

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.  
Département de Microbiologie.  
Filière : sciences biologique.  
Option: Microbiologie del'environnement.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

**Amélioration de la germination de blé dur sous stress salin par  
l'apport des bactéries PGPR et d'osmoprotecteurs dérivés de  
l'algue marine *Ulva lactuca***

Présenté par :

**Benaoudia Nadia & Medjoudj Saloua**

Soutenu le : 10 Juin 2015.

Devant le jury composé de :

**M<sup>r</sup> BELHADI D**  
**M<sup>r</sup> NABTI EI-H**  
**Mm SAIDANI K**  
**M<sup>r</sup> RAI A**

**MAA** Président  
**MCA** Encadreur  
**MAA** Examineur  
**Doctorant** Co-Promoteur

*Année universitaire: 2014 / 2015*

## Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction .....	1
Synthèse bibliographique	
I. Agriculture et stress salin .....	3
I.1. Besoins nutritionnels au niveau mondial .....	3
I.2. Agriculture et problèmes abiotiques .....	3
I.3. Salinisation des sols .....	3
a. Définition .....	4
b. Effets de la salinité sur les sols et le rendement agricole .....	4
2. Définition de la rhizosphère .....	4
2.1. Rhizosphère et microorganismes du sol .....	5
2.2. Interaction plante-bactéries rhizosphériques .....	5
2.3. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes .....	5
a. La résistance systémique induite (RSI) .....	6
b. La tolérance systémique induite (TSI) .....	6
3. PGPR et stress salin .....	7
3.1. Impact des PGPR sur l'amélioration des cultures sous stress salin .....	7
3.2. Salinité et bactéries rhizosphériques .....	7
3.3. Réponse des PGPR au stress salin .....	7
3.4. Salinité et interaction plante- PGPR .....	7
4. Macro-algues marines et solutés compatibles .....	8
4.1. Macro-algues marines .....	8
4.2. Classification des macro-algues marines .....	8
a. Chlorophycées .....	8
b. Phéophycées .....	8
c. Rhodophycées .....	9
4.3. Osmorégulation chez les macro-algues marines .....	9
5. Stress salin et osmoprotecteurs .....	9
5.1. Solutés compatibles .....	9
5.2. Osmoprotecteurs .....	10

5.3. Classifications des osmoprotecteurs .....	10
a. Proline .....	10
b. Ectoïne .....	10
c. Ammoniums quaternaires .....	11
d. Sulfoniums tertiaires .....	11
e. Choline .....	11
6. Germination .....	11
6.1. Salinité et germination des graines .....	12
6.2. PGPR et germination des graines sous stress salin .....	12

## **Matériel et méthodes**

1. Provenance des souches.....	13
2. Provenance des graines.....	14
3. Collecte de l'Algue marine <i>Ulva lactuca</i> .....	15
4. Vérification de la pureté des souches .....	16
4.1. Aspect des colonies .....	16
4.1.1. Aspect des colonies sur le milieu LB agar « Luria Bertani » .....	16
4.1.2. Aspect des colonies sur le milieu « N-free Jensen » .....	16
5. Détermination du pH optimum de croissance des souches .....	16
6. Halotolérance des souche-effet de la glycine bêtaïne et d' <i>U. lactuca</i> .....	17
6.1. Mise en évidence de l'halotolérance des souches .....	17
6.2. Préparation de l'extrait hydro-alcoolique d' <i>U. lactuca</i> .....	17
6.3. Addition de la Glycine bêtaïne au milieu N-Fb.....	18
6.4. Addition de l'extrait d' <i>U. lactuca</i> au milieu N-Fb.....	18
6.5. Préparation des inocula bactériens .....	18
6.6. Détermination de l'halotolérance .....	18
6.7. Analyses statistiques.....	19
7. Germination des graines de blé.....	21
7.1. Stérilisation des graines .....	21
7.2. Protocole expérimental .....	21

7.3. Inoculation des graines .....	23
7.4. Analyse statistique.....	23

## **Résultats et Discussion**

1. Confirmation de l'identité des souches .....	24
2. Détermination du pH optimum.....	26
3. Etude de l'halotolerance des souches .....	28
4. Résultats de la germination .....	33
4.1. Effet de la salinité sur la germination de blé dur.....	35
4.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination de blé .....	35
4.3. Effet de la GB et d'UL sur la germination des graines de blé .....	35
4.4. Effet des souches, la GB et d'UL sur la germination de blé .....	36
Conclusion.....	39
Références bibliographiques.....	40

Annexes

Résumé

## *Remerciements*

*Tout d'abord, Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé courage et bénédiction pour accomplir ce travail.*

*Nous remercions particulièrement Mr. NABTI El Hafid, pour nous avoir fait l'honneur d'être notre encadreur, pour nous avoir accueilli au sein de son laboratoire, de nous avoir fait confiance, encouragé et conseillé tout en nous laissant une grande liberté. Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.*

*On tient à exprimer nos profondes reconnaissances à Mr. RAI Abdelwahab, notre Co-promoteur, pour son suivi attentif, son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés tout au long de ce travail.*

*Nous tenons à remercier très sincèrement Mr Belhadi d'avoir accepté de présider notre soutenance, ainsi que Mm Saidani d'avoir accepté de lire, corriger et examiner ce modeste travail.*

*Nous remercions également, l'équipe du laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables : Leila, Kamal, Meriem, Nabila et Soumia pour leurs encouragements et les bons moments passés ensemble.*

*Merci à tous qui ont participé, de près ou de loin, à la réussite de ce travail.*

*Nadia et Saloua*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*À mes chers parents qui m'ont tant soutenu tout le long  
de mon parcours. Aucun hommage ni remerciement ne  
saurait être suffisant,*

*À mon cher fiancé Samir que je remercie pour le soutien et  
le réconfort qu'il m'a apporté,*

*À mon grand frère Farid, sa femme Nouara et leurs enfants  
Celya, Salim et mon préféré Reyad,*

*À ma grande sœur Nacera, son mari Mohamed et leurs  
enfants Amel et le petit Lamine,*

*À ma petite sœur Sonia, son mari Massinissa,*

*À mes très chères sœurs Karima et Samia,*

*À mon cher frère Karim,*

*À ma belle-famille surtout Nana Fatima, yama Zahia,  
mes belles-sœurs Katia, Hassiba et Souad,*

*À mes très chers amis Fouzia, Hany, Massika et Locifavec qui  
j'ai partagé des moments inoubliables,*

*À tous mes amis de la promotion ME surtout  
Horia, Sabrina, Warda et hassna.*

*Benaoudia Nadia*

*Je dédie ce travail :*

*A Mes chers parents qui m'ont toujours soutenu durant mes études et qui m'ont tout offert. Que dieu les protège et que ce travail soit le témoignage de leur sacrifice et leur tendresse*

*A mes chers grands-mères Taklit et Saghera à qui je souhaite une longue vie*

*A tous mes chers frères et sœurs Djamel, Mahmoud, Fatah, Farouk, Yacine, Fakir, Dida, Nina*

*A mes cousins Abdallah, Chaaben, Abdouahab et leurs enfants Minouche, Hanadi, Rayane, Haythème, Ikrame*

*A toute la famille MEDJOUDJ*

*A mes très chers amis Nabil, Sadia, Sabiha, Aida, Lamou, Fadou*

*A toute personne que je connais*

*A tous les étudiants de la promotion Microbiologie d'Environnement*

*MEDJOUDJ Saloua*

*2014/2015*

## Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction .....	1
Synthèse bibliographique	
I. Agriculture et stress salin .....	3
I.1. Besoins nutritionnels au niveau mondial .....	3
I.2. Agriculture et problèmes abiotiques .....	3
I.3. Salinisation des sols .....	3
a. Définition .....	4
b. Effets de la salinité sur les sols et le rendement agricole .....	4
2. Définition de la rhizosphère .....	4
2.1. Rhizosphère et microorganismes du sol .....	5
2.2. Interaction plante-bactéries rhizosphériques .....	5
2.3. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes .....	5
a. La résistance systémique induite (RSI) .....	6
b. La tolérance systémique induite (TSI) .....	6
3. PGPR et stress salin .....	7
3.1. Impact des PGPR sur l'amélioration des cultures sous stress salin .....	7
3.2. Salinité et bactéries rhizosphériques .....	7
3.3. Réponse des PGPR au stress salin .....	7
3.4. Salinité et interaction plante- PGPR .....	7
4. Macro-algues marines et solutés compatibles .....	8
4.1. Macro-algues marines .....	8
4.2. Classification des macro-algues marines .....	8
a. Chlorophycées .....	8
b. Phéophycées .....	8
c. Rhodophycées .....	9
4.3. Osmorégulation chez les macro-algues marines .....	9
5. Stress salin et osmoprotecteurs .....	9
5.1. Solutés compatibles .....	9
5.2. Osmoprotecteurs .....	10

5.3. Classifications des osmoprotecteurs .....	10
a. Proline .....	10
b. Ectoïne .....	10
c. Ammoniums quaternaires .....	11
d. Sulfoniums tertiaires .....	11
e. Choline .....	11
6. Germination .....	11
6.1. Salinité et germination des graines .....	12
6.2. PGPR et germination des graines sous stress salin .....	12

## **Matériel et méthodes**

1. Provenance des souches.....	13
2. Provenance des graines.....	14
3. Collecte de l'Algue marine <i>Ulva lactuca</i> .....	15
4. Vérification de la pureté des souches .....	16
4.1. Aspect des colonies .....	16
4.1.1. Aspect des colonies sur le milieu LB agar « Luria Bertani » .....	16
4.1.2. Aspect des colonies sur le milieu « N-free Jensen » .....	16
5. Détermination du pH optimum de croissance des souches .....	16
6. Halotolérance des souche-effet de la glycine bêtaïne et d' <i>U. lactuca</i> .....	17
6.1. Mise en évidence de l'halotolérance des souches .....	17
6.2. Préparation de l'extrait hydro-alcoolique d' <i>U. lactuca</i> .....	17
6.3. Addition de la Glycine bêtaïne au milieu N-Fb.....	18
6.4. Addition de l'extrait d' <i>U. lactuca</i> au milieu N-Fb.....	18
6.5. Préparation des inocula bactériens .....	18
6.6. Détermination de l'halotolérance .....	18
6.7. Analyses statistiques.....	19
7. Germination des graines de blé.....	21
7.1. Stérilisation des graines .....	21
7.2. Protocole expérimental .....	21

7.3. Inoculation des graines .....	23
7.4. Analyse statistique.....	23

## **Résultats et Discussion**

1. Confirmation de l'identité des souches .....	24
2. Détermination du pH optimum.....	26
3. Etude de l'halotolerance des souches .....	28
4. Résultats de la germination .....	33
4.1. Effet de la salinité sur la germination de blé dur.....	35
4.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination de blé .....	35
4.3. Effet de la GB et d'UL sur la germination des graines de blé .....	35
4.4. Effet des souches, la GB et d'UL sur la germination de blé .....	36
Conclusion.....	39
Références bibliographiques.....	40

Annexes

Résumé

*Liste des abréviations*

**AIA** : Acide Indole -3-Acétique

**BE** : Biomasse et Environnement

**BEA4**: *Flavobacterium johnsoniae*

**BEC9**: *Pseudomonas putida*

**BOA4**: *Achromobacter xylooxidans*

**Ca<sup>+</sup>**: Calcium

**DMSP**: Diméthylsulphoniopropionate

**DO** : Densité Optique

**EPS** : Exopolysaccharides

**EXP** : Expérience

**FAO** : Food Agriculture organization

**GB** : Glycine Bétaine

**K<sup>+</sup>**: Potassium

**LAMER** : Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables

**LB**: Luria-Bertani

**Na<sup>+</sup>**: Sodium

**N-Fb**: Nitrogen- Free broth

**ONU**: Organisation Nations Unies

**PGPR**: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

**pH**: Potentiel d'hydrogene

**RSI**: Résistance systémique induite

**SEB9:** *Azotobacter chroococcum*

**TSI :** Tolérance Systémique Induite

**U L:** *Ulva lactuca*

***Liste des tableaux***

<b><i>N°</i></b>	<b><i>Titre</i></b>	<b><i>pages</i></b>
<b>I</b>	Date et lieu d'échantillonnage de sol correspondant à chaque souche.	<b>13</b>
<b>II</b>	Résultat de l'identification moléculaire des quatre souches.	<b>13</b>
<b>III</b>	Taxonomie des quatre souches étudiées.	<b>14</b>
<b>IV</b>	Systematique de blé dur ( <i>Triticum durum</i> ).	<b>14</b>
<b>V</b>	Caractères morpho-physicochimiques des quatre souches sur milieu LB.	<b>25</b>
<b>VI</b>	Comparaison entre les pH optimums de croissance et les pH des échantillons des sols d'isolement.	<b>28</b>

## Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>pages</b>
<b>1</b>	Les graines de blé <i>Triticum durum</i> variété BOUSSALEM.	<b>15</b>
<b>2</b>	l'algue marine <i>Ulva lactuca</i> .	<b>15</b>
<b>3</b>	L'extrait hydro-alcoolique d' <i>U. lactuca</i> .	<b>18</b>
<b>4</b>	L'halotolérance des quatre souches en présence ou en absence de la GB [1mM] et de l'extrait hydro-alcoolique d' <i>U. lactuca</i> [1%].	<b>20</b>
<b>5</b>	Aspect, sur milieu LB, des quatre souches (A: <i>P. putida</i> BEC9; B: <i>F. johnsoniae</i> BEA4; C: <i>A. xylosoxidans</i> BOA4; D: <i>A. chroococcum</i> SEB9).	<b>25</b>
<b>6</b>	Aspect, sur milieu Jensen, des quatre souches (A: <i>P. putida</i> BEC9; B: <i>F. johnsoniae</i> BEA4; C: <i>A. xylosoxidans</i> BOA4; D: <i>A. chroococcum</i> SEB9).	<b>25</b>
<b>7</b>	Aspect des souches après Coloration de Gram, (A: <i>F. johnsoniae</i> BEA4; B: <i>P. putida</i> BEC9; C: <i>A. xylosoxidans</i> BOA4; D: <i>A. chroococcum</i> SEB9).	<b>26</b>
<b>8</b>	Détermination du pH optimum de la croissance des quatre souches <b>A:F. johnsoniae</b> BEA4; <b>B:P. putida</b> BEC9; <b>C:A. xylosoxidans</b> BOA4; <b>D:A. chroococcum</b> SEB9 .	<b>27</b>
<b>9</b>	Croissance maximale obtenue sur le milieu N-Fb sous différentes concentration en NaCl. Test réalisé en présence de glycine bêtaïne [1 mM/L] et de l'extrait hydro-alcoolique d' <i>U. lactuca</i> [1%]. <b>A:F. johnsoniae</b> BEA4; <b>B:P. putida</b> BEC9; <b>C:A. xylosoxidans</b> BOA4; <b>D:A. chroococcum</b> SEB9	<b>29-30</b>
<b>10</b>	Pourcentage finale de germination des graines en présence de l'NaCl (100, 200, 300) et en présence de Glycine bêtaïne(GB) [1mM] et d'extrait hydro-alcoolique d' <i>Ulva lactuca</i> (UL) [1%]. Les graines sont inoculées, ou non, avec les souches <i>F. Johnsoniae</i> (BEA4), <i>P putida</i> (BEC9), <i>A. xylosoxidans</i> (BOA4) et <i>A. chroococcum</i> (SEB9).	<b>34</b>

## Introduction

La salinisation des terres est un problème majeur à l'échelle du globe. Selon la FAO (*Food Agriculture Organization*) et les estimations les plus récentes, la salinisation des terres affecte déjà au moins 400 millions d'hectares et en menace gravement une surface équivalente (Arshad *et al.*, 2014).

L'Algérie, un pays englobant toutes les variantes du climat méditerranéen, n'échappe pas à ce phénomène. La sécheresse observée depuis longtemps a conduit manifestement au processus de salinisation des sols sur 3,2 millions d'hectares affectés (Benmahioul *et al.*, 2009). Cette salinisation est plus marquée dans les régions steppiques du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient. Elle provient aussi de l'irrigation le plus souvent mal contrôlée (Munns, 2009).

Cette salinisation conduit à l'appauvrissement des sols en matières organiques et à l'accumulation d'ions toxiques. Par conséquence, les terres agricoles productives sont détériorées. D'un autre côté, l'accroissement de la population a augmenté la demande pour les produits agricoles. Ceci n'a pas seulement menacé la suffisance des ressources alimentaires disponibles, mais aussi a nécessité l'exploitation de terres marginales cultivées (Munns *et al.*, 2008).

Chez les plantes et en présence de fortes teneurs en chlorure de sodium, de nombreux processus physiologiques sont sensiblement affectés: la germination, la croissance et la disponibilité en nutriments (Ayala-Astorga et Alcaraz-Meléndez, 2010). Parmi les récoltes les plus largement consommées, le blé occupe une place de choix. Toutefois, lorsque la salinité dépasse 100 mM, la germination et les autres paramètres liés à la croissance sont considérablement inhibés (Maghsoudi et Maghsoudi, 2008).

Selon les chercheurs, la résolution de ce problème résiderait l'amélioration des procédures de gestion et de choix appropriés aux cultivars des plantes, la sélection et l'amélioration de souches bactériennes osmotolérantes promotrices de la croissance des plantes (PGPR), et l'utilisation d'engrais naturels ne provoquant pas l'accumulation des ions toxiques (Ghoul, 1990 ; Nabti *et al.*, 2007).

En effet, l'application des PGPR ; de l'anglais : « *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* » constitue une importance majeur dans l'agriculture, elle permet d'améliorer la croissance des plantes par une multitude de mécanismes y compris l'amélioration de la

disponibilité des minéraux par la dégradation de la matière organique, la chélation du fer, la solubilisation de certains éléments tels que le phosphate, la production de phytohormones de croissance etc...

L'objectif de ce travail est axé sur la détermination du comportement des bactéries diazotrophes ainsi que la germination des graines de blé sous stress salin et le rôle d'osmoprotecteurs naturels dérivés de l'algue marine *Ulva lactuca* dans l'amélioration de ces deux paramètres (l'halotolérance des bactéries et la germination des graines).

## **I. Agriculture et stress salin**

Dans plusieurs zones du globe terrestre, la salinisation est le processus majeur de la dégradation des terres. En moyenne, le monde perd 3 hectares de terres cultivables par minute à cause de la salinisation. Aussi 10 à 15% des surfaces irriguées (20 à 30 millions d'hectares) souffrent, à des degrés divers, de ce problème (Mermoud, 2006).

### **I.1 Besoins nutritionnels au niveau mondial**

L'agriculture mondiale est parvenue, au cours des décennies passées, à nourrir une population mondiale en forte croissance. En 2011, l'ONU (Organisation Nations Unies) avait annoncé que la population mondiale a dépassé 7 milliards habitant sur terre (Ashraf *et al.*, 2012). Cette population croissante exigera une quantité et une qualité croissantes de nourriture provenant de l'agriculture. Pour répondre à ces nouvelles exigences, un doublement de la production sera probablement nécessaire dans les quarante prochaines années. A titre d'exemple, la demande mondiale de céréales devrait augmenter de 585 millions à 828 millions de tonnes en 2025, ce qui correspond à une augmentation de 42% (Nooyi *et al.*, 2011).

### **I.2. Agriculture et problèmes abiotiques**

Différents stress abiotiques tels que la température, l'acidité et la salinité élevées affectent la croissance des végétaux et des microorganismes rhizosphériques induisant un dysfonctionnement allant jusqu'à la mort cellulaires (Roberts, 2005). La salinité et la sécheresse représentent deux contraintes naturelles majeures conditionnant le développement et la productivité des végétaux dans les zones arides et semi-aride (Vieira Dasilva *et al.*, 1990). Une salinité élevée cause plusieurs types de stress à la plante comprennent l'altération de l'absorption des éléments nutritifs tel que les ions de potassium ( $K^+$ ), calcium ( $Ca^{+}$ ), ainsi que l'accumulation des ions toxiques particulièrement le sodium ( $Na^+$ ) (Belkheiri, 2009).

### **I.3. Salinisation des sols**

L'irrigation des terres cultivées conduit à la salinisation des sols en particulier dans les régions arides et semi-arides (Munns, 2009). Elle peut être aussi induite par la remontée de la nappe phréatique (Loyer, 1991). Les pratiques agricoles diverses ont augmenté progressivement le taux de sels dans le sol provoquant la dégradation des terres arables depuis plusieurs siècles, la salinisation prend une ampleur croissante dans le

monde et devenue un véritable fléau pour les cultures agricoles (Schwabe *et al.*, 2006 ; Munns *et al.*, 2008). Le total des terres salinisées à travers le monde est estimé à 900 million d'hectares, équivalant à 6 % de la masse terrestre mondiale (Wyn Jones et Gouston 1991 ; Munns, 2002).

**a. Définition :**

La salinisation est le processus d'accumulation des sels minéraux solubles dans le sol à des niveaux nuisibles pour les plantes. Ces sels dissous sont constitués d'un mélange de cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ... etc) et d'anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ... etc) (Tanji, 2002). Elle peut être causée soit par des processus naturels « salinisation primaire », ou être induite par des activités humaines « salinisation secondaire » (Ghassemi *et al.* 1995).

**b. Effets de la salinité sur les sols agricoles :**

La structure d'un sol peut être définie comme le regroupement des particules primaires du sol dans les agrégats. Ces derniers sont séparés entre eux par des pores dans lesquels le gaz et le liquide peuvent circuler. La structure d'un sol a une importance considérable sur son fonctionnement. D'une part, elle détermine la pénétration des racines dans le sol, d'autre part, elle agit sur les déplacements d'eau et d'éléments nutritifs vers les racines (Lavelle et Spain, 2001). L'augmentation de la quantité du sodium dans un sol entraîne la destruction de sa structure. En favorisant la dispersion des colloïdes minéraux et par conséquent la réduction de la structure poreuse du sol. La salinisation augmente ainsi l'imperméabilité des couches profondes du sol ce qui empêche l'aération et l'absorption de l'eau par les racines (Ghassemi *et al.* 1995).

**c. Effets de la salinité sur le rendement agricole :**

La salinité constitue un facteur limitant non négligeable pour l'agriculture mondiale (Hillel, 2000). Dans les régions arides et semi-arides, les sols sont perturbés à la fois dans leurs activités biologiques, leurs stabilités et leurs fertilités. Ils sont sans cesse soumis à une grande variabilité physico-chimique du notamment à la présence de l' $\text{NaCl}$ . (Vieira Dasilva, 1990). La salinité peut entraîner des réductions significatives des pourcentages finaux de la germination engendrant la réduction de tous les paramètres du rendement agricole (Foolad *et al.*, 1999 ; Munns et Rawson, 1999).

## **I.2. Rhizosphère et microorganismes du sol :**

La rhizosphère est un environnement écologique colonisé par de nombreux micro-organismes. Des communautés des micro-organismes sont associées aux systèmes racinaires de toutes les plantes supérieures (Khalid *et al.*, 2006). Ces êtres vivants sont requis dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère (Germida *et al.*, 1998). Par ailleurs, la communauté microbienne joue un rôle inévitable dans l'amélioration et la stabilisation de la structure du sol. Plusieurs études ont montré que l'agrégation et la stabilité d'un sol dépendent de sa nature et de sa teneur en matière organique ce qui est étroitement lié à sa population microbienne (Elustondo *et al.*, 1990).

### **I.2.1. Définition de la rhizosphère :**

Le terme rhizosphère dérive d'un mot grec « Rhizo »=racine et « Sphère »= champs d'influence (Morgan *et al.* 2005). Ce terme a été utilisé pour la première fois par Lorenz Ailtner (1904) pour définir la zone du sol sous l'influence des racines des légumineuses. Par la suite, cette définition a été étendue à toutes les plantes. Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). La rhizosphère est définie aujourd'hui comme étant le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes. Ces interactions dépendent des conditions physiques du milieu et des organismes mis en jeu (Norini, 2007). La rhizosphère est divisée comme suit : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe *et al.*, 2008).

### **I.2.2. Les microorganismes dans la rhizosphère :**

Dans la rhizosphère, la plupart des microorganismes sont bénéfiques en favorisant la croissance des plantes et leur bien-être (Bonkowski *et al.* 2009). Les microorganismes du sol sont représentés par quelques métazoaires, protozoaires, algues microscopiques, champignons, et bactéries (Wild, 1993 ; Maier *et al.* 2000). Concernant les bactéries, il a été estimé qu'un gramme de sol contiendrait de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries (Horner-Devine *et al.* 2003). Parmi les bactéries du sol, il existe des cocci (sphères de  $0,5\mu\text{m}$ ), des bacilles ( $0,3-0,5\mu\text{m}$ ) ou des spirales. Les bactéries les plus communes appartiennent aux genres ; *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*,

*Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Azospirillum*, *Mycobacterium* et *Azotobacter* (Madkour, *et al.* 1990; Buée *et al.* 2009).

### **I.2.3. Interaction plante-bactéries rhizosphériques :**

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkin et Lynch, 2002). Deux catégories d'effets bénéfiques des microorganismes sur les plantes peuvent être distinguées (van der Heijden *et al.*, 2008) ; les effets directs, via les organismes microbiens associés à la racine qui mettent en place des relations mutualistes avec les plantes et les effets indirects, via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère et modifiant les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs ainsi que la répartition des ressources. Les racines de la plante offrent une niche pour la prolifération des bactéries du sol qui profitent des exsudats racinaire (Wipps, 2001 ; Walter et Vega, 2007).

### **I.2.4. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes :**

Certaines bactéries (*Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent la plante d'une manière bénéfique en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre les infections phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme **PGPR**, de l'anglais (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Gray et Smith, 2005).

Certains PGPR du genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodobacter*, *Azospirillum* ont été récemment décrites pour leurs effets positifs sur la croissance des plantes et l'augmentation de leurs rendements (légume, pomme citron, myrtille, mure, abricot, framboise, betterave à sucre...) (Esitken *et al.* ; 2002 Dobblaere *et al.* ; 2003 ; Cakmakci *et al.* 2006 ; Orhan *et al.* 2006). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par différents mécanismes tels que la fixation d'azote, la solubilisation d'oligoéléments, l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante et la synthèse de phytohormones ou de vitamines (Dobblaere *et al.*, 2003 ; Cakmakci *et al.*, 2006 ; Orhan *et al.*, 2006).

#### **a. La résistance systémique induite (RSI) :**

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis une

attaque par un organisme pathogène (Van loon, 2007). Cette immunisation est appelée résistance systémique induite (ISR : *Induced Systemic Resistance*) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008). L'ISR peut être induite par des bactéries à Gram positifs comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartenant aux genre *Pseudomonas*(*fluorescens*, *putida*)et aux entérobactéries tel que *Serratia*ou *Pantoea* (Jourdan *et al.*,2008).

### **b. La tolérance systémique induite (TSI) :**

L'éthylène est une phytohormone responsable de la stimulation de la germination des graines. Elle favorise également la maturation des fruits et déclenche l'abscission des feuilles (Burdman *et al.*, 2000 ; Bleecker et kende, 2002). Cependant, l'élévation de sa concentration sous stress salin se traduit par l'inhibition de la formation des poils ainsi que l'élongation racinaire et par conséquent une réduction de la croissance végétale (Mayaka *et al.*, 2004). L'acide-1-Aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), le précurseur direct de l'éthylène, est réduit par une enzyme d'origine bactérienne « **ACC-désaminase** ». Cette enzyme est exprimée chez plusieurs rhizobactéries telles que *Bacillus pumilus*, *Alcaligenes spp*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Ralstonia solanacearum* et *Pseudomonas spp*. Celles-ci peuvent dégrader l'ACC en  $\alpha$ - ketobutyrate et en ammonium (Glick *et al.*, 2007).

## **I.3. PGPR et stress salin :**

### **I.3.1. PGPR et amélioration des cultures sous stress salin :**

Au cours des dernières années, une nouvelle approche a été développée pour atténuer le stress dû à la salinité chez les plantes. Elle consiste à l'application des PGPR sur les semences et les plantes. L'utilisation des PGPR comme inocula en agriculture pour réduire le stress salin est la voie la plus prometteuse pour améliorer la production et le rendement des régions touchées par la salinité (Mayak *et al.*,2004).

### **I.3.2. Salinité et bactéries rhizosphériques :**

Les microorganismes telluriques sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. Une salinité élevée diminue considérablement la croissance des bactéries provoquant une accumulation de la matière organique non dégradée, ce qui agit négativement sur la disponibilité des nutriments nécessaires à la

croissance des plantes (Zahran ,1997). Une augmentation ou une diminution du volume cellulaire sont les deux résultats physiologiques d'un choc hyper ou hypo-osmotique, respectivement, ce qui provoque une plasmolyse (Csonka, 1989 ; Ghoul, 1990).

### **I.3.3.Réponse des PGPR au stress salin :**

Les ions potassium ( $K^+$ ) constituent l'osmolyte primaire chez la grande majorité des bactéries, leur accumulation contribue à la compensation de l'osmolarité externe et au maintien de la turgescence cellulaire normale (Christian et Waltho, 1961 ; Walderhaug et Coll, 1989). Les PGPR répondent au stress osmotique essentiellement par l'accumulation des solutés compatibles, ces molécules osmotiquement actives conservent une pression de turgescence positive nécessaire à la division cellulaire (Curati *et al.*, 1998). Certains PGPR produisent des exopolysaccharides (EPS) qui se lient aux cations sodium ( $Na^+$ ) en réduisant sa teneur dans le milieu (Ashraf *et al.*, 2004). Ces EPS protègent également les bactéries de la dessiccation par modification de leurs microenvironnements (Roberson et Firestone, 1992).

### **I.3.4 Salinité et interaction plante- PGPR :**

Les *PGPR* jouent un rôle clé dans un grand nombre de processus dans différents écosystèmes salins incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes, les cycles biogéochimique de l'azote et de carbone, la production des régulateurs de croissance (auxine, cytokine et gibbérelline) ainsi que la répression de la synthèse d'éthylène (Hogberb *et al.*, 2001 ; Kowalckuk et Stephen, 2001 ; Sprint, 2001 ; Smith et Read, 2008 ; Weyens *et al.*, 2010).

## **I.4. Macro-algues marines et solutés compatibles :**

### **I.4.1. Les macro-algues marines :**

Les algues, organismes photosynthétiques, sont conventionnellement définies comme des végétaux peuplant les milieux aquatiques, les lieux humides et de nombreux milieux terrestres. Elles sont dépourvues des tiges, de racines, de feuilles ou de fleurs. Leurs appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle » (Guillaume, 2010). Les macro-algues sont constituées à leur base par des crampons, leur permettant de se fixer sur un support. Elles absorbent les nutriments par toute la surface du thalle en contact avec l'eau. Les crampons sont surmontés d'un pédoncule de longueur et de diamètre variable (le

stipe). L'algue se termine par une fronde qui peut être découpée en filaments, cordons ou lanières (Hortense, 2011).

#### **I.4.2. Classification des macro-algues marines :**

Selon leur pigmentation, les macro-algues sont divisées en trois groupes : les chlorophycées « algues vertes », les phéophycées « algues brunes », et les rhodophycées « algues rouges » (Mohamed *et al.*, 2012).

##### **a. Les chlorophycées :**

Les chlorophycées jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux. Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, aux quelles sont associées des carotènes et des xanthophylles, comme les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieu marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre (Pérez, 1997). Les grands genres sont *Ulva* (ou laitue de mer) (*Ulva lactuca*) et *Enteromorpha* (ou cheveux de mer).

##### **b. Les phéophycées :**

Les phéophycées ont généralement une structure pluricellulaire et de dimensions très variables. La majorité de ces algues vivent en milieu marin et présentent une couleur brunâtre résultant de l'association de pigments dominants, à savoir la xanthophylle et la fucoxanthine. Leurs dimensions varient d'éléments microscopiques jusqu'à de très grandes formes (Guillaume, 2010).

##### **c. Les rhodophycées :**

Les rhodophycées doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments comme les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques unes vivent également en eau douce (Guillaume, 2010).

#### **I.4.3. Osmorégulation chez les macro-algues marines :**

Les macro-algues marines sont à l'origine de différentes sources d'énergie et de carbone, elles sont riches aussi en substances osmoprotectrices [Glycine bêtaïne et Diméthylsulfoniopropionate (DMSP), oxalate et acétate] qui sont utilisées par plusieurs

bactéries afin de challenger le stress salin (Ghoul *et al.*, 1995). Plusieurs études sont menées sur l'utilisation de l'algue marine *Ulva lactuca* comme osmoprotecteurs naturelles sous stress salin (Nabti *et al.*, 2007).

### **I.5. stress salin et osmoprotecteurs :**

Pour survivre sous contraintes osmotiques, les cellules doivent s'adapter en accumulant des solutés spécifiques dans des conditions hyper-osmotiques et de les libérer dans des conditions hypo-osmotiques. Ces solutés se sont avérés d'efficaces stabilisateurs d'enzymes, offrant une protection non seulement contre une forte teneur en sel, mais aussi en absence de stress (Yancey *et al.*, 1982).

#### **I.5.1. Les solutés compatibles :**

Le terme «soluté compatible» a été introduit par Brown et Simpson en 1972 pour décrire des solutés accumulés qui ne présentaient pas d'activité inhibitrice, même à forte concentration, vis-à-vis des fonctions enzymatiques (Bremer et Kramer 2000). Les solutés compatibles sont de petites molécules organiques (sucres, polyols, acides aminés et leurs dérivés, bétaines et ectoïnes). Ces osmolytes peuvent être synthétisées par la cellule elle-même ou transportés du milieu extérieur (Robert, 2005).

#### **I.5.2. Les osmoprotecteurs :**

Certains solutés compatibles n'ont aucun effet sur la croissance cellulaire en milieu à forte osmolarité. Les autres, par contre, ont un important effet de stimulation sur le taux de croissance lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de culture. Ce sont des **osmoprotecteurs** (Strom et Coll, 1983). Ils s'agissent de molécules dipolaires, solubles ne portant pas une charge électrique nette à pH physiologique (Bremer et Karmner, 2000 ; Sleator et Hill, 2001). Les osmoprotecteurs peuvent être accumulés à de fortes concentrations intracellulaires (1M) sans aucun effet sur les fonctions cellulaires. Ces derniers agissent à des concentrations extérieures faibles (1mM) et leur accumulation est accompagnée par une augmentation du volume d'eau en évitant la déshydratation cellulaire (Kempf et Bremer, 1998).

#### **I.5.3. Classifications des osmoprotecteurs :**

Sous stress salin, la cellule fait appel à différentes substances osmoprotectrices afin de protéger ses macromolécules vitales et maintenir sa survie contre l'effet de l'osmolarité élevée (Miller et Wood, 1996).

**a. La proline :**

La proline est un acide aminé très répandu chez les plantes. Elle est accumulée en grandes quantités face à un stress osmotique (Bremer et Kramer., 2000). Chez les bactéries à Gram négatif, son accumulation s'effectue à partir du milieu externe par augmentation de l'activité du transport (Fougere *et al.*, 1991). Celle-ci peut être accumulée à des concentrations molaires élevées sans nuire au comportement cellulaire (Da Costa *et al.*, 1998).

**b. L'ectoïne :**

L'ectoïne (1, 4, 5, 6-tetrahydro-2 méthyle-4pyrimidine) est un acide aminé cyclique chargé positivement (Malin et Lapidot, 1996), découvert pour la première fois comme soluté compatible endogène chez la bactérie phototrophe extrêmement halophile *Ectothiorhodospira halochoris*, d'où son nom (Da Costa *et al.*, 1998). L'accumulation de l'ectoïne est proportionnelle à la force osmotique du milieu (Bernard *et al.*, 1993). Depuis, l'ectoïne est détectée comme osmoprotecteur efficace chez plusieurs genres de bactéries : *Pseudomonas* (Kets *et al.*, 1996) et *Escherichia. coli* (Talibart *et al.*, 1994; Bremer et Krämer, 2000).

**c. Les ammoniums quaternaires :**

Les bêtaïnes sont des dérivés méthylés d'acides aminés, Les représentants majeurs de cette classe d'osmoprotecteurs. Sont de la glycine bêtaïne (G.B), la proline bêtaïne, l'hydroxyproline bêtaïne et la pépicolate bêtaïne (Rhodes et Hanson, 1993). Les bêtaïnes ont été isolées à partir de plusieurs plantes des zones arides où elles se concentrent parfois en grandes quantités. Elles ont été aussi détectées chez les algues marines (Ghoul, 1990).

**d. Les sulfoniures tertiaires :**

Ce sont des analogues soufrés des bêtaïnes, utilisés comme solutés compatibles par différents organismes vivants (Rhodes et Hanson, 1993). Le DMSP est répandu dans les milieux marins (Da Costa *et al.*, 1998). Il est accumulé comme osmolyte majeur chez certaines algues (*Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca*) (Ghoul, 1990). Le diméthylsulfonioacétate (DMSA) est un puissant osmoprotecteur chez *E. coli*. Son effet est équivalent à celui de la GB (Chambers *et al.*, 1987 ; Cosquer *et al.*, 1999).

**e. La choline :**

La choline est un précurseur de la glycine bêtaïne, sa transformation se déroule en deux étapes ; la première consiste en la transformation de la choline en bêtaïne-aldéhyde sous l'action de la choline déshydrogénase, la deuxième est la synthèse de la glycine bêtaïne sous l'action de la bêtaïne-aldéhyde déshydrogénase (Le Rudulier et Bernard 1986; Strøm *et al.*, 1986). Ces 2 enzymes peuvent transformer de très faibles concentrations extracellulaires en choline (1 mM) en des teneurs élevées en G.B intracellulaire (Landfard et Strøm, 1986).

**I.6.La germination :**

La germination a comme signe visible la sortie de la radicule hors des téguments de la graine. C'est un phénomène naturel qui intervient lorsque les semences sont imbibées d'eau dans des conditions favorables de température, oxygénation et obscurité. La germination est donc définie par la sortie et le développement, à partir de l'embryon de la semence, des organes essentiels prouvant l'aptitude de la semence à produire des plantes normales. (Maciejewski, 1991 ; Chaux et Foury, 1994 ; Hopkins, 2003 ; Labbe, 2004 ; Baumgartner et Emonet, 2007).

**I.6.1. Salinité et germination des graines:**

La germination des graines est le stade le plus sensible au stress salin et hydrique (Boulghalagh *et al.*, 2006). Plusieurs études ont montrés que le sel a un effet dépressif sur le taux de gémination des graines et leur croissance biologique (M'barek *et al.*, 2001). Les effets inhibiteurs imposés par la salinité sur le processus de la gémination peuvent être également expliqué par l'altération des enzymes et des hormones de la graine (Larcher, 1995).

**I.6.2. PGPR et germination des graines sous stress salin :**

De nombreux travaux ont prouvés que les traitements des graines avec les PGPR telsque *Azospirillum spp*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas putida* ont donné une meilleure germination des graines de tomate, de poivre, de laitue, de radis, de maïs et de blé (Rodriguez *et al.*, 2001 ; Bazavaraju *et al.*, 2002 Kaymak *et al.*, 2009). La souche *Azospirillum brasilense* NH améliore la germination des graines en présence du stress osmotique par le maintien de l'équilibre hydrique (Nabti *et al.*, 2007).

Le travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables (LMER)-Equipe Biomasse et Environnement (BE), durant une période de 3 mois.

Ce travail consiste en l'étude de l'effet d'osmoprotecteurs naturels, dérivés de la laitue de mer (*Ulva lactuca*), sur la croissance de quatre souches bactériennes qualifiées de PGPR, ainsi que sur la germination des graines du blé dur (variété BOUSSALEM) sous stress salin et en présence de ces souches.

## 1. Provenance des souches

Les souches bactériennes ont été fournies par le Laboratoire d'accueil (LMER-BE). Elles ont été isolées pour la première fois, par Mr. RAI Abdelwahab, à partir d'échantillons de sols agricoles, dans le cadre de la préparation de sa thèse de doctorat. Le tableau ci-dessous détaille la date et le lieu de chaque échantillonnage et la souche qui lui correspond :

**Tableau I :** Date et lieu d'échantillonnage du sol correspondant à chaque souche

Échantillon	Lieu d'échantillonnage	Date	Nom de la souche
BEA	Bejaïa: 36°42'11,60'' N, 5°5'14,47'' E.	21/01/14.	BEA4
BEC	Bejaïa: 36°40'44,54'' N, 4°53'35,55'' E.	29/01/14.	BEC9
BOA	Bouira: 36°7'41,29'' N, 3°32'55,89'' E.	29/01/14.	BOA4
SEB	Setif: 36°11'30,55'' N, 5°22'16,79'' E.	24/02/14.	SEB9

Les souches ont été génétiquement identifiées au niveau du laboratoire de Biotechnologies et Valorisation des Bio-Géo-ressources (LBVBGR)-Manouba, Tunis (Tunisie). Voici un tableau déterminant le résultat de l'identification de chaque souche.

**Tableau II :** Résultat de l'identification moléculaire des quatre souches

Nom de la souche	Résultat de l'identification
BEA4	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
BEC9	<i>Pseudomonas putida</i>
BOA4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
SEB9	<i>Azotobacter chroococcum</i>

Taxonomie des souches :

La classification présentée dans le tableau ci-dessous est tirée du manuel de Bergey de Bacteriologie 2015.

**Tableau (III) :** Taxonomie des quatre souches étudiées

	BEA4	BEC9	BOA4	SEB9
Domaine	Bactérie	Bactérie	Bactérie	Bactérie
Embranchement	Bacteroidetes	Proteobacterie	Proteobacterie	Proteobacterie
Classe	Flavobacterie	$\gamma$ -Proteobacterie	$\beta$ -Proteobacterie	$\gamma$ -Proteobacterie
Ordre	Flavobacteriales	Pseudomonadales	Burkholderiales	Pseudomonadales
Famille	Flavobacteriaceae	Pseudomonadaceae	Alcaligenaceae	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Azotobacter</i>
Espèce	<i>johnsoniae</i>	<i>putida</i>	<i>xylooxidans</i>	<i>chroococcum</i>

Les quatre souches constituent le résultat d'une sélection à partir d'un total de 70 souches fixatrices d'azote isolées sur un milieu dépourvu de toute source d'azote (*N-Free Jensen medium*). La sélection a été réalisée sur la base de la capacité des souches à produire des métabolites d'intérêt agricole (enzymes, phytohormones, sidérophores et activité antifongique).

## 2. Provenance des graines

Les graines de blé dur (*Triticum durum* variété BOUSSALEM) récoltée dans la saison (2014), sont fournies par l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales-Union des Coopératives Agricoles (Bejaïa-Algérie).

**Tableau (IV) :** Systématique de blé dur (*Triticum durum*) (Brouillet *et al.*, 2006).

<b>Règne</b>	Plantea (végétale)
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Liliopsida
<b>Ordre</b>	Cyperales
<b>Famille</b>	Poaceae
<b>Genre</b>	<i>Triticum</i>
<b>Espèce</b>	<i>durum</i>



Fig. 2 : Les graines de blé *Triticum durum* variété BOUSSALEM.

### 3. Collecte de l'algue marine *Ulva lactuca*

*Ulva lactuca*, macro-algue marine verte (Chlorophyceae) très répandue dans le bassin méditerranéen. Vivant fixée sur les rochers de l'étage médiolittoral, elle est de couleur vert brillant et caractérisée par une taille allant de 10 à 15 cm (Fig. 1). Elle a été récoltée le 13/04/2015, au niveau de la plage Boulimat-Bejaïa (Algérie) [36°81'51.40'' N, 4°98'64.26'' E].

**Taxonomie :**

**Règne :** Protista,

**Ordre :** Chlorophyceae,

**Phylum :** Chlorophyta,

**Famille :** Ulvaceae,

**Classe :** Ulvales,

**Genre :** *Ulva*

**Espèce :** *Lactuca*.



Fig. 3 : l'algue marine *Ulva lactuca*.

#### **4. Vérification de la pureté des souches**

Pour vérifier la pureté des souches et après un repiquage à partir du milieu de conservation, une observation de l'aspect des colonies, une observation à l'état frais et après coloration de Gram ainsi que les deux tests (catalase et oxydase) ont été réalisés.

##### **4.1. Aspect des colonies**

Après repiquage des souches, Les colonies sont soumises à l'observation macroscopique (forme, couleur, relief). L'observation est réalisée après culture sur deux milieux différents.

###### **4.1.1. Aspect des colonies sur le milieu LB agar « Luria-Bertani »**

Le milieu LB ; composition en g/l : Tryptone, 10g ; Extrait de levure, 5g ; NaCl, 10g ; à pH final de 7,0 ( $\pm 0.02$ ) ; est stérilisé à 120 C°/15 min, coulé dans des boites de Pétri de 9 mm de diamètre puis utilisé pour la culture des quatre souches (BEA4, BEC9, BOA4, SEB9). Le test est réalisé pour la mise en évidence de la forme, la couleur, l'aspect, le diamètre et les reliefs des colonies (Miller, 1972).

###### **4.1.2. Aspect des colonies sur le milieu « N-free Jensen »**

Les quatre souches sont repiquées, à partir d'une culture fraîche de 24 h (lavée 3 fois avec de l'eau physiologique), sur un milieu dépourvu de toute source d'azote. Cette étape est réalisée pour mettre en évidence la capacité inhérente aux souches de fixer l'azote atmosphérique. Pour cela, le milieu Jensen (1951) ; composition en g/l : Mannitol, 20 ; KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 1,0 ; CaCO<sub>3</sub>, 2,0 ; MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 ; NaCl, 0,5 ; FeSO<sub>4</sub>, 0,1 ; Na<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub>, 0,005 ; à pH final de 7,4 ( $\pm 0.02$ ) est utilisé (Thompson, 1989).

La coloration de Gram, la mobilité bactérienne (état frais), la recherche de la catalase et de l'oxydase sont effectuées sur les 4 souches.

#### **5. Détermination du pH optimum de croissance des souches**

Pour déterminer l'effet du pH sur la croissance des souches, le milieu LB liquide est préparé à une gamme de pH allant de 5 à 9 (5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 et 9). Le pH est ajusté à l'aide d'un pH-mètre (Hanna instruments HI 2210®) en utilisant des solutions de NaOH et de HCl [1M]. L'expérience est réalisée sur des microplaques à fond rond de 96 puits, ce type de microplaques est constitué de 12 colonnes (8 puits/colonne). Chaque puits servira à inoculer 200 µl du milieu avec 10

µl de la suspension bactérienne. Pour chaque colonne de la microplaque, le milieu utilisé est ajusté à un même pH donnant enfin huit répétitions de même nature. Enfin, les microplaques sont incubées à 30°C / 24 h.

La lecture est effectuée, en duplicata, par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu Mini 1240®). Les deux lectures sont obtenues en mélangeant le contenu de chaque 4 puits (8 au total) dans deux cuves à spectrophotomètre.

## **6. Halotolérance des souches et effet de la Glycine Bétaïne et d'*U.***

### ***lactuca* :**

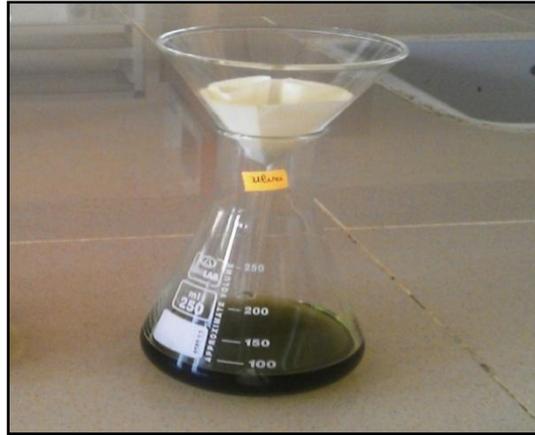
L'halotolérance des quatre souches déterminée sur milieu N-Fb (Nitrogen-Free broth) ; composition en g/l : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 ; NaCl, 0,1 ; CaCl<sub>2</sub>, 0,02 ; FeCl<sub>3</sub>, 0,01 ; NaMoO<sub>4</sub>, 0,002 ; Extrait de levure, 0,05. Le pH est ajusté à 7,0 ± 0.02 en utilisant le NaOH (1M).

### **6.1. Mise en évidence de l'halotolérance des souches**

Le milieu N-Fb est préparé à des concentrations croissantes en NaCl allant de 250 à 650 mM (250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 mM). Le milieu contient initialement de NaCl (0.5g/l) dont il faut tenir en considération. Le même milieu est préparé en présence de glycine bêtaïne (ajoutée à une concentration finale de 1mM) et de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* (ajouté à une dilution finale de 1%).

### **6.2. Préparation de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca***

50 g de l'algue fraîche (thalle) sont homogénéisés dans de l'éthanol 70 % (vol /vol) sous agitation à température ambiante. Le mélange est filtré à travers un papier filtre pour éliminer les particules solides. Le filtrat est évaporé à sec, sous vide à 40°C. La poudre est récupérée dans 10 ml d'eau distillée et l'extrait hydro-alcoolique obtenu est utilisé dans le milieu de culture à une concentration finale de 1% (Ghoul *et al.*, 1995).



**Figure 3 :** L'extrait hydro-alcoolique d'*U. lactuca*.

### **6.3. Addition de la glycine bêtaïne au milieu N-Fb**

Afin de tester l'effet la glycine bêtaïne sur la croissance et la survie des souches sous stress salin. Une solution-mère de GB (1 mM), stérilisée à l'aide d'une membrane Millipore (WAHTMAN® ; 0,2  $\mu$ m PES), est ajoutée au milieu N-Fb auquel des concentrations en NaCl allant de 0 à 650 mM sont additionnées.

### **6.4. Addition de l'extrait d'*Ulva lactuca* au milieu N-Fb**

Des dilutions à 1/100ème de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* sont effectuées et additionnées au milieu N-Fb préparé à différentes concentrations en NaCl. Les solutions obtenues sont stérilisées à 120°C/20 min.

### **6.5. Préparation des inocula bactériens**

Un volume de 5 ml du milieu LB estensemencé par une culture fraîche (de 24h) des 04 souches. Après incubation à 28°C/24h, les cultures sont centrifugées (Nüve NF 200®) à 3000 rpm/10 min. Les culots obtenus sont lavés trois fois par 5 ml d'eau physiologique stérile (8,5g/l NaCl) puis repris finalement dans 5ml. Les suspensions bactériennes lavées serviront à inoculer le milieu de culture N-Fb préalablement distribué dans des microplaques à fond rond (96 puits).

### **6.6. Détermination de l'halotolérance**

L'expérience est réalisée sur des microplaques à fond rond de 96 puits [12 colonnes (8 puits/colonne)]. Chaque puits servira à inoculer 200  $\mu$ l du milieu avec 10  $\mu$ l de la suspension bactérienne préalablement lavée. Pour chaque colonne de la microplaque,

le milieu est utilisé à une même concentration en NaCl donnant enfin huit répétitions de même nature. Enfin, les microplaques sont incubées à 28°C/72 h. Des témoins sans NaCl sont préparés en parallèle. La croissance bactérienne dans les différents puits est déterminée par mesure de la DO à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu Mini 1240®).

La lecture est réalisée, en duplicata, par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu Mini 1240®). Les deux lectures sont obtenues en mélangeant le contenu de chaque 4 puits (8 au total) dans deux cuves à spectrophotomètre.

L'étude de l'halotolérance des souches ainsi que de l'effet de la glycine bêtaïne et d'*Ulva lactuca* sur la croissance des bactéries sous stress salin est réalisée en même temps en utilisant les mêmes inocula bactériens pour chaque souche.

### **6.7. Analyses statistiques**

Les résultats obtenus sont statistiquement analysés en utilisant le test t de Student pour comparer entre deux échantillons appariés. Un test statistique permettant d'étudier l'influence d'un facteur donnée sur un caractère à étudier dans un ensemble donné.

$$t = \frac{\left(\frac{1}{n}\right) |\sum_i d_i|}{\sqrt{\text{SCE}/n(n-1)}}$$

Les résultats obtenus sont confirmés par une analyse (Two way ANOVA) en utilisant le logiciel Graph Pad Prism version 6.

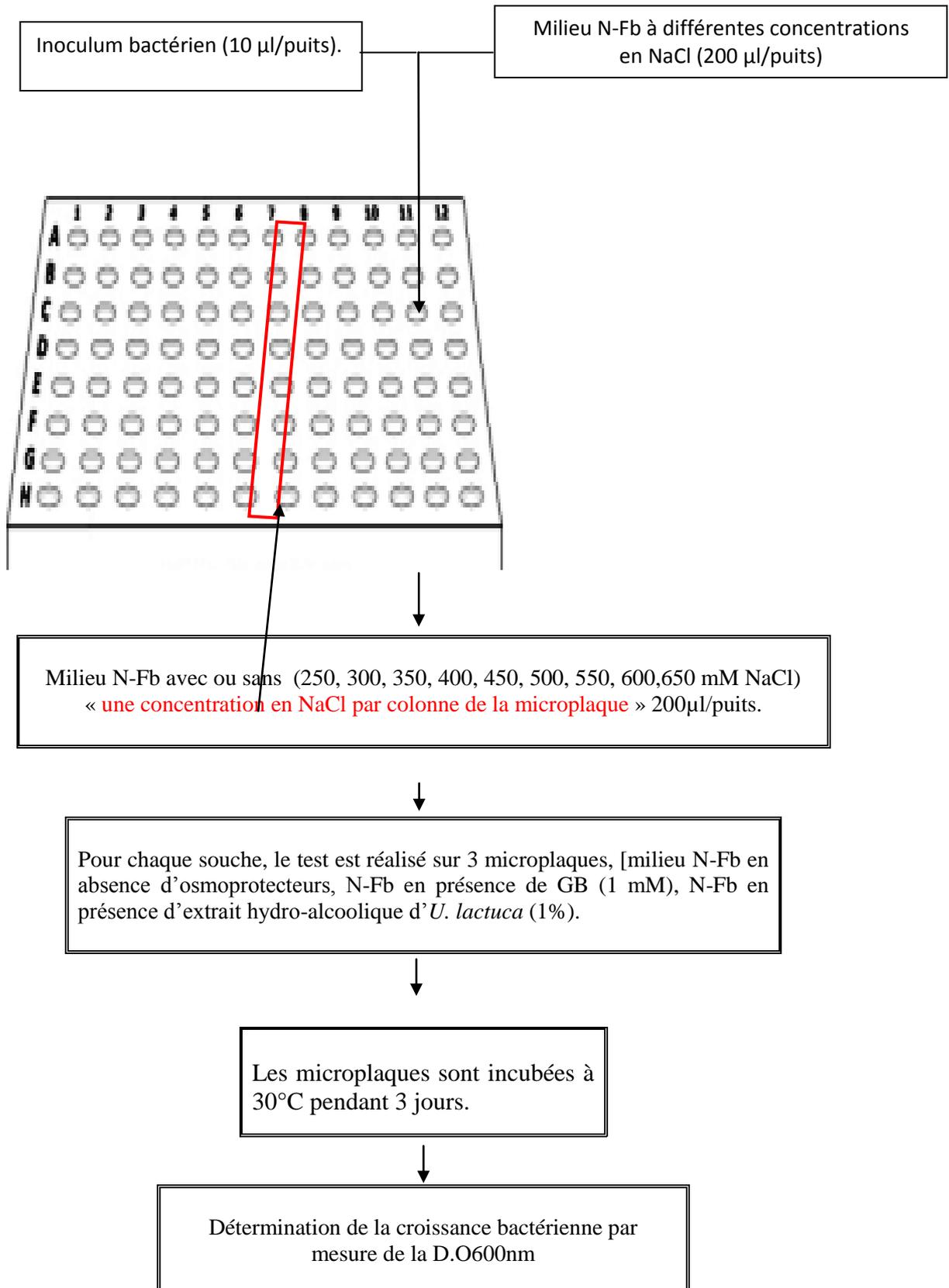


Figure. 4 : Halotolérance des quatre souches en présence ou en absence de la GB [1mM] et de l'extrait hydro-alcoolique d'*U. lactuca* [1%].

## **7. Germination des graines de blé**

Afin de déterminer l'effet des souches étudiées, de la glycine bêtaïne (GB) et de l'extrait hydro-alcoolique d'*U. lactuca* (UL) sur la germination des graines du blé dur sous stress salin, les graines sont sélectionnées rigoureusement en fonction de leur morphologie, leur taille et leur état.

### **7.1. Stérilisation des graines**

Les graines sont stérilisées selon la méthode de Götzet *al.* (2006) en trois étapes :

1. Les graines sont d'abord trempées dans de l'éthanol (70%/1min) sous agitation douce.
2. Elles sont ensuite remises dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 12% /15 mn.
3. Enfin, elles ont subi six lavages successifs à l'eau distillée stérile pour se débarrasser du chlore.

### **7.2. Protocole expérimental (Ramados *et al.*, 2013)**

Des disques en papier filtre standard d'un diamètre égal à celui des boîtes de Pétri sont stérilisés au four Pasteur à 180°C pendant 15 minute puis placés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre (02 papier filtre/boîte).

Dans chaque boîte de Pétri, le papier filtre est imbibé avec des solutions à différentes concentrations en NaCl (5ml/boîte). Ces solutions sont additionnées, ou non, de GB et d'extrait hydro-alcoolique d'*U. lactuca* à une concentration finale de 1 mM et 1%, respectivement. Des boîtes imbibées uniquement avec de l'eau distillée stérile (0 mM) sont utilisées comme témoin négatif. Des boîtes imbibées uniquement avec des solutions saline (100, 200, 300 mM) sont utilisées comme témoin positif.

L'étude de la germination est divisée en cinq expériences réalisées en même temps et dans les mêmes conditions de température, d'humidité et d'obscurité. Chacune des cinq expériences est divisée en trois sous-expériences.

Première expérience réalisée en absence de souches bactériennes, **EXP (I)** :

Première sous-expérience réalisée en absence d'osmoprotecteurs, **SOUS EXP (I)**.

Deuxième sous expérience en présence de GB [1 mM], **SOUS EXP (2)**.

Troisième sous expérience en présence de l'extrait d'UL [ $10^{-2}$ ], **SOUS EXP (3)**.

Chaque sous-expérience est réalisée avec quatre tests

Premier test (**T1**) : réalisé à 0 mM NaCl

Deuxième test (**T2**) : réalisé à 100 mM NaCl

Troisième test (**T3**) : réalisé à 200 mM NaCl

Quatrième test (**T4**) : réalisé à 300 mM NaCl

Les quatre tests sont réalisés en Triplicata (**A**, **B** et **C**) : **3 x** (12 graines/boite).

Les quatre expériences **EXP (II)**, **EXP (III)**, **EXP (IV)** et **EXP (V)** constituent des répétitions de la première expérience mais en présence des quatre souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9, respectivement (Voir inoculation des graines).

### **7.3. Inoculation des graines**

Après stérilisation des graines, elles sont imbibées dans des suspensions bactériennes lavées des quatre souches étudiées (30 minutes de contact entre la bactérie et les graines).

Cette expérience est réalisée à l'obscurité. Le suivi de la germination est effectué durant 12 jours en dénombrant les graines germées dans chaque boite (une lecture/2jours). Une graine est considérée comme germée après la sortie de l'embryon de la cuticule (3 mm de longueur au minimum). A la fin de l'expérience, le pourcentage de germination dans chaque boite est déterminé.

### **7.4. Analyse statistique :**

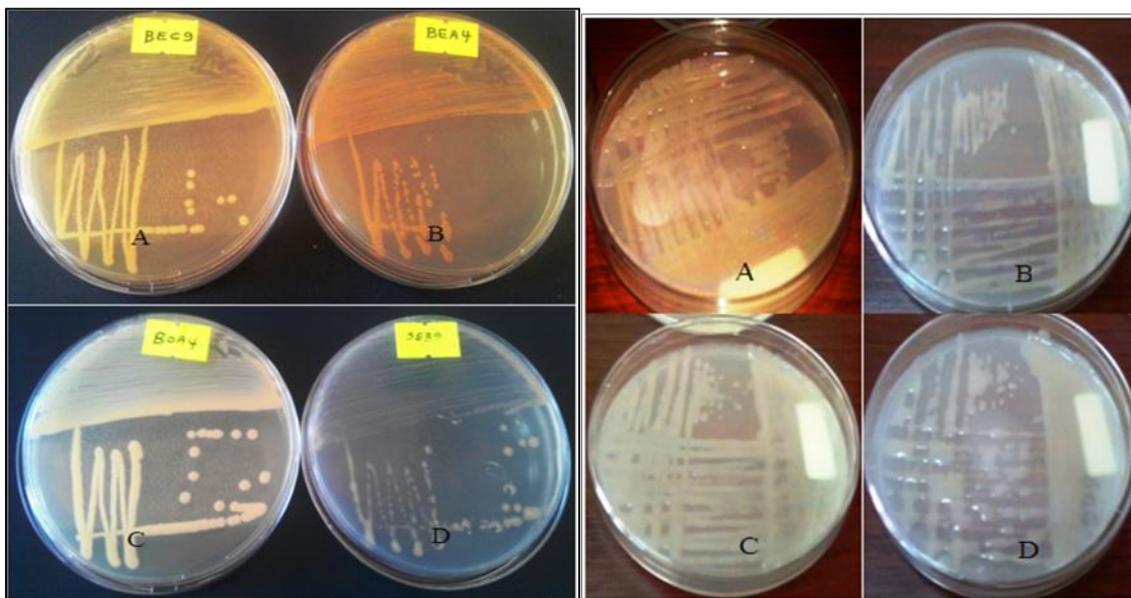
Les résultats sont analysés par groupe en utilisant le test (Two way ANOVA) sur le logiciel Graph Pad Prism version 6.

Les souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9, sur lesquelles le travail a été réalisé, ont été sélectionnées sur la base de leur capacité à synthétiser des métabolites d'intérêt agricole : enzymes hydrolytiques, Acide Indole Acétique (AIA), Sidérophores, solubilisation de phosphate et activité antifongique.

Les quatre souches produisent des quantités importantes d'enzymes hydrolytiques (cellulase, chitinase, amylase, lipase, protéase et estérase) pouvant jouer un rôle très important dans le recyclage de la matière organique dans le sol (Carrim *et al.*, 2006 ; Shonkor et Ajit, 2011). Elles produisent la phytohormone AIA, connue pour son rôle non négligeable dans la stimulation de la croissance des plantes (Ahmad *et al.*, 2005). L'ensemble des souches produisent également des sidérophores et solubilisent le phosphate tricalcique [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], deux paramètres importants dans l'amélioration du rendement des cultures agricoles (Jacques *et al.*, 1993 ; Ramos Solano *et al.*, 2008 ; Keneni *et al.*, 2010). La souche SEB9 semble avoir une activité antifongique sur une large gamme de champignons considérés comme phytopathogènes, y compris *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* et d'autres. Sur la base de ces résultats obtenus, les quatre sont sélectionnées pour être utilisées comme biofertilisants promouvant la croissance des plantes et substituant les fertilisants chimiques.

## 1. Vérification de la pureté des souches

Il est à noter que les quatre souches ont été isolées pour la première fois sur le milieu Jensen, elles sont donc considérées comme des bactéries Diazotrophes (fixatrices d'azote). Repiquées sur le milieu LB, les colonies des quatre souches sont de formes arrondies, légèrement bombées et de couleurs variables (BEA4 : orange, BEC9 : jaunâtre, BOA4 : blanchâtre, SEB9 : transparente). Contrairement à ça, les colonies perdent leurs formes et leurs couleurs une fois repiquées sur le milieu N-free Jensen. Elles deviennent de couleur blanchâtre, plus muqueuses et poussent en nappes en prolongeant la durée d'incubation. Il semble que ce changement de formes est lié à la production d'une quantité considérablement accrue d'exopolysaccharides servant à la protection de la nitrogénase (enzyme assurant la fixation d'azote). Ces exopolysaccharides protègent également les bactéries de la dessiccation par modification de leurs microenvironnements en se liant aux cations sodium ( $\text{Na}^+$ ). Ces derniers sont le plus souvent impliqués dans les cas de stress hydrique (Roberson et Firestone, 1992 ; Becker, 1998).



**Figure 6:** Aspect, sur milieu LB, des quatre souches (A : *P. putida* BEC9 ; B : *F. johnsoniae* BEA4; C: *A. xylosoxidans* BOA4 ; D : *A. chroococcum* SEB9).

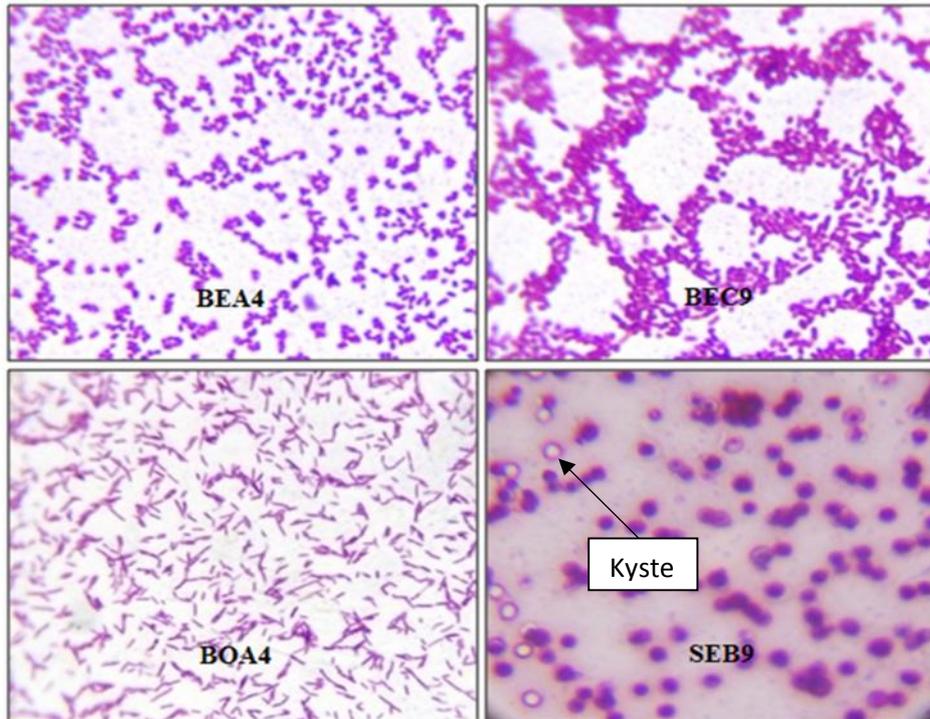
**Figure 7:** Aspect, sur milieu Jensen, des quatre souches (A: *P. putida* BEC9 ; B : *F. johnsoniae* BEA4; C : *A. xylosoxidans* BOA4 ; D: *A. chroococcum* SEB9).

**Tableau (V) :** Caractères morpho-physicochimiques des quatre souches sur milieu LB.

	BEA4	BEC9	BOA4	SEB9
Aspect	Arrondies Aplaties Oranges- dorées	Bombé Légèrement verdâtre	Blanchâtre Bombé Aspect régulier	Blanchâtre muqueuse diffuse
Enkystement	-			+
Forme	Bacilles			Pléomorphes
Mobilité				+
Gram				-
Catalase				+
Oxydase				+

Les critères d'identification étudiés pour les quatre souches coïncident avec les données de la littérature. Ainsi, les souches *F. johnsoniae*, *P. putida*, *A. xylosoxidans* sont caractérisées par une forme bacillaire de taille qui varie d'une espèce à l'autre (McBride, 2004 ; Brenner *et al.*, 1923). Les cellules de la souche *A. chroococcum* prennent de

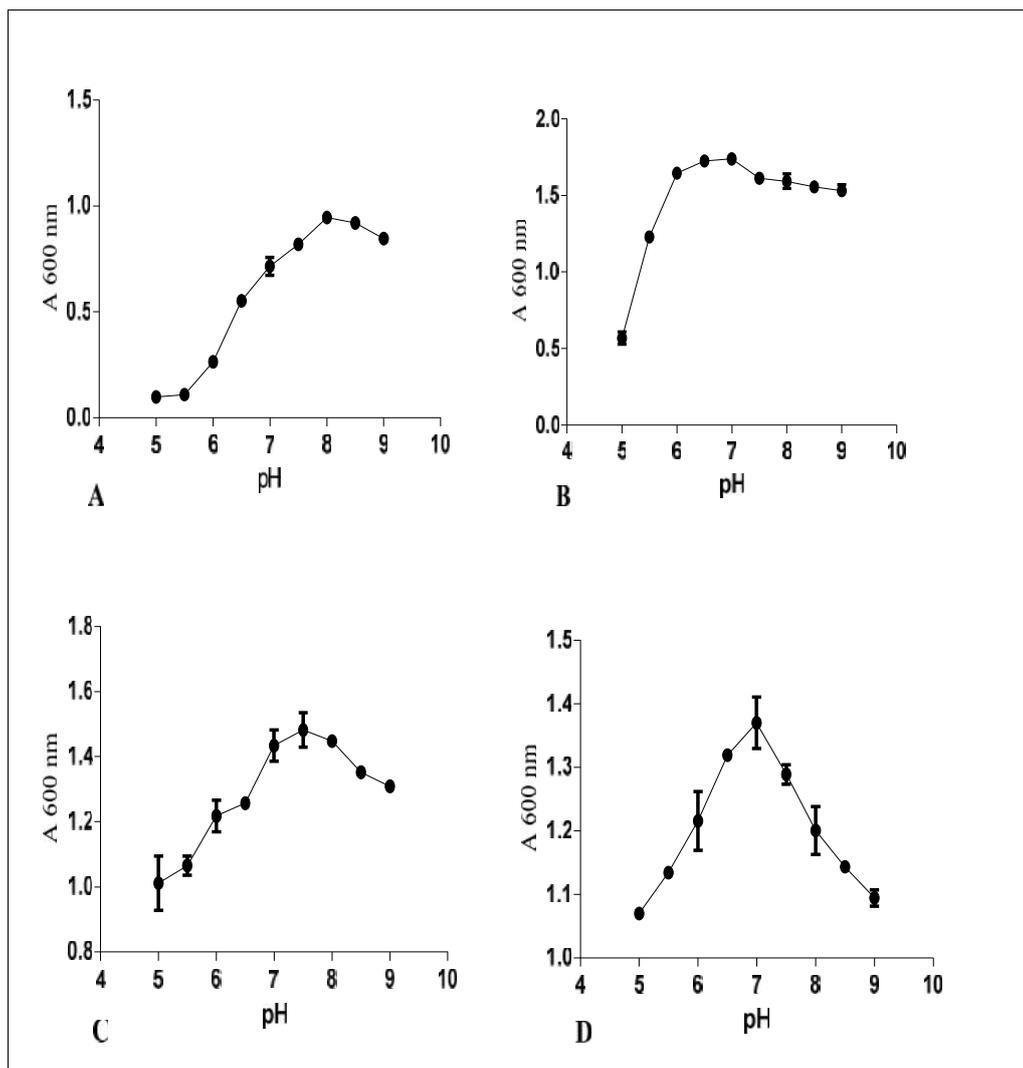
multiples formes sur la même lame (pléomorphe) avec présence de kystes (fig 8) (Winogradsky, 1938 ; Dhanashekar, 2003 ; Kisten ,2006 ; Becking, 2006). Les espèces appartenant aux genres *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Azotobacter* sont des bactéries Gram négative (Duggan *et al.*, 1996 ; Manfredi *et al.*, 2000 ; Brener *et al.*, 1923). Aussi, les quatre souches *F. johnsoniae*, *P. putida*, *A. xylosoxidans* et *A. chroococcum* se sont révélées mobiles, avec une réaction positive à l'oxydase et au catalase (Tchan, 1984 ; Duggan *et al.*, 1996 ; McBride, 2004 ; Henry, 2011).



**Figure 8:** Aspect des souches après Coloration de Gram, des (A : *F. johnsoniae* BEA4; B : *P. putida* BEC9; C: *A. xylosoxidans* BOA4 ; D : *A. chroococcum* SEB9).

## 2. détermination du pH optimum

Ce test a été réalisé dans le but de minimiser, voir éliminer, l'effet du pH et son interaction avec celui de la salinité lors de l'étude de l'halotolérance des souches (l'un des objectifs principaux de ce travail).



**Figure 9:** Détermination du pH optimum de la croissance des quatre souches **A** : *F. johnsoniae* BEA4; **B** : *P. putida* BEC9 ; **C** : *A. xylooxidans* BOA4 ; **D** : *A. chroococcum* SEB9 (test réalisé en duplicata).

La souche BEA4, présente une meilleure croissance dans un pH légèrement alcalin 8,00. En deçà et au-delà, on observe une diminution de la croissance. La souche BEC9 est moins sensible aux variations de pH par rapport aux autres souches, elle croit le mieux à un pH situé entre 6,5 et 7. Une meilleure croissance a été observée avec la souche BOA4 à un pH de 7,5. Après cette valeur la croissance bactérienne diminue. Un pH neutre (7,00) favorise le mieux la croissance de la souche SEB9. Il est à noter que cette dernière est la plus sensible aux variations du pH.

La croissance des souches étudiées est meilleure sur une gamme de pH qui varie de 6,5 à 8 avec un optimum de pH au allant tourde 7,00. (Goodfellow et Williams, 1983) ont montrées que la plupart des bactéries du sol préfèrent les sols neutres et légèrement

alcalins ce qui est en corrélation avec nos résultats ainsi que les résultats obtenus lors de l'étude des propriétés physicochimiques des échantillons du sol à partir desquels les souches ont été isolées (Tableau VI).

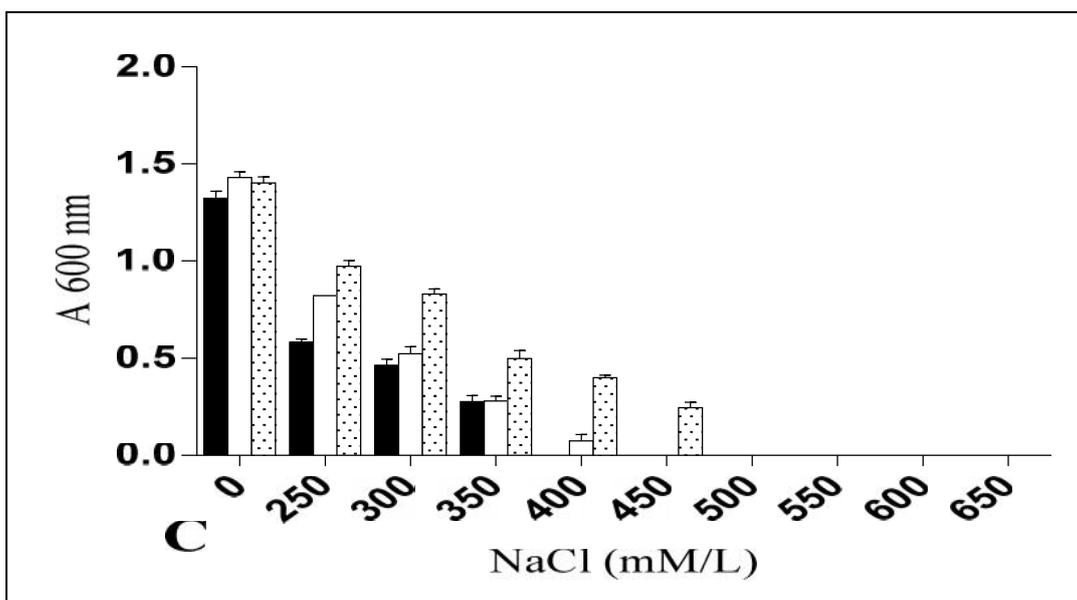
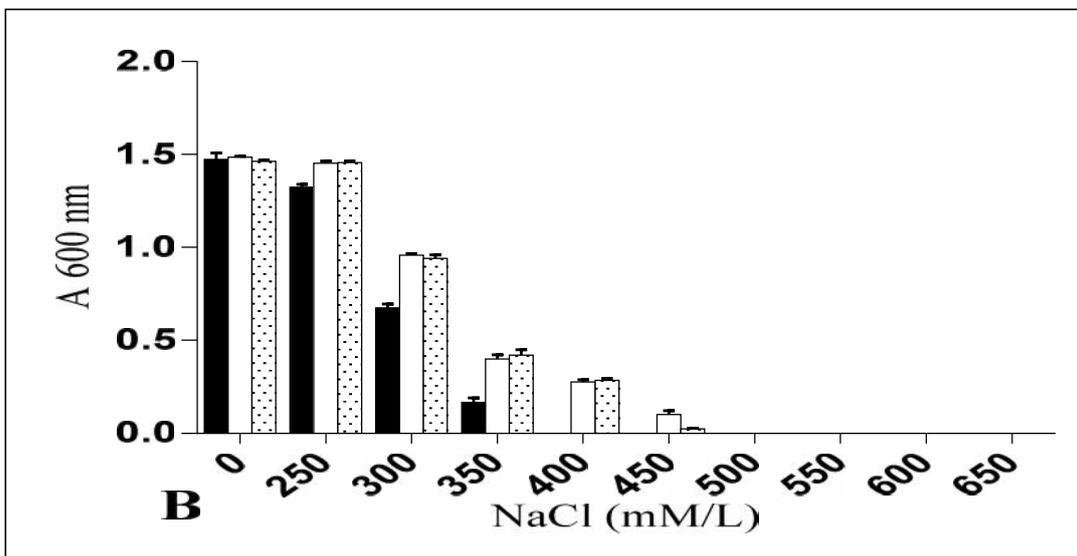
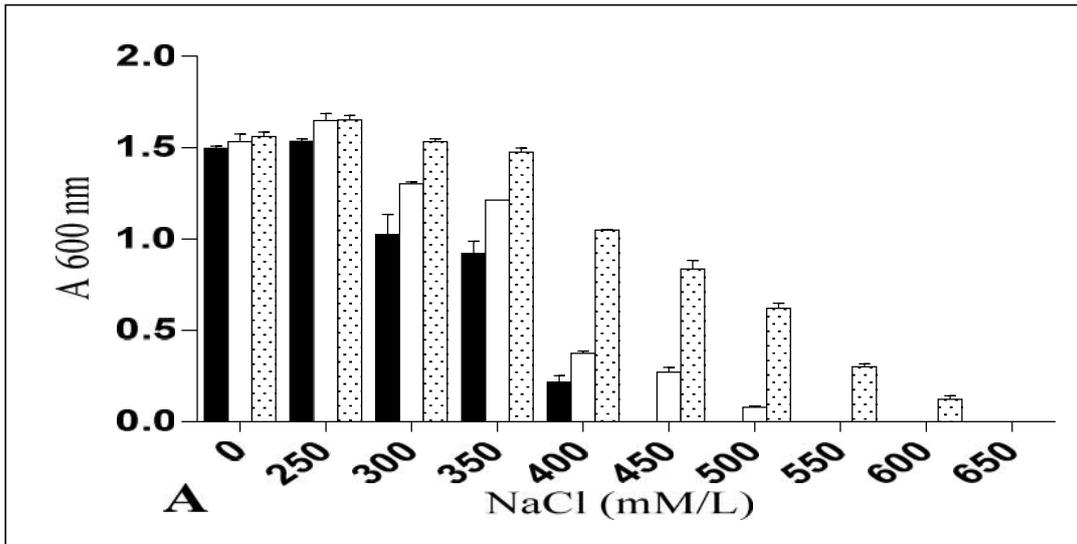
**Tableau (VI) :** La comparaison entre les pH optimums de croissance et les pH des échantillons des sols d'isolement.

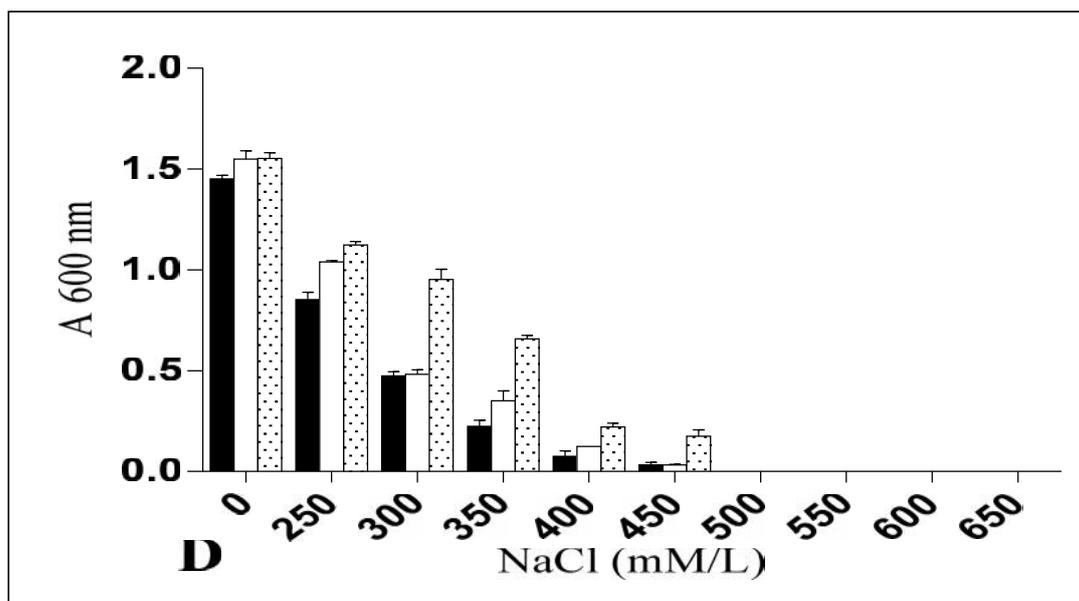
Nom de l'échantillon	Nom de la souche	pH de l'échantillon	pH optimum de croissance
BEA	BEA4	7.16	8
BEC	BEC9	7.29	7
BOA	BOA4	7.60	7.5
SEB	SEB9	7.41	7

Les souches *F. johnsoniae* (BEA4), *P. putida* (BEC9) et *A. xylosoxidans* (BOA4) peuvent croître sur une large gamme de pH allant de 6,5 à 9. Ces mêmes valeurs ont été constatées chez les mêmes espèces ou des espèces voisines dans plusieurs travaux (McMahon *et al.*, 2007 ; CHÁVEZ-PARGA *et al.*, 2012 ; Belal et El-Nady, 2013 ; SREEDEVI *et al.*, 2013). Par contre, la souche *A. chroococcum* (SEB9) est sensible aux variations du pH. Sa croissance maximale est enregistrée à un pH de 7 et diminue rapidement au-delà et en deçà de cette valeur. D'après notre étude la souche *Azotobacter chroococcum* (SEB9) croît sur une gamme de pH très étroite ce qui est confirmé avec des souches de cette même espèce dans des travaux réalisés par (Lees et Postgate, 1973 ; Hine et Lees, 1976 ; Pozo *et al.*, 2002 ; Kisten *et al.*, 2006) qui ont prouvé que le PH des milieux de culture destinés à des souches d'*A. Chroococcum* doit être situés entre 7 et 7,5.

### 3. Etudes de l'halotolérance des souches

La croissance, exprimée en DO, des quatre souches sur le milieu minimum (N-Fb) en présence de différentes concentrations en NaCl (0, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650mM), de la GB [1mM] ou de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* (1%) est exprimée dans les figures 10.





■ Témoïn    □ Glycine bétaine    ▨ *Ulva lactuca*

**Figure. 10:** croissance maximale obtenue sur le milieu N-Fb sous différentes concentration en NaCl. Test réalisé en présence de glycine bétaine [1 mM/L] et de l'extrait hydro-alcoolique d'*U. lactuca* [1%]. **A :** *F. johnsoniae* BEA4; **B:** *P. putida* BEC9; **C :** *A. xylooxidans* BOA4; **D :** *A. chroococcum* SEB9 (test réalisé en duplicata, un témoin en absence d'osmoprotecteur et réalisé).

En absence d'osmoprotecteurs, la souche *F. johnsoniae*-BEA4 tolère jusqu'à 400 mM de NaCl avec un optimum de croissance à 250 mM. A partir de cette concentration, sa croissance diminue graduellement. A 450 mM aucune croissance n'a été enregistrée. L'addition de la glycine bétaine au milieu a amélioré la croissance par rapport au témoin et permet à la bactérie de croître jusqu'à 500 mM de sel, La croissance bactérienne est restaurée en présence d'extraits hydro-alcooliques d'algue à 600 mM. Aucune croissance n'a été enregistrée à 650 mM de sel (figure 10 ; A).

La souche *P. putida*-BEC9 est capable de croître jusqu'à 350 mM. Au-delà de cette concentration sa croissance diminue. L'ajout des deux osmoprotecteurs GB et L'extrait hydro-alcoolique de *Ulva lactuca* ont permis la restauration de sa croissance jusqu'à 450 mM, notant que la GB est bien meilleur que (UL) à cette concentration en sel. A la concentration 500 mM, aucune croissance n'a été notée (figure 10 ; B).

Concernant la souche *A. xylooxidans*-BOA4 est, elle tolère jusqu'à 350 mM. La GB et l'extrait d'algue ont amélioré sa croissance dans les concentrations (250, 300, 350 et 400) mM. Mais l'action stimulatrice exercée par *Ulva lactuca* a été plus remarquable. A

(450mM) l'extrait de UL a permis sa restauration. Au-delà de cette concentration la croissance est inhibée même en présence des deux osmoprotecteurs (figure 10 ; C).

La souche *A. chroococcum*-SEB9 conserve une bonne capacité de croissance jusqu'à 450mM/NaCl. Une amélioration de sa croissance est observée en présence de la GB et d'extrait de *Ulva lactuca* dans les concentrations (0, 250, 300, 350, 400 et 450). L'effet de l'extrait a été meilleur que celui de la GB. Au-delà de 450 mM de sel, aucune croissance n'a été constatée (figure 10 ; D).

#### ➤ Analyse statistique :

Pour mettre en évidence la significativité des résultats de la croissance des souches obtenus, avec ou sans osmoprotecteurs, le test t de Student pour la comparaison entre deux échantillons appariés a été utilisé.

$$t = \frac{\left(\frac{1}{n}\right) |\sum_i d_i|}{\sqrt{SCE/n(n-1)}}$$

n: nombre de mesure pour chaque série.

d : La variation du paramètre entre les deux mesures.

SCE : La somme des carrés des écarts  $SCE = \sum (d - d_{moy})^2$ .

Cette valeur t calculée est à comparer avec celle de la table de Student : (ddl = n-1=9 ; le risque = 5%). La différence est significative entre les deux séries de valeur si la valeur t calculée est supérieure à celle de la table (pour les autres calculs, voir annexe 1).

Le coût relativement élevé des osmoprotecteurs synthétiques tel que la glycine bêtaïne constitue un obstacle majeur empêchant leur utilisation dans la formulation des engrais pour maintenir le bon rendement agricole et la stabilité des populations microbiennes sur des sols affectés par un stress salin. Cet obstacle oblige les chercheurs à penser à une valorisation de certaines ressources naturelles susceptibles de fournir une source d'osmoprotection, mais aussi, d'enrichissement de ce type de sol.

Selon (Larsen *et al.*, 1987 et Kushner, 1993), les bactéries résistant à une concentration située entre (200-1200 Mm) sont considérées comme étant des halophiles faibles. L'étude de l'effet de la salinité sur les quatre souches a fait ressortir une osmotolérance comprise dans les limites de l'intervalle précédemment cité. Cela signifie que les souches étudiées sont modérément halotolérantes, à l'exception de la souche BEA4 considérée comme faiblement halophile optimum de croissance à 250 mM. Cependant,

leur croissance est considérablement améliorée par l'ajout d'osmoprotecteurs naturels ou synthétiques.

Les rhizobactéries halotolérantes peuvent développer des mécanismes moléculaires intrinsèques pour survivre et croître en vertu de l'augmentation de la salinité (Tripathi *et al.*, 2002). Les bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* et *Achromobacter*. Sont parmi les PGPR les plus dominantes dans les sols salins (Ahmad *et al.*, 2005 ; Sreedevi *et al.*, 2013).

L'amélioration et la restauration de la croissance des quatre souches par l'apport de la Glycine bêtaïne et de l'extrait hydro-alcoolique est remarquable. L'osmoprotection par la Glycine bêtaïne est meilleure avec la souche *P. putida*. (Le Rudulier *et al.*, 1983 ; Hartmann *et al.*, 1991 ; D'Souza-Ault *et al.*, 1993 ; Ghoul *et al.*, 1995 ; Nabti *et al.*, 2007) ont prouvé que la glycine bêtaïne est un osmoprotecteur très efficace chez cette espèce ainsi que d'autres espèces appartenant aux genres *Rhizobium*, *Azospirillum* et *E. coli*. Outre son rôle dans l'osmoprotection, la GB pourrait également améliorer la croissance des souches de *Pseudomonas* à faible osmolarité, en servant comme source de carbone et d'azote (Diab *et al.*, 2006).

L'extrait hydro-alcooliques de l'algue marine *Ulva lactuca* (UL) apporte une meilleure osmoprotection par rapport à la glycine bêtaïne (GB) chez les souches *F. johnsoniae*, *A. xylosoxidans* et *A. chroococcum*. (Ghoul *et al.*, 1995) ont étudié la composition de l'extrait de l'algue marine *Ulva lactuca* en molécules impliquées directement ou indirectement dans l'osmoprotection (l'apport d'azote aminé, de composés-onium et de protéines). Les résultats obtenus ont montré que cet extrait est riche en acides aminés, en bêtaïnes, en sulfoniums tertiaires y compris le Diméthylsulphoniopropionate (DMSP) et en protéines.

L'augmentation de la teneur intracellulaire en acides aminés en fonction du stress osmotique a été constatée chez plusieurs espèces bactériennes (Britten et McClure, 1962 ; Brown et Stanley, 1972 ; Tempes et Coll., 1970 ; Makenmson et Hastings, 1979 ; Hua et Coll., 1982) . Parmi ces acides aminés les plus étudiés la proline, le tréhalose et les bêtaïnes sont dominants chez une grande variété de plantes, de bactéries halophiles et d'algues marines (Hanson et Scott, 1980 ; Robinson et Jones, 1986 ; Ghoul, 1995 ; McNeil *et al.*, 1999 ; Ashraf et Foolad, 2007).

Le dimethylsulfoniopropionate (DMSP) est répandu dans les milieux marins (Da Costa *et al.*, 1998). Il est accumulé spécifiquement comme osmoprotecteur lors d'une carence en azote dans le milieu (Ghoul, 1990; Ciula *et al.*, 1997). Et Il est généralement admis qu'un osmoprotecteur doit être accumulé durablement dans la cellule pour être efficace en allégeant le stress salin (Csonka et Hanson, 1991). Le DMSP fonctionne comme un osmoprotecteur exogène chez de nombreuses espèces bactériennes dont *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella thyphimurium*, *Sinorhizobium meliloti*, *Azospirillum brasilense* (Ghoul *et al.*, 1990; Galinski, 1995 ; Pichereau *et al.*, 1998 ; Nabti *et al.*, 2007).

#### 4. Résultats de la germination

Les résultats discutés ci-dessous sont obtenus après 12 jours d'incubation des graines à température ambiante du laboratoire et à l'obscurité. Le pourcentage final de germination est déterminé sur trois répétitions et à partir d'un total de 12 graines par répétition.

$$P_i = (N_i \times 100) / 12.$$

$P_i$  : pourcentage final de germination dans chaque boîte.

$N_i$  : nombre de graine germé dans la même boîte.

Le pourcentage final de germination ( $P_f$ ) de chaque essai est donc :

$$P_f = P_i / 3.$$

##### 4.1. Effet de la salinité sur la germination de blé dur

Selon les résultats obtenus, La salinité a un effet significativement important sur la germination des graines de blé dur. Cela se manifeste par la diminution graduelle de taux de germination avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu par rapport au témoin. En absence de sel dans le milieu, le taux de germination a été de 80,56%. À la plus forte concentration en NaCl, 300mM, le taux de germination est fortement réduit atteignant 2,75%. Concernant les concentrations (100 et 200) mM, les pourcentages ont été de 36,1% et 30,53 respectivement.

##### 4.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination de blé

En absence de la NaCl dans le milieu, l'inoculation des graines de blé par les souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 a légèrement réduit taux de germination (différence statistiquement non significative). À titre d'exemple, la souche BOA4 a réduit le taux de germination de 80,56% à 63,9%.

En présence des différentes concentrations en NaCl, l'inoculation des graines avec les souches a amélioré significativement le taux germination en comparaison avec le

témoin. À 100 et 200 mM, le taux de germination observé en présence de la souche *Azotobacter chroococcum* (SEB9) a été meilleur que celui observé en présence des autres souches. À 300 mM, l'amélioration du taux de germination a été hautement significative pour la souche *Achromobacter xylosoxidans* (BOA4), sachant que le taux de germination de 2,75% a été amélioré jusqu'à 50%.

#### **4.3. Effets de la GB et d'UL sur la germination des graines de blé**

En absence de stress salin, l'addition de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* dans le milieu n'a pas d'effet sur le taux de germination, contrairement à la glycine bêtaïne qui a légèrement réduit le taux de germination. Sous stress salin, l'ajout de l'osmoprotecteur GB ou de l'extrait d'*Ulva lactuca* a amélioré significativement le taux de germination. En absence de la GB et de l'extrait d'*Ulva lactuca*, le taux de germination a été de (36,1 ; 30,53 et 2,75)% pour les concentrations (100, 200 et 300) mM respectivement. Cependant l'ajout des deux osmoprotecteurs séparément dans le milieu a permis d'améliorer significativement le taux de germination par rapport au témoin. À 100 et 200 mM, l'extrait de l'algue et la GB ont, statistiquement, le même effet sur le taux de germination (63,9 et 47,23% respectivement). Pour la concentration 300 mM l'effet de l'extrait a été bien meilleur que celui de la GB (30,23 et 22,23%).

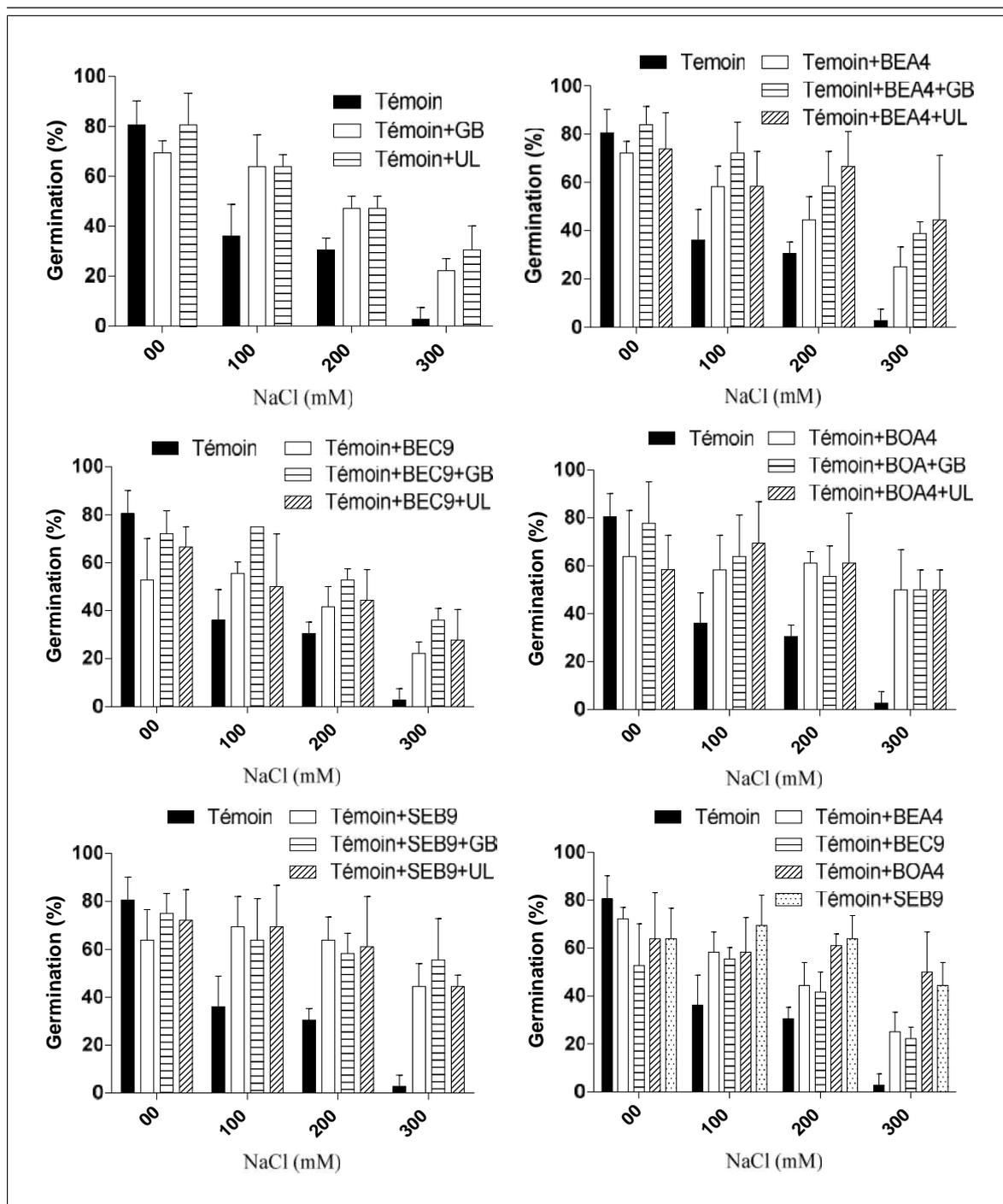
#### **4.4. Effet des souches, de GB et d'UL sur la germination de blé**

En absence de sel (0 mM), l'inoculation des graines avec BEA4 en présence de la GB a amélioré le taux de germination. Mais l'ajout de l'extrait n'a donné aucun effet. En revanche, l'inoculation des graines avec les autres souches en présence de la GB ou de l'extrait n'a aucun effet sur le taux de germination.

Sous stress salin, l'addition de la GB ou de l'extrait d'*U. lactuca* aux graines inoculées a amélioré significativement le taux de germination par rapport au témoin. Pour la souche BEA4, à 100 mM, l'osmoprotection fournie par la GB est meilleure que celle d'*U. lactuca*. Cependant, avec les concentrations (200 et 300) mM, l'extrait a mieux amélioré le pourcentage final de germination. La GB est un osmoprotecteur efficace pour la souche BEC9, ce dernier était non significativement plus efficace que l'extrait de l'algue.

Concernant les graines inoculées avec les souches BOA4 et SEB9, l'addition de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* dans le milieu à concentrations 100 et 200

mM a amélioré le pourcentage de germination mieux que l'ajout de la GB. À 300 mM, les deux osmoprotecteurs ont donné le même effet pour BOA4. Pour la souche SEB9, la GB a amélioré le taux de germination mieux que l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca*.



**Figure 11 :** Pourcentage finale de germination des graines en présence de l'NaCl (100, 200, 300) et en présence de Glycine bétaïne(GB) [1mM] et d'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* (UL) [1%]. Les graines sont inoculées, ou non, avec les souches *F. Johnsoniae* (BEA4), *P. putida* (BEC9), *A. xylooxidans* (BOA4) et *A. chroococcum* (SEB9). Des témoins en absence de sel sont présentés. Les bars constituent l'écart type ( $\pm$ ET).

L'excès en NaCl dans le milieu réduit la disponibilité de l'eau chez la plante aboutissant à une déshydratation du cytoplasme qui affecte le métabolisme des cellules et la fonction des macromolécules et par conséquent, la croissance des plantes (Le Rudulier, 2005; Taffouo *et al.*, 2009).

Les PGPR sont capables d'exercer un effet bénéfique sur la croissance de la plante par augmentation du taux cumulé de la germination (Glick *et al.*, 1998). L'utilisation de ces derniers comme inoculant des graines de blé dans les sols touchés par la salinité améliore la hauteur des plantes, la longueur des racines et le rendement des graines.

Les souches bactériennes étudiées dans le cadre de ce travail semblent avoir un effet bénéfique sur la germination des graines de blé. De ce point de vu, elles peuvent être considérées comme PGPR. Leur capacité à produire certains métabolites tel que l'acide indole-3-acétique (AIA), une phytohormone jouant un rôle important dans promotion de la germination des graines, peut être à l'origine de ce pouvoir (Whipps, 1990 ; Fallik *et al.*, 1994 ; Ahmad *et al.*, 2005).

Les quatre souches peuvent aussi solubiliser les formes insolubles de phosphate inorganique assurant l'alimentation minérale de la plante en phosphate (Kucey *et al.*, 1989 ; Pradhan et Sukla, 2005 ; Sharma *et al.*, 2007). Elles peuvent également produire des sidérophores améliorant l'alimentation des graines en fer. Leur croissance dans le milieu améliore la disponibilité des métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels que le Zinc et le Plomb (Dimkpa *et al.*, 2009).

(Ahmad *et al.*, 2008) ont prouvés que l'expression bactérienne des métabolites influençant la croissance des plantes tel que l'IAA, les sidérophores et les phosphatases est influencé par la salinité ce qui influence par conséquent la croissance de la plante.

Sur la base des résultats obtenus avec les tests de germination, les souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 améliorent la germination des graines de blé dur à salinité élevée. Ces résultats ont été confirmés par de nombreux travaux : *Azotobacter* (Elshanshoury, 1995 ; Pati *et al.*, 1995; Jarak *et al.*, 1977 ; Shaukat *et al.*, 2006), *Azotobacter chroococcum* (Jarak *et al.*, 2006), *Pseudomonas* (Zaidi, 2003), *Pseudomonas putida* (Kaymak *et al.*, 2009), *Flavobacterium sp* (Rathi *et al.*, 2014) et *Achromobacter xylosoxidans* (Tam et Diep, 2014). Sont des exemples pertinents dans l'amélioration de la germination et la croissance végétale du blé, de maïs et d'orge. L'inoculation des graines de blé dur par

*Azotobacter chroococcum* augmente significativement les paramètres de croissance (hauteur de la plante, longueur des racines et poids frais et secs racinaires et foliaires) sous stress salin. Ces résultats sont rapportés par de nombreux auteurs qui ont trouvé que l'inoculation des graines par une souche appartenant au genre *Azotobacter* augmente le pourcentage de germination de graines de blé d'environ 58,6 % (Krieg et Holt, 1984 ; El-Shansboury, 1995; Nadeem *et al.*, 2006. Shaukat *et al.*, 2006).

Selon Borojevic *et al.*, (1980), l'application de la GB améliore la croissance et le rendement du blé sous stress salin. Il a un effet bénéfique sur la germination des graines et la croissance des plantes sous stress salin. Cette osmoprotecteur participe au maintien de la pression de turgescence en augmentant le volume cellulaire et stabilise la structure et la fonction des protéines en améliorant son état d'hydratation (D'Souza-Ault *et al.*, 1999).

Selon Nelson (2004), il est bien évident que le rendement des céréales dépend de la fertilité du sol et sa richesse en Potassium (P), en azote (N) et en matière organique. Des études ont montrés que l'extrait d'*U. Lactuca* favorise la croissance des graines de blé et que sa décomposition améliore la fertilité des sols pauvre par l'apport d'éléments nutritifs tels que le P le N et la matière organique (Alvey *et al.*, 2003 ; Nedzarek et Suszczewski, 2004).

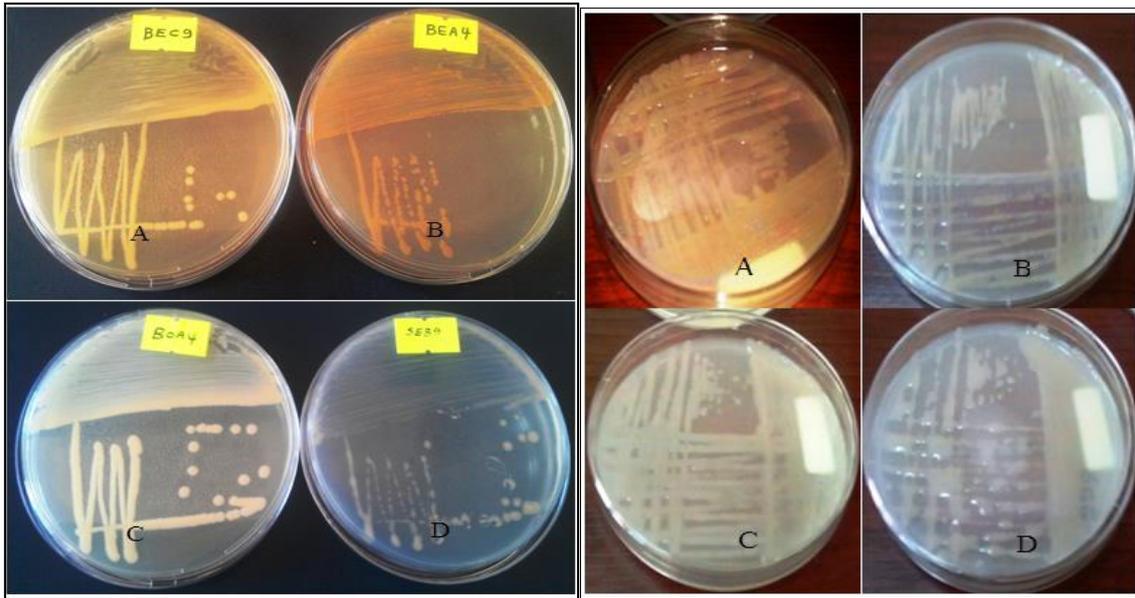
Selon les travaux de (Ghoul *et al.*, 1995 ; Summers *et al.*, 1988 ; Ibrahim *et al.*, 2014), la capacité de l'extrait d'*Ulva lactuca* à améliorer le taux de germination des graines sous stress salin revient à sa composition en divers bétaines, en DMSP et en acides aminés tels que la proline et la choline.

Les souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9, sur lesquelles le travail a été réalisé, ont été sélectionnées sur la base de leur capacité à synthétiser des métabolites d'intérêt agricole : enzymes hydrolytiques, Acide Indole Acétique (AIA), Sidérophores, solubilisation de phosphate et activité antifongique.

Les quatre souches produisent des quantités importantes d'enzymes hydrolytiques (cellulase, chitinase, amylase, lipase, protéase et estérase) pouvant jouer un rôle très important dans le recyclage de la matière organique dans le sol (Carrim *et al.*, 2006 ; Shonkor et Ajit, 2011). Elles produisent la phytohormone AIA, connue pour son rôle non négligeable dans la stimulation de la croissance des plantes (Ahmad *et al.*, 2005). L'ensemble des souches produisent également des sidérophores et solubilisent le phosphate tricalcique  $[Ca_3(PO_4)_2]$ , deux paramètres importants dans l'amélioration du rendement des cultures agricoles (Jacques *et al.*, 1993 ; Ramos Solano *et al.*, 2008 ; Keneni *et al.*, 2010). La souche SEB9 semble avoir une activité antifongique sur une large gamme de champignons considérés comme phytopathogènes, y compris *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* et d'autres. Sur la base de ces résultats obtenus, les quatre sont sélectionnées pour être utilisées comme biofertilisants promouvant la croissance des plantes et substituant les fertilisants chimiques.

## 1. Vérification de la pureté des souches

Il est à noter que les quatre souches ont été isolées pour la première fois sur le milieu Jensen, elles sont donc considérées comme des bactéries Diazotrophes (fixatrices d'azote). Repiquées sur le milieu LB, les colonies des quatre souches sont de formes arrondies, légèrement bombées et de couleurs variables (BEA4 : orange, BEC9 : jaunâtre, BOA4 : blanchâtre, SEB9 : transparente). Contrairement à ça, les colonies perdent leurs formes et leurs couleurs une fois repiquées sur le milieu N-free Jensen. Elles deviennent de couleur blanchâtre, plus muqueuses et poussent en nappes en prolongeant la durée d'incubation. Il semble que ce changement de formes est lié à la production d'une quantité considérablement accrue d'exopolysaccharides servant à la protection de la nitrogénase (enzyme assurant la fixation d'azote). Ces exopolysaccharides protègent également les bactéries de la dessiccation par modification de leurs microenvironnements en se liant aux cations sodium ( $Na^+$ ). Ces derniers sont le plus souvent impliqués dans les cas de stress hydrique (Roberson et Firestone, 1992 ; Becker, 1998).



**Figure 6:** Aspect, sur milieu LB, des quatre souches (A : *P. putida* BEC9 ; B : *F. johnsoniae* BEA4; C: *A. xylosoxidans* BOA4 ; D : *A. chroococcum* SEB9).

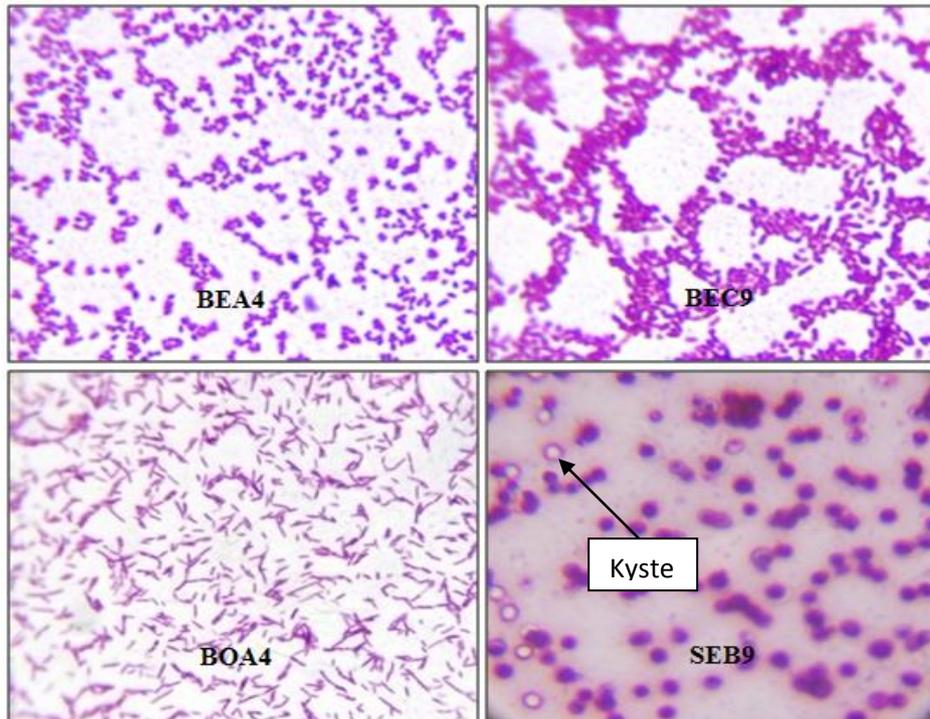
**Figure 7:** Aspect, sur milieu Jensen, des quatre souches (A: *P. putida* BEC9 ; B : *F. johnsoniae* BEA4; C : *A. xylosoxidans* BOA4 ; D: *A. chroococcum* SEB9).

**Tableau (V) :** Caractères morpho-physicochimiques des quatre souches sur milieu LB.

	BEA4	BEC9	BOA4	SEB9
Aspect	Arrondies Aplaties Oranges- dorées	Bombé Légèrement verdâtre	Blanchâtre Bombé Aspect régulier	Blanchâtre muqueuse diffuse
Enkystement	-			+
Forme	Bacilles			Pléomorphes
Mobilité				+
Gram				-
Catalase				+
Oxydase				+

Les critères d'identification étudiés pour les quatre souches coïncident avec les données de la littérature. Ainsi, les souches *F. johnsoniae*, *P. putida*, *A. xylosoxidans* sont caractérisées par une forme bacillaire de taille qui varie d'une espèce à l'autre (McBride, 2004 ; Brenner *et al.*, 1923). Les cellules de la souche *A. chroococcum* prennent de

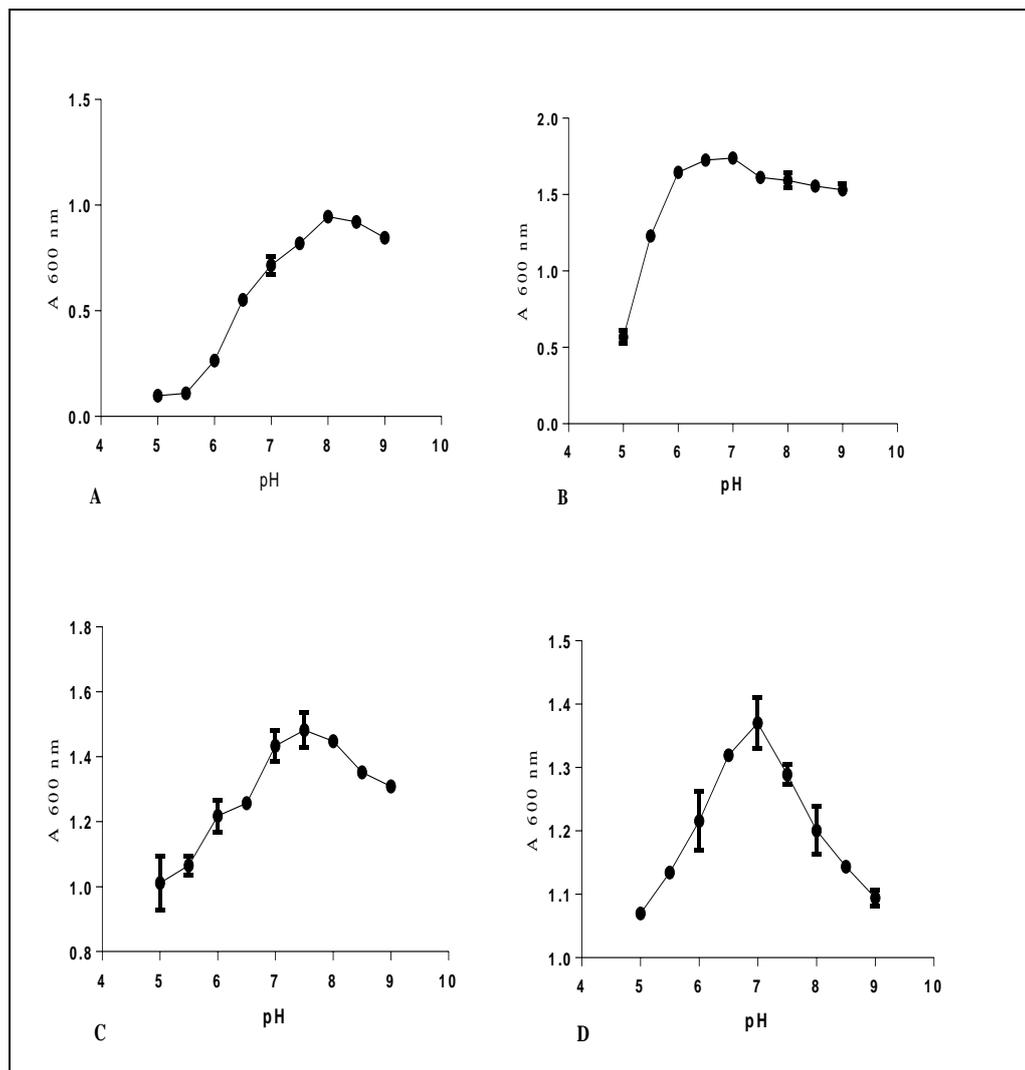
multiples formes sur la même lame (pléomorphe) avec présence de kystes (fig 8) (Winogradsky, 1938 ; Dhanashekar, 2003 ; Kisten ,2006 ; Becking, 2006). Les espèces appartenant aux genres *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Azotobacter* sont des bactéries Gram négative (Duggan *et al.*, 1996 ; Manfredi *et al.*, 2000 ; Brener *et al.*, 1923). Aussi, les quatre souches *F. johnsoniae*, *P. putida*, *A. xylosoxidans* et *A. chroococcum* se sont révélées mobiles, avec une réaction positive à l'oxydase et au catalase (Tchan, 1984 ; Duggan *et al.*, 1996 ; McBride, 2004 ; Henry, 2011).



**Figure 8:** Aspect des souches après Coloration de Gram, des (A : *F. johnsoniae* BEA4; B : *P. putida* BEC9; C: *A. xylosoxidans* BOA4 ; D : *A. chroococcum* SEB9).

## 2. détermination du pH optimum

Ce test a été réalisé dans le but de minimiser, voir éliminer, l'effet du pH et son interaction avec celui de la salinité lors de l'étude de l'halotolérance des souches (l'un des objectifs principaux de ce travail).



**Figure 9:** Détermination du pH optimum de la croissance des quatre souches **A** : *F. johnsoniae* BEA4; **B** : *P. putida* BEC9 ; **C** : *A. xylooxidans* BOA4 ; **D** : *A. chroococcum* SEB9 (test réalisé en duplicata).

La souche BEA4, présente une meilleure croissance dans un pH légèrement alcalin 8,00. En deçà et au-delà, on observe une diminution de la croissance. La souche BEC9 est moins sensible aux variations de pH par rapport aux autres souches, elle croit le mieux à un pH situé entre 6,5 et 7. Une meilleure croissance a été observée avec la souche BOA4 à un pH de 7,5. Après cette valeur la croissance bactérienne diminue. Un pH neutre (7,00) favorise le mieux la croissance de la souche SEB9. Il est à noter que cette dernière est la plus sensible aux variations du pH.

La croissance des souches étudiées est meilleure sur une gamme de pH qui varie de 6,5 à 8 avec un optimum de pH au allant tourde 7,00. (Goodfellow et Williams, 1983) ont montrées que la plupart des bactéries du sol préfèrent les sols neutres et légèrement

alcalins ce qui est en corrélation avec nos résultats ainsi que les résultats obtenus lors de l'étude des propriétés physicochimiques des échantillons du sol à partir desquels les souches ont été isolées (Tableau VI).

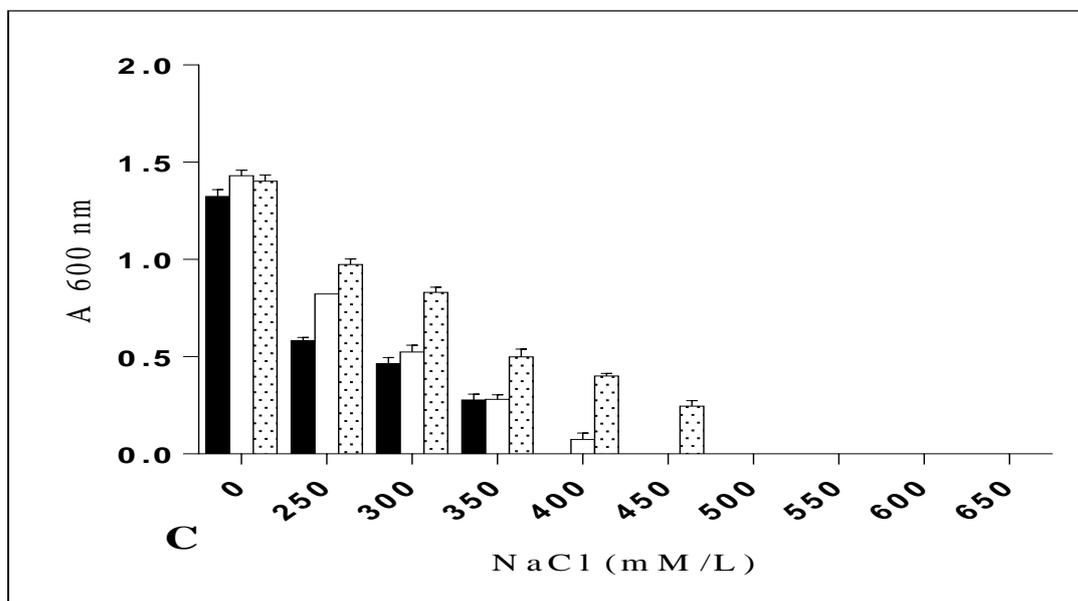
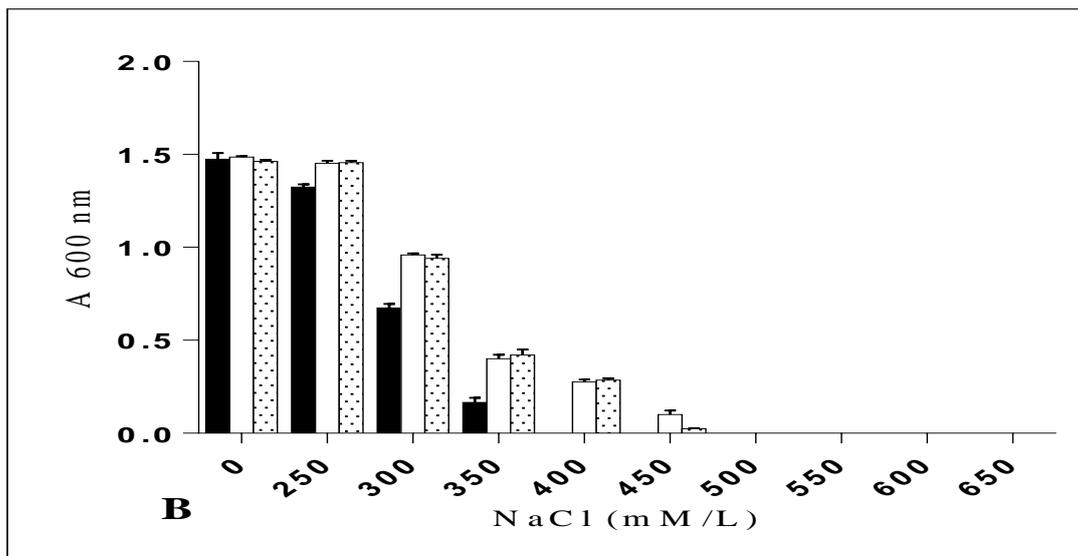
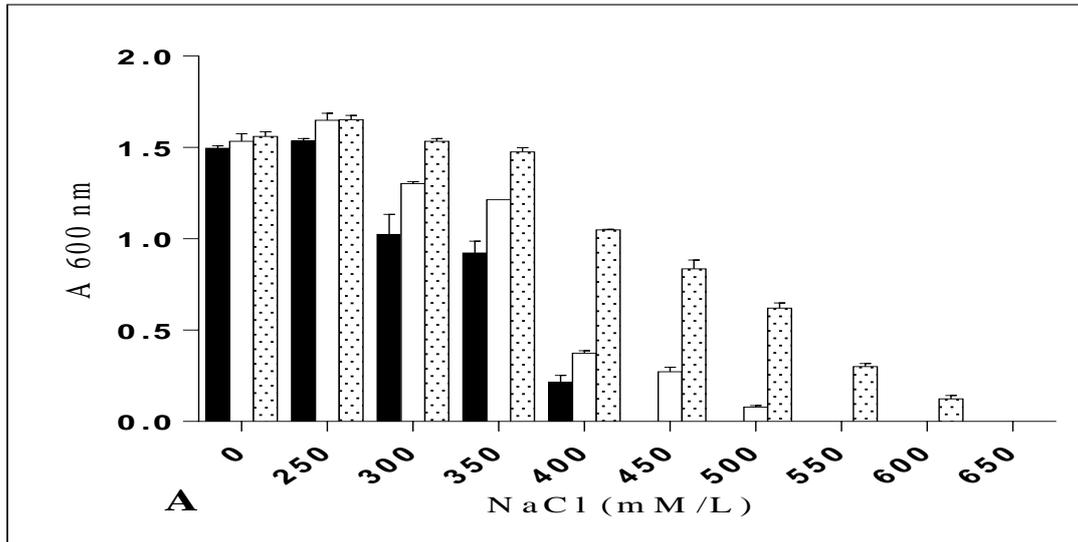
**Tableau (VI) :** La comparaison entre les pH optimums de croissance et les pH des échantillons des sols d'isolement.

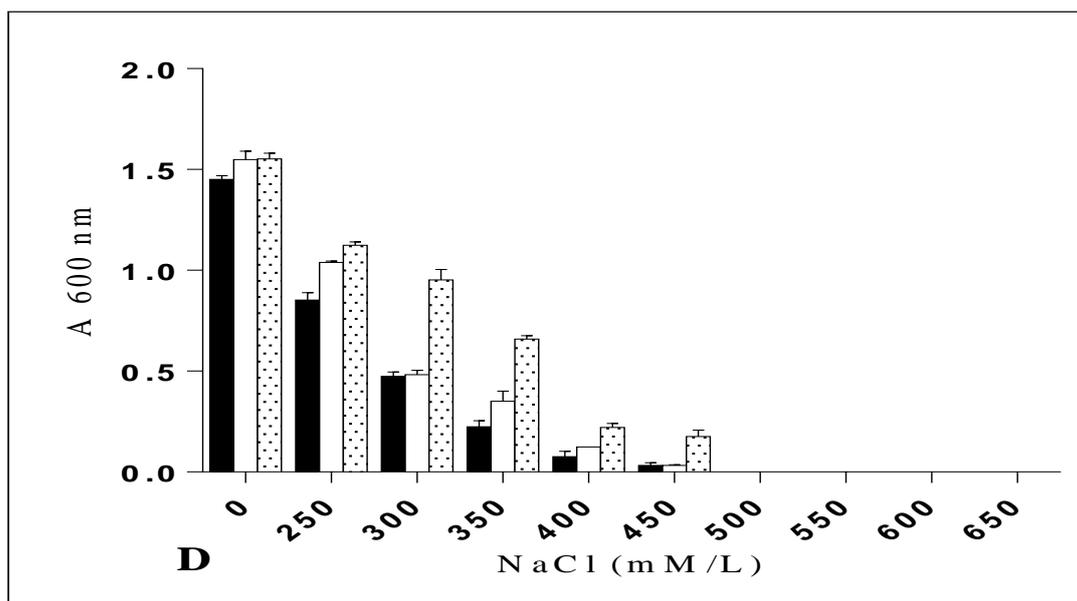
Nom de l'échantillon	Nom de la souche	pH de l'échantillon	pH optimum de croissance
BEA	BEA4	7.16	8
BEC	BEC9	7.29	7
BOA	BOA4	7.60	7.5
SEB	SEB9	7.41	7

Les souches *F. johnsoniae* (BEA4), *P. putida* (BEC9) et *A. xylosoxidans* (BOA4) peuvent croître sur une large gamme de pH allant de 6,5 à 9. Ces mêmes valeurs ont été constatées chez les mêmes espèces ou des espèces voisines dans plusieurs travaux (McMahon *et al.*, 2007 ; CHÁVEZ-PARGA *et al.*, 2012 ; Belal et El-Nady, 2013 ; SREEDEVI *et al.*, 2013). Par contre, la souche *A. chroococcum* (SEB9) est sensible aux variations du pH. Sa croissance maximale est enregistrée à un pH de 7 et diminue rapidement au-delà et en deçà de cette valeur. D'après notre étude la souche *Azotobacter chroococcum* (SEB9) croît sur une gamme de pH très étroite ce qui est confirmé avec des souches de cette même espèce dans des travaux réalisés par (Lees et Postgate, 1973 ; Hine et Lees, 1976 ; Pozo *et al.*, 2002 ; Kisten *et al.*, 2006) qui ont prouvé que le PH des milieux de culture destinés à des souches d'*A. Chroococcum* doit être situés entre 7 et 7,5.

### 3. Etudes de l'halotolérance des souches

La croissance, exprimée en DO, des quatre souches sur le milieu minimum (N-Fb) en présence de différentes concentrations en NaCl (0, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650mM), de la GB [1mM] ou de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* (1%) est exprimée dans les figures 10.





■ Témoïn    □ Glycine bétaine    □ *Ulva lactuca*

**Figure. 10:** croissance maximale obtenue sur le milieu N-Fb sous différentes concentrations en NaCl. Test réalisé en présence de glycine bétaine [1 mM/L] et de l'extrait hydro-alcoolique d'*U. lactuca* [1%]. **A :** *F. johnsoniae* BEA4; **B:** *P. putida* BEC9; **C :** *A. xylooxidans* BOA4; **D :** *A. chroococcum* SEB9 (test réalisé en duplicata, un témoin en absence d'osmoprotecteur et réalisé).

En absence d'osmoprotecteurs, la souche *F. johnsoniae*-BEA4 tolère jusqu'à 400 mM de NaCl avec un optimum de croissance à 250 mM. A partir de cette concentration, sa croissance diminue graduellement. A 450 mM aucune croissance n'a été enregistrée. L'addition de la glycine bétaine au milieu a amélioré la croissance par rapport au témoin et permet à la bactérie de croître jusqu'à 500 mM de sel, La croissance bactérienne est restaurée en présence d'extraits hydro-alcooliques d'algue à 600 mM. Aucune croissance n'a été enregistrée à 650 mM de sel (figure 10 ; A).

La souche *P. putida*-BEC9 est capable de croître jusqu'à 350 mM. Au-delà de cette concentration sa croissance diminue. L'ajout des deux osmoprotecteurs GB et L'extrait hydro-alcoolique de *Ulva lactuca* ont permis la restauration de sa croissance jusqu'à 450 mM, notant que la GB est bien meilleur que (UL) à cette concentration en sel. A la concentration 500 mM, aucune croissance n'a été notée (figure 10 ; B).

Concernant la souche *A. xylooxidans*-BOA4 est, elle tolère jusqu'à 350 mM. La GB et l'extrait d'algue ont amélioré sa croissance dans les concentrations (250, 300, 350 et 400) mM. Mais l'action stimulatrice exercée par *Ulva lactuca* a été plus remarquable. A

(450mM) l'extrait de UL a permis sa restauration. Au-delà de cette concentration la croissance est inhibée même en présence des deux osmoprotecteurs (figure 10 ; C).

La souche *A. chroococcum*-SEB9 conserve une bonne capacité de croissance jusqu'à 450mM/NaCl. Une amélioration de sa croissance est observée en présence de la GB et d'extrait de *Ulva lactuca* dans les concentrations (0, 250, 300, 350, 400 et 450). L'effet de l'extrait a été meilleur que celui de la GB. Au-delà de 450 mM de sel, aucune croissance n'a été constatée (figure 10 ; D).

#### ➤ Analyse statistique :

Pour mettre en évidence la significativité des résultats de la croissance des souches obtenus, avec ou sans osmoprotecteurs, le test t de Student pour la comparaison entre deux échantillons appariés a été utilisé.

$$t = \frac{\left(\frac{1}{n}\right) |\sum_i d_i|}{\sqrt{SCE/n(n-1)}}$$

n: nombre de mesure pour chaque série.

d : La variation du paramètre entre les deux mesures.

SCE : La somme des carrés des écarts  $SCE = \sum (d - d_{moy})^2$ .

Cette valeur t calculée est à comparer avec celle de la table de Student : (ddl = n-1=9 ; le risque  $\alpha = 5\%$ ). La différence est significative entre les deux séries de valeur si la valeur t calculée est supérieure à celle de la table (pour les autres calculs, voir annexe 1).

Le coût relativement élevé des osmoprotecteurs synthétiques tel que la glycine bêtaïne constitue un obstacle majeur empêchant leur utilisation dans la formulation des engrais pour maintenir le bon rendement agricole et la stabilité des populations microbiennes sur des sols affectés par un stress salin. Cet obstacle oblige les chercheurs à penser à une valorisation de certaines ressources naturelles susceptibles de fournir une source d'osmoprotection, mais aussi, d'enrichissement de ce type de sol.

Selon (Larsen *et al.*, 1987 et Kushner, 1993), les bactéries résistant à une concentration située entre (200-1200 Mm) sont considérées comme étant des halophiles faibles. L'étude de l'effet de la salinité sur les quatre souches a fait ressortir une osmotolérance comprise dans les limites de l'intervalle précédemment cité. Cela signifie que les souches étudiées sont modérément halotolérantes, à l'exception de la souche BEA4 considérée comme faiblement halophile optimum de croissance à 250 mM. Cependant,

leur croissance est considérablement améliorée par l'ajout d'osmoprotecteurs naturels ou synthétiques.

Les rhizobactéries halotolérantes peuvent développer des mécanismes moléculaires intrinsèques pour survivre et croître en vertu de l'augmentation de la salinité (Tripathi *et al.*, 2002). Les bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* et *Achromobacter*. Sont parmi les PGPR les plus dominantes dans les sols salins (Ahmad *et al.*, 2005 ; Sreedevi *et al.*, 2013).

L'amélioration et la restauration de la croissance des quatre souches par l'apport de la Glycine bêtaïne et de l'extrait hydro-alcoolique est remarquable. L'osmoprotection par la Glycine bêtaïne est meilleure avec la souche *P. putida*. (Le Rudulier *et al.*, 1983 ; Hartmann *et al.*, 1991 ; D'Souza-Ault *et al.*, 1993 ; Ghoul *et al.*, 1995 ; Nabti *et al.*, 2007) ont prouvé que la glycine bêtaïne est un osmoprotecteur très efficace chez cette espèce ainsi que d'autres espèces appartenant aux genres *Rhizobium*, *Azospirillum* et *E. coli*. Outre son rôle dans l'osmoprotection, la GB pourrait également améliorer la croissance des souches de *Pseudomonas* à faible osmolarité, en servant comme source de carbone et d'azote (Diab *et al.*, 2006).

L'extrait hydro-alcooliques de l'algue marine *Ulva lactuca* (UL) apporte une meilleure osmoprotection par rapport à la glycine bêtaïne (GB) chez les souches *F. johnsoniae*, *A. xyloxydans* et *A. chroococcum*. (Ghoul *et al.*, 1995) ont étudié la composition de l'extrait de l'algue marine *Ulva lactuca* en molécules impliquées directement ou indirectement dans l'osmoprotection (l'apport d'azote aminé, de composés-onium et de protéines). Les résultats obtenus ont montré que cet extrait est riche en acides aminés, en bêtaïnes, en sulfoniums tertiaires y compris le Diméthylsulphoniopropionate (DMSP) et en protéines.

L'augmentation de la teneur intracellulaire en acides aminés en fonction du stress osmotique a été constatée chez plusieurs espèces bactériennes (Britten et McClure, 1962 ; Brown et Stanley, 1972 ; Tempes et Coll., 1970 ; Makenmson et Hastings, 1979 ; Hua et Coll., 1982) . Parmi ces acides aminés les plus étudiés la proline, le tréhalose et les bêtaïnes sont dominants chez une grande variété de plantes, de bactéries halophiles et d'algues marines (Hanson et Scott, 1980 ; Robinson et Jones, 1986 ; Ghoul, 1995 ; McNeil *et al.*, 1999 ; Ashraf et Foolad, 2007).

Le dimethylsulfoniopropionate (DMSP) est répandu dans les milieux marins (Da Costa *et al.*, 1998). Il est accumulé spécifiquement comme osmoprotecteur lors d'une carence en azote dans le milieu (Ghoul, 1990; Ciula *et al.*, 1997). Et Il est généralement admis qu'un osmoprotecteur doit être accumulé durablement dans la cellule pour être efficace en allégeant le stress salin (Csonka et Hanson, 1991). Le DMSP fonctionne comme un osmoprotecteur exogène chez de nombreuses espèces bactériennes dont *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella thyphimurium*, *Sinorhizobium meliloti*, *Azospirillum brasilense* (Ghoul *et al.*, 1990; Galinski, 1995 ; Pichereau *et al.*, 1998 ; Nabti *et al.*, 2007).

#### 4. Résultats de la germination

Les résultats discutés ci-dessous sont obtenus après 12 jours d'incubation des graines à température ambiante du laboratoire et à l'obscurité. Le pourcentage final de germination est déterminé sur trois répétitions et à partir d'un total de 12 graines par répétition.

$$P_i = (N_i \times 100) / 12.$$

$P_i$  : pourcentage final de germination dans chaque boîte.

$N_i$  : nombre de graine germé dans la même boîte.

Le pourcentage final de germination ( $P_f$ ) de chaque essai est donc :

$$P_f = \sum P_i / 3.$$

##### 4.1. Effet de la salinité sur la germination de blé dur

Selon les résultats obtenus, La salinité a un effet significativement important sur la germination des graines de blé dur. Cela se manifeste par la diminution graduelle de taux de germination avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu par rapport au témoin. En absence de sel dans le milieu, le taux de germination a été de 80,56%. À la plus forte concentration en NaCl, 300mM, le taux de germination est fortement réduit atteignant 2,75%. Concernant les concentrations (100 et 200) mM, les pourcentages ont été de 36,1% et 30,53 respectivement.

##### 4.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination de blé

En absence de la NaCl dans le milieu, l'inoculation des graines de blé par les souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 a légèrement réduit taux de germination (différence statistiquement non significative). À titre d'exemple, la souche BOA4 a réduit le taux de germination de 80,56% à 63,9%.

En présence des différentes concentrations en NaCl, l'inoculation des graines avec les souches a amélioré significativement le taux germination en comparaison avec le

témoin. À 100 et 200 mM, le taux de germination observé en présence de la souche *Azotobacter chroococcum* (SEB9) a été meilleur que celui observé en présence des autres souches. À 300 mM, l'amélioration du taux de germination a été hautement significative pour la souche *Achromobacter xylosoxidans* (BOA4), sachant que le taux de germination de 2,75% a été amélioré jusqu'à 50%.

#### **4.3. Effets de la GB et d'UL sur la germination des graines de blé**

En absence de stress salin, l'addition de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* dans le milieu n'a pas d'effet sur le taux de germination, contrairement à la glycine bêtaïne qui a légèrement réduit le taux de germination. Sous stress salin, l'ajout de l'osmoprotecteur GB ou de l'extrait d'*Ulva lactuca* a amélioré significativement le taux de germination. En absence de la GB et de l'extrait d'*Ulva lactuca*, le taux de germination a été de (36,1 ; 30,53 et 2,75)% pour les concentrations (100, 200 et 300) mM respectivement. Cependant l'ajout des deux osmoprotecteurs séparément dans le milieu a permis d'améliorer significativement le taux de germination par rapport au témoin. À 100 et 200 mM, l'extrait de l'algue et la GB ont, statistiquement, le même effet sur le taux de germination (63,9 et 47,23% respectivement). Pour la concentration 300 mM l'effet de l'extrait a été bien meilleur que celui de la GB (30,23 et 22,23%).

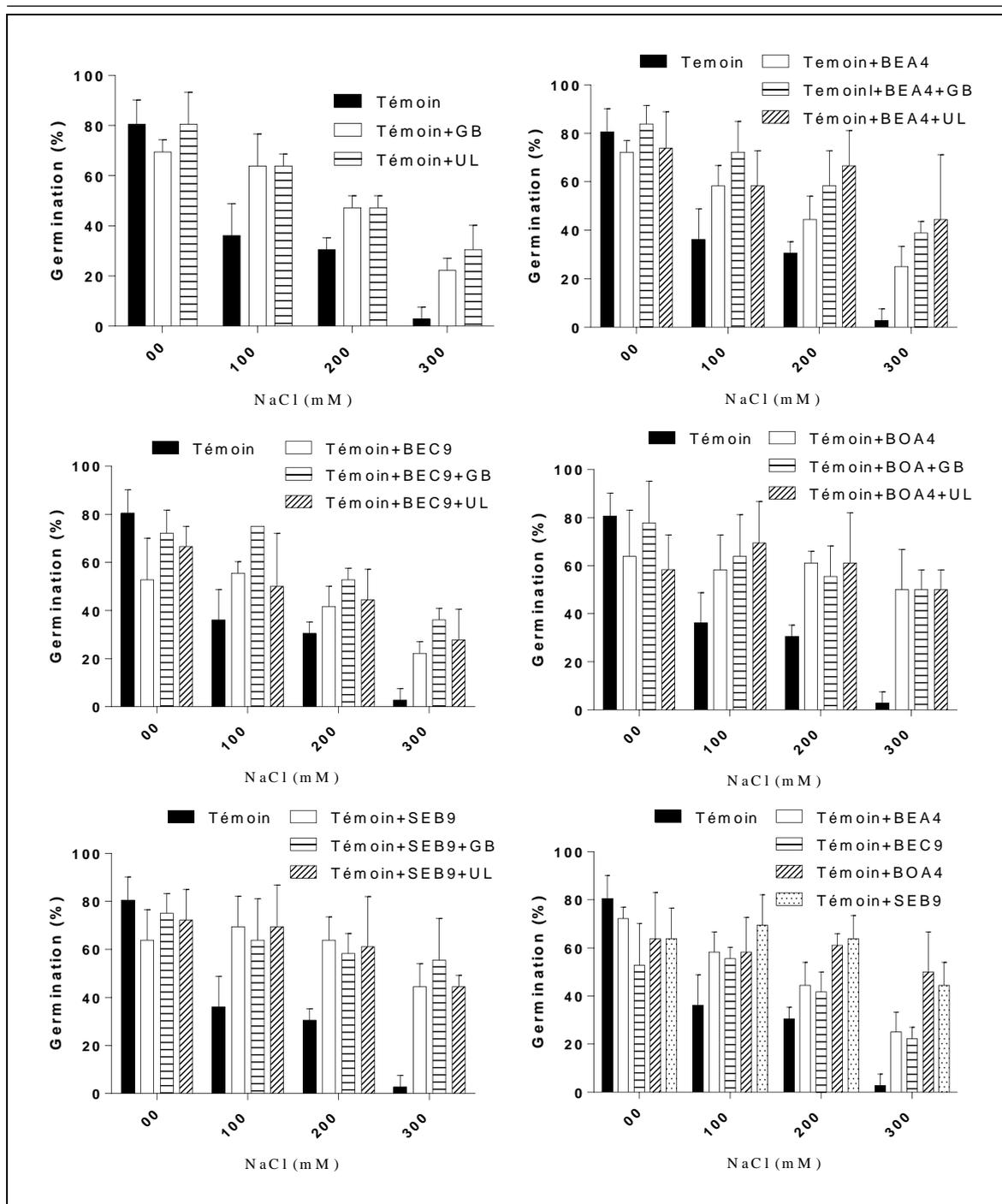
#### **4.4. Effet des souches, de GB et d'UL sur la germination de blé**

En absence de sel (0 mM), l'inoculation des graines avec BEA4 en présence de la GB a amélioré le taux de germination. Mais l'ajout de l'extrait n'a donné aucun effet. En revanche, l'inoculation des graines avec les autres souches en présence de la GB ou de l'extrait n'a aucun effet sur le taux de germination.

Sous stress salin, l'addition de la GB ou de l'extrait d'*U. lactuca* aux graines inoculées a amélioré significativement le taux de germination par rapport au témoin. Pour la souche BEA4, à 100 mM, l'osmoprotection fournie par la GB est meilleure que celle d'*U. lactuca*. Cependant, avec les concentrations (200 et 300) mM, l'extrait a mieux amélioré le pourcentage final de germination. La GB est un osmoprotecteur efficace pour la souche BEC9, ce dernier était non significativement plus efficace que l'extrait de l'algue.

Concernant les graines inoculées avec les souches BOA4 et SEB9, l'addition de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* dans le milieu à concentrations 100 et 200

mM a amélioré le pourcentage de germination mieux que l'ajout de la GB. À 300 mM, les deux osmoprotecteurs ont donné le même effet pour BOA4. Pour la souche SEB9, la GB a amélioré le taux de germination mieux que l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca*.



**Figure 11 :** Pourcentage finale de germination des graines en présence de l'NaCl (100, 200, 300) et en présence de Glycine bétaïne(GB) [1mM] et d'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* (UL) [1%]. Les graines sont inoculées, ou non, avec les souches *F. Johnsoniae* (BEA4), *P putida* (BEC9), *A. xylooxidans* (BOA4) et *A. chroococcum* (SEB9). Des témoins en absence de sel sont présentés. Les bars constituent l'écart type ( $\pm$ ET).

L'excès en NaCl dans le milieu réduit la disponibilité de l'eau chez la plante aboutissant à une déshydratation du cytoplasme qui affecte le métabolisme des cellules et la fonction des macromolécules et par conséquent, la croissance des plantes (Le Rudulier, 2005; Taffouo *et al.*, 2009).

Les PGPR sont capables d'exercer un effet bénéfique sur la croissance de la plante par augmentation du taux cumulé de la germination (Glick *et al.*, 1998). L'utilisation de ces derniers comme inoculant des graines de blé dans les sols touchés par la salinité améliore la hauteur des plantes, la longueur des racines et le rendement des graines.

Les souches bactériennes étudiées dans le cadre de ce travail semblent avoir un effet bénéfique sur la germination des graines de blé. De ce point de vu, elles peuvent être considérées comme PGPR. Leur capacité à produire certains métabolites tel que l'acide indole-3-acétique (AIA), une phytohormone jouant un rôle important dans promotion de la germination des graines, peut être à l'origine de ce pouvoir (Whipps, 1990 ; Fallik *et al.*, 1994 ; Ahmad *et al.*, 2005).

Les quatre souches peuvent aussi solubiliser les formes insolubles de phosphate inorganique assurant l'alimentation minérale de la plante en phosphate (Kucey *et al.*, 1989 ; Pradhan et Sukla, 2005 ; Sharma *et al.*, 2007). Elles peuvent également produire des sidérophores améliorant l'alimentation des graines en fer. Leur croissance dans le milieu améliore la disponibilité des métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels que le Zinc et le Plomb (Dimkpa *et al.*, 2009).

(Ahmad *et al.*, 2008) ont prouvé que l'expression bactérienne des métabolites influençant la croissance des plantes tel que l'IAA, les sidérophores et les phosphatases est influencé par la salinité ce qui influence par conséquent la croissance de la plante.

Sur la base des résultats obtenus avec les tests de germination, les souches BEA4, BEC9, BOA4 et SEB9 améliorent la germination des graines de blé dur à salinité élevée. Ces résultats ont été confirmés par de nombreux travaux : *Azotobacter* (Elshanshoury, 1995 ; Pati *et al.*, 1995; Jarak *et al.*, 1977 ; Shaukat *et al.*, 2006), *Azotobacter chroococcum* (Jarak *et al.*, 2006), *Pseudomonas* (Zaidi, 2003), *Pseudomonas putida* (Kaymak *et al.*, 2009), *Flavobacterium sp* (Rathi *et al.*, 2014) et *Achromobacter xylosoxidans* (Tam et Diep, 2014). Sont des exemples pertinents dans l'amélioration de la germination et la croissance végétale du blé, de maïs et d'orge. L'inoculation des graines de blé dur par

*Azotobacter chroococcum* augmente significativement les paramètres de croissance (hauteur de la plante, longueur des racines et poids frais et secs racinaires et foliaires) sous stress salin. Ces résultats sont rapportés par de nombreux auteurs qui ont trouvé que l'inoculation des graines par une souche appartenant au genre *Azotobacter* augmente le pourcentage de germination de graines de blé d'environ 58,6 % (Krieg et Holt, 1984 ; El-Shansboury, 1995; Nadeem *et al.*, 2006. Shaukat *et al.*, 2006).

Selon Borojevic *et al.*, (1980), l'application de la GB améliore la croissance et le rendement du blé sous stress salin. Il a un effet bénéfique sur la germination des graines et la croissance des plantes sous stress salin. Cette osmoprotecteur participe au maintien de la pression de turgescence en augmentant le volume cellulaire et stabilise la structure et la fonction des protéines en améliorant son état d'hydratation (D'Souza-Ault *et al.*, 1999).

Selon Nelson (2004), il est bien évident que le rendement des céréales dépend de la fertilité du sol et sa richesse en Potassium (P), en azote (N) et en matière organique. Des études ont montrés que l'extrait d'*U. Lactuca* favorise la croissance des graines de blé et que sa décomposition améliore la fertilité des sols pauvre par l'apport d'éléments nutritifs tels que le P le N et la matière organique (Alvey *et al.*, 2003 ; Nedzarek et Suszczewski, 2004).

Selon les travaux de (Ghoul *et al.*, 1995 ; Summers *et al.*, 1988 ; Ibrahim *et al.*, 2014), la capacité de l'extrait d'*Ulva lactuca* à améliorer le taux de germination des graines sous stress salin revient à sa composition en divers bétaines, en DMSP et en acides aminés tels que la proline et la choline.

“A”

- **Ahmad F, Ahmad I et Khan MS. (2005).** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, 29: 29-34.
- **Ahmed OH, Aminuddin H et Husni MHA. (2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agric. Scand.*, 58: 182-186.
- **Alderhaug WMO, Litw ACK et Epstein W. (1989).** Wide distribution of homologs of Escherichia gill Kdp K<sup>+</sup>-ATPase among Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **171**: 1192-1195.
- **Alvey S, Yang CH, Buerkert A et Crowley DE. (2003).** Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils. *Biol. Fertil. Soil* 37:73-8.
- **Arshad NA, Ahsan AK, Anizan Ik, Azhar M, Febri D, Wan Mohtar W Y & Che RB MZ. (2014).** Salinity stress in plant and An important Antioxidant enzyme. *Life Sci* 11 (10) : pp. (913-920).
- **Ashraf M, Hasnain S, Berge O et Mahmood T. (2004).** Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol. Fertil. Soils*, **40**: 157-162.
- **Ashraf MY et Foolad MR. (2007).** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59:206-216.
- **Ashraf M, MSA Ahmad, Öztürk M et Aksoy, A (2012).** Crop Improvement Through Different Means: Challenges and Prospects In Crop Production for Agricultural Improvement. © Springer Science+Business Media B.V. pp .2-14.
- **Aquilanti L, Favilli F, Clemeti F. (2004).** Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil. Biol. Biochem.* 36: 1475–1483.
- **Ayala-Astorga GI et Alcaraz-Meléndez L. (2010).** Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann & Hemsley) grown in vitro. *Electron. J. Biotechnol.* **13** : 1-15.

“B”

- **Basavaraju O, Rao ARM et Shankarappa TH. (2002).** Effect of Azotobacter inoculation and nitrogen levels on growth and yield of radish (*Raphanussativus* L). In: Rajak DC, Jabalpur (Eds.), Proceedings of Microbial Technology for Sustainable Development and Productivity. Biotechnology of Microbes and Sustainable Utilization. pp. 155-160.
- **Baumgartner M. et Emonet E., (2007).** Les graines germées. Haute école de santé Genève .Filière Diététique.
- **Becker A et Pühler A. (1998).** Production of Polysaccharides. In: Spaink, HPA, Kondorosi, and PJJ Hooykaas. (Eds.), The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, pp. 97-118.
- **Becking J.(2006).** The family *Azotobacteraceae*. Prokaryotes. 6: 759-783.
- **Belal, B. Elsayed et Mohamed F. El-Nady. (2013).** Bioremediation of pendimethalin-contaminated soil. African Journal of Microbiology Research. Vol. 7(21), pp. 2574-2588.
- **Bell-Perkins LJ et Lynch JM. (2002).** Rhizosphere microbiology In G. Bitton (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology. A Wiley-Interscience Publication, Canada. pp. 2713-2728.
- **Benkheira A. (2009).** L'arganeraie Algériennes. Bulletin d'information Conservation de la Biodiversité et Gestion Durable des Ressources Naturelles, **9** :1-16.
- **Benmahioul B, Daguin F et Kaid-Harche M. (2009).** Effet du stress salin sur la germination et la croissance *in vitro* du pistachier (*Pistaciavera*L.). *C. R. Biologies*, **332** :164- 170.
- **Bernard T, Jebbar M, Rassouli Y, Himdi-Kebbab S, Hamelin JH et Blanco C. (1993).** Ectoïne accumulation and osmotic regulation *Brevibacterium lines*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 129-136.
- **Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, et Cleyet-Marel JC. (2000).** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.*, **46**:229- 36.
- **Bleecker AB et Kende H. (2000).** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 1-18.

- **Borojevic S, Cupina T et Krsmanovic M. (1980).** Green area parameters in relation to grain yield of different wheat genotypes. *Z. Pflanzenzuech.*, 84: 265-283.
- **Boulghalagh J, Berrichi A, EL Halouani H et Boukroute A. (2006).** Effet des stress salin et hydrique sur la germination des graines du jojoba (*Simmondsiachinensis* [link] schneider). Recueil des résumés. Le Premier Congrès National sur l'Amélioration de Production Agricole, Settat, Maroc ;,24p.
- **Bonkowski M, Villenave C et Griffiths B. (2009).** Rhizosphère fauna: The functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant Soil.* **32**:213-233.
- **Bremer E. et Krämer R. (2000).** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In G. S torz and R. Henge-Arois (eds.), *Bacterial stress responses*. ASM Press; Washington. pp. 79-97.
- **Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT et Garrity GM. (1923).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2B New York: Springer.
- **Brimecombe MJ, De Leij FA et Lynch JM. (2007).** Rhizodeposition and microbial population, *In* R. Pinto, Z. Varanini, P. Nannipierei(eds.), *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press. New York. pp. 74-98.
- **Britten RJT et McClure FT. (1962).** The amino acid pool in *E.coli*. *Bacteriol. Rev.* 26 : 292-335.
- **Brouillet L, F. Coursol, M. Favreau. (2006).** *VASCAN. The database of Canadian vascular plants*. Herbar Marie-Victorin, Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal.
- **Brown AD et Simpson JR. (1972).** Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 589-591.
- **Brown CM et Stanley SO.(1972).** Environment-mediated changes in the cellular content of the "pool" constituents and their associated changes in cell physiology. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22: 363-389.
- **Buée M, De Boer W, Martin F, Van Overbeek L. and Jurkevitch. (2009).** The rhizosphere zoo: An overview of plant associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and some of their structuring factors. *Plant Soil.* **321**: 189-212.
- **Burdman SEJ et Okon Y. (2000).** Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, *In*: N. S. Subba Rao and Y. R.

Dommergues, (eds.), Microbial Interactions in Agriculture and Forestry. Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.

“C”

- **Cakmakci R, Donmez F, Aydin A et Sahin F. (2006).** Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38(6):1482-1487.
- **Carrim AJI, Barbosa EC et Gonçalves VJD. (2006).** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Archives of Biology and Technology.* 49, 353-359.
- **Chambers ST, Kunin CM, Miller D et Hamada A. (1987).** Dimethylthein can substitute for glycine betaine as an osmoprotectant molecule for *E. coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4845- 4847.
- **Chaux C et Foury C. (1994).** Metrise des facteurs de production, qualité et traitement des semences, mise en culture par semis en place in production légumière. Tome1- Généralité. Tec et Doc .Lavoisier **277**: 431-455.
- **Chávez-Parga Ma Del Carmen, Munguía-Franco Alejandro, Aguilar-Torres Mayanin et Escamilla-Silva Eleazar M. (2012).** Optimization of Zeaxanthin Production by Immobilized *Flavobacterium* sp. Cells in Fluidized Bed Bioreactor. *Advances in Microbiology.* 2: 598-604.
- **Christian, JHB et Waltho J. (1961).** The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *J. Gen. Microbiol.* **25**: 97-102.
- **Ciula R A, Diaz MR, Taylor BF et Roberts MF. (1997).** Organic osmolytes in aerobic bacteria from Manolake, an alkaline moderately hypersaline environment. *App. Environ. Microbiol.* 63: 220-226.
- **Cosquer A, Pichereau V, Pocard JA, Minet J et Bernard T. (1999).** Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3304- 3311.
- **Csonka LN. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121-147.
- **Csonka LN et Hanson AD. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:569-606.

- **Curatti L, Folco E, Desplats P, Abratti G, Limones V, Herrera-Estrella L et Salerno G. (1998).** Sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of the *spsA* gene and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 6776–6779.

“D”

- **Da Costa MS, Santos H et Galinski EA. (1998).** On overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and *Archeae*. In: G. Antranikian (ed.), *biotechnology of extremophiles*. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 118-153.
- **Denis F et Ploy MC. (2007).** *Bactériologie médicale: techniques usuelles* Elsevier Masson, 573 p.
- **Dhanashekar, Viruthagiri T, Sabarathinam PL. (2003).** *Biochemical Engineering Journal*.16:1-8.
- **Diab F, Bernard T, Bazire A, Haras, Blanco C et Jebbar M. (2006).** Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology*.152: 1395-1406.
- **Dimkpa C, Tanjaweinad T et Asch F. (2009).** Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* pp 1-13.
- **Dobbelaere S, Vanderleyden J et Okon Y. (2003).** Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **22**(2):107-149.
- **D’Souza-Ault MR, Smith LT et Smith GM. (1993).** Roles of Nacetylglutaminyl-glutamine amide and glycine bêtaïnes in adaptation of *Pseudomonasaeruginosato* osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:473-478.
- **Duggan JM, Goldstein SJ, Chenoweth CE, Kauffman CA, Bradley SF (1996).** *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* **23**: 569-576.

“E”

- **El-shanshoury AR. (1995).** Interaction of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* and *Streptomyces mutabilis*, in relation to their effect on wheat development. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **175**: 119-127.

- **Esitken A, Karlidag H, Ercisli S et Sahin F. (2002).** Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu 142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum blight*) of apricot. *Gartenbauwissenschaft*. 67(4):139–142.

**“F”**

- **Fallik E, Sarig S et Okon Y. (1994).** Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: Okon Y. (ed.), *Azospirillum–Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton. P. 77–85.
- **Foolad MR, Hyman JR et Lin GY. (1999).** Relationships between cold- and salt-tolerance during seed germination in tomato: analysis of response and correlated response to selection. *Plant Breed*, 118: 49-52.
- **Fougere F, Le Rudulier D et JG Streeter. (1991).** Effects of salts on amino acid, organic acid, and carbohydrates composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*. 96:1228-1236.

**“G”**

- **Galinski EA. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol*. 37: 274-325.
- **Germida JJ, Siciliano SD, Freitas de R et Seib AM. (1998).** Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26:43–50.
- **Ghassemi F, AJ. Jakeman et HA Nix. (1995).** Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Center for resource and environmental studies, The Australian National University, Canberra, Australia. 125 p.
- **Ghoul M. (1990).** L’halotolérance de *E. coli*. Effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de Doctorat. Université de Rennes I. France, 167p.
- **Ghoul M, Minet J, Bernard T, Dupray E et Cornier M. (1995).** Marine macroalgae as a source for osmoprotection for *Escherichia coli*. *Microb. Ecol*. 30:171-181.
- **Glick BR, DM Penrose et J Li (1998).** A model for lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *J. Theor. Biol.*, 190: 63-68.
- **Glick RB, Cheng Z et Czarny J. (2007).** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol*. 119: 329-339.

- **Gotz MCM, Gomes N, Dratwinski A, Costa R, Berg G, Peixoto R, Mendoca - Hagler LM et Smalla K. (2006).** Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol.* **56** :207–218.
- **Gray EJ et Smith DL. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 395-412.
- **Guillaume P. (2010).** Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. *Thèse de doctorat en biochimie.* Université de la Rochelle France.

### “H”

- **Hanson AD et Scott NA. (1980).** Betaine synthesis from radioactive precursors in attached, water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* **66**:342-348.
- **Hartmann A, Prabhu SR et Galinski EA. (1991).** Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil* **137**:105-109.
- **Hartmann. (2007).** A halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilense* Strain from Algerian Soil restores Wheat Growth under Saline Conditions. *Eng. Life.Sci.* **7**:354-360.
- **Henry D, Speert D. (2011).** *Pseudomonas*. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington DC: ASM press. pp. 677 – 91.
- **Hine PW, Lees H (1976).** The growth of nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* in continuous culture under intense aeration. *Can. J. Microbiol.* **22**: 611-618.
- **Högberg P, Nordgren A, Buchmann N, Taylor AFS, Ekblad A, Hogberg MN, Nyberg G, Ottosson-Löfvenius M et Read DJ. (2001).** Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*, **411**: 789-792.
- **Hopkins WG. (2003).** *Physiologie végétale*. Traduction de la 2<sup>e</sup> édition américaine par SERGE R. Ed de Boeck. pp. 309-362.
- **Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH et Bohannan BJM. (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters.* **6**: 613-62.
- **Hortense. (2011).** Les applications et la toxicité des algues marines. *Thèse de doctorat en pharmacie*, Université de Limoges. France.

- **Hua SS, Tsai Y, Uchens GM et Noma AT. (1982).** Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. Strain WR 1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 441 : 135-140.

“I”

- **Ibrahim WM, Refaat M, Ali Khaulood A. Hemid et Makram A. Sayed. (2014).** Role of *Ulva lactuca* extract in alleviation of salinity stress on wheat seedlings. *Scientific World Journal.* 11p.

“J”

- **Jacques P, P Delfosse, M Ongena, P Lepoivre, P Cornélis, N Koedam, L Neirinckx, et P Thonart. (1993).** Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agric.* 2 : 301-307.
- **Jarak M, Protić R, Govedarica M, Milosevic N, Djuric N, (1997).** Microbiological activity in soil under wheat inoculated with diazotrophs. *A periodical of Scientific Research PKB INI Agro-economic, Belgrade, Yugoslavia,* 3, 1: 39-45.
- **Jarak Mirjana, Protić Rade, Janković Snezana et Jovan Čolo. (2006).** response of wheat to *Azotobacter* - actinomycetes inoculation and nitrogen fertilizers. *Romanian Agricultural Research.* pp. 38-42.

“K”

- **Kaymak HC, Guvenc I, Yarali F et Donmez MF. (2009).** The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanussativus* L.) seeds under saline conditions. *Turk J Agric Forest.* 33:173–179.
- **Khalid A, Arshad M et Zahir ZA. (2006).** Phytohormones: microbial production and applications. In: N. Uphoff , A.S. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga and J. Thies. Taylor & Francis/CRC (Eds.), *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems.* Boca Raton, Florida. pp. 207-220.
- **Kempf B et Bremer E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170: 319-330.
- **Keneni A, F Assefa, et PC Prabu. (2010).** Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean of Ethiopia and their abilities on solubilization insoluble phosphates *J. Agr. Sci. Tech.* 12: 79-89.

- **Kennedy AC et de Luna LZ. (2004).** Rhizospher. In : D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (eds.), Encyclopedia of soil in the environment. Vol 03. Columbia University, USA. pp. 399-409.
- **Kets EPW, Galinski EA, De Wit M, De Bont JAM et Heipieper HJ. (1996).** Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. J. Bacteriol. **23**: 6665-6670.
- **Kisten AG, Kurdish IK, Bega ZT, Tsarenko AY (2006).** The effect of several factors on the growth of pure and mixed cultures of *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus subtilis*. Appl. Biochem. Microbiol. 42: 278-28.
- **Krieg NR et Holt JG. (1984).** Bergey's manual of determinative bacteriology, volume 1, Baltimore, The Williams and Wilkins Co.
- **Kucey RMN, Janzen HH et Legget HH.(1989).** Microbial mediated increases in plant available phosphorus. Adv. Agron. 42:199–228.
- **Kushner DJ. (1993).** Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The biology of halophilic bacteria*.(eds.), RH. Vreeland et L I. HochsteinCRC Press, Inc., BocaRaton, Fla. pp. 87-103.

“L”

- **Labbe M. (2004).** Ces étonnante graines germées. Auvers sur oise : Labbe. Revue succinctes de livres et d'essai (critique).
- **Landfald B et Strøm AR. (1986).** Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli* . J. Bacteriol. **165**: 894-855.
- **Larcher W. (1995).** Plant under stress. In: Physiological Plant Ecology. Third edition. Springer. 321-448.
- **Larsen I, Sydney LK, Landfald B et Strøm AR. (1987).** Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organics osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. Arch. Microbiol. 132:1-7.
- **Lavelle P et Spain AV. (2001).** Soil ecology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 654p.
- **Legros J P. (2009).** La salinisation des terres dans le monde, Bull. n°40, Académie des Sciences et Lettres de Montpellier. pp. 257-269.
- **Le Rudulier D, Bernard T, Pocard JA et Goas G. (1983).** Enhancement of osmotolerance in *Rhizobium meliloti* by glycine betaines and proline betaines. C. R. Acad. Sci. Paris **297**:155-160.

- **Le Rudulier D. (2005).** Osmoregulation in Rhizobia : the key role of compatible solutes grain legume **42 : 18-19.**
- **Lees H et Postgate JR (1973).** The behaviour of *Azotobacterchroococcum* in oxygen- and phosphate-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 75: 161-166.
- **Levy E, Eyal Z, Chet I et Hochman A. (1992).** Resistance mechanisms of *Septoriatriticito* antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **40**:163-71.
- **Loyer JY. (1991).** Classification des sols salés : les sols salic. Cah. Orston. sér. Pédol. **26**: 51-61.

**“M”**

- **Maciejewski. (1991)** .Semence et plante ; Agriculture d’aujourd’hui. Tec et Doc.5.
- **Madkour MA, Smith LT et Smith GM. (1990).** Preferential osmolyte accumulation: A mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2876-2881.
- **MaghsoudiAM etMaghsoudi K.(2008).** Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticumaestivum*L.) cultivars WJ. *Agric Sc.* **04** (3): 351-358.
- **Maier R.** Environmental microbiology, p. 79-82.
- **Makemson JE et Hastings JW. (1979).** Glutamate functions in osmoregulation in a marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 : 178-180.
- **Malin G et Lapidot A. (1996).** Introduction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J. Bacteriol.* **178**: 385-395.
- **Mayak S, Tirosh T et Glick BR. (2004).** Plant growth-promoting bacteria confer resistance in to tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 565-572.
- **M’barek M, Rhmoune C, Sdiri H, Meddahi ML et Selmi M, (2001).** Effet de stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains de quelques variétés maghrébin de blé. *Scence et changement planétaire /Secheresse.* Volume 12, Numero 3. pp. 167-174.
- **McBride M J. (2004).** Cytophaga-*Flavobacterium* Gliding Motility. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*, vol. 7. pp. 63–71.

- **McMahon. M Aoife Doyle, Evelyn M a, Sarah Brooks Kevin E. O'Connor b. (2006).** Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology* 40 1435–1441.
- **McNeil SD, Nuccio ML et Hanson AD. (1999).** Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120**:945-949.
- **Mermoud A. (2006).** Cours de physique du sol : Maîtrise de la salinité des sols. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, 23 p.
- **Miller JH. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold spring harbor, NY: Cold spring harbor laboratory.
- **Miller KJ et Wood JM. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**:101-136.
- **Mohamed S, Hashim SN, Rahman AH. (2012).** Seaweeds : A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*, **23** :83-96.
- **Morgan JAW, Bending GD et White PJ. (2005).** Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. **56** : 1729-1739.
- **Munns R et Rawson HM. (1999).** Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* pp. 459-464.
- **Munns R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell. Environ.*, **25**: 239-250.
- **Munn J, M. January et Cutright TJ. (2008).** Greenhouse evaluation of EDTA effectiveness at enhancing Cd, Cr, and Ni uptake in *Helianthus annuus* and *Thlaspi caerulescens*. *J. Soils Sediments*, **8**: 116-122.
- **Munns R. (2009).** Strategies for Crop improvement in Saline Soils. Chapter 11. In M. Ashraf, M. Ozturk, H.R. Athar (ed.), *Salinity and water stress, improving crop efficiency*, Springer Science. Business Media B.V.

“N”

- **Nabti E. (2007).** Restauration de la croissance de *Azospirillum brasilense* et de Blé dur et leur osmoprotection par *Ulva lactuca* en Milieux Salés. Thèse de Doctorat en Science Biologique. Université Abderrahmane Mira de Bejaia. 147p.

- **Nabti E, Sahnoune M, Adjrad S, Van Dommelen A, Ghoul M, Schmid M et Hartmann A. (2007).** A halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilense* Strain from Algerian Soil restores Wheat Growth under Saline Conditions. *Eng. Life.Sci.* **7**:354-360.
- **Nadeem SM, Zahir ZA, Naveed M, Arshad M et Shahzad SM. (2006).** Variation in growth and ion uptake of maize due to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria under salt stress. *Soil Environ.*, **25**(2): 78-84.
- **Nedzarek, A. and S. Rakusa-Suszczewski. (2004).** Decomposition of macroalgae and the release nutrient in Admiralty Bay, King Isl. *Ant. Polar Biosci.* **17**:26-35.
- **Nelson LM. (2004).** *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants.* Online Crop Management, 10.1094/CM-2004-0301-05-RV.
- **Nooyi Indra, Chairman et CEO, (2011).** Agriculture Chapter 1. In James, G. workman (ed.), *Water Security: The Water-Food-Energy-Climate Nexus.* pp 17-43.
- **Norini MP. (2007).** Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux, avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de mycorhization . thèse de Doctorat en Géosciences . Université Henri Poincaré Nancy. 33 p.

### “O”

- **Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M et Sahin F. (2006).** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* **111**(1): 38-43.

### “P”

- **Pati BR, Sengupta S et Chandra AK. (1995).** Impact of selected phyllospheric diazotrophs on the growth of wheat seedlings and assay of the growth substances produced by the diazotrophs. *Microbiological Research* **150**: 121-127.
- **Pérez R. (1997).** *Ces algues qui nous entourent* Editions Quae. 272 p.
- **Pichereau V, Pocard JA, Hamelin J, Blanco C, et Bernard T. (1998).**
- Differential effects of Dimethylsulfoniopropionate, Dimethylsulfonioacetate and other S-Methylated compounds on the growth of *Sinorhizobium meliloti* at low and high osmolarities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1420-1429.
- **Prescott L M. (2009).** *Microbiologie (2eme éd).* FRANCE: De Boeck.

- **Pozo C, Martinez Toledo MV, Rodales B, Gonzalez-Lopez J.(2002).** Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacterchroococcum*H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewaters from olive oil mills) as a primary carbon source. *J. Biotechnol.* 97:125-131.
- **Pradhan N et SuklaLB. (2005).**Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol.* 5(10): 850-854.

“R”

- **Ramos S, Maicas B et Mañero FJG. (2008).** Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), In : I. Ahmad, J. Pichtel et S. Hayat (ed.), *Plant-bacteria interactions.* Wiley-Vch, Weinheim. pp. 41- 52.
- **Rathi MS, Sangeeta Paul et Jyoti Kumar Thakur. (2014).** Response of wheat to inoculation with mycorrhizae alone and combined with selected rhizobacteria including *flavobacterium*sp. as a potential bioinoculant. *Journal of Plant Nutrition,* 37:76–86.
- **Rhodes D et Hanson AD. (1993).** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.
- **Robertson EB et Firestone MK. (1992).** Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas sp.* *Appl. Environ. Microbiol.,*58: 1284-1291.
- **Roberts MF. (2005).** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *BioMed.* 1: 5-30.
- **Robinson SP et Jones GP. (1986).**Accumulation of glucinebétaineinchloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Aust. J. Plant Physiol.*1986:659-668.
- **Rodriguez MN, Villalonga RD, Castillo RAJ, Marques AJL, Gonzalez LR, Llanes SP et Peguero FM. (2001).** Influence of application of a biofertilizer based on *Azospirillum* on germination of seed and production of vegetable crops. *Centro Agricola* 28:38–41.

“S”

- **Sharma K, Dak G, Agrawal A, BhatnagarMet Sharma R. (2007).** Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicerarietinum* seed sand seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.,* 1: 61-63.
- **Schwabele KA, Iddo K et Knap KC. (2006).** Drain water management for salinity mitigation in irrigated agriculture. *Am. J. Agric. Ecol.,* 88: 133-140.

- **Shaukat K, Affrasayab S et Hasnain S. (2006).** Growth responses of *Triticum aestivum* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. *Res. J. Microbiol.*, **1**: 330-338.
- **Shonkor KD et Ajit V. (2011).** Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. *soil enzymology*. **2** : 25-45.
- **Sreedevi Sasidharan, Sreedharan Sajith, Sailas Benjamin. (2013).** Cellulase Producing Bacteria from the Wood-Yards on Kallai River Bank. *Advances in Microbiology*. **3**, 326-332.
- **Sleator RD et Hill C. (2001).** Bacterial osmoadaptation : the role of osmolytes bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.
- **Smith SE et Read DJ. (2008).** Mycorrhizal symbiosis. 3<sup>rd</sup> edition, Academic Press, New-York, USA.
- **Sprent JI. (2001).** Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- **Strom AR, Le Rudulier D, Jakowec MW, Bunnell RC et Valentine RC. (1983).** Osmoregulatory (Osm) genes and osmoprotective compounds. In T. Kosuge, C. Meredith et A. Hollaender (eds.), Genetic engineering of plants. Plenum publishing corp, New York. pp. 39-59.
- **Summers PS, Nolte KD, Cooper AJL, Borgeas H, Leustek T, Rhodes D et Hanson AD. (1998).** Identification and stereospecificity of the first three enzymes of 3-Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in a Chlorophyte Alga. *Plant Physiol.* **116**:369-378.

**“T”**

- **Talibart R, Jebbar M, Gouesbet C, Hamidi-Kebbab S, Wroblewski H, Blanco C et Bernard T. (1994).** Osmoadaptation in rhizobacteria : ectoine-induced salt tolerance. *J. Bacteriol.* **176**: 5210-5217.
- **Tam HM et Diep CN. (2014) .** Isolation, Characterization and Identification of Endophytic Bacteria in Sugarcane (*Saccharum* spp. L.) Cultivated on Soils of the Dong Nai Province, Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences*. Vol. 2, No. 6, pp. 361-368.
- **Tanji KK. (2002).** Salinity in the soil environment. Chap 2. In A. Läuchli et U. Lüttig (eds.), Salinity: environment-plants-molecules. Kluwer, Dordrecht. Netherlands. pp. 21-51.

- **Taffouo VD, JK Kouamou, LMT Ngalangue, BAN Ndjeudji et A Akoa( 2009).** Effects of salinity stress on growth, ions partitioning and yield of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars. *Int. J. Bot.*, **5**: 135-143.
- **Tchan YT. New PB. (1984).** Genus I *Azotobacter*, Beijerinck (1901). In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. p. 220–229.
- **Tempest DW, Meers JL et Brown CM. (1970).** Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *J. Gen. Microbiol.* **64** : 171-185.
- **Tripathi AK, Nagarajan T, Verma SC et Rudulier DL. (2002).** Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *A. brasilense* Sp7 under salinity stress. *Curr. Microbiol.*, **44**: 363-367.

“V”

- **Urdan E, Ongena M et Thonart P. (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**: 437-449.
- **Van Loon LC et Bakker PAHM. (2005).** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, In Z.A. Siddiqui (ed.), *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer Science Dordrecht. The Netherlands. pp. 39-66.
- **Van Loon LC. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254.
- **Viera DSJ (1990).** Workshop Européen sur la physiologie, la biochimie et la génétique de la résistance à la sécheresse chez les plantes. *Colloque soc. BOT.* ,147P.

“W”

- **Walter N et Vega O. (2007).** A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* **60**(1): 3621-3643.
- **Weyens N, Monchy S, Vangronsveld J, Taghari et Lelie DV. (2010).** Plant-Microbe Partnerships. In Timmis KN. (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. pp. 2547-257.
- **Whipps JM. (1990).** Carbon utilization. In: *The Rhizosphere*. Lynch J.M. (ed.), Wiley Interscience, Chichester, UK. pp. 59-97.

- **Whipps JM. (2001).** Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. **52**:487-511.
- **Wild A. (1993).** Soils and environment. An introduction. In Cambridge price editions. Cambridge University press, Cambridge. 281p.
- **Winogradsky S. (1938).** Ann. Inst. Pasteur. pp. 60-351.
- **Wyn Jones G, Gouston H. (1991):** Complètement a ryor conflicting approaches to Salinity DDU. Bulletin N° **23**: 7-9.

“ $\gamma$ ”

- **Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD et Somero G. (1982).** Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**:1212-1222.

“Z”

- **Zahran HH. (1997).** Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soils*. **25**: 211-223.
- **Zaidi A, Khan MS, Amil M (2003)** Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum*L.). *Eur J Agron***19**: 15-21.

## Conclusion

La Salinité est l'un des stress affectant le plus gravement l'agriculture mondiale. Elle affecte les communautés microbiennes dans la rhizosphère causant ainsi la destruction de plusieurs espèces bactérienne et par conséquent, une diminution de la diversité microbienne des sols ci qui répercute sur la croissance des végétale et le rendement des cultures.

Notre travail a visé l'étude de l'effet de l'inoculation bactérienne et de l'apport d'osmoprotecteurs naturels (l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca*) ou synthétique (Glycine bêtaïne) dans l'amélioration de la germination des graines de blé sous stress salin. Cette étude montre que le NaCl a un effet dépressif sur la croissance bactérienne et la germination des graines.

Les deux osmoprotecteurs (GB) et (UL) ont permis de restaurer significativement l'halotolérance des 04 souches étudiées. L'inoculation bactérienne, l'ajout de la GB (1mM) ou de l'extrait hydro-alcoolique de (UL) (1%) a amélioré considérablement le taux de germination finale des graines de blé en présence de salinité élevée.

Les résultats ont révélé que les propriétés osmoprotectrices de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* sont évidentes et dépassent celles de la GB. Cette forte restauration de la croissance bactérienne et de la germination des graines de blé serait justifiée par la richesse de cet extrait en éléments nutritifs et en diverses molécules potentiellement osmoprotectrices, donc cet extrait peut être utilisé comme une source naturelle d'osmoprotection ayant un rôle clé dans la croissance bactérienne et la production des cultures agricoles à des hautes osmolarités.

Des études ultérieures pour la mise en évidence de la contenance exhaustive de l'algue marine *U. lactuca*, des composés impliqués directement et indirectement dans l'osmoprotection conférée par l'extrait d'algue étudiée, ainsi qu'une étude *in vivo* sur des stades plus avancés de la croissance du blé doivent être envisagés comme principales perspectives de ce travail.

**Annexe I :**

Densités optiques obtenu pour l'étude du pH :

Souche BEA4 :

pH	Densité optique	
5,0	0,1079	0,0879
5,5	0,1187	0,0994
6,0	0,2666	0,2612
6,5	0,5579	0,5463
7,0	0,7452	0,6860
7,5	0,8140	0,8240
8,0	0,9550	0,9370
8,5	0,9100	0,9312
9,0	0,8411	0,8500

Souche BEC9 :

pH	Densité optique	
5,0	0,5972	0,5390
5,5	1,2214	1,2356
6,0	1,6592	1,6321
6,5	1,7266	1,7266
7,0	1,7549	1,7238
7,5	1,6000	1,6241
8,0	1,5600	1,6263
8,5	1,5719	1,5400
9,0	1,5035	1,5597

Souche BOA4 :

pH	Densité optique	
5,0	1,0700	0,9522
5,5	1,0438	1,0862
6,0	1,1832	1,2522
6,5	1,2448	1,2696
7,0	1,4677	1,4000
7,5	1,4442	1,5200
8,0	1,4366	1,4600
8,5	1,3569	1,3466
9,0	1,3054	1,3113

Souche SEB9 :

pH	Densité optique	
5,0	1,0697	1,0698
5,5	1,1353	1,1332
6,0	1,1830	1,2483
6,5	1,3180	1,3208
7,0	1,3416	1,3988
7,5	1,2782	1,2999
8,0	1,2273	1,1742
8,5	1,1497	1,1378
9,0	1,1036	1,0853



**Annexe III :**

Calculs statistiques pour la comparaison des résultats de l'halotolérance :

Témoin Vs Glycine bétaïne  
(souche BEA4)

NaCl (mM)	Témoin	Milieu + GB	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,4952	1,5342	0,039	-0,08466	0,007167316
250	1,5354	1,6498	0,1144	-0,00926	8,57476E-05
300	1,0236	1,3029	0,2793	0,15564	0,02422381
350	0,9222	1,2145	0,2923	0,16864	0,02843945
400	0,2154	0,3749	0,1595	0,03584	0,001284506
450	0	0,2721	0,2721	0,14844	0,022034434
500	0	0,08	0,08	-0,04366	0,001906196
550	0	0	0	-0,12366	0,015291796
600	0	0	0	-0,12366	0,015291796
650	0	0	0	-0,12366	0,015291796
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,13101684</math></b>					
<b>t<sub>cal</sub>=3,24</b>					

Témoin Vs Ulva lactuca  
(souche BEA4)

NaCl (mM)	Témoin	Milieu + U.L	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,4952	1,5612	0,066	-0,33031	0,109104696
250	1,5354	1,6521	0,1167	-0,27961	0,078181752
300	1,0236	1,5345	0,5109	0,11459	0,013130868
350	0,9222	1,4756	0,5534	0,15709	0,024677268
400	0,2154	1,0487	0,8333	0,43699	0,19096026
450	0	0,8354	0,8354	0,43909	0,192800028
500	0	0,6215	0,6215	0,22519	0,050710536
550	0	0,3014	0,3014	-0,09491	0,009007908
600	0	0,1245	0,1245	-0,27181	0,073880676
	0	0	0	-0,39631	0,157061616
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,89951561</math></b>					
<b>t<sub>cal</sub>= 3,963</b>					

## Témoin Vs Glycine bêtaïne (souche BEC9) :

NaCl (mM)	Témoin	Milieu + GB	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,4749	1,4863	0,0114	-0,09198	0,00846032
250	1,3249	1,4523	0,1274	0,02402	0,00057696
300	0,6748	0,9597	0,2849	0,18152	0,03294951
350	0,1653	0,4	0,2347	0,13132	0,017244942
400	0	0,2754	0,2754	0,17202	0,02959088
450	0	0,1	0,1	-0,00338	1,14244E-05
500	0	0	0	-0,10338	0,010687424
550	0	0	0	-0,10338	0,010687424
600	0	0	0	-0,10338	0,010687424
650	0	0	0	-0,10338	0,010687424
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,13158374</math></b>					
<b>t<sub>cal</sub>=2,70</b>					

Témoin Vs *Ulva lactuca* (souche BEC9) :

NaCl (mM)	Témoin	Milieu + U. L	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,4749	1,4623	-0,0126	-0,10764	0,00848241
250	1,3249	1,4555	0,1306	0,03556	0,04910656
300	0,6748	0,9412	0,2664	0,17136	0,03888784
350	0,1653	0,4213	0,256	0,16096	0,002601
400	0	0,2865	0,2865	0,19146	0,05257849
450	0	0,0235	0,0235	-0,07154	0,00574564
500	0	0	0	-0,09504	0,02913849
550	0	0	0	-0,09504	0,02913849
600	0	0	0	-0,09504	0,02913849
650	0	0	0	-0,09504	0,02913849
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,14602856</math></b>					
<b>t<sub>cal</sub>=2,36</b>					

Témoin Vs Glycine bêtaïne (souche BOA4) :

NaCl (mM)	Témoin	Milieu +GB	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,3246	1,43	0,1054	0,05715	0,003266123
250	0,5823	0,8225	0,2402	0,19195	0,036844803
300	0,4635	0,525	0,0615	0,01325	0,000175563
350	0,2782	0,28	0,0018	-0,04645	0,002157603
400	0	0,0736	0,0736	0,02535	0,000642622
450	0	0	0	-0,04825	0,002328063
500	0	0	0	-0,04825	0,002328063
550	0	0	0	-0,04825	0,002328063
600	0	0	0	-0,04825	0,002328063
650	0	0	0	-0,04825	0,002328063
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,05472703</math></b>					
<b>t<sub>cal</sub>=1,95</b>					

Témoin Vs Glycine bêtaïne (souche SEB9) :

NaCl (mM)	Témoin	Milieu + U.L	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,45	1,5523	0,1023	-0,05541	0,003070268
250	0,8532	1,1246	0,2714	0,11369	0,012925416
300	0,4745	0,9523	0,4778	0,32009	0,102457608
350	0,2236	0,66	0,4364	0,27869	0,077668116
400	0,0756	0,2213	0,1457	-0,01201	0,00014424
450	0,0321	0,1756	0,1435	-0,01421	0,000201924
500	0	0	0	-0,15771	0,024872444
550	0	0	0	-0,15771	0,024872444
600	0	0	0	-0,15771	0,024872444
650	0	0	0	-0,15771	0,024872444
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,29595735</math></b>					
<b>t<sub>cal</sub>=2,95</b>					

Témoin Vs *Ulva lactuca* (souche SEB9) :

NaCl (mM)	Témoin	Milieu +GB	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,45	1,5496	0,0996	0,05259	0,002765708
250	0,8532	1,0384	0,1852	0,13819	0,019096476
300	0,4745	0,4832	0,0087	-0,03831	0,001467656
350	0,2236	0,35	0,1264	0,07939	0,006302772
400	0,0756	0,1246	0,049	0,00199	3,9601E-06
450	0,0321	0,0333	0,0012	-0,04581	0,002098556
500	0	0	0	-0,04701	0,00220994
550	0	0	0	-0,04701	0,00220994
600	0	0	0	-0,04701	0,00220994
650	0	0	0	-0,04701	0,00220994
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,04057489</math></b>					
<b>t<sub>cal</sub>=2,21</b>					

## La souche BOA4 (témoin Vs milieu additionné de UL)

NaCl (mM)	Témoin	Milieu + UL	d	d-d <sub>moy</sub>	(d-d <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>
0	1,3246	1,4032	0,0786	0,0921	0,00848241
250	0,5823	0,9746	0,3923	0,2216	0,04910656
300	0,4635	0,8314	0,3679	0,1972	0,03888784
350	0,2782	0,4999	0,2217	0,051	0,002601
400	0	0,4	0,4	0,2293	0,05257849
450	0	0,2465	0,2465	0,0758	0,00574564
500	0	0	0	-	
	0	0	0	0,1707	0,02913849
550	0	0	0	-	
	0	0	0	0,1707	0,02913849
600	0	0	0	-	
	0	0	0	0,1707	0,02913849
650	0	0	0	-	
	0	0	0	0,1707	0,02913849
<b>SCE = <math>\sum (d-d_{moy})^2 = 0,2739559</math></b>					

**Annexe IV :**

Tableaux des résultats obtenus pour le test de germination valeurs en (%):

	Témoin			Témoin+GB			Témoin+UL		
00	91,7	75,0	75,0	75,0	66,7	66,7	66,70	83,30	91,70
100	25,0	50,0	33,3	50,0	75,0	66,7	66,70	58,30	66,70
200	33,3	33,3	25,0	50,0	41,7	50,0	50,00	50,00	41,70
300	0,0	0,0	8,3	25,0	25,0	16,7	25,00	25,00	41,70

	Témoin			Témoin+BEA4			Témoin+BEA4+GB			Témoin+BEA4+UL		
00	91,7	75,0	75,0	75,0	75,0	66,7	88,3	75,0	88,3	88,30	75,00	58,30
100	25,0	50,0	33,3	66,7	58,3	50,0	83,3	75,0	58,3	41,70	66,70	66,70
200	33,3	33,3	25,0	50,0	33,3	50,0	66,7	66,7	41,7	75,00	75,00	50,00
300	0,0	0,0	8,3	16,7	25,0	33,3	41,7	33,3	41,7	25,00	75,00	33,30

	Témoin			Témoin+BEC9			Témoin+BEC9+GB			Témoin+BEC9+UL		
00	91,7	75,0	75,0	66,7	58,3	33,3	66,3	83,3	66,7	66,70	58,30	75,00
100	25,0	50,0	33,3	58,3	50,0	58,3	75,0	75,0	75,0	66,70	25,00	58,30
200	33,3	33,3	25,0	41,7	50,0	33,3	50,0	50,0	58,3	33,30	58,30	41,70
300	0,0	0,0	8,3	16,7	25,0	25,0	33,3	41,7	33,3	41,70	16,70	25,00

	Témoin			Témoin+BOA4			Témoin+BOA+GB			Témoin+BOA4+UL		
00	91,7	75,0	75,0	75,0	41,7	75,0	83,3	91,7	58,3	66,70	41,70	66,70
100	25,0	50,0	33,3	75,0	50,0	50,0	50,0	58,3	83,3	83,30	50,00	75,00
200	33,3	33,3	25,0	58,3	58,3	66,7	41,7	66,7	58,3	41,70	58,30	83,30
300	0,0	0,0	8,3	66,7	33,3	50,0	41,7	50,0	58,3	41,70	58,30	50,00

	Témoin			Témoin+SEB9			Témoin+SEB9+GB			Témoin+SEB9+UL		
00	91,7	75,0	75,0	66,7	75,0	50,0	83,3	75,0	66,7	75,0	58,3	83,3
100	25,0	50,0	33,3	58,3	66,7	83,3	50,0	83,3	58,3	83,3	50,0	75,0
200	33,3	33,3	25,0	58,3	58,3	75,0	50,0	66,7	58,3	41,7	58,3	83,3
300	0,0	0,0	8,3	50,0	33,3	50,0	75,0	50,0	41,7	41,7	50,0	41,7

	Témoin			Témoin+BEA4			Témoin+BEC9			Témoin+BOA4			Témoin+SEB9		
00	91,7	75,0	75,0	75,0	75,0	66,7	66,7	58,3	33,3	75,0	41,7	75,0	66,7	75,0	50,0
100	25,0	50,0	33,3	66,7	58,3	50,0	58,3	50,0	58,3	75,0	50,0	50,0	58,3	66,7	83,3
200	33,3	33,3	25,0	50,0	33,3	50,0	41,7	50,0	33,3	58,3	58,3	66,7	58,3	58,3	75,0
300	0,0	0,0	8,3	16,7	25,0	33,3	16,7	25,0	25,0	66,7	33,3	50,0	50,0	33,3	50,0

## Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de l'inoculation des graines de blé dur (*Triticum durum*, variété Boussalem) avec quatre souches PGPR : (*Flavobacterium johnsoniae* BEA4, *Pseudomonas putida* BEC9, *Achromobacter xylosoxidans* BOA4 et *Azotobacter chroococcum* SEB9) en présence et en absence d'extrait d'*Ulva lactuca* (1%) ou de la glycine bêtaïne GB (1mM) sous stress salin. L'étude de l'effet du pH et de la salinité sur la croissance des 04 souches révèle que ces dernières croient le mieux sur un pH neutre à légèrement alcalin et qu'elles sont modérément halotolérantes. L'addition de l'extrait d'*Ulva lactuca* ou de la GB montre que ces deux derniers constituent des osmoprotecteurs efficaces pour les quatre souches. Les résultats ont montré que l'application du stress salin exerce une action dépressive et entraîne une chute du taux de germination (de 80,56% à 2,75% à 300 mM). Cependant, l'inoculation des graines avec les souches a amélioré significativement le taux de germination (de 2,75% à 50% avec la souche BOA4 à 300 mM). L'inoculation des graines en présence de l'extrait d'*Ulva lactuca* permet l'amélioration de taux de germination (de 30,53% à 70% avec la souche SEB9 à 200 mM).

Les résultats montrent que les quatre souches peuvent être utilisées comme inoculant afin d'améliorer le taux de germination des graines du blé sous stress salin et que l'extrait hydro-alcoolique d'*Ulva lactuca* peut être utilisé pour promouvoir l'halotolérance des souches et des graines.

**Mots clés :** Blé dur, PGPR, *Ulva lactuca*, glycine bêtaïne, stress salin, inoculation.

## Abstract

The present work focuses on the study of durum wheat seeds inoculation (*Triticum durum* variety Boussalem) with four PGPR strains: (*Flavobacterium johnsoniae* BEA4, *Pseudomonas putida* BEC9, *Achromobacter xylosoxidans* BOA4 and *Azotobacter chroococcum* SEB9) in presence and absence of *Ulva lactuca* extract (1%) or glycine betaine GB (1 mM) under salt stress. The study of the effect of pH and salinity on the growth of the four strains showed that they grow better on neutral to slightly alkaline pH and that they are moderately halotolerant. The addition of *Ulva lactuca* extract or GB showed the potential osmoprotective on the four strains. The results showed that application of salt stress exerts a depressing action and results in a drop in germination rate (80.56% at 2.75% to 300 mM). However, inoculating seeds with bacterial strains improved significantly the germination rate (2.75 to 50% with the strain BOA4 at 300 mM). Also, the inoculation of seeds in presence of *Ulva lactuca* extracts allows enhancement of the germination rate (from 30.53% to 70% with the strain SEB9 at 200 mM).

The results show that the four strains could be used as inoculant to improve the germination of wheat seeds under salt stress and the hydro-alcoholic extract of *Ulva lactuca* could also be used to promote strains and seeds halotolerance.

**Keywords:** Durum wheat, PGPR, *Ulva lactuca*, glycine betaine, salt stress, inoculation.

*Dédicaces.*

*Remerciements.*

# *Introduction.*

*Synthèse  
bibliographique.*

*Matériel et  
méthodes.*

# *Résultats et discussion.*

*Conclusion.*

*Références  
bibliographiques.*

*Annexes.*