

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 Biotechnologie

Réf :

Mémoire
Présenté par
MADI ANAIS et RAHLI ZAKIA
Pour l'obtention du diplôme de
Master Académique
Filière : Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

Formation de biofilm chez les bactéries favorisant la croissance des plantes : Application dans l'atténuation des stress agro-environnementaux

Soutenu le : 07/07/2025

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
<i>Mme BOUKTIT N.</i>	<i>MAA</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mr BELHADI D.</i>	<i>MCA</i>	<i>Encadrent</i>
<i>Mme DJOUDER Z.</i>	<i>MAA</i>	<i>Examinateuse</i>

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciment

Avant toute chose, nous exprimons notre profonde gratitude à Dieu Tout-Puissant, qui nous a accordé la volonté, la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail. Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrant, Monsieur BELHADI Djellali, pour ses conseils éclairés, sa bienveillance, sa disponibilité et son soutien constant tout au long de cette étude. Que notre reconnaissance et notre respect l'accompagnent. Nous exprimons également notre gratitude à Madame BELHADI pour sa présence attentive et sa gentillesse tout au long de ce parcours. Nous remercions chaleureusement les membres du jury : Madame la Présidente, Bouktit Nadia, et Madame l'examinatrice, Djouder Zina. Leur expertise, leurs conseils avisés et leurs remarques constructives ont grandement contribué à l'amélioration de ce mémoire. Leur rigueur scientifique et leur disponibilité lors de la soutenance ont permis d'en renforcer la qualité. Nous tenons enfin à remercier les ingénieurs du laboratoire du département de Biotechnologie pour leur aide précieuse et leur accueil tout au long de notre travail.





Didécace

« مَنْ يُرِيدُ اللَّهُ بِهِ خَيْرًا يُعْلَمُهُ فِي الدِّينِ »
(Hadith صحيح رواه البخاري ومسلم)

« *Celui à qui Allah veut du bien, Il l'instruit dans la religion.* »
(Hadith authentique rapporté par Al-Bukhari et Muslim)

*Louange à Allah, Le Tout-Puissant,
Pour Sa miséricorde, Sa guidance, et la force qu'Il m'a accordée tout au long de ce
parcours.*

*À ma mère Fatiha, lumière de ma vie,
Pour son amour inépuisable, ses invocations constantes, et son soutien dans les moments
les plus difficiles.*

*À mon père Abdel Madjid, mon pilier silencieux,
Pour sa confiance, ses encouragements et sa bienveillance.*

*À mon frère Houssem, mon unique et précieux soutien,
Pour sa présence, ses mots réconfortants et son affection fraternelle.*

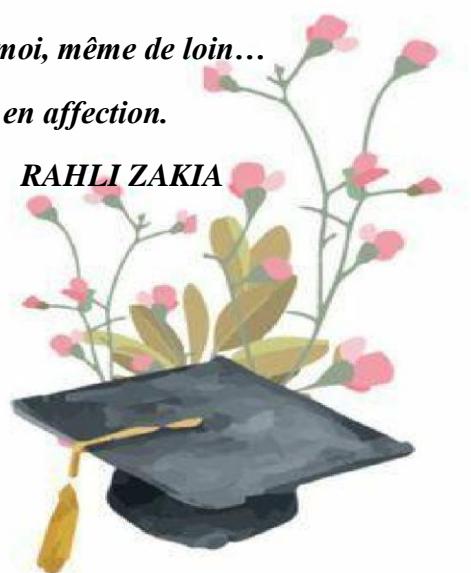
*À ma binôme Anaïs,
Pour sa complicité, son soutien et les efforts partagés tout au long de cette aventure.*

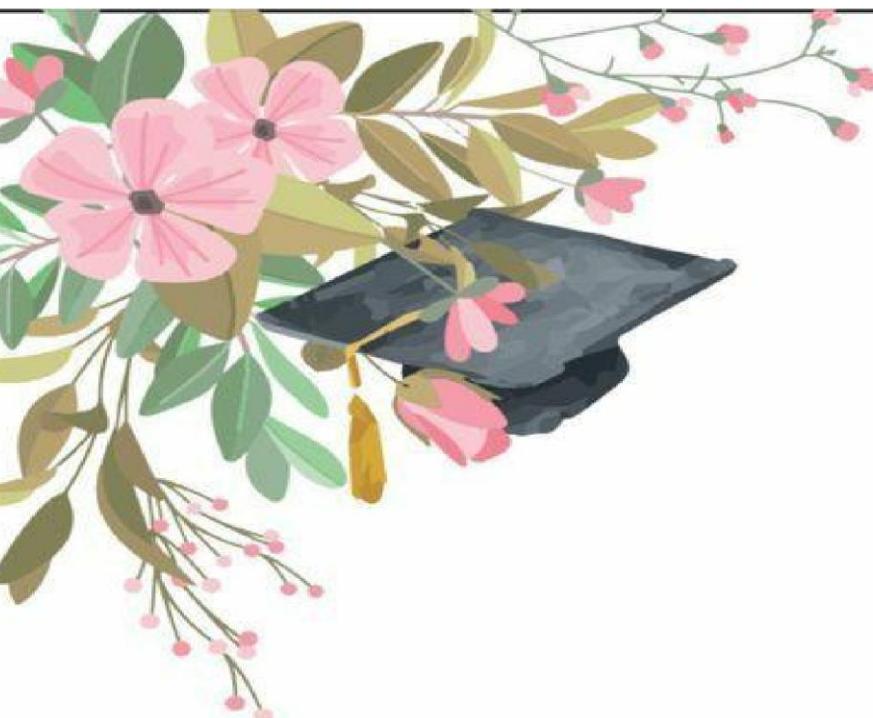
*À mes amis sincères,
Et à mes proches, en particulier Fouzia, Leticia, Fifi, Thifina, Bariza, Asma, Walid,
Mohamed-Ali et à tout ma famille, du côté paternel et maternel pour leur amour, leurs
encouragements et leur présence précieuse dans ma vie.
Qui ont été à mes côtés, présents dans les moments clés, avec bienveillance et chaleur.*

Et à tous ceux qui m'ont soutenue, inspirée, ou simplement cru en moi, même de loin...

Ce travail vous est dédié, avec tout mon cœur, en reconnaissance et en affection.

RAHLI ZAKIA





Didécace

À celle qui fut la source de tendresse et d'amour,

A ma mère Naïma, merci pour tes sacrifices, ton affection inconditionnelle et pour chaque prière qui a guidé mes pas. À mon pilier, mon exemple,

A mon père Rachid, merci pour ton soutien indéfectible et tes mots qui m'ont donné confiance.

À mon frère si cher, Imad, merci pour ta présence, ton écoute, et pour chaque sourire dans les moments de doute.

À ma sœur de cœur, Imène, merci d'avoir été là, ta tendresse et ton aide m'ont été précieuses. À moi-même, pour chaque nuit blanche, chaque silence, chaque victoire discrète...

À la famille Madi et Ikhlef

Vous êtes ma force et mon repère. Ce travail est aussi les vôtres

À mon binôme Ahlam, merci pour ton soutien, tes mots simples mais puissants, et ta présence qui a fait toute la différence. Ce mémoire te rend hommage aussi.

À Leticia, Inès, Yasmine, fifi, Merci d'avoir été la-vous êtes mes éclats de rires, mes pauses douces, mes doses d'énergie

Merci à ALLAH, source de mon courage et de ma persévérance

MADI ANAIS



Liste d'abréviations**Liste des figures****Liste des tableaux**

Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Microorganismes rhizosphériques	3
2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)	3
3. Mécanismes d'action des PGPR	3
3.1.Mécanismes directe	4
3.1.1. Solubilisation du phosphate.....	4
3.1.2. Fixation biologique d'azote.....	5
3.1.3. Production des sidérophores	5
3.1.4. Production d'acide indole – acétique (AIA)	6
3.2. Mécanismes indirects	6
3.2.1. Production de substance antibactérienne	7
3.2.2. Production d'acide cyanhydrique(HCN)	8
3.2.3. Production d'ammoniac(NH ₃)	9
3.2.4. Production des enzymes hydrolytiques	9
4. PGPR et stress abiotiques : une stratégie biologique pour la durabilité agricole	10
4.1.Mécanismes d'adaptation des PGPR face aux stress abiotiques	10
4.2.Formation des biofilms et production d'EPS	11
4.2.1. Biofilm : structure, fonction et important pour les PGPR	11
4.2.2. Exopolysaccharides : rôle structurel et physiologique.....	11
4.3.Influence des facteurs abiotiques sur l'efficacité des PGPR	12
Matériel et méthodes.....	13
1. Matériels biologiques	13
2. Méthodes	13
2.1.Revivification des souches	13
2.2.Evaluation du potentiel promoteur de la croissance des plantes.....	14
2.2.1. Solubilisation du phosphate	14
2.2.2. Fixation biologique d'azote	15
2.2.3. Production de sidérophores	15
2.2.4. Production des phytohormones : Acide indole acétique	16
2.2.5. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)	16
2.2.6. Production d'ammoniac (NH ₃)	16
2.2.7. Production d'enzymes hydrolytiques	17
2.3.Evaluation de l'effet du stress sur la formation de biofilm	18
2.4.Evaluation de la production des exopolysaccharides	19
2.4.1. Extraction des exopolysaccharides	19
2.4.2. Dosages des exopolysaccharides	20
3. Analyse statistique	20

Résultats et discussion.....	21
1. Evaluation du potentiel PGPR	21
1.1.Solubilisation de phosphate	21
1.2.Fixation biologique d'azote	23
1.3.Production de sidérophores	24
1.4.Production des phytohormones : acide indole acétique	25
1.5.Production de cyanure d'hydrogène (HCN)	26
1.6.Production d'ammoniac	27
1.7.Activités enzymatiques	27
2. Analyse de la diversité fonctionnelle des souches PGPR par classification hiérarchique (CHA)	29
3. Tolérance aux stress abiotiques et formation de biofilm	31
3.1.Stress salin et de formation de biofilm	31
3.2.Effets des métaux lourds sur la formation de biofilm	32
3.2.1. Cas de plomb	32
3.2.2. Cas de cadmium.....	33
4. Evaluation de la production des exopolysaccharides	33
5. Relations entre production d'exopolysaccharides et formation de biofilm chez les PGPR	34
Conclusion	35
Annexes	37
Références bibliographiques.....	51

Résumé

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole Acétique

CAS : Chrome Azural S

CMC : CarboxyMéthylCellulose

CV : Cristal Violet

EPS : Exopolysaccharides

HCN : Cyanure d'hydrogène

NFB : Nitrogen-Fixing Bacteria

PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

PNPG : P-nitrophényl- β -D-galactopyranoside

PSB : Phosphate-Solubilizing Bacteria

PVK : Milieu Pikovskaya

ROS : Réactive Oxygène Species

RSI : Résistance Systématique Induite

SAR : Systemic aquired resistance

TSA : Trypticase Soja Agar

TSB : Trypticase Soja Broth

YEM : Yeast Extract Mannitol

YMA : Yeast Mannitol Agar

YMB : Yeast Mannitol Broth

Liste des figures

Figure 1 : Illustration des effets directs et indirects des PGPR	4
Figure 2: Illustration de l'activité de solubilisation du phosphate.....	21
Figure 3: Mise en evidence de la fixation libre du diazote	23
Figure 4: Mise en évidence de la production de sidérophore.....	24
Figure 5: Mise en evidence de la production d'AIA.....	25
Figure 6: Mise en evidence de la production d' HCN	26
Figure 7: Mise en evidence de la production de NH3	27
Figure 8: Mise en evidence des activités enzymatiques	29
Figure 9: Classification Hiérarchique ascendante basée sur les caractères PGPR	30
Figure 10: Evaluation de la formation de biofilm en presence du NACL	32
Figure 11: Distribution des niveaux de tolérance au Cadmium	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Matériel biologique utilisé	14
---	----

INTRODUCTION

La croissance constante de la population mondiale exerce une pression croissante sur les systèmes agricoles, incitant les producteurs à intensifier les cultures pour répondre aux besoins alimentaires. Cette intensification repose largement sur l'utilisation massive d'intrants chimiques, notamment les engrains azotés et phosphatés. Bien qu'efficaces à court terme, ces pratiques entraînent une dégradation des sols, la pollution des ressources hydriques et un déséquilibre des communautés microbiennes du sol (Li et al., 2023). Dans cette optique, la recherche d'alternatives écologiques s'impose comme une priorité.

Parmi ces alternatives, l'utilisation des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) suscite un intérêt croissant. Présentes naturellement dans la rhizosphère, ces bactéries contribuent à la nutrition végétale, à la stimulation de la croissance et à la protection contre les stress abiotiques et biotiques. Leurs mécanismes d'action incluent la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores, la fixation de l'azote atmosphérique et la libération de composés bénéfiques tels que l'ammoniac (NH_3) ou le cyanure d'hydrogène (HCN), utilisé en lutte biologique (Hasan et al., 2024).

Certaines souches de PGPR se distinguent également par la production d'enzymes extracellulaires telles que les cellulases, les amylases, les lipases, les protéases ou les pectinases. Ces enzymes participent à la biodégradation de la matière organique et à la suppression des agents phytopathogènes. L'activité hémolytique observée chez certaines souches (Saberi Riese et al., 2024) peut également refléter leur potentiel en production de métabolites bioactifs.

Un atout majeur des PGPR réside dans leur capacité à former des biofilms ; structures tridimensionnelles leur permettant de s'ancrer aux racines et de résister aux conditions environnementales défavorables. Ces biofilms, notamment en conditions de stress salin ou métallique, facilitent la colonisation racinaire, protègent les bactéries, améliorent la rétention d'eau et favorisent la disponibilité des nutriments (Ajijah et al., 2023). Dans ce processus, les exopolysaccharides (EPS), éléments constitutifs essentiels de la matrice du biofilm, jouent un rôle clé dans l'adhésion cellulaire, la protection contre les stress et la stabilité de la structure.

L'analyse quantitative des EPS permet ainsi d'évaluer le potentiel adaptatif des souches, leur aptitude à interagir durablement avec les plantes, ainsi que leur efficacité dans des contextes agroenvironnementaux contraints (Çam et Bicek, 2023 ; Carezzano et al., 2023).

Dans un contexte de transition vers une agriculture durable, il devient crucial d'identifier des souches capables d'assumer plusieurs fonctions : améliorer la croissance végétale, résister aux contraintes abiotiques (comme la salinité ou la présence de métaux lourds), tout en contribuant à la restauration des sols et à la réduction de l'usage d'intrants chimiques.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude s'inscrit et vise à :

- Évaluer les propriétés PGPR d'une collection de souches isolées de la rhizosphère des *Viciae* ;
- Caractériser leur potentiel multifonctionnel en conditions standards et sous stress abiotique (sel et métaux lourds), notamment à travers la production d'enzymes, de biofilms et d'exopolysaccharides.
- Sélectionner les souches ayant les meilleures aptitudes en matière de promotion de la croissance végétale et de tolérance aux stress abiotiques pour une éventuelle application comme biofertilisants, agents de biocontrôle contre les pathogènes, et comme outils potentiels de bioremédiation dans des environnements pauvres ou contaminés.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Microorganismes rhizosphériques

La rhizosphère, interface dynamique entre les racines des plantes et le sol, constitue l'un des environnements microbiens les plus actifs de la biosphère. Elle héberge une diversité élevée de microorganismes, dont beaucoup interagissent avec la plante hôte en influençant sa nutrition, sa croissance et sa résistance aux pathogènes (Bulgarelli et al., 2013 ; Ling et al., 2022). Ces communautés microbiennes sont façonnées conjointement par les caractéristiques de la plante, du sol, et les facteurs biotiques et abiotiques environnants. Elles comprennent des microorganismes bénéfiques, qui soutiennent la croissance végétale ; des espèces neutres, qui participent au réseau trophique via l'utilisation des exsudats racinaires et des pathogènes, pouvant altérer la santé des plantes. Parmi les microorganismes bénéfiques, les bactéries associées à la rhizosphère peuvent être symbiotiques (ex. : *Rhizobium*) ou libres, évoluant dans le sol ou à la surface racinaire (Chen et al., 2024).

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

Les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) représentent un groupe fonctionnel clé dans l'agriculture durable. Elles contribuent au développement végétal via plusieurs fonctions telles que la stimulation de la croissance racinaire, l'amélioration de l'absorption des nutriments, la fixation de l'azote atmosphérique, la protection contre les pathogènes et l'induction de la tolérance aux stress abiotiques (sécheresse, salinité, température, métaux lourds) (Piao et al., 2024).

Ces bactéries colonisent différents habitats de la plante : la rhizosphère, la phyllosphère, ou l'endosphère. Les endophytes (PGPE), situés à l'intérieur des tissus végétaux, sont souvent plus efficaces. Protégés des variations environnementales et en interaction étroite avec l'hôte, ils bénéficient d'un accès privilégié aux exsudats racinaires et peuvent moduler directement les niveaux d'hormones végétales, favorisant ainsi la croissance (Giauque et al., 2019 ; Voccianate et al., 2022).

3. Mécanismes d'action des PGPR

Les PGPR agissent via deux grands types de mécanismes ; directs, en améliorant la nutrition végétale ou en modulant la physiologie de la plante et indirects, en inhibant les agents pathogènes ou en induisant la résistance systémique (Figure 1) (Kundan et al., 2023 ; Olanrewaju et al., 2017).

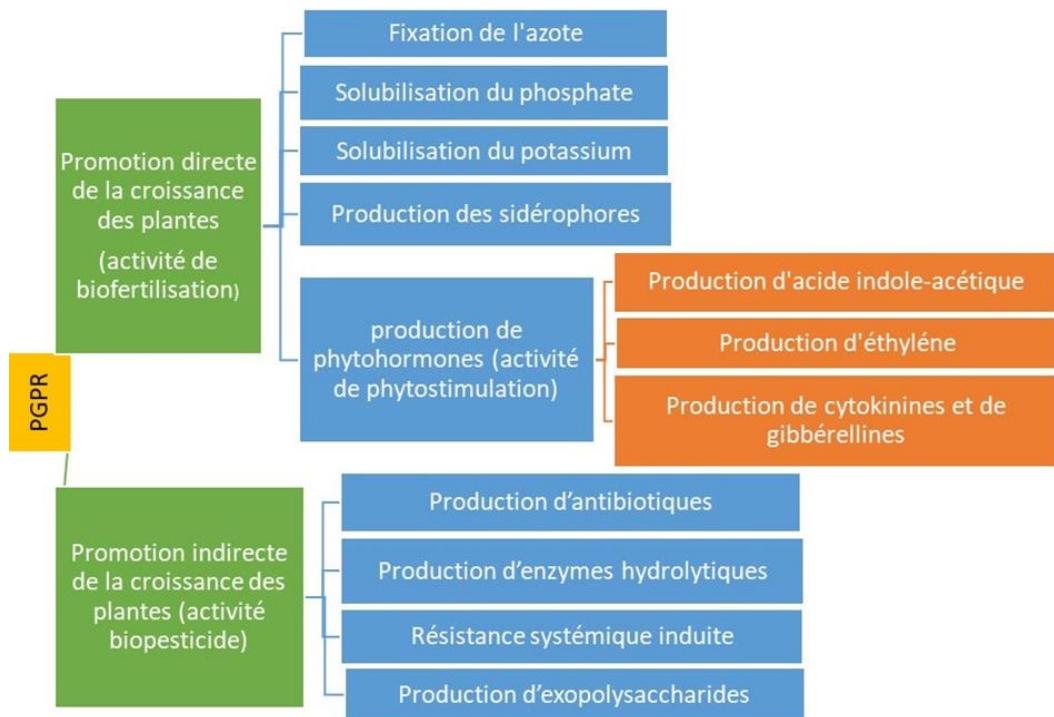


Figure 1 : Illustration des effets directs et indirects des PGPR (Gupta et al., 2015)

3.1. Mécanismes directs

Les mécanismes directs les plus importants et les plus étudiés sont la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate inorganique, la production de phytohormones (auxines, cytokinines, gibbérellines) ; la production d'ACC désaminase, qui régule l'éthylène et la sécrétion de sidérophores facilitant l'acquisition du fer (figure 1). Ces mécanismes pallient les carences fréquentes des sols agricoles en azote et en phosphore, réduisant ainsi la dépendance aux engrains chimiques (Glick, 2012).

3.1.1 Solubilisation du phosphate

Le phosphore, bien qu'essentiel à de nombreux processus physiologiques (division cellulaire, biosynthèse d'ADN/ARN, conversion d'énergie), est souvent présent dans le sol sous des formes insolubles. Les PGPR améliorent sa biodisponibilité par la production d'acides organiques, l'acidification locale du microenvironnement rhizosphérique et la chélation de cations complexés au phosphate. Parmi les microorganismes les plus efficaces dans ce processus figurent plusieurs espèces de rhizobia, notamment *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Bradyrhizobium* spp. et

Bradyrhizobium japonicum. À ceux-ci s'ajoutent d'autres genres bactériens tels que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* et *Serratia*, reconnus pour leurs capacités à solubiliser et minéraliser divers composés phosphatés du sol (Fahde et al., 2023 ; Akhreim et al., 2024). Certains champignons filamenteux, notamment *Aspergillus* et *Penicillium*, contribuent également à ce processus. Ainsi, en améliorant significativement la biodisponibilité du phosphore, ces microorganismes contribuent à optimiser la nutrition phosphatée des plantes, avec un impact positif sur leur développement global.

3.1.2. Fixation biologique de l'azote

L'azote (N) constitue un macroélément essentiel à la croissance et à la productivité des plantes. Toutefois, malgré sa présence abondante dans l'atmosphère sous forme gazeuse (N_2), sa biodisponibilité dans le sol reste limitée en raison des pertes importantes liées à la volatilisation, à la lixiviation et à la dénitrification. Par ailleurs, l'usage excessif d'engrais azotés de synthèse, bien que permettant d'augmenter les rendements agricoles, engendre de graves conséquences environnementales, notamment la pollution des nappes phréatiques et l'eutrophisation des milieux aquatiques. Face à ces défis, la fixation biologique de l'azote (FBN) représente une alternative durable et écologiquement favorable. Ce processus naturel, assuré par des microorganismes appelés diazotrophes, permet de convertir l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_4^+), forme assimilable par les plantes. La FBN contribue à hauteur d'environ 60 % de l'azote disponible dans la biosphère terrestre (Tahir et Sarwar, 2013).

Les diazotrophes peuvent être classés en deux grandes catégories :

- Les espèces libres, vivant dans la rhizosphère ou dans le sol, telles que *Azospirillum spp.*, *Azotobacter spp.*, *Acetobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.* et *Streptomyces spp.* ;
- Les espèces symbiotiques, qui établissent des associations mutualistes avec des plantes hôtes. Parmi celles-ci, on retrouve les rhizobia, en interaction avec les légumineuses, ainsi que *Frankia spp.*, en symbiose avec les plantes actinorhiziennes. D'autres bactéries, comme *Herbaspirillum spp.*, *Azoarcus spp.* et certaines souches d'*Azospirillum spp.*, sont associées aux racines de graminées.

Les bactéries symbiotiques, en particulier les rhizobia, ont démontré une efficacité remarquable dans la réduction des apports d'engrais azotés. Il est estimé qu'elles permettent une fixation équivalente à 53 millions de tonnes d'azote par an dans les cultures vivrières à l'échelle mondiale (Fahde et al., 2023), contribuant ainsi à la durabilité des systèmes agricoles.

3.1.3. Production de sidérophores

Le fer (Fe) est un micronutriment essentiel pour les plantes, mais sa biodisponibilité est limitée dans les sols en raison de sa forme majoritairement insoluble (Fe^{3+}). Pour pallier cette carence, certaines bactéries de la rhizosphère, notamment les PGPR (*Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Serratia*, etc.), sécrètent des sidérophores ; de petites molécules chélatantes ayant une forte affinité pour le fer ferrique. Ces composés facilitent la solubilisation du fer et sa disponibilité pour la plante, tout en participant à l'atténuation de la toxicité des métaux lourds et à la lutte biologique contre des phytopathogènes tels que *Fusarium*, *Aspergillus* et *Pythium* (Timofeeva et al., 2022).

Les sidérophores remplissent donc une double fonction : mobilisation du fer et réduction du stress environnemental chez les plantes. Ils sont recyclés après libération intracellulaire du fer. Des études ont montré que des PGPR comme *Gluconacetobacter diazotrophicus* et *Azospirillum brasilense* améliorent la nutrition ferrique des fraisiers en culture hydroponique, même en conditions de carence. Les sidérophores de type hydroxamate se sont révélés plus efficaces que ceux de type catéchol. Cependant, leur efficacité peut être affectée par la salinité, les conditions environnementales (photodégradation, hydrolyse) et la présence de pesticides, qui altèrent la capacité des bactéries à produire ces composés. Une étude a révélé que certains pesticides organophosphorés (phorate, glyphosate, etc.) réduisent significativement la production de sidérophores par des souches bactériennes, bien que *Pseudomonas fluorescens* reste relativement résistant à ces effets (de Andrade et al., 2023).

3.1.4. Production d'acide indole-acétique (AIA)

L'acide indole-acétique (AIA), principale forme d'auxine, est une phytohormone essentielle au développement végétal. La synthèse microbienne de l'AIA, en particulier par les bactéries de la rhizosphère, est bien documentée. Il est estimé qu'environ 80 % des microorganismes isolés de cette zone sont capables de produire de l'AIA en tant que métabolite secondaire (Ahemed et Kibret, 2014).

L'AIA d'origine bactérienne peut moduler le pool hormonal endogène des plantes, influençant ainsi des processus clés tels que la division cellulaire, la différenciation, l'elongation des racines, la formation de tissus vasculaires, ainsi que le développement des nodules racinaires chez les légumineuses (Tahir & Sarwar, 2013). En agissant comme molécule de signalisation, l'AIA participe également aux interactions rhizobactérie-plante et peut influencer l'expression génique de certains microorganismes du sol.

Néanmoins, une régulation fine de cette hormone est nécessaire. Des niveaux excessifs d'AIA, qu'ils soient exogènes ou induits par des pathogènes, peuvent affaiblir les défenses des plantes et favoriser leur sensibilité à certaines infections bactériennes (Ahemed & Kibret, 2014).

La majorité des espèces de *Rhizobium* sont reconnues pour leur aptitude à produire de l'AIA, ce qui soutient leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote, notamment par la stimulation de la nodulation chez les plantes hôtes. La régulation hormonale induite par l'AIA apparaît donc comme un levier fondamental dans l'optimisation des interactions bénéfiques entre les PGPR et les plantes (Tahir and Sarwar, 2013 ; Ahemed et Kibret, 2014).

3.2. Mécanismes indirects

La capacité des bactéries de lutte biologique à favoriser indirectement la croissance des plantes suscite un intérêt considérable, tant pour (i) comprendre certains mécanismes sous-jacents utilisés par ces bactéries que pour (ii) les utiliser commercialement en remplacement des pesticides chimiques. Les PGPR contribuent à la croissance végétale par des mécanismes indirects, principalement en renforçant les défenses naturelles des plantes et en améliorant leur tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Glick, 2012).

3.2.1. Production de substance antibactérienne

Les rhizobactéries promotrices de croissance des plantes (PGPR) synthétisent une large gamme de métabolites antimicrobiens de faible poids moléculaire, principalement en réponse à la compétition microbienne dans la rhizosphère. Ces composés, tels que le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), les phénazines, la pyoluteorine, la pyrrolnitrine, les lipopeptides cycliques (ex. : surfactine, bacillomycine D, fengycine) et le cyanure d'hydrogène, présentent des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, insecticides et cytotoxiques (Hassen et al., 2016 ; Fahde et al., 2023).

Des espèces telles que *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus* spp. se distinguent par leur forte capacité à produire ces antibiotiques, jouant un rôle crucial dans la lutte biologique contre

divers phytopathogènes. Le mode d'action de ces molécules repose essentiellement sur la perturbation des membranes cellulaires ou l'inhibition de la synthèse de la paroi chez les agents pathogènes. Parmi les PGPR, certaines souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sont connues pour produire des bactériocines et des antibiotiques peptidiques, comme la trifolitoxine (TFX), impliqués dans l'inhibition de pathogènes fongiques (Wang et al., 2013 ; Das et al., 2017). D'autres genres comme *Bradyrhizobium* produisent la rhizobitoxine, capable de limiter les infections causées par *Macrophomina phaseolina* sur des cultures telles que le soja ou l'arachide.

La biosynthèse de ces composés dépend de multiples facteurs, incluant l'état physiologique de la bactérie, la disponibilité des nutriments, ainsi que des conditions environnementales (pH, température, teneur en oligo-éléments comme le zinc). Par ailleurs, certaines PGPR telles que *Rhizobium*, *Azospirillum* ou *Klebsiella pneumoniae* possèdent une activité pectinolytique, renforçant leur efficacité dans le contrôle des maladies végétales par dégradation des composés pariétaux des pathogènes (Fahde et al., 2023).

3.2.2. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

L'acide cyanhydrique (HCN) est un métabolite secondaire volatil doté de puissantes propriétés antimicrobiennes. Il agit principalement en inhibant des métallozymes, notamment les cytochromes C oxydases à cuivre, perturbant ainsi la chaîne de transport des électrons et entraînant une suppression de l'énergie cellulaire chez de nombreux microorganismes phytopathogènes (Das et al., 2017).

La biosynthèse du HCN repose sur l'activité de l'enzyme HCN synthétase, en présence de glycine, son principal précurseur. Plusieurs genres bactériens, dont *Rhizobium*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Aeromonas* et surtout *Pseudomonas fluorescens*, sont connus pour leur capacité à produire du cyanure (Fahde et al., 2023). Cette cyanogénèse contribue de manière significative à la lutte biologique contre les pathogènes du sol.

Par exemple, *Mesorhizobium loti* MP6, isolé de nodules racinaires de *Mimosa pudica*, a démontré une production efficace de HCN, inhibant la croissance de *Sclerotinia sclerotiorum*, l'agent pathogène responsable de la pourriture blanche chez *Brassica campestris* (Das et al., 2017).

3.2.3. Production d'ammoniac (NH_3)

L'azote, élément nutritif essentiel au développement végétal, doit être converti de sa forme gazeuse (N_2) en composés assimilables, tels que les nitrates (NO_3^-) ou l'ammoniac (NH_3). Certaines bactéries bénéfiques du sol, notamment les PGPR, participent à cette transformation via la désamination enzymatique des acides aminés (Bhattacharyya et Ghosh, 2024).

Les genres *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Burkholderia* figurent parmi les plus efficaces pour cette production. L'ammoniac ainsi libéré peut-être directement absorbé par les racines, améliorant la nutrition azotée des plantes, en particulier dans les sols appauvris (Fanai et al., 2024).

Outre son rôle nutritionnel, l'ammoniac exerce également un effet suppressif sur les pathogènes en modifiant le pH local de la rhizosphère, ce qui peut limiter la prolifération de microorganismes nuisibles. Ainsi, la présence de souches productrices d'ammoniac dans la zone racinaire contribue à la fois à la santé et à la croissance des plantes (Fanai et al., 2024).

En raison de ces propriétés, les PGPR producteurs de NH_3 sont considérés comme des agents prometteurs en biofertilisation. Leur utilisation en agriculture durable offre une alternative écologique aux engrains azotés chimiques, favorisant la productivité tout en préservant les écosystèmes (Alzate Zuluaga et al., 2024).

3.2.4. Production d'enzymes hydrolytiques

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) produisent une large gamme d'enzymes hydrolytiques extracellulaires qui jouent un rôle essentiel dans la colonisation de la rhizosphère, la biodisponibilité des nutriments et la lutte contre les pathogènes (Ehinmitan et al., 2024). Ces enzymes permettent la dégradation de composés organiques complexes présents dans le sol ou dans les parois cellulaires des agents phytopathogènes. Parmi les plus courantes, on retrouve les cellulases, qui hydrolysent la cellulose en sucres simples ; les amylases, qui décomposent l'amidon ; les lipases, qui catalysent la dégradation des lipides en acides gras et glycérol ; les protéases, qui fragmentent les protéines en peptides ou acides aminés ; et les pectinases, qui ciblent les pectines des parois végétales (Devi et al., 2023). Ces activités enzymatiques facilitent non seulement la croissance des plantes en améliorant l'assimilation des nutriments, mais permettent également aux PGPR de supprimer les pathogènes en perturbant l'intégrité de leurs structures cellulaires. Certaines souches présentent aussi une activité hémolytique, révélatrice d'une forte production de

protéines extracellulaires, utilisée dans la compétition microbienne de la rhizosphère. Ainsi, la production d'enzymes hydrolytiques constitue un mécanisme clé du potentiel biostimulant et bioprotecteur des PGPR en agriculture durable (Santoyo et *al.*, 2024 ; Ehinmitan et *al.*, 2024).

4. PGPR et stress abiotiques : une stratégie biologique pour la durabilité agricole

Les stress environnementaux, tels que la salinité, la sécheresse, les températures extrêmes, les métaux lourds et les stress oxydatifs, représentent des contraintes majeures à la productivité agricole mondiale. Ces stress abiotiques perturbent le métabolisme des plantes en affectant l'absorption des nutriments, la photosynthèse, la division cellulaire et l'équilibre hydrique, entraînant une réduction significative de la croissance végétale et du rendement des cultures (Zhu, 2016).

Dans ce contexte, les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) offrent des solutions écologiques pour renforcer la résilience des plantes. Leur efficacité repose notamment sur leur capacité à coloniser durablement la rhizosphère, à induire des réponses physiologiques favorables chez les plantes et à former des structures protectrices telles que les biofilms. L'utilisation des PGPR constitue ainsi une alternative durable aux intrants chimiques, en favorisant la productivité agricole dans des contextes environnementaux contraints (Vurukonda et *al.*, 2016).

4.1. Mécanismes d'adaptation des PGPR face aux stress abiotiques

Les PGPR déploient plusieurs mécanismes pour atténuer les effets négatifs des stress abiotiques. Ces mécanismes incluent la production de phytohormones (comme l'IAA), d'enzymes antioxydantes, de sidérophores, d'ammoniac, ainsi que de substances de signalisation qui favorisent la croissance végétale. En situation de stress, de nombreuses souches développent également des structures biofilms et produisent des exopolysaccharides (EPS), qui leur permettent de survivre, de s'ancrer aux racines, et de moduler les conditions micro-environnementales au bénéfice des plantes (Saharan et *al.*, 2024 ; Li et *al.*, 2024).

4.2. Formation des biofilms et production d'EPS

4.2.1. Biofilms : structure, fonctions et importance pour les PGPR

Les biofilms sont des communautés bactériennes multicellulaires, structurées en une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, protéines, lipides et ADN extracellulaire. Cette architecture tridimensionnelle confère une protection accrue contre les conditions défavorables, une communication intercellulaire efficace (Quorum Sensing), ainsi qu'une meilleure persistance dans la rhizosphère (Saharan et al., 2024).

Chez les PGPR, la formation de biofilm est un atout pour établir une interaction stable avec les racines. Elle favorise l'ancrage, améliore la tolérance aux stress abiotiques, et permet le maintien de fonctions cruciales telles que la solubilisation des nutriments et la protection contre les pathogènes (Li et al., 2024).

4.2.2. Exopolysaccharides : rôle structural et physiologique

Les EPS jouent un rôle fondamental dans la cohésion du biofilm, l'adhésion aux racines et la protection contre les stress chimiques et physiques. Ils améliorent aussi la rétention d'eau et la tolérance à des conditions telles que la salinité ou la présence de métaux lourds (Çam et Bicek, 2023).

Une production abondante d'EPS est corrélée à une plus grande capacité d'adaptation des souches bactériennes. Ces données sont précieuses pour sélectionner des PGPR robustes, utilisables comme biofertilisants ou agents de biocontrôle en agriculture durable (Carezzano et al., 2023).

4.3. Influence des facteurs abiotiques sur l'efficacité des PGPR

Les conditions environnementales influencent directement la formation des biofilms et la production d'EPS par les PGPR. Des facteurs tels que le pH, la température, l'humidité du sol, ou la disponibilité en nutriments affectent l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la matrice biofilm (Beauregard et al., 2013). Par exemple, des stress modérés comme une légère salinité peuvent stimuler la production de biofilm par activation de voies de signalisation spécifiques (Nadeem et al., 2014).

Les métaux lourds constituent un facteur abiotique particulièrement influent. Certaines PGPR répondent à ce stress en augmentant la production d'EPS, capables de piéger les ions métalliques dans la matrice biofilm, créant ainsi une barrière protectrice (Gupta et al., 2014). Cette adaptation permet la survie bactérienne et le maintien des fonctions bénéfiques dans des

sols contaminés. Toutefois, à fortes concentrations, des métaux comme le cadmium, le plomb ou le cuivre peuvent inhiber la formation de biofilm en perturbant la croissance bactérienne ou en détruisant la structure du biofilm (Sinha et *al.*, 2017).

Ainsi, la capacité des PGPR à former des biofilms efficaces dans des conditions de stress représente un critère essentiel pour leur sélection dans les programmes d'agriculture durable. Elle garantit non seulement leur survie, mais aussi leur efficacité dans la stimulation de la croissance végétale et la restauration des sols dégradés (Anbuganesan et *al.*, 2024 ; Bhagat et *al.*, 2024)

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude appartiennent à la collection du laboratoire d'écologie microbienne de l'Université Abderrahmane Mira, Bejaia. Elles proviennent de différentes régions de Bejaia et sont isolées à partir des nodules de différentes espèces de la tribu des *Viciae*.

Tableau 1 : Matériel biologiques utilisé

Codes	Plantes d'origine	Codes	Plantes d'origine
S1	<i>V. faba cv. minor</i>	S12	<i>V. faba cv. equina</i>
S2	<i>V. faba cv. equina</i>	S13	<i>V. faba cv. minor</i>
S3	<i>V. faba cv. equina</i>	S14	<i>V. faba cv. equina</i>
S4	<i>V. faba cv. equina</i>	S15	<i>V. faba cv. minor</i>
S5	<i>V. faba cv. equina</i>	S16	<i>V. faba cv. equina</i>
S6	<i>V. faba cv. equina</i>	S17	<i>V. faba cv. minor</i>
S7	<i>V. faba cv. minor</i>	S18	<i>V. faba cv. minor</i>
S8	<i>V. faba cv. equina</i>	S19	<i>V. faba cv. minor</i>
S9	<i>V. sativa</i>	S20	<i>Pisum sativum</i>
S10	<i>V. faba cv. equina</i>	S21	<i>V. faba cv. equina</i>
S11	<i>V. faba cv. equina</i>		

2. Méthodes

2.1. Revivification des souches

Les 21 souches bactériennes retenues dans le cadre de cette étude ont été soumises à une étape de revivification avant utilisation. À cet effet, environ 2 ml de bouillon TSB (Tryptic Soy Broth) (Annexe 1) ont été ajoutés directement sur chacune des cultures conservées dans des tubes à essai contenant du YMA (Yeast Mannitol Agar) (Annexe 1) incliné. Ce milieu riche en nutriments permet de relancer la croissance bactérienne. Les tubes ont ensuite été incubés à 28–30 °C pendant 24 à 48 heures.

Les souches bactériennes revivifiées ont été repiquées sur milieu YMA puis incubées à 28°C pendant 48 heures. Après vérification de la pureté des cultures, les souches retenues ont

étés transférées sur tubes inclinés pour une nouvelle incubation puis conserver à 4°C pour usage ultérieur.

2.2. Évaluation du potentiel promoteur de la croissance des plantes

Pour évaluer le potentiel promoteur de la croissance des plantes, les différentes souches ont été testées pour leur capacité de solubilisation de phosphate, fixation d'azote, production des sidérophores, production d'acide indole-acétique (AIA), production de cyanure d'hydrogène (HCN) et de production d'ammoniac (NH_3).

2.2.1. Solubilisation du phosphate

Deux approches complémentaires basées sur l'utilisation du milieu Pikovskaya (PVK) (Annexe 1) ont été utilisées pour évaluer le potentiel de solubilisation du phosphate tricalcique par les différentes souches.

a. Détection qualitative de la solubilisation du phosphate

La solubilisation du phosphate a été réalisée sur le milieu Pikovskaya contenant 0.5% de phosphate tricalcique (Ca_3PO_4) comme source de phosphate insoluble (Pikovskaya, 1948). Le milieu PVK a été ensemencé en spot et à raison de 10 μl à partir des précultures obtenues sur bouillon TSB et dont la densité optique à 630 nm est de 0,1. Après incubation à 28°C pendant 7 jours, la solubilisation du phosphate se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Afin de quantifier cette activité, les diamètres des colonies et ceux des halos ont été mesurés puis utilisés pour calculer l'indice de solubilisation (IS) (Pikovskaya, 1948) selon la formule suivante :

$$\text{IS} = \text{Diamètre total (colonie + halo)} / \text{Diamètre de la colonie}$$

b. Dosage quantitatif de la solubilisation du phosphate

Les souches sélectionnées pour leur capacité à solubiliser le phosphore ont fait l'objet d'une évaluation quantitative du pouvoir solubilisant par la méthode colorimétrique sur milieu liquide PVK. Ainsi, 5ml du milieu liquide sont inoculés avec 500 μl d'une suspension bactérienne d'une densité optique de 0,1 à 630 nm. Après incubation pendant 7 jours à 28°C, le contenu des tubes a été centrifugé à 6000 tr/min pendant 15 min (Nautiyal, 1999). Le surnageant a ensuite été récupéré dans des tubes à essai, dans lesquels sont ajoutés 800 μl d'un mélange réactionnel (acide ascorbique à 10% et tartrate de potassium et d'antimoine à 26,6%), 1 ml de

molybdate d'ammonium (0,96%) et 1 ml d'acide sulfurique 4M (Annexe 2). Après incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min, la quantification du phosphate solubilisé a été réalisée par colorimétrie à 890 nm en se référant à une courbe d'étalonnage établie en utilisant du phosphate assimilable (K_2HPO_4) à différentes concentrations (Amri et al., 2023). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions.

2.2.2. Fixation d'azote

La capacité des isolats bactériens à fixer l'azote atmosphérique a été évaluée à l'aide du milieu NFB (Nitrogen-Free Base) (Annexe 1), dépourvu de source d'azote selon la méthode décrite par (Alomari et al., 2024). Après une culture préalable dans du bouillon TSB demi-concentré à 28°C pendant 48 h sous agitation, 10 µL de chaque culture ont été déposés en spots sur la surface du milieu NFB. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 7 jours. Toute croissance bactérienne apparente sur ce milieu indique une capacité de fixation de l'azote atmosphérique. Elle a été évaluée de manière qualitative selon quatre niveaux : absence (-), faible (+), modérée (++) et forte (+++). Chaque test a été réalisé en triplicata pour garantir la fiabilité des résultats.

2.2.3. Production de sidérophores

La production de sidérophores par les isolats bactériens a été évaluée selon une méthode qualitative inspirée de Schwyn et Neilands (1987). Après stérilisation par filtration, 1ml du réactif CAS (annexe 2) a été ajouté au milieu YMA appauvri en fer (Annexe 2), avant sa solidification. Les isolats ont ensuite été déposés par spots de 10 µL sur la surface du milieu, puis incubés à 28 °C pendant 24 à 48 heures. Après incubation, une fine couche du réactif CAS préparé dans une eau gélosée a été ajoutée en surface (Slama et al., 2019). Après une période maximale de 30 minutes, un changement de couleur est observé dans le milieu superposé, entourant exclusivement les spots des souches productrices, passant du bleu au violet (pour les sidérophores de type catéchol) ou du bleu à l'orange (pour les souches produisant des hydroxamates). Toutes ces expériences ont été réalisées avec trois répétitions pour chacune d'entre elles (Pérez-Miranda et al., 2007).

2.2.4. Production des phytohormones : Acide Indole-Acétique

Pour évaluer la production d'acide indole-3-acétique (AIA), Les différentes souches bactériennes ont été cultivées dans un milieu aux sels de Winogradsky (WS) (Annexe 1). Le milieu a été inoculé avec les cultures bactériennes et incubé à 28°C pendant 7 jours. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 10 000 tr/min pendant 10 minutes pour éliminer les cellules bactériennes. Le surnageant obtenu a été mélangé avec le réactif de Salkowski composé de 50 mL d'acide perchlorique à 35 % et de 1 mL de FeCl₃ 0,5 M (Annexe 2). Le mélange a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 25 minutes. L'apparition d'une coloration rose indique la présence d'AIA, dont la concentration a été déterminée par spectrophotométrie à 530 nm, en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec des solutions standards d'AIA de concentrations comprises entre 0 et 35 µg/ml (Loper et Schroth, 1986). Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois répétitions.

2.2.5. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production de HCN par les isolats bactériens a été évaluée selon le protocole de Lorck (1948). Des boîtes de Pétri contenant une gélose nutritive enrichie en glycine (4,4 g/L) (Annexe 1) ont été ensemencées en spot à raison de 10 µL. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Une fois les spots déposés, un disque de papier Whatman imbibé d'une solution de picrate de sodium, préparée avec 5 % d'acide picrique et 2 % de carbonate de sodium, a été placé à l'intérieur du couvercle. La boîte a alors été scellée à l'aide de parafilm pour éviter toute dispersion des gaz, puis incubée à 28°C pendant 7 jours. Le résultat positif est identifié par le changement de couleur du papier, passant du jaune à une teinte allant de l'orange au marron, signe de la production d'HCN.

2.2.6. Production d'ammoniac (NH₃)

La production d'ammoniac par les isolats bactériens a été évaluée selon la méthode décrite par Cappuccino et Sherman (2014). Brièvement, 50 µL de culture bactérienne fraîche ont été inoculés dans 5 mL d'eau peptonée (annexe 1), puis incubés à 28°C pendant 72 heures. Après incubation, 250 µL de réactif de Nessler ont été ajouté à 1mL de la culture bactérienne. Le réactif réagit avec l'ammoniac pour former un complexe coloré, dont l'intensité varie du jaune pâle au brun foncé, proportionnelle à la quantité de NH₃ produite. Une coloration jaune pâle indique une faible production, tandis qu'une coloration brun foncé signale une production élevée.

2.2.7. Production d'enzymes hydrolytiques

2.2.7.1. Activité Cellulolytique

L'activité cellulase a été testée sur un milieu solide contenant 5 g/L de carboxyméthylcellulose (CMC). Des spots de 10 µL de culture bactérienne ont été déposés sur la surface du milieu, suivi d'une incubation à 28°C pendant 48 heures. Après incubation, les boîtes ont été traitées avec une solution d'iode à 1 % (Annexe 2) durant 10 à 15 minutes. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique la dégradation de la CMC en glucose, révélant une activité cellulolytique (Kasana et al., 2008).

2.2.7.2. Activité protéasique

L'évaluation de l'activité protéolytique a été effectuée sur gélose YMA enrichie avec 2 % de lait écrémé (annexe 1), ajouté après stérilisation. Des aliquotes de 10 µL de culture ont été ensemencés en spot, puis incubés à 28°C pendant 48 heures. La formation d'un halo clair autour des colonies, dû à l'hydrolyse de la caséine, témoigne de la production de protéase.

2.2.7.3. Activité amylolytique

La détection de l'activité amylolytique a été réalisée sur gélose contenant 1 % d'amidon soluble (Annexe 1). Après dépôt en spot de 10 µL de culture et incubation à 28°C pendant 72 heures, la présence de zones dépigmentées (halos clairs) autour des colonies après avoir ajouté de la solution d'iode indique l'hydrolyse de l'amidon, révélatrice d'une activité amylasique.

2.2.7.4. Activité Lipasique

L'activité lipase a été détectée sur gélose YMA supplémentée, après autoclavage, avec 2 % de Tween 80 (Annexe 1). Des spots de 10 µL de culture ont été déposés, suivis d'une incubation à 28°C pendant 48 heures. Un halo opaque formé autour des colonies témoigne de l'hydrolyse des triglycérides, traduisant une activité lipasique.

2.2.7.5. Activité Pectinolytique

La capacité pectinolytique a été évaluée sur un milieu solide contenant 0,5 % de pectine (Annexe 1). Après dépôt de 10 µL de culture et incubation à 28 °C pendant 48 heures, le milieu a été coloré avec du rouge Congo (0,05 %). L'apparition de zones dépigmentées autour des colonies indique une dégradation de la pectine, signe d'activité pectinolytique.

2.2.7.6. Activité hémolytique

Le test d'hémolyse est réalisé sur gélose supplémentée avec 5 % de sang de mouton défibriné (Annexe 1). Les souches ont été ensemencées par spots de 10 µL, incubées à 28 °C pendant 72 h. Les réactions observées sont : β -hémolyse (halo clair), α -hémolyse (teinte verdâtre due au méthémoglobine), γ -hémolyse (absence de lésion) (American Society for Microbiology, 2012).

2.3 Evaluations de l'effet du stress sur la formation de biofilm

La formation de biofilms a été évaluée par la méthode de coloration au cristal violet, qui permet de quantifier la biomasse adhérente. Le développement des biofilms a été effectué dans des microplaques stériles à 96 puits. Un volume de 200 µL de chaque suspension bactérienne a ensuite été distribué dans les puits de la microplaque contenant du milieu YMB additionné du NaCl à des concentrations de 0, 50, 100 et 150 mM, du cadmium à 0, 20, 40 et 80 µM ou du plomb à des concentrations de 0, 400, 800, 1600 µM, afin d'évaluer l'influence du stress salin et du stress métallique sur la production des biofilms. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche et chaque condition. Un témoin négatif ainsi qu'un témoin sans contraintes ont été prévus. L'incubation a été réalisée à 28 °C pendant 48 heures, sans agitation, afin de favoriser l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm.

Après incubation, le surnageant a été retiré délicatement à l'aide d'une micropipette, et chaque puits a été lavé trois fois avec 200 µl d'eau distillée stérile pour éliminer les cellules non adhérentes. Les plaques ont été ensuite retournée sur du papier absorbant pour éliminer l'excès de liquide. La coloration du biofilm a été effectuée par l'ajout de 200 µl de cristal violet à 0,1%, avec une incubation de 15 à 20 minutes à température ambiante. Le colorant a été éliminé, et les puits ont été rincés 3 à 5 fois à l'eau détaillée. Les plaques ont été laissées sécher à l'air libre, retournées sur du papier absorbant pour sécher. Le colorant retenu a ensuite été solubilisé à l'aide de d'éthanol pur. La densité optique a été mesurée à 590 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Les souches ont été classées selon les critères de classification de la capacité de formation de biofilm établis, sur la base de seuils d'absorbances (DOc) mesurées en microplaques après coloration au cristal violet.

- Non productrice de biofilm (-) $DO \leq DO_c$
- Faible production de biofilm (+) $DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$

- Production modérée de biofilm (++) $2x \text{DOc} < \text{DO} \leq 4x \text{Doc}$

- Forte production de biofilm (+++) $4x \text{DOc} < \text{DO}$

Où : DOc = DO moyenne du contrôle négatif + (3 x l'écart type du contrôle négatif)

2.4 Evaluation de la production des exopolysaccharides

2.4.1. Extraction des exopolysaccharides

La production d'exopolysaccharides (EPS) a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 70 mL de milieu liquide YMB (Yeast Mannitol Broth) stérile, préalablement ajusté à un pH initial de 6,8. Chaque flacon a été inoculé avec 3,5 mL d'une culture bactérienne fraîche en phase exponentielle, puis incubé à 28 °C sous agitation constante à 150 rpm, afin d'assurer une oxygénation optimale et de favoriser la biosynthèse des EPS.

Après 72 heures d'incubation, les cultures ont été centrifugées à 6 000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C, en vue d'éliminer les cellules bactériennes. Le surnageant contenant les EPS solubles a été soigneusement récupéré. Son pH a ensuite été ajusté à 7,25 à l'aide d'une solution de NaOH ou de HCl 1 N, afin de stabiliser les composés extracellulaires. Enfin, 3 g de NaCl ont été ajoutés à chaque flacon contenant la suspension, dans le but de favoriser la précipitation des exopolysaccharides.

La précipitation des exopolysaccharides (EPS) a été effectuée par l'ajout d'un volume d'éthanol à 95 %, préalablement refroidi à 4 °C, pour un volume équivalent de surnageant. Le mélange a ensuite été incubé à 4 °C pendant une nuit afin de permettre la précipitation complète des polysaccharides. Le lendemain, les EPS précipités ont été récupérés par centrifugation à 5 000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot obtenu, contenant les EPS, a été soigneusement resuspendu dans 10 mL d'eau distillée stérile en vue de leur quantification ultérieure.

2.4.2. Dosage des exopolysaccharides

Le dosage des exopolysaccharides (EPS) a été réalisé selon la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique, couramment utilisée pour la quantification des glucides totaux. Le culot obtenu après précipitation, puis resuspendu dans 10 mL d'eau distillée stérile, a servi de solution d'analyse. Pour chaque échantillon, un volume de 1 mL de la solution d'EPS a été transféré dans un tube à essai, puis mélangé avec 0,2 mL de phénol à 5 %. L'ajout immédiat de 1 mL d'acide sulfurique concentré a ensuite été effectué de manière rapide et uniforme. Le mélange a été homogénéisé par agitation douce, puis incubé dans un bain-marie à 95 °C pendant

3 minutes. Après refroidissement à température ambiante, les tubes ont été conservés à l'obscurité pendant 30 minutes afin de permettre le développement optimal de la coloration. L'intensité de la coloration orangée, proportionnelle à la concentration en glucides, a été mesurée à une longueur d'onde de 480 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant des concentrations croissantes de glucose (0 à 100 µg/mL), ce qui a permis d'exprimer les résultats en µg/mL équivalent glucose.

3. Analyse statistique

Les données recueillies ont fait l'objet d'une ANOVA à un seul facteur et d'une comparaison multiple des moyennes, en utilisant la méthode Tukey HSD (Tukey Honest significant difference).

RESULTS ET DISCUSSION

1. Évaluation du potentiel PGPR

1.1. Solubilisation de phosphate

La capacité des souches bactériennes à solubiliser le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) a d'abord été évaluée sur milieu solide à l'aide du calcul de l'indice de solubilisation du phosphate (ISP). Cette évaluation repose sur l'observation de halos clairs autour des colonies, témoignant de la mise en solution du phosphate insoluble. Les résultats ont mis en évidence une variabilité importante entre les isolats testés (Figure 2).

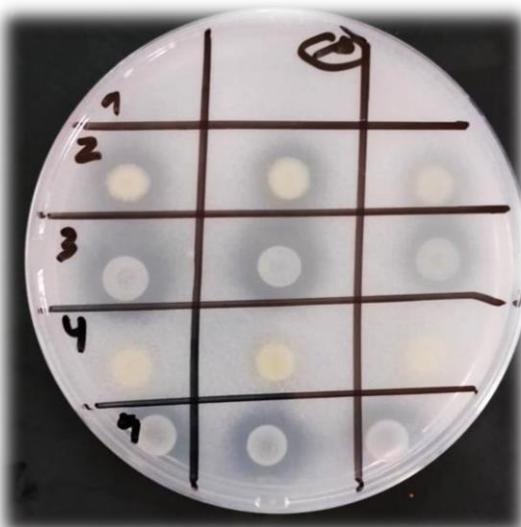


Figure 2 : Illustration de l'activité de solubilisation du phosphate en fonction des souches étudiées

L'analyse des indices de solubilisation du phosphate (ISP) révèle une variabilité significative entre les différentes souches bactériennes, indiquant des aptitudes contrastées à mobiliser le phosphate insoluble. Cette variabilité est fréquemment rapportée dans la littérature, notamment chez les PGPR, dont les capacités dépendent de leur génotype, de leur origine environnementale et de leur métabolisme.

La souche S16 se démarque nettement avec les ISP les plus élevés, suggérant une capacité particulièrement efficace à mobiliser le phosphate insoluble du milieu. Cette performance pourrait s'expliquer par une production accrue d'acides organiques tels que l'acide gluconique, citrique ou oxalique, reconnus pour leur rôle dans la solubilisation du phosphate tricalcique.

Les souches S12, S2, S9 et S5 présentent également des niveaux d'ISP intéressants, indiquant un bon potentiel phytobénéfique. Ces valeurs supérieures à 1,8 sont généralement considérées comme indicatrices d'une activité de solubilisation efficace.

Les souches S10 et S21, aux valeurs identiques, confirment une performance modérée, tandis que S3, S7 et S20 se situent en bas du classement, traduisant une faible activité de solubilisation. Cela pourrait s'expliquer par une expression réduite des enzymes (phosphatases acides/alcalines) ou une faible production d'acides organiques responsables de la mobilisation du phosphate, comme l'acide gluconique ou citrique.

À l'opposé, les souches S7 et S20 affichent les indices les plus faibles, ce qui reflète une capacité réduite à solubiliser le phosphate. Cette faible performance pourrait être liée à une absence ou à une sous-expression des voies métaboliques impliquées dans la production d'agents solubilisants, ou à une faible excrétion extracellulaire de métabolites.

La variabilité des ISP reflète la diversité fonctionnelle des souches testées. Cette diversité constitue un levier précieux pour la sélection de souches PGPR performantes, adaptées aux besoins en biofertilisation dans différents contextes agroécologiques. Ces résultats justifient des investigations complémentaires sur la nature des composés sécrétés et l'analyse génomique des voies impliquées dans la solubilisation du phosphate.

Le dosage du phosphate soluble produit par les différentes souches bactériennes, en milieu liquide, met en évidence une variabilité significative entre les isolats, confirmée par les lettres indiquant les groupes statistiques selon le test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

La souche S11 se distingue nettement par une concentration significativement très élevée en phosphate soluble. Cette performance exceptionnelle suggère un potentiel élevé de solubilisation du phosphate, possiblement lié à une forte production d'acides organiques ou à une régulation efficace des voies métaboliques associées à la libération de phosphore.

Les souches S7 et S5 affichent des rendements intéressants, bien que significativement inférieur à celui de S11. Plusieurs autres souches, comme S2, S16, S3 et S12, forment un groupe intermédiaire, avec des concentrations comprises entre 4 et 9 µg/ml, traduisant une activité modérée. En revanche, les souches S19, S21 et surtout S20 se situent au bas du classement, avec des productions nettement plus faibles. La souche S20 est statistiquement différente de toutes les autres et présente une très faible capacité à solubiliser le phosphate dans les conditions testées.

Ces résultats corroborent l'observation selon laquelle la solubilisation du phosphate est une caractéristique souche-dépendante, influencée par des facteurs physiologiques et biochimiques propres à chaque isolat.

1.2. Fixation d'azote

La croissance observée sur le milieu N-free (NFB), dépourvu de toute source d'azote, chez 95,24 % des souches testées (soit 20 sur 21), atteste de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique sous forme libre (figure 4). Ce résultat est révélateur du potentiel de ces souches en tant que bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), qui jouent un rôle clé dans l'amélioration de la nutrition azotée des végétaux.

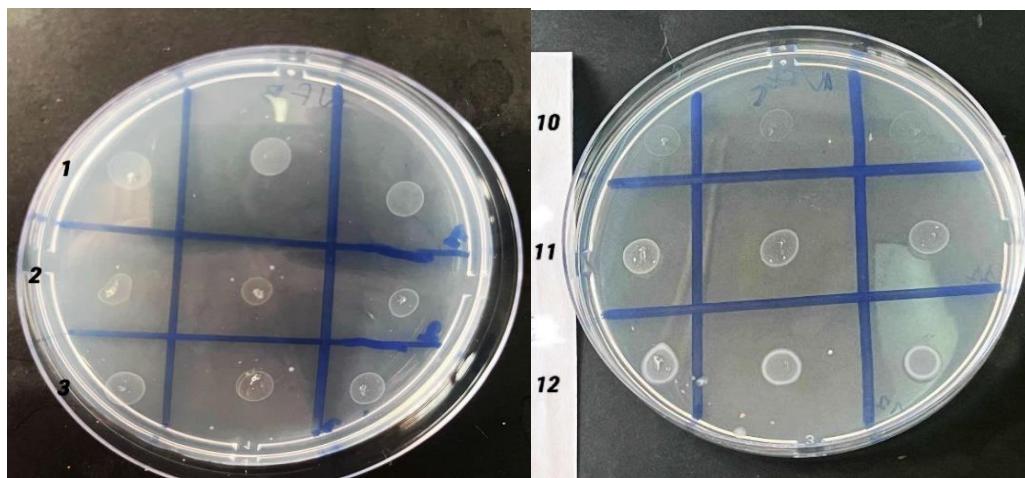


Figure 3 : Mise en évidence de la fixation libre du diazote en fonction des souches étudiées

Parmi les PGPR, les bactéries du genre *Rhizobium* occupent une place particulière en raison de leur double capacité : fixation symbiotique de l'azote en association avec les légumineuses, et parfois fixation libre dans la rhizosphère. Ces bactéries abritent des gènes fonctionnels essentiels à ce processus, notamment *nif*, *fix* et *nod*. La présence de ces gènes confère aux *Rhizobium spp.* un avantage écologique et agronomique important, leur permettant d'apporter de l'azote assimilable aux plantes dans des sols pauvres, sans recours aux engrains chimiques (Goyal et al., 2021 ; Lindström et Mousavi, 2020).

Outre *Rhizobium*, d'autres PGPR non symbiotiques appartenant à des genres tels que *Azospirillum*, *Azotobacter*, ou encore certaines souches de *Pseudomonas* et *Bacillus*, possèdent également cette aptitude à fixer l'azote de manière libre. Ces bactéries interagissent avec les racines via la rhizosphère, améliorant la croissance végétale par un apport localisé en ammoniac, souvent couplé à d'autres mécanismes comme la production d'auxines ou la solubilisation de phosphate (Rodge et al., 2016 ; Bharti et al., 2022).

1.3. Production de sidérophores

Parmi les 21 souches de *Rhizobium* testées, 16 souches (76,19 %) ont montré une production positive de sidérophores, tandis que 2 souches (9,52 %) se sont révélées négatives (figure 4). L'analyse des halos colorés sur le milieu CAS (Chrome Azurol S) a permis de caractériser les types de sidérophores produits. Les souches S2, S3, S4, S5, S6, S8 et S16 ont généré des halos bleu-violet, typiques des sidérophores de type catécholate, reconnus pour leur forte affinité envers le fer ferrique (Fe^{3+}) (Neilands, 1995). En parallèle, les souches S7 et S14 ont montré une décoloration bleu-orange, suggérant la production de sidérophores de type hydroxamate, également efficaces pour la chélation du fer, bien que généralement légèrement moins puissants que les catécholates (Saha et al., 2016). Enfin, trois souches (14,29 %) ont été classées comme non déterminées (ND) en raison d'une réponse chromatique ambiguë, nécessitant des analyses complémentaires.

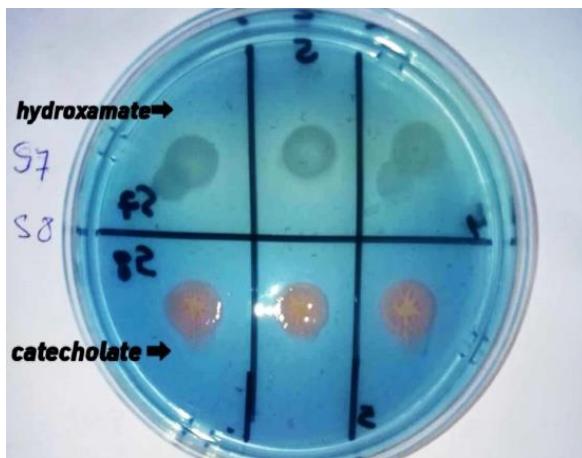


Figure 4. Mise en évidence de la production de sidérophores en fonction des souches étudiées

La forte proportion de souches productrices de sidérophores témoigne de leur potentiel en tant que bactéries promotrices de la croissance végétale (PGPR). Ces molécules jouent un rôle clé dans l'acquisition du fer dans les environnements pauvres en fer biodisponible, tout en limitant sa disponibilité pour les microorganismes phytopathogènes. Ainsi, elles contribuent indirectement à la protection de la plante hôte contre les agents pathogènes en établissant une compétition pour le fer dans la rhizosphère.

La diversité des types de sidérophores identifiés reflète également la variabilité fonctionnelle des souches étudiées, ce qui constitue un atout dans la perspective d'un usage agronomique. Les sidérophores de type catécholate sont couramment produits par des genres tels que *Pseudomonas*, *Enterobacter*, ou *Klebsiella*, tandis que les hydroxamates sont

fréquemment associés à *Azotobacter* et certaines souches de *Rhizobium* (Neilands, 1995). Cette observation suggère que les souches locales de *Rhizobium* pourraient présenter un potentiel multifonctionnel comparable à celui d'autres PGPR bien étudiés, renforçant leur intérêt comme bio-inoculants.

Des études antérieures soutiennent ces observations. Par exemple, Bhagat et al. (2014) ont rapporté que 88 % des isolats de pois chiche testés dans leur étude produisaient des sidérophores, soulignant la fréquence élevée de ce caractère parmi les bactéries rhizosphériques.

La production de sidérophores chez la majorité des souches étudiées constitue un indicateur fort de leur aptitude à promouvoir la croissance végétale et à agir en tant qu'agents de biocontrôle naturels, ce qui justifie leur sélection pour des applications futures en agriculture durable.

1.4. Production des phytohormones : acide indole acétique

La production d'AIA a été observée chez l'ensemble des 21 souches testées, comme en témoigne l'apparition d'une coloration rose-orangée caractéristique après addition du réactif de Salkowski, confirmant la synthèse de cette phytohormone de type auxine (Figure 5). Toutefois, l'intensité de la coloration variait visiblement d'une souche à l'autre, suggérant des différences quantitatives dans la production d'AIA.



Figure 5 : Mise en évidence de la production d'AIA en fonction des souches étudiées

La quantification spectrophotométrique réalisée à 530 nm, en se basant sur une courbe d'étalonnage (annexe 3), a permis de déterminer les concentrations d'AIA produites par chaque souche. Les résultats montrent une variation significative entre les souches (test LSD, $p < 0,05$).

La souche S7 s'est distinguée par la production la plus élevée d'AIA suivie des souches S5, S6, S2 et S12. L'analyse de la variance (ANOVA) a confirmé que ces souches figuraient parmi les plus performantes, avec des différences statistiquement significatives par rapport aux autres isolats. À l'inverse, les souches S13, S15, S17, S18, S19, S20 et S21 ont montré des niveaux de production plus faibles ;

La capacité à produire des niveaux élevés d'AIA confère à ces souches des propriétés PGPR accrues, notamment dans la stimulation du développement racinaire, l'amélioration de l'absorption de l'eau et des nutriments et la tolérance aux stress abiotiques, comme la salinité ou la sécheresse (Glick, 2012). Ainsi, les souches les plus performantes, notamment S7, S5, S6, S2 et S12, peuvent être envisagées pour des applications concrètes en agriculture durable et inoculation biofertilisante, en particulier dans des environnements à faible fertilité naturelle.

1.5. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production de cyanure d'hydrogène (HCN) a été détectée chez 54,14 % des souches de *Rhizobium* testées (soit 12 sur 21), comme en témoigne l'apparition d'une coloration orange sur le papier Whatman imbibé de réactif spécifique (figure 6).



Figure 6 : Mise en évidence de la production d'HCN en fonction des souches étudiées

Parmi les souches positives, certaines, comme la souche S6, ont montré une production modérée à faible, tandis que 7 souches (33,33 %) n'ont exprimé aucune activité HCN détectable. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'Ahemad et Kibret (2014) qui ont signalé une fréquence de production de HCN de 52 % chez des isolats de *Pseudomonas fluorescens* issus de la rhizosphère. Une proportion similaire a également été rapportée chez divers PGPR par Blumer et Haas (2000).

Chez les *Rhizobium*, la production d'HCN peut conférer un avantage compétitif dans la rhizosphère en limitant la croissance de microorganismes nuisibles, tout en favorisant

l'établissement symbiotique avec la plante hôte. Ce mécanisme est particulièrement pertinent dans les sols pauvres ou renfermant des pathogènes, où l'action antimicrobienne du HCN favorise la survie des bactéries bénéfiques et stimule la croissance végétale.

1.6. Production d'ammoniac

Parmi les souches testées, 16 souches (76,2%) ont montré une production positive d'ammoniac, révélée par un changement de coloration du jaune à brun après l'ajout du réactif de Nessler (figure 7).



Figure 7 : Mise en évidence de la production de NH₃

Cette forte fréquence est en accord avec les travaux de Kumar et al. (2018), qui ont observé la production d'ammoniac chez environ 70 % des isolats rhizosphériques. Ces résultats confirment que la production d'ammoniac est un trait courant chez les PGPR, jouant un rôle clé dans leur interaction avec les plantes.

Bien que ce mécanisme soit largement étudié chez des genres tels que *Pseudomonas*, *Bacillus* ou *Azotobacter*, plusieurs études récentes ont démontré que des souches de *Rhizobium*, traditionnellement connues pour leur symbiose fixatrice d'azote, possèdent également cette capacité de production extracellulaire d'ammoniac en condition libre (Gopalakrishnan et al., 2015). Cela met en lumière la polyvalence fonctionnelle des *Rhizobium*, capables d'exercer des effets bénéfiques aussi bien dans leur forme symbiotique que libre.

1.7. Activités enzymatiques

L'analyse des activités enzymatiques a révélé une diversité fonctionnelle importante parmi les souches de *Rhizobium* étudiées, traduisant leur aptitude à interagir efficacement avec la rhizosphère et à exercer un rôle bénéfique sur la croissance des plantes.

Dans cette étude, 57,14 % des souches ont exprimé une activité protéolytique. Ce taux est inférieur à celui rapporté par Rasool et al. (2021) (69 %). La production de protéases

extracellulaires est considérée comme un mécanisme indirect, capable de dégrader les protéines constitutives des parois fongiques et de limiter ainsi l'établissement des pathogènes dans la rhizosphère.

L'activité cellulolytique, détectée chez 80,95 % des isolats, reflète la capacité des souches à produire des cellulases. Ces enzymes facilitent non seulement la dégradation de la cellulose des résidus organiques du sol, améliorant la biodisponibilité du carbone, mais également la lyse des parois cellulaires des champignons pathogènes.

Un taux équivalent (80,95 %) a été observé pour l'activité amylolytique. Cette fréquence indique une excellente capacité à hydrolyser l'amidon. Cela suggère une aptitude à utiliser des sources carbonées complexes, favorisant leur colonisation rhizosphérique et leur persistance dans le sol.

L'activité pectinolytique, détectée chez 52,38 % des souches, confirme leur capacité à dégrader la pectine, composant essentiel de la paroi végétale.

L'activité hémolytique a été observée uniquement chez 23,81 % des souches, ce qui indique un faible potentiel pathogène. Cette faible fréquence est cohérente avec les observations de Bevivino et al. (1994), qui ont rapporté une faible incidence de l'hémolyse chez les bactéries rhizosphériques.

Les résultats obtenus montrent que plusieurs souches de *Rhizobium* possèdent des profils enzymatiques variés (figure 8), soulignant leur potentiel en tant que PGPR multifonctionnels.

Chez les *Rhizobium*, traditionnellement reconnus pour leur capacité de fixation d'azote symbiotique, ces fonctions enzymatiques témoignent d'une polyvalence écologique importante.

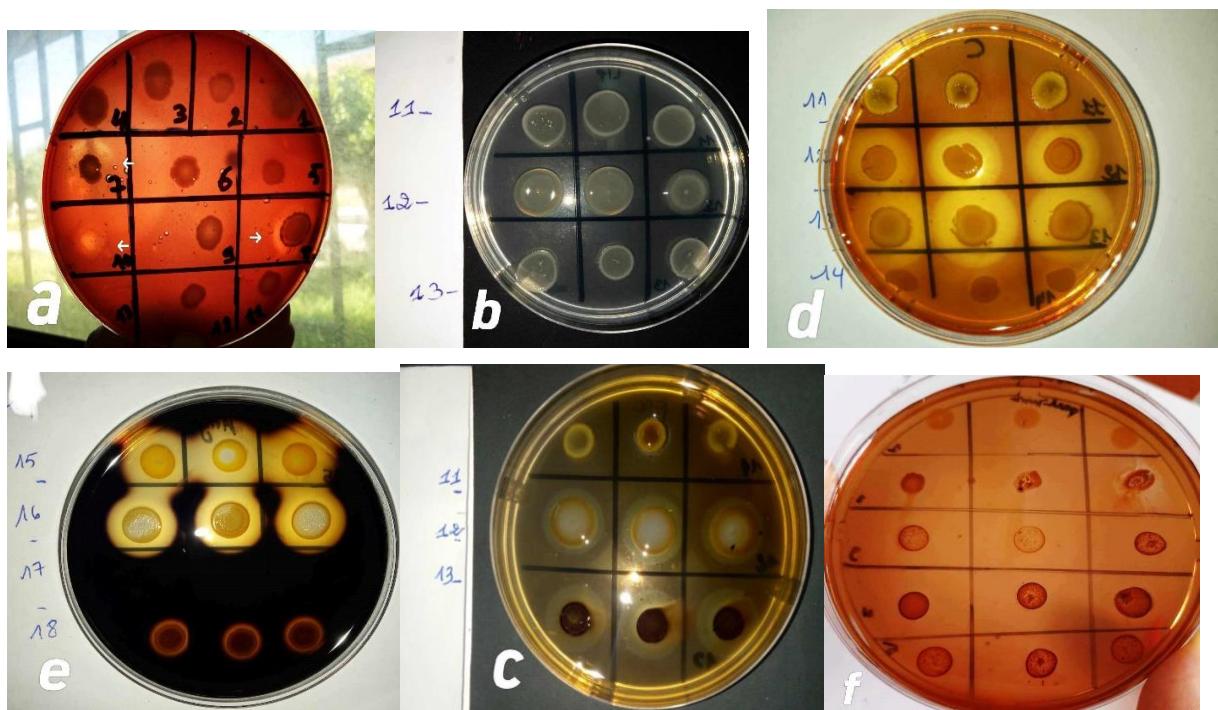


Figure 8 : Mise en évidence des activistes enzymatiques (a. Hémolytique : un halo clair, b. activité lipolytique : un halo opaque, c. activité protease : un halo clair, d. activité cellulase : un halo clair, e. activité amylolytique un halo clair, f. activité pectinolytique : un halo clair)

2. Analyse de la diversité fonctionnelle des souches PGPR par classification hiérarchique (CHA)

Le dendrogramme obtenu par la classification hiérarchique ascendante (CHA), basée sur les résultats des différents tests fonctionnels (traits PGPR), a permis de regrouper les 21 souches de *Rhizobium* en sept classes distinctes, selon un seuil de dissimilarité fixé à 22,27 % (Figure 9).

Classe 1 : Elle regroupe les souches S4, S7, S18 et S9, qui présentent un profil enzymatique riche (cellulases, amylases, pectinases) et une forte production de cyanure d'hydrogène (HCN).

Classe 2 : Cette classe rassemble les souches S10 et S14, marquées par une activité amylolytique élevée et regroupe des souches peu performantes sur les autres fonctions PGPR.

Classe 3 : Cette classe regroupe les souches S19, S1, S20 et S11, aux profils intermédiaires, elles possèdent des fonctions conservées telles que la fixation d'azote atmosphérique, la production d'ammoniac et une activité cellulolytique.

Classe 4 : Constituée des souches S13, S2, S3 et S12, cette classe regroupe les souches les plus riches en traits PGPR, associant solubilisation du phosphate, production d'HCN et d'ammoniac.

Ce profil les rend particulièrement intéressantes pour le biocontrôle et la mobilisation des nutriments. Les différences enzymatiques entre ces souches (protéases, pectinases) renforcent leur complémentarité fonctionnelle, utile dans des formulations microbiennes mixtes.

Classe 5 : Unique par sa composition, cette classe ne comprend que la souche S6 qui présente un profil exceptionnel, combinant fixation de l'azote, production de sidérophores et de HCN, ainsi qu'une très forte activité amylolytique.

Classe 6 : Composée des souches S16, S5, S15 et S8 qui montrent une variabilité modérée sur les traits PGPR, notamment la solubilisation du phosphate, la production d'ammoniac et l'activité protéolytique.

Classe 7 : Elle comprend les souches S17 et S21, caractérisées principalement par la fixation de l'azote et la solubilisation du phosphate tricalcique, deux fonctions clés dans l'amélioration de la fertilité des sols pauvres.

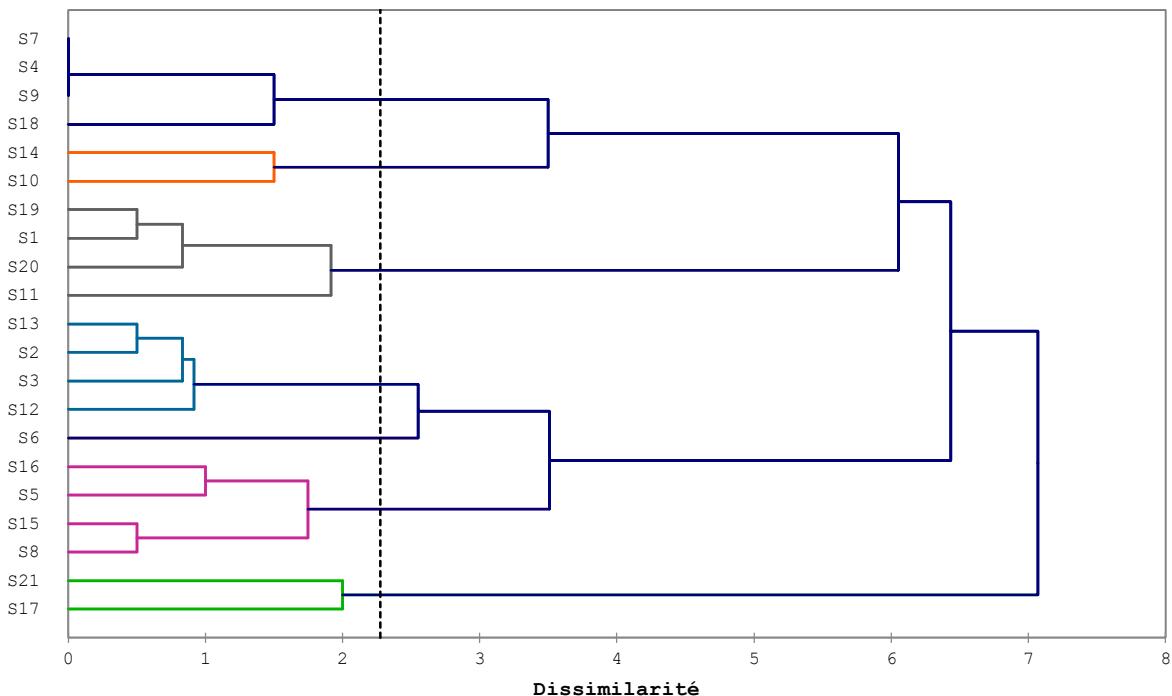


Figure 9 : Classification hiérarchique ascendante basée sur les caractères PGPR

3. Tolérance aux stress abiotiques et formation de biofilm

3.1. Stress salin et de formation de biofilm

En absence du sel (0 mM NaCl), la majorité des souches présentent une bonne aptitude à produire du biofilm, ce qui témoigne de leur potentiel naturel d'adhésion et de colonisation de la rhizosphère. Cependant, plus la salinité augmente, une variabilité marquée dans les réponses a été observée. Ces résultats révèlent une tolérance différentielle au stress osmotique selon les souches.

La distribution des réponses selon les classes observées dans le dendrogramme de classification hiérarchique ascendante (figure 10) révèle une corrélation intéressante entre la richesse en traits PGPR et la tolérance au NaCl. Les souches appartenant aux classes 3, 4 et 5 ; ayant combiné plusieurs fonctions se sont révélées parmi les plus tolérantes, maintenant une formation de biofilm stable même à 150 mM. C'est le cas des souches S11, S7 et S9. À l'inverse, les souches des classes 2 et 7, dépourvues d'activités enzymatiques notables ou d'aptitude à produire des métabolites secondaires protecteurs, ont montré une baisse marquée de production de biofilm.

La capacité des PGPR à former des biofilms sous stress salin est un critère crucial dans la sélection de bioinoculants pour les sols salins.

Ces résultats confirment que la formation de biofilm n'est pas un trait isolé mais dépend étroitement de l'expression conjointe d'autres fonctions PGPR. Les souches S7, S9, S11 et S19, par leur tolérance remarquable et leur richesse fonctionnelle.

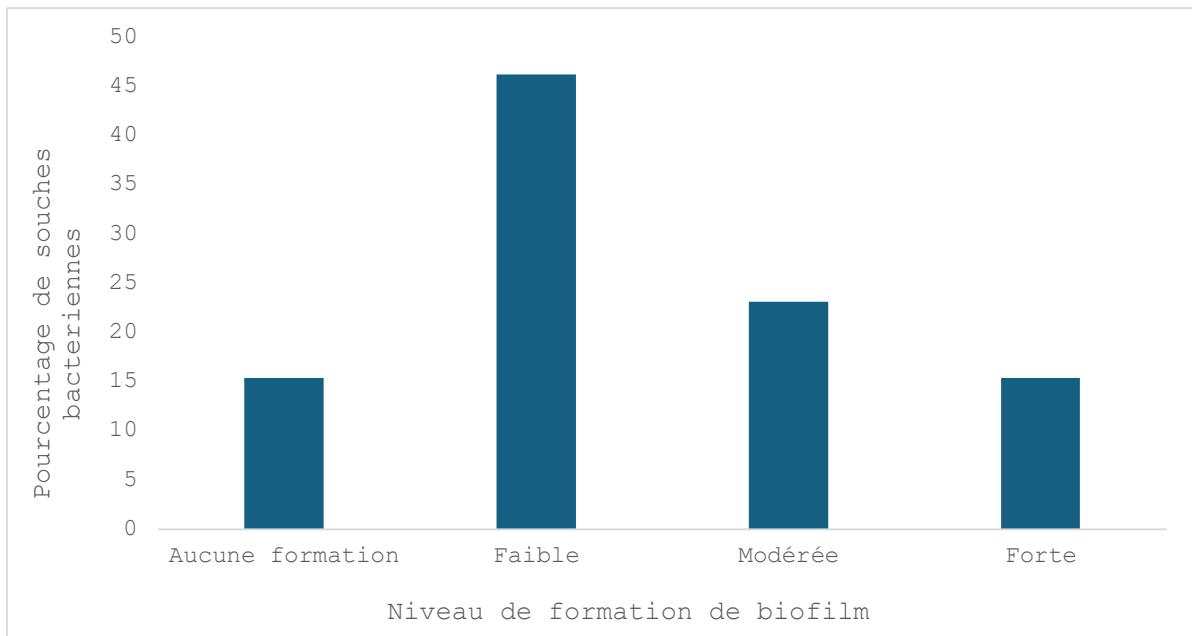


Figure 10 : Evaluation de la formation de biofilm en présence du NACL

3.2. Effets des métaux lourds sur la formation de biofilm

3.2.1. Cas du plomb

La formation de biofilm a été étudiée chez treize souches bactériennes soumises à des concentrations croissantes de plomb (Pb) : 0, 400, 800 et 1600 µg/ml, dans le but d'évaluer leur tolérance à ce stress métallique. Cette approche vise à simuler des conditions de contamination environnementale croissante, notamment dans les sols pollués par des métaux lourds.

À la concentration maximale de 1600 µg/ml de plomb, une forte variabilité de réponses a été observée parmi les souches testées. Cinq souches (S2, S3, S7, S9, S12) illustrant une tolérance élevée au stress métallique. Une seule souche, S19 a été totalement inhibée (-), ne montrant aucune formation de biofilm à ce niveau de contamination.

Selon Harrison et *al.* (2007), la croissance et la production de biofilm aux différentes concentrations seraient liées à une efficacité élevée des mécanismes de protection impliquant la séquestration des ions Pb²⁺. Ces mêmes auteurs ont rapporté que la tolérance aux métaux lourds serait également liée à des mécanismes physiologiques.

Les résultats rapportés par Teitzel et Parsek (2003) ont montré que le biofilm agit comme une barrière physique limitant la pénétration des ions métalliques.

3.2.2. Cas du cadmium

L'évaluation de la formation de biofilm en présence de concentrations croissantes de cadmium (Cd) (0, 20, 40 et 80 µg/ml) montre qu'à la concentration maximale de 80 µg/ml, la tolérance est variable selon les souches testées (figure 11).

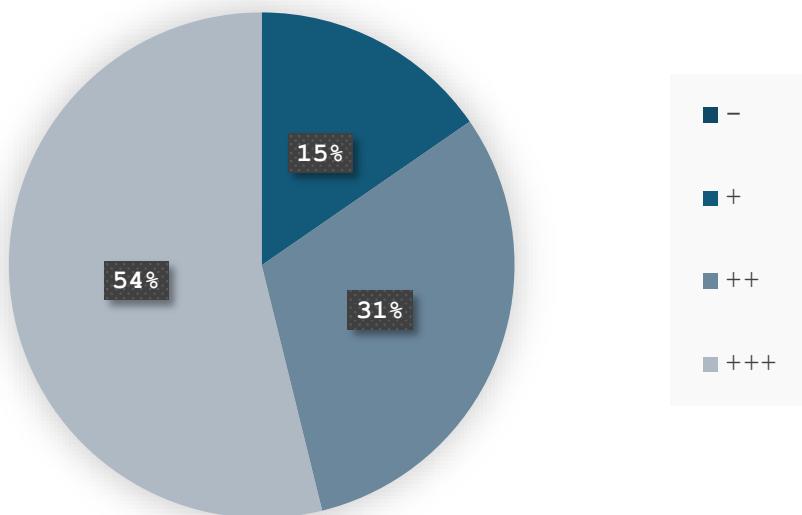


Figure 11 : Distribution des niveaux de tolérance au cadmium

Schue et al. (2011) ont rapporté que divers mécanismes expliquent la détoxication du cadmium chez les bactéries, notamment l'exclusion, la liaison et la séquestration. Le cadmium est éliminé des cellules par des transporteurs d'efflux de métaux réduit sous forme de sulfure de cadmium, précipité sous forme de sels insolubles, immobilisé dans les parois cellulaires ou lié à des agents chélateurs.

4. Evaluation de la production des exopolysaccharides

Le dosage quantitatif des exopolysaccharides produits par les souches de PGPR révèle une variabilité significative entre les isolats testés. La souche S3 se distingue par une production maximale, ce qui représente la concentration la plus élevée parmi toutes les souches analysées. L'analyse de la variance à un facteur (ANOVA), suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes selon la méthode de Fisher LSD, confirme que cette production est significativement supérieure ($p = 0,016$) à celle des souches S8 et S12.

Les souches S5 et S9, bien que présentant une production d'EPS inférieure à S3, S8 et S12, restent classées parmi les productrices intermédiaires.

La faible production d'exopolysaccharides comme dans le cas des souches S11, S13, S21, S7 et S9 serait due, à une non-activation des gènes de biosynthèse des polysaccharides ou à des conditions de culture qui ne favorisent pas leur expression.

5. Relation entre production d'exopolysaccharides et formation de biofilm chez les PGPR

L'analyse conjointe des résultats de production d'exopolysaccharides et de la formation de biofilm chez les souches PGPR étudiées révèle une corrélation positive entre ces deux paramètres physiologiques. Les souches telles que S3, S7, S9 et S12, qui affichent une production élevée ou intermédiaire d'EPS, montrent également une forte formation de biofilm sous stress abiotique (NaCl, Pb, Cd). À l'inverse, des souches comme S11, S13 et S21, qui produisent de faibles quantités d'EPS, montrent une capacité réduite à former des biofilms, en particulier sous stress salin ou métallique.

Conclusion

Ce travail a permis d'examiner en profondeur le potentiel multifonctionnel de plusieurs souches bactériennes, principalement du genre *Rhizobium*, isolées à partir des nodules de différentes espèces de la tribu *Viciae*, dans le but de les valoriser en tant que bioinoculants. L'objectif central était d'évaluer leur aptitude à favoriser la croissance végétale, leurs tolérances à divers stress abiotiques, ainsi que leur capacité à contribuer à la bioremédiation des sols pollués.

Les 21 souches sélectionnées ont été soumises à une série de tests afin de caractériser leur fonction PGPR. Une grande majorité (95,23%) a démontré une capacité à fixer l'azote atmosphérique, confirmant leur rôle potentiel dans l'enrichissement naturel des sols. La solubilisation du phosphate sur milieu solide a montré une variabilité marquée, avec des indices de solubilisation élevés chez les souches S16 et S19.

L'analyse quantitative de la production d'AIA a mis en évidence une importante diversité fonctionnelle. La souche S7 s'est démarquée avec la concentration la plus élevée, suivie de S5, S6, S2 et S1.

La majorité des isolats a produit des sidérophores, dont les types catécholates et hydroxamates ont pu être identifiés selon la nature des halos observés. La production de cyanure d'hydrogène a été détecté chez la moitié des souches, et celle d'ammoniac chez la majorité.

Les tests enzymatiques ont révélé un potentiel métabolique large. Les activités cellulosique et amylolytiques ont été les plus fréquentes (80,95%), suivie des activités protéolytique (52,14%), péctinolytique (52,38%), lipolytique et hémolytique (23,81%).

La formation de biofilms a également été analysée en condition standard et sous stress (Nacl, Cd, Pb). Plusieurs souches ont maintenu une production stable même en conditions extrêmes, ce qui reflète leur résilience écologique.

Ces résultats démontrent que plusieurs souches rhizosphériques possèdent des propriétés bénéfiques. Elles représentent ainsi des candidates adaptées à l'agriculture durable, limitant l'usage d'intrants chimiques.

Néanmoins, ces données nécessitent des validations complémentaires. Il serait pertinent de :

- Tester leur efficacité sur différentes espèces végétales, en condition contrôlée puis en plein champ ;
- Évaluer leur propriétés antifongiques et antimicrobiennes, spécifiques ;
- Identifier les gènes d'intérêt impliqués dans la biosynthèse de composés bénéfiques ;
- Développer des formulations d'inoculant stable adaptées à diverses conditions agro-écologiques ;

- Etudier leur tolérance au stress physique (température, sécheresses, pH, UV, ...);
- Comparer leur performance et leur compétitivité *vis-à-vis* des espèces indigènes des sols.

En somme, cette étude met en évidence l'importance de la sélection et de la valorisation des PGPR performants, notamment du genre *Rhizobium*, comme leviers biologiques clés pour une agriculture plus durable, efficiente et adaptée aux enjeux environnementaux actuels.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Milieu Pikovskaya PVK (g/l)

Glucose.....	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
MgCl ₂ , 6H ₂ O	5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25
KCl.....	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
Agar.....	15
Eau distillée	qsp 1000 mL

Bouillon TSB demi-concentré (g/l)

Digest de caséine (pancréatique)	8,5
Digest de soja (papain digest).....	1,5
Chlorure de sodium (NaCl)	2,5
Phosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	1,25
Glucose.....	1,25
Eau distillée	qsp 1000 mL
pH.....	7,3

Le milieu est ensuite stérilisé par autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Milieu Nitrogen-Free Base (NFB) solide (g/l)

Malate de sodium	5
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
FeCl ₃	0,005
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0005
Agar.....	15
Eau distillée	qsp 1000 mL
pH.....	7

Le milieu est ensuite stérilisé par autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Yeast Mannitol Agar (YMA)

Mannitol	10 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/L
Extrait de levure	0,4 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
NaCl	0,1 g/L
Agar.....	15 g/L
Eau distillée	qsp 1 L
pH	6,8

Le milieu est ensuite stérilisé par autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Milieu de Winogradsky (WS)

Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	0,4 g/L
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ ·7H ₂ O).....	0,8 g/L
Nitrate de potassium (KNO ₃)	4 g/L
Hydrogénophosphate de sodium (Na ₂ HPO ₄).....	1,4 g/L
Saccharose	10 g/L
L-tryptophane	2 g/L
Eau distillée	qsp 1 L

Gélose nutritive enrichie en glycine

Gélose nutritive	25 g/L
Glycine	4,4 g/L
Eau distillée	qsp 1 L

Eau peptonée

Peptone	10 g/L
NaCl	5 g/L

Gélose au carboxyméthylcellulose à 1 % (CMC)

CMC 1 %	10 g/L
Peptone	5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/L
Extrait de levure	2 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
NaCl	5 g/L
Agar.....	15 g/L
Eau distillée	qsp 1 L

pH..... 7,0

Gélose au lait écrémé

Solution de lait écrémé 7 %
Peptone 5g
Extrait de levure 2,5g
Glucose 1g
Agar 15 g
Eau distillée qsp 1000ml
pH..... 7,0

Gélose à l'amidon

Peptone 5g
Amidon soluble (1%) 10g
Agar agar 15g
Eau distillée qsp 1000 ml
pH..... 7,0

Gélose au Tween 80 à 2 %

Tween 80 2 %
Peptone 5g
Extrait de levure 2,5g
Agar agar 15g
Eau distillée qsp 1000 ml
pH..... 5,0

Gélose à la pectine 0,5 %

Pectine 5g
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g/L
 KH_2PO_4 1 g/L
Agar agar 15g
Eau distillée qsp 1000 ml
pH..... 5,54

Gélose au sang

Sang mouton 5%
Peptone 0,5%

Extrait de levure0,3%
NaCl0,5 %
Agar agar1,5%
Eau distilléeqsp 1000 ml
pH.....7,4

Yeast Mannitol Broth (YMB)

Mannitol 10g/L
Extrait de levure..... 0,4g/L
K2HPO4 0,5g/L
MgSo4*7H2O..... 0,2g/L
NaCl 0,1g/L
Eau distillée qsp 1000mL
pH.....7,0

Le milieu est ensuite stérilisé par l'autoclavage à 121°C pendant 15 minutes

Bouillon Luria-Bertani (LB)

Tryptone10g
Extrait de levure5g
Chlorure de sodium0,5g
Eau distilléeqsp 1000 ml

Annexe 2 : Réactifs utilisés

Réactif de Salkowski

Acide perchlorique à 35 % 50 mL
Solution de FeCl₃ à 0,5 M 1 Ml

Solution Chrome Azurol S (CAS)

Solution 1 : dissoudre de Dissoudre 8,28 mL d'acide chlorhydrique (HCl) pur dans 100mL d'eau distillée

Solution 2 : Prélever 500 µL de la solution 1

Solution 3 : Ajouter 13,5 mg de FeCl₃, 6H₂O à la solution 2 sous agitation jusqu'à dissolution complète.

Solution 4 : Dissoudre 12,5 mg de Chrome Azurol S (CAS) dans 10 mL d'eau distillée.

Solution 5 : Mélanger 1,5 mL de la solution 3 avec 7,5 mL de la solution 4

Solution 6 : Dissoudre 36mg de HDTMA (Hexadécytriméthylammonium bromure) dans 10 mL d'eau distillée.

Solution finale de CAS : Mélanger 9 mL de la solution 5 avec 6 mL de la solution 6. La solution obtenue doit être bien homogénéisée avant utilisation.

Solution d'iode à 1%

Iodure de potassium2g
Iode.....	1g
Eau distillée	qsp100 ml

Solution de rouge Congo

Rouge Congo.....	0,05
Éthanol.....	10mL
Eau distillée.....	90mL

Solution de Cristel violette à 0,1%

Cristel violet.....	0,1%
Eau distillée.....	qsp 100mL

Solution de molybdate d'ammonium à 0,96%

Molybdate d'ammonium	0,96g
Eau distillée.....	100 ml

Solution d'Acide ascorbique a 10%

Acide ascorbique	5g
Eau distillée.....	qsp50mL

Solution de tartrate de potassium

Tartrate de potassium	0,1334g
Eau distillée.....	qsp 50 mL

Solution de picrate de sodium

Acide picrique a 5%..... 5g
Eau distillée..... qsp 100mL
Carbonate de sodium a 2%..... 0,2g
Eau distillée qsp 100mL

Solution de glucose

Glucose..... 0,1g
Eau distillée..... qsp 10mL

Solution de phénol à 5%

Phénol.....0,05g
Eau distillée.....qsp 10mL

Annexe 3 : les courbes

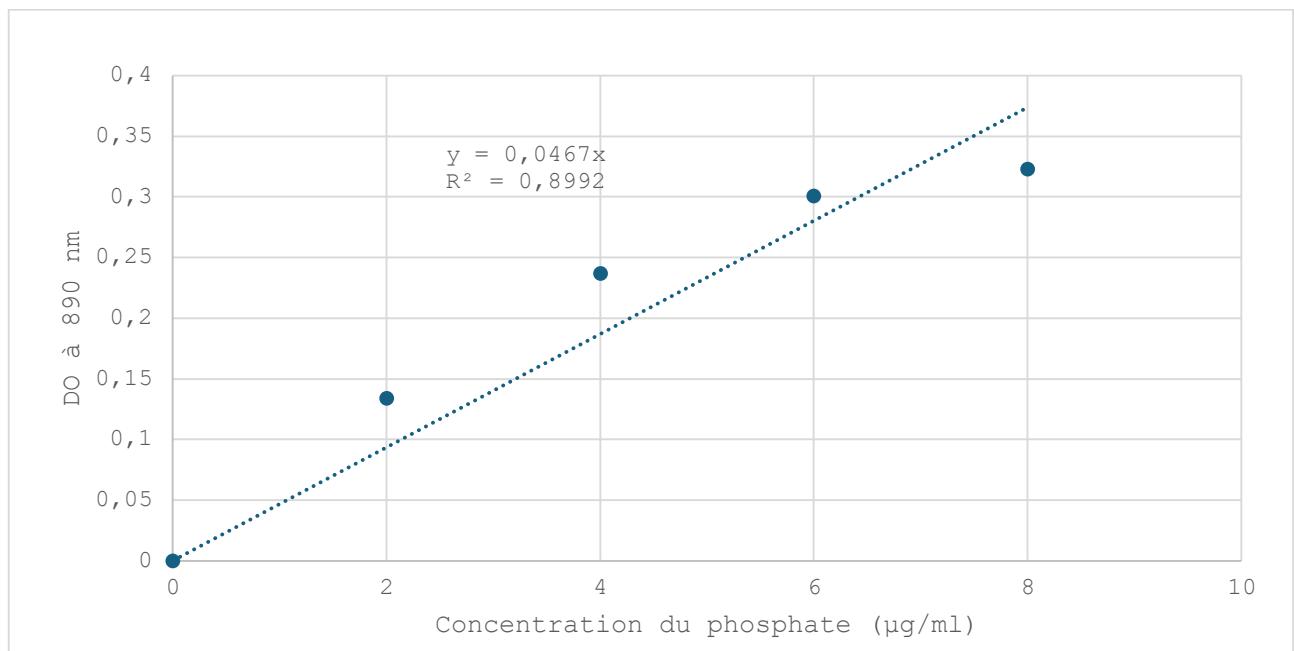


Figure 16 : Courbe d'étalonnage pour dosage du phosphore

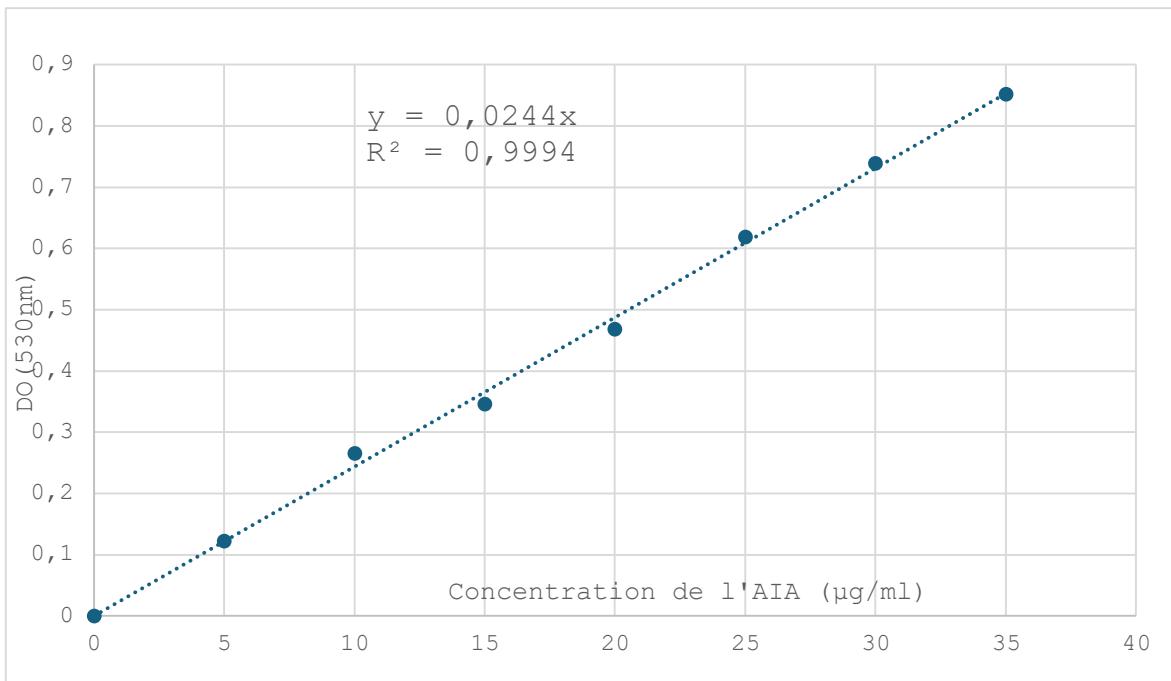


Figure 17 : Courbe d'étalonnage pour dosage de l'acide indole acétique

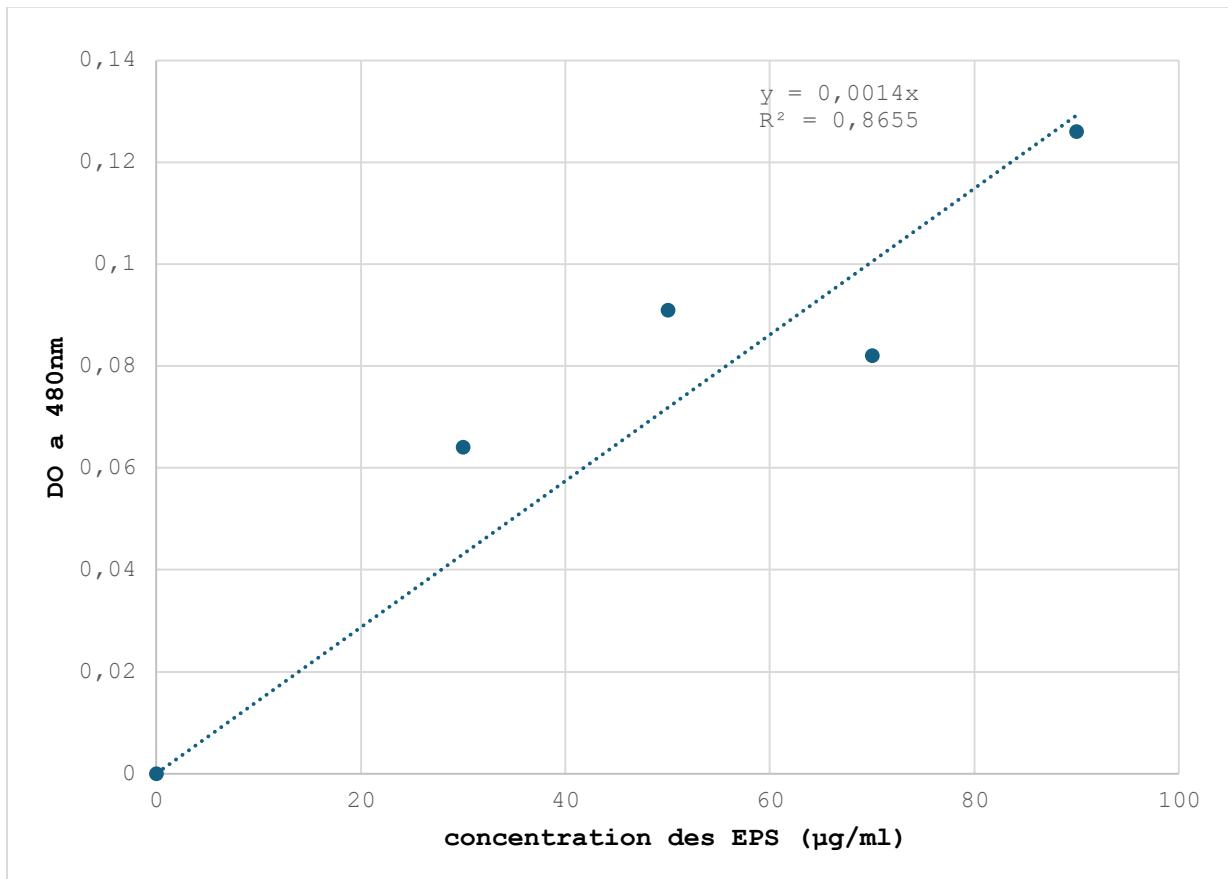


Figure 18 : Courbe d'étalonnage pour dosage d'EPS

REFERENCES BIBLIOGRAPH

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20.
- Ajijah, N., Fiodor, A., Pandey, A. K., Rana, A., & Pranaw, K. (2023). *Plant growth-promoting bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: A multifaceted agent for sustainable agriculture*. *Diversity*, 15(1), 112. <https://doi.org/10.3390/d15010112>
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., & Lalande, R. (1998). Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth-promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes and lettuce. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(9), 791–797.
- Akhreim, A. A., Jadhav, A. U., Gaballa, M. F., Ahire, K. D., Abid, A. A. D., Sulaiman, G., & Attitalla, I. (2024). The contribution of stress-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from abiotic-stressed ecosystems to sustainable plant management: A comprehensive review. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*. (2024), 22(2):14202-14223. E-ISSN: 2221-7630;P-ISSN: 1727-4915.
- Alhoqail, W. A. (2025). *Exopolysaccharide-Producing PGPR: Mechanisms for Alleviating Salinity-Induced Plant Stress*. *Polish Journal of Environmental Studies*. <https://doi.org/10.15244/pjoes/196747>
- Alomari et al. (2024). Rocha, D. J. P., Santos, C. S. & Sillankorva, S. (2021). Optimized Protocols for Biofilm Analysis in Saline Environments. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 678450.
- Alzate Zuluaga, M. Y. Fattorini, R., Cesco, S., & Pii, Y. (2024). *Plant-microbe interactions in the rhizosphere for smarter and more sustainable crop fertilization: the case of PGPR-based biofertilizers*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1440978. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1440978>
- American Society for Microbiology. (2012). *Starch agar protocol* (Archana Lal & Naowarat Cheeptham, authors). In *ASM Bacteriology Laboratory Manual*. American Society for Microbiology
- Amri, M., Rjeïbi, M. R., Gatrouni, M., Mateus, D. M. R., Asses, N., Pinho, H. J. O., & Abbes, C. (2023). *Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils*. *Microorganisms*, 11(3), 783. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030783>

- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160–167.
- Anbuganesan, V., Vishnupradeep, R., Bruno, L. B., Sharmila, K., Freitas, H., & Rajkumar, M. (2024). *Combined Application of Biochar and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Improves Heavy Metal and Drought Stress Tolerance in Zea mays*. *Plants*, 13(8), 1143. <https://doi.org/10.3390/plants13081143>
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), E1621–E1630.
- Bharti, N. et al. (2022). Salt-tolerant PGPRs and their biofilm formation potential under saline conditions. *Environmental Sustainability*, 5(3), 345–356.
- Bhutani N., Maheshwari R., Negi M., & Suneja P. (2018). Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* species from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters. *Journal of Plant Science*, 65(1), 1–15. doi:10.1163/22238980-00001025
- Bérard, A., Clavel, T., Le Bourvellec, C., Davoine, A., Le Gall, S., Doussan, C., & Bureau, S. (2020). Exopolysaccharides in the rhizosphere: A comparative study of extraction methods. Application to their quantification in Mediterranean soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 149, 107961. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107961>
- Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., & Bedi, N. (2024). *Biofilms formation in plant growth-promoting bacteria for alleviating agro-environmental stress*. *Science of the Total Environment*, 907, 167774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167774>
- Bhattacharyya, P. N., & Ghosh, S. (2024). *Ammonia production by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): A key trait for enhancing nitrogen availability and plant health*. *PeerJ*, 12, e17882. <https://doi.org/10.7717/peerj.17882>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E. & Schulze-Lefert, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838 (2013).)
- Banerjee, A., Sarkar, S., Cuadros-Orellana, S., & Bandopadhyay, R. (2019). Exopolysaccharides and biofilms in mitigating salinity stress: The biotechnological

- potential of halophilic and soil-inhabiting PGPR microorganisms. In S. Das & H. R. Dash (Eds.), *Microorganisms in saline environments: Strategies and functions* (pp. 133–153). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_6
- Berza, B., Sekar, J., Vaiyapuri, P., et al. (2022). Evaluation of inorganic phosphate solubilizing efficiency and multiple plant growth promoting properties of endophytic bacteria isolated from root nodules *Erythrina brucei*. *BMC Microbiology*, 22:276. DOI : 10.1186/s12866-022-026887
 - Bevvino, A., Tabacchioni, S., Chiarini, L., Carusi, M. V., Del Gallo, M., & Visca, P. (1994). Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology*, 148(5), 1551–1558. DOI: 10.1099/13500872-140-5-1069
 - Bhagat D, Sharma P, Sirari A, Kumawat KC (2014). Screening of *Mesorhizobium* spp. for control of Fusarium wilt in chickpea in vitro conditions. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3:923-930.
 - Çam, S., & Bicek, S. (2023). Effects of temperature, salt, and phosphate on biofilm and exopolysaccharide production by *Azotobacter* spp. *Archives of Microbiology*, 205(3), 87. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03428-9>
 - Campo-Pérez, V., Alcàcer-Almansa, J., Julián, E., & Torrents, E. (2023). A high-throughput microtiter plate screening assay to quantify and differentiate species in dual-species biofilms. *Microorganisms*, 11(9), 2244. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092244>
 - Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A laboratory manual* (10th ed., p. 507). Boston, MA: Pearson
 - Carezzano, M. E., Alvarez Strazzi, F. B., Pérez, V., Bogino, P., & Giordano, W. (2023). *Exopolysaccharides synthesized by rhizospheric bacteria: A review focused on their roles in protecting plants against stress*. *Applied Microbiology*, 3(4), 1249–1261. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3040086>
 - Chen, Q., Song, Y., An, Y., Lu, Y., & Zhong, G. (2024). *Mechanisms and impact of rhizosphere microbial metabolites on crop health, traits, functional components: a comprehensive review*. *Molecules*, 29(24), 5922. <https://doi.org/10.3390/molecules29245922>
 - Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia microbiologica*, 62, 425-435.
 - de Andrade, L. A., Santos, C. H. B., Frezarin, E. T., Sales, L. R., & Rigobelo, E. C. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, 11(4), 1088.

- Devi, S., Sharma, S., Tiwari, A., Bhatt, A. K., Singh, N. K., Singh, M., Kaushalendra, & Kumar, A. (2023). *Screening for Multifarious Plant Growth Promoting and Biocontrol Attributes in Bacillus Strains Isolated from Indo Gangetic Soil for Enhancing Growth of Rice Crops.* *Microorganisms*, 11(4), 1085. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041085>
- Ehinmitan, E., Losenge, T., Mamati, E., Ngumi, V., Juma, P., & Siamalube, B. (2024). *BioSolutions for Green Agriculture: Unveiling the Diverse Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.* *International Journal of Microbiology.* <https://doi.org/10.1155/2024/6181491>
- Fahde, S., Boughribil, S., Sijilmassi, B., & Amri, A. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture*, 13(7), 1279. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071279>.
- Fanai, A., Bohia, B., Lalremruati, F., Lalhriatpuii, N., Lalrokimi, L., Lalmuanpuii, R., Singh, P. K., & Zothanpuia. (2024, août 20). *Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review.* *PeerJ*, 12, e17882. <https://doi.org/10.7717/peerj.17882>
- Ghanaim, A. M., Mohamed, H. I., & El-Ansary, A. E. (2025). Production and characterization of exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* AG01 with some medical potential applications. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02730-z>.
- Giauque, H., Connor, E. W., & Hawkes, C. V. (2019). Endophyte traits relevant to stress tolerance, resource use and habitat of origin predict effects on host plants. *New Phytologist*, 221(4), 2239-2249.]
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012(1), 963401
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Prospects for Development of Sustainable Agriculture.* *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7(2), 96–102
- Gupta, P., Diwan, B. (2014). Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 5, 1–18.

- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: Challenges and opportunities. *Biotech*, 5(4), 355–377.
- Hasan, A., Tabassum, B., Hashim, M., & Khan, N. (2024). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as a Plant Growth Enhancer for Sustainable Agriculture: A Review. *Bacteria*, 3(2), 59–75. <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598.
- Harrison, J. J., Ceri, H., & Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), 928–938.
- Illmer, P., & Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3), 257–263.
- Joseph, B., Patra, R. R., & Lawrence, R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, 1(2), 141–152.
- Janati, W., Mikou, K., El Ghadraoui, L., & Errachidi, F. (2022, 26 Sept.). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing legumes rhizosphere in Morocco. *Frontiers in Microbiology*, 13:958300. DOI : 10.3389/fmicb.2022.958300
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2009). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 43–54. <https://doi.org/10.1051/agro.2008027>
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019, Article ID 4917256, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Kanlayakrit, W., & Boonpan, A. (2007). Screening of halophilic lipase-producing bacteria and characterization of enzyme for fish sauce quality improvement. *Kasetsart Journal: Natural Science*, 41, 576–585.
- Kaur, R., Devi, S. & Kaur, P. (2019). Salt Stress Modulation of PGPR Activity: A Review. *Applied Soil Ecology*, 143, 101-112

- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- Kundan, D., Nath, D., & Chakraborty, S. (2023). *Enhancing plant growth-promoting rhizobacterial activities through consortium exposure: A review*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1099999. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1099999>
- Li, Xin, Lei Qiao, Yaping Huang, Dongchu Li, Minggang Xu, Tida Ge, Jeroen Meersmans, Wenju Zhang, et al. (2023). *Manuring improves soil health by sustaining multifunction at relatively high levels in subtropical area*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 353, 108539. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108539>
- Li, Y., Narayanan, M., Shi, X., Chen, X., Li, Z., & Ma, Y. (2024). *Biofilm formation in plant growth-promoting bacteria for alleviating agro-environmental stress*. *Science of the Total Environment*, 907, 167774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167774>
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. DOI 10.1111/1751-7915.13517
- Ling, N., Wang, T. & Kuzyakov, Y. Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nat Commun* 13, 836 (2022). [https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9.\).](https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9.)
- Loper, J. E., & Schroth, M. N. (1986). Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76, 386-389
- Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum*, 1(2), 142–146. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x>
- Martínez-Hidalgo, P., Barroso, C., & García, J. M. (2014). Rhizobial biology and its biotechnological applications. *Symbiosis*, 62(2), 123–135.
- Mishra, P. K., Mishra, S., Selvakumar, G., & Bisht, J. K. (2011). Coinoculation *Bacillus thuringiensis* KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances nodulation and yield of *Pisum sativum* L. under rainfed conditions. *European Journal of Soil Biology*, 47(5), 374–379.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429–448.

- Nautiyal, C. S. (1999). *An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms*. FEMS Microbiology Letters, 170(1), 265–270 doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. Journal of Biological Chemistry, 270(45), 26723–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- Nocelli, N., Bogino, P. C., Banchio, E., & Giordano, W. (2016). Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. Materials, 9(6), 418.
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. International Journal of Molecular Sciences, 13(11), 14002–14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. Journal of Visualized Experiments, 47, 2437.
- Olanrewaju, O.S.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 2017, 33, 197
- Pailin, T., Kang, D. Y., & Schmidt, K. A. (2001). Detection of extracellular proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures grown on skim milk agar. *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), 45–49. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00954.x>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. Critical Reviews in Plant Sciences, 34(1-3) 17–42.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- Piao, Y., Condrich, A., Scranton, S., Hebner, C., Lu, L., & Ali, M. A. (2024). Utilizing plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to advance sustainable agriculture. *Bacteria*, 3(4), 434–451. <https://doi.org/10.3390/bacteria3040030>
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the growth of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362–370.
- Pinho, D. P., Contesini, F. J., Costa, T. M. H., Baião, D. G., Santos Neto, J. C., Pereira, J. M., & Rodrigues, R. (2021). Screening and characterization of thermostable amylase-producing bacteria isolated from soil samples of Afdera, Afar Region (Ethiopia).

- International Journal of Microbiology*, 2021, Article 5592885.
<https://doi.org/10.1155/2021/559288>.
- Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2012). Bacterial biofilm formation under salt stress and its effect on plant growth promoting activities. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 512–521.
 - Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., & Moënne-Locoz, Y. (2003). Phylogeny HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant and HCN synthesis capacity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(6), 525–535.
 - Rasool, A., Mir, M. I., Zulfajri, M., Hanafiah, M. M., Unnisa, S. A., & Mahboob (2021). Plant Growth Promoting And Antifungal Asset Of Indigenous Rhizobacteria Secluded From Saffron (*Crocus Sativus L.*) Rhizosphere. *Microbia Pathogenesis*, 150, 104734.
 - Rather, M., Neog, P., Gupta, K., & Mandal, M. (2022). Microbial biofilm-mediated bioremediation of heavy metals: A sustainable approach. In R. Verma & V. Meena (Eds.), *Microbes and microbial biotechnology for green remediation* (pp. 485–502). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90452-0.00030-X>.
 - Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 305–339.
 - Riseh, R. S., Vazvani, M. G., Hajabdollahi, N., & Thakur, V. K. (2023). *Bioremediation of heavy metals by rhizobacteria*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(8), 4689–4711. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04177-z>
 - Riva, A., Borgo, F., Lassandro, C., Verduci, E., Morace, G., & Borghi, E. (2019) From the environment to the host: how soil bacteria like Rhizobium and
 - Rodge, S. P., sable, S. K., salve, S. K., sawant, S. A., & patil, N. P. (2016). Isolation and characterization of PGPR from roots of *Ficus religiosa* growing on concrete walls and its effect on plant growth under drought condition *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(9), 583-593
 - Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

- Saberi Riseh, R., Vatankhah, M., Hassanisaadi, M., & Ait Barka, E. (2024). *Unveiling the role of hydrolytic enzymes from soil biocontrol bacteria in sustainable phytopathogen management.* *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 29(3), 105. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2903105>
- Saghafi, D., Ghorbanpour, M., Ajirloo, H. S., & Lajayer, B. A (2019), Enhancement of growth and salt tolerance in Brassica napus L. seedlings by halotolerant Rhizobium strains containing ACC-deaminase activity. *Plant Physiology Reports*, 1-11.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P.(2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Saharan, B. S., Beniwal, N., & Duhan, J. S. (2024). From formulation to function: A detailed review of microbial biofilms and their polymer-based extracellular substances. *The Microbe*, 5, 100194. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100194>
- Sandhya, V., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2009).Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharidesproducing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biologia Plantarum*, 53(3), 471–477.DOI:10.1007/s00374-009-0401-z
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Afridi, M. S., Mitra, D., Valencia-Cantero, E., & Peralta-Videa, J. R. (2024). *Trichoderma and Bacillus multifunctional allies for plant growth and health in saline soils: recent advances and future challenges.* *Frontiers in Microbiology*, 15, 1423980. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1423980>
- Schue M, Fekete A, Ortet P, Brutesco C, Heulin T, et al. (2011). Modulation of Metabolism and Switching to Biofilm Prevail over Exopolysaccharide Production in the Response of Rhizobium alamii to Cadmium. *PLoS ONE* 6(11): e26771. doi:10.1371/journal.pone.0026771
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. Accès en ligne
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587.

- Shokri, D., & Emtiazi, G. (2010). Indole-3-acetic acid production by Azospirillum brasilense and Pseudomonas fluorescens in the presence of tryptophan. African Journal of Microbiology Research, 4(13), 1491–1494.
- Shrestha, S., Khatiwada, J. R., Zhang, X., Chio, C., Kognou, A. L. M., Chen, F., Han, S., Chen, X., & Qin, W. (2021). Screening and molecular identification of novel pectinolytic bacteria from forest soil. *Fermentation*, 7(1), 40. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010040>
- Siddiqui, I. A., & Shaukat, S. S. (2003). Suppression of root-rot disease by fluorescent pseudomonads in tomato: The role of HCN and antifungal metabolites. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 323–332.
- Singh, R. P., Jha, P. N. (2019). A Halotolerant PGPR Rhizobium sp. Confers salinity tolerance in rice plants through induction of antioxidant defense systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(8), 1–13.
- Sinha, S., Mukherjee, S. K. (2017). Cadmium-induced siderophore production and biofilm formation by a cadmium-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: A strategy for cadmium sequestration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 129–138.
- Slama, H. B., Triki, M. A., Chenari Bouket, A., Ben Mefteh, F., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Cherif-Silini, H., Vallat, A., Oszako, T., Gharsallah, N., & Bouket, A. C. (2019). Screening of the high-rhizosphere competent *Limoniastrum monopetalum* culturable endophyte microbiota allows the recovery of multifaceted and versatile biocontrol agents. *Microorganisms*, 7(8), 249. <https://doi.org/10.3390/microorganisms708024>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganismplant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- Tahir, M., & Sarwar, M. A. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Pak. j. life soc. Sci. Group* 2013, 19, 79–87.
- Teitzel, G. M., & Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2313–2320. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003>

- Timmusk, S. et al. (2014). Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced oxidative stress. *Plant and Soil*, 374(1), 35–50.
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). *Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture*. *Plants*, 11(22), 3065. <https://doi.org/10.3390/plants11223065>
- Tsegaye, Z., Gizaw, B., Tefera, G., Feleke, A., Chaniyalew, S., Alemu, T., & Assefa, F. (2019). Isolation and biochemical characterization of plant growth promoting (PGP) bacteria colonizing the rhizosphere of tef crop during the seedling stage. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 3(1), 013-027.
- Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2), 137–144.
- Voccianti, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022). The Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Mitigating Plant's Environmental Stresses. *Applied Sciences*, 12(3), 1231. <https://doi.org/10.3390/app12031231>
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24.
- Wang, R., Chang, Y. L., Zheng, W. T., Zhang, D., Zhang, X. X., Sui, X. H., ... & Chen, W. X. (2013). *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and applied microbiology*, 36(2), 101-105.
- Wang, Z., Zhang, H., Liu, L., et al. (2022). Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their abilities of phosphorus solubilization and wheat growth promotion. *BMC Microbiology*, 22:296. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02715-7>
- Wróbel, M., Śliwakowski, W., Kowalczyk, P., Kramkowski, K., & Dobrzyński, J. (2023). Bioremediation of heavy metals by the genus *Bacillus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(6), 4964. <https://doi.org/10.3390/ijerph20064964>
- Yadav, M. K., Song, J. H., Vasquez, R., & Kang, D.-K. (2024). Methods for detection, extraction, purification, and characterization of exopolysaccharides of lactic acid bacteria – A systematic review. *Foods*, 13(22), 3687. <https://doi.org/10.3390/foods13223687>.

- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2009). Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In Microbial strategies for crop improvement, Springer, 23–50.
- Zaidi, A., Tripathi, V., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2022). Plant growth promoting rhizobacterial biofertilizers for crop production: The past, present, and future. *Frontiers in Plant Science*, 13, Article 1002448.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1002448>
- Zhang, J., Xiao, Y., Wang, H., Zhang, H., Chen, W., & Lu, W. (2023). Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharide: Formation, immunomodulatory ability, health effects, and structure–function relationship. *Microbiological Research*, 274, 127432.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127432>
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324.

Résumé

Cette étude met en évidence la complémentarité fonctionnelle de plusieurs souches de PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), ouvrant la voie à la formulation d'un consortium bactérien synergique. La souche S7, productrice d'acide indole acétique (IAA), stimule l'allongement et la ramifications des racines, améliorant ainsi l'exploration du sol. La souche S16, quant à elle, se distingue par une forte capacité de solubilisation du phosphate, contribuant à une meilleure nutrition minérale des plantes. La production d'exopolysaccharides (EPS) et la formation de biofilm par la souche S3 assurent une protection cellulaire accrue et favorisent l'ancrage durable des bactéries dans la rhizosphère. En parallèle, la souche S5 présente des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de polymères organiques, participant à la libération de nutriments et à la défense contre les pathogènes. La production de sidérophores par la souche S12 améliore la disponibilité du fer dans l'environnement racinaire, un élément crucial pour la croissance végétale. Enfin, la tolérance au stress abiotique de la souche S9 confère au consortium une stabilité fonctionnelle dans des conditions environnementales contraignantes.

Mots clés : PGPR, Rhizobium, Consortium bactérien, Solubilisation du phosphate, Biofilm, Agriculture durable

Abstract

This study highlights the functional complementarity of several strains of PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), paving the way for the formulation of a synergistic bacterial consortium. Strain S7, which produces indole acetic acid (IAA), stimulates root elongation and branching, thereby improving soil exploration. Strain S16, meanwhile, stands out for its high phosphate solubilisation capacity, contributing to better mineral nutrition for plants. The production of exopolysaccharides (EPS) and the formation of a biofilm by strain S3 provide increased cell protection and encourage the bacteria to take root in the rhizosphere over the long term. At the same time, strain S5 has enzymatic activities involved in the degradation of organic polymers, helping to release nutrients and defend against pathogens. The production of siderophores by strain S12 improves the availability of iron in the root environment, a crucial element for plant growth. Lastly, the abiotic stress tolerance of strain S9 gives the consortium functional stability under restrictive environmental conditions.

Keywords : PGPR, *Rhizobium*, Bacterial consortium, Phosphate solubilization, Biofilm, Sustainable agriculture

ملخص

تسلط هذه الدراسة الضوء على التكامل الوظيفي للعديد من سلالات البكتيريا الجذرية المُعزّزة لنمو النبات (PGPR)، مما يمهد الطريق لتكوين تحالف بكتيري متآزر. تُحَفَّر السلاسلة S7، المنتجة لحمض الإندول الأسيتيك (IAA)، استطالة الجذور وتفرّعها، مما يُحسّن من استكشاف التربة. من ناحية أخرى، تتميز السلاسلة S16 بقدرتها العالية على إذابة الفوسفات، مما يُسهم في تحسين تغذية النباتات بالمعادن. يضمن إنتاج عديدات السكاريد الخارجية (EPS) وتكوين الأغشية الحيوية بواسطة السلاسلة S3 زيادة الحماية الخلوية ويعزّز ترسيخ البكتيريا بشكل مستدام في منطقة الجذور. بالتوازي مع ذلك، تُظهر السلاسلة S5 أنشطة إنزيمية تشارك في تحلل البولимерات العضوية، مشاركةً في إطلاق العناصر الغذائية والدفاع ضد مسببات الأمراض. يُحسّن إنتاج السلاسلة S12 لحواملي الحديد من توافر الحديد في بيئه الجذور، وهو عنصر أساسى لنمو النبات. أخيراً، يمنح تحمل الإجهاد غير الحيوي للسلاسلة S9 استقراراً وظيفياً للاتحاد في ظل الظروف البيئية المجهدة.

الكلمات المفتاحية: PGPR، الريزوبيوم، اتحاد البكتيريا، إذابة الفوسفات، الأغشية الحيوية، الزراعة المستدامة.