé des engrais chimiques. En particulier, l'atténuation du stress salin par les PGPB constitue une stratégie efficace pour valoriser les sols marginaux, souvent impropres à l'agriculture ou présentant de très faibles niveaux de productivité à cause de la salinité (Bensidhoum et al., 2019).

La salinité, en effet, réduit la biomasse, la diversité et les fonctions microbiennes, en particulier celles des microorganismes sensibles au sel (Ofek et al., 2006). À l'inverse, les PGPB halotolérantes conservent leur viabilité et maintiennent leurs fonctions métaboliques en conditions salines. Il est donc essentiel de vérifier que les souches sélectionnées pour un usage agricole soient capables de résister aux conditions de salinité dans lesquelles elles seront appliquées.

## **1.4 Recherche des activités d'intérêt agricole**

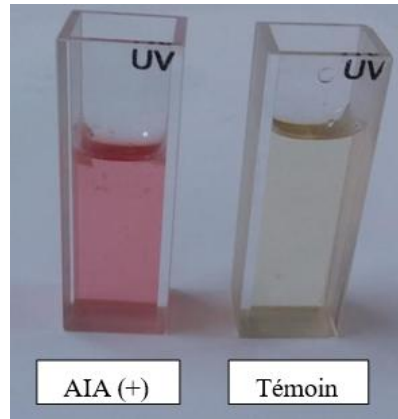
Les isolats sélectionnés ont été testés pour leur capacité à produire de l'AIA ainsi que diverses enzymes d'intérêt agronomique.

### **1.4.1 Production d'AIA**

La production d'AIA a été mise en évidence sur milieu LB additionné de  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de tryptophane et de 0,5 % de glucose. L'apparition d'une coloration rose a été retenue comme indicateur de la production d'AIA.

Les résultats ont montré que 15 isolats sur 20 (75 %) étaient producteurs d'AIA, avec des concentrations variant de  $3,23 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour l'isolat N63 à  $126,01 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour l'isolat N76. Les isolats N53, N8 et N94 ont produit respectivement 35,7, 47,4 et  $62,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Les concentrations moyennes d'AIA produites par les différents isolats sont présentées en annexe II.



**Figure 10. Aspect d'un résultat positif pour la production d'AIA**

La production de substances régulatrices de la croissance constitue l'un des mécanismes directs les plus importants par lesquels les PGPB stimulent la croissance des plantes (Baca et Elmerich, 2007). Il est estimé qu'environ 80 % des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'acide indole-acétique (AIA) (Zakharova et al., 1999). La biosynthèse de cette hormone est influencée par divers facteurs, notamment les conditions de culture, le stade de croissance bactérien et la disponibilité du substrat dans le milieu.

L'AIA, principale auxine d'origine microbienne, exerce une action sur presque tous les aspects physiologiques du développement végétal. Elle stimule la germination des graines, la division et l'élargissement cellulaires, la différenciation tissulaire, l'expansion foliaire, ainsi que l'initiation et l'élongation racinaire (Egamberdieva, 2008 ; Maleki et al., 2010 ; Martínez-Viveros et al., 2010). Depuis plusieurs décennies, la capacité à produire l'AIA est considérée comme un critère majeur de sélection des bactéries telluriques présentant un fort potentiel de promotion de la croissance des plantes (Abd El-Azeem et al., 2007 ; Bakthavatchalu et al., 2012 ; Vacheron et al., 2013 ; Dinesh et al., 2015 ; Etesam et al., 2015 ; Ait Bessai et al., 2022a).

De nombreux travaux rapportent que l'effet stimulateur des PGPB est directement lié à leur aptitude à produire cette auxine. Par exemple, Egamberdieva (2009) a observé une amélioration de 52 % de la croissance racinaire du blé cultivé sous stress salin (100 mM NaCl), après inoculation par trois souches de *Pseudomonas* productrices d'AIA (5 ; 5,7 et 7,4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Plusieurs genres bactériens, tels que *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Azotobacter*, ont également été signalés comme producteurs d'AIA, contribuant à la stimulation de la croissance du blé (Tsavkelova et al., 2006 ; Jha et Kumar, 2009 ; Soltani et al., 2010 ; Kumar et al., 2014).

Par ailleurs, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* et *Azospirillum lipoferum* ont été utilisées par Sharma et al. (2014) pour améliorer la croissance du riz. Ces souches ont démontré une remarquable capacité de production d'AIA, entraînant une augmentation des pigments photosynthétiques, de la teneur en chlorophylle et de la biomasse sèche par rapport aux témoins non inoculés. Une souche particulière, *Pseudomonas putida* BHUJY23, s'est distinguée par sa production élevée d'AIA et par son efficacité à la fois pour améliorer le rendement du riz et pour agir comme agent antagoniste contre plusieurs phytopathogènes (Lavakush et al., 2012).

Des effets synergiques ont également été rapportés. Hasan et al. (2014) ont montré que la co-inoculation de *Rhizobium* et *Azospirillum*, deux genres producteurs d'AIA, améliorait significativement la croissance du riz, notamment la longueur des racines et les poids frais et secs. D'autres études confirment également le rôle des genres *Bacillus* et *Citrobacter* dans la stimulation de la croissance racinaire du riz, principalement attribuée à la production d'AIA (Yadav et al., 2011 ; Habib et al., 2015).

### 1.4.2 Activités enzymatiques

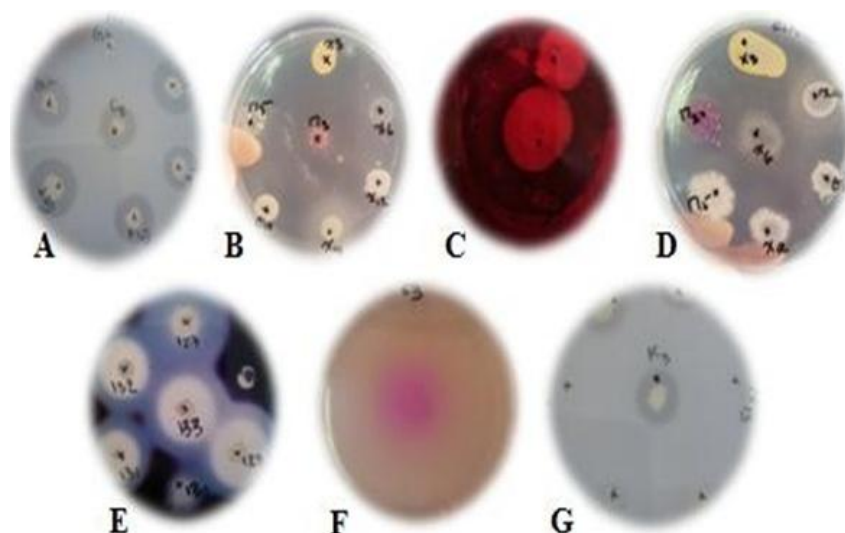
Les isolats bactériens testés ont présenté des profils enzymatiques variés. À 0 mM de NaCl, l'enzyme la plus fréquemment exprimée était la protéase, détectée chez 70 % des isolats (14/20), suivie par la lipase, produite par 60 % des isolats (12/20). La chitinase représentait l'activité la moins fréquente, observée uniquement chez 40 % des isolats (8/20).

D'autres activités enzymatiques ont également été détectées :

- cellulases : 60 %,
- estérases : 50 %,
- amylases : 30 %,
- uréases : 25 %.

L'ajout de NaCl aux milieux de culture a influencé les niveaux d'expression de ces enzymes, sans pour autant inhiber leur production. Ces résultats suggèrent une certaine robustesse enzymatique des isolats halotolérants face aux conditions salines.

Les résultats détaillés de ces tests sont présentés dans l'annexe III.



**Figure 11. Aspect des résultats positif des activités enzymatiques testées**

**A** : Protéase ; **B** : Lipase ; **C** : Cellulase ; **D** : Estérase ; **E** : Amylase ; **F** : Uréase ; **G** :  
Chitinase

La dégradation de la matière organique par les activités cataboliques des microorganismes du sol constitue l'un des principaux mécanismes par lesquels les bactéries telluriques contribuent à l'amélioration de la croissance végétale. L'intérêt porté à ces microorganismes en agriculture repose sur leur utilisation en tant que biofertilisants et agents de biocontrôle. Les enzymes microbiennes, telles que les uréases, estérases, lipases, protéases, chitinases et cellulases, jouent un rôle central dans les processus de transformation biologique de la matière organique (Glick, 1995 ; Viveros et al., 2010 ; Rana et al., 2012 ; Xun et al., 2015).

La capacité de certaines bactéries à sécréter ces enzymes extracellulaires ne se limite pas à la simple fertilisation biologique des sols par la dégradation de la matière organique. En effet, ces enzymes trouvent également des applications étendues dans divers domaines biotechnologiques tels que l'agroalimentaire, l'industrie des détergents, le textile, la pharmacie, la médecine et la biologie moléculaire (Carrim et al., 2006). Parmi elles, les chitinases et les cellulases occupent une place particulière en tant qu'agents de biocontrôle, grâce à leur aptitude à dégrader les parois cellulaires des champignons phytopathogènes (Mitchell et Alexander, 1963 ; Sindhu et Dadarwal, 2001 ; Labuschagne et al., 2010).

Les enzymes produites par les PGPB permettent de dégrader les nutriments insolubles présents dans le sol, tels que les protéines, l'amidon et la cellulose, et de les transformer en

composés solubles assimilables par les plantes (sucres, acides aminés,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Caldwell, 2005 ; Burns et Wallenstein, 2010). La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle global du carbone (Ponnambalam et al., 2011), puisqu'elle conduit à la libération de dioxyde de carbone ou de méthane par l'action microbienne (Ljungdahl et Eriksson, 1985).

Les cellulases microbiennes suscitent ainsi un intérêt particulier en raison de leur potentiel d'utilisation dans la valorisation des déchets agricoles. De même, les lipases ont été décrites dès 1901 chez plusieurs espèces bactériennes, notamment *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus*, *B. fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *P. fluorescens* (Eijkmann, 1901 ; Fickers et al., 2008). La synthèse de lipases et d'estérases par certaines bactéries contribue à la dégradation des composés lipidiques, participant ainsi au recyclage de la matière organique et à la libération d'éléments nutritifs indispensables à la croissance des plantes.

Les amylases, pour leur part, catalysent l'hydrolyse de l'amidon ou du glycogène en glucose et/ou en oligosaccharides (Thoma et al., 1971). Elles sont produites par divers organismes, notamment les plantes, les animaux et les microorganismes. Leur production par les bactéries du sol joue un rôle déterminant dans la décomposition de la matière organique et la mise à disposition des nutriments nécessaires aux plantes. Des travaux de Whipps (2001), Siddiqui (2005) et Viollet (2010) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* productrices d'amylases stimulent significativement la croissance et la santé des plantes.

Il est bien établi que la production d'enzymes lytiques, telles que les protéases, constitue l'un des mécanismes indirects par lesquels les PGPB exercent un effet antagoniste sur les microorganismes nuisibles (Twisha et Desai, 2014). L'activité protéasique influence également la synthèse des auxines, notamment de l'AIA, en libérant le tryptophane, précurseur de cette hormone (Mansour et al., 1994). Plusieurs auteurs (Chet et al., 1990 ; Kobayashi et al., 2002 ; Labuschagne et al., 2010) ont rapporté le rôle des protéases microbiennes dans la lutte biologique. Lian et al. (2007) ont par ailleurs mis en évidence leur implication dans la dégradation des cuticules de nématodes, un mécanisme utilisé par certaines espèces de *Bacillus* pour limiter les infestations nématodiennes.

L'uréase est une enzyme clé dans l'hydrolyse de l'urée, générant du  $\text{CO}_2$  et de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Selon Polacco (1977), les uréases du sol proviennent à la fois des plantes et des microorganismes, ces derniers produisant des formes intra- et extracellulaires de l'enzyme (Mobley et Hausinger, 1989).

Les chitinases hydrolysent les polymères insolubles de N-acétylglucosamine liés par des liaisons  $\beta(1,4)$ , constituants majeurs des parois cellulaires de nombreux champignons, des exosquelettes d'insectes et des carapaces de crustacés (Bhushan et Hoondal, 1998). Les microorganismes producteurs de chitinases sont ainsi largement considérés comme des agents de lutte biologique (Bhushan et Hoondal, 1998 ; Huang et al., 2005). Kathiresan et al. (2011) ont rapporté que certaines souches d'*Azotobacter* produisent d'importantes quantités de cellulases, amylases, lipases, chitinases et protéases. De même, Ahmad et al. (2013) ont montré que des souches de *Pseudomonas* synthétisent ces enzymes, jouant un rôle crucial dans la dégradation de la matière organique et dans la suppression de pathogènes fongiques. Certaines souches de *Pseudomonas* réduisent ainsi la croissance de champignons filamenteux grâce à la sécrétion de chitinases et d'autres enzymes lytiques.

L'application de ces bactéries comme agents de protection biologique des cultures est particulièrement prometteuse contre les pathogènes dont la paroi cellulaire contient de la chitine (Prasad et al., 2015). Par exemple, Kohler et al. (2007) ont observé que l'inoculation de *Lactuca sativa* (laitue) avec *Bacillus subtilis* accroissait significativement les activités uréasiques, protéasiques et phosphatasiques dans la rhizosphère, améliorant ainsi la croissance des plantes et l'assimilation de nutriments tels que le potassium et le calcium. Singh et al. (1999) ont également montré que des souches chitinolytiques de *Paenibacillus* sp. et *Streptomyces* sp. pouvaient supprimer le flétrissement du concombre causé par *Fusarium oxysporum*. L'isolat bactérien MIC 3, capable de produire un ensemble d'enzymes lytiques (protéase, amylase, cellulase, chitinase et pectinase), a montré une forte activité antagoniste contre *F. oxysporum* et *Phoma* sp. (Avinash et Rai, 2014). Plus récemment, Xu et Kim (2016) ont évalué le rôle de *Paenibacillus polymyxa* SC09-21, producteur de cellulases et de protéases, en tant qu'agent de biocontrôle contre le mildiou causé par *Phytophthora* sp., tout en agissant comme stimulateur de la croissance du poivron. Cette souche a permis de réduire significativement la sévérité de la maladie.

## 2 Effet de la salinité sur la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate, du potassium et du silicate

### 2.1 Fixation biologique de l'azote atmosphérique

Les 20 isolats étudiés ont été testés pour leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique sur le milieu NFB, dépourvu de toute source d'azote, et préparé à différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Aux conditions sans sel (0 mM), 95 % des isolats (19/20) se sont révélés fixateurs libres d'azote. À 300 mM, cette proportion a chuté à 70 % (14/20), puis à 45 % (9/20) aux concentrations de 600 et 900 mM (Annexe III).

L'azote moléculaire représente environ 78 % de l'atmosphère. Ce gaz, chimiquement très stable, n'est pas directement assimilable par les organismes supérieurs ni par la majorité des microorganismes. Cependant, certains procaryotes sont capables de le fixer, contribuant ainsi au cycle biogéochimique de l'azote (Golubyatnikov et al., 2013 ; Bertrand et al., 2015).

La fixation biologique de l'azote dans le sol constitue l'un des mécanismes par lesquels les microorganismes favorisent la croissance des plantes (James et al., 1994 ; Glick, 1997 ; Vessey, 2003 ; Gray et Smith, 2004). Ce processus est assuré par divers procaryotes, qu'ils vivent en vie libre (par ex. *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Acetobacter*) ou en symbiose avec les plantes (par ex. *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*) (Reddy, 2014).

Ce processus repose sur l'activité de la nitrogénase, une enzyme composée de deux complexes métalloprotéiques :

- la dinitrogénase (hétérotétramère ~250 kDa, codée par les gènes *nifD* et *nifK*), qui contient le site actif de réduction de l'azote,
- la dinitrogénase réductase (homodimère ~70 kDa, codée par *nifH*), qui assure l'hydrolyse de l'ATP et le transfert d'électrons vers la dinitrogénase (Zehr et al., 2003).

L'usage excessif des engrais azotés de synthèse, associé aux émissions d'oxyde nitreux liées à certaines activités anthropiques, contribue au déséquilibre du cycle de l'azote, posant un risque croissant pour les sols et l'atmosphère. En céréaliculture, l'emploi de bactéries

fixatrices d'azote pour réduire la dépendance aux engrais chimiques est une stratégie largement adoptée.

De nombreuses études ont confirmé l'efficacité de diverses bactéries fixatrices d'azote comme biofertilisants, notamment des genres *Azospirillum* (Rao et al., 1987 ; Hartmann, 1996 ; Malik et al., 1997 ; Santa et al., 2004 ; Nabti et al., 2010 ; Volpiano et al., 2014), *Pseudomonas* (Rao et al., 1987 ; Hartmann, 1996 ; Mirza et al., 2006 ; Shabaev et Voronina, 2007), *Bacillus* (Park et al., 2005), *Herbaspirillum* (Brusamarello-Santos et al., 2012 ; Volpiano et al., 2014), *Azotobacter* (Rao et al., 1987 ; Milošević et al., 2012), *Rhizobium*, *Enterobacter* (Habibi et al., 2014), *Klebsiella* (Iniguez et al., 2004) et *Burkholderia* (Van et al., 2000 ; Govindarajan et al., 2008). Ces bactéries se sont révélées efficaces pour accroître le rendement du blé et du riz, tout en réduisant l'apport d'engrais chimiques.

Au fil des années, plusieurs espèces des genres *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* et *Pseudomonas* ont été utilisées comme PGPB pour stimuler la croissance de diverses plantes (Malik et al., 1997 ; Glick et al., in Altman et Waisel, 1997 ; Kader et al., 2002 ; Sgroy et al., 2009 ; Vacheron et al., 2013). Des espèces telles que *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Azotobacter chroococcum* ont été décrites comme fixatrices d'azote dans le sol (Madkour et al., 1990 ; Jha et Kumar, 2009 ; Laskar et al., 2013 ; Pathania et al., 2014).

Par ailleurs, les Rhizobia occupent une place centrale dans la promotion de la croissance végétale en raison de leur capacité à établir des symbioses avec les légumineuses. Des espèces comme *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* et *R. japonicum* se sont révélées particulièrement efficaces pour l'apport d'azote à une large gamme de plantes, telles que la luzerne, le trèfle doux, le pois, la lentille, le haricot ou le niébé (Yamaguchi, 1983).

L'inoculation avec des bactéries associatives, comme *Azospirillum*, s'est également montrée bénéfique pour améliorer le rendement de légumineuses d'hiver telles que le pois et le pois chiche (Sarig et al., 1986). Dans le cas du soja, Dashti et al. (1998) ont montré que l'inoculation par *Serratia liquefaciens* 2-68 ou *S. proteamaculans* 1-102 augmentait la nodulation, la fixation d'azote et l'accumulation d'azote total dans deux cultivars. L'azote fixé, exprimé en pourcentage d'azote et de protéines dans les tissus, était significativement supérieur chez les plantes inoculées.

Chez la pomme de terre, Pishchik et al. (1998) ont rapporté qu'une inoculation par *Klebsiella mobilis* (souches CIAM880 et CIAM853) entraînait une augmentation notable du rendement en tubercules et de la teneur en azote. Plus récemment, Naqqash et al. (2016) ont montré que des inoculations par *Azospirillum*, *Enterobacter* et *Rhizobium* amélioraient la croissance et le rendement de la pomme de terre en conditions axéniques. Par exemple, *Azospirillum* sp. TN10 a permis une augmentation significative du poids frais et sec des plantes, ainsi que de la teneur en azote des tiges et des racines, comparativement aux témoins non inoculés.

## **2.2 Solubilisation du phosphate inorganique**

Le phosphate constitue l'un des nutriments minéraux les plus essentiels à la croissance et au développement des plantes. Les PGPB favorisent cette croissance en améliorant l'acquisition des nutriments, notamment par la transformation et la solubilisation du phosphate insoluble présent dans le sol (Babalola et al., 2012). L'utilisation de PGPB halotolérants capables de solubiliser le phosphate représente une stratégie durable et une alternative prometteuse aux engrais chimiques, en particulier pour la fertilisation des sols affectés par la salinité, contribuant ainsi à l'amélioration de la production agricole (Alori et al., 2017).



**Figure 12. Aspect de la zone de solubilisation du phosphate tricalcique par un de nos isolats sur le milieu de Pikovskaya après 48h d'incubation**

Dans ce travail, 65 % (13/20) des isolats ont montré une capacité de solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu PVK supplémenté avec 0 ou 300 mM de NaCl, tandis que 25 % (5/20) des isolats ont exprimé cette activité sur milieu PVK additionné de 600 ou 900 mM de NaCl. À 0 mM de NaCl, les indices de solubilisation (IS) variaient de 2,25 à 4 selon la durée d'incubation. À 300 mM de NaCl, les IS étaient compris entre 1,1 et 3,5 ; à 600 mM entre 1,18 et 3,14 ; et à 900 mM entre 0,37 et 3,3. Sur milieu liquide, huit isolats ont présenté

une activité de solubilisation, avec des concentrations de phosphate soluble comprises entre 0,035 µg/mL et 255,125 µg/mL.

L'isolat N76 a montré les IS les plus élevés : un indice de 4 sur milieu PVK contenant 300 mM de NaCl et de 3,3 sur milieu PVK à 900 mM, après 15 jours d'incubation à 28 °C (Annexe IV).

**Tableau 5. Solubilisation du phosphore inorganique par l'isolat N76 sur milieux solides et liquides**

Isolat	[NaCl] mM	2 jours		7 jours		15 jours		21 jours	
		IS	pH	P soluble (µg/mL)	IS	pH	P soluble (µg/mL)	IS	pH
N76	0	2,87	6,22	136,625	3,5	6,05	142,875	3,87	5,36
	300	2,66	6,66	85,375	3	6	141,625	4	5,24
	600	2,41	6,77	59,225	2,42	6,11	117,875	3,1	5,74
	900	2,2	6,79	54,125	2,33	6,75	59,425	3,3	5,85

Les résultats obtenus pour l'isolat N76 sont supérieurs à ceux rapportés par Zhu et al. (2011), qui ont montré qu'une souche halophile était capable de solubiliser le phosphate en milieu salin (30 g/L), produisant après 10 jours une zone de solubilisation de 2,5 à 3,0 cm.

Dans notre étude, l'isolat N76 a pu solubiliser le phosphate tricalcique dans un bouillon PVK supplémenté avec 0, 300, 600 et 900 mM de NaCl. La solubilisation maximale a été enregistrée à 300 mM, avec  $255,152 \pm 0,01$  µg/mL de phosphate soluble, suivie de  $219,125 \pm 0,03$  µg/mL et  $205,375 \pm 0,05$  µg/mL respectivement à 600 et 900 mM de NaCl (Annexe IV). Cet isolat a montré une activité maximale de solubilisation à 21 jours pour toutes les concentrations de NaCl testées. La quantité la plus élevée de phosphate soluble ( $255,152 \pm 0,01$  µg/mL) reste inférieure à celle rapportée par Zhu et al. (2011) ( $283,16$  µg/mL), mais supérieure à celle obtenue par Nico et al. (2012) ( $109,47$  µg/mL). Ces résultats suggèrent que N76 présente un bon potentiel en tant que bactérie solubilisatrice de phosphate.

La solubilisation du phosphate inorganique en milieu liquide par N76 s'est accompagnée d'une diminution du pH, passant de 7,0 (pH initial) à  $5,16 \pm 0,02$  après 21 jours d'incubation. Ce pH de  $5,16 \pm 0,02$  correspondait à une concentration de  $255,15 \pm 0,01$  µg/mL de phosphate soluble dans le surnageant, alors que le témoin maintenait un pH stable (pH = 7). Cette acidification du milieu de culture confirme la production et la libération d'acides organiques. En effet, lors de la solubilisation du phosphate, les bactéries produisent

divers acides organiques de faible poids moléculaire, dont les groupements hydroxyle et carboxyle permettent la chélation des cations associés au phosphate, favorisant ainsi sa mise en solution (Chen et al., 2006 ; Adhikari et al., 2021 ; Emami et al., 2020). Selon Alori et al. (2017), plusieurs acides organiques interviennent dans ce processus, notamment les acides gluconique, citrique, lactique, 2-cétogluconique, oxalique, tartrique, acétique, fumarique, malique, glyoxalique, isobutyrique, isovalérique, itaconique, propionique, succinique, aspartique, maléique, glutamique, glycolique, malonique et  $\alpha$ -cétobutyrique.

De nombreuses études confirment une corrélation entre la diminution du pH du milieu et les taux de solubilisation du phosphate (Zhu et al., 2011 ; Jha et al., 2009 ; Chen et al., 2015). Toutefois, Singh et al. (2014) ont signalé que cette corrélation n'était pas systématique, la solubilisation du phosphate n'étant pas toujours directement liée à l'acidité du milieu.

Parmi la grande diversité des PGPB, les bactéries du genre *Azotobacter* sont reconnues comme de puissants solubilisateurs de phosphate et promoteurs de la croissance végétale (Nosrati et al., 2014). Kaur et Reddy (2015) ont montré que l'inoculation du maïs et du blé avec deux bactéries solubilisatrices de phosphate (*Pantoea cypripedii* PSB-3 et *Pseudomonas plecoglossicida* PSB-5), en présence de phosphate naturel, augmentait significativement la croissance des plantes et l'absorption totale de phosphore par rapport au témoin. Dans une autre expérience en serre, l'application d'un isolat d'*Azotobacter*, seul ou en combinaison avec des engrais chimiques, a significativement amélioré le rendement et la biomasse racinaire de trois variétés de blé (Kumar et al., 2001).

D'autres espèces bactériennes, telles que *Achromobacter xylosoxidans* (Ma et al., 2009), *Bacillus polymyxa* (Nautiyal, 1999), *Pseudomonas putida* (Malboobi et al., 2009), *Acetobacter diazotrophicus* (Dutta et Podile, 2010), *Agrobacterium radiobacter* (Leyval et Berthelin, 1989), *Bradyrhizobium mediterraneum* (Peix et al., 2001), *Enterobacter aerogenes* et *Pantoea agglomerans* (Chung et al., 2005), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Crespo et al., 2011), *Rhizobium meliloti* (Krishnaraj et Dahale, 2014) ainsi que *Pseudomonas azotoformans* (Adhikari et al., 2021) sont également rapportées comme bactéries solubilisatrices de phosphate et promotrices de la croissance des plantes.

### **2.3 Solubilisation du phosphate organique**

Le phytate représente la forme la plus abondante de phosphate organique dans le sol, lequel constitue entre 10 et 50 % du phosphore total (Alori et al., 2017). La phytase hydrolyse

le phytate en phosphate soluble (esters phosphoreux), directement assimilable par les racines des plantes (Alori et al., 2017).

La capacité des isolats à minéraliser le phytate par la production de phytase a été évaluée à différentes concentrations de NaCl. Après 10 jours d'incubation à 28 °C, 40 % (8/20) des isolats se sont révélés capables de minéraliser le phytate en absence de NaCl, 45 % (7/20) en présence de 300 mM de NaCl, 30 % (6/20) à 600 mM et 20 % (4/20) à 900 mM.

Les indices de solubilisation (IS), calculés selon la formule d'Edi-Premono (1996) après 2, 5 et 10 jours d'incubation à 28 °C (Jha et al., 2009), variaient de 1,35 à 6. L'IS le plus élevé (6,5) a été obtenu à 300 mM de NaCl et après 10 jours d'incubation, pour l'isolat N76 (Tableau VI, Annexe V).

La quantification de la phytase produite par les isolats en milieu liquide supplémenté en NaCl a montré qu'aucune activité n'était détectée jusqu'à 2 jours d'incubation (0 µg/mL de phosphate soluble), indiquant l'absence de production mesurable de phytase. La quantité maximale de phosphate soluble a été enregistrée pour l'isolat N76 après 10 jours d'incubation à 28 °C, avec  $0,168 \pm 0,002$  U/mL ( $0,168 \pm 0,002$  µg/mL·min) à 0 mM de NaCl (Tableau VI, Annexe V).

**Tableau 6. Minéralisation du phosphate organique par l'isolat N76 sur milieux solides et liquides**

Isolat	NaCl (mM)	2 jours (IS / P soluble U/mL)	5 jours (IS / P soluble U/mL)	10 jours (IS / P soluble U/mL)
N76	0	3,62 / 0	4,33 / 0,027	5,28 / 0,168
	300	3,28 / 0	5,28 / 0,014	6,5 / 0,097
	600	3,57 / 0	3,9 / 0,002	5 / 0,012
	900	3,25 / 0	4,25 / 0	4,85 / 0,004

Les phosphates organiques, issus de la biomasse végétale, microbienne et animale du sol, présentent une grande diversité chimique mais sont majoritairement représentés par l'acide phytique, principalement sous forme de sel (phytate, *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, IP6) (Liu et al., 2021). Ces composés peuvent être davantage complexés aux particules du sol via des processus d'adsorption-désorption (Niu et al., 1995 ; Kumar et al., 2020). On estime que le stock de phosphore organique accumulé dans les sols agricoles pourrait suffire à soutenir une agriculture intensive pendant plusieurs décennies (Singh et al.,

2017). Toutefois, seulement environ 0,1 % est directement disponible pour les plantes (Ait Bessai et al., 2022), le reste devant être transformé en phosphate soluble.

Pour accéder à ces formes organiques, les plantes et les micro-organismes du sol ont développé divers mécanismes, incluant l'expression d'enzymes telles que les phytases, ainsi que l'exsudation d'acides organiques et de sidérophores, facilitant la libération de phosphate soluble (Gamalero et al., 2009 ; Gupta et al., 2015).

Des bactéries phytase-productrices ont été isolées à partir de différentes sources : sols agricoles (Babalola et al., 2012), excréments de volaille (Alori et al., 2017) et sédiments fluviaux (Vyas et al., 2009). Par exemple, Babalola et al. (2012) ont isolé deux souches fluorescentes de *Pseudomonas* à partir d'un sol composté, capables d'hydrolyser jusqu'à 81 % du phosphate contenu dans le phytate ajouté. La phytase a par ailleurs été extraite et caractérisée chez plusieurs espèces du genre *Pseudomonas*, notamment *P. simiae*, *P. putida* (Shulze et al., 2019), *P. palleroniana*, *P. proteolytica* et *P. azotoformans* (Adhikari et al., 2021).

La production de phytase par des isolats bactériens est considérée comme une voie prometteuse pour améliorer la croissance des plantes dans les sols déficients en phosphore (Idriss et al., 2002 ; Kumar et al., 2013). Shulze et al. (2019) ont adopté une approche de biologie synthétique combinatoire pour introduire des phytases phylogénétiquement diverses dans le génome de bactéries associées aux racines. Par des essais en culture liquide, 41 souches ont été identifiées comme capables d'hydrolyser le phosphate issu du phytate, avec un pH optimal variable. La majorité des souches testées (12/14) ont significativement amélioré la croissance d'*Arabidopsis* dans des essais sur gélose où le phytate constituait l'unique source de phosphore. La croissance des plantes était généralement corrélée à la mobilisation du phosphate soluble par ces souches.

L'approche combinatoire offre plusieurs avantages dans la mise au point de biofertilisants à base de bactéries productrices de phytase. D'une part, elle permet de contrôler l'hôte bactérien : contrairement aux isolats environnementaux présentant une forte activité phytase mais dont la capacité de colonisation racinaire reste incertaine (Vyas et al., 2009), cette stratégie repose sur des PGPB déjà connues pour leur aptitude à coloniser les plantes. D'autre part, les approches de biologie synthétique permettent de créer des consortiums bactériens aux fonctions complémentaires. À l'avenir, cette stratégie pourrait être élargie afin

d'exploiter d'autres mécanismes de solubilisation du phosphate (enzymes diverses, voies métaboliques produisant des métabolites chélateurs) ou d'autres fonctions bénéfiques pour les plantes, telles que la fixation biologique de l'azote ou la production d'hormones de croissance (Hartmann et al., 1991).

## **2.4 Solubilisation du potassium**

Le potassium constitue le troisième élément nutritif essentiel à la croissance et au développement des plantes. Toutefois, près de 90 % du potassium présent dans le sol se trouve sous forme insoluble, principalement dans les roches, les silicates et divers minéraux (Goldstein, 1994). La teneur en K soluble est donc généralement faible, ce qui limite fortement la production agricole.

Les micro-organismes jouent un rôle déterminant en libérant le potassium à partir de ces minéraux, le rendant ainsi disponible pour les plantes. De nombreuses études ont confirmé la capacité des bactéries telluriques à solubiliser le K insoluble et ont montré l'effet bénéfique de l'inoculation des bactéries solubilisant le potassium (KSB) sur la croissance végétale (Meena et al., 2016 ; Kang et al., 2017).

Dans ce travail, les isolats ont été évalués pour leur aptitude à solubiliser le potassium ( $K_2O \cdot 5Si_2$ ) sur milieu Aleksandrov modifié, supplémenté avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Ainsi, 15 % (3/20) des isolats ont pu solubiliser le potassium à 0 mM NaCl et seulement 5 % (1/20) à 300 mM (Annexe VII). Les indices de solubilisation (IS) observés après une semaine d'incubation à 28 °C variaient de 0,8 à 1,3.

L'isolat N08 a été le seul capable de solubiliser le potassium aussi bien en milieu solide qu'en bouillon Aleksandrov, à 0 et 300 mM de NaCl. La solubilisation maximale a été enregistrée à 0 mM, avec  $25,034 \pm 0,02$  µg/mL de K solubilisé, suivie de  $9,267 \pm 0,03$  µg/mL à 300 mM NaCl.

Diverses bactéries de sol ont déjà été décrites comme KSB, capables de libérer le K à partir de minéraux silicatés (feldspaths, aluminosilicates), notamment *Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus*, *B. circulans*, *Paenibacillus* spp., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Pseudomonas* sp. et *Burkholderia* (Sheng et al., 2008 ; Lian et al., 2002 ; Rajawat et al., 2012 ; Liu et al., 2012 ; Basak et Biswas, 2012 ; Singh et al., 2010). D'autres genres tels qu'*Arthrobacter* sp., *Enterobacter hormaechei*, *Paenibacillus glucanolyticus* et *B. mucilaginosus subsp. siliceus* ont également été rapportés (Meena et al., 2014 ; Meena et al., 2015a ; Meena et al., 2016).

Des isolats tels qu'*Azotobacter chroococcum* et *Bacillus* spp. ont aussi été isolés à partir de racines de coton comme KSB (Barougy et al., 2009). Selon ces auteurs, la capacité de solubilisation pourrait être liée à des différences dans les propriétés génomiques et plasmidiques des souches.

Actuellement, les mécanismes de solubilisation du potassium par les PGPB et l'effet de leur inoculation sur la disponibilité des nutriments et la croissance des cultures restent encore peu documentés (Meena et al., 2013). Toutefois, le mécanisme le plus largement décrit est la production d'acides organiques qui dissolvent les minéraux potassiques insolubles (muscovite, orthoclase, biotite, feldspaths, micas, vermiculite, smectites, etc.), libérant ainsi le K et le Si assimilables par les plantes (Abou El-Seoud et Abdel-Megeed, 2012).

Ces acides organiques (oxalique, tartrique, citrique, gluconique, malique, succinique, acétique, lactique, propionique, glycolique, malonique, fumarique, etc.) sont produits lors du métabolisme du glucose. Ils abaissent le pH du milieu, acidifient l'environnement bactérien et facilitent la dissolution des minéraux. En parallèle, ils favorisent la chélation des cations associés au potassium, libérant simultanément K, Si et Al, et améliorent ainsi la biodisponibilité minérale dans la rhizosphère (Maurya et al., 2014 ; Meena et al., 2014a ; Song et al., 2015 ; Gusain et al., 2015 ; Verma et al., 2013 ; Römheld et Kirkby, 2010).

Néanmoins, la baisse du pH n'explique pas toujours seule la solubilisation du potassium. Certaines études ont montré l'absence de corrélation entre l'acidification et la libération du K (Zarjani et al., 2013 ; Rosa-Magri et al., 2012). D'autres mécanismes, tels que la production de polysaccharides capsulaires jouant un rôle clé dans la dissolution minérale (He et Sheng, 2006 ; Meena et al., 2013), ou la capacité de chélation directe des acides organiques, pourraient intervenir. Par exemple, l'ajout d'EDTA (0,005 M) au milieu a montré un effet solubilisant comparable à celui de l'inoculation par *Penicillium bilaii* (Kucey, 1988 ; Sheng et He, 2006 ; Liu et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la solubilisation du potassium est un processus multifactoriel, nécessitant encore des recherches approfondies.

## **2.5 Solubilisation du silicate**

Le silicium (Si) n'est pas encore classé parmi les éléments essentiels à la croissance des plantes. Toutefois, de nombreuses études ont montré qu'il s'agit d'un élément bénéfique, capable de stimuler le développement de diverses espèces végétales : blé (Collin et al., 2014), riz (Feng et al., 2010), maïs (Ma & Takahashi, 2002), bambou (Epstein, 1994), pois pigeon

*Cajanus cajan* (Owino-Gerroh et al., 2005), *Sesbania rostrata* (Kurdali et al., 2019), luzerne *Medicago sativa* (Johnson et al., 2017 ; Wang & Han, 2007), niébé *Vigna unguiculata* (Dakora & Nelwamondo, 2003 ; Mali et al., 2008), soja *Glycine max* (Hamayun et al., 2010 ; Lee et al., 2010), haricot commun *Phaseolus vulgaris* (Murillo-Amador et al., 2007 ; Zuccarini, 2008), fève *Vicia faba* (Hellal et al., 2012 ; Kardoni et al., 2013 ; Shahzad et al., 2013), et pois chiche *Cicer arietinum* (Fawaz & Mohammad, 2013 ; Garg & Bhandari, 2016).

Dans ce travail, les isolats bactériens ont été testés pour leur capacité à solubiliser le silicate ( $\text{SiO}_2$ ) sur milieu Aleksandrov modifié, supplémenté avec différentes concentrations de NaCl (0, 300, 600 et 900 mM). Les résultats ont montré que 20 % (4/20) des isolats solubilisait le silicate à 0 mM NaCl, et 10 % (2/20) à 300 mM NaCl (Annexe). Les indices de solubilisation (IS) variaient de 0,3 à 0,8 après une semaine d'incubation à 28 °C. Aucun isolat n'a toutefois montré d'activité en bouillon Aleksandrov modifié.

Bien que le silicium soit le deuxième élément le plus abondant sur Terre, sa faible solubilité limite fortement son absorption par les plantes. Quelques genres bactériens, tels que *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Enterobacter*, possèdent la capacité de libérer le Si à partir de silicates naturels (Vasanthi et al., 2018). Outre la solubilisation du silicium, ces bactéries peuvent simultanément libérer du phosphate, du potassium, du calcium et du fer contenus dans les minéraux silicatés (Etesami & Jeong, 2022 ; Raturi et al., 2021).

L'amélioration de la mobilisation du Si dans la rhizosphère repose à la fois sur l'interaction avec divers cations réactifs (Ca, Na, Al, Zn, Fe) et sur la présence de **transporteurs spécifiques de Si** dans les plantes, permettant une meilleure absorption et contribuant à la tolérance au stress abiotique.

Les mécanismes proposés incluent :

- la production d'acides organiques et inorganiques (oxalique, citrique, gluconique, etc.) qui abaissent le pH et dissolvent les silicates ;
- la production de polysaccharides extracellulaires favorisant la chélation ;
- l'action des groupes fonctionnels bactériens (carboxylates, phosphates de lipopolysaccharides, peptidoglycane, acides teichuroniques et teichoïques) qui rendent la surface cellulaire réactive et facilitent l'adsorption aux minéraux insolubles ;

- la réduction bactérienne du soufre par les bactéries sulfato-réductrices, produisant du H<sub>2</sub>S qui interagit avec les cations du réseau cristallin (Etesami & Jeong, 2022 ; Kang et al., 2017).

De nombreuses études ont montré les effets bénéfiques des bactéries solubilisant le silicate (BSi) sur :

- la germination des graines,
- la croissance et le rendement des cultures,
- l’augmentation de l’absorption de K et Si,
- ainsi que la réduction de l’accumulation de métaux lourds (Anjanadevi et al., 2016 ; Awasthi et al., 2011 ; Lynn et al., 2013 ; Meena et al., 2014, 2015a ; Subhashini & Kumar, 2014 ; Zhang et al., 2013 ; Zhang & Kong, 2014 ; Etesami et al., 2017 ; Adhikari et al., 2020).

Historiquement, Aleksandrov (1985) fut le premier à proposer l’application de BSi combinées à des engrais organo-minéraux pour améliorer la croissance et le rendement du maïs et du blé (Meena et al., 2014). Depuis, plusieurs travaux ont montré que l’inoculation avec des souches telles que *Bacillus edaphicus* ou *B. mucilaginosus* entraîne une augmentation significative de l’absorption de K, P et N, et améliore la croissance de cultures comme le coton, le colza, la tomate et le riz (Lin et al., 2002 ; Sheng, 2005 ; Bakhshandeh et al., 2017).

De plus, l’inoculation de BSi favorise l’allongement des poils absorbants racinaires et améliore la disponibilité des nutriments dans le sol (Singh et al., 2010 ; Sindhu et al., 2012 ; Zeng et al., 2012). Des souches solubilisant le silicate ont été isolées de la rhizosphère de nombreuses plantes (blé, riz, maïs, soja, tomate, aubergine, pomme de terre, thé, coton, arachide, sésame, banane, etc.) dans différents types de sols, notamment ceux riches en minéraux silicatés comme au mont Tianmu (Chine) (Hu et al., 2006).

Dans l’ensemble, les bactéries solubilisant le silicate apparaissent comme une solution durable de biofertilisation, améliorant non seulement la nutrition en K, P et Si, mais aussi la productivité et la tolérance au stress abiotique des cultures.

### 3 Effet d'une souche PGPB sur la germination, la croissance des plantules de blé (*Triticum aestivum*) et la restauration de phosphate sous stress salin induit

#### 3.1 Identification moléculaire

L'isolat N76 a été sélectionné pour évaluer l'effet de la salinité sur la germination et la croissance des plantules de blé. L'analyse de la séquence partielle de l'ADNr 16S de la souche N76 a été réalisée par alignement multiple à l'aide de l'algorithme heuristique BLAST, en comparaison avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank. Les résultats ont révélé une identité de 98 % et une couverture de 93 % avec la souche *Pseudomonas azotoformans* (Seq323\_Culture2\_NC120620), confirmant l'appartenance de N76 à ce taxon (numéro d'enregistrement GenBank : ON810356).

#### 3.2 Effet de *Pseudomonas azotoformans* sur la germination des graines de blé

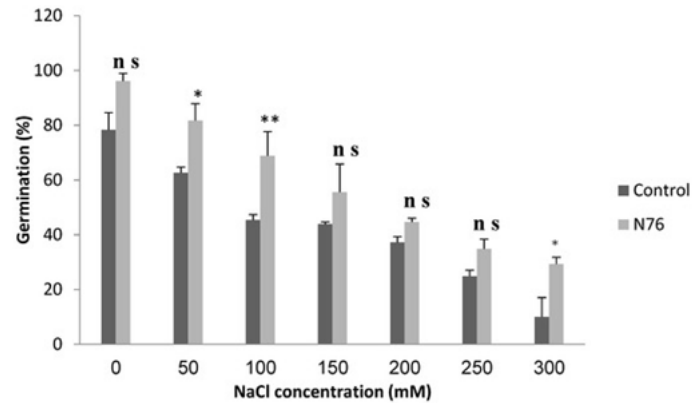
L'effet de la souche N76 sur la germination des graines de blé a été étudié sous différentes conditions de salinité (0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM de NaCl).

Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration en NaCl réduit significativement les taux de germination, tant chez les graines inoculées que chez les témoins non inoculés. Cependant, l'inoculation avec *P. azotoformans* a permis d'atténuer cet effet négatif, en améliorant de manière significative ( $p < 0,005$ ) le pourcentage de germination, notamment à 100 mM de NaCl.

À 0 mM, le taux de germination est passé de 78,33 % (témoin) à 96,11 % (inoculé). Sous conditions salines, l'amélioration est également marquée :

- **50 mM NaCl** : 62,66 % → 81,66 %
- **100 mM NaCl** : 45,33 % → 68,88 %
- **150 mM NaCl** : 43,88 % → 55,55 %
- **200 mM NaCl** : 37,66 % → 44,66 %
- **250 mM NaCl** : 24,88 % → 34,66 %
- **300 mM NaCl** : 10,00 % → 29,33 %

Ces résultats (Fig. 13) mettent en évidence la capacité de la souche *P. azotoformans* à stimuler la germination des graines de blé, même sous stress salin élevé, ce qui suggère son potentiel comme inoculant biostimulant pour améliorer la tolérance des cultures aux conditions de salinité.



**Figure 13. Effet de *P. azotoformans* sur la germination des graines de blé sous différentes concentrations de NaCl**

**N.S.** : aucune différence significative ; \* : différence significative ( $p < 0,05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0,005$ ).

La salinité exerce un impact négatif sur la germination des graines et la croissance des plantes en perturbant divers processus métaboliques, depuis la germination jusqu'à la maturité. Les stades précoces, tels que la germination et l'établissement des plantules, sont particulièrement sensibles au stress salin. Ainsi, l'atténuation de ses effets à ces étapes critiques augmente significativement les chances d'obtenir une culture réussie en conditions salines (Daliakopoulos et al., 2016).

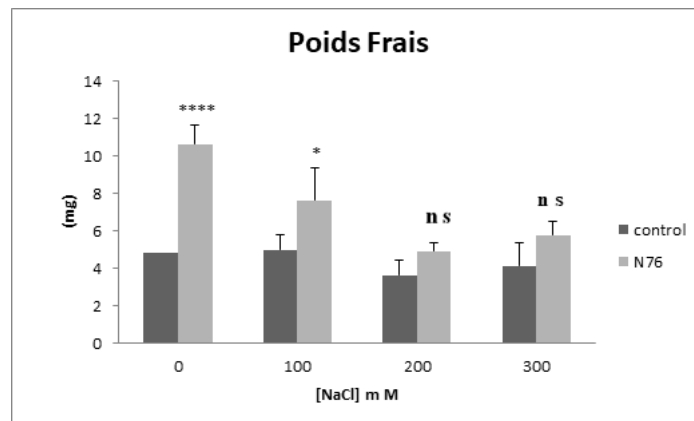
Dans notre étude, l'inoculation des graines de blé avec la souche *P. azotoformans* N76 a conduit à une augmentation significative du taux de germination par rapport aux témoins, aussi bien en absence de stress qu'en présence de différentes concentrations de NaCl. Ces résultats confirment l'importance de sélectionner des PGPB capables de tolérer et de survivre dans des environnements salins, afin de garantir leur efficacité comme inoculants. De nombreuses recherches antérieures corroborent ces observations, rapportant que l'inoculation avec des PGPB accroît les taux de germination, améliore la tolérance des plantes et stimule leur croissance sous stress salin (Tiwari et al., 2016 ; Nadeem et al., 2013).

### 3.3 Effet de *P. azotoformans* sur la croissance des semis de blé

Les résultats obtenus indiquent que la croissance des semis de blé est fortement affectée par l'augmentation des concentrations en NaCl (0, 100, 200 et 300 mM). Toutefois, l'amorçage des graines avec la souche N76 de *P. azotoformans* a permis d'atténuer l'effet délétère du stress salin et d'améliorer l'ensemble des paramètres de croissance mesurés (poids frais, poids sec, longueur des pousses et des racines).

En condition non saline (0 mM NaCl), l'inoculation bactérienne a entraîné une augmentation de 99,68 % du poids frais des plants par rapport aux témoins. Sous stress salin, les gains demeurent significatifs, avec une amélioration du poids frais de 92,95 % à 100 mM, 96,30 % à 200 mM et 70,10 % à 300 mM de NaCl (Fig. 14).

Ces résultats s'inscrivent dans la lignée de plusieurs travaux ayant montré que les PGPB halotolérants atténuent les effets néfastes de la salinité et favorisent la croissance du blé, notamment en améliorant la longueur des pousses ainsi que les poids frais et secs des plantes (Vessey et al., 2003 ; Singh et al., 2016). Par exemple, Bhise et al. (2017) ont rapporté qu'après 15 jours de croissance à 100 mM de NaCl, le poids frais des plants de blé inoculés avec un PGPB halotolérant atteignait  $2,92 \pm 0,02$  g, une valeur supérieure à celle observée dans notre étude.



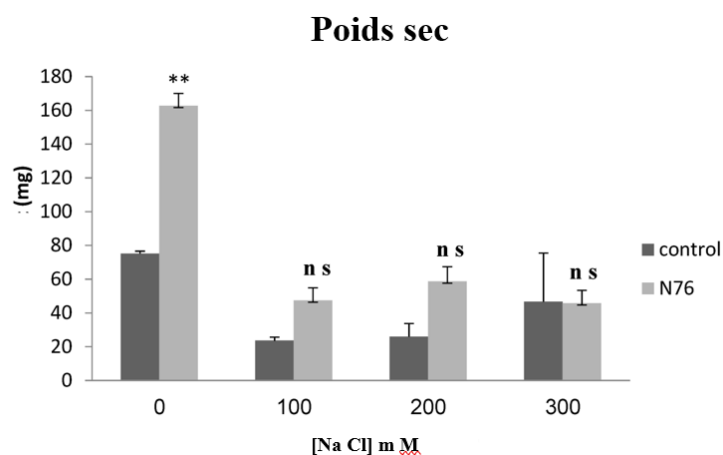
**Figure 14. Effet de *P. azotoformans* sur le poids frais des plantules de blé sous différentes concentrations de NaCl**

**N.S.** : aucune différence significative ; \* : différence significative ( $p < 0,05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0,0001$ ).

D'après nos résultats, l'inoculation avec la souche *P. azotoformans* N76 a permis d'augmenter le poids sec des plants de blé en conditions de 0, 100 et 200 mM de NaCl, avec

des gains respectifs de 116,41 %, 100,55 % et 125,61 % par rapport aux témoins. En revanche, à 300 mM de NaCl, aucun effet positif significatif n'a été observé sur le poids sec des plantules (Fig. 15).

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Bhise et al. (2017), qui ont également mis en évidence l'effet favorable de PGPB halotolérants sur l'accumulation de biomasse sèche du blé sous stress salin. De même, Bharti et al. (2016) ont montré une augmentation significative du poids sec du blé après inoculation avec une souche halotolérante, aussi bien en conditions non salines que salines, comparé aux plants non inoculés. Dans la même lignée, Emami et al. (2020) ont rapporté que l'inoculation de cultivars de blé avec des bactéries solubilisant le phosphate améliorait significativement les paramètres de croissance. Après 120 jours de culture, le poids sec des plants inoculés atteignait 10 g, contre des valeurs inférieures chez les témoins non inoculés.

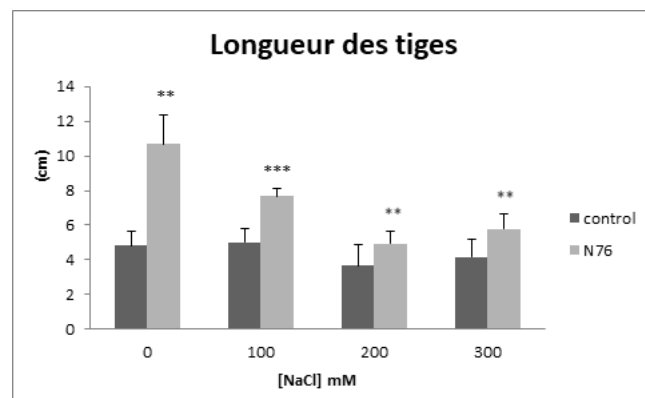


**Figure 15. Effet de *P. azotoformans* sur le poids sec des semis de blé sous différentes concentrations de NaCl**

N.S. : aucune différence significative ; \*\* : différence significative ( $p < 0,005$ ).

Nos résultats ont clairement montré que la longueur des pousses des plantules non inoculées diminuait avec l'augmentation des concentrations de NaCl. En revanche, l'inoculation avec la souche *P. azotoformans* a significativement stimulé la croissance des pousses, aussi bien en conditions de stress salin qu'en absence de sel, par rapport aux témoins non inoculés. Plus précisément, la longueur des pousses a augmenté respectivement de 47,82 %, 97,74 %, 85,43 % et 93,6 % aux concentrations de 0, 100, 200 et 300 mM de NaCl (Fig. 15).

Ces valeurs sont nettement supérieures à celles rapportées par Bharti et al. (2016), qui ont observé une longueur moyenne de pousse de blé de  $11,46 \pm 0,37$  cm après inoculation bactérienne à 100 mM de NaCl. De même, Pande et al. (2017) ont montré que l'inoculation de graines de maïs avec des bactéries solubilisant le phosphore favorisait une croissance significativement supérieure à celle du témoin non inoculé, un effet attribué à la production d'acides organiques (gluconique, formique et citrique) par ces souches. Par ailleurs, Iyer et al. (2017) ont rapporté une amélioration de la longueur et du poids des pousses lorsque les graines de pois chiches étaient inoculées avec des bactéries solubilisatrices de phosphate (PSB).



**Figure 16. Effet de *P. azotoformans* sur la longueur des pousses des plantules de blé sous différentes concentrations de NaCl**

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

Les résultats de notre enquête ont montré que sous différentes concentrations de NaCl, la souche de *P. azotoformans* a un effet positif sur la longueur des racines des plantules de blé par rapport au témoin. Ainsi, la longueur de la racine a été améliorée de 120,70 %, 53,2 %, 34,69 % et 39,42 % à 0, 100, 200 et 300 mM, respectivement (Fig .17). D'après ces résultats, l'augmentation de la croissance racinaire pourrait être due à une absorption accrue de phosphore dans les graines de blé inoculées avec la souche de *P. azotoformans*. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Ramadoss et al . (2013) où l'inoculation du blé avec des souches bactériennes halotolérantes a amélioré la croissance du blé sous stress salin (80 mM, 160 mM et 320 mM) et la longueur des racines a augmenté de 90 % par rapport aux témoins non inoculés à 320 mM de NaCl. Upadhyay et Singh (2015) ont également montré que l'inoculation du blé avec du PGPB augmentait la longueur des racines à 200 mM. De même, plusieurs études ont fait état d'une augmentation de l'absorption de phosphate dans les plantes

inoculées à la suite de la solubilisation du phosphore par le PGPB (Nico et al., 2012 ; Emami et al., 2020 ; Banaei-Asl et al., 2015).

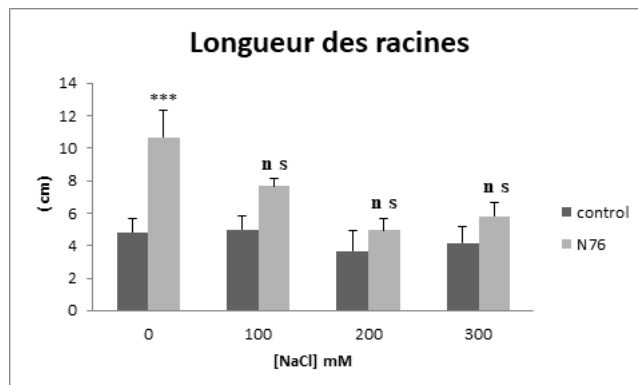


Figure 17. Effet de *P. azotoformans* sur la longueur des racines des plantules de blé sous différentes concentrations de NaCl

N.S. : aucune différence significative ; \*\*\* : différence significative ( $p < 0,001$ ).

### 3.4 Estimation quantitative du phosphate soluble dans le sol

Les souches de *Pseudomonas* jouent un rôle essentiel en tant que PGPB sous stress salin, notamment grâce à l'expression de divers traits bénéfiques (Nadeem et al., 2013 ; Srinivasan et al., 2012). Dans notre étude, l'inoculation des graines de blé avec *P. azotoformans* a amélioré l'ensemble des paramètres de croissance des plantules. Cette amélioration pourrait être attribuée à la capacité de la souche à solubiliser le phosphore présent dans le sol.

La teneur en phosphate soluble a été mesurée dans les sols où poussaient les semis de blé, afin d'évaluer l'effet de *P. azotoformans* sur la solubilisation du phosphore en conditions de salinité croissante (0, 100, 200 et 300 mM de NaCl). Avant le semis, la concentration en phosphate soluble dans le sol était de  $18,51 \pm 0,25$  ppm. Après 15 jours de culture, les semis non inoculés ont entraîné une diminution significative du phosphate soluble dans les sols arrosés avec 0 et 100 mM de NaCl. Cette baisse peut être expliquée par l'absorption du phosphore par les plantules, utilisé dans leur métabolisme au cours de la croissance. En revanche, dans les sols arrosés avec 200 et 300 mM de NaCl, la diminution a été plus faible, avec des valeurs respectives de  $17,82 \pm 0,56$  et  $17,52 \pm 0,62$  ppm (Tableau VII). Ces résultats suggèrent que le stress salin limite l'absorption du phosphate par les semis de blé.

Tableau 7. Disponibilité du phosphore (ppm) dans les sols témoins et les sols contenant des graines inoculées avec *P. azotoformans*

[NaCl] (mM)	0 mM	100 mM	200 mM	300 mM
Sol témoin	10,56 ± 0,33	12,6 ± 0,28	17,82 ± 0,56	17,52 ± 0,62
Sol inoculé (N76)	23,3 ± 0,74	49,42 ± 0,36	19,56 ± 0,45	19,5 ± 0,51

Les sols où poussaient les semis inoculés avec *P. azotoformans* présentaient une teneur en phosphate soluble nettement plus élevée que les témoins. La concentration maximale,  $49,42 \pm 0,36$  ppm, a été enregistrée dans un sol soumis à 100 mM de NaCl. Dans les sols arrosés avec 200 et 300 mM, la teneur en phosphate a également été légèrement augmentée par rapport aux témoins (Tableau VII).

Ces observations confirment les résultats de Srinivasan et al. (2012), qui ont montré que la libération de phosphate par les micro-organismes solubilisateurs diminue à mesure que la concentration en NaCl s'élève. La solubilisation microbienne du phosphore insoluble améliore sa disponibilité pour les racines, jouant ainsi un rôle déterminant dans le maintien de la nutrition phosphatée des plantes en conditions salines et non salines. La souche *P. azotoformans* pourrait également être valorisée dans le développement d'« engrais intelligents », comme le suggèrent Raimondi et al. (2021).

Les PGPB produisent divers métabolites d'un grand intérêt agronomique, ce qui leur confère une place croissante dans l'agriculture moderne. Dans le cadre de ce travail, nous avons montré que la répartition des bactéries telluriques productrices de ces métabolites (AIA, enzymes lytiques, substances antifongiques, etc.) ainsi que leurs interactions avec l'environnement sont influencées par la salinité. De ce point de vue, cette partie apporte des informations précieuses pour une meilleure compréhension de la distribution des traits PGP dans le sol. Néanmoins, des études complémentaires, notamment sur l'effet de la salinité sur la production quantitative et qualitative de ces métabolites, sont nécessaires afin d'approfondir la compréhension de l'impact du stress salin sur le comportement des bactéries du sol et de mieux valoriser les résultats obtenus.

Les bactéries productrices d'enzymes lytiques présentent un intérêt particulier en agriculture, car elles participent à la dégradation de la matière organique et à l'enrichissement des sols en éléments nutritifs indispensables au développement des plantes. Par ailleurs, elles trouvent également des applications potentielles dans divers secteurs industriels, tels que l'agroalimentaire, la pharmacie ou la cosmétique.

Nos résultats ont révélé que l'augmentation de la conductivité électrique des échantillons de sol entraînait une diminution de la production de métabolites d'intérêt agronomique (AIA, enzymes lytiques, etc.). Ainsi, la salinité affecte directement les performances des PGPB dans le sol. Les activités de production d'enzymes hydrolytiques, de synthèse d'AIA, de fixation biologique de l'azote ainsi que de solubilisation du phosphate, du potassium et du silicium sont davantage exprimées chez des bactéries isolées de sols non affectés par la salinité. En outre, une humidité élevée du sol favorise la production de substances antifongiques, sans pour autant influencer la synthèse des autres métabolites. De plus, les sols caractérisés par de faibles teneurs en matière organique hébergent une proportion plus importante de bactéries fixatrices d'azote, solubilisatrices du phosphate, du potassium et du silicium, ainsi que productrices d'enzymes hydrolytiques et d'AIA. Ces résultats mettent en évidence l'existence de relations complexes entre les paramètres physico-chimiques du sol et le profil métabolique des PGPB qui s'y développent.

Certaines pratiques agricoles intensives ont permis d'améliorer les rendements à l'échelle mondiale. Cependant, l'irrigation excessive ainsi que l'usage massif d'engrais chimiques, de fongicides, de pesticides et d'herbicides synthétiques ont contribué de manière significative à la salinisation des sols, à la pollution des agroécosystèmes et à l'altération de la

qualité nutritionnelle des denrées agricoles. C'est dans ce contexte que la deuxième partie de notre travail a consisté à isoler et sélectionner, *in vitro*, une souche bactérienne tellurique présentant un potentiel comme biofertilisant et comme restauratrice de la croissance végétale en conditions de stress salin.

La salinité réduit fortement la croissance, la biomasse et la productivité des plantes. Dans ce cadre, nous avons identifié et sélectionné la souche *P. azotoformans* N76, une bactérie halotolérante possédant un arsenal de métabolites d'intérêt agronomique. Cette souche s'est révélée capable de fixer l'azote atmosphérique, de solubiliser le phosphate inorganique, de minéraliser le phosphate organique, de produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques et de synthétiser des quantités significatives d'AIA, y compris en conditions de stress salin. Elle a également montré une capacité à améliorer la germination des graines et la croissance des plantules de blé (*Triticum aestivum*) soumises à une salinité induite. Ces résultats désignent *P. azotoformans* N76 comme un biofertilisant prometteur pour la culture du blé dans des sols affectés par la salinité. Toutefois, des essais complémentaires, menés *in vivo* et en conditions de champ, sont indispensables pour évaluer son effet à des stades prolongés du développement végétal, son impact sur le rendement final, ainsi que ses effets à long terme sur les propriétés du sol et sur les interactions blé-PGPB qui sous-tendent l'amélioration de la croissance.

En conclusion, ce travail constitue une contribution originale à la compréhension du comportement des PGPB en conditions de stress salin, à l'analyse de la distribution des traits PGP dans les bactéries telluriques et à la mise en place de stratégies de formulation d'engrais biologiques. Il ouvre la voie à la sélection et à la valorisation de bactéries bénéfiques en agriculture durable. Toutefois, des recherches supplémentaires sont indispensables pour approfondir cette thématique, et les résultats obtenus ici fourniront une base solide pour orienter les futures investigations.

**Abd El-Azeem S. A. M., Mehana T. A. et Shabayek A. A. (2007).** Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. African Crop Science Conference Proceedings, El-Minia, Egypt. 8, 1517-1525.

**Abdel-Salam M.A., Shams A.S. (2012).** Feldspar-K fertilization of potato (*Solanum tuberosum* L.) augmented by biofertilizer. J. Agric. Environ. Sci. 12, 694-699.

**Abou-el-Seoud., Abdel-Megeed A(2012).** Impact of rock materials and biofertilizations on P and K availability for maize (*Zea maize*) under calcareous soil conditions. Saudi J Biol Sci .19:55–63.

**Adam A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxgénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat en Science. Université de Liège, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique, 165p.

**Adhikari P., Jain R ., Sharma A ., Pandey A. ( 2021).** Plant Growth Promotion at Low Temperature by Phosphate-Solubilizing *Pseudomonas Spp.* Isolated from High-Altitude Himalayan. *Soil.Microb. Ecol.* 82, 677–687.

**Ahemad M., Kibret M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University - Science 26, 1–20.

**Ahmad M., Zahir Z.A., Asghar H.N., Asghar M.(2011).** Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can J Microbiol 57, 578–589.

**Ahmad N., Shinwari Z.K., Bashir S., Yasir, M. (2013).** Function and phylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with GM and non-GM maize. Pak. J. Bot. 45(5): 1781-1788.

**Ahmadzadeh M. et Tehrani A.H. (2009).** Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. Biol. Control. 48, 101-107.

**Ait Bessai S., Bensidhoum L. et Nabti E. (2022b).** Optimization of IAA production by telluric bacteria isolated from northern Algeria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 41, 1878-8181.

**Ait Bessai S., Corrêa A., Cruz C., Yadav A. N. et Nabti E. (2022a).** Plant Growth Promoting Microbes as Biofertilizers: Promising solutions for sustainable agriculture under climate change associated abiotic stresses. *Plant Science Today*. 8 (sp1): 60-76.

**Ajouz S. (2009).** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèses de doctorat de Pathologie Végétale. Université d'avignon et des pays de vaucluse. Faculté des Sciences, Avignon, 198p.

**Aleksandrov V.G. (1985).** Organo-mineral fertilizers and silicate bacteria. *Dokl Akad Nauk* .7:43–8.

**Allen S., Nair V., Graetz D., Jose S., Nair P. (2006).** Phosphorus loss from organic versus inorganic fertilizers used in alleycropping on a Florida Ultisol. *Agriculture Ecosystems & Environment* 117, 290–298.

**Almeida H.J., Pancelli M.A., Prado R.M., Cavalcante V.S., Cruz F.J.R.(2015).** Effect of potassium on nutritional status and productivity of peanuts in succession with sugar cane. *Journal of soil science and plant nutrition* 15, 1–10.

**Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O.(2017).** Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front Microbiol* 8, 971.

**Anjanadevi I.P., John N.S., John K.S., Jeeva M.L., Misra R.S. (2016).** Rock inhabiting potassium solubilizing bacteria from Kerala, India: characterization and possibility in chemical K fertilizer substitution. *J. Basic Microbiol.* 56, 67-77.

**Antoun H. et Prévost D. (2005).** Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Siddiqui Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Netherlands. pp.1-38.

**Archana D., Nandish M., Savalagi V., Alagawadi A. (2013).** Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. *BIOIN FOLET-A Quarterly J. Life Sci.* 10, 248-257.

**Archana D.S., Nandish M.S., Savalagi V.P., Alagawad, A.R. (2012).** Screening of potassium solubilizing bacteria (KSB) for plant growth promotional activity. *BIOINFOLET-A Quarterly J. Life Sci.* 9, 627-630.

**Ashraf M. et Foolad M.R. (2007).** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Experim. Bot.* 59, 206-216.

**Ashraf M., Ahmad M. S. A., Öztürk M. et Aksoy A. (2012).** Crop Improvement through Different Means: Challenges and Prospects. In: Ashraf, M. et al. (eds). *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 1-15.

**Athar H. R. et Ashraf M. (2009).** Strategies for Crop Improvement against Salinity and Drought Stress: An Overview. In: Ashraf, M. (ed). *Salinity and Water Stress*. Springer Science + Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 1-16.

**Avinash T.S. et Rai R.V. (2014).** Antifungal activity of plant growth promoting rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. of Cucurbitaceae. In: Kharwar RN et al. (eds.) *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, Springer, India, pp. 257-264.

**Awasthi R., Tewari R., Nayyar H. (2011).** Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. *Int. Res. J. Microbiol.* 2, 484-503.

**Babalola O.O., Glick B.R. (2012).** The use of microbial inoculants in African agriculture: Current practice and future prospects. *J. Food Agric. Environ.* 10 (3-4), 540-549.

**Baca B.E. et Elmerich C. (2007).** Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C., Newton W.E. (Eds). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, Springer, Netherlands. pp. 113-143.

**Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian, S., Smith D.L. (2018).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci* 9, 1473.

**Badr M.A. (2006).** Efficiency of K-feldspar combined with organic materials and silicate dissolving bacteria on tomato yield. *J Appl Sci Res* .2:1191-8.

**Bagyalakshmi B., Ponmurugan P., Balamurugan A. (2012).** Impact of different temperature, carbon and nitrogen sources on solubilization efficiency of native potassium solubilizing bacteria from tea (*Camellia sinensis*). J Biol Res .3(2):36–42.

**Bakhshandeh E., Pirdashti H., Lendeh K.S. (2017).** Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. Ecol. Eng. 103, 164 169.

**Bakthavatchalu S., Shivakumar S. et Sullia S.B. (2012).** Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluation of their potential as biocontrol agents. Acta Biologica Indica. 1(1), 61-67.

**Bakyalakshmi B., Ponmurugan P., Balamurugan A. (2012).** Impact of different temperature, carbon and nitrogen sources on solubilization efficiency of native potassium solubilizing bacteria from tea (*Camellia sinensis*). J Biol Res. 3(2):36–42.

**Banaei-Asl F., Bandehagh A., Uliaei E.D., Farajzadeh D., Sakata K., Mustafa G., Komatsu S.(2015).** Proteomic analysis of canola root inoculated with bacteria under salt stress. J. Proteom. 124, 88–111.

**Barles S., Breyse D., Guillerme A. et Laeyval C. (1999).** Le Sol Urbain. Collection VILLES, Economica, Paris. 278p.

**Barriuso J., Solano B. R., Lucas J. A., Lobo A. P., García-Villaraco A. et Mañero F. J. G. (2008).** Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad, I., Pitchel, J. and Hayat, S. (eds). Plant-Bacteria interaction: Strategies and techniques to promote plant growth. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 1-17.

**Basak B.B., Biswas D.R. (2010).** Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop. Biol Fertil Soils .46:641–8.

**Basak B.B., Biswas D.R. (2012).** Modification of waste mica for alternative source of potassium: evaluation of potassium release in soil from waste mica treated with potassium solubilizing bacteria (KSB). Germany: Lambert Academic Publishing.ISBN 978-3-659-29842-4.

**Belkebla N., Ait Bessai S.; Melo J., Caeiro M.F., Cruz C., Nabti, E.H. (2022).** Restoration of *Triticum aestivum* growth under salt stress by phosphate-solubilizing bacterium isolated from southern .<https://doi.org/10.3390/agronomy12092050>.

**Bello S.K., Alayafi A.H., AL-Solaimani S G., Abo-Elyousr K.A.M. (2021).** Mitigating Soil Salinity Stress with Gypsum and Bio-Organic Amendments: A Review. *Agronomy* 11, 1735.

**Beneduzi A., Ambrosini A. et Passaglia L.M.P. (2012).** Plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 4 (suppl), 1044-1051.

**Bensidhoum L., Ait Bessai S. et Nabti E. (2019).** Restoration of Plant Growth Under Saline Soil by Halotolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: Kumar, M., Etesami, H., Kumar, V. (Eds.), *Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*. Springer, Singapore, pp. 23-51.

**Berman-Frank I., Antonietta Q., Zoe V.F., Andrew J. I., Haramaty Liti H. (2007).** Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria, *Limnology and Oceanography*, 52, doi: 10.4319/lo.2007.52.5.2260.

**Bertrand J. C., Bonin P., Caumette P., Gattuso J. P., Grégori G., Guyoneaud R., Le Roux X., Matheron R., Poly, F. (2015).** Biogeochemical Cycles. In: Bertrand JC et al. (eds.) *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology*, Springer Science+Business Media Dordrecht. pp 511-617.

**Bharti N., Pandey S.S., Barnawal D., Patel V., Kalra A. (2016).** Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Sci. Rep.* 6, 34768.

**Bhattacharyya P. N. et Jha D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327–1350.

**Bhise K.K., Bhagwat P.K., Dandge P.B. (2017).** Synergistic effect of *Chryseobacterium gleum* sp. SUK with ACC deaminase activity in alleviation of salt stress and plant growth promotion in *Triticum aestivum* L . 3. *Biotech* .7,105.

**Bhushan B. et Hoondal G.S (1998).** Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnology Letters*, 20, 157-159.

**Bist V., Niranjana A., Ranjan M., Lehri A., Seem K., Srivastava S.(2020).** Silicon-Solubilizing Media and Its Implication for Characterization of Bacteria to Mitigate Biotic Stress. *Frontiers in Plant Science* 11.

**Blaylock A.D. (1994).** Soil salinity, salt tolerance, and growth potential of horticultural and landscape plants. University of Wyoming, Cooperative Extension Service, Department of Plant.

**Bric J. M., Bostock R. M. et Silverstone S. E. (1991).** Rapid in Situ Assay for Indole Acetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535-538.

**Bruggen V.J., Wichern F., Joergensen R. (2006).** Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. *Geoderma* 137, 100–108.

**Brusamarello-Santos L. C. C., Pacheco F., Aljanabi S. M. M., Monteiro R. A., Cruz L. M., Baura V. A., Pedrosa F. O., Souza E. M. et Wassem R. (2012).** Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 356: 113-125.

**Burns R.G. et Wallenstein M. (2010).** Microbial extracellular enzymes and natural and synthetic polymer degradation in soil: current research and future prospects. In: 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 2010 August 1 - 6, Brisbane, Australia. 2010, p. 67-69.

**Caldwell B.A. (2005).** Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia.* 49, 637- 644.

**Calvo P., Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E. et Zúñiga D. (2010).** Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Braz J Microbiol.* 41, 899-906.

**Carrim A.J.I., Barbosa E.C. et Gonçalves Vieira J.D. (2006).** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of Jacaranda decurrens Cham. (Carobinha-do-campo). Braz. Arch. Biol. Technol. 49, 353-359.

**Chandra D., Srivastava R., Gupta V.V., Franco C.M. et Sharma A.K. (2019).** Evaluation of ACC-deaminase-producing rhizobacteria to alleviate water-stress impacts in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Can J Microbiol. 65(5):387-403.

**Chen W., Yang F., Zhang L., Wang J. (2015).** Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *Pseudomonas sp.* PSB12: effects of phosphorus forms and carbon sources. *Geomicrobiol J.* 33(10), 870–877.

**Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A., Young C.C. (2006).** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol.* 34,33–34.

**Chet I., Ordentlich A., Shapira R. et Oppenheim A. (1990).** Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant Soil.* 129, 85-92.

**Chowdhury N., Marschner P., Burns R.G. (2011).** Soil microbial activity and community composition: impact of changes in matric and osmotic potential. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1229–1236.

**Christensen W. B. (1946).** Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from Salmonella and Shigella Types. *J. Bacteriol.* 52, 461-466.

**Chung H., Park M., Madhaiyan M., Seshadri S., Song, J., Cho H. et Sa T. (2005).** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1970-1974.

**Collin B., Doelsch E., Keller C., Cazevielle P., Tella M., Chaurand P., Panfili F., Hazemann J.L., Meunier J.D. (2014).** Evidence of sulfur-bound reduced copper in bamboo exposed to high silicon and copper concentrations. *Environmental Pollution.* Volume 187, Pages 22-30.

**Cookson P. (1999).** Spatial Variation of Soil Urease Activity Around Irrigated Date Palms. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 13, 155–169.

**Cornelis G.T., Delvaux B., Georg R.B., Lucas Y., Ranger J., Opfergelt S. (2011).** Tracing the origin of dissolved silicon transferred from various soil-plant systems towards rivers: a review. *Biogeosciences* 8 (1), 89-112, 2011.

**Crespo, J., Boiardi J. et Luna M. (2011).** Mineral phosphate solubilization activity of *gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agric Sci.* 2:16-22.

**Dakora F.D., Nelwamondo A. (2003).** Silicon nutrition promotes root growth and tissue mechanical strength in symbiotic cowpea. *Functional Plant Biology* 30 (9), 947-953.

**Daliakopoulos I.N., Tsanis I.K., Koutroulis A., Kourgialas N.N., Varouchakis A.E., Karatzas G.P., Ritsema C.J. (2016).** The threat of soil salinity: A European scale review. *Sci. Total Environ.* 573, 727–739.

**Darrah PR. (1993).** The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. In: Barrow, N. J. (Ed). *Plant nutrition-from genetic engineering to field practice*. Kluwer Academic Publishers, USA, pp 3-22.

**Dashti N., Zhang F., Hynes R. et Smith D.L. (1998).** Plant growth promoting rhizobacteria accelerates nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. *Plant Soil.* 200: 205-213.

**Deacon J. (2005).** Chapter 14: Fungi as plant pathogens. 2005 Issue. (accessed.15.04.2016)

**Dikilitas M. et Karakas S. (2012).** Behavior of Plant Pathogens for Crops Under Stress During the Determination of Physiological, Biochemical, and Molecular Approaches for Salt Stress Tolerance. In: Ashraf, M. et al. (eds). *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, pp 417-441.

**Dinesh R., Anandaraj M., Kumar A., Bini Y. K., Subila K. P. et Aravind R. (2015).** Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiol. Res.* 173, 34-43.

**Dupont C.L., Rusch D.B., Yooseph S., Lombardo M.J., Richter A., Valas R., Novotny M., Yee-Greenbaum J., Selengut J.D., Haft D.H., Halpern A.L., Lasken R.S.,**

**Nealson K., Friedman R., Venter J.C. (2012).** Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage, *The ISME Journal*, Volume 6, Issue 6, Pages 1186–1199.

**Dutta S. et Podile A. R. (2010).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Crit. Rev. Microbiol.* 36(3): 232–244.

**E. El-Barougy E., Fayzalla, E.A., M.M. El-Rayes. (2009).** Control of soil-borne pathogenic fungi of soybean by biofumigation with mustard seed meal. *J. Applied Sci.*, 5: 2272-2279.

**Edi Premono M., Moawad A.M., Vlek P.L.G. (1996).** Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones J Crop Sci.* 11, 13–23.

**Egamberdieva D. (2008).** Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turk. J. Biol.* 32, 9-15.

**Egamberdieva D. (2009).** Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta. Physiol. Plant.* 31, 861-864.

**Egamberdieva D. Jabborova D. et Hashem A. (2015).** Pseudomonas induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to Fusarium root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.019>. *Saudi J Biol Sci.* 22, 773-79.

**Eijkmann C. (1901).** Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Zentralbl. Bakt. Parasitenkd. Infektionskr.* 29, 841-848.

**Emami S., Alikhani H.A., Pourbabaee A.A., Etesami H., Motasharezadeh B., Sarmadian F. (2020).** Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improve phosphorus use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere* .14, 100196.

**Epstein E (1999).** Silicon. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 50:641–664.

**Esitken A., Yildiz H.E., Ercisli S., Figen Donmez M., Turan M., Gunes A. (2010).** Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia horticulturae*.

**Etesami H., Alikhani H. A. et Hosseini H. M. (2015).** Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*. 2, 72-78.

**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, 897–911.

**Etesami H., Jeong B.R. (2022).** Chapter 19 - Biodissolution of silica by rhizospheric silicate-solubilizing bacteria, Silicon and Nano-silicon in Environmental Stress Management and Crop Quality Improvement. Academic Press. Pages 265-276.

**Fageria N.K., Gheyi H.R., Moreira A. (2011).** Nutrient Bioavailability in Salt Affected Soils. *Journal of Plant Nutrition* 34, 945–962.

**FAO. (2002).** Rapport du Sommet mondial de l'alimentation : cinq ans après. Rome, 10-13 juin 2002. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/005/y7106f.pdf>.

**FAO. (2012).** Alexandratos, N. et J. Bruinsma. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.

**Farooq M.A., Dietz K.-J. (2015).** Silicon as Versatile Player in Plant and Human Biology: Overlooked and Poorly Understood. *Frontiers in Plant Science* 6.

**Fawaz K., Mohammad A. (2013).** Growth and nitrogen fixation in silicon and/or potassium fed chickpeas grown under drought and well watered conditions. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, vol. 9, no. 3. pp. 385-406.

**Feng J., Shi Q., Wang X., Wei M., Yang F., Xu H. (2010).** Silicon supplementation ameliorated the inhibition of photosynthesis and nitrate metabolism by cadmium (Cd) toxicity in *Cucumis sativus* L., *Scientia Horticulturae*. Volume 123, Issue 4, Pages 521-530.

**Fernández García I., Lecina S., Ruiz-Sánchez M.C., Vera J., Conejero W., Conesa M.R., Domínguez A., Pardo J.J., Lélis B.C., Montesinos P.(2020).** Trends and Challenges in Irrigation Scheduling in the Semi-Arid Area of Spain. *Water* 12, 785.

**Fickers P. J. et Destainand P Thonart. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 119-130.

**Figueiredo M. V. B., Seldin L., de Araujo F. F. et Mariano R. L. R. (2010).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In: Maheshwari, D. K. (ed). Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, pp 21-43.

**Fisher K., Newton W.E. (2004).** Nitrogen Fixation: An Historical Perspective, in: Smith, B.E., Richards, R.L., Newton, William E. (Eds.), Catalysts for Nitrogen Fixation: Nitrogenases, Relevant Chemical Models and Commercial Processes, Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–31.

**Freire E A., Laime E.M.M., Navilta V., do N., Santos, J. D.L. (2009).** Análise dos riscos de salinidade do solo do perímetro irrigado de Forquilha, Ceará. Revista Educação Agrícola Superior 24, 62–66.

**Gadd G.M. (2007).** Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycol Res 111, 3–49.

**Gamalero E., Berta G., Glick B.R. (2009).** The use of microorganisms to facilitate

**Gamalero E., Bona E., Todeschini V., Lingua G. (2020).** Saline and Arid Soils: Impact on Bacteria, Plants, and Their Interaction. Biology (Basel) 9, 116.

**Garbarino J., Bednar A.J., Rutherford D.W., Beyer R.S., Wershaw R. (2003).** Environmental Fate of Roxarsone in Poultry Litter. I. Degradation of Roxarsone during Composting. Environmental science & technology 37, 1509–14.

**Garg N., Bhandari P. (2016).** Silicon nutrition and mycorrhizal inoculations improve growth, nutrient status,  $K^+/Na^+$  ratio and yield of *Cicer arietinum* L. genotypes under salinity stress. *Plant Growth Regul* 78, 371–387.

**Ghoul M. (1990).** Halotolerance de *Escherichia coli*, Effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de doctorat, université de Rennes I, U.F.R. de PHARMACIE. Soutenue publiquement le : 2 juillet 1990.

**Glick B. R., Ghosh S., Liu, C., Dumbroff E. B. (1997).** Effects of a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (*Pseudomonas putida* GR12-2) on the Early Growth of Canola

Seedlings. In: A. A. and W. Y. (eds.) *Biology of Root Formation and Development*. Plenum Press, New York. pp. 253-258.

**Glick B. R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109-117.

**Glick B. R., Ghosh S., Liu C. et Dumbroff E. B. (1997).** Effects of a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (*Pseudomonas putida* GR12-2) on the Early Growth of Canola Seedlings. In: A. A. and W. Y. (eds.) *Biology of Root Formation and Development*. Plenum Press, New York. pp. 253-258.

**Goldstein A.H. (1994).** Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the soil utilization of exogenous mineral phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorni A, Yagil E, Silver S, editors. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. Washington: ASM Press; ISBN 1555810802 p. 197–203.

**Golubyatnikov L. L., Mokhov I. I., Eliseev, A. V. (2013).** Nitrogen Cycle in the Earth Climatic System and Its Modeling. *Atmospheric and Oceanic Physics.* 49(3): 229–243.

**Govindarajan M., Balandreau J., Kwon S. W., Weon H. Y. et Lakshminarasimhan C. (2008).** Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. *Microb. Ecol.* 55: 21-37.

**Gray E. J. et Smith D. L. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil. Biol. Biochem.* 37: 395–412.

**Grover A., Aggarwal P., Kapoor A., Katiyar-Agarwal S., Agarwal M., Chandramouli A. (2003).** Addressing abiotic stresses in agriculture through transgenic technology. *Current Science* 84.

**Gupta G, Parihar SS, Ahirwar NK, Snehi SK, Singh V (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol* 7: 096-102.

**Gusain Y., Singh U., & Sharma A. (2015).** Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 14(9), 764–773.

**Habib S. H., Kausar H., Saud H.M., Ismail M. R. et Othman R. (2015).** Molecular Characterization of Stress Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Growth Enhancement of Rice. *International Journal of Agriculture and Biology*. doi: 10.17957/IJAB/15.0094.

**Habibi S., Djedidi S., Prongjunthuek K., Mortuza M. D. F., Ohkama-Ohtsu N., Sekimoto H. et Yokoyoma, T.(2014).** Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil*. 379: 51-66.

**Hamayun M., Khan S.A., Ahmad N., Tang D.S., Kang S.M., Na C.I., Sohn E.Y., Hwang Y.H., Shin D.H., Byung-Hyun Lee B.H., Kim J.G., Lee I.J.(2009).** *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* .25 (4), 627-632.

**Han H.S., Lee K.D. (2005).** Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of eggplant. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 1, 176-180.

**Han H.-S., Lee K.D. (2006).** Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant soil Environ.* 52, 130.

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

**Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Elsas J.D. van. (2008).** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16, 463–471.

**Hartmann A. (1996).** Biotechnological aspects of diazotrophic bacteria associated with rice In: Rahman et al. (eds.) *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*. Springer Science+Business Media Dordrecht. pp 211-224.

**Hartmann A., Prabhu S.R., Galinski E.A. (1991).** Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil* .137, 105–109.

**Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M. (2008).** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7–14.

**Hasan M., Bano A., Hassan S. G., Iqbal J., Awan U., Rong-ji D. et Khan K. A. (2014).** Enhancement of Rice Growth and Production of Growth-Promoting Phytohormones by Inoculation with Rhizobium and Other Rhizobacteria. *World Appl. Sci. J.* 31, 1734-1743.

**Hellal F.A., Abdelhameid M., Abo-Basha D.M., Zewainy R.M. (2012).** Alleviation of the adverse effects of soil salinity stress by foliar application of silicon on Faba bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Applied Sciences Research.*(4428–4433).

**Holguin G et Glick B.R. (2001).** Expression of ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol.* 41, 81-288.

**Hopkins W.G. (2003).** *Physiologie végétale.*

**Hu X., Chen J., Guo J. (2006).** Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World j. Microbiol. Biotechnol.* 22, 983-990.

**Huang P., Patel M., Santagata M.C. et Bobet A. (2009).** Classification of Organic Soils. Publication FHWA/IN/JTRP-2008/02, Joint Transportation Research Program, Indiana Department of Transportation and Purdue University, West Lafayette, Indiana.

**Huang P., Patel M., Santagata M.C., Bobet A. (2009).** Classification of Organic Soils. Publication FHWA/IN/JTRP-2008/02, Joint Transportation Research Program, Indiana Department of Transportation and Purdue University, West Lafayette, Indiana. doi: 10.5703/1288284314328

**Idriss E.E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T., Borriss R. (2002).** Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect. *Microbiology* .148, 2097.

**Iniguez A. L., Dong Y. et Triplett E. W. (2004).** Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17(10): 1078-1085.

**Iyer B.n., Rajput M.S., Rajkumar S. (2017).** Effect of succinate on phosphate solubilization in nitrogen fixing bacteria harbouring chick pea and their effect on plant growth. *Microbiol. Res.* 202, 43–50.

**James E.K., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani J. I., Dobereiner, J. (1994).** Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* 45(275): 757-766.

**Jamil A., Riaz S., Ashraf M. et Foolad M. R. (2011).** Gene expression profiling of plants under salt stress. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 30, 435–458.

**Jha B.K., Gandhi Pragash M., Cletus J., Raman G., Sakthivel N. (2009).** Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World J. Microb. Biot.* 25,573–581.

**Jha C. K. et Saraf M. (2012).** Hormonal Signaling by PGPR Improves Plant Health under Stress Conditions. In: Maheshwari, D. K. (ed). *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, pp 119-140.

**Jha P. et Kumar A. (2009).** Characterization of Novel Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from Wheat Plant. *Microb. Ecol.* 58, 179 - 188.

**Jiang H., Dong H., Yu B., Liu X., Li Y., Ji S., Zhang C. (2007).** Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan Plateau. *Environmental microbiology* 9, 2603–21.

**Johnson S.N., Ryalls M.W.J., Gherlenda A. N., Frew A., Hartley S.E. (2018).** Benefits from below: Silicon supplementation maintains legume productivity under predicted. *Frontiers in Plant Science* 9, 202.

**Kader M.A., Mian M.H. et Hoque M. S. (2002).** Effects of *Azotobacter* inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat. *J. Biol. Sci.* 2(4): 259-261.

**Kang G., Li G., Wu Y., Liu G., Wang Y., Guo T. (2017).** Large-scale Proteomics Combined with Transgenic Experiments Demonstrates An Important Role of Jasmonic Acid in Potassium Deficiency Response in Wheat and Rice. *Molecular & Cellular Proteomics*, Volume 16, Issue 11, 1889 – 1905.

**Kardoni F., Mosavi S. J. S., Parande S., Torbaghan M. E. (2013).** Effect of salinity stress and silicon application on yield and component yield of faba bean (*Vicia faba*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)*, (814–818).

**Kathiresan K., Saravanakumar K., Anburaj R., Gomathi V., Abirami G., Sahu S.K., Anandhan S. (2011).** Microbial enzyme activity in decomposing leaves of mangroves. Intl. J. Adv. Biotech. Res. 2(3): 282-389.

**Kaur G. et Reddy M. S. (2015).** Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping Cycle and Economics. Pedosphere. 25(3): 428–437.

**Kavitha T., Nelson R. et Jesi S. J. (2013).** Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Int. J. Pharm. Bio. Sci. 4, 177 - 186.

**Khan M.S., Zaidi A., Musarrat J.(2009).** The growth of plants in saline soils. In: *Microbial strategies for cropimprovement*. Eds.; Springer : Dordrecht Heidelberg, London . pp.1–22.

**Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A. (2007).** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. Agron. Sustain. Dev. 27, 29–43.

**Kiran P. P., Akshit P., Chris P.C. (2016).** Plant growth promotion and nitrogen fixation in canola (*Brassica napus*) by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa* and its GFP-tagged derivative in a long. Botany 94 (12), 1209-1217.

**Kobayashi D.Y., Reedy R.M., Bick J.A. et Oudemans P.V. (2002).** Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. Appl Environ Microbiol. 68, 1047-1054.

**Kohler J., Caravaca F., Carrasco L., Roldán, A. (2007).** Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. Appl. Soil Ecol. 35:480–487.

**Krishnaraj P.U. et Dahale S. (2014).** Mineral Phosphate Solubilization: Concepts and Prospects in Sustainable Agriculture. Proc. Indian. Natn. Sci. Acad. 80:389-405.

**Kucey R.M.N. (1988).** Effect of *Penicillium biloji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. Can J Soil .68:261–7.

**Kumar A., Kumar K., Kumar P., Maurya R., Prasad S. et Singh S. K. (2014).** Production of indole acetic acid by *Azotobacter* strains associated with mung bean. *Plant Arch.* 14, 41-42.

**Kumar A., Singh S., Gaurav A.K., Srivastava S., Verma J.P. (2020).** Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. *Front Microbiol.* 11, 1216.

**Kumar V., Behl R. K. et Narula N. (2001).** Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiol. Res.* 156: 87-93.

**Kumar V., Singh P., Jorquera M.J., Sangwan P., Kumar P., Verma A.K., Agrawal S. (2013).** Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World J Microbiol Biotechnol.* 29, 1361–1369.

**Kurdali F., Al-Chammaa M., Al-Ain F. (2019).** Growth and N<sub>2</sub> fixation in Saline and/or Water Stressed *Sesbania aculeata* Plants in Response to Silicon Application. *Silicon* 11, 781–788.

**Labuschagne N., Pretorius T. et Idris A.H. (2010).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. In: Maheshwari D.K. (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 211- 230.

**Labuschagne N., Pretorius T. et Idris A.H. (2010).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. In: Maheshwari D.K. (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 211 -230.

**Lapinskas E. et Motuzienė L. P. (2006).** The influence of soil acidity on symbiotic and non-symbiotic nitrogen fixation. *Zemdirbyste.* 93(4): 210-220.

**Laskar F., Sharma G. D. et Deb B. (2013).** Characterization of Plant Growth Promoting Traits of Diazotrophic Bacteria and their Inoculating Effects on Growth and Yield of Rice Crops. *Global Res. Anal.* 2(4): 2277-8160.

**Lavakush Yadav J. et Verma J. P. (2012).** Isolation and Characterization of Effective Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Rice Rhizosphere of Indian Soil. *Asian J. Biol. Sci.* 5: 294-303.

**Leaungvutiviroj C., Ruangphisarn P., Hansanimitkul P., Shinkawa H., Sasaki K. (2010).** Development of a new biofertilizer with a high capacity for N<sub>2</sub>fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Biosci Biotechnol Biochem* .74(5):1098–1101.

**Lee K.E., Adhikari A., Kang S.M., You Y.H., Joo G.J., Kim J.H., Kim S.J., & Lee, I.J. (2019).** Isolation and Characterization of the High Silicate and Phosphate Solubilizing Novel Strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that Promotes Growth in Rice Plants. *Agronomy*, 9(3), 144.

**Leyval C. et Berthelin J. (1989).** Interaction between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium agrobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil*. 117: 103-110.

**Li F., Li S., Yang Y., Cheng L. (2006).** Advances in the study of weathering products of primary silicate minerals, exemplified by mica and feldspar. *ACTA PETROLOGICA ET MINERALOGICA* 25, 440–448.

**Lian B., Fu P.Q., Mo D.M., Liu C.Q. (2002).** A comprehensive review of the mechanism of potassium release by silicate bacteria. *Acta Mineral Sinica* .22:179.

**Lian L.H., Tian B.Y., Xiong R., Zhu M.Z., Xu J. et Zhang D.Q. (2007).** Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. *Lett Appl Microbiol.* 45, 262-269.

**Lin Y.H. and Xia F.S. (2002).** Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*. 52(1): 66-72.

**Liu C.H., Siew W., Hung Y.T., Jiang Y.T., Huang, C.H. (2021).** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Gene in *Pseudomonas azotoformans* is Associated with the Amelioration of Salinity Stress in Tomato. *J. Agric. Food Chem.* 69, 913–921.

**Liu D., Lian B., Dong H. (2012).** Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiol J* .29(5):413–21.

**Liu W., Xu X., Wu S., Yang Q., Luo Y., Christie P. (2006).** Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environ Geochem Health* .28:133–40.

**Liu W.H., Chen F.F., Wang C.E., Fu H.H., Fang X.Q., Ye J.R. et Shi J.Y. (2019).** Indole-3-acetic acid in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007: enzymatic identification of the indole-3-acetamide synthesis pathway. *Front. Microbiol.* 10, 2559.

**Ljungdahl L.G. et Eriksson K.E. (1985).** Ecology of Microbial Cellulose Degradation. *Adv Microb Ecol.* 8, 237-299.

**Lynn T.M., Win H.S., Kyaw E.P., Latt Z.K., Yu S.S. (2013).** Characterization of phosphate solubilizing and potassium decomposing strains and study on their effects on tomato cultivation. *Int. J. Innov. Applied Stud.* 3, 959-966.

**Ma Y., Rajkumar M. et Freitas H. (2009).** Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J. Env. Manag.* 90: 831-837.

**Ma J., Takahashi E (1990).** Effect of silicon on the growth and phosphorus uptake of rice. *Plant Soil* 126:115–119.

**Ma J.F. (2004).** Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition* 50, 11–18.

**Madkour M. A., Smith L.T. et Smith G. M. (1990).** Preferential Osmolyte Accumulation: A Mechanism of Osmotic Stress Adaptation in Diazotrophic Bacteria. *App. Environ. Microb.* (56)9: 2876-2881.

**Malboobi M.A., Behbahani M., Madani H., Owlia P., Deljou A., Yakhchali B., Moradi M. et Hassanabadi H. (2009).** Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1479-1484.

**Maleki M., Mostafae S., Mokhtarnejad L. et Farzaneh M. (2010).** Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. *Aust. J. Crop Sci.* 4, 676-683.

**Mali M., Aery N.C. (2008).** Silicon effects on nodule growth, dry-matter production, and mineral nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171 (6), 835-840.

**Malik K. A., Bilal R., Mehnaz S., Rasul G., Mirza M. S. et Ali, S. (1997).** Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil*. 194: 37–44.

**Mansour F. A., Aldesuquy H.S. et Hamedo H.A. (1994).** Studies on Plant Growth Regulators and Enzymes Production by Some Bacterie. *Qatar Univ.Sci. J.* 14, 281-288.

**Marschner P., Yang C. H., Lieberei, R. et Crowley, D. E. (2001).** Soil and plant

**Marschner P., Yang C-H., Lieberei R., Crowley D.E. (2001).**Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*.Volume 33, Issue 11. Pages 1437-1445.

**Martínez-Viveros O.M., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G.M.L.M. et Mora, M.L. (2010).** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant. Nutr.* 10, 293-319.

**Maurya B.R., Meena V.S., Meena O.P. (2014).** Influence of inceptisol and alfisol's Potassium Solubilizing Bacteria (KSB) isolates on release of K from waste mica. *VEGETOS*. Vol. 27 (1) : 181-187.

**Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. (2004).** Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* 166(2):525-30.

**Meena V.D., Dotaniya M.L., Coumar V., Rajendiran S., Ajay Kundu S., Subba Rao A.(2014).** A Case for Silicon Fertilization to Improve Crop Yields in Tropical Soils. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 84, 505–518.

**Meena M.D., Joshi P.K., Jat H.S., Chinchmalatpure A.R., Narjary B., Sheoran P., Sharma D.K. (2016).** Changes in biological and chemical properties of saline soil amended with municipal solid waste compost and chemical fertilizers in a mustard–pearl millet cropping system. *CATENA C*, 1–8.

**Meena V.S., Maurya B.R. and Verma J.P. (2013).** Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils. *Microbiological Research*. Doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003.

**Meena V.S., Maurya B.R., Bahadur I. (2015a).** Potassium solubilization by bacterial strain in waste mica. *Bangladesh J. Bot.* 43, 235-237.

**Meena V.S., Maurya B.R., Verma J.P. (2014).** Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils? *Microbiological Research* 169, 337–347.

**Meena V.S., Maurya B.R., Verma J.P., Aeron A., Kumar A., Kim K., Bajpai V.K. (2015b).** Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecol. Eng.* 81, 340-347.

**Meena V.S., Maurya B.R., Verma J.P., Meena R.S. (2016).** Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. Springer.

**Menéndez E., Pérez-Yépez J., Hernández M., Rodríguez-Pérez A., Velázquez E., & León-Barrios M. (2020).** Plant Growth Promotion Abilities of Phylogenetically Diverse *Mesorhizobium* Strains: Effect in the Root Colonization and Development of Tomato Seedlings. *Microorganisms*, 8(3), 412.

**Milošević N., Tintor B., Protić R., Cvijanović G. et Dimitrijević T. (2012).** Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. *Romanian Biotechnol. Lett.* 17(3): 7352-7357.

**Mirza M. S., Mehnaz S., Normand P., Prigent-Combaret C., Moëgne-Loccoz Y., Bally, R. et Malik K. A. (2006).** Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol. Fertil. Soils.* 43: 163-170.

**Mitchell R. et Alexandre M. (1963).** Lysis of soil fungi by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 6, 169-177.

**Mobley H.L.T. et Hausinger R.P. (1989).** Microbial urease: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiol Rev.* 53, 85-108.

**Mohanavelu A., Naganna S.R., Al-Ansari N. (2021).** Irrigation Induced Salinity and Sodicity Hazards on Soil and Groundwater: An Overview of Its Causes, Impacts and Mitigation Strategies. *Agriculture* 11, 983.

**Mojgani, N. (2017).** Bacteriocin-Producing Rhizosphere Bacteria and Their Potential as a Biocontrol Agent. In: Mehnaz, S. (eds) Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. Microorganisms for Sustainability, vol 2. Springer, Singapore.

**Morrone D., Chambers J., Lowry L., Kim G., Anterola A., Bender K. et Peters, R.J.(2009).** Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. FEBS Lett. 583:475-80.

**Munns R., Tester M. (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Ann Rev Plant Boil* .

**Muralikannan N., Anthomiraj S. (1998).** Occurrence of silicate solubilizing bacteria in rice ecosystem. Madras Agric J. 85:47–50.

**Murillo-Amador B., Yamada S., Yamaguchi T., Rueda-Puente E., Ávila-Serrano N., García-Hernández J.L., López-Aguilar R., Troyo-Diéguez E., Nieto-Garibay A. (2007).** Influence of Calcium Silicate on Growth, Physiological Parameters and Mineral Nutrition in Two Legume Species Under Salt Stress. Journal of Agronomy and Crop Science Volume 193, Issue 6 pp. 413-421.

**Nabti E., Sahnoune M., Ghoul M., Fischer D., Hoffmann A., Rothballer M., Schmid, M. et Hartman, A. (2010).** Restoration of Growth of Durum Wheat (*Triticum durum* var. Waha) Under Saline Conditions Due to Inoculation with the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* NH and Extracts of the Marine Alga *Ulva lactuca*. J. Plant. Growth. Regul. 29: 6–22.

**Nabti E., Sahnoune M., Adjrad S., Dommelen A. V., Ghoul M., Schmid M. et Hartman A. (2007).** A Halophilic and Osmotolerant *Azospirillum brasilense* Strain from Algerian Soil Restores Wheat Growth under Saline Conditions. Eng. Life Sci. 7(4): 354-360.

**Nachshon U. (2018).** Cropland Soil Salinization and Associated Hydrology: Trends, Processes and Examples. Water 10, 1030.

**Nadeem S.M., Zahir Z.A., Naveed M., Nawaz S. (2013).** Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Anna Microbiol* . 63,225–232.

**Nannipieri P., Ciardi C., Palazzi T., Badalucco L. (1990).** Short-term nitrogen reactions following the addition of urea to a grass-legume association. *Soil Biology and Biochemistry*. Volume 22, Issue 4, Pages 549-553, ISSN 0038-0717.

**Nannipieri P., GRECO S., Ceccanti B. (2017).** Ecological significance of the biological activity in soil. *Soil biochemistry* 293–356.

**Naqqash T., Hameed S., Imran A., Hanif M.K., Majeed A. et van Elsas J.D. (2016).** Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria. *Front. Plant Sci.* 7:144.

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

**Newton A.C., Pigott C.D. (1998).** Mineral nutrition and mycorrhizal infection of seedling oak and birch. II. The effect of fertilizers on growth, nutrient uptake and ectomycorrhizal infection. *New Phytologist*, 117, 45-52.

**Nico M., Ribaud C.M., Gori J.I., Cantore M.L., Curá J.A. (2012).** Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Appl. Soil Ecol.* 61, 190–195.

**Niklinska M., Chodak M. et Laskowski R.(2005).** Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biol. Biochem.* 37: 2185-2194.

**Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M. (1995).** Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol.* 109, 735–742.

**Nosrati R., Owlia P., Saderi H., Rasooli I. et Malboobi M. A. (2014).** Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran J. Microbiol.* 6(4): 285-295.

**Ofek M., Ruppel S. et Waisel Y. (2006).** Effects of salinity on rhizosphere bacterial communities associated with different root types of *Vicia faba* L. In: Ozturk, M., Waisel, Y., Khan, A., Gork, G. (Eds.), *Biosaline agriculture and salinity tolerance in plants*. Birkhäuser, Basel, pp. 1-13.

**Owino-Gerroh C., Gascho G. J., Phatak S. C. (2005).** Pigeonpea Response to Silicon, Phosphorus, and Rhizobium Inoculation in an Acid Coastal Plain Soil. *Journal of Plant Nutrition*, 28(5), 797–804.

**Pande P., Pandey P., Mehra S., Singh M., Kaushik S. (2017).** Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15, 379–391.

**Parker J. (1956).** Drought resistance in woody plants. *The Botanical Review.* 22, 241-289.

**Parmar P., Sindhu S.S. (2013).** Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *J. Microbiol. Res.* 3, 25-31.

**Pathania N., Gosal S. K., Saroa G. S. et Vikal Y. (2014).** Molecular characterization of diazotrophic bacteria isolated from rhizosphere of wheat cropping system from central plain region of Punjab. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8(9): 862-871.

**Peix A.A.A., Rivas-Boyer A.A.P.F., Mateos P.F., Rodriguez-Barrueco C., Martínez-Molina E. et Velázquez E. (2001).** Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.

**Penrose D. M. et Glick B. R. (2003).** Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum.* 118: 10-15. 2003.

**Pepper I. L. et Gerba C. P. (2004).** *Environmental Microbiology, a Laboratory Manual*, 2nd edition. Elsevier Academic Press, USA.

**Pii Y., Mimmo T., Tomasi N., Terzano R., Cesco S., Crecchio C. (2015).** Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and fertility of soils.*

**Pishchik V.N., Chernyaeva I.I., Kozhemaykov A.P., Vorobyov N.I., Lazarev A.M. et Kozlov L.P. (1998).** Effect of inoculation with nitrogen-fixing *Klebsiella* on potato yield. In: Malik KA et al. (eds.) *Nitrogen Fixation with Non-Legumes.* Kluwer Academic Publishers, Great Britain, pp. 223-235.

**Polacco J.C. (1977).** Is nickel a universal component of plant ureases? *Plant Sci Lett.* 10: 249-255.

**Ponnambalam A.S., Deepthi R.S. et Ghosh A.R. (2011).** Qualitative Display and Measurement of Enzyme Activity of Isolated Cellulolytic Bacteria. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.* 1, 33-37.

**Prajapati K., Sharma M.C., Modi H.A (2013).** Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on *Abelmoscus esculantus*. *Int J Agric Sci* .3(1):181–188.

**Prajapati K., Sharma M.C., Modi H.A. (2012).** Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic industry soils. *Life Sci Leaflets* .5:71–75.

**Prajapati K.B., Modi H.A. (2012).** Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria from ceramic industry soil. *CIBTech J Microbiol* .1:8–14.

**Prasad R., Kumar M., Varma, A. (2015).** Role of PGPR in Soil Fertility and Plant Health. In: Egamberdieva D et al. (eds.) *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants, Soil Biology* 42. Springer International Publishing Switzerland, pp. 247-260.

**Premono M., Moawad A.M., Vlek P.L.G. (1996).** Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones J Crop Sci* .11, 13–23.

**Prescott L. M. (2002).** *Microbiology*, 5th edition. The McGraw–Hill Companies, New York, USA, p 675.

**Raaijmakers J., Vlami M. et Jorge T. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Lee.* 81, 537-547.

**Raheem A., Shaposhnikov A., Belimov A.A., Dodd I.C. et Ali B. (2018).** Auxin production by rhizobacteria was associated with improved yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. *Arch Agron* <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1362105> *Soil Sci.* 2018; 64, 574-87.

**Raimondi G., Maucieri C., Toffanin A., Renella G., Borin M. (2021).** Smart fertilizers: What should we mean and where should we go? *Ital. J. Agron.* 16.

**Rajawat M.V.S., Singh S., Singh G., Saxena A.K. (2012).** Isolation and characterization of K solubilizing bacteria isolated from different rhizospheric soil. In: Proceeding of 53rd Annual Conference of Association of Microbiologists of India.p. 124.

**Rajini S.B., Nandhini M., Udayashankar A.C., Niranjana S.R., Lund O.S., Prakash H.S.(2020).** Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of Sorghum bicolor. Plant Pathology 69, 642–654.

**Ramadoss D., Lakkineni V. K., Bose P., Ali S., Annapurna K. (2013).** Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. Springer Plus. doi:10.1186/2193-1801-2-6.

**Rana A., Saharan B., Nain L., Prasanna R. et Shivay Y. S. (2012).** Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. Soil Sci. Plant Nutr. 58, 573-582.

**Rao V. R., Jena, P. K. et Adhya, T. K. (1987).** Inoculation of rice with nitrogen-fixing bacteria-problems and perspectives. Biol. Fertil. Soils. 4(1): 21-26.

**Raturi G., Sharma Y., Rana V., Thakral V., Myaka B., Salvi P., Singh M., Dhar H., Deshmukh R. (2021).** Exploration of silicate solubilizing bacteria for sustainable agriculture and silicon biogeochemical cycle. Plant Physiology and Biochemistry 166, 827–838.

**Raturi G., Sharma Y., Rana V., Thakral V., Myaka B., Salvi P., Singh M., Dhar H., Deshmukh R. (2021).** Exploration of silicate solubilizing bacteria for sustainable agriculture and silicon biogeochemical cycle. Plant Physiology and Biochemistry. Volume 166. Pages 827-838.

**Reddy P. P. (2014).** Potential Role of PGPR in Agriculture. In: Reddy, P. P. (ed.) Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection. Springer, India. pp 17-34.

**Rengasamy P. (2010).** Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. Functional Plant Biol. 37, 613–620.

**Rietz D.N., Haynes R.J.(2003).** Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry 35, 845–854.

**Rodríguez H., Fraga R.(1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17, 319–339.

**Romheld V., Kirkby E.A. (2010).** Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant Soil* .335:155–80.

**Rosa-Magri M.M., Avansini S.H., Lopes-Assad M.L., Tauk-Tornisielo S.M., Ceccato Antonini S.R. (2012).** Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspota globosa*. *Braz Arch Biol Technol.*55:577–82.

**Rouiller J., Souchier B., Bruckert S., Fellere C., Toutain F. et Vedy J. C. (1994).** Méthodes D'analyses Des Sols. In : B. M. and S. B. (eds.) *Pédologie : 2. Constituants et propriétés du sol.* Masson, Paris. pp. 619-654.

**Rousk J., Brookes P. C. et Bååth E. (2009).** Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(6): 1589–1596.

**Sagervanshi A., Kumari P., Nagee A., Kumar A.(2012).** Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from Anand agriculture soil. *Int. J. Lif. Sci. Pharm. Res.* 2(3), 245–255.

**Sahebi M., Hanafi M.M., Siti Nor Akmar A., Rafii M.Y., Azizi P., Tengoua F.F., Nurul Mayzaitul Azwa J., Shabanimofrad M. (2015).** Importance of Silicon and Mechanisms of Biosilica Formation in Plants. *BioMed Research International* 2015, e396010.

**Saiyad S.A., Jhala Y. K., Vyas R.V. (2015).**Comparative efficiency of five potash and phosphate solubilizing bacteria and their key enzymes useful for enhancing and improvement of soil fertility. *International J. Sci. Res. Publications.* 5, 2250-3153.

**Saleem M., Arshad M., Hussain S. et Bhatti A. S. (2007).** Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 635–648.

**Sangeeth K.P., Bhai R.S., Srinivasan V. (2012).** *Pae nibacillus glucanolyticus*, a promising potassium solubilizing bacterium isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.) rhizosphere. *J. Spic. Aromatic. Crop.* 21

**Santa O. R. D., Hernández R. F., Alvarez G. L. M., Junior P. R. et Soccol C. R.(2004).** Azospirillum sp. Inoculation in Wheat, Barley and Oats Seeds Greenhouse Experiments. Brazilian Arch. Biol. Technol. 47(6): 843-850.

**Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda M. del C., Glick B.R. (2016).** Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiol Res 183, 92–99.

**Saravanakumar D. (2012).** Rhizobacterial ACC Deaminase in Plant Growth and Stress Amelioration In: Maheshwari D.K. (ed.), Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 187-204.

**Sarig S., Kapulnik Y. et Okon Y. (1986).** Effect of Azospirillum inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. Plant Soil. 90: 335-342.

**Sathe A.P., Kumar A., Mandlik R., Raturi G., Yadav H., Kumar N., Shivaraj S.M., Jaswal R., Kapoor R., Gupta S.K., Sharma T.R., Sonah H. (2021).** Role of silicon in elevating resistance against sheath blight and blast diseases in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Physiology and Biochemistry 166, 128–139.

**Savant N.K., Snyder G.H., Datnoff L.E. (1996).** Silicon Management and Sustainable Rice Production 58, 151–199.

**Schmitt-Kopplin P., Hertkorn N., Frommberger M., Lucio M., Englmann M., Fekete A. et Gebefugi I. (2007).** Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass Spectrometry for Non-Targeted Metabolomics of Molecular Interactions in the Rhizosphere. In: Varma, A. and Oelmüller, R. (Eds). Soil biology, Volume 11, Advanced techniques in soil microbiology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp 281-293.

**Scow, K. M. 2004.** Soil microbiology. In: Schaechter, M. (ed). The Desk Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Ltd, China, pp 914-926.

**Sgroy V., Cassán F., Masciarelli O., Papa M. F. D., Lagares A. et Luna V. (2009).** Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. Appl. Microbiol. Biotechnol. doi: 10.1007/s00253-009-2116-3.

**Shaaban E.A., El-Shamma I.M.S., El Shazly S., El-Gazzar A., Abdel-Hak R.E. ( 2012).** Efficiency of rock-feldspar combined with silicate dissolving bacteria on yield and fruit qual ity of valencia orange fruits in reclaimed soils. J Appl Sci Res .8:4504–10.

**Shabaev V. P. et Voronina L. P. (2007).** Grain Yield and Quality of Winter Wheat Inoculated with a Mixed Culture of Pseudomonas Bacteria against the Background of Increasing Nitrogen Fertilizer Rates. Russ. Agric. Sci. 33(5): 311-313.

**Shahbaz M. et Ashraf M. (2013).** Improving salinity tolerance in cereals. Crit. Rev. Plant Sci. 32: 237–249.

**Shahid S.A., Zaman M., Heng, L. (2018).** Introduction to Soil Salinity, Sodicty and Diagnostics Techniques, in: Zaman, M., Shahid, S.A., Heng, L. (Eds.), Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–42.

**Shahzad S.M., Arif M.S., Riaz M., Iqbal Z., Ashraf M. ( 2013).** PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. European Journal of Soil Biology. Volume 57, Pages 27-34.

**Sharma A., Shankhdhar D., Sharma A. et Shankhdhar S. C. (2014).** Growth promotion of the rice genotypes by pgprs isolated from rice rhizosphere. J. Soil Sci. Plant Nutr. 14, 505-517.

**Sharma S., Kulkarni J., Jha B. (2016).** Halotolerant Rhizobacteria Promote Growth and Enhance Salinity Tolerance in Peanut. Front Microbiol 7, 1600.

**Sheng X. (2005).** Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. Soil Biol. Biochem. 37, 1918-1922.

**Sheng X.F., He L.Y. (2006).** Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Can J Microbiol .52:66–72.

**Sheng X.F., Zhao F., He L.Y., Qiu G., Chen L. (2008).** Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar. Can. J. Microbiol. 54, 1064-1068.

**Shulse C.N., Chovatia M., Agosto C., Wang G., Hamilton M., Deutsch S., Yoshikuni Y., Blowa M.J. (2019).** Engineered Root Bacteria Release Plant-Available Phosphate from Phytate. Appl. Environ. Microbiol. 85, e01210-19.

**Siddiqui Z.A. (2005).** PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui, Z.A. (Eds.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, pp. 111-142.

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

**Silini A., Cherif-Silini H. et 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 J. Microbiol. Res.* 10, 387-399.

**Silva C.M.M. de S., Fay,E.F., Silva C.M.M. de S., Fay, E.F.(2012).** Effect of Salinity on Soil Microorganisms, Soil Health and Land Use Management. IntechOpen.

**Sindhu S.S., Dadarwal K.R. (2001).** Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiol. Res.* 156, 353-358.

**Sindhu S.S., Parmar P., Phour M. (2012).** Nutrient cycling: potassium solubilization by microorganisms and improvement of crop growth. In: Parmar N, Singh A, edit ors. Geomicrobiology and biogeochemistry: soil biology. New York, Germany: Springer-Wien.

**Singh G., Biswas D.R., Marwaha T.S. (2010).** Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum* L.): a hydroponics study under phytootron growth chamber. *J. Plant Nutr.* 33, 1236-1251.

**Singh M., Kumar A., Singh R., Pandey K.D. (2017).** Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech.* 7,315.

**Singh P., Kumar V., Agrawal S. (2014).** Evaluation of Phytase Producing Bacteria for Their Plant Growth Promoting Activities. *Int. J. Microbiol.* 426483.

**Singh P.P., Shin Y.C., Park C.S. et Chung Y.R. (1999).** Biological Control of Fusarium Wilt of Cucumber by Chitinolytic Bacteria. *Phytopathol.* 89, 93-99.

**Singh, M.; Kumar, A.;Singh, R.; Pandey, K.D. (2017).** Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech.* 7, 315.

**Soltani A. A., Khavazi K., Asadi-Rahmani H., Omidvari M., Dahaji P. A. et Mirhoseyni H. (2010).** Plant Growth Promoting Characteristics in Some Flavobacterium spp. Isolated from Soils of Iran. J. Agric. Sci. 2, 106-115.

**Somers E, Vanderleyden J. et Srinivasan M. (2004).** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. Crit. Rev. Microbiol. 304, 205-240.

**Sparks D. I., Huang P. m.(1985).** Physical Chemistry of Soil Potassium, in: Potassium in Agriculture. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 201–276.

**Sparks D.L. (1987).** Potassium Dynamics in Soils, in: Stewart, B.A. (Ed.), Advances in Soil Science, Advances in Soil Science. Springer, New York, NY, pp. 1–63.

**Sparks D.L, Huang P.M. (1985).** Physical chemistry of soil potassium. In: Munson RD, et al., editors. Potassium in agriculture. Madison, WI: ASA. p. 201–76.

**Sparks D.L. (1987).** Potassium dynamics in soils, Advances in Soil Science. Springer, pp. 1-63.

**Sparks D.L., Huang P.M. (1985).** Physical chemistry of soil potassium. Potassium in agriculture. 201 276.

**Srinivasan R., Alagawadi A.R., Yandigeri M.S., Meena K.K., Saxena A.K. (2012).** Characterization of phosphate-solubilizing microorganisms from salt-affected soils of India and their effect on growth of sorghum plants [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Ann. Microbiol. 62, 93–105.

**Stanković M. S., Petrović M., Godjevac D. et Stevanović Z. D. (2015).** Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? J. Arid. Environ. 120: 26-32.

**Subhashini D.V., Kumar A. (2014).** Phosphate solubilizing *Streptomyces* spp obtained from the rhizosphere of *Ceripops decandra* of Corangi mangroves. The Indian J. Agri. Sci. 84.

**Sugumaran P and Janarthanam B (2007).** Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World J. Agric Sci 3 (3): 350-355.

**Tabli N., Rai A., Bensidhoum L., Palmieri G., Gogliettino M., Cocca E., Consiglio C., Cillo F., Bubici G. et Nabti E. (2018).** Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria.

**Tak H. I., Ahmad F., Babalola O. O. (2013).** Advances in the Application of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Phytoremediation of Heavy Metals. In: Whitacre DM (ed.) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer Science+Business Media, New York. pp 33-52.

**Tao K., Kelly S., Radutoiu S.(2019).** Microbial associations enabling nitrogen acquisition in plants. *Curr Opin Microbiol* 49, 83–89.

**Tejada M., Garcia C., Gonzalez J.L., Hernández T.(2006).** Use of Organic Amendment as a Strategy for Saline Soil Remediation: Influence on the Physical, Chemical and Biological Properties of Soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1413–1421.

**Thoma J.A, Spradlin J.E. et Dygert S. (1971).** Plant and animal amylases. In: Boyer P.D. (ed) *The enzymes*, 5th edn. Academic, New York, pp. 115-189.

**Timmusk S., Abd El-Daim I.A., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., Stenström E., Niinemets Ü.( 2014).** Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS One* 9, e96086.

**Tiwari S., Lata C., Chauhan P.S., Nautiyal C.S. (2016).** *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 99, 108–117.

**Tortora M.L., Díaz-Ricci J.C. et Pedraza R.O. (2011).** *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch. Microbiol.* 193: 275-86.

**Tri-Wahyudi A., Puji Astuti R., Widyawati,A., Meryandini A. et Asih. Nawangsih A. (2011).** Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials.* 3, 34-40.

**Tsavkelova E. A., Klimova S. Y., Cherdyntseva T. A. et Netrusov A. I. (2006).** Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. Appl. Biochem. Micro. 42, 117-126.

**Twisha P. et Desai.P. B. (2014).** Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of Gossypium species in Monsoon. Res. J. Recent. Sci. 3, 42- 51.

**United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2004).** World Population Prospects: World Population to 2300. Working Paper No. ST/ESA/SER.A/236. New York

**United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2015).** World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.241. New York

**Upadhyay S.K., Singh D.P. (2015).** Effect of salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biol.*17. 288–293.

**Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M. L., Touraine B., Loccoz Y. M., Muller D., Legendre L., Dyé F. W. et Combaret C. P. (2013).** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant. Sci.* doi: 10.3389/fpls.2013.00356.

**Van V. T., Berge O., Kê S. N., Balandreau J. et Heulin T. (2000).** Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of Burkholderia vietnamiensis on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil.* 218: 273-284.

**Vasanthi N., Saleena L.M. & Raj S.A.( 2018).** Silica Solubilization Potential of Certain Bacterial Species in the Presence of Different Silicate Minerals. *Silicon* 10, 267–275.

**Verma J.P., Yadav J., Tiwari K.N. (2012).** Enhancement of nodulation and yield of chickpea by co-inoculation of indigenous *Mesorhizobium spp.* and plant growth promoting rhizobacteria in eastern Uttar Pradesh. *Commun Soil Sci Plant Analy.* 43:605–21.

**Verma J.P., Yadav J., Tiwari K.N., Kumar A. (2012b).** Effect of indigenous *Mesorhizobium spp.* and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chick pea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecol Eng.* 51:282–6.

**Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *PlantSoil.*

**Vincent A. (2002).** Conception and simulation of a wire-cylinder DBD reactor for the treatment of nitrogen oxides in isotopically labeled gas mixtures. These genie des procedes et haute technologie; 184 refs. Universite Pierre et Marie Curie, 75 - Paris (France).

**Viollet A. (2010).** Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. Fluorescents non pathogènes. Thèse de Doctorat de Microbiologie des Sols et de l'Environnement. Spécialité : Ecologie Microbienne. Université de Bourgogne. 364p.

**Vitousek P.M., Porder S., Houlton B.Z. and Chadwick O.A. (2010).** Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen–phosphorus interactions. *Ecological Applications*, 20: 5-15.

**Viveros O. M., Jorquera M. A., Crowley D. E., Gajardo G. et Mora M. L. (2010).** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.* 10, 293-319.

**Volpiano C.G., Estevam A., Saatkamp K., Furlan F., Vendruscolo E.C.G. et Santos, M.F.D. (2014).** Physiological responses of the co-cultivation of PGPR with two wheat cultivars in vitro under stress conditions. *BMC Proceedings*. doi:10.1186/1753-6561-8-S4 P108.

**Vurukonda S.S.K.P., Giovanardi D. et Stefani E. (2018).** Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int J Mol Sci.* 19(4):952.

**Vyas P., Gulati A. (2009).** Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing *fluorescent Pseudomonas*. *BMC Microbiol.* 9, 174.

**Wan W., Qin Y., Wu H., Zuo W., He H., Tan J., Wang Y., He D.(2020).** Isolation and Characterization of Phosphorus Solubilizing Bacteria With Multiple Phosphorus Sources Utilizing Capability and Their Potential for Lead Immobilization in Soil. *Front Microbiol* 11, 752.

**Wang X. S., Han J. G. (2007).** Effects of NaCl and silicon on ion distribution in the roots, shoots and leaves of two alfalfa cultivars with different salt tolerance. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53(3), 278–285.

**Waughray, D. (2011).** Agriculture. In: Waughray, D. (ed). The World Economic Forum Water Initiative, Water Security: The Water-Food-Energy-Climate Nexus. World Economic Forum, Washington, USA, pp 17-43.

**Whipps J.M. (2001).** Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 52, 487-511.

**Wong V.N., Dalal R.C., Greene R.S. (2008).** Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil. *Biology and fertility of soils* 44, 943–953.

**Xiao Y., Wang X., Chen W., Huang Q. (2017).** Isolation and Identification of Three Potassium-Solubilizing Bacteria from Rape Rhizospheric Soil and Their Effects on Ryegrass. *Geomicrobiology Journal* 34, 873–880.

**Xu S. et Kim B.S. (2016).** Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* strain SC09-21 for biocontrol of *Phytophthora* blight and growth stimulation in pepper plants. *Trop. Plant Pathol.* 41:162.

**Xun F., Xie B., Liu S. et Guo C. (2015).** Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 598-608.

**Yadav J., Verma J. P. et Tiwari K. N. (2011).** Plant Growth Promoting Activities of Fungi and their effect on Chickpea Plant Growth. *Asian J. Biol. Sci.* doi:10.3923/ajbs.2011.

**Yadegari M., Mosadeghzad Z. (2012).** Biofertilizers effects on quantitative and qualitative yield of Thyme (*Thymus vulgaris*). *Afr. J. Agri. Res.* 7, 4716-4723.

**Yamaguchi M. (1983).** World Vegetables: Principles, Production and Nutritive Values. AVI PUBLISHING COMPANY, INC. Westport, Connecticut, United States.

**Yao L., Wu Z., Zheng Y., Kaleem I., Li C. (2010).** Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology* 46, 49–54.

**Youssef G.H., Seddik W.M.A., Osman M.A (2010).** Efficiency of natural minerals in presence of different nitrogen forms and potassium dissolving bacteria on peanut and sesame yields. *J. Am. Sci.* 6, 647-660.

**Zahir Z.A., Arshad M. et Frankenberger W.T.J. (2004).** Plant growth promoting rhizobacteria: Application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro.* 81, 97-198.

**Zahir Z.A., Ghani U., Naveed M., Nadeem S. M. et Asghar H. N. (2009).** Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia sp.* containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Arch. Microbiol.* 191, 415-24.

**Zakharova E.A., Shcherbakov A.A., Brudnik V.V., Skripko N.G., Bulkhin N.S. et Ignatov V.V. (1999).** Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense* insights from quantum chemistry. *Eur J Biochem.* 259, 572-576.

**Zarjani J.K., Aliasghar zad N., Oustan S., Emadi M., Ahmadi A. (2013).** Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. *Arch Agro Soil Sci.* 77:7569.

**Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M. and Steward, G.F. (2003).** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Env. Microbiol.* 5: 539-554.

**Zeng X., Liu X., Tang J., Hu S., Jiang P., Li W., Xu L. (2012).** Characterization and potassium-solubilizing ability of *Bacillus Circulans* Z 1–3. *Adv. Sci. Lett.* 10, 173-176.

**Zhang A., Zhao G., Gao T., Wang W., Li J., Zhang S., Zhu B. (2013).** Solubilization of insoluble potassium and phosphate by *Paenibacillus kribensis* CX-7: a soil microorganism with biological control potential. *Afri. J. Microbiol. Res.* 7, 41-47.

**Zhang C., Kong F. (2014).** Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Appl. Soil. Ecol.* 82, 18-25.

**Zhu F., Qu L., Hong X., Sun X. (2011).** Isolation and Characterization of a Phosphate-Solubilizing Halophilic Bacterium *Kushneria sp.* YCWA18 from Daqiao Saltern on the Coast of Yellow Sea of China. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 615032.

**Zuccarini P. (2008).** Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. *Biol Plant* 52, 157–160.

**Annexe I. Composition des milieux de culture utilisés**

*(par litre d'eau distillée)*

**Gélose nutritive (GN)**

<b>Composant</b>	<b>Quantité (g)</b>
Peptone	5,0
Extrait de viande	1,0
Extrait de levure	2,0
NaCl	5,0
Agar	7,5
pH	7,2 ± 0,2

**Luria–Bertani (LB)**

<b>Composant</b>	<b>Quantité (g)</b>
Tryptone	10,0
Extrait de levure	5,0
NaCl	5,0
pH	7,2 ± 0,2

**Annexe II. Production d'acide indole-acétique (AIA) par les isolats bactériens**

<b>Isolat</b>	<b>AIA (µg/mL)</b>	<b>Isolat</b>	<b>AIA (µg/mL)</b>
N4	20,52	N65	44,57
N8	47,40	N75	61,72
N11	14,65	N76	126,01
N20	21,47	N78	49,25
N27	13,28	N79	70,25
N33	7,37	N81	45,20
N37	9,73	N94	62,20
N43	8,18	N128	74,57
N48	85,86		
N53	35,70		
N58	69,14		
N63	3,23		

Annexes

**Annexe III : Résultats des différents tests qualitatifs réalisés pour les 20 isolats bactériens**

Isolat	[NaCl]mM	Cellulase	Chitinase	Amylase	Protéase	Estérase	Lipase	Uréase	FixationN2
N4	0	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(+++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+++)	(-)	(++)
	600	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(+)
	900	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
N8	0	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(+++)	(++)	(+++)
	300	(-)	(+)	(+++)	(++)	(-)	(++)	(+)	(++)
	600	(-)	(+)	(+++)	(++)	(-)	(++)	(+)	(+)
	900	(-)	(+)	(+)	(++)	(-)	(+)	(+)	(+)
N11	0	(+++)	(++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(+++)	(+)	(-)	(-)	(++)	(+++)	(-)	(++)
	600	(+++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+++)	(-)	(+)
	900	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)
N20	0	(-)	(-)	(+++)	(-)	(++)	(-)	(++)	(+++)
	300	(-)	(-)	(+++)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	600	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	900	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
N27	0	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(++)
	600	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(-)	(+)
	900	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(-)	(+)
N33	0	(-)	(++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)
	300	(-)	(+)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)
	600	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	900	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
N37	0	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)

Annexes

	300	(+++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)
	600	(+++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(+)	(-)
	900	(+++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)
N43	0	(-)	(++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)
	300	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)
	600	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	900	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
N48	0	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(+++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(-)
	600	(+++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)
	900	(+++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
N53	0	(++)	(++)	(-)	(+++)	(-)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(-)	(+)	(-)	(++)	(-)	(+++)	(-)	(++)
	600	(-)	(+)	(-)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)
	900	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
N58	0	(-)	(-)	(++)	(+++)	(-)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(+++)	(-)	(++)
	600	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+++)	(-)	(-)
	900	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)
N63	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)
	300	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	600	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	900	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
N65	0	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(+++)
	300	(+++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(-)	(++)
	600	(++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(-)	(+)
	900	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)
N75	0	(-)	(-)	(++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(+++)

Annexes

	300	(-)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
	600	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
	900	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
N76	0	(+++)	(++)	(-)	(+++)	(+++++)	(+++)	(+++)	(++++)
	300	(++)	(+)	(-)	(+++)	(+++++)	(+++)	(+++)	(++++)
	600	(++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(++)
	900	(++)	(-)	(-)	(+++)	(+)	(+)	(++)	(+)
N78	0	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(+++)
	300	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(++)
	600	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
	900	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
N79	0	(+++)	(++)	(-)	(+++)	(+)	(-)	(-)	(+++)
	300	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)
	600	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	900	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
N81	0	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(+++)	(+)	(++)	(+++)	(+)	(+++)	(-)	(++)
	600	(++)	(-)	(++)	(++)	(-)	(++)	(-)	(+)
	900	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)	(++)	(-)	(+)
N94	0	(+++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
	300	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)
	600	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(++)	(+)
	900	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
N128	0	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)	(+++)
	300	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(++)	(-)	(++)
	600	(+++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)
	900	(++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)

## Annexes

**Annexe V : Résultats de test de minéralisation de phosphate réalisé sur les isolats bactériens.**

Isolat	[NaCl] mM	2 jours		5 jours		10 jours	
		IS	P soluble µg/mL	IS	P soluble µg/mL	IS	P soluble µg/mL
N4	0	3,75	0	4,03	0,011	4,85	0,012
	300	3,54	0	3,72	0,004	4,1	0,004
	600	3,38	0	3,56	0	3,7	0
	900	3,2	0	3,1	0	3,28	0
N11	0	4	0	4,95	0,009	5,2	0,011
	300	3,85	0	4,37	0,003	4,75	0,004
	600	3,73	0	4	0,002	4,3	0,001
	900	3,45	0	3,45	0	3,82	0
N27	0	2,9	0	3,62	0	4	0
	300	2,76	0	3,1	0	3,15	0
	600	2,73	0	3,05	0	3,28	0
	900						
N53	0	3,65	0	4	0,018	4,7	0,020
	300	3,3	0	3,53	0,010	4	0,010
	600	2,75	0	3,15	0	4,1	0,001
	900	2,55	0	2,8	0	3,25	0
N58	0	1,35	0	2,2	0	2,45	0
	300						
	600						
	900						
N65	0	3,2	0,015	3,55	0,016	3,8	0,016
	300	2,56	0,003	2,6	0,002	2,45	0,003
	600	2,1	0	2,33	0	2	0
	900						

## Annexes

N76	0	3,62	0	4,33	0,027	5,28	0,168
	300	3,28	0	5,28	0,014	6,5	0,097
	600	3,57	0	3,9	0,002	5	0,012
	900	3,25	0	4,25	0	4,85	0,004
N128	0	2,3	0	2,78	0	3	0
	300	1,65	0	2	0	2,1	0
	600						
	900						

**Annexe VI : Résultats du test de solubilisation du potassium réalisés sur les isolats bactériens***(après 7 jours d'incubation)*

<b>Isolat</b>	<b>[NaCl] (mM)</b>	<b>IS</b>	<b>K soluble (µg/mL)</b>
N8	0	1,30	25,034
	300	0,75	9,267
N53	0	1,05	—
	300	—	—
N78	0	0,80	—
	300	—	—

**Annexe VII : Résultats du test de solubilisation du silicate réalisés sur les isolats bactériens***(après 7 jours d'incubation)*

<b>Isolat</b>	<b>[NaCl] (mM)</b>	<b>IS</b>
N8	0	0,80
	300	0,41
N11	0	0,43
	300	—
N65	0	0,65
	300	—
N94	0	0,58
	300	0,30

### **Publications:**

- **Belkebla N.**, Bessai S.A., Melo J., Caeiro M.F., Cruz C., Nabti, E.-h. (2022). Restoration of *Triticum aestivum* Growth under Salt Stress by Phosphate-Solubilizing Bacterium Isolated from Southern Algeria. *Agronomy*.12, 2050.
- Dahdah K., Charchar N., Bouchaala L. ., Nourine H. ., **Belkabila N .**, Melo J ., & Nabti E.-H. (2022). Isolation, in vitro evaluation and construction of Versatile Microbial Consortia. *Cellular and Molecular Biology*, 68(8), 173–181.

### **Communications :**

#### **Poster :**

- **Belkebla Nadia** ; Ait Bessai Sylia ; Nabti El-Hafid. (2019). L’impact des bactéries du sol dans la restauration et la biofertilisation. Journées Doctoriales sur « L’innovation et le transfert technologique » (Béjaïa, Algérie 15 et 16 juillet).
- **Belkebla Nadia** ; Ait Bessai Sylia ; Nabti El-Hafid. (2019). Effet de bactéries telluriques sur la restauration des éléments NPK dans les sols salés. Algerian American Foundation summer university 2019 (University of Mostefa Benboulaïd Batna-2- Algeria 28 July- 3 August).
- Ait Bessai Sylia ; **Belkebla Nadia** ; Nabti El-Hafid. (2019). Isolement de bactéries productrices de substances antifongiques et d’intérêt agricole. Algerian American Foundation summer university 2019 (University of Mostefa Benboulaïd Batna-2- Algeria 28 July- 3 August).
- **Belkebla Nadia** ; Sylia Ait Bessai ; Juliana Melo ; Maria Filomena Caeiro ; Cristina Cruz ; El-hafid Nabti. (2023). Effet d'une bactérie fixatrice d’azote et solubilisant le phosphate sur la restauration de la croissance de blé sous stress salin. Algerian American Foundation summer university 2023 (University of Médéa Algeria 6 to 12 August 2023).

**Résumé :** La salinité entraîne des pertes agricoles importantes dans de nombreuses régions du monde. Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) sont une solution prometteuse pour améliorer la croissance et la productivité des plantes dans de telles conditions de stress par différents mécanismes, principalement la fixation d'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphore, du potassium et du silicium. Dans ce travail, 260 isolats bactériens sont obtenus à partir de 26 échantillons de sol prélevés dans différentes régions en Algérie. L'halotolérance des ces isolats a été étudiée et 20 isolats ont été sélectionnés. La capacité des isolats halotolérants à produire des enzymes d'intérêt agricole, à produire de l'AIA, à fixer d'azote, à solubiliser le phosphore, le potassium et le silicium à 0; 300; 600 et 900 mM NaCl ont été déterminés. Enfin, l'effet d'un isolat halotolérant, sur la germination des graines de blé (*Triticum aestivum*) et la croissance de ses plantules est déterminé. Dans ce travail, le stress salin affecte négativement les taux de la solubilisation de phosphore, le potassium et le silicium mais il n'affecte pas la fixation d'azote. La souche *Pseudomonas azotoformans* a montré sa plus grande capacité de solubilisation du phosphore ( $255,152 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ), et de minéralisation de phytates ( $0,168 \pm 0,002 \text{ U/mL}$ ), La quantité la plus élevée de potassium est de ( $25,034 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ ). Le taux de phosphate soluble dans le sol était de  $49,42 \pm 0,36 \text{ ppm}$  obtenue à 100 mM de NaCl. Le pourcentage de germination des graines, la longueur des pousses et des racines et les poids frais et secs se sont avérés plus élevés dans les plantules inoculées bactériennes que dans les semis non inoculés. L'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes représente une approche biotechnologique importante pour rétablir les niveaux de phosphore dans les sols salins et pour favoriser la croissance des plantes dans les terres agricoles affectées par le sel.

**Mots-clés :** biofertilisation; PGPB; phosphore; stress salin; *Triticum aestivum*; Algérie

**Abstract:** Salinity causes significant agricultural losses in many regions of the world. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are a promising solution for improving plant growth and productivity under such stressful conditions through various mechanisms, mainly atmospheric nitrogen fixation and the solubilisation of phosphorus, potassium and silicon. In this study, 260 bacterial isolates were obtained from 26 soil samples collected in different regions of Algeria. The halotolerance of these isolates was studied and 20 isolates were selected. The ability of the halotolerant isolates to produce enzymes of agricultural interest, to produce AIA, to fix nitrogen, and to solubilise phosphorus, potassium and silicon at 0, 300, 600 and 900 mM NaCl was determined. Finally, the effect of a halotolerant isolate on the germination of wheat seeds (*Triticum aestivum*) and the growth of its seedlings was

determined. In this study, salt stress negatively affected the solubilisation rates of phosphorus, potassium and silicon, but did not affect nitrogen fixation. The *Pseudomonas azotoformans* strain showed the greatest capacity for phosphorus solubilisation ( $255.152 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ) and phytate mineralisation ( $0.168 \pm 0.002 \text{ U/mL}$ ). The highest amount of potassium was ( $25.034 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ). The rate of soluble phosphate in the soil was  $49.42 \pm 0.36 \text{ ppm}$  obtained at 100 mM NaCl. Seed germination percentage, shoot and root length, and fresh and dry weights were higher in bacterial inoculated seedlings than in non-inoculated seedlings. The use of plant growth-promoting bacteria represents an important biotechnological approach to restoring phosphorus levels in saline soils and promoting plant growth in salt-affected agricultural land.

**Key words:** biofertilisation; PGPB; phosphorus; salt stress; *Triticum aestivum*; Algeria

**ملخص:** تسبب الملوحة خسائر زراعية كبيرة في العديد من مناطق العالم. تعتبر البكتيريا المحفزة لنمو النباتات تعتبر البكتيريا حلاً واعداً لتحسين نمو النباتات وإنتاجيتها في مثل هذه الظروف الصعبة من خلال آليات مختلفة، (PGPB) المساعدة على نمو النبات أهمها تثبيت النيتروجين الجوي، وإذابة الفوسفور والبوتاسيوم والسيليكون. في هذا العمل، تم الحصول على 260 عينة بكتيرية من 26 عينة تربة تم جمعها من مناطق مختلفة في الجزائر. تمت دراسة تحمل هذه العينات للملوحة وتم اختيار 20 عينة. تم تحديد قدرة ، وتثبيت النيتروجين، وإذابة الفوسفور والبوتاسيوم AIA العزلات المقاومة للملوحة على إنتاج إنزيمات ذات أهمية زراعية، وإنتاج ، وأخيراً، تم تحديد تأثير عزلات مقاومة للملوحة على إنبات بذور القمح NaCl والسيليكون عند 0؛ 300؛ 600 و 900 مليمولار ونمو شتلات القمح. في هذا العمل ، يؤثر الإجهاد الملحي سلبيًا على معدلات ذوبان الفوسفور والبوتاسيوم (*Triticum aestivum*) أكبر قدرتها على ذوبان *Pseudomonas azotoformans* والسيليكون، ولكنه لا يؤثر على تثبيت النيتروجين. أظهرت سلالة أعلى كمية من البوتاسيوم هي ( $25,034 \pm \text{ U/mL}$  ، ومعدن الفيتات ( $0,168 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$ ) الفوسفور ( $0,01 \pm 255,152$ )  $0,02$  ميكروغرام/مل). وبلغ معدل الفوسفات القابل للذوبان في التربة  $49.42 \pm 0.36$  جزء في المليون عند 100 مليمول من كلوريد الصوديوم. وكانت نسبة إنبات البذور وطول البراعم والجذور والوزن الطازج والجاف أعلى في الشتلات الملقحة بالبكتيريا منها في الشتلات غير الملقحة. يمثل استخدام البكتيريا التي تعزز نمو النباتات نهجًا بيوتكنولوجيًا مهمًا لاستعادة مستويات الفوسفور في التربة المالحة وتعزيز نمو النباتات في الأراضي الزراعية المتضررة من الملوحة .

**الكلمات المفتاحية:** التسميد البيولوجي؛ البكتيريا المحفزة لنمو النبات؛ الفوسفور؛ إجهاد الملح؛ القمح الطري؛ الجزائر

## Article

# Restoration of *Triticum aestivum* Growth under Salt Stress by Phosphate-Solubilizing Bacterium Isolated from Southern Algeria

Nadia Belkebla <sup>1</sup>, Syla Ait Bessai <sup>1</sup>, Juliana Melo <sup>2</sup>, Maria Filomena Caeiro <sup>3</sup> , Cristina Cruz <sup>2</sup>   
and El-hafid Nabti <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia 06000, Algeria

<sup>2</sup> Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (CE3C), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Edifício C2, Piso 5, Sala 2.5.03 Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

\* Correspondence: nabtielhafid1977@yahoo.com or el-hafid.nabti@univ-bejaia.dz

**Abstract:** Salinity causes significant agricultural losses in many areas in the world. Plant growth promoting bacteria (PGPB) are a promising solution to enhance plant growth and productivity under such stress conditions by different mechanisms, mainly phosphorous solubilization. This study aims to improve wheat seedling growth under salt stress by a halotolerant phosphorous-solubilizing bacterial strain. Soil sample was collected in the south of Algeria (Ghardaia), and bacterial isolation was carried out on nutrient agar (NA) at different NaCl concentrations (300; 600 and 900 mM). The ability of the halotolerant isolates to solubilize inorganic phosphorous at 0; 300; 600 and 900 mM NaCl was determined. The isolate that showed the highest solubilization indexes was selected and identified as *Pseudomonas azotoformans*. Sterile wheat (*Triticum aestivum*) seeds were inoculated by this strain and then sown in soil at different NaCl concentrations (0; 100; 200; 300 mM). Different growth parameters were measured after 15 days. The strain showed its highest capacity for phosphorous solubilization ( $255.152 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ) at 300 mM NaCl, and for phytate mineralization ( $0.168 \pm 0.002 \text{ U/mL}$ ) at 100 mM NaCl. The highest amount of soluble phosphorous in the soil was  $49.42 \pm 0.36 \text{ ppm}$  obtained at 100 mM NaCl. Seed germination percentage, shoot and root length and fresh and dry weights were found to be higher in bacterial inoculated seedlings compared to uninoculated ones. According to this study, the use of plant growth promoting bacteria represents an important biotechnological approach to restore phosphorous levels in saline soils and to promote plant growth in salt-affected agricultural land.

**Keywords:** biofertilization; PGPB; phosphorous; salt stress; *Triticum aestivum*; Algeria



**Citation:** Belkebla, N.; Bessai, S.A.; Melo, J.; Caeiro, M.F.; Cruz, C.; Nabti, E.-h. Restoration of *Triticum aestivum* Growth under Salt Stress by Phosphate-Solubilizing Bacterium Isolated from Southern Algeria. *Agronomy* **2022**, *12*, 2050. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092050>

Academic Editor: Carmelo Maucieri

Received: 21 July 2022

Accepted: 26 August 2022

Published: 28 August 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

With the demand for food supply, especially wheat production in developing countries, an increase in cereal production is required to meet the nutritional needs of these countries [1]. Chemical fertilizers are used to increase crop growth and yield but the increased use of chemical pesticides, herbicides and excessive irrigation has led to accumulation of toxic substances in soil and salinization of agricultural land [1]. More than 6% of the land surface is affected by salinity, which corresponds to 20% of irrigated land located particularly in arid and semi-arid areas. In Algeria, about 10–15% of irrigated land is affected, occupying 3.2 million hectares of the total area, located in the north of the country [2].

Salinity highly limits plant growth and development. It affects hormone production, transpiration, photosynthesis, nutrient translocation and increases ethylene levels in roots

and other metabolic processes [3,4]. Several strategies have been developed to improve plant tolerance to this abiotic stress such as selection of varieties known for their high salt tolerance, production of genetically modified crops and the exogenous application of compatible solutes known for their osmo-protective properties, but these approaches are expensive and not sustainable [5]. Alleviation of salt stress devastating effects on plants using halotolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) is an appropriate solution for sustainable, less costly and healthy agriculture [6].

PGPB provide beneficial effects on soil quality and plant growth through several mechanisms such as phytohormone production [7], pest control [8], degradation of organic pollutants [9], increasing plant nutrient availability through atmospheric nitrogen fixation [10], solubilizing and mineralizing phosphorous for plant growth [11] and improving tolerance to abiotic stresses (drought and salinity) [12]. The use of PGPB in agriculture promotes plant growth and protects plants from the adverse effects of salt stress [6]. Several studies have reported that inoculation of wheat with PGPB strains such as *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas* sp. were shown to increase plant tolerance to salt stress and promoted plant growth under these conditions [2,13,14].

Phosphorous (P) is an essential limiting macronutrient for plant growth and development [15]. This element is implicated in several physiological processes such as enzyme activation, protein synthesis, photosynthesis, disease development and insect resistance and osmoregulation [16]. Phosphorous is mainly immobilized in the soil by chemical precipitation where it becomes less soluble and therefore unavailable to plant roots [17]. Several studies have demonstrated the ability of PGPB to solubilize inorganic phosphorous and/or mineralize organic phosphorous into accessible forms to plants [18,19] through the secretion of low molecular weight organic acids, such as gluconic acid and citric acid [20]; these organic acids consequently lower the pH and chelate the cations attached to insoluble phosphorous and convert them into soluble forms ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) [21], and by the release of extracellular enzymes: phosphatase and phytases catalyzing the hydrolysis of the phosphoric esters [22].

Soluble salts reduce soil fertility and affect plant growth and development. In this context, our study aims to isolate and characterize a halotolerant bacterial strain capable of solubilizing insoluble forms of phosphorous at different NaCl concentrations and being useful for improving wheat seedling growth under saline conditions.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Soil Sampling and Bacterial Isolation

A soil sample was collected from an agricultural field in southern Algeria (Ghardaia, 32°15'21.9" N 3°38'01.6" E) using a sterile metallic corer from 10 to 30 cm depth. Physico-chemical soil properties such as pH, electrical conductivity, gravimetric moisture content and total organic matter were measured. The soil sample was sterilely homogenized and 1 g of the soil was added to 9 mL of phosphate-buffered saline (PBS), containing per 1 L of distilled water: NaCl (8 g); KCl (0.2 g);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.24 g);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1.44 g), and mixed to form the first dilution  $10^{-1}$ . Then, 1 mL of this solution was serially diluted from  $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ . A total of 1 mL of each dilution was used to inoculate three Petri dishes containing nutrient agar medium supplemented with different concentrations of NaCl (300, 600 and 900 mM). The inoculation was carried out in triplicate. After incubation at  $30 \pm 2$  °C for 48 h, 10 colonies of different appearance were selected from the 3 different NaCl-containing media and then purified on the appropriate culture medium for each isolate.

### 2.2. Halotolerance of the Selected Isolates

The halotolerance of selected bacterial isolates was determined using Glucose Minimal Medium containing (per liter): glucose (5 g);  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 g);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 g);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2.4 g); NaCl (0.5 g) and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 g); pH =  $7 \pm 0.2$ . This medium was prepared at different NaCl concentrations (0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1100; 1200; 1300; 1400; 1500 and 1600 mM). 20  $\mu\text{L}$  of each bacterial fresh culture ( $\text{OD}_{600} = 0.2$ ) (SPECTRONIC

20 D ChemLab Images and instruction, Hanover, New Hampshire, USA) were used to inoculate 2 mL of NaCl-containing GMM, and uninoculated medium was used as control. The procedure was performed in triplicate. After 48 h incubation at 28 °C under shaking (100 rpm/min), the bacterial growth was estimated by measuring the optical density with spectrophotometer at 600 nm [23].

### 2.3. Inorganic Phosphorous Solubilization

#### 2.3.1. On Solid Medium

Selected isolates were tested for their ability to solubilize inorganic phosphorous [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] on Pikovskaya's [24] medium containing, per liter of distilled water, in g/L: glucose (10 g);  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (5 g);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.5 g); NaCl (0.2 g);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g); KCl (0.2 g); yeast extract (0.5 g);  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.002 g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.002 g); and agar (15 g). This medium was prepared at different NaCl concentrations (0, 300, 600 and 900 mM). Three spots of 5  $\mu\text{L}$  of each bacterial suspension were placed in a Petri dish containing the PVK prepared medium, and three Petri dishes were used for each isolate. The ability of an isolate to solubilize inorganic phosphorous was indicated by the appearance of a clear halo around the colonies [25]. After incubation for 21 days at 28 °C, 3 isolates were able to solubilize inorganic phosphorous at 0, 300, 600 and 900 mM NaCl. The solubilization index (SI) was calculated for each isolate at the 2nd; 7th; 15th and 21st days of incubation, according to the formula of Edi-Premono (1996)  $[\text{SI}] = \text{diameter of (colony + halo zone) / colony diameter}$  [26]. The isolate with the highest solubilization index was selected for further tests.

#### 2.3.2. Quantification of Solubilized Phosphorous in Liquid Medium

Quantitative estimation of inorganic phosphorous solubilization efficiency was performed in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of PVK broth prepared at different NaCl concentrations: 0, 300, 600 and 900 mM. This medium was inoculated with the selected isolate (200  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension with approximately  $6 \times 10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ), then incubated at 28 °C for 2, 7, 15 and 21 days under shaking (180 rpm/min). The experiment was carried out in triplicate. Sterile uninoculated broth served as a control. After each incubation period, the cultures were harvested by centrifugation (Eppendorf 58/OR centrifuge) at 10,000 rpm/min for 20 min. The pH of supernatants was determined. Then, the supernatants were used for soluble phosphorous estimation.

To measure the amount of released phosphorous in the culture medium, two solutions were prepared separately:

Solution (1): chloromolybdic acid: 1.5 g of ammonium molybdate dissolved in 40 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (45 °C) were added to 34.2 mL HCl (12N), and then we added  $\text{H}_2\text{O}$  to this solution until a final volume of 100 mL.

Solution (2): chlorostannous acid: 2.5 g of  $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  were dissolved in 10 mL of HCl (12N) and then completing with  $\text{H}_2\text{O}$  to a final volume of 100 mL.

To estimate the concentration of soluble phosphorous in the medium, 1 mL of supernatant was mixed with 4.5 mL of solution (1) and 25  $\mu\text{L}$  of solution (2). After incubation at room temperature ( $23 \pm 2$  °C) for 15 min, the OD was measured at 600 nm. The experiment was carried out in triplicate. The amount of soluble phosphorous was estimated according to a standard curve prepared using different concentrations of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 50, 100, 150, 200, 250 and 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  [27].

### 2.4. Determination of Phytase Production

#### 2.4.1. On Solid Medium

The ability of our isolate to mineralize phytate through the production of phytase was tested at different NaCl concentrations. A total of 5  $\mu\text{L}$  of the bacterial suspension was inoculated on the medium containing (per liter of distilled water): glucose (15 g); sodium phytate (1 g);  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (2 g); KCl (0.5 g);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 g);  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.003 g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.003 g) and agar (20 g). This medium was prepared at 0, 300,

600 and 900 mM NaCl, and the pH was adjusted to 7.5. Sodium phytate was used as a substrate for phytase to release phosphorous. After 48 h of incubation at 28 °C, clear halos were observed around the colonies of our isolate at the different NaCl-containing media, indicating therefore that the isolate is able to mineralize phytate by phytase production. The solubilization index (SI) was measured and calculated according to the formula of Edi-Premono (1996) [26] after 2, 5 and 10 days of incubation at 28 °C [27].

#### 2.4.2. Quantitative Analysis of Phytase Production

Quantitative analysis of extracellular phytase production was performed by inoculating 200 µL ( $6 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) of the selected isolate's culture into Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of a medium containing (per liter of distilled water): sodium phytate (1 g); peptone (10 g); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g); KCl (0.5 g); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g); MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.003 g); FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O (0.003 g). This medium was amended with different NaCl amounts to get final concentrations of 0; 300; 600 and 900 mM at pH = 7.5. After incubation at 28 °C for 2; 7 and 10 days under agitation (200 rpm/min), the cultures were centrifuged at 10,000× g for 10 min at 4 °C and the supernatant was used for extracellular phytase estimation [28].

The phytase activity determines the amount of inorganic phosphorous released in the medium, hence one unit [29]. To determine the rate of phosphorous released, two mixtures were prepared:

Mixture (1): 0.2 mL of the previously obtained supernatant were mixed with 0.5 g of sodium phytate dissolved in 100 mL sodium acetate buffer (0.2 M, pH = 5.5). After incubation at 28 °C for 30 min, the reaction was stopped by adding 102 mL of 15% trichloroacetic acid.

Mixture (2): 100 mL of sulphuric acid (1 M) were mixed with 100 mL of ascorbic acid (10%) and 4 mL of ammonium molybdate (3:1:0.1) at 2.5%.

For the phytase estimation, 100 µL of mixture (1) were mixed with 900 µL of mixture (2) and incubated at 28 °C for 20 min, and then the absorbance of the final mixture was measured at 700 nm [28].

#### 2.5. Molecular Identification of the Selected Isolate

The selected strain was identified based on the 16S rDNA sequence. DNA extraction was followed by amplification of this gene using the forward primer (356F) 5'ACWCCTACGGGWWGCWGC and the reverse primer (1064R) 5'AYCTCACGRCACGAGCTGAC.

Polymerase chain reaction (PCR) reactions were carried out in a final volume of 20 µL. The reaction mixture consisted in 10 µL of MyTaq Red Mix 2x (Bioline, Paris, France), 1 µL of each primer F and R (at 10 µM/each), 1 µL of DNA sample, and 7 µL of ultrapure water. The mixture was placed in Tpersonal cycler (Whatman Biometra, Göttingen, Germany), programmed as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, then 35 cycles each one consisting in three steps: denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 55 °C for 10 s, elongation at 72 °C for 60 s, and then a final elongation at 72 °C for 7 min.

Aliquots of the PCR reactions were resolved on 0.7% agarose gels stained with ethidium bromide. PCR products were purified by Zymoclean DNA kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), following the manufacturers' instructions. Purified PCR products were sequenced in both directions at StabVida (Caparica, Portugal) using the primers previously cited.

The obtained sequences were compared with the sequences available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) accessed on 12 November 2021, using the BLAST algorithm in order to identify our isolate.

#### 2.6. Wheat Germination and Growth Improvement by the Selected Isolate under Salt Stress

##### 2.6.1. Germination Improvement

Wheat seeds (*Triticum aestivum*) were rigorously chosen according to their morphology and size, and then surface sterilized by soaking them in ethanol (70%) for 1 min and in

sodium hypochlorite solution (12%) for 3 min. the sterilization was followed by 6 times successive wash with sterile distilled water [30]. Sterile wheat seeds were soaked in washed bacterial suspension (OD = 0.8) for 1 h at room temperature. Control seeds were soaked in sterile distilled water [31].

Sterile filter paper discs with a diameter equal to that of the Petri dishes were placed in Petri dishes (1 filter paper/box). The filter paper was soaked (2 mL/dish) with sterile saline solutions (sterile distilled water + NaCl) at different NaCl concentrations (0, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM). Afterwards, the bacterial inoculated seeds and the control seeds were placed in the boxes at a rate of 15 seeds/box/NaCl treatment (the experiment was performed in triplicate) which means 3 Petri dishes/NaCl treatment [32].

The experiment was carried out in the dark at an average temperature of 25 °C. The number of germinated seeds was counted every 2 days until the 14th day (no more germinating seeds). During this essay, there was no need to extra seed watering. At the end of the experiment, the final percentage of germination was calculated.

### 2.6.2. Growth Promotion of Wheat Seedlings

The soil used in the experiment is a soil with a low mineral content. It was provided by the Centre for Ecology, Evolution and Environmental Change (CE3C), Faculty of Science, University of Lisbon. It was mixed with vermiculite (50/50: *v/v*) and autoclaved.

The germinated seeds (bacterial inoculated seeds and the control seeds) were sowed in pots (7 cm × 12 cm) containing the soil-vermiculite mixture at a rate of 2 seeds/pot, at a depth of about 1 cm. The pots were watered with 20 mL/pot every 3 days with saline solutions (water with NaCl at concentration of 0, 100, 200 and 300 mM) according to the NaCl treatments in the germination phase. The experiment was carried out with 6 replicates (pots) per treatment. The pots were placed in a growth chamber with a light/dark photoperiod of 16/8 h, at temperature of 25/20 °C and a relative humidity (RH) of 70%/50%. After 15 days, the shoot and root length as well as the shoot and root fresh and dry weights of the samples in each treatment were determined. In addition to these plant growth parameters, the amount of soluble phosphorous in the soil where the wheat seedlings were growing was quantified according to [33]. This experiment was stopped at the 15th day because after this period the control seedlings were completely damaged.

The ability of the isolate to release phosphorous into the soil was tested by measuring the soluble phosphorous amounts in the soil before and after each treatment (bacterial and NaCl treatments). These amounts were determined according to a standard curve prepared using different concentrations of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma, Madison, Wisconsin, USA) [33].

### 2.7. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7. The wheat germination results and the wheat seedling growth parameters data were analyzed by analysis of variance, subject to a 95% confidence interval.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Selection of the Isolate N76

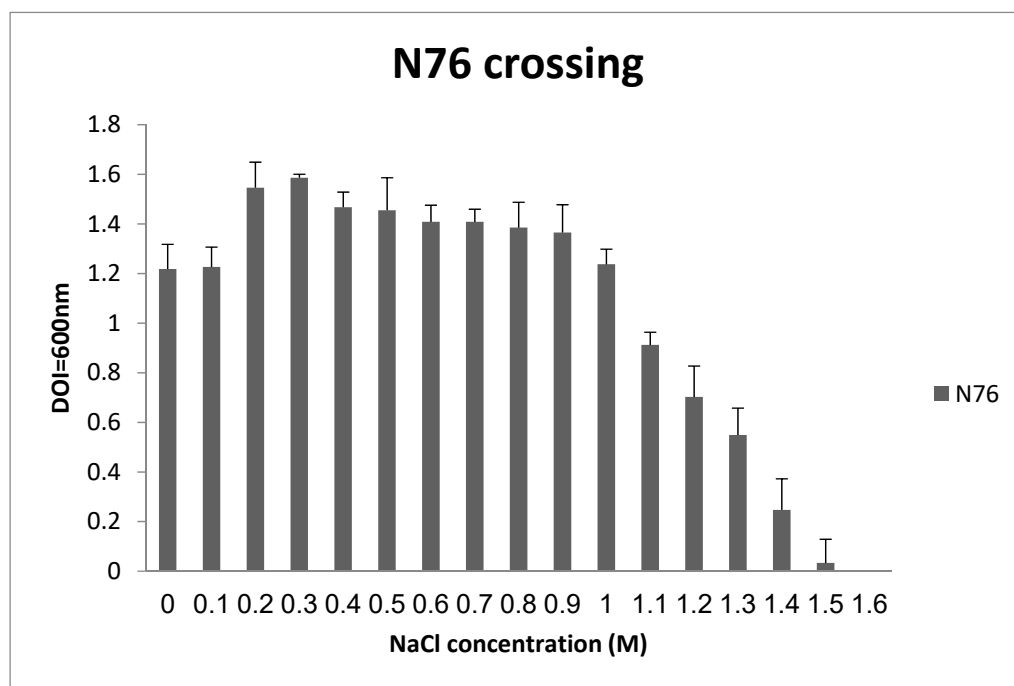
The performed physico-chemical analysis of the soil sample showed that it is characterized by the following parameters: pH = 8.25, electrical conductivity (EC) = 3.8 ds/m, gravimetric moisture content ( $\theta_g$ ) = 0.243 and total organic matter was = 1.2%

The soil sample was found to be alkaline (pH > 7), non-saline (EC < 4 ds/m) and rich in organic matters.

From this soil sample, a total of 10 bacterial isolates were obtained on NA medium at different NaCl concentrations (300, 600 and 900 mM). Among these isolates the isolate N76 was selected on the basis of its high salt tolerance and its ability to solubilize inorganic phosphorous at 0; 300; 600 and 900 mM NaCl, showing the highest solubilization index comparing to the other isolates.

### 3.2. Halotolerance of the Isolate N76

The halotolerance of N76 was studied on GMM medium prepared at (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 and 1600 mM of NaCl). The isolate N76 was found able to tolerate up to 1.4 M NaCl, with an optimum growth at 300 mM NaCl. The impact of salinity on the growth of the isolate N76 is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Impact of NaCl concentration (0–1.6 M) on the growth of isolate N76.

### 3.3. Molecular Identification of the Selected Isolate

Comparison of the partial 16S rDNA sequence of the strain N76 with those deposited in the GenBank database was performed by multiple alignments using the BLAST heuristic algorithms. The resulting sequence of the strain N76 (GenBank accession number ON810356) has shown 98% identity and 93% coverage with *Pseudomonas azotoformans* strain Seq323\_Culture2\_NC120620.

*Pseudomonas* sp. strains play an important role in maintaining soil fertility [34]. Their potential as plant growth promoting bacteria is well known and these microorganisms have been reported for their applications as biofertilizers [35]. Several studies have highlighted the ability of *Pseudomonas* strains to solubilize phosphorous such as *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* [27], *P. palleroniana* and *P. jessenii* [36], and *P. azotoformans* and *P. proteolytica* [37].

### 3.4. Phosphorous Solubilization on Solid and Liquid Medium

Phosphorous is one of the most important mineral nutrients for plant growth and development. PGPB improve plant growth via enhancement of plant nutrient acquisition through transformation and solubilization of insoluble phosphorous in the soil [38]. The use of halotolerant phosphorous-solubilizing PGPB is a sustainable alternative strategy to the use of chemical fertilizers for salt-affected soil fertilization with phosphorous and agricultural production improvement [39].

In this study, our strain was able to solubilize tricalcium phosphorous on PVK medium supplemented with 0, 300, 600 and 900 mM NaCl (Table 1). The solubilization indices (SI) varied from  $2.2 \pm 0.08$  to  $4 \pm 0.02$ , accordingly to the days of incubation. The highest SI ( $4 \pm 0.02$ ) was recorded in PVK medium at 300 mM NaCl after 15 days of incubation at 28 °C. This result may be explained by the fact that the optimum growth of *Pseudomonas azotoformans* under salinity conditions was at 300 mM NaCl (Table 1). Our results are

superior to those reported by [18]. The study carried out by [18] revealed the ability of a halophilic bacterial strain to solubilize phosphorous in saline medium (30 g/L); after 10 days of incubation, the phosphorous solubilization zone was about 2.5–3.0 cm.

**Table 1.** Inorganic phosphorous solubilization by *Pseudomonas azotoformans* N76 on both solid and liquid media.

Strain	NaCl (mM)	2 Days			7 Days			
		SI	Medium' pH	Soluble—P µg/mL	SI	Medium' pH	Soluble—P µg/mL	
N76	0	2.87 ± 0.05	6.22 ± 0.02	136.625 ± 0.01	3.5 ± 0.05	6.05 ± 0.03	142.875 ± 0.23	
	300	2.66 ± 0.03	6.66 ± 0.02	85.375 ± 0.03	3 ± 0.05	6 ± 0.01	141.625 ± 0.12	
	600	2.41 ± 0.02	6.77 ± 0.04	59.225 ± 0.06	2.42 ± 0.05	6.11 ± 0.01	117.875 ± 0.19	
	900	2.2 ± 0.08	6.79 ± 0.05	54.125 ± 0.02	2.33 ± 0.05	6.75 ± 0.02	59.425 ± 0.08	
			15 Days			21 Days		
		NaCl (mM)	SI	Medium' pH	Soluble—P µg/mL	SI	Medium' pH	Soluble—P µg/mL
		0	3.87 ± 0.06	5.36 ± 0.02	242.125 ± 0.25	3.5 ± 0.01	5.22 ± 0.03	242.875 ± 0.34
		300	4 ± 0.02	5.24 ± 0.04	255.125 ± 0.13	3.5 ± 0.03	5.16 ± 0.02	255.152 ± 0.11
		600	3.1 ± 0.03	5.74 ± 0.05	216.875 ± 0.12	3.14 ± 0.02	5.58 ± 0.05	219.125 ± 0.31
		900	3.3 ± 0.02	5.85 ± 0.02	201.625 ± 0.32	3 ± 0.01	5.61 ± 0.02	205.375 ± 0.25

*Pseudomonas azotoformans* was able to solubilize tricalcium phosphorous in PVK broth medium supplemented with 0, 300, 600 and 900 mM NaCl. The maximum phosphorous solubilization was recorded at 300 mM with  $255.152 \pm 0.01$  µg/mL of solubilized phosphorous followed by  $219.125 \pm 0.03$  µg/mL and  $205.375 \pm 0.05$  µg/mL obtained at 600 and 900 mM NaCl respectively. Our isolate showed maximum phosphorous solubilization under all NaCl concentrations at 21 days. Our results about the maximum amount of soluble phosphorous ( $255.152 \pm 0.01$  µg/mL) are a bit lower than those reported by [18] which were 283.16 µg/mL, and higher to those obtained by [37] which were 109.47 µg/mL. Therefore, our strain may be considered having a good potential as phosphorous-solubilizing bacterium.

In this study, solubilization of inorganic phosphorous in liquid medium by *P. azotoformans* was accompanied by a pH decrease from an initial pH = 7.0 to pH =  $5.16 \pm 0.02$  after 21 days incubation. A pH of  $5.16 \pm 0.02$  with  $255.15 \pm 0.01$  2 µg/mL of soluble phosphorous was recorded in the culture supernatant, while the pH of the control was constant (pH = 7). The significant decrease in pH (from 7 to  $5.16 \pm 0.02$ ) in the culture supernatant observed during inorganic phosphorous solubilization indicates the production and release of acids. During phosphorous solubilization, the pH of the growth medium decreases due to the production of several low molecular weight organic acids which facilitate phosphorous solubilization through their hydroxyl and carboxyl groups by chelating the phosphorous-bound cation, thereby converting it to a soluble form [34,37,40]. According to [39], several organic acids are applied in phosphorous solubilization such as gluconic, citric, lactic, 2-ketogluconic, oxalic, tartaric, acetic, fumaric, malic, glyoxalic, isobutyric, isovaleric, itaconic, propionic, succinic, aspartic, maleic, glutamic, glycolic, malonic and  $\alpha$ -ketobutyric acids. The release of oxalic and malic acid, lactic acid, citric acid and succinic acid into the growth media during phosphorous solubilization by *Pseudomonas azotoformans* has been reported by [37].

Several studies have reported the possible correlation between phosphorous solubilization rates and a decrease in the pH of growth medium [18,27,41]. However, Singh et al., 2014 [42] reported that there is no correlation between pH and the amount of solubi-

lized phosphorous, and reported also that phosphorous solubilization is not necessarily correlated with the acidity of medium.

### 3.5. Detection and Quantification of Phytase Activity

Phytate is the most abundant form of organic phosphorous (organic phosphorous represents 10 to 50% of total phosphorous) in the soil [39]. Phytase transforms phytate into soluble phosphorous (phosphorous esters) available to plants roots [39]. Our strain *Pseudomonas azotoformans* was able to mineralize phytate by the production of phytase in agar medium containing phytate as the only source of phosphorous. This agar medium was prepared at 0, 300, 600 and 900 mM NaCl. The incubation was performed at 28 °C during 2, 5 and 10 days. The solubilization indexes were determined. They were ranged from  $3.25 \pm 0.02$  to  $6.5 \pm 0.03$ . The highest IS =  $6.5 \pm 0.03$  was recorded at 300 mM NaCl and 10 days incubation (Table 2).

**Table 2.** Organic phosphorous mineralization by *Pseudomonas azotoformans* on solid and liquid media.

Strain	NaCl (mM)	2 Days		5 Days		10 Days	
		SI	Soluble— P U/mL	SI	Soluble— P U/mL	SI	Soluble— P U/mL
N76	0	$3.62 \pm 0.01$	0	$4.33 \pm 0.02$	$0.027 \pm 0.001$	$5.28 \pm 0.04$	$0.168 \pm 0.002$
	300	$3.28 \pm 0.03$	0	$5.28 \pm 0.02$	$0.014 \pm 0.004$	$6.5 \pm 0.03$	$0.097 \pm 0.004$
	600	$3.57 \pm 0.05$	0	$3.9 \pm 0.03$	$0.002 \pm 0.0001$	$5 \pm 0.01$	$0.012 \pm 0.001$
	900	$3.25 \pm 0.02$	0	$4.25 \pm 0.01$	0	$4.85 \pm 0.02$	$0.004 \pm 0.001$

The quantification of the amount of produced phytase by our isolate in the liquid medium amended with the different NaCl concentrations showed that until 2 days incubation the amount of soluble phosphorous was 0 µg/mL, which means that our strain did not produce the phytase yet. The maximum amount of soluble phosphorous is  $0.168 \pm 0.002$  U/mL ( $0.168 \pm 0.002$  µg/mL.min) at 0 mM/28 °C/10 days incubation (Table 2).

The phytase has been extracted and characterized from several *Pseudomonas* isolates, including *Pseudomonas simiae* and *Pseudomonas putida* [43], *Pseudomonas palleroniana*, and *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas azotoformans* [37]. Production of phytase by bacterial isolates could promote plant growth in phosphorous -deficient agricultural soils [29,44]. In our study, we focused on the solubilization of inorganic phosphorous (tricalcium phosphorous) more than on the mineralization of organic phosphorous (phytate) because the isolate N76 is more efficient in the solubilization of inorganic phosphorous than in the mineralization of organic phosphorous.

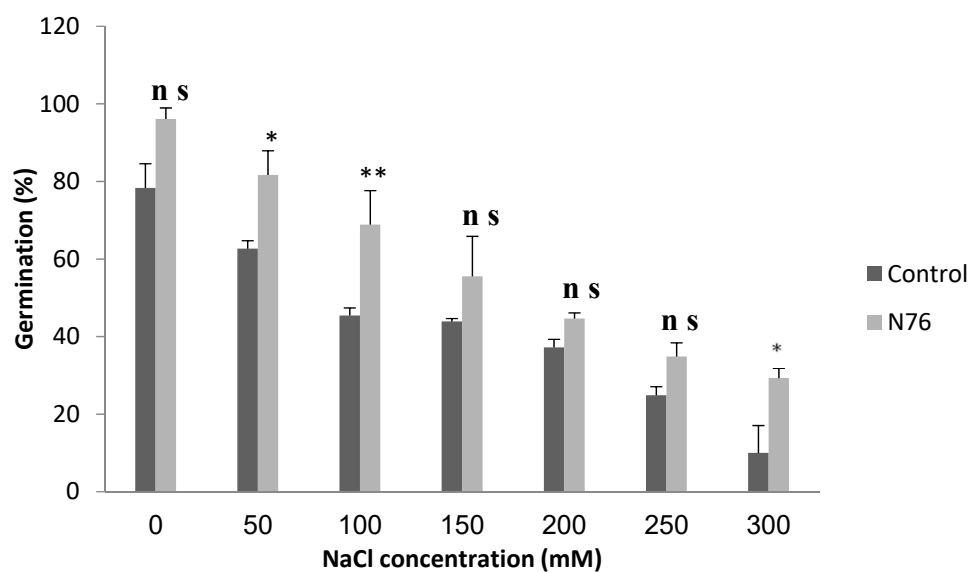
### 3.6. Effect of *P. azotoformans* on Wheat Seed Germination and Wheat Seedling Growth

Phosphorous is the second limiting nutrient for plant growth. This nutrient is involved in several processes such as cell division, new tissue growth, nucleic acid structure, protein synthesis, photosynthesis, glycolysis, respiration, membrane synthesis and stability, enzyme activation/inactivation, redox reactions, signaling, carbohydrate metabolism, nitrogen fixation, energy generation and transfer [45].

The availability of phosphorous in soils is about 0.05% (*w/w*), but only 0.1% of it is available for plant absorption. Plants need elevated available phosphorous concentrations to reach their maximum productivity [46]. Phosphorous deficiency leads to 5–15% reductions in crop yields [47]. Phosphorous availability in soil depends on several factors, including pH and ion concentrations in the soil [48]. Salinity significantly reduces phosphorous uptake by plants because phosphorous ions precipitate in such conditions and become unavailable to plant roots [49], so plants require additional phosphorous to maintain growth and productivity under such stress conditions [50].

### 3.6.1. Effect of *P. azotoformans* on Wheat Seed Germination

The impact of our strain in improvement of wheat seed germination was tested under different salinity conditions (0, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM). The results showed that salt stress has negatively affected the germination rates of both inoculated and uninoculated seeds. Increasing NaCl concentrations decreased wheat seed germination. Inoculated seeds with the *P. azotoformans* strain showed a significant ( $p < 0.005$ ) increase in germination rates compared to the control seeds at 100 mM. The final germination percentage has been improved from 78.33% to 96.11% at 0 mM NaCl due to seed inoculation with *P. azotoformans*. The germination rates increased from 62.66% to 81.66%; 45.33% to 68.88%; 43.88% to 55.55%; 37.66% to 44.66%; 24.88% to 34.66%; 10 to 29.33% under 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM NaCl, respectively (Figure 2).



**Figure 2.** Effect of *P. azotoformans* on wheat seed germination under different NaCl concentrations. ns: no significant difference; \*: significant difference ( $p < 0.05$ ); \*\*: significant difference ( $p < 0.005$ ).

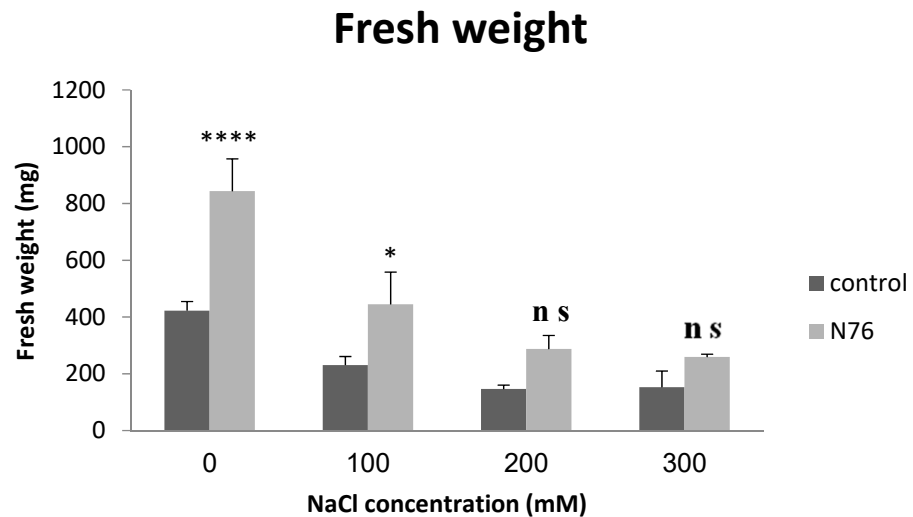
Salinity has a negative impact on seed germination and plant growth by affecting various metabolic processes from germination to maturity of the plant. Seed germination and early seedling growth are the stages that are the most susceptible to salinity and mitigating its effect at these early stages will increase the chance of establishing a successful crop under salt stress [51]. In our study, inoculation of wheat seeds with *P. azotoformans* strain significantly increased the germination rate compared to the control seeds; this improvement was observed under both stress and non-stress conditions. Since, PGPB application is beneficial in salt-affected soils, it is important to ensure that the used inoculum is able to resist and survive under these particular conditions. Several studies have reported that inoculation with PGPB results in increased seed germination rates, improves plant tolerance and promotes plant growth under salt stress [52,53].

### 3.6.2. Effect of *P. azotoformans* on Wheat Seedling Growth

The results of our study showed that wheat seedling growth was affected by NaCl at different concentrations (0, 100, 200 and 300), but seed priming with *P. azotoformans* N76 strain has mitigated the salt stress and promoted all the growth parameters of wheat seedlings. Fresh weights, dry weight, shoot and root lengths were improved in bacterial inoculated plants compared to the controls.

At 0 mM, fresh weight of the wheat seedlings has been increased from 99.68% due to bacterial inoculation. Under different concentrations of NaCl (100, 200 and 300 mM) the fresh weight of wheat seedlings has also increased from 92.95%, 96.30%, 70.10% respectively (Figure 3). Several studies have reported the positive effect of halotolerant PGPB is

decreasing the adverse effect of salt stress and enhancing wheat growth parameters (shoot length, fresh and dry weight of plants) under salt stress conditions [15,54]. Bhise et al., 2017 [55] reported that fresh weight of wheat plant inoculated with halotolerant PGPB was  $2.92 \pm 0.02$  g after 15 days of growth at 100 mM NaCl, these results are higher than our results.

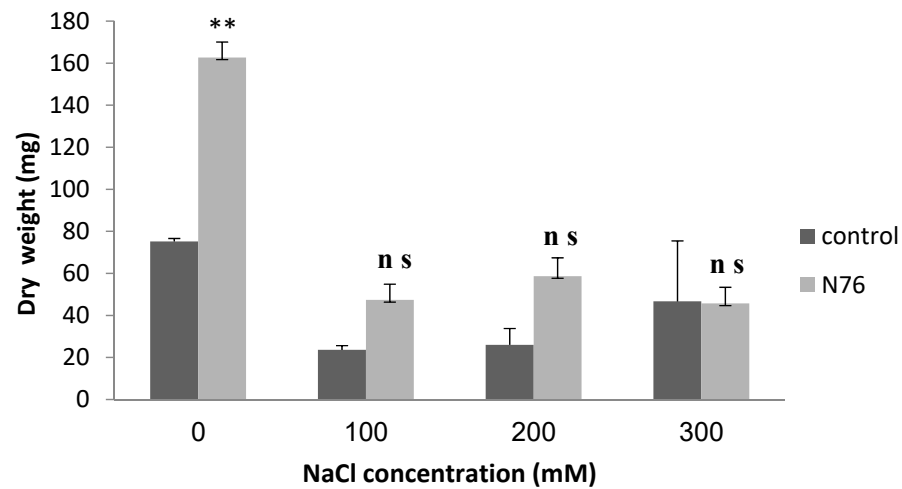


**Figure 3.** Effect of *P. azotoformans* on fresh weight of wheat seedlings under different NaCl concentrations. ns: no significant difference; \*: significant difference ( $p < 0.05$ ); \*\*\*\*: significant difference ( $p < 0.0001$ ).

According to our results, our strain *P. azotoformans* N76 has increased the wheat seedlings' dry weight under 0, 100 and 200 mM NaCl, from 116.41%, 100.55% and 125.61% respectively. However, at 300 mM the strain did not bring any positive effect on the seedlings' dry weight (Figure 4). Our results are similar to those reported by [55]. Bharti et al., 2016 [56] showed a significant increase in wheat dry weight after inoculation with halotolerant PGPB strain compared to non-inoculated wheat grown in non-saline and saline soil. Emami et al., 2020 [40] reported improved growth parameters when wheat cultivars were inoculated with phosphorous-solubilizing bacteria compared to the non-inoculated control, the dry weight of wheat plants was 10 g after 120 days of planting.

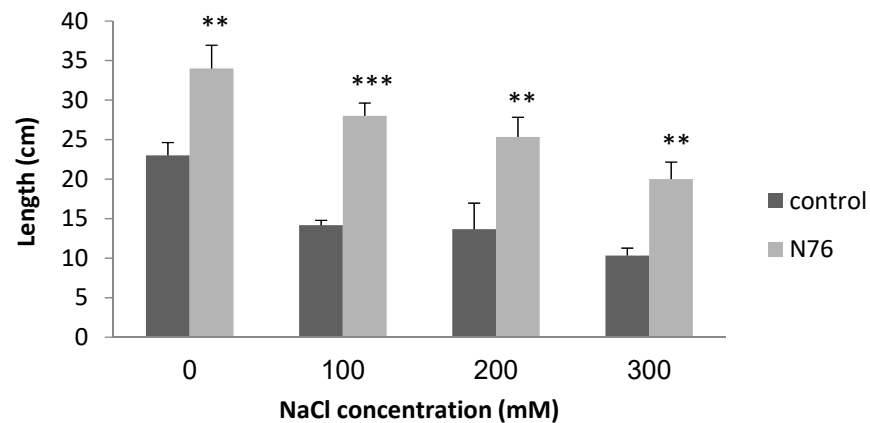
Our results clearly showed a decrease in shoot length of the uninoculated seedlings in increased NaCl concentrations. The *P. azotoformans* strain was found to increase the shoot length of inoculated seedlings compared to uninoculated ones under both salt stress and non-stress conditions. The shoot length was found to be increased from 47.82%, 97.74%, 85.43% and 93.6% at 0; 100; 200; and 300 mM NaCl. The obtained results are shown in Figure 5. Our results are much higher to those obtained by Bharti et al., 2016 [56], who reported wheat shoot length of  $11.46 \pm 0.37$  cm obtained after bacterial inoculation at 100 mM. Pande et al., 2017 [57] showed that maize seeds inoculated with phosphorous-solubilizing bacteria had the best growth compared to the non-inoculated treatment, which may be due to the production of organic acids (such as gluconic, formic and citric acids) by these strains. Iyer et al., 2017 [58] reported that shoot length and weight were improved when chickpea seeds were inoculated with PSB.

## Dry weight



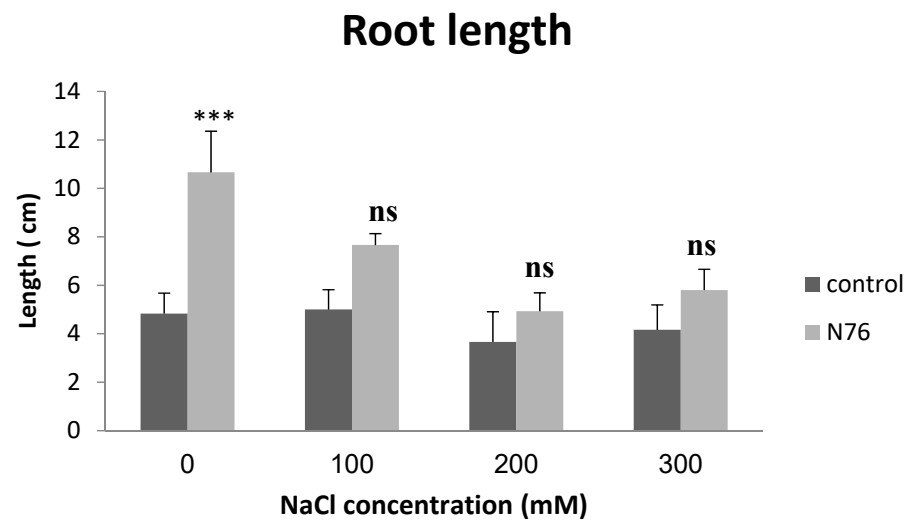
**Figure 4.** Effect of *P. azotoformans* on the dry weight of wheat seedlings under different NaCl concentrations. ns: no significant difference; \*\*: significant difference ( $p < 0.005$ ).

## Shoot length



**Figure 5.** Effect of *P. azotoformans* on the shoot length of wheat seedlings under different NaCl concentrations. \*\*: significant difference ( $p < 0.005$ ); \*\*\*: significant difference ( $p < 0.001$ ).

The results of our investigation showed that under different concentrations of NaCl the *P. azotoformans* strain has a positive effect on the root length of the wheat seedlings compared to the control. Thus, the root length was improved from 120.70%, 53.2%, 34.69% and 39.42% at 0, 100, 200 and 300 mM, respectively (Figure 6). According to these results, the increase in root growth may be due to increased P uptake in wheat seeds inoculated with the *P. azotoformans* strain. These results are similar to those obtained by [32] whereby wheat inoculation with halotolerant bacterial strains improved wheat growth under salt stress (80 mM, 160 mM and 320 mM) and root lengths increased by 90% compared to non-inoculated controls at 320 mM NaCl. Upadhyay and Singh (2015) [59] also showed that wheat inoculation with PGPB increased root length at 200 mM. Similarly, several studies have reported increased phosphorous uptake in inoculated plants as a result of phosphorous solubilization by PGPB [17,40,60]



**Figure 6.** Effect of *P. azotoformans* on the root length of wheat seedlings under different NaCl concentrations. ns: no significant difference; \*\*\*: significant difference ( $p < 0.001$ ).

### 3.7. Quantitative Estimation of Soluble Phosphorous in the Soil

*Pseudomonas* strains play an important role as plant growth promoters under salt stress via the expression of several PGP traits [53,61]. In our study, inoculation of wheat seeds with *P. azotoformans* improved all the seedlings' growth parameters; this improvement may be due to bio-solubilization of phosphorous in the soil.

The quantity of soluble phosphorous in the soil, where the wheat seedlings were growing, was measured to determine the effect of *P. azotoformans* strain on phosphorous solubilization in soils watered with saline solutions of different NaCl concentrations (0, 100, 200 and 300 mM).

Phosphorous content in the soil before sowing the wheat seed was  $18.51 \pm 0.25$  ppm. After 15 days of uninoculated wheat seedlings' growth, the phosphorous concentrations were considerably decreased in the soil watered with saline solutions of 0 and 100 mM NaCl. This decrease may be explained by the fact that the plant has absorbed soluble phosphorous and used it in its metabolism during its growth. The amounts of phosphorous in soils watered with saline solutions of 200 and 300 mM NaCl has slightly decreased from  $18.51 \pm 0.28$  to  $17.82 \pm 0.56$  and  $17.52 \pm 0.62$  ppm (Table 3). These results may show the negative effect of salt stress on phosphorous uptake by the wheat seedlings.

**Table 3.** The phosphorous availability (ppm) in control soil and soil containing inoculated seeds with *Pseudomonas azotoformans*.

	0 mM	100 mM	200 mM	300 mM
Control soil	$10.56 \pm 0.33$	$12.6 \pm 0.28$	$17.82 \pm 0.56$	$17.52 \pm 0.62$
Soil containing N76-inoculated-seeds	$23.3 \pm 0.74$	$49.42 \pm 0.36$	$19.56 \pm 0.45$	$19.5 \pm 0.51$

The soils where *P. azotoformans* inoculated seedlings were growing showed increased soluble phosphorous content. The highest amount of soluble phosphorous was  $49.42 \pm 0.36$  ppm, recorded in soil irrigated with saline solution of 100 mM NaCl. In soils watered with saline solutions of 200 and 300 mM, the phosphorous contents were slightly increased (Table 3). Our results confirm what was reported by Srinivasan et al., 2012 [61] where the amount of phosphorous released by phosphorous-solubilizing fungi decreased with increasing NaCl concentration in the soil. Phosphorous availability is enhanced by microbial solubilization of insoluble phosphorous in the soil, which increases phosphorous availability to the roots. Thus, these phosphorous-solubilizing bacteria play a key role in restoration of soluble phosphorous

levels in the salt-affected and non-affected soils. The strain *Pseudomonas azotoformans* can also be used to produce smart fertilizers as described by Raimondi et al., 2021 [62].

#### 4. Conclusions

Salt stress is a significant constraint for plant growth and productivity. The use of halotolerant-PGPB is a promising solution for salt stress alleviation and plant growth promotion under such conditions. Phosphorous-solubilizing and phosphorous-mineralizing halotolerant-PGPB can be used as important biofertilizers to increase the availability of soluble phosphorous for plant absorption in salinity-affected soils.

The results of our investigation highlighted the ability of the halotolerant bacterial isolate N76, identified as *P. azotoformans*, to solubilize inorganic phosphorous and to mineralize organic phosphorous at different NaCl concentrations. Inoculation of wheat seeds with this strain has resulted in increased germination rates and improved growth parameters of the wheat seedlings, both under salt stress and non-stress conditions. In addition, this strain was able to restore the amounts of soluble phosphorous in saline and non-saline soil. Therefore, our strain may be used as a biofertilizer for wheat growth improvement under salt stress.

According to the results of our study, the *P. azotoformans* strain N76 is highly recommended to be applied as a biofertilizer in salt-affected soil. This strategy can replace the massive use of chemical fertilizers in agricultural fields, thus promoting healthy and sustainable agriculture. Future study of the genetic mechanisms involved in inorganic phosphorous solubilization and organic phosphorous mineralization by this strain is required for a better understanding of how PGPB improve plant growth.

**Author Contributions:** The first author (N.B.) wrote the draft and realized the different experiments in the laboratory; the second author (S.A.B.) completed the draft until the final manuscript stage; the third author (J.M.) participated in the experimental design and several analyses; M.F.C. realized the molecular sequencing of the bacteria gene and the registration in the gene bank; C.C. revised checked the manuscript and corrected it; E.-h.N. made the conception and all the design of the paper, and after checking the final version, he added some necessary details. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by national funds through FCT—Fundação para a Ciência e a Tecnologia—in the frame of FCT R&D Unit funding UIDB/00329/2020.

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

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

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

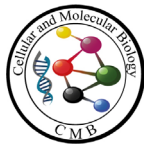
#### References

1. Bensidhoum, L.; Ait Bessai, S.; Nabti, E. Restoration of Plant Growth Under Saline Soil by Halotolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). In *Saline Soil-Based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*; Kumar, M., Etesami, H., Kumar, V., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 23–51.
2. Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Yahiaoui, B. 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.* **2016**, *10*, 387–399.
3. Liu, C.H.; Siew, W.; Hung, Y.T.; Jiang, Y.T.; Huang, C.H. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Gene in *Pseudomonas azotoformans* is Associated with the Amelioration of Salinity Stress in Tomato. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 913–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Niu, X.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.; Pardo, J.M. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 735–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kumar, A.; Singh, S.; Gaurav, A.K.; Srivastava, S.; Verma, J.P. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Singh, M.; Kumar, A.; Singh, R.; Pandey, K.D. Endophytic bacteria: A new source of bioactive compounds. *3 Biotech.* **2017**, *7*, 315. [[CrossRef](#)]

7. Ait Bessai, S.; Bensidhoum, L.; Nabti, E. Optimization of IAA production by telluric bacteria isolated from northern Algeria. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2022**, *41*, 102319. [[CrossRef](#)]
8. Mojgani, N. Bacteriocin-producing rhizosphere bacteria and their potential as biocontrol agent. In *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*; Mehnaz, S., Ed.; Springer Nature: Singapore, 2017; pp. 165–181.
9. Gamalero, E.; Berta, G.; Glick, B.R. Effects of plant growth promoting bacteria and AM fungi on the response of plants to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 501–514. [[CrossRef](#)]
10. Padda, K.P.; Puri, A.; Chanway, C.P. Plant growth promotion and nitrogen fixation in canola by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa* and its GFP-tagged derivative in a long-term study. *Botany* **2016**, *94*, 1209–1217. [[CrossRef](#)]
11. Gupta, G.; Parihar, S.S.; Ahirwar, N.K.; Snehi, S.K.; Singh, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2015**, *7*, 96–102.
12. Ait Bessai, S.; Corrêa, A.; Cruz, C.; Yadav, A.N.; Nabti, E. Plant Growth Promoting Microbes as Bio-fertilizers: Promising solutions for sustainable agriculture under climate change associated abiotic stresses. *Plant. Sci. Today* **2022**, *8*, 60–76.
13. Nabti, E.; Sahnoune, M.; Adjrad, S.; Dommelen, A.V.; Ghoul, M.; Schmid, M.; Hartman, A.A. Halophilic and Osmotolerant *Azospirillum brasilense* Strain from Algerian Soil Restores Wheat Growth under Saline Conditions. *Eng. Life Sci.* **2007**, *7*, 354–360. [[CrossRef](#)]
14. Egamberdieva, D.; Kucharova, Z. Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biol. Fert. Soil.* **2009**, *45*, 561–573. [[CrossRef](#)]
15. Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* **2003**, *255*, 571–586. [[CrossRef](#)]
16. Marschner, P.; Yang, C.H.; Lieberei, R.; Crowley, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **2001**, *33*, 1437–1445. [[CrossRef](#)]
17. Nico, M.; Ribauda, C.M.; Gori, J.I.; Cantore, M.L.; Curá, J.A. Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Appl. Soil Ecol.* **2012**, *61*, 190–195. [[CrossRef](#)]
18. Zhu, F.; Qu, L.; Hong, X.; Sun, X. Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2011**, *2011*, 615032. [[CrossRef](#)]
19. Qureshi, M.A.; Ahmad, Z.A.; Akhtar, N.; Iqbal, A.; Mujeeb, F.; Shakir, M.A. Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P-availability and promoting cotton growth. *J. Anim. Plant Sci.* **2012**, *22*, 204–210.
20. Oteino, N.; Lally, R.D.; Kiwanuka, S.; Lloyd, A.; Ryan, D.; Germaine, K.J.; Dowling, D.N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 745. [[CrossRef](#)]
21. Trivedi, P.; Sa, T. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr. Microbiol.* **2008**, *56*, 140–144. [[CrossRef](#)]
22. Kour, D.; Rana, K.L.; Kaur, T.; Yadav, N.; Yadav, A.N.; Kumar, M.; Kumar, V.; Dhaliwal, H.S.; Saxena, A.K. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: A review. *Pedosphere* **2021**, *31*, 43–75. [[CrossRef](#)]
23. Hartmann, A.; Prabhu, S.R.; Galinski, E.A. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil* **1991**, *137*, 105–109. [[CrossRef](#)]
24. Pikovskaya, R. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* **1948**, *17*, 362–370.
25. Sagervanshi, A.; Kumari, P.; Nagee, A.; Kumar, A. Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from Anand agriculture soil. *Int. J. Lif. Sci. Pharm. Res.* **2012**, *2*, 245–255.
26. Edi Premono, M.; Moawad, A.M.; Vlek, P.L.G. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones. J. Crop Sci.* **1996**, *11*, 13–23.
27. Jha, B.K.; Gandhi Pragash, M.; Cletus, J.; Raman, G.; Sakthivel, N. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 573–581. [[CrossRef](#)]
28. Saiyad, S.A.; Jhala, Y.K.; Vyas, R.V. Comparative efficiency of five potash and phosphate solubilizing bacteria and their key enzymes useful for enhancing and improvement of soil fertility. *Int. J. Sci. Res. Publ.* **2015**, *5*, 2250–3153.
29. Kumar, V.; Singh, P.; Jorquera, M.J.; Sangwan, P.; Kumar, P.; Verma, A.K.; Agrawal, S. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 1361–1369. [[CrossRef](#)]
30. Götz, M.; Nirenberg, H.; Krause, S.; Wolters, H.; Draeger, S.; Buchner, A.; Lottmann, J.; Berg, G.; Smalla, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **2006**, *58*, 404–413. [[CrossRef](#)]
31. Nabti, E.; Bensidhoum, L.; Tabli, N.; Dahel, D.; Weiss, A.; Rothballer, M.; Schmid, M.; Hartmann, A. Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by *Cellulosi microbium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *Eur. J. Soil Biol.* **2014**, *61*, 20–26. [[CrossRef](#)]
32. Ramadoss, D.; Lakkineni, V.K.; Bose, P.; Ali, S.; Annapurna, K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Plus.* **2013**, *2*, 6. [[CrossRef](#)]

33. Olsen, S.R.; Cole, C.V.; Watanabe, F.S.; Dean, L.A. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *U.S. Dep. Agric.* **1954**, *19*, 939.
34. Chen, Y.P.; Rekha, P.D.; Arun, A.B.; Shen, F.T.; Lai, W.A.; Young, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* **2006**, *34*, 33–34. [[CrossRef](#)]
35. Vyas, P.; Gulati, A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tomer, S.; Suyal, D.C.; Shukla, A.; Rajwar, J.; Yadav, A.; Shouche, Y.; Goel, R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from Western Indian Himalayan. soils. *3 Biotech.* **2017**, *7*, 95–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Adhikari, P.; Jain, R.; Sharma, A.; Pandey, A. Plant Growth Promotion at Low Temperature by Phosphate-Solubilizing *Pseudomonas* spp. Isolated from High-Altitude Himalayan. *Soil. Microb. Ecol.* **2021**, *82*, 677–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Babalola, O.O.; Glick, B.R. The use of microbial inoculants in African agriculture: Current practice and future prospects. *J. Food Agric. Environ.* **2012**, *10*, 540–549.
39. Alori, E.T.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 971. [[CrossRef](#)]
40. Emami, S.; Alikhani, H.A.; Pourbabaee, A.A.; Etesami, H.; Motasharezadeh, B.; Sarmadian, F. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improve phosphorus use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere* **2020**, *14*, 100196. [[CrossRef](#)]
41. Chen, W.; Yang, F.; Zhang, L.; Wang, J. Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *Pseudomonas* sp. PSB12: Effects of phosphorus forms and carbon sources. *Geomicrobiol. J.* **2015**, *33*, 870–877. [[CrossRef](#)]
42. Singh, P.; Kumar, V.; Agrawal, S. Evaluation of Phytase Producing Bacteria for Their Plant Growth Promoting Activities. *Int. J. Microbiol.* **2014**, *2014*, 426483. [[CrossRef](#)]
43. Shulse, C.N.; Chovatia, M.; Agosto, C.; Wang, G.; Hamilton, M.; Deutsch, S.; Yoshikuni, Y.; Blowa, M.J. Engineered Root Bacteria Release Plant-Available Phosphate from Phytate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01210-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Idriss, E.E.; Makarewicz, O.; Farouk, A.; Rosner, K.; Greiner, R.; Bochow, H.; Richter, T.; Borriss, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect. *Microbiology* **2002**, *148*, 2097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Vance, C.P.; Ehde-Stone, C.; Allan, D.L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **2003**, *157*, 423–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lambers, H.; Plaxton, W.C. Phosphorus: Back to the Roots. *Annu. Plant Apocal.* **2018**, *48*, 3–22.
47. Shenoy, V.V.; Kalagudi, G.M. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnol. Adv.* **2005**, *23*, 501–513. [[CrossRef](#)]
48. Bano, A.; Fatima, M. Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fertility Soils* **2009**, *45*, 405–413. [[CrossRef](#)]
49. Abbasi, M.K.; Musa, N.; Manzoor, M. Mineralization of soluble P fertilizers and insoluble rock phosphate in response to phosphate-solubilizing bacteria and poultry manure and their effect on the growth and P utilization efficiency of chilli (*Capsicum annum* L.). *Biogeoscience* **2015**, *12*, 4607–4619. [[CrossRef](#)]
50. Sidari, M.; Mallamaci, C.; Muscolo, A. Drought, salinity and heat differently affect seed germination of *Pinus pinea*. *J. For. Res.* **2008**, *13*, 326–330. [[CrossRef](#)]
51. Daliakopoulos, I.N.; Tsanis, I.K.; Koutroulis, A.; Kourgialas, N.N.; Varouchakis, A.E.; Karatzas, G.P.; Ritsema, C.J. The threat of soil salinity: A European scale review. *Sci. Total Environ.* **2016**, *573*, 727–739. [[CrossRef](#)]
52. Tiwari, S.; Lata, C.; Chauhan, P.S.; Nautiyal, C.S. *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *99*, 108–117. [[CrossRef](#)]
53. Nadeem, S.M.; Zahir, Z.A.; Naveed, M.; Nawaz, S. Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Ann. Microbiol.* **2013**, *63*, 225–232. [[CrossRef](#)]
54. Singh, P.N.; Jha, R.P. The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155026.
55. Bhise, K.K.; Bhagwat, P.K.; Dandge, P.B. Synergistic effect of *Chryseobacterium gleum* sp. SUK with ACC deaminase activity in alleviation of salt stress and plant growth promotion in *Triticum aestivum* L. *3 Biotech.* **2017**, *7*, 105. [[CrossRef](#)]
56. Bharti, N.; Pandey, S.S.; Barnawal, D.; Patel, V.; Kalra, A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Pande, P.; Pandey, P.; Mehra, S.; Singh, M.; Kaushik, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2017**, *15*, 379–391. [[CrossRef](#)]
58. Iyer, B.; Rajput, M.S.; Rajkumar, S. Effect of succinate on phosphate solubilization in nitrogen fixing bacteria harbouring chick pea and their effect on plant growth. *Microbiol. Res.* **2017**, *202*, 43–50. [[CrossRef](#)]
59. Upadhyay, S.K.; Singh, D.P. Effect of salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biol.* **2015**, *17*, 28–293. [[CrossRef](#)]
60. Banaei-Asl, F.; Bandehagh, A.; Ulliaei, E.D.; Farajzadeh, D.; Sakata, K.; Mustafa, G.; Komatsu, S. Proteomic analysis of canola root inoculated with bacteria under salt stress. *J. Proteom.* **2015**, *124*, 88–111. [[CrossRef](#)]

61. Srinivasan, R.; Alagawadi, A.R.; Yandigeri, M.S.; Meena, K.K.; Saxena, A.K. Characterization of phosphate-solubilizing microorganism from salt-affected soils of India and their effect on growth of sorghum plants [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Ann. Microbiol.* **2012**, *62*, 93–105. [[CrossRef](#)]
62. Raimondi, G.; Maucieri, C.; Toffanin, A.; Renella, G.; Borin, M. Smart fertilizers: What should we mean and where should we go? *Ital. J. Agron.* **2021**, *16*. [[CrossRef](#)]



## Isolation, *in vitro* evaluation and construction of Versatile Microbial Consortia

Kamal Dahdah<sup>1,2</sup>, Nabil Charchar<sup>2</sup>, Laid Bouchaala<sup>2</sup>, Heidar Nourine<sup>2</sup>, Nadia Belkabila<sup>1</sup>, Juliana Melo<sup>3</sup>, El-Hafid Nabti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria

<sup>2</sup> Division Biotechnologie et Environnement, Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine, Algérie

<sup>3</sup> Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Original paper

#### Article history:

Received: May 11, 2022

Accepted: August 22, 2022

Published: August 31, 2022

#### Keywords:

Versatile microbial consortia; enzyme; biodegradation; agriculture; organic waste

### ABSTRACT

In this study, we constructed versatile microbial consortia (VMC) with potential applications in organic waste management. After the sample and isolation procedure, the purified isolates were evaluated for their enzymatic potential, such as cellulose, xylan, petroleum, and proteins -hydrolysis. Selected isolates were screened for other traits, such as phosphate solubilization, nitrogen fixation and antimicrobial activity. Finally, the isolates were grouped into consortia according to their compatibility. The microorganisms selected for each consortium were identified by partial analysis of the 16S rRNA (bacteria) and the ITS region of the 18S RNA gene (fungi). Two microbial consortia were obtained and named VMC1 and VMC2. These two consortia are characterized by several activities of agricultural and environmental interest, such as the degradation of recalcitrant and polluting organic compounds, nitrogen fixation, IAA production phosphate solubilization and antimicrobial activity. Molecular identification of the microorganisms forming the two consortia allowed us to identify two species of actinomycetes (*Streptomyces* sp. BM1B and *Streptomyces* sp. BM2B), one species of Actinobacteria (*Gordonia amicalis* strain BFPx) and three fungal species (*Aspergillus luppii* strain 3NR, *Aspergillus terreus* strain BVkn and *Penicillium* sp. BM3). The term "Versatile Microbial Consortia" is a term that we proposed in this study to establish a methodology for building multifunctional microbial groups for the better valorization of organic waste.

Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2022.68.8.31>

Copyright: © 2022 by the C.M.B. Association. All rights reserved.

### Introduction

In recent years, the application of chemical fertilizers and pesticides has increased rapidly and is a serious concern for agricultural production and environmental management. Currently, conventional agriculture and its practices are presented as a major threat to soil vitality by causing the alteration of microbial functional diversity. Intensive agriculture leads to land degradation and environmental pollution in several agroecosystems (1-3). The organic fraction of organic waste represents a precious resource that could be recycled and transformed into fertilizer rich in nutrients. Organic waste comprises recalcitrant substances such as cellulose, hemicellulose and lignin (4, 5). Soils contain a high proportion of organic matter from, for example, plant residues. This proportion is an important aspect of the function and quality of the soil (3, 6). Large quantities of organic waste from plant crops are a real environmental problem because this waste represents a real focus of microorganisms, some of which are pathogenic, which can survive in agricultural soils and infect subsequent crops (7). In addition, organic fertilizers of animal origin recycled into agricultural soils may contain pathogenic bacteria that can threaten human and environmental health (8). Also, waste polluted by hydrocarbons can affect agricultural production in terms of quantity and quality (9).

Microorganisms govern the functioning of global biogeochemical cycles (6). They have been considered an important source of natural compounds of agro-active importance (10). The soil ecosystem includes various microbial communities that perform various functions, namely, decomposition of organic matter, storage and release of nutrients for plants, regulation of plant growth, etc. (5). Bacteria dominate in the initial phases of decomposition of plant residues, while fungi predominate in later phases (3). The decomposition of high molecular weight organic matter in the soil is mediated by microbial extracellular enzymes. These enzymes are mainly hydrolases that help to acquire carbon, phosphorus and nitrogen (6, 11). The essential role of beneficial microorganisms is the decomposition of organic waste into nutritive elements, detoxification, suppression of plant diseases, improving nutrient cycling, nitrogen (N) fixation and production of many bioactive compounds, including vitamins and hormones (12). Many studies have demonstrated the beneficial effect of microorganisms on crop yields and quality. However, the use of microbial consortia in agriculture remains low. Due to the synergy of the microorganisms that populate them, microbial consortia have more properties than an individual inoculum (1). A microbial consortium is made up of several microbial species working together with broad metabolic capacities (13). The use of microbial consortia in organic waste degradation is sure, efficient and econom-

\* Corresponding author. Email: [nabtielhafid1977@yahoo.com](mailto:nabtielhafid1977@yahoo.com); [el-hafid.nabti@univ-bejaia.dz](mailto:el-hafid.nabti@univ-bejaia.dz)

ical (14).

In this work, the term « Versatile Microbial Consortia (VMC) » refers to a group of microorganisms that can ensure many functions simultaneously, i.e., degradation of recalcitrant compounds, nitrogen fixation, phosphate solubilization, antimicrobial activity, hydrocarbons degradation, etc. Hence, the objective of this study is to construct VMC with multiple functions that can serve potential applications in organic waste management.

## Materials and Methods

### Sampling and isolation

#### *Isolation of cellulose-degrading microorganisms*

To isolate cellulose-degrading microorganisms, ruminant manure and soil were sampled in sterile bags and transported to the laboratory. Then, a dilution series was prepared and 100  $\mu$ L of each dilution was spread on the surface of a Petri dishes containing the mineral salt medium (MSM) composed in g/l: NaCl (0.5),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.1),  $\text{NaNO}_3$  (0.2),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.025),  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (1.0),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4), agar (15), and pH adjusted to 7.0 (15) supplemented with 1% carboxymethylcellulose (CMC) as the sole carbon source. Petri dishes were incubated at 30°C until colonies appeared. The colonies which appear in the highest dilutions were purified on the same medium. Pure cultures were obtained by successive sub-culturing on appropriate medium and stored at 4°C for later use.

#### *Isolation of petroleum-degrading bacteria*

To isolate petroleum-degrading bacteria, 50 $\mu$ l of the stock sample solution (fresh sewage sludge collected from a wastewater treatment plant, Ibn Ziad-Constantine and mixed with sterile distilled water at 10%) was mixed with 200 $\mu$ l of the sterile crude oil, which covers the surface MSM-agar then incubated at 30°C (15). After incubation, two successive subcultures were carried out on a new surface of MSM-agar medium covered with 200 $\mu$ l of well-spread sterile crude oil, then incubated at 30°C. Pure cultures were obtained by successive sub-culturing on appropriate medium and stored at 4°C for later use. Bacteria isolated on MSM-crude oil agar were evaluated for degradation of crude oil in a liquid medium. Erlenmeyer flask-100ml containing 30ml of liquid MSM medium supplemented with 1% crude oil as the sole carbon source was inoculated with 200 $\mu$ l of bacterial suspension washed twice in PBS solution (8000rpm/10min), then incubated at 30°C under continuous agitation (150rpm) for 10 days.

#### *In vitro detection of some potential traits of purified isolates*

Purified isolates were evaluated for their enzymatic potentials, such as hydrolysis of protein (16), starch (17), cellulose (18), xylan (19), lipid (20), urea (21) and gelatin (22); production of melanin (23) and ammonia ( $\text{NH}_3$ ) (24); nitrogen fixation (25). Other tests are detailed below.

### Phosphate solubilization

Solubilization of phosphate (P) was evaluated on Pikovskaya medium (PVK) containing in g/L: (10),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (5),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.5), NaCl (0.2),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1), KCl (0.2), Yeast extract (0.5),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.002),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.002), Agar (15), and pH adjusted to 7. The inoculation was done, on a Petri dish containing the PVK

medium, by streaking in the case of bacteria and actinomycetes and by deposit of agar disk for fungi. The appearance of a clear area around the colonies indicates the solubilization of P (26). We also studied, for fungi, the solubilization of P in test tubes containing PVK medium by agar disk deposition of each fungus. The appearance of a clear area below the fungal disk indicates the P solubilization.

### Indole acetic acid (IAA) production

After each incubation period, the supernatant of bacterial cultures and fungi was collected in sterile Eppendorf-1.5ml tubes and then centrifuged (14,000 rpm, 15 min). After centrifugation, the quantification of IAA in the supernatants was estimated by the colorimetric method and detected by thin-layer chromatography (TLC) (10, 27).

### Biodegradation of feather waste

Proteolytic isolates were evaluated for their potential to degrade keratin waste. For this, fresh and whole poultry feathers were washed with distilled water and then dried. Thirty milliliters of minimal medium [ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4g/l) and  $\text{CaCl}_2$  (0.22g/l)] were introduced into each 100ml Erlenmeyer flask containing three poultry feathers and autoclaved. Erlenmeyer flasks were inoculated with each proteolytic isolate and then incubated for 21 days under continuous agitation (200rpm) (28).

### Antimicrobial activity

The antagonism of the selected isolates was studied by cross-streak method (29) against four pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, obtained from National Center for Biotechnology Research, Constantine, Algeria). While antifungal activity was investigated against three phytopathogenic fungi: *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Botrytis cinerea* BC1 (obtained from the mycology laboratory of Bejaia university, Algeria) and *Fusarium* sp. F6 (obtained from National Center for Biotechnology Research, Constantine, Algeria) using the direct confrontation method on the Petri dish (30). The antagonism tests were performed in duplicate

### Grouping of selected isolates into a consortium

The cross-streak method was used to group the selected isolates into a consortium (14). Each isolate was streaked along the center of the Petri dish or by deposition of an agar disc in the case of fungi on TSA medium, then incubated for 24h for bacteria and 5 days for actinomycetes and fungi. After incubation, the isolates were inoculated with a streak perpendicular to the pre-incubated streaks and then incubated for 48h for bacteria and 5 days for actinomycetes and fungi. Isolates are grouped in the same consortium when no antagonism has been observed between them.

### Morphological and molecular characterization of selected isolates

The isolates that make up the two consortia VMC1 and VMC2 have been morphologically characterized and identified by analysis of the rDNA gene. In the case of bacteria, DNA extraction and PCR amplification of the 16S rRNA region were performed as described by Ferrari et

al. (31) and Pudasaini et al. (32), respectively. For fungi, DNA extraction and PCR amplification of 18S rRNA IST regions were performed as described by Azevedo et al. (33). The PCR amplicons obtained were purified and sequenced (33). The obtained sequences were subjected to sequence similarity comparison using the NCBI Gene Bank database. To build the phylogenetic tree, sequences were aligned using the multiple sequence alignment program from the MEGA 11 program.

## Results and Discussion

### Isolation and purification

This work was carried out by isolating microbial strains from the soil, sewage sludge and ruminant manure. The purification allowed us to have 11 different isolates (Six cellulose-degrading microorganisms and five petroleum-degrading bacteria), which include fungi, actinomycetes and bacteria. The number of purified isolates on the isolation media and the isolation sample are presented in Table 1.

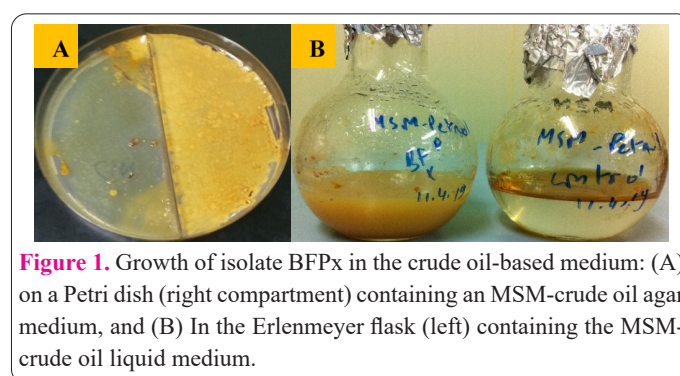
The evaluation of the growth of petroleum-degrading bacteria in the liquid medium allowed us to select the BFPx isolate, which showed good growth (Figure 1). Consequently, seven isolates were selected for further work. A similar approach was taken by Saha and Santra (34) to isolate microorganisms from municipal solid waste for use in organic waste degradation. In order to select petroleum-degrading bacteria, Mukred et al. (35) evaluated the growth of 62 bacterial isolates on MSM-crude oil agar and then on MSM- crude oil liquid. Only four isolates showed good growth and degradation of crude oil.

### Enzymes activities and other features

Most isolates purified from different samples have a diverse and important enzyme arsenal, particularly CMCase (Isolates 5NR, BM1B and BM2B), xylanase (Isolates 5NR, BM3 and BM1B), amylase (Isolates BM1B and BVkn), protease and lipase (Isolate 5NR), and gelatinase (Isolates BM3, BM2B, BVkn and BM1B) (Table 2). Saha

and Santra (34) reported a similar study. They subjected nine isolates to a qualitative test for producing eight extracellular enzymes such as cellulase, lipase, protease, amylase, lecithinase, etc. In addition, Sarkar and Chourasia (14) screened isolated bacteria to produce extracellular enzymes necessary for the effective degradation of organic solid waste. In order to screen fungal isolates for their multiple functional traits and impact on plant growth, Imran et al. (11) evaluated 73 isolates for extracellular enzyme production. They found that 95.52%, 61.11%, 35.82% and 41.79% of isolates were positive for lipase, amylase, chitinase and cellulase, respectively.

Extracellular enzymes play an important role in agriculture and the environment. They play an important role in nutrient cycling by enhancing the decomposition of residual organic matter in the soil, thereby providing nutrients to plants. However, their direct role in promoting plant growth is less explored (11, 5). Cellulase and xylanase play an important role in degrading biomass rich in cellulose and hemicelluloses (36). Microorganisms such as *Penicillium* sp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* sp., *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. produce cellulolytic enzymes during organic waste degradation (4). Lipases were used in the pretreatment of sludge resulting from the treatment of wastewater and dairy products to reduce the fat content (37). In addition, lipolytic activity promotes the biodegradation of organic pollutants such as oil waste



**Figure 1.** Growth of isolate BFPx in the crude oil-based medium: (A) on a Petri dish (right compartment) containing an MSM-crude oil agar medium, and (B) In the Erlenmeyer flask (left) containing the MSM-crude oil liquid medium.

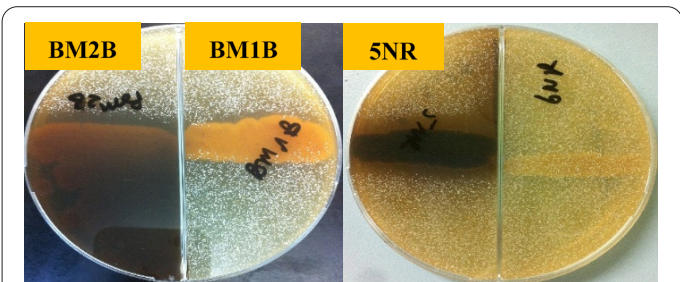
**Table 1.** The purified and selected isolates from different samples.

Sample	Isolation medium	Number of purified isolates with coding	Selected microorganisms
Soil	MSM-CMC-Agar	Two isolates named 5NR and 3NR	Isolate 5NR (Actinomycetes) and isolate 3NR (Fungi)
Ruminant manure	MSM-CMC-Agar	Four isolates named BM2B, BM1B, BM3 and BVkn	Isolates BM2B and BM1B (Actinomycetes), isolates BM3 and BVkn (Fungi)
Sewage sludge	MSM-crude oil agar	Five isolates named BS <sub>2</sub> <sup>P</sup> , BS <sub>1</sub> <sup>P</sup> , BF <sub>2</sub> <sup>P</sup> , BFPx and BF <sub>3</sub> <sup>P</sup>	Isolate BFPx (Bacterium)

**Table 2.** Enzyme activities of selected isolates.

Isolate	Protease	Lipase	Amylase	Cellulase	Xylanase	Gelatinase
BM2B	-	+++	+++	++	-	+
BM1B	-	+	++	+++	+++	+
BM3	++	-	++	++	+++	+
BVkn	ND	-	+++	+	++	+
5NR	+++	+++	+	+++	+++	-
3NR	+	-	ND	++	++	ND
BFPx	-	-	-	-	-	ND

(+) Low activity, (++) Good activity, (+++) Excellent activity, (-) No activity, (ND) Not determined.



**Figure 2.** Melanin production by actinomycete isolates BM1B, BM2B and 5NR on a medium containing tyrosine as a precursor. Production of brownish diffusible pigmentation by isolates BM2B and 5NR.

(36). Proteases hydrolyze protein waste into amino acids and bioactive peptides. Hydrolysis products such as proline play an important role in immobilizing heavy metals by protecting plants from their toxic effect (38). Thus, protein hydrolysates derived from organic waste are generally considered plant biostimulants (39).

For melanin production only, actinomycetes isolates BM2B and 5NR produced brown to blackish pigmentation (Figure 2). Actinomycetes are known to produce melanin pigments. El-Naggar and El-Ewasy, (40) screened one hundred and thirty strains of actinomycetes for melanin synthesis and noted the significant production by *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. The environmental interest of microorganisms producing melanoid pigments is their biological activities, including antimicrobial and antioxidant activities, as they can hunt and adsorb heavy metals such as Cd and Pb (40). Tyrosinase is the key enzyme in melanin production using L-tyrosine as a precursor (23). This precursor can be released following the action of microbial proteases on protein waste. Tyrosinase has also removed phenolic compounds from wastewater (41).

For  $\text{NH}_3$  production, the positive isolates are BM1B, BM2B, 3NR and BM3. While for urease, the positive isolates are 5NR, BM2B, BM3 and BVkn. The study of growth in the N-Free medium showed that isolates BM2B, BM1B and BFPx are able to fix atmospheric N. Rodrigues et al. (42) estimated that 29% and 24% of isolated actinomycetes were able to grow in the nitrogen-free medium and produce ammonia, respectively. Nitrogen is one of the most important elements in molecule biosynthesis (42). Therefore, its fixation, transformation and recycling in organic and inorganic forms are of agricultural importance. For example, N values can be improved due to atmospheric N fixation by nitrogen-fixing bacteria, which usually occurs at the end of composting (43) as they can convert nitrogen gas into  $\text{NH}_3$  in agricultural soils, which plants then take up.

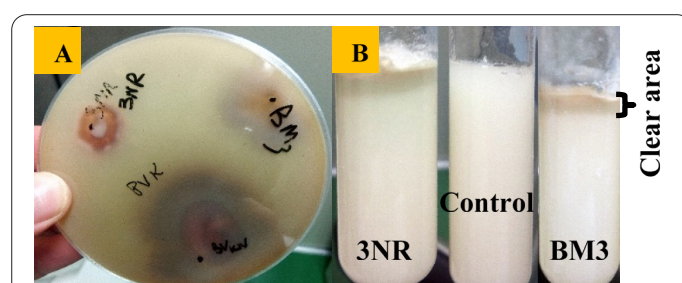
### Solubilization of phosphate

The selected isolates were evaluated for solubilization of inorganic P. Only fungal isolates 3NR and BM3 showed the ability to solubilize P. The study of the solubilization of P by fungal isolates 3NR and BM3 in test tubes containing the PVK agar medium allowed us to conclude on their ability to solubilize the P, while this solubilization by the same isolates on Petri dishes did not show clear solubilization (Figure 3). The use of test tubes containing PVK agar medium to reveal the solubilization of P was first described in this study. This method is mainly suitable for fungi. Phosphorus is one of the main nutrients limiting plant growth (26). Despite its abundance in soil, only

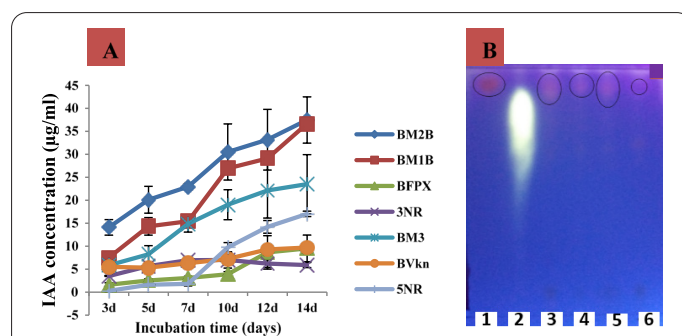
0.1% of total P exists in a form available to plants (44). Phosphate-solubilizing microorganisms ensure a soluble P form and stimulate plant growth. Doilom et al. (45) isolated phosphate-solubilizing fungi (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*), of which the airborne fungal strain KUMCC 18-0196 (*Aspergillus hydei* sp. nov.) showed the most significant phosphate-solubilizing activity.

### Indole acetic acid production

The production of IAA increases gradually with the incubation time. Both actinomycete isolates BM2B and BM1B showed remarkable IAA production after 12 days of incubation (33.17 and 29.1  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). In the case of fungi, the production of IAA increases progressively with the incubation time in all the fungal isolates except the 3NR isolate, which marked a decrease after the 10th day of incubation. To confirm the presence of IAA in microbial cultures, we used TLC. TLC shows pink spots relative to the distance traveled by each extract, which confirms the presence of IAA in the extract (Figure 4). In the case of the BM3 isolate, a brown-colored spot was observed, which is not at the same level as the standard. This indicates that this isolate does not produce the IAA. IAA is a common natural auxin resulting from the metabolism of L-tryptophan by microorganisms. Several microorganisms have the ability to produce IAA and improve plant growth (27). Screening of several actinomycete strains by Anwar et al. (10) for IAA production shows significant production in *Streptomyces nobilis* WA-3, *Streptomyces Kunmingensis* WC-3 and *Streptomyces enissocaesilis* TA-3 producing 79.5, 79.23 and 69.26  $\mu\text{g/ml}$  IAA. Imran et al. (11) evaluated 73 fungal isolates for IAA production. They found that 65.67% of the isolates produced IAA.



**Figure 3.** P-Solubilization by fungal isolates 3NR and BM3. (A) on Petri dish containing PVK medium, (B) in tubes containing the PVK medium proposed in this study, clear zone indicates P solubilization by the fungal isolates.



**Figure 4.** (A) IAA production as a function of incubation time by the selected isolates. (B) Detection of IAA by TLC, (1): Standard solution of IAA at 700 $\mu\text{g/ml}$ , (2): crude extract of BM3, (4): crude extract of BM2B, (5): crude extract of BM1B.

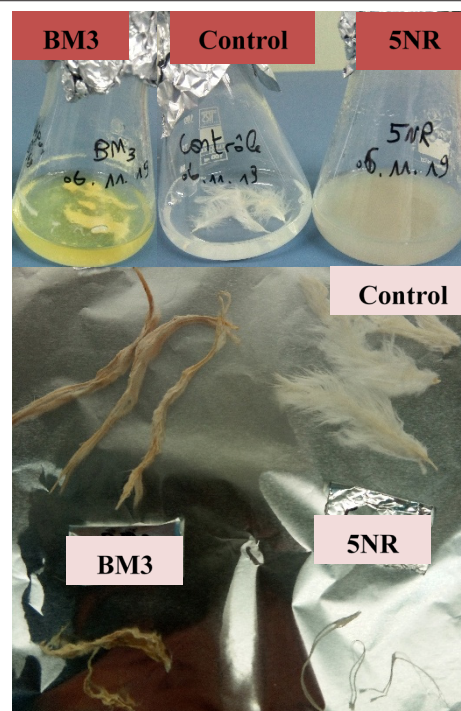
### Biodegradation of feather waste

The selected isolates were evaluated for degradation of keratin waste. Isolate 5NR showed almost complete degradation of poultry feathers and partial degradation in the case of isolate BM3 after 21 days of incubation (Figure 5). Several microorganisms are responsible for the degradation of keratin-based waste. Tiquia et al. (46) isolated two keratin-degrading bacteria identified as *Streptomyces* sp. and *Bacillus licheniformis* in order to use them as an inoculum to improve the composting process. Poultry feathers have become one of the main pollutants due to their recalcitrant nature and possibly the presence of pathogenic microorganisms. They consist of 90% keratin which is a good source of peptides, amino acids and N (44, 46). The action of these microorganisms on feathers can generate peptides and amino acids of agricultural and environmental interest. The release of tryptophan during feathers degradation can serve as a precursor for the production of phytohormone (IAA) (44). Also, the hydrolyzate of poultry feather proteins obtained after bacterial degradation showed its potential in hexavalent chromium reduction (47).

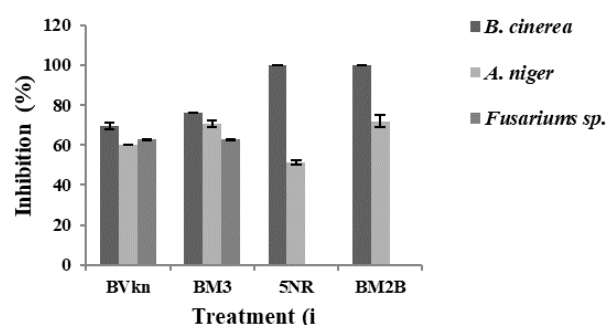
### Antimicrobial activity

The study of the antibacterial activity of the selected isolates showed, in general, low activity of our isolates against the pathogenic bacteria tested. Two actinomycete isolates, 5NR and BM2B, showed antagonism against *S. enteritidis* ATCC 13076 and *S. aureus* ATCC 25923 (Table 3). A similar approach was taken by Saha and Santra (34) to assess the antagonism of microbial isolates against *S. aureus*, *Salmonella* sp. and *Klebsiella pneumoniae* with the aim of using it to improve the degradation of organic waste. Actinomycetes are known for their antagonism against pathogenic bacteria. In their study, Baskaran et al. (29) screened 42 actinomycetes against pathogenic bacteria and found that 22 species exhibited antagonism. Several studies have reported the potential of some pathogenic bacteria to persist in soils amended with mature compost, such as *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and Non-pathogenic *E. coli* (8). The presence of pathogenic bacteria in agricultural soils allows consideration of antibacterial activity as a main criterion when selecting microorganisms of agricultural interest.

The antagonism of the selected isolates was tested against three plant pathogens. Fungal isolates, BM3 and BVkn, have an antagonism against *B. cinerea*, *A. niger* and *Fusarium* sp. F6, while actinomycete isolates 5NR and BM2B, have an antagonism against *B. cinerea* and *A. niger* (Figure 6). Several authors claim that the development of new biological control products against plant diseases requires the screening of a large number of antago-



**Figure 5.** Degradation of keratin waste by proteolytic isolates BM3 and 5NR: (A) in minimal liquid medium supplemented with poultry feathers as a substrate, (B) appearance of poultry feathers at the end of incubation with proteolytic isolates.



**Figure 6.** Percent inhibition of phytopathogenic fungi by fungal (BVkn and BM3) and actinomycetes (BM2B and 5NR) isolates obtained by direct confrontation test on Petri dishes. ANOVA, Fisher LSD test ( $p \leq 0.05$ ).

nistic agents (7). In their study, Suárez-Estrella et al. (7) screened, *in vitro*, a microbial collection for its antagonism against phytopathogenic agents and they revealed that 76 strains (25 Actinobacteria, 28 fungi and 23 bacteria) are active against *F. oxysporum* f.sp. *melonis*. To have a microbial consortium to use in composting vegetable waste, Al-Dhabi et al., (2) evaluated the antagonism of 37 actino-

**Table 3.** Antagonism of selected isolates against pathogenic bacteria.

Isolate	Antagonism against test bacteria			
	Gram-positive		Gram-negative	
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
5NR	-	+	+	-
BM2B	-	+	+++	-
BM1B	-	-	-	-
BM3	-	-	-	-
3NR	-	-	-	-
BVkn	-	-	-	-
BFPx	-	-	-	-

(+): low activity ( $\leq 9$  mm); (+++): good activity (12-15 mm); (-): no activity.

mycetes against five phytopathogenic fungi (*F. xyssporum*, *F. solani*, *A. niger*, *A. flavus* and *Bipolaris oryzae*). Only a single actinomycete (*Streptomyces* sp. Al-Dhabi 30) showed potent activity against all plant pathogens tested. It is recommended to select microorganisms with antagonism to at least two plant pathogens (7).

### Microbial consortia

Many microorganisms have been isolated based on their ability to degrade recalcitrant materials such as lignocellulosic compounds. In many cases of degradation efficiency, microbial consortia have been shown to be superior over single strains (13). Microbial consortia have multiple applications in sustainable agriculture and the environment allowing greater absorption of nutrients and biological control of pathogens; use of organic amendments such as compost and reduction or elimination of external inputs (1, 10). In order to build versatile microbial consortia, we assessed the compatibility of selected microorganisms by the cross-streak method. The latter allowed us to propose two consortia named VMC1 and VMC2. A similar approach has been adopted by several authors (11, 34, 14).

The two consortia formed in this study present several activities of agricultural and environmental interest. VMC1 consortium is composed of actinomycetes (BM1B and BM2B) and bacteria (BFPx) with an interesting and diversified enzymatic arsenal involved in the recycling of organic matter in the soil and in organic waste management processes such as composting. This consortium can be used to remove hydrocarbons from some polluted organic waste through the isolate BFPx, which uses crude oil as the sole source of carbon. In addition, the presence of lipolytic isolates (BM2B and BM1B) can enhance hydrocarbon biodegradation. Thanks to nitrogen metabolism (nitrogen fixation, urease and  $\text{NH}_3$  production), VMC1 can improve the fertility of agricultural soils, therefore reducing the pollution caused by the excessive use of chemical fertilizers. In addition, this consortium produces IAA, a phytohormone that promotes plant growth. VMC1 can be used in the control of pathogens: in agriculture as a biological control agent against phytopathogenic fungi and in the environment to reduce or eliminate certain pathogenic bacteria such as *salmonella* and staphylococci when managing contaminated waste such as sewage sludge. For VMC2, it is composed only of fungi (BVkn, BM3 and 3NR). This consortium has properties in common with VMC1 (interesting and diversified enzymatic arsenal, urease, production of  $\text{NH}_3$  and IAA, biological control of plant pathogens). In addition, VMC2 can be involved in the recycling of keratin waste such as poultry feathers and in the solubilization of insoluble P in order to ensure a source of P that can be assimilated by plants. Figure 7 shows the potential interventions of VMCs to solve some major problems affecting agriculture and the environment, mainly the management of organic waste and its application in agriculture.

### Morphological and molecular identification

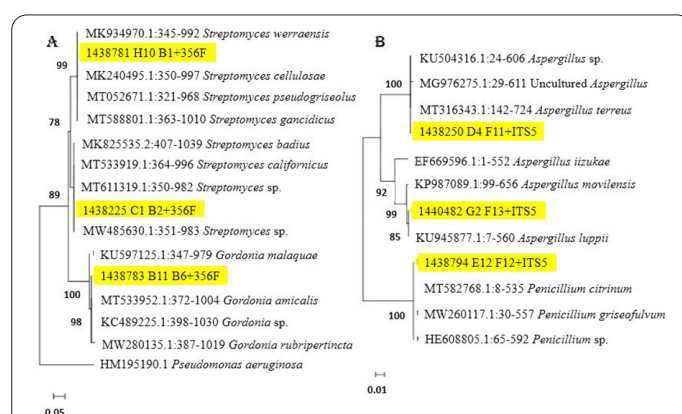
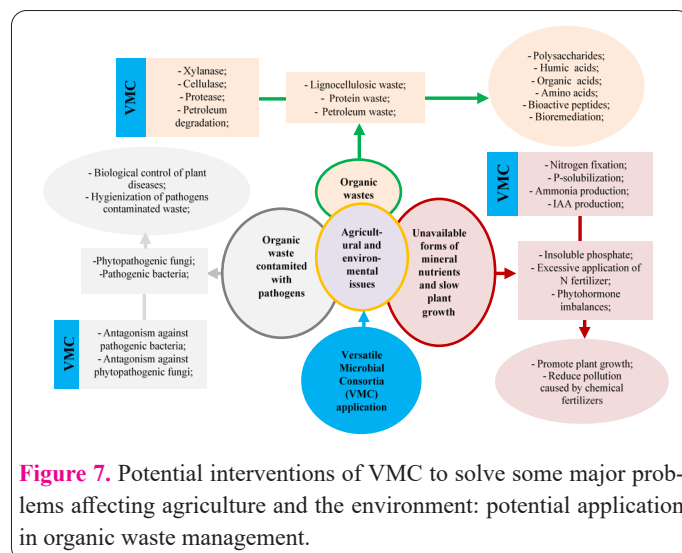
Isolates composing VMC1 and VMC2 were identified by microscopic observation and partial gene sequencing of 16S rRNA for bacteria and 18S rRNA for fungi (Table 4). Similarities of obtained sequences with strains available in the NCBI GeneBank are presented in Table 4.

The actinomycete isolates BM1B and BM2B were af-

iliated with the genus *Streptomyces*. The BFPx isolate has an identity of 99.68 with the *Gordonia amicalis* strain (accession no. MT533952.1). For fungal isolates, BVkn and 3NR have 100% identity with strains *Aspergillus terreus* (accession no. MT316343.1) and *Aspergillus luppii* (accession no. KU945877.1), respectively. In contrast, the BM3 isolate was affiliated with the genus *Penicillium*. The phylogenetic analysis of the selected isolates is represented in the form of a phylogenetic tree (Figure 8).

### Conclusion

The isolation and screening of microorganisms from different sites allowed us to have a diverse and interesting microbial collection composed of actinomycetes, bacteria and fungi. All isolates show an important and diversified enzymatic arsenal, mainly CMCase, xylanase, amylase, protease and lipase. The selected isolates also show other important activities, such as degradation of keratin, gelatin and crude oil; phosphate solubilization; nitrogen fixation; antimicrobial activity, etc. To reveal the solubilization of P by fungi, we recommend the use of the test tube method proposed in this study for better visualization of P, especially for fast-growing and invasive fungi. The compatibility study of the selected isolates allowed us to group them



**Figure 8. (A) Phylogenetic tree of the bacterial species composing the VMC1.** The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap in 1000. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position. The 16S rRNA sequence of *Pseudomonas aeruginosa* HM195190.1 was used as an out-group. **(B) Phylogenetic tree of fungal species composing the VMC2.** The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap in 1000. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

**Table 4.** Identification of selected isolates based on morphological criteria as well as partial analysis of 16S and 18S rRNA. The closest relatives of the isolates, according to the BLAST search, are shown.

Strain	Microscopic appearance	Morphological identification	Next related cultivated strain (Blast)	Access Number	Percent identity (%)	
BM1B (B1)	rectus-flexibilis spore chains	<i>Streptomyces</i> sp. BM1B		MT588801.1	100	
				<i>Streptomyces gancidicus</i>	MT052671.1	100
				<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>		
				<i>Streptomyces cellulosa</i>		
				<i>Streptomyces werraensis</i>		
BM2B (B2)	rectus-flexibilis spore chains	<i>Streptomyces</i> sp. BM2B		MK934970.1	100	
				MT611319.1	99.84	
				<i>Streptomyces californicus</i>	MT533919.1	99.84
				<i>Streptomyces badius</i>		
				MW485630.1	99.68	
MT533952.1	99.68					
BFPx (B6)	Gram positive, rod-shaped and V-form	non-filamentous <i>Actinobacteria</i>		<i>Gordonia amicalis</i>	KU597125.1	98.74
				<i>Gordonia malaquae</i>		
				<i>Gordonia rubripertincta</i>		
				MW280135.1	98.43	
				MT316343.1	100	
BVkn (F11)	aspergillus-like conidial head	<i>Aspergillus</i> sp. BVkn		<i>Aspergillus terreus</i>	KU504316.1	100
				<i>Aspergillus</i> sp.		
				Uncultured <i>Aspergillus</i>	MG976275.1	99.66
BM3 (F12)	terminal whorl	<i>Penicillium</i> sp. BM3		MT582768.1	100	
				<i>Penicillium citrinum</i>	MW260117.1	100
				<i>Penicillium griseofulvum</i>		
				<i>Penicillium</i> sp.		
				HE608805.1	100	
KU945877.1	100					
3NR (F13)	aspergillus-like conidial head	<i>Aspergillus</i> sp. 3NR		<i>Aspergillus luppii</i>	KP987089.1	99.64
				<i>Aspergillus movilensis</i>		
				<i>Aspergillus iizukae</i>	EF669596.1	95.20

into two versatile microbial consortia named VMC1 and VMC2. These two consortia can fulfill several functions of agricultural and environmental interest at the same time: (i) Degradation of various organic compounds such as cellulose, hemicellulose, starch, proteins, lipids and crude oil (Potential application in the management of organic waste and the depollution of sites polluted by hydrocarbons), (ii) Phosphate solubilization, nitrogen fixation, ammonia and IAA production (potential application as a biofertilizer in agriculture) and (iii) antagonisms against pathogens (potential application in the biological control of phytopathogenic fungi and as a means of controlling pathogenic bacteria in contaminated waste). This work presents a non-exhaustive experimental methodology to follow in order to build multifunctional microbial groups for large and effective applications. However, these consortia require in situ evaluation in the management of organic waste, such as the co-composting of sewage sludge with other wastes in order to confirm their effectiveness.

### Acknowledgments

The authors wish to thank the General Directorate for Scientific Research and Technological Development as well as the Ministry of Higher Education and Scientific Research as well as for funding this work. We also thank Mr. AZIOUN Amar, Director of the Constantine Biotechnology Research Center, for his help.

### Funding

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research under Grant 05/CRBt/DGRSDT.

### Interest conflict

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### References

1. Aguilar-Paredes A, Valdés G, Nuti M. Ecosystem Functions of Microbial Consortia in Sustainable Agriculture. *Agronomy* 2020; 10: 1902; doi:10.3390/agronomy10121902.
2. Al-Dhabi NA, Esmail GA, Ghilan AKM, Arasu MV. Composting of Vegetable Waste Using Microbial Consortium and Biocontrol Efficacy of *Streptomyces* Sp. Al-Dhabi 30 Isolated from the Saudi Arabian Environment for Sustainable Agriculture. *Sustainability* 2019; 11: 6845; doi:10.3390/su11236845.
3. Holík L, Hlisenkovský L, Honzík R, Trögl J, Burdová H, Popelka J. Soil Microbial Communities and Enzyme Activities after Long-Term Application of Inorganic and Organic Fertilizers at Different Depths of the Soil Profile. *Sustainability* 2019; 11: 3251; doi:10.3390/su11123251.
4. Gautam SP, Bundela PS, Pandey AK, Jamaluddin, Awasthi MK, Sar-saiya S. Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. *Int. J. Microbiol* 2012; 2012, 1-12.

5. Meetei TT, Devi YB, Jackson K. Effect of Various Enzymes on Mineralization of Soil Organic Matter. *Plant Arch* 2020; 20, 3392-3395.
6. Góme EJ, Delgad JA, González JM. Persistence of microbial extracellular enzymes in soils under different temperatures and water availabilities. *Ecol. Evol* 2020; 10; 10167–10176.
7. Suárez-Estrella F, Arcos-Nievas MA, López MJ, Vargas-García MC, Moreno J. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biol. Control* 2013; 67; 509-515.
8. Chen Z, Jiang X. Microbiological safety of chicken litter or chicken litter-based organic fertilizers: A review. *Agriculture* 2014; 4; 1-29.
9. Zuzolo D, Guarino C, Tartaglia M, Sciarriello R. Plant-Soil-Microbiota Combination for the Removal of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH): An In-Field Experiment. *Front. Microbiol* 2021; 11:621581. doi: 10.3389/fmicb.2020.621581
10. Anwar S, Ali B, Sajid I. Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. *Front. Microbiol* 2016; 7:1334. doi: 10.3389/fmicb.2016.01334.
11. Imran M, Abulreesh HH, Monjed MK, Elbanna K, Samreen, Ahmad I. Multifarious functional traits of free-living rhizospheric fungi, with special reference to *Aspergillus* spp. isolated from North Indian soil, and their inoculation effect on plant growth. *Ann. Microbiol* 2021; 71:31.
12. Higa T, Parr JF. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Center Atami, Japan, 1994.
13. Kang D, Jacquiod S, Herschend J, Wei S, Nesme J, Sørensen SJ. Construction of simplified microbial consortia to degrade recalcitrant materials based on enrichment and dilution-to-extinction cultures. *bioRxiv* 2019; DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/670133>.
14. Sarkar P, Chourasia R. Bioconversion of organic solid wastes into biofortified compost using a microbial consortium. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric* 2017; 6; 321-334.
15. Al-Hawash AB, Alkoorenee JT, Abbood HA, Zhang J, Sun J, Zhang X, Ma F. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnol. Rep* 2018; 17, 104-109.
16. Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang CHN. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin strain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 1974; 24; 54-63.
17. Swain MR, Ray RC. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Microbiol. Res* 2009; 164, 121-130.
18. Ariffin H, Abdullah N, Umi Kalsom MS, Shirai Y, Hassan MA. Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *Int. J. Eng. Technol* 2006; 3; 47-53.
19. Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Jayapal N. A simple and efficient diffusion technique for assay of endo- $\beta$ -1, 4-xylanases activity. *Braz. J. Microbiol* 2011; 42; 1349-1353.
20. Kumar D, Kumar L, Nagar S, Raina C, Parshad R, Gupta VK. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch. Appl. Sci. Res* 2012; 4; 1763-1770.
21. Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol* 1946; 52; 461-6.
22. dela Cruz TEE, Torres JMO. Gelatin hydrolysis test protocol. *ASM* 2016; 1-10.
23. Raval KM, Vaswani PS, Majumder DR. Biotransformation of a single amino-acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. *Int. j. sci. res. publ* 2012; 2; 1-9.
24. Kannapiran E, Ramkumar SV. Inoculation effect of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth of black gram (*Phaseolus mungo* Roxb; Eng). *Ann. Biol. Res* 2011; 2; 615-621.
25. Muangthong A, Youpensuk S, Rerkasem B. Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. *Trop. Life Sci. Res* 2015; 26; 41-51.
26. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett* 1999; 170; 265-270.
27. Numponsak T, Kumla J, Suwannarach N, Matsui K, Lumyong S. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fructicola* CMU-A109. *PLoS ONE* 2018; 13; e0205070.
28. Selvam K, Vishnupriya B, Yamuna M. Isolation and description of keratinase producing marine actinobacteria from South Indian Coastal Region. *Afr. J. Biotechnol* 2013; 12; 19-26.
29. Baskaran R, Vijayakumar R, Mohan PM. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malays. J. Microbiol* 2011; 7; 26-32.
30. Islam MR, Jeong YT, Ryu YJ, Song CH, Lee YS. Isolation, identification and optimal culture conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 producing antifungal agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. *Mycobiology* 2009; 37; 114-120.
31. Ferrari BC, Zhang C, van Dorst J. Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. *Front. Microbiol* 2011; 2; 1-14.
32. Pudasaini S, Wilson J, Ji M, van Dorst J, Snape I, Palmer AS, Burns BP, Ferrari BC. Microbial Diversity of Browning Peninsula, Eastern Antarctica Revealed Using Molecular and Cultivation Methods. *Front. microbiol* 2017; 8:591, doi: 10.3389/fmicb.2017.00591.
33. Azevedo E, Barata M, Marques MI, Caeiro MF. *Lulworthia atlantica*: a new species supported by molecular phylogeny and morphological analysis. *Mycologia* 2017; DOI: 10.1080/00275514.2017.1302255.
34. Saha A, Santra SC. Isolation and characterization of bacteria isolated from municipal solid waste for production of industrial enzymes and waste degradation. *J Microbiol Exp* 2014; 1; 12-19.
35. Mukred AM, Abd Hamid A, Hamzah A, Yusoff WMW. Growth enhancement of effective microorganisms for bioremediation of crude oil contaminated waters. *Pak. J. Biol. Sci* 2008; 11; 1708-1712.
36. Karigar CS, Rao SS. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Res* 2011; 2011; 1-11.
37. Rasit N, Mohammad FS. Production and characterization of bio catalytic enzyme produced from fermentation of fruit and vegetable wastes and its influence on aquaculture sludge. *Int. j. sci. technol* 2018; 4; 12-26.
38. du Jardin P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hort* 2015; 196; 3-14.
39. Xu L, Geelen D. Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Front. Plant Sci* 2018; 9; 1-13.
40. El-Naggar NEI-A, El-Ewasy SM. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Sci. Rep* 2017; 7; 1-19.
41. Karam J, Nicell JA. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 1997; 69; 141-153.
42. Rodrigues AA, Araújo MVE, Soares RDS, De Oliveira BFR, Sibov ST, Vieira JDG. Isolation and screening for multi-trait plant

- growth promoting actinobacteria from organic sugarcane rhizosphere. *Int. J. Microbiol. Res* 2018; 10; 1193-1198.
43. Jusoh MLC, Abd Manaf L, Abdul Latiff P. Composting of rice straw with effective microorganisms (EM) and its influence on compost quality. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng* 2013; 10; 1-9.
44. Tamreihao K, Mukherjee S, Khunjamayum R, Devi LJ, Asem RS, Ningthoujam DS. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agriculture production. *J. Basic Microbiol* 2019; 59; 4-13.
45. Doilom M, Guo JW, Phookamsak R, Mortimer PE, Karunarathna SC, Dong W, Liao CF, Yan K, Pem D, Suwannarach N, Promputtha I, Lumyong S, Xu JC. Screening of Phosphate-Solubilizing Fungi From Air and Soil in Yunnan, China: Four Novel Species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Front. microbiol* 2020; 11; DOI=10.3389/fmicb.2020.585215
46. Tiquia SM, Ichida JM, Keener HM, Elwell DL, Burt E, Michel FCJ. Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 2005; 67; 412-419.
47. Bhang K, Chaturvedi V, Bhatt R. Feather degradation potential of *Stenotrophomonas maltophilia* KB13 and feather protein hydrolysate (FPH) mediated reduction of hexavalent chromium. *3 Biotech* 2016; 6; 1-9.

**Résumé :** La salinité entraîne des pertes agricoles importantes dans de nombreuses régions du monde. Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) sont une solution prometteuse pour améliorer la croissance et la productivité des plantes dans de telles conditions de stress par différents mécanismes, principalement la fixation d'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphore, du potassium et du silicium. Dans ce travail, 260 isolats bactériens sont obtenus à partir de 26 échantillons de sol prélevés dans différentes régions en Algérie. L'halotolérance des ces isolats a été étudiée et 20 isolats ont été sélectionnés. La capacité des isolats halotolérants à produire des enzymes d'intérêt agricole, à produire de l'AIA, à fixer d'azote, à solubiliser le phosphore, le potassium et le silicium à 0; 300; 600 et 900 mM NaCl ont été déterminés. Enfin, l'effet d'un isolat halotolérant, sur la germination des graines de blé (*Triticum aestivum*) et la croissance de ses plantules est déterminé. Dans ce travail, le stress salin affecte négativement les taux de la solubilisation de phosphore, le potassium et le silicium mais il n'affecte pas la fixation d'azote. La souche *Pseudomonas azotoformans* a montré sa plus grande capacité de solubilisation du phosphore ( $255,152 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ), et de minéralisation de phytates ( $0,168 \pm 0,002 \text{ U/mL}$ ), La quantité la plus élevée de potassium est de ( $25,034 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ ). Le taux de phosphate soluble dans le sol était de  $49,42 \pm 0,36 \text{ ppm}$  obtenue à 100 mM de NaCl. Le pourcentage de germination des graines, la longueur des pousses et des racines et les poids frais et secs se sont avérés plus élevés dans les plantules inoculées bactériennes que dans les semis non inoculés. L'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes représente une approche biotechnologique importante pour rétablir les niveaux de phosphore dans les sols salins et pour favoriser la croissance des plantes dans les terres agricoles affectées par le sel.

**Mots-clés :** biofertilisation; PGPB; phosphore; stress salin; *Triticum aestivum*; Algérie

**Abstract:** Salinity causes significant agricultural losses in many regions of the world. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are a promising solution for improving plant growth and productivity under such stressful conditions through various mechanisms, mainly atmospheric nitrogen fixation and the solubilisation of phosphorus, potassium and silicon. In this study, 260 bacterial isolates were obtained from 26 soil samples collected in different regions of Algeria. The halotolerance of these isolates was studied and 20 isolates were selected. The ability of the halotolerant isolates to produce enzymes of agricultural interest, to produce AIA, to fix nitrogen, and to solubilise phosphorus, potassium and silicon at 0, 300, 600 and 900 mM NaCl was determined. Finally, the effect of a halotolerant isolate on the germination of wheat seeds (*Triticum aestivum*) and the growth of its seedlings was determined. In this study, salt stress negatively affected the solubilisation rates of phosphorus, potassium and silicon, but did not affect nitrogen fixation. The *Pseudomonas azotoformans* strain showed the greatest capacity for phosphorus solubilisation ( $255.152 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ) and phytate mineralisation ( $0.168 \pm 0.002 \text{ U/mL}$ ). The highest amount of potassium was ( $25.034 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ). The rate of soluble phosphate in the soil was  $49.42 \pm 0.36 \text{ ppm}$  obtained at 100 mM NaCl. Seed germination percentage, shoot and root length, and fresh and dry weights were higher in bacterial inoculated seedlings than in non-inoculated seedlings. The use of plant growth-promoting bacteria represents an important biotechnological approach to restoring phosphorus levels in saline soils and promoting plant growth in salt-affected agricultural land.

**Key words:** biofertilisation; PGPB; phosphorus; salt stress; *Triticum aestivum*; Algeria

**ملخص:** تسبب الملوحة خسائر زراعية كبيرة في العديد من مناطق العالم. تعتبر البكتيريا المحفزة لنمو النباتات تعتبر البكتيريا المساعدة على نمو حلاً واعداً لتحسين نمو النباتات وإنتاجيتها في مثل هذه الظروف الصعبة من خلال آليات مختلفة، أهمها تثبيت النيتروجين الجوي، (PGPB) النباتات وإذابة الفوسفور والبوتاسيوم والسيليكون. في هذا العمل، تم الحصول على 260 عينة بكتيرية من 26 عينة تربة تم جمعها من مناطق مختلفة في الجزائر. تمت دراسة تحمل هذه العينات للملوحة وتم اختيار 20 عينة. تم تحديد قدرة العزلات المقاومة للملوحة على إنتاج إنزيمات ذات أهمية وأخيراً، تم NaCl، وتثبيت النيتروجين، وإذابة الفوسفور والبوتاسيوم والسيليكون عند 0؛ 300؛ 600 و 900 ملليمولار AIA زراعية، وإنتاج ونمو شتلات القمح. في هذا العمل، يؤثر الإجهاد الملحي (*Triticum aestivum*) تحديد تأثير عزلات مقاومة للملوحة على إنبات بذور القمح *Pseudomonas* سلبيًا على معدلات ذوبان الفوسفور والبوتاسيوم والسيليكون، ولكنه لا يؤثر على تثبيت النيتروجين. أظهرت سلالة أعلى كمية من U/mL، ومعدن الفيتات ( $0,002 \pm 0,168 \mu\text{g/mL}$ ) أكبر قدرتها على ذوبان الفوسفور ( $0,01 \pm 255,152$  U/mL)، والبوتاسيوم هي ( $25,034 \pm 0,02 \text{ ميكروغرام/مل}$ ). وبلغ معدل الفوسفات القابل للذوبان في التربة  $49,42 \pm 0,36$  جزء في المليون عند 100 ملليمول من كلوريد الصوديوم. وكانت نسبة إنبات البذور وطول البراعم والجذور والوزن الطازج والجاف أعلى في الشتلات الملقحة بالبكتيريا منها في الشتلات غير الملقحة. يمثل استخدام البكتيريا التي تعزز نمو النباتات نهجًا بيوتكنولوجيًا مهمًا لاستعادة مستويات الفوسفور في التربة المالحة وتعزيز نمو النباتات في الأراضي الزراعية المتضررة من الملوحة.

**الكلمات المفتاحية:** التسميد البيولوجي؛ البكتيريا المحفزة لنمو النبات؛ الفوسفور؛ إجهاد الملح؛ القمح الطري؛ الجزائر.