

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université de Blida 1**

**Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie**

**Département De Biotechnologie et Agro-écologie**

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique**

**Option : Biotechnologie Microbienne**

**L'utilisation des Rhizobacteries (biostimulation) dans la promotion  
de la croissance des plantes**

**Présenté par :**

**Mlle Lina Mouloua**

**et**

**Mlle Hind Secraoui**

**Soutenu devant les membres de jury :**

**Mme F. AMMAD**

**Présidente**

**M.C.A**

**U.BLIDA 1.**

**Mme A.YALA**

**Examinatrice**

**Docteur**

**U.BLIDA 1.**

**Mme D.TOUA**

**Promotrice**

**M.A.A**

**U.BLIDA 1.**

**BLIDA. 16 / 07 /2022**

# Remerciements

Avant tout nous remercions **ALLAH** le tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la patience pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et notre remerciement aux membres de jury : Notre enseignante **Mme Ammad F**, qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de président de jury.

**Dr. YALA A**, qui a accepté de faire partie de ce jury et examiner ce travail et consacré de son temps pour son évaluation.

Nos vifs remerciements à notre promotrice **Mme.Toua D** , qui a accepté la responsabilité de superviser ce travail , pour son aide , ses conseils , sa disponibilité, ces précieux encouragements, sa patience et sa confiance. Nous lui témoignons , notre gratitude et notre reconnaissance.

On tient à exprimer notre grande considération et nos vifs remerciements à nos enseignants : **Pr Benchaaben, Mme Ammad, Mme Benkortbey, Mme Bouchenak, Mme Benoussaid.**

Ainsi que le personnel du département Biotechnologie trouve ici nos sincères remerciements.

Enfin on remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin , directement ou indirectement à réaliser ce travail.

**Lina et Hind**

Je dédie ce travail à :

A la mémoire de mon Cher père ‘ Djidji ‘

J’aurais tant souhaité votre présence en ce moment pour partager ma joie avec vous. Papa tu m’as toujours demandé d’être forte , correcte et faire le bien , jésais que cet accomplissement t’aurai rendu très fier de moi .  
Que vos âmes reposent en paix.

Ma mère ‘Mimi’ Mes chers frères , Billel et Abdou et ma sœur ,Loubna etBadiaa .

Je vous remercie pour votre soutien continu. Je suis très chanceuse de vous avoir à mes côtés. Je vous serai toujours reconnaissante d’avoir tout le temps cru en moi et de me rassurer pendant les moments de doute que j’ai pu avoir pendant la réalisation de ce travail et pour votre disponibilité quand j’en avais besoin. Je vous souhaite ce qu’il y a de meilleur.

**Hind**

Je dédie ce travail à :

Mes parents ;

Aucune dédicace au monde , aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur l'amour et la gratitude que j'ai pour vous . Chaque ligne de ce travail , chaque mot et chaque lettre exprime la reconnaissance, l'estime, le respect et le merci à vous qui êtes mes parents. Vous êtes les meilleurs parents qu'un enfant rêverait d'avoir. Que dieu vous garde à moi , vous protège et vous procure bonne santé inchaa Allah .

Mes chers frères , Mounir et Amir , ma sœur Ferial et ma nièce Mira

Je vous remercie pour votre soutien continu. Je suis très chanceuse de vous avoir à mes côtés. Je vous serai toujours reconnaissante d'avoir tout le temps cru en moi et de me rassurer pendant les moments de doute que j'ai pu avoir pendant la réalisation de ce travail et pour votre disponibilité quand j'en avais besoin. Je vous souhaite ce qu'il y a de meilleur.

**Lina**

## ملخص:

### العنوان: استخدام البكتيريا الجذرية (التحفيز الحيوي) في تعزيز نمو النبات.

تعد الضغوط الحيوية واللاأحيائية بشدة من إنتاج النبات وإنتاجيته. من الأهمية بمكان الإجهاد الملح الذي لا يحد فقط من نمو النبات وبقائه ، ولكنه يؤثر على خصوبة التربة ويهدد استدامة النظم البيئية الزراعية تتفاقم المشكلة في المناطق القاحلة وشبه القاحلة الهشة حيث يؤدي التبخر المرتفع وانخفاض هطول الأمطار واستخدام المياه المالحة للري إلى تسريع تملح التربة. تعتبر البقوليات من الأطعمة المغذية جدًا للناس وتوفر العناصر الغذائية الأساسية للنظم البيئية ، وهي عنصر أساسي للزراعة المستدامة. يمكنهم استعادة صحة التربة من خلال قدرتهم على تحديد النيتروجين في تفاعل تكافلي مع جذور التربة. ومع ذلك ، فإن الإجهاد الملحي يحد بشدة من الإنتاجية وقدرة النيتروجين في البقوليات. تعزز البكتيريا الجذرية المعزولة لنمو النبات (PGPR) والبكتيريا الشعاعية بشكل أساسي نمو النبات عن طريق إنتاج الهرمونات النباتية ، وحيدات الحديد ، والمضادات الحيوية والمركبات المضادة للفطريات ، وإذابة الفوسفات وتوفير العداء للكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية. بالإضافة إلى ذلك ، فإن للبكتيريا الشعاعية تأثيرات مفيدة على الإيقاع ونمو البقوليات. في هذه الدراسة ، تم استخدام البكتيريا الشعاعية المعزولة من منافذ مختلفة ولها أنشطة PGP في تجارب التلقيح المشترك مع الجذور في جذور نباتات *Medicago sativa* المعرضة للإجهاد الملحي. تشير النتائج إلى أن البكتيريا الشعاعية التي تتحمل الجفاف والملوحة مع سمات PGP المتعددة يمكن أن تزيد من نمو البرسيم في ظل ظروف ملحية ، في وجود أو عدم وجود بكتيريا جذرية تكافلية. وبالتالي ، يمكن أن تكون البكتيريا الشعاعية المكتشفة في هذه الدراسة أسمدة حيوية مناسبة في صياغة المنتجات الزراعية التي تعمل على تحسين نمو النبات والصحة والإنتاجية في التربة المالحة ، وهو بديل ضروري للزراعة الحديثة والتنمية المستدامة. ركز عملنا على دراسة مقالتين تتضمن استخدام الريزوبيوم وحده و التلقيح المشترك مع البكتيريا الشعاعية في ظل ظروف معينة من الإجهاد الأحيائي من أجل رؤية تأثيرهما على نمو البرسيم ادى التحليل الى الاستنتاج التالي :

- في المقال الأول ، أعطى تطبيق *Rhizobium O172* المعزول من منطقة ورقلة والمُلقح تحت الماء والإجهاد الملحي نتائج في تعزيز نمو البرسيم مقارنة بالسلالات المعزولة الأخرى.

- في المقال الثاني ، أظهر التلقيح المشترك للسلالة المرجعية *Sm 1021* و *Sm2011* مع 5 سلالات من البكتيريا الشعاعية المعزولة من بسكرة وسكيدة نموًا أفضل وتحملًا أفضل مقارنة بتلقيح ريذوبيوم وحده.

الكلمات الرئيسية: PGPR / الجذور / البكتيريا الشعاعية / البرسيم / التحفيز الحيوي / الإجهاد اللاأحيائي.

## Résumé :

### **Titre : Utilisation des rhizobactéries (bio-stimulation) dans la promotion de la croissance des plantes.**

Les stress biotiques et abiotiques limitent gravement la production et la productivité des plantes. Le stress salin revêt une importance notable, car il limite non seulement la croissance et la survie des plantes, mais il affecte la fertilité des sols et menace la durabilité des écosystèmes agricoles. Le problème est exacerbé dans les zones arides et semi-arides fragiles où l'évaporation élevée, les faibles précipitations et l'utilisation d'eau salée pour l'irrigation accélèrent la salinisation des sols. Les légumineuses, considérées comme des aliments très nutritifs pour l'homme et fournissant des nutriments essentiels aux écosystèmes, sont un élément fondamental de l'agriculture durable. Elles peuvent restaurer la santé des sols par leur capacité à fixer l'azote dans une interaction symbiotique avec les rhizobies du sol. Cependant, le stress salin limite fortement la productivité et la capacité de fixation de l'azote chez les légumineuses. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) et principalement les actinobactéries favorisent la croissance des plantes en produisant des phytohormones, des sidérophores, des antibiotiques et des composés antifongiques, en solubilisant le phosphate et en fournissant un antagonisme aux microorganismes phytopathogènes. En outre, les actinobactéries ont des effets bénéficiaux sur la nodulation et la croissance des légumineuses. Dans cette étude, des actinobactéries isolées de niches différentes et ayant des activités PGP ont été utilisées dans des expériences de co-inoculation avec des rhizobies dans la rhizosphère de plantes *Medicago sativa* soumises à un stress salin. Les résultats indiquent que des Actinobactéries tolérantes à la sécheresse et à la salinité et possédant de multiples traits PGP peuvent potentiellement augmenter la croissance de la luzerne dans des conditions salines, en présence ou en l'absence de bactéries rhizobiennes symbiotiques. Les actinobactéries découvertes dans cette étude peuvent donc être des biofertilisants appropriés dans la formulation de produits agricoles améliorant le développement, la santé et la productivité des plantes dans les sols salins, une alternative nécessaire pour l'agriculture moderne et le développement durable. Dans ce cadre notre travail a porté sur l'étude de deux articles impliquant l'utilisation de *Rhizobium* seul et en co-inoculation avec une *Actinobactérie* sous certaines conditions de stress abiotique et cela afin de voir leur effet sur la croissance de la luzerne (*Medicago sativa*). L'analyse a abouti à la conclusion suivante :

-Dans le premier article l'application de *Rhizobium* O172 isolés de la région de Ouargla et inoculé sous stress hydrique et salin a donné des résultats dans la promotion de la croissance de la luzerne par rapport aux autres souches isolées .

-Dans le deuxième article la co-inoculation de souche de référence Sm 1021, Sm2011 avec 5 souches d'actinobactérie isolées de Biskra et Skikda ont montré une meilleure croissance et une meilleure tolérance par rapport à l'inoculation des rhizobies seuls .

**Mots clés :** PGPR / *Rhizobium* / Actinobactérie / Luzerne / Biostimulation/ stress abiotiques .

## **Abstract:**

### **Title: Use of rhizobacteria (bio-stimulation) in plant growth promotion.**

Biotic and abiotic stresses are severely limiting plant production and productivity. Of notable importance is salt stress that not only limits plant growth and survival, but affects the soil fertility and threatens agricultural ecosystems sustainability. The problem is exacerbated in fragile arid and semi-arid areas where high evaporation, low precipitation and the use of salty water for irrigation is accelerating soil salinization. Legumes, considered very nutritious foods for people and providing essential nutrients for ecosystems are a fundamental element of sustainable agriculture. They can restore soil health by their ability to fix nitrogen in a symbiotic interaction with the rhizobia of the soil. However, salt stress is severely limiting productivity and nitrogen fixation ability in legumes. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and mainly actinobacteria promote plant growth by producing phytohormones, siderophores, antibiotics and antifungal compounds, solubilizing phosphate and providing antagonism to phytopathogenic microorganisms. In addition, actinobacteria have beneficial effects on nodulation and growth of legumes. In this study, actinobacteria isolated from different niches and having PGP activities were used in co-inoculation experiments with rhizobia in *Medicago sativa* plants rhizosphere submitted to salt stress. The results indicate that drought- and salinity-tolerant Actinobacteria with multiple PGP traits can potentially increase alfalfa growth under saline conditions, in the presence or absence of symbiotic rhizobial bacteria. Actinobacteria discovered in this study can, therefore, be suitable biofertilizers in the formulation of agricultural products improving plant development, health and productivity in saline soils, a necessary alternative for modern agriculture and sustainable development. In this context, our work has focused on the study of two articles involving the use of rhizobium alone and in co-inoculation with an actinobacteria under certain conditions of abiotic stress in order to see their effect on the growth of alfalfa (*Medicago.sativa*). The analysis led to the following conclusion:

- In the first work the application of rhizobium O172 isolated from the region of Ouargla and inoculated under water and salt stress gave results in the promotion of the growth of alfalfa compared to other isolated strains.
- In the second work the co-inoculation of reference strain Sm 1021, Sm2011 with 5 strains of actinobacteria isolated from Biskra and Skikda showed a better growth and a better tolerance to the inoculation of rhizobium alone.

**Key words:** PGPR / Rhizobium / Actinobacteria / Alfalfa / Biostimulation / Abiotic stresses.

## Liste des abréviations :

AIA : Acide Indole Acétique.

ATB : Antibiotiques.

ABA : acide abscisique.

ACC : aminocyclopropane-1-carboxylate.

AMF : champignon mycorhizien a arbuscule.

BBT : bleu de Bromothymol

BAP : Benzylaminopurine

CaCl<sub>2</sub>:le chlorure de Calcium.

Ca<sub>3</sub>Hpo<sub>4</sub> : Phosphate tricalcique

Df: Dworkin et Foster

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations.

GB : gibbérellines.

GA : acides gibbérellique .

GYP : Glucose Yeast Extract Peptone

HgCl<sub>2</sub> : le chlorure de mercure.

HCN :acide cyanhydrique

H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> : L'ion dihydrogénophosphat

ISP2: International Streptomyces Program

LCO : lipochitino oligosaccharides.

Lb : Luria Bertani Rural

PGP: Plant Growth Promoting .

ROS : Robot Operating System.

USSL Staff : (United States Salinity Laboratory Staff, 1954).

## Liste des figures :

<b>Figure 01.</b> Représentation schématique des horizons du sol.....	4
<b>Figure 02.</b> Représentation schématique de la rhizosphère .....	5
<b>Figure 03.</b> Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire et par conséquent, la colonisation de la rhizosphère par les rhizobactéries du sol.....	9
<b>Figure 04.</b> Représentation schématique de la symbiose mycorhizienne .....	13
<b>Figure 05.</b> Représentation schématique des Principaux types mycorhiziens actuels représentés sur une coupe transversale d'une racine modifiée.....	14
<b>Figure 06.</b> Représentation schématique des Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse .....	16
<b>Figure 07 .</b> Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre <i>Rhizobium</i> et une plante.....	18
<b>Figure 08.</b> Mécanismes directs et indirects médiés par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) .....	25
<b>Figure 09.</b> Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale...	29
<b>Figure 10 .</b> Conservation des nodules dans des tubes.....	34
<b>Figure 11.</b> effet de l'augmentation des concentrations en NaCl sur la croissance des souches nodulant La luzerne .....	52
<b>Figure 12.</b> Tolérance des souches à différents pH.....	52
<b>Figure 13.</b> Tolérance des souche à différentes températures.....	53
<b>Figure 14.</b> Aspect des colonies sur milieu YMA.....	54
<b>Figure 15 .</b> Aspect des colonies sur milieu YMA+ RC .....	54
<b>Figure 16.</b> Aspect des colonies sur milieu YMA+ BBT (acidification) .....	55
<b>Figure 17.</b> Observation microscopique de bacilles courts à Gram négatif (Gx100) .....	55
<b>Figure 18 .</b> Aspect des colonies sur milieu yeast-lactose-agar : Absence d'halo autour des colonies.....	56
<b>Figure 19.</b> Examen microscopique (partie supérieure) et morphologie des colonies (partie inférieure) des souches actinobactériennes MS1, MS2, Ag1, MS3 et MS4.....	58
<b>Figure 20:</b> Effet de l'inoculation par <i>Rhizobium</i> sur la croissance végétale de la luzerne ....	62
<b>Fig. 21 :</b> Aspect des nodules de <i>Medicago sativa</i> inoculés ou co-inoculés .....	64

## Liste des photos :

<b>Photo1</b> :Germination des graines de luzerne sur boîte gélosée .....	37
<b>Photo 2</b> : graine germée dans un tube Gibson .....	37
<b>Photos 03</b> : Description de quelques étapes de la mise en place du protocole expérimental et la croissance des plantes: <b>A)</b> semis des graines ; <b>B)</b> inoculation bactérienne ; <b>C)</b> germination et levée des jeunes plantules ; <b>D)</b> plantules en phase de croissance.....	44
<b>Photo 04</b> : Croissance différentielle des plantes de luzerne en fonction de la quantité d'eau d'arrosage .....	45
<b>Photo05</b> :AspectdescoloniessurmilieuYMA .....	50
<b>Photo 06</b> : Formation de nodosités sur les racines de jeunes plantes de luzerne après inoculation.....	51

## **LISTE DES TABLEAUX :**

<b>Tableau 01 :</b> Les différentes catégories de rhizodépôts selon leur composition biochimique et leur mode de libération .....	8
<b>Tableau 02 :</b> Tableau qui représente la taxonomie des Azotobacter et la taxonomie des Azospirillum.....	21
<b>Tableau 03:</b> Exemples de phytohormones et d'enzyme stimulateurs de croissances produites parles PGPR .....	31
<b>Tableau 04:</b> Origine de l'isolement des souches bactériennes utilisées.....	47
<b>Tableau 05:</b> Différents traitements utilisés dans l'expérience sous stress salin et conditions normals .....	48

# **Table des Matières**

Résumé en Arabe

Résumé en Français

Résumé en anglais

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

**Introduction ..... 1**

## **Patrie 1: Synthèse bibliographique**

### **Chapitre 01 : Notion générale sur la rhizosphère**

1-La rhizosphère..... 5

2-Colonisation rhizosphérique ..... 9

2-1 Facteurs biotiques..... 10

2-2 Facteurs abiotiques..... 10

### **Chapitre 02 : La microflore rhizosphérique**

1- Microorganismes symbiotiques ..... 12

1-1 La symbiose mychorizienne ..... 13

1-2 La symbiose Rhizobienne ..... 15

1-2-1 Le genre Rhizobium ..... 16

1-2-2 La formation de nodosités ..... 17

2-Microorganismes non symbiotiques ..... 21

2-1 Le genre Azotobacter etAzospirillum..... 22

2-2 Le genre Bacillus ..... 23

2-3 Le genre Pseudomonas ..... 24

### **Chapitre 03 : Mécanismes d'action des PGPR**

1-Mécanismes indirects des PGPR ..... 26

2-Mécanismes directs des PGPR..... 27

2-1- Biofertilisation ..... 27

2-1-1 Fixation d'azote..... 27

2-1-2 Solubilisation du Phosphate..... 27

2-1-3 Solubilisation du potassium.....	28
2 – Phytostimulation.....	28
2-1 Production d’hormones de croissance .....	28
2-1-1 Acide indole acétique (AIA).....	29
2-1-2 Cytokinines .....	30
2-1-3 Gibbérellines.....	30
2-1-4 Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase.....	31
<b>Partie 02 : Partie Expérimentale :</b>	
<b>Partie I :</b>	
1- Matériels .....	34
2-Méthodes.....	34
2-1 Les sites et périodes de la collecte des échantillons .....	34
2-2 Isolements et Purifications des isolats .....	36
2-2-1 Isolement et purification des rhizobium à partir des nodules(les deux travaux).....	36
2-2-2 Isolement et purification des Actinobacteria(Travaux2).....	36
3-Identifications et Caractérisations des isolats .....	37
3-1 Caractérisations des isolats des rhizobium(Travaux 1) .....	37
3-1-1 Authentification des isolats .....	37
3-1-2 Caractérisation physiologique des isolats.....	38
3-1-3 Caractérisation phylogénétique .....	39
3-2 Caractérisations des isolats des rhizobium(Travaux2) .....	39
3-2-1 Caractères morphologiques .....	39
3-2-2 Activités PGP des souches <i>Rhizobium</i> .....	40
3-3 Caractérisation des isolats d’Actinobacteria(Travaux2) .....	41
3-3-1 Mesure des activités PGP des souches d’Actinobacteria .....	42
3-3-2 Étude de la tolérance au stress.....	43
3-3-3 Identification moléculaire des isolats d’Actinobacteria .....	44
<b>Partie II :Utilisation des rhizobactéries dans la phytostimulation de la luzerne.</b>	
I-Utilisation des rhizobium dans la phytostimulation de la luzerne dans des conditions de stress hydrique et salin (travaux 01) de Salim Azib., 2022	
I-1 Souches bactériennes et conditions de croissance.....	44
I-2 Matériel végétal .....	44

I-3 Substrat de culture .....	45
I-4 Etude du stress hydrique.....	45
I-5 Etude du stress salin.....	46
I-6 Mesures de paramètres de croissances suite aux stress .....	46
II- L'utilisation de rhizobium dans l'inoculation simple et en co-inoculation avec les actinobactéries dans la bio-stimulation de la luzerne (Traveau02) de Samira Saidi .,2021	
II-1 Inoculations bactériennes, croissance végétale et test de nodulation.....	47
II-1-1 Germination aseptique des graines .....	47
II-1-2 Culture et inoculation des plantules.....	47
II-2 Effets de la co-inoculation <i>Rhizobium</i> -Actinobacteria sur La croissance de la luzerne	47
II-2-1 Matériel végétal .....	47
II-2-2 Préparation des inoculats bactériens .....	48
II-2-3 Inoculation bactérienne dans des conditions normales de croissance.....	48
II-2-4 Effets de la co-inoculation bactérienne sur la croissance de <i>Medicago sativa</i> .....	49
II-2-5 Inoculation bactérienne et condition sous stress salin de croissance .....	49
II-2-6 Mesure des paramètres morphologiques .....	49
II-2-7 Dosage des pigments photosynthétiques .....	50
<b>Résultats et discussions :</b>	
<b>Partie I :</b>	
I-Les résultats des Travaux 01 Salim Azib., 2022.....	50
I-1 Isolement et caractérisation. ....	51
I-1-1 Caractéristiques morphologiques et de croissance des isolats .....	51
I-1-2 Authentification des isolats .....	51
I-2 Caractérisation physiologique des isolats.....	52
II- Les travaux 02 (Samira Saidi., 2021).....	54
II-1 Caractérisation morpho-biochimique des isolats .....	54
II-2 Activités PGP des souches <i>Rhizobium</i> isolées .....	58
II-3 Caractérisation des isolats d'actinobacteria .....	58
II-3-1 Caractérisation morphologique et culturale .....	58
II-3-2 Caractérisation biochimique .....	59
II-3-3 Caractérisation physiologique.....	59

II-3-4 Activités PGP des Actinobacteria .....	60
II-3-5 Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries .....	61
<b>Partie II : Utilisation des rhizobactéries dans la phytostimulation de la luzerne.</b>	
II-1 Utilisation des rhizobium dans la phytostimulation de la luzerne dans des conditions de stress hydrique et salin (travaux 01) de Salim Azib., 2022... ..	62
II-2 L'utilisation de rhizobium dans l'inoculation simple et en co-inoculation avec les actinobactéries dans la bio-stimulation de la luzerne (Traveau02) de Samira Saidi .,2021.....	62
II-2-1 L'effet de l'inoculation des rhizobium sur la croissance de la luzerne.....	63
II- 3 Effets de la co-inoculation Rhizobium-Actinobacteria sur La croissance de la luzerne (biostimulation) .....	64
<b>-Conclusion et perspective .....</b>	<b>67</b>
<b>-Références bibliographiques</b>	
<b>-Annexes</b>	

# **Introduction**

## **Introduction**

---

### **Introduction :**

Les fourrages sont parmi les cultures les plus populaires dans le monde en raison de leur rendement élevé et leur valeur nutritionnelle (digestibilité et teneur en protéines). Grâce à cette dernière, ils sont très utilisés dans l'alimentation animale et du bétail. Suite à la situation économique dans le monde et particulièrement en Algérie et suite aux problèmes écologiques engendrés par l'utilisation abusive des engrais chimiques en agriculture intensive ; La production des cultures fourragères est restée très limitée. Pour améliorer et développer sa redynamisation en Algérie, l'Etat Algérien a mis en place un plan national à long terme, pour valoriser cette culture afin d'assurer une sécurité alimentaire et un équilibre écologique de l'environnement. Donc cette stratégie a pour objectif de trouver des alternatives pour remplacer les molécules chimiques par des molécules bioactives, afin d'assurer une agriculture durable (ABDELGUERFI ET AL., 2008).

Les rhizobactéries sont parmi les microorganismes telluriques bénéfiques stimulatrices de la croissance végétale et sont utilisées comme biofertilisant et biopesticide. Désignées sous le terme PGPR de l'anglais Plant « Growth Promoting Rhizobacteria ». Ils ont la faculté de promouvoir la croissance des plantes en leur conférant la résistance vis-à-vis des agents phytopathogènes et aux différents stress abiotiques (Welbaum et al., 2004 ; Compant et al., 2010). L'effet bénéfique des PGPR peut être assuré par des mécanismes indirects des PGPR sont leur pouvoir compétitif vis-à-vis de l'espace des nutriments et leur pouvoir à produire des métabolites anti-microbien, afin de protéger la plante contre les agents phytopathogènes (biocontrôle) et par leur effet direct qui intervient dans la stimulation de la croissance végétale par la solubilisation de certains nutriments et par la production des phytohormones (Berg, 2009).

Les PGPR, sont donc des candidats de premier choix dans beaucoup de domaines particulièrement : l'agriculture et l'environnement vu leur rôle dans la bioprotection, biostimulation ainsi que dans la bioremédiation (Sprent, 2009).

Parmi les genres des PGPR ; on trouve le groupe des « Rhizobia ». Ces derniers sont capables d'établir des symbioses avec les légumineuses dans les sols pauvres en azote. Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les Rhizobia appartiennent toutes à la superfamille des Fabaceae (légumineuses) (Selami, 2015). Elles forment la troisième famille par ordre d'importance chez les Angiospermes avec près de 20000 espèces. C'est l'une des familles les plus diversifiées du groupe des plantes supérieures dans leur morphologie, leur habitat et leur écologie (Diegane, 2018). Beaucoup de ces espèces sont notamment utilisées dans les secteurs de l'agriculture car elles sont riches en protéines de qualité pour l'alimentation humaine (haricot, lentille, pois, pois chiche, fève) ou pour l'alimentation animale sous forme de graines (pois, féverole, soja, lupin) ou sous forme de fourrages (luzerne, trèfle...) et également en agroforesterie (production de bois, huiles, résines...) (Yahara et al., 2013). Grâce à leurs symbioses avec les Rhizobiums elles forment des nodules fixateurs d'azote sur leurs racines et parfois sur leurs tiges donc elles jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols et comme aliment (fourrage) pour les animaux (Bernard, 1996). Ces espèces et leurs symbiotes ont attiré l'attention des scientifiques en raison de leur tolérance aux conditions environnementales extrêmes, telles que la salinité, stress hydrique, la sécheresse et les températures élevées (Zahran, 2001 ; Moschetti et al., 2005)

## Introduction

---

La luzerne (*Medicago sativa* L.), est l'une des principales cultures de légumineuses fourragères dans les zones arides et semi-arides de l'Afrique du Nord (**Elboutahiri et al., 2010**). En Algérie, la superficie consacrée à la luzerne représente 0,37 à 0,71% de la superficie totale consacrée aux cultures fourragères. Dans le Sahara, cette culture est de loin la principale espèce fourragère cultivée (**Chaabena et al., 2012**). Cette espèce est une légumineuse fourragère vue sa grande valeur nutritive, sa digestibilité et son rendement de biomasse élevé et sa capacité de contribuer à l'incorporation de grandes quantités d'azote, avec un avantage économique conséquent, aidant à réduire l'application d'engrais de synthèse (**Campillo et al., 2003 ; Carlson et Huss-Danell, 2003, Jensen et Hauggaard-Nielsen, 2003**).

L'objectif de notre travail est l'étude de deux articles qui ont contribué à appliquer des *Rhizobium* seul et en combinaison avec une autre bactérie bénéfique appartenant aux actinobactéries dans quelques régions du Sud Algérien (Ghardaia, Ouargla et El Oued) et une région de haut plateau sétif et cela afin d'évaluer la capacité de ses rhizobactéries à promouvoir et à améliorer la croissance chez la luzerne (*Medicago sativa*) et cela dans des conditions normales et des conditions de stress abiotiques.

Ce travail comprend :

- Une partie d'analyse bibliographique
- Un matériel et méthodes
- Des résultats et discussions
- Une conclusion et perspectives.

# Synthèse bibliographique

# Synthèse bibliographique

## Chapitre 01 : Notion générale sur la rhizosphère .

Le sol est la partie superficielle de l'écorce terrestre, qui résulte de l'action des altérations de la roche mère et de la décomposition de la matière organique sous l'effet de divers facteurs (climats, nature de la roche mère, activité biologique...) (Bouras., 2014)(Fig 01). Il est constitué d'une phase gazeuse (de dioxyde de carbone, d'oxygène et d'azote ), d'une phase liquide (solution du sol car l'eau est chargée d'ions qui circule dans les espaces libres ou les pores du sol) et d'une phase solide (Gobat et al., 2004, Amin khoudja., 2013), composé de matières inorganiques, de matières organiques et des êtres vivants diversifiés , constitués : des racines de plantes, de la microfaune et de la microflore . Ces derniers peuvent se retrouver dans tous les types de sols vierges ou cultivés entourant les racines des plantes (Manoharachary et Mukerji., 2006) ; c'est la rhizosphère.

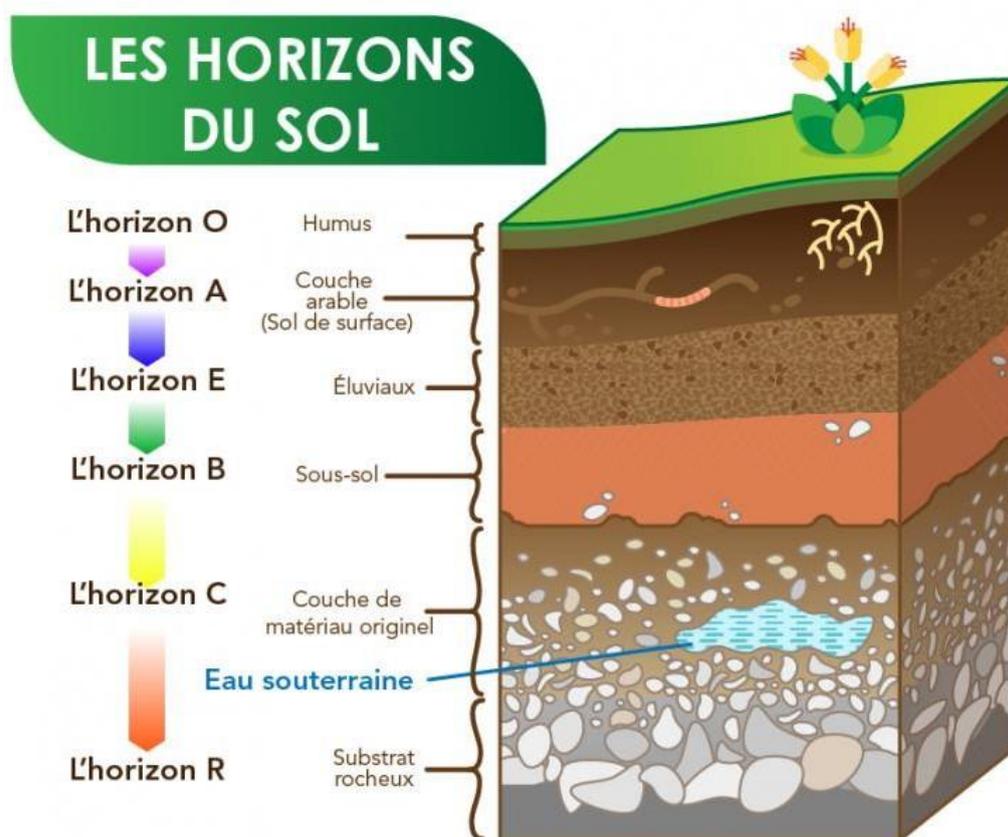


Figure 01. Représentation schématique des horizons du sol (Amarger,2002) .

### Légende :

- **L'horizon O** : Il s'agit de la couche superficielle comprenant des débris végétaux et de l'humus, ce que l'on nomme « litière ». L'humus est riche en éléments nutritifs puisque les décomposeurs dégradent les débris (Baize et Girard, 2008). Ces éléments nutritifs sont entraînés vers les horizons inférieurs par les eaux de pluie.

# Synthèse bibliographique

---

- **L'horizon A** : Il s'agit d'une couche composée d'un mélange d'humus et de minéraux. On qualifie ce mélange de « terre arable ». Sa couleur est généralement foncée (Paul, Lavoisier, 2010) . Comme elle est riche en matière organique, cette couche est très importante pour la croissance des végétaux puisqu'elle est très fertile. Son aération est assurée par des animaux fousseurs. Elle est fortement soumise à l'érosion.
- **L'horizon E** : constitué de dépôt d'argile qui s'échappe des autres couches parce qu'il est un éluviat (Marcel Jamagne – 2011) , On le trouve souvent dans les sols plus âgés et ceux des forêts.
- **L'horizon B** : Cette couche est très pauvre en humus, mais très riche en éléments minéraux tels que les oxydes de fer et les silicates (Bernard Jabiol – 2011) . Il est souvent de couleur plus pâle que l'horizon A ou encore de teinte rougeâtre. Les débris provenant des horizons supérieurs s'y accumulent.
- **L'horizon C et R** : On note l'absence de matière organique dans cette couche uniquement composée de roche-mère altérée et fragmentée par des facteurs physiques et chimiques ( Patricia Touyre – 2001) . Il peut être sableux, argileux ou dur.

## 1-La rhizosphère :

Hiltner en 1904 a défini le terme de « rhizosphère » (rhiza = racine, sphaira = ce qui est autour) comme la partie étroite du sol influencée par l'activité des exsudats racinaires (Hinsinger et al., 2009). Donc la rhizosphère est le lieu d'interaction entre le sol, les racines des plantes et les microorganismes ( les protozoaires, les nématodes, les algues, les champignons, les bactéries, les actinomycètes et les virus) (Paul et ; Clark, 1996 ; Goncerayston et Campbell, 1996; Miethling et al. 2000 ; Marschner et al. 2001 ; Gholami et al. 2012 ). Ces êtres vivants ont un rôle actif dans le processus de la décomposition et du recyclage des nutriments tels que l'azote (N) , le phosphore (P) , le fer (Fe) ,(Germida et al., 1998) , ce qui aboutira à l'amélioration et à la stabilisation de la structure du sol et par conséquent à la disponibilité des nutriments pour la plante et pour les microorganismes telluriques (BAKER, 1968). Selon où sont localisées ces rhizobactéries dans la rhizosphère, on peut classer cette dernière en trois zones distinctes (Fig 02) :

-**L'ectorhizosphère** : c'est la partie du sol riche en microorganismes qui entoure les racines de la plante (Maougal, 2014).

-**Le rhizoplan** : c'est la fraction du sol riche aux microorganismes ( des hyphes mycéliens et des rhizobactéries ) fortement adhérents aux racines des plantes (Maougal, 2014).

-**L'endorhizosphère** : C'est la partie du sol riche de microorganismes qui sont à l'intérieur des racines . C'est-à-dire le cortex racinaire, l'épiderme et les poils absorbants, (Balandreau et Knowles, 1978). Il résulte du passage graduel du sol dans les cellules du parenchyme cortical de la plante, utilisant ces exsudats sans causer la mort cellulaire (Maougal, 2014).

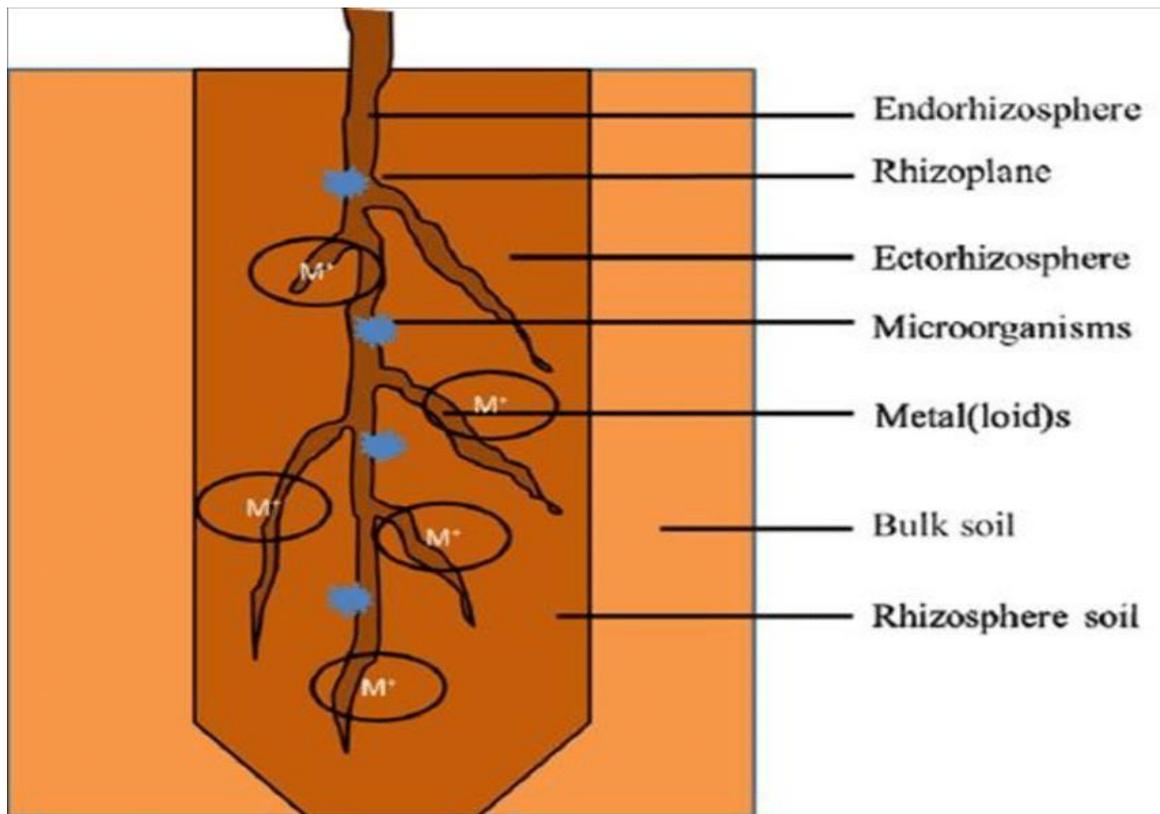


Figure 02. Représentation schématique de la rhizosphère (Sheshadri et al., 2015).

La communauté microbienne de la rhizosphère fait partie d'un réseau trophique complexe qui utilise les nutriments libérés par les racines, ces derniers sont les principaux régulateurs de la colonisation et de la diversité microbienne (Mendes et al., 2014). Effectivement les plantes exercent une forte influence sur la composition de la communauté microbienne dans le sol car elles libèrent une large gamme de composés organiques sous forme de mucilage sécrété par les racines. Ces derniers sont riches en eau et en polysaccharides, ce qui facilite l'échange entre les racines et les particules du sol (Nambiar, 1976). Aussi sous forme d'exsudats racinaires composés des sucres, des acides aminés et plus de 40 % de produits de la photosynthèse (Davet, 1996; Anouar, 2012), ces derniers représentent un élément clé dans les échanges entre la plante et les microorganismes : c'est la rhizodéposition (Soufiane, 1989 ; Lynch, 1995 ; Jones et al., 2009). Les rhizodépôts (tableau 01) ont notamment un rôle important dans la communication entre les microorganismes et les plantes (Grayston et al., 1997 ; Nguyen, 2003). Ces communications sont les clés de leur survie puisque la performance microbienne dépend de la capacité à percevoir et à réagir rapidement aux échanges environnementaux, effectivement les bactéries ont développé un mécanisme complexe de communication afin de contrôler l'expression de certaines fonctions par un dispositif appelé le quorum sensing (Ahmed et al., 2008). Les communications bactériennes par le quorum sensing sont basées essentiellement sur la production et la sécrétion des molécules signales dans le milieu des auto-inducteurs, dont leur concentration est proportionnellement liée à la densité de la biomasse cellulaire. Quand une bactérie détecte une molécule signal à une concentration donnée, la transcription de certains gènes régulée par ce mécanisme est induite ou réprimée. A cet effet, de nombreux processus microbiens sont régulés par le quorum sensing, engendrant la production de divers biomolécules telles que : les siderophores, les

## **Synthèse bibliographique**

---

antibiotiques , la bioluminescence, la formation de biofilms et la nodulation (**Cianciotto, 2005 ;Baron et Coombes, 2007**).L'importance des mécanismes de régulation par le quorum sensing chez les bactéries bénéfiques des plantes va induire la promotion de la croissance, la protection contre les bactéries pathogènes et la lutte contre les stress salins et hydriques (**Ahmed et al., 2008** ). Le quorum sensing confère aux bactéries de nombreux avantages compétitifs ce qui va améliorer leur chances de survie et leur colonisation des niches écologiques, donc leur compétence rhizosphérique (**Bingle et al., 2008 ; Filloux et al., 2008**).

## Synthèse bibliographique

**Tableau 01.** Les différentes catégories de rhizodépôts selon leur composition biochimique (Rovira, 1969) .

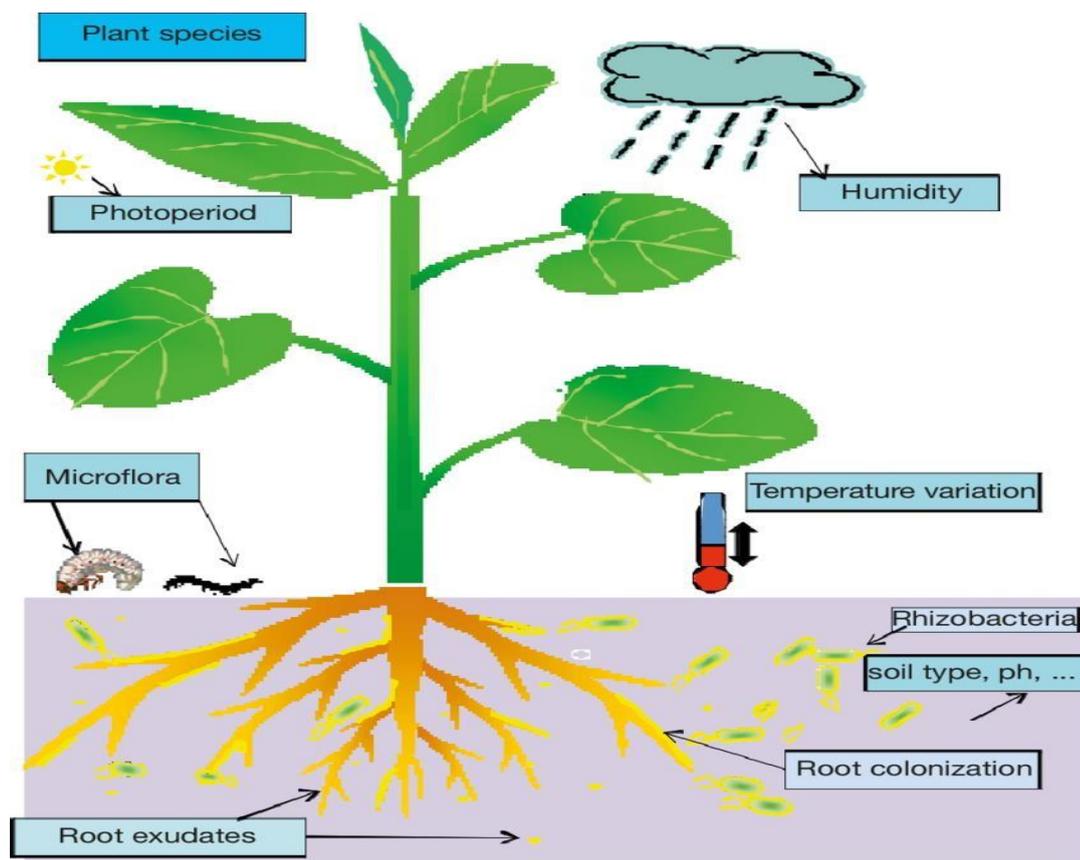
Rhizodépôts	Composition biochimique
Les exsudats	<p>Composés hydrosolubles de faible poids moléculaire ,libérés passivement par les racines vers la solution du sol selon un gradient de concentration représentés principalement par les hydrates de carbone et sucres (glucose,fructose,maltose , raffinose, rhamnose, galactose ribose, saccharose, xylose, Arabinose.</p> <p>Acides aminés carboxyliques et phénoliques , acide aminobutyrique, homosérine, cystathionine .</p> <p>Acides aliphatiques :tels que Acides acétique, butyrique, citrique, glycolique, malique, malonique, oxalique, propionique, succinique, tartrique, valérique.</p> <p>Acides aromatiques :tels que P-hydroxybenzoïque, cafféique, p-coumarique, ferulique, gentistique, protocatéchuique, salicylique, sinapique, syringique, vanillique.</p> <p>Acides gras :tels que Linoléique, linoléinique, oléique, palmitique, stéarique, phospholipides.</p> <p>Stérols :tels que Campesterol, cholestérol, sitostérol, sigmastéro .</p> <p>Enzymes :tels que Amylase, désoxyribonucléase, inverstase, peroxidase, phosphatase, ribonucléase .</p> <p>Divers Vitamines, hormones de croissance, tels que auxines, cytokinines, gibbérellines.</p>
Les sécrétions	Composés de poids moléculaire variable,libérés par transport actif . Ce sont notamment des glucides .
Les mucilages et Le mucigel	<p>- Composés de poids moléculaire élevé,libérés principalement au niveau des apex voir même des poils absorbants .composé de polysaccharides (les sucres majeurs ; l'arabinose , galactose, fucose, glucose, xylose).Représentés par des sucres polymérisés et protéines .</p> <p>-Le mucigel est un mélange complexe de mucilage et de débris racinaires,bactériens et de particules minérales.</p>

## Synthèse bibliographique

### 2-La Colonisation rhizosphérique :

la niche rhizosphérique représente un habitat propice à la colonisation des systèmes racinaires par les microorganismes, vue sa richesse et sa diversité en éléments nutritifs, (Decaëns 2010). La compétence microbienne pour coloniser la rhizosphère implique un chimiotactisme envers les exsudats racinaires, et une capacité à adsorber plus les nutriments sur les racines (Jacques et al., 1993). Par exemple les *Pseudomonas* se caractérisent par une capacité élevée à chélater le fer du sol pour leurs besoins nutritionnels (Latour et Lemanceau, 1997, Whipps, 2001). Dans des conditions de carence en fer, ces bactéries synthétisent les sidérophores (pyoverdine), qui chélatent le fer, cette chélation réduit la disponibilité des ions ferriques  $Fe^{3+}$  pour les agents pathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance et de leur pouvoir infectieux (Bloemberg et Lugtenberg, 2001), donc la réduction de la maladie peut être le résultat d'une colonisation importante des racines ou des sites de l'infection par ces rhizobactéries bénéfiques (Persello-Cartieaux et al., 2003).

Plusieurs paramètres biotiques et abiotiques interviennent pour modéliser la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère (Marschner et al., 2001; Dias et al., 2013), (fig.03).



**Figure 03.** Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire et par conséquent, la colonisation de la rhizosphère par les rhizobactéries du sol (Nihorimbere et al, 2011).

## **Synthèse bibliographique**

---

### **2-1 Facteurs biotiques :**

Il est important de remarquer que le génotype de plante a une influence importante sur la composition de la communauté microbienne de la rhizosphère **(Xu et al., 2009; Koranda et al., 2011)**. Les propriétés phénotypiques racinaires telles que la structure du système racinaire, le profil d'exsudation racinaire, la capacité d'acquisition de nutriments et d'eau diffèrent en fonction du génotype de la plante et influent sur les interactions avec les populations microbiennes **(Marschner et al., 2001; Xu et al., 2009)**. Cela se traduit par des différences de structure entre les communautés microbiennes associées aux différents génotypes végétaux.

Les exsudats racinaires varient également quantitativement et qualitativement avec l'âge de la plante **(Xu et al., 2009)** et la zone racinaire **(Marschner et al., 2001)**. Ils jouent un rôle essentiel dans le processus de colonisation de la rhizosphère par les microorganismes. Ces exsudats sont utilisés par la microflore endémique autant que signaux chimiques en plus d'être utilisés comme un substrat nutritif disponible pour leur croissance et leur développement dans la rhizosphère. **(Landi et al., 2006; Bais et al., 2006; Cregut et al., 2009; Aira et al., 2010; Nihorimbere et al., 2011; Guo et al., 2011; Zhang et al., 2011; Chao et al., 2013; Prescott et Grayston, 2013)**.

### **2-2 Facteurs abiotiques :**

Les structures des communautés microbiennes de la rhizosphère sont variables et dépendent de nombreux facteurs abiotiques **(Noguez, 2005; Colares et Melo, 2013)**. Plusieurs études suggèrent que le type de sol est un facteur important de structuration et de composition des communautés de micro-organismes du sol et de la rhizosphère **(Berg & Smalla, 2009 ; Schreiter et al., 2014 ; Bonito et al., 2014 ; Bonito et al., 2019)**. Chaque type de sol possède son propre cortège microbien, cette spécificité est notamment due au pH qui peut varier considérablement d'un sol à un autre **(Fierer & Jackson, 2006)**, mais également d'autres facteurs telles que : l'humidité des sols, la salinité et la température **(Nelson et Mele, 2007; Rajendhran et Gunasekaran, 2008)**, peuvent agir sur la structure des communautés, la disponibilité des nutriments, la solubilité des métaux et le contenu en carbone **(Asuming-Brempong et al., 2008; Sul et al., 2013)** et en azote **(Fierer et al., 2003)**, ce qui contrôle la biomasse des communautés microbiennes dans la rhizosphère. **(Buyer et al., 2010)**.

- **Le pH** : le pH est l'un des forts prédicteurs de la composition et de la diversité des communautés bactériennes selon le type du sol **(Buyer et al., 2010)**. Il modifie les réactions chimiques qui régissent la biodisponibilité de nombreux nutriments dans le sol, particulièrement P, Fe, Zn et Cu **(Edwards et al., 2015)**. L'acidification de la rhizosphère peut permettre une augmentation de la disponibilité de P lorsqu'ils sont présents sous la forme de phosphates et du calcium (Ca) **(Seagren et Aydilek, 2010)**. Par exemple le pH influence fortement la composition des Acidobactéries et des Actinobactéries, Ainsi, les abondances relatives des Acidobacteria diminuent avec l'augmentation du pH **(Wienert et al., 2010)**.

- **La température** : La température joue un rôle très important dans le développement et le maintien des microorganismes telluriques **(Coince 2013)**. Elle agit directement sur les

## Synthèse bibliographique

---

activités enzymatiques et tous les phénomènes physico-chimiques de la cellule de ces derniers. Elle conditionne la répartition des espèces et des communautés de population dans la rhizosphère et elle influence profondément la multiplication et le métabolisme bactérien. La tolérance à la température pour la plupart des espèces se situe dans un intervalle compris entre -10 et +50°C (**Skujins, 1986**), comme il existe des microorganismes mésophiles qui peuvent se croître à des températures entre 25°C et 40°C se sont des bactéries saprophytes responsables de la dégradation de la matière organique du sol rhizosphérique. Il existe des bactéries mésophiles pathogènes qui peuvent se croître à 37°C et les microorganismes thermophiles peuvent être présents à des températures élevées plus de 70°C (**Pochon et al., 1957**). À cet effet, une augmentation ou une diminution de la température aura pour conséquence une modification globale de la composition des communautés microbiennes qui colonisent la rhizosphère en perturbant par leurs actions sur la vitesse des réactions biochimiques (**Walker et al. 2006**).

**-La salinité** : la salinité du sol, est l'une des problèmes majeurs affectant la productivité agricole, en particulier dans les sols arides et semi-arides (**Bharti et al., 2013; Silini et al., 2016; Fatima and Arora, 2019; Etesami and Glick, 2020; Mahmoud et al., 2020**). Les bactéries halophiles nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance, cette concentration peut varier de 1 % à 6 % pour les faiblement halophiles jusqu'à 15 % à 30 % pour les bactéries halophiles extrêmes (*Halobacterium*) (**Larsen, 1962 ; Kushner, 1993**). Dans ce cas, la bactérie accumule des quantités importantes de potassium pour rester hypertonique par rapport à son environnement. Les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (*Staphylococcus aureus*), mais peuvent aussi tolérer à des concentrations élevées en sel (**Yoon et al., 2003**).

La salinité dégrade la fertilité du sol et interfère avec le développement normal des plantes qui affecte gravement la productivité des cultures (**FAO. 2015 ;Etesami and Glick, 2020**). Une concentration élevée en sel altère également la croissance des plantes en perturbant le fonctionnement physiologique et biochimique (**Egamberdieva et al., 2011**), elle entraîne une perte de turgescence et un dysfonctionnement membranaire, par conséquent une toxicité ionique et une déshydratation cellulaire (**Silini et al., 2016; Etesami and Glick, 2020**).

Ces facteurs, subissent des changements, qui augmentent la complexité globale du sol et de l'environnement (**Nunan, 2001 , Zhou et al., 2002**). Tarlera et al. ont montré que le développement de l'écosystème du sol favorise le développement de communautés bactériennes distinctes, ainsi leurs activités en améliorant la croissance des plantes (**Lauber, 2008**).

### Chapitre 02 : La microflore rhizosphérique

Les microorganismes colonisant la rhizosphère sont nombreux et diversifiés, ils forment la biomasse microbienne du sol (**Focht et Mallin, 1979 ; Lavelle et Spain, 2001**), ils sont composés d'une flore fongiques, d'actinomycètes et de bactéries. Ces derniers jouent un rôle dans la décomposition de la matière organique, dans le biocontrôle comme agents de lutte biologique (ISR) (**Ranjard et Richaume, 2001**) et dans la phytostimulation par la solubilisation du phosphore, la production de phytohormones et la fixation d'azote par les bactéries libres et les bactéries symbiotiques, dont les plus étudiées sont les symbioses rhizobiennes avec les légumineuses ce qui permet une meilleure croissance des plantes. Au sein de la rhizosphère on peut également distinguer les microorganismes symbiotiques qui sont situés à l'intérieur ou à la surface des racines, ils dépendent entièrement de la plante pour leur survie (**Wardle et al 2004**) c'est la symbiose mycorhizienne des champignons avec les racines des plantes (**Mougel et al 2006**).

#### 1- Microorganismes symbiotiques :

La plante est la principale force structurante des communautés microbiennes. On estime qu'environ 20 000 espèces de plantes (sur environ 300 000) seraient entièrement dépendantes d'organismes microbiens pour leur croissance et leur survie (**van der Heidjen et al 2008**).

Les microorganismes symbiotiques sont dits mutualistes quand ils ont un effet bénéfique sur la nutrition et/ou la santé des plantes avec lesquelles ils interagissent. Ces derniers fournissent à la plante des éléments nutritifs (l'azote, phosphore, fer, potassium, zinc) nécessaire pour sa croissance. (**Brencic & Winans 2005**). Ils vont ensuite induire des changements physiologiques chez la plante hôte de par leur activité spécifique au sein de cette dernière, puis vont à leur tour ajuster leur propre physiologie pour réaliser leur activité.

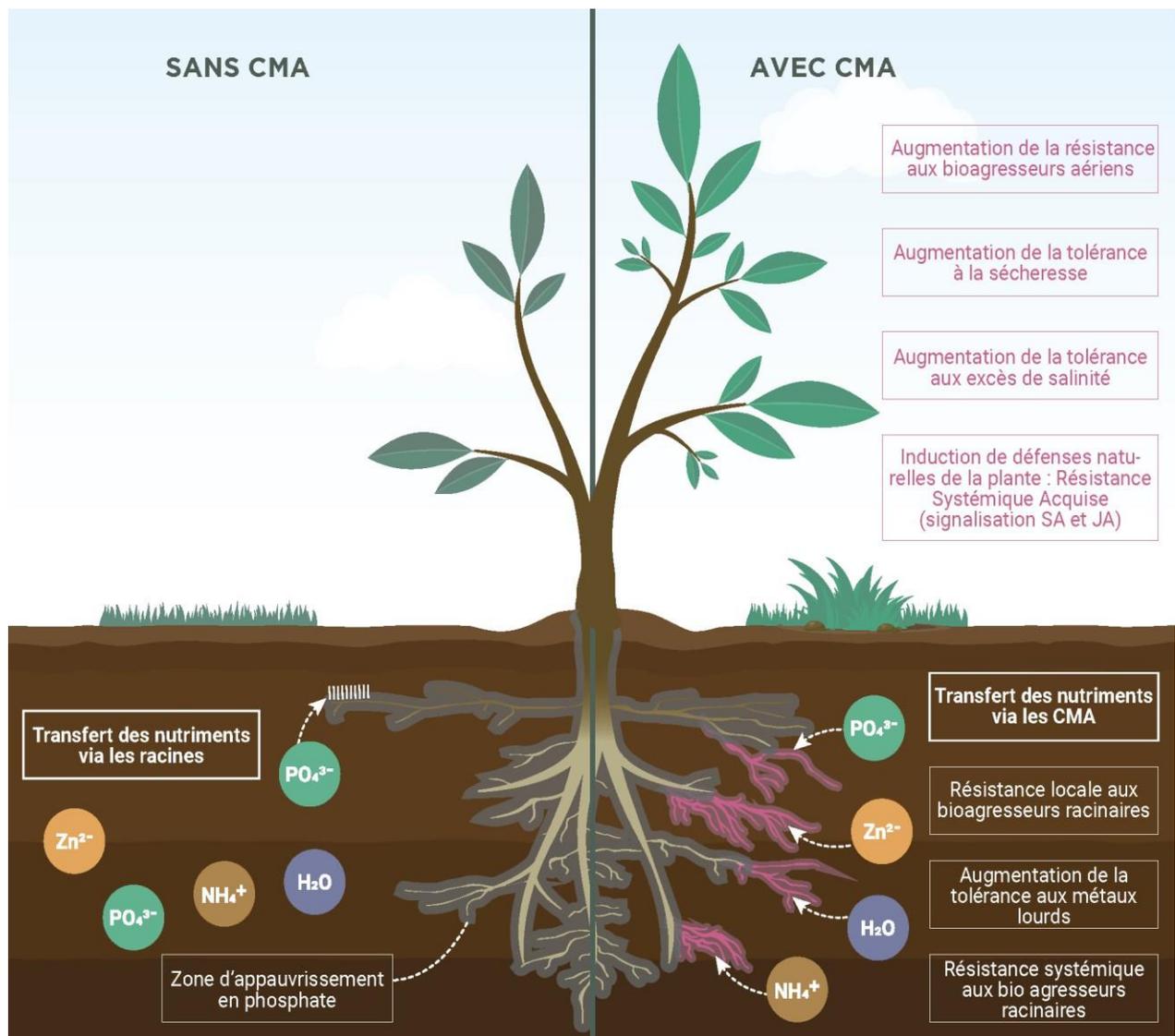
L'interaction va donc reposer sur des échanges de signaux très coordonnés entre la plante et le microorganisme (**van Loon et al 1998 ; Landa et al 2003**). Les plantes vont, ainsi, produire des métabolites (sucres, acides-aminés, composés aromatiques,...) qui vont agir comme une source d'attraction pour les microorganismes. Ces derniers vont synthétiser des protéines leur permettant de détecter les signaux chimiques venant de la plante. Ce qui va permettre leur fixation au niveau de la racine pour établir une interaction avec la plante hôte et réaliser la mise en place des interactions de la symbiose (**Bever et al 2012**). C'est le cas, par exemple, dans la symbiose mycorhizienne (exemple A), les champignons mycorhiziens de type arbusculaire AMF vont s'établir dans les racines puis capter le phosphore qui se trouve dans le sol, le transporter le long de leurs hyphes et ensuite le délivrer à la plante hôte (**Young et al 2003**), et dans le cas de la symbiose rhizobium-légumineuse (exemple B) on a la formation de nodules racinaires dans lesquels s'établissent les rhizobia afin de fixer l'azote atmosphérique (**Whipps 2001**). Il existe aussi des associations symbiotiques hors légumineuses c'est le cas des Frankia-actinorhizienne, les racines des plantes associées aux Frankia forment des nodosités spécifiques appelées « actinorhizes » (**Dawson, 1990**), l'importance de ces espèces tient surtout au fait qu'elles sont responsables d'une partie importante de la fixation biologique de l'azote et que ce sont des espèces capables de réhabiliter des sites dégradés ou de protéger les sols contre diverses formes d'érosion (**Moiroud, 1996**).

## Synthèse bibliographique

---

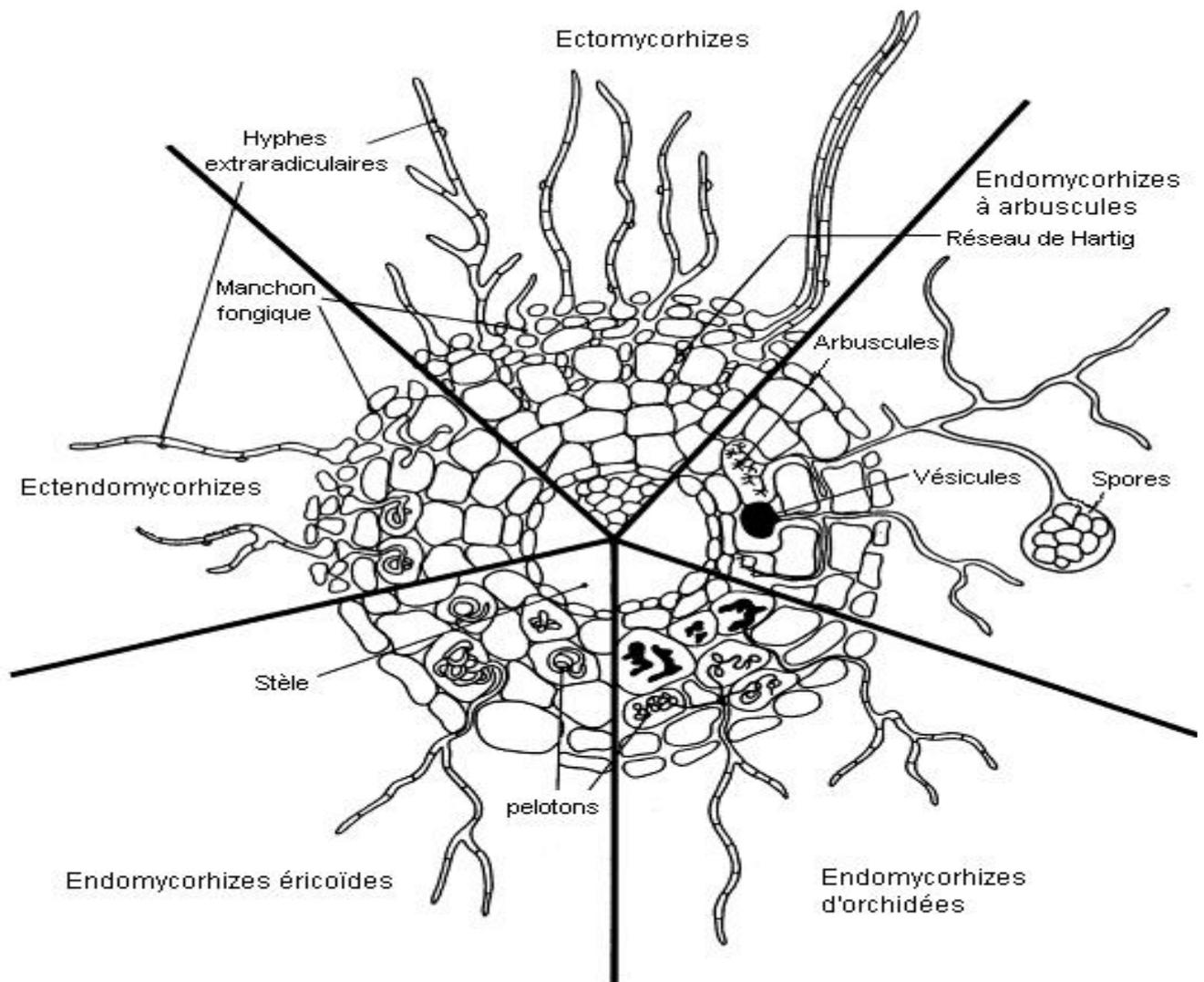
### 1-1 La symbiose mycorhizienne :

Au sein de la rhizosphère , les champignons mycorhiziens forment avec les racines des plantes des symbioses mycorhiziennes . Le terme mycorhize a été introduit par Albert Bernhard Frank en 1885, et provient des mots grecs « mycos » qui veut dire champignon et « rhiza » qui veut dire racine. Ce terme décrit une interaction symbiotique mutualiste (fig 04) dans laquelle la plante, qui est autotrophe , fournit au champignon, qui est hétérotrophe , de la matière carbonée issues de la photosynthèse sous forme de sucre. En retour, le champignon fournit à la plante des minéraux et de l'eau (**Smith et Read 2008**), et se multiplie sur la surface de contact entre le sol et la racine, ce qui décuple du même coup les capacités d'absorption de l'eau par le système racinaire Grâce au mycélium très dense et ramifié qu'il se développe autour des racines . Par exemple : Les champignons MA se sont des champignons (endo) mycorhiziens à arbuscules qui absorbent les éléments nutritifs et en les retransmettant ensuite aux plantes, notamment le phosphore (P); (**Jansa et al. 2005; Tchabi et al. 2010**), mais aussi d'autres éléments nutritifs (N, K, Zn, etc.). Lors d'une carence en phosphore, les plantes peuvent absorber près de 90 % du phosphore dont elles ont besoin grâce aux champignons MA (**Rillig et Mummey 2006; Schmid et al. 2008**). Cette symbiose est la plus répandue et la plus ancienne des symbioses entre les plantes et les champignons , probablement contribué à la colonisation du monde terrestre par les plantes (**Brundrett 2002; Kohler et al. 2015**), ce qui induisent une forte influence sur les écosystèmes (**Cardon et Whitbeck 2007**).



**Figure04.** Représentation schématique de la symbiose mycorhizienne (Wang et Qiu 2006).

On distingue trois grands types de mycorhizes (fig 05), basés principalement sur leur morphologie et le type de plante hôte associé : les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes et les endomycorhizes (Harley et Harley, 1987).



**Figure 05 .** Représentation schématique des Principaux types mycorhiziens actuels représentés sur une coupe transversale d'une racine modifiée (**LeTacon, 1985**).

### 1-2 La symbiose Rhizobienne :

L'association symbiotique la mieux connue est la symbiose rhizobienne chez les légumineuses (**Vance, 2001; Van Loon, 2007; Lugtenberg et al., 2013**).

Les légumineuses sont apparues pour la première fois sur Terre il y a environ 70 millions d'années (**Polhill et al., 1981**), constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec plus de 650 genres et 18000 espèces. Les légumineuses sont des cultures essentielles pour de nombreuses raisons : sur le plan écologique et agricole car elles sont riches en nutriments et ont une teneur élevée en protéines et sont responsables d'une partie du flux global d'azote provenant de l'azote atmosphérique  $N_2$  vers des formes telles que l'ammoniac, le  $ni$  (**Sobti et al., 2015**). Elles constituent un apport important et peu coûteux en azote organique qui accroissent la fertilité des sols. Elles constituent aussi une source d'alimentation extrêmement

## Synthèse bibliographique

---

importante aussi bien pour l'homme (soja, pois, haricot...) que pour l'animal (trèfle, luzerne...) (Giraud, 2007).

### 1-2-1 Le genre *Rhizobium* :

#### -Taxonomie du genre *rhizobium* :

-Règne : Bacteria

-Embranchement : Proteobacteria

-Classe : Alpha Proteobacteria

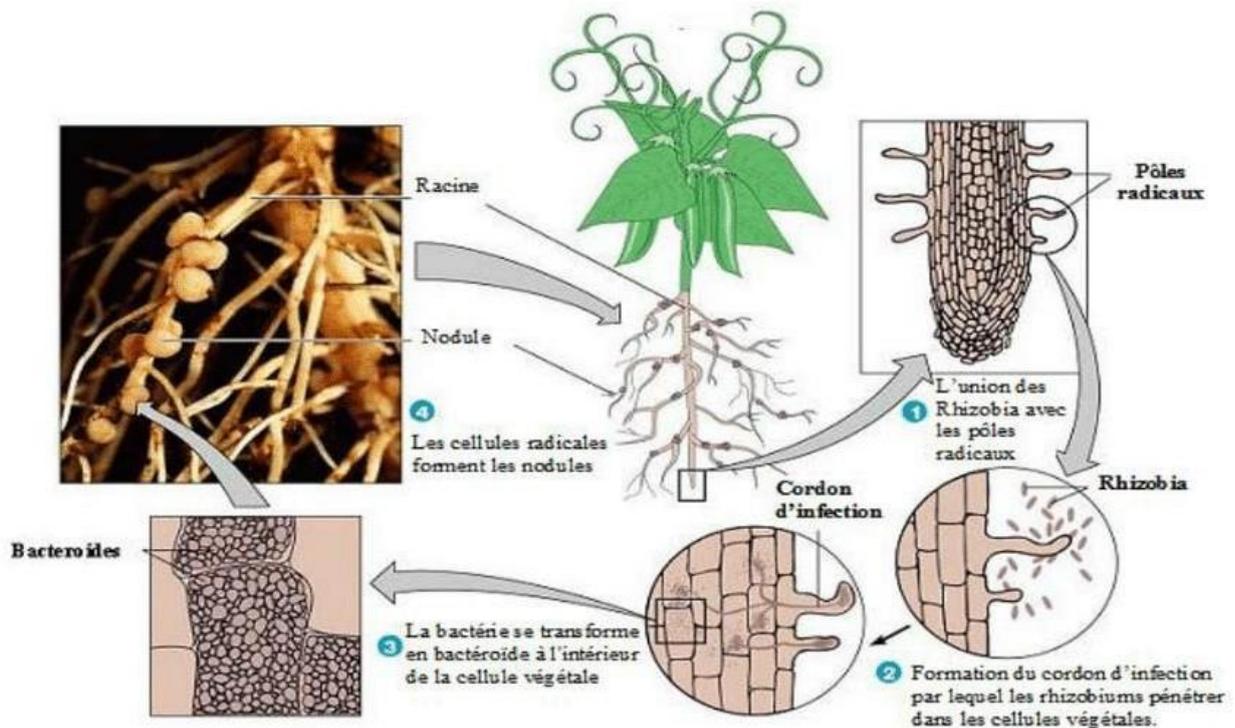
-Ordre : Rhizobiales

-Famille : Rhizobiaceae

-Genre : *Rhizobium* . Frank 1889 (**Approved lists 1980**).

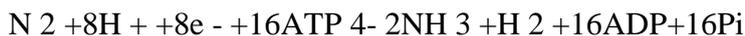
Les *Rhizobium* sont des bactéries Gram négatif, strictement aérobies sans sporulation et de forme en bâtonnets, sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire . Ce sont des bactéries fixatrices d'azote par symbiose , qui vivent dans la rhizosphère (Sakrouhi, 2017). Leur croissance est optimale à 28°C et un pH entre 6 et 7 (Somasegaran et Hoben, 1985 ; Fitouri, 2011 ). Ces bactéries ont la particularité de posséder les gènes permettant la synthèse d'un complexe enzymatique nitrogénase qui permet la fixation d'azote atmosphérique dans le nodule de la racine des légumineuses , en favorisant leur croissance dans les sols pauvres en azote (Sprent,2009) . En plus de la fixation d'azote les *Rhizobium* peuvent aussi solubiliser le phosphate (Halder et Chakrabarty, 1993) , produire des sidérophores et des phytohormones telle que : AIA , Cytokinines et Gibberellines (Arora et al., 2001).Ces rhizobactéries sont utilisés comme engrais biologiques (biofertilisant ) (Afzal et Bano 2008 ; Senthilkumar et al., 2009).

Le terme symbiose positive signifie "vivre avec" est utilisé dès le 19ième siècle pour décrire une association à bénéfice entre deux partenaires : la plante hôte et la bactérie (Geiman, 1964) . L'association symbiotique entre les légumineuses et les rhizobactéries est l'une des associations les plus étudiées. Du fait de son importance agro-économique ,Cette association fut décrite par Boussingault en 1838. Les *Rhizobium*s, sont capables d'établir des symbioses racinaires avec des plantes légumineuses en formant des nodules racinaires ou sur les tiges appelés nodules caulinaires (Giraud et Fleischman, 2004) , dans lesquels elles fixent l'azote atmosphérique en le réduisant, via l'enzyme nitrogénase, en ammonium (Perret et al., 2000 ; Gibson et al., 2008).Les symbioses *Rhizobium*-légumineuses varient à la fois dans la spécificité de la gamme d'hôte et dans la diversité des espèces bactériennes nodulant une plante hôte donnée.Cette relation symbiotique est réalisé par plusieurs étapes (fig 06) .



**Figure 06.** Représentation schématique des Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse. (Torche, 2006).

La fixation d'azote est la réduction du  $N_2$  en  $NH_3$ , catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase en conditions de faible teneur en oxygène, selon la réaction suivante (Kaminski et Boistard, 1998) :



### 1-2-2 La formation de nodosités :

Le processus de nodulation (fig 07), est régulé par l'échange de signaux moléculaires entre les deux partenaires, des rhizobiums spécifiques portent des gènes de nodulation qui peuvent former des nodules sur des hôtes spécifiques. Ces gènes sont induits par des gènes régulateurs activés par les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires. Le produit des gènes de nodulation est impliqué dans la synthèse des facteurs de Nod qui sont impliqués dans la morphogénèse des nodules.

La constitution d'un nodule fonctionnel est divisée en 3-étapes :

#### a-Pré-échange de signal d'infection :

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en  $(NH_4^+)$ , les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca et al., 2004). Ce signal, une fois perçu par le Rhizobium, induit l'expression de gènes nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (LCO) (Dénarié, 2000). Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca et al., 2004). Les rhizobiums

## Synthèse bibliographique

---

diffèrent dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un deuxième niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (**Moschetii et al., 2005**).

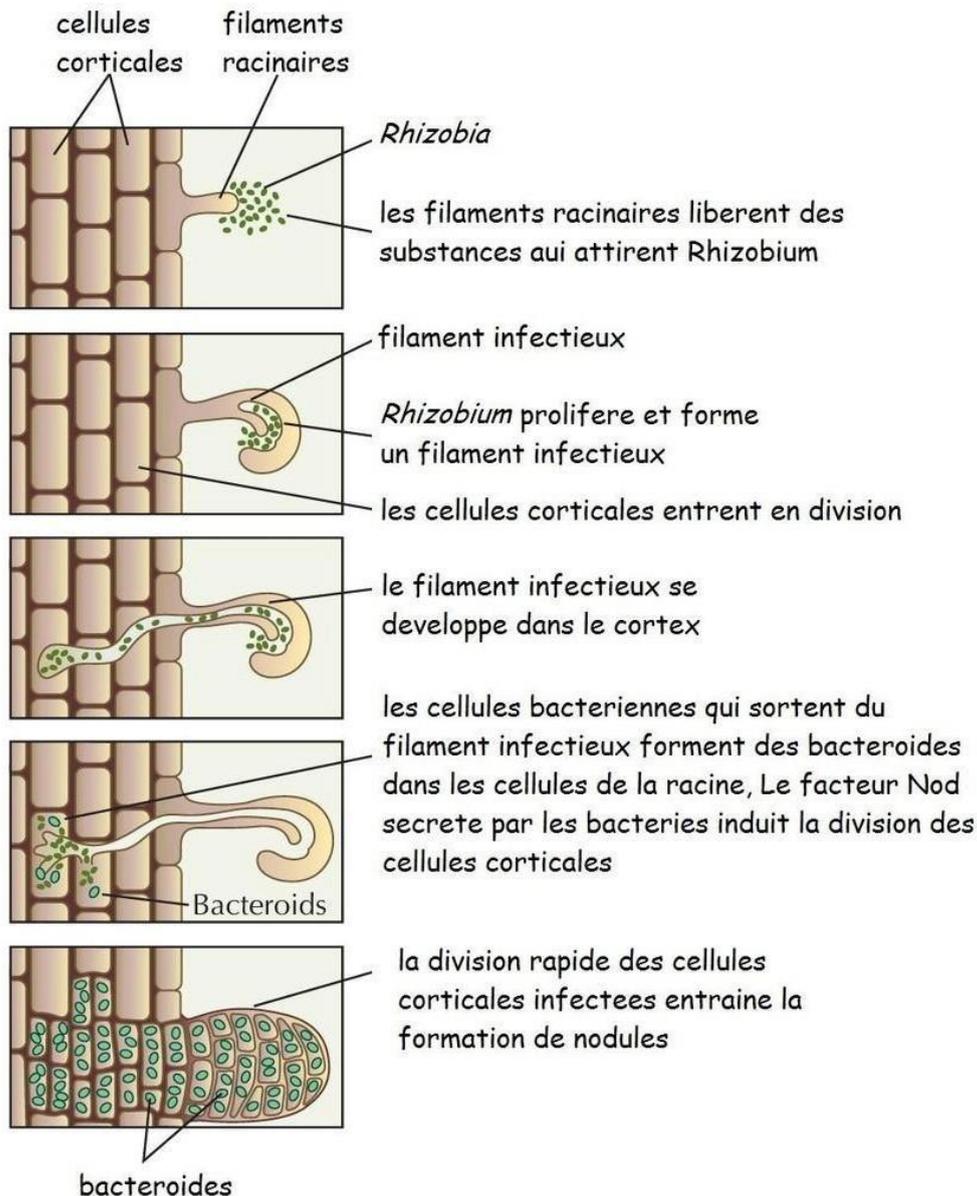
**Les gènes nod** : Les gènes nod ou gènes de nodulation, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire (**Dupuy et Nougier, 2005**). Les gènes régulateurs nodD codent pour des protéines en présence de signaux (de type flavonoïdes) sécrétés par la plante ce qui activent l'expression des autres gènes nod de la bactérie ; ils sont dits gènes nod structuraux (**Pelmont, 1995**).

### **b- Infection :**

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, « la rhicadhésine ». Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (**Perry et al., 2004**). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (GA et AIA ) qui assouplissent la paroi cellulaire (**Dupuy et Nougier, 2005**). Le *Rhizobium* s'apprête alors à entrer dans la plante, le facteur de nodulation induit une dépolarisation de la membrane. Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (**Machrafi, 2001**). En réponse le poil absorbant sécrète une enzyme, « la polygalacturonase », qui fragilise la paroi et facilite la pénétration des bactéries (**Dupuy et Nougier, 2005**). Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (**Perry et al., 2004**). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme.

### **c- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes :**

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe contenant des mucilages limités par des fibrilles celluloseuses d'origine végétale; c'est le filament d'infection (**Dupuy et Nougier, 2005**). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. L'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (**Bélanger, 1998**). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes, un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (**Dupuy et Nougier, 2005**). La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivie de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (**Machrafi, 2001**). La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en masse. Une membrane pér bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (**Perry et al., 2004**). Ce qui protège la plante contre l'ammoniac produit et une pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote (**Bélanger, 1998**).



**Figure 07 .** Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry et al., 2004).

### 1-2-3 Les facteurs environnementaux influençant la symbiose fixatrice d'azote :

L'état physiologique de l'hôte va conditionner le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian et al., 2015). Le potentiel fixateur d'azote d'une souche compétente de rhizobia, capable d'établir une symbiose avec une légumineuse, ne pourra pas être optimal si sa plante hôte est soumise à des perturbations liées aux paramètres environnementaux (Zahran, 1999). Ces perturbations peuvent se présenter sous la forme d'un stress salin, d'un stress hydrique d'un pH du sol défavorable et des températures élevées (Brockwell et al., 1995). Afin d'améliorer le rendement des cultures de légumineuses dans des environnements plus défavorables, les cultivars tolérants au stress doivent être associés à des rhizobiums tolérants aussi au stress (Laranjo et Oliveira, 2006).

## Synthèse bibliographique

---

### a-La salinité :

La salinité menace l'agriculture de nombreuses régions arides ou semi-arides (**Ashraf et al., 2008**). Le stress salin entraîne la diminution du potentiel osmotique de la solution du sol et des effets spécifiques d'ions (principalement  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) (**Munns et Tester, 2008**). Ce stress osmotique provoque un déséquilibre nutritionnel de la plante et une toxicité cellulaire, affectant son développement (**Munns et Tester, 2008**). La tolérance au sel varie selon les espèces de légumineuses (**Abdel-Wahab et Zahran, 1981 ; Fagg et Stewart, 1994**). Lors de la symbiose, les légumineuses et la formation de nodules sont plus sensibles au sel ou au stress osmotique que les rhizobiums (**Velagaleti et al., 1990 ; Zahran, 1991 ; El-Shinnawi et al., 1998**). Le stress salin inhibe les premières étapes de la symbiose. La réduction de l'activité fixatrice de  $\text{N}_2$  par le stress dû au sel est généralement attribuée à une réduction de la respiration des nodules (**Ikeda et al., 1992 ; Delgado et al., 1994**) et à une réduction de la production de protéines cytosoliques, par les nodules (**Delgado et al., 1994**). La réduction de l'activité photosynthétique pourrait également affecter la fixation de  $\text{N}_2$  par les légumineuses soumises au stress salin (**Georgiev et al., 1993**). La croissance d'un certain nombre de rhizobiums a été inhibée par 100 mM de NaCl, alors que certains rhizobiums, par exemple *Rhizobium meliloti*, étaient tolérants à 300 à 700 mM de NaCl. Les souches à croissance rapide étant plus tolérantes que celles à croissance lente (**Zahran, 1999**). Les Rhizobia développent des stratégies spécifiques pour faire face au stress salin, notamment l'accumulation de cations inorganiques (par exemple, le potassium) et la production intracellulaire de solutés organiques de faible poids moléculaire, tels que la proline, le tréhalose, la glycine bêtaïne, les ectoïnes et les polyamines (**Dong et al., 2017**). Ces composés protègent les cellules de la dessiccation et du stress osmotique en stabilisant la conformation des protéines et des membranes biologiques (**Wdowiak-Wróbel et al., 2013 ; Lunn et al., 2014**).

### b-Le stress hydrique :

La faible nodulation des légumineuses dans les sols arides est probablement due à la diminution des niveaux de population de rhizobiums pendant la saison sèche. Toutefois, l'influence de l'activité de l'eau et du sol sur la croissance et la vigueur des plantes, et donc la nodulation, ne doit pas être ignorée (**Sadowsky, 1995**).

Selon **Dommergues et al. (1998)**, la sécheresse exerce un effet très marqué sur le fonctionnement des nodules et la quantité de l'azote fixé, car le nodule est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige. En effet, le déficit hydrique modifie la structure et le fonctionnement des nodosités qui résulte de la modification des barrières à la diffusion d'oxygène, toutes fois, l'excès d'eau entraîne une baisse de diffusion d'oxygène vers les nodosités (**Guy, 1987**).

### c-Les températures :

Les températures élevées des sols dans les zones tropicales et subtropicales constituent un problème majeur pour la fixation biologique de l'azote des cultures de légumineuses (**Michiels et al., 1994**). Les effets du stress thermique sur la nodulation et la fixation de l'azote ont été étudiés depuis longtemps, même avant le début de la formation de nodules, la température au niveau de la rhizosphère influence non seulement la survie rhizobienne dans le sol, mais également l'échange de signaux moléculaires entre les deux partenaires symbiotiques (**Sadowsky, 2005**).

Une température élevée a un effet inhibiteur sur la formation des poils absorbants et sur la formation du cordon d'infection des bactéries. Par exemple, chez les légumineuses à graines

## Synthèse bibliographique

---

tropicales, aucun nodule n'a été formé sur l'arachide (*Arachis hypogaea*) à 40 °C ou sur le soja à 37 °C (**Hungria et Vargas, 2000**). Le fonctionnement des nodules peut également être affecté par les températures élevées entraînant une diminution du taux de certaines réactions essentielles, telles que la synthèse de la nitrogénase (**Brooks et al., 1984**).

L'évaluation de la tolérance des rhizobiums au stress thermique dans un milieu de culture a été utilisée comme moyen rapide de sélectionner les souches les plus tolérantes, en vue d'une évaluation plus poussée des performances symbiotiques dans des conditions de stress. La température optimale pour la croissance des souches rhizobiennes varie de 28 à 31 °C (**Mabrouk et al., 2018**), la tolérance des rhizobies à haute température évaluée in vitro était bien corrélée avec les résultats obtenus lors d'essais symbiotiques (**Kishinevsky et al., 1992; Hashem et al., 1998; Kulkarni et Nautiyal, 1999**).

L'existence de cette corrélation est probablement due au fait qu'une performance symbiotique plus élevée à hautes températures dépend plus de la capacité du rhizobium à survivre sous cette température que de la capacité à fixer l'azote dans ces conditions. L'activité de la nitrogénase est fortement affectée par une augmentation de la température, quelle que soit la sensibilité de la souche à la chaleur (**Michiels et al., 1994**).

### d-Le pH du sol :

Les sols acides limitent la production agricole dans le monde (**Edwards et al., 1991**). L'acidité du sol diminue la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses, ce qui a un effet négatif sur la croissance et le rendement, en particulier chez les plantes qui dépendent exclusivement de la symbiose pour acquérir l'azote (**Mohammadi et al., 2012; Bekere et al., 2013**). L'acidité limite à la fois la survie et la persistance des bactéries nodulantes des légumineuses dans le sol (**Correa et Barneix, 1997**), l'absence de nodules a été constatée chez les légumineuses cultivées dans des sols acides, en particulier dans les sols de pH inférieur à 5, la sensibilité de certaines souches rhizobiennes à ces conditions est une cause d'inhibition de la formation de nodules (**Graham et al., 1982 ; Carter et al., 1994 ; Bayoumi et al., 1995**). Des rapports récents ont indiqué que la sélection de partenaires symbiotiques, chez les *Medicago* (luzerne) tolèrent l'acidité du sol et peut rendre possible leur culture sur des sols d'un pH aussi acide que 4-3 (**Mabrouk et al., 2018**).

### 2-Microorganismes non symbiotiques :

Certaines espèces microbiennes comme les bactéries *Pseudomonas* (*fluorescens* et *Putida*), *Bacillus*, *azotobacter*, *azospirillum* (**Doornbos et al 2012**) ou les champignons du genre *Trichoderma* (**Harman et al 2004**) sont des microorganismes libres, non symbiotiques à la base, mais qui ont aussi la capacité de s'associer avec les racines des plantes. Ils vont alors s'assurer une source de nutriments pour la plante hôte, donc ils ont des effets bénéfiques directs ou indirects sur cette dernière. Ces bactéries, sont appelées les PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria), ou Rhizobactéries promouvant la croissance de la plante. Elles améliorent le développement et la croissance végétative, le contrôle des bioagresseurs susceptibles d'induire des maladies sur la plante (**Bakker et al 2007**).

On définit les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (**Kloepper, 1993**). Ils sont capables de se multiplier et de rivaliser avec les microorganismes pour occuper la rhizosphère riche en éléments nutritifs. L'association, le rôle et les effets que ces

## Synthèse bibliographique

---

rhizobactéries exercent sur la plante sont en fonction du succès de leur établissement dans la rhizosphère et elles peuvent avoir un effet positif sur la croissance des plantes. Ils stimulent la croissance des plantes par la production d'hormones et d'autres éléments favorisant directement la croissance de la plante ou indirectement par la production de substances capables de supprimer ou ralentir la croissance et le développement des agents phytopathogènes (Whipps, 2001 ; Beattie, 2006).

On distingue des PGPR Phytoprotectrices et des PGPR Phytostimulatrices ( Glick et al., 1995) :

Les PGPR phytoprotectrices favorisent indirectement la croissance des plantes par la suppression des micro-organismes délétères qui inhibent la croissance des plantes et en réduisant certaines maladies ( Kokalis-Burelle et al., 2006). Ils peuvent produire des antibiotiques pour les pathogènes, en détruisant leur molécules signaux (Podile et Kishore, 2007) , en activant la résistance systémique induite des plantes, qui augmentera la résistance des plantes à l'attaque des pathogènes, et en contrôlant la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs.

Les PGPR phytostimulatrices influencent la croissance des plantes par : l'amélioration de la biodisponibilité de certains nutriments par la fixation de l'azote atmosphérique par la symbiose (Zahir et al., 2003 ) ou par solubilisation du phosphate et Synthétise des phytohormones comme des auxines, cytokinines, gibbérellines, modulant le développement des plantes grâce à une activité 1aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACC )qui va entrainer une élongation racinaire et facilite la mise en place ou le fonctionnement des symbioses mutualistes entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote ou les champignons micorhiziens, (Chamam et al. 2013).

### 2-1 Le genre Azotobacter et Azospirillum :

**Tableau 02** : Tableau qui représente la taxonomie des Azotobacter (Beijerinck, 1901) et la taxonomie des Azospirillum (Tarrand et al, 1979).

<b>Règne</b>	Bacteria	Bacteria
<b>Embranchement</b>	Proteobacteria	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Gammaproteobacteria	Alphaproteobacteria
<b>Ordre</b>	Pseudomonadales	Rhodospirillales
<b>Famille</b>	Pseudomonadaceae	Rhodospirillaceae
<b>Genre</b>	Azotobacter	Azospirillum

## Synthèse bibliographique

---

Ces bactéries sont des aérobies strictes, hétérotrophe et libre dans le sol qui fixe l'azote atmosphérique chez la plupart des végétaux et le transforme en ammonium ( **Johana Dobereiner, 2017** ) . Leur cellule sont ovoïdes et relativement larges ( **Ahmed et Khan., 2005** ) . Les Azotobacter et les Azospirillum étant qualifiés comme PGPR synthétisent des substances biologiquement actives telles que les phytohormones (les auxines, AIA) stimulant ainsi la croissance des plantes. Ils solubilisent certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration et la fertilisation des sols ( **Chen et Shuler., 1995**).

### 2-2 Le genre Bacillus :

#### -Taxonomie du genre Bacillus :

- Règne : Bacteria
- Embranchement : Firmicutes
- Classe : Bacilli
- Ordre : Bacillales
- Famille : Bacillaceae
- Genre : Bacillus (**Cohn,1872**) .

Bacillus est le genre le plus abondant dans la rhizosphère et naturellement présent dans le voisinage immédiat des racines des plantes (**Abriouel et al., 2011**). Ce sont des bactéries à Gram-positif, aérobies mais également aéro-anaérobies facultatives, en forme de bâtonnets et formatrices de spores, (**Sansinenea & Ortiz, 2011**), hétérotrophes, majoritairement saprophytes, faciles à cultiver, leurs dimensions varient de (0,5 × 1,2 µm) à (2,5 × 10 µm), thermorésistantes (résistant à 100°C), peuvent se cultiver sur milieux ordinaires dans de larges limites de température (12- 45°C) et de pH (6 - 8,5). La plupart se développent plus vite à 30°C qu'à 37°C, et leur culture est abondante en 24h. En bouillon comme en gélose. Les espèces du genre Bacillus présentent une grande diversité de phénotypes et leur rôle dans les écosystèmes sont très variables. On les retrouve dans de nombreux environnements comme le sol, la roche, la poussière, les milieux aquatiques, la végétation, la nourriture et les intestins de différents insectes et animaux d'où leur description en tant que genre ubiquitaire (**Nicholson, 2002 ; Slepecky & Hemphill, 2006 ; Abriouel, Franz, Omar, & Galvez, 2011**).

L'activité PGPR de certaines de ces souches telle que les *Bacillus subtilis* a été connue depuis de nombreuses années, ce qui a entraîné une connaissance approfondie des mécanismes impliqués. Il y a un certain nombre de métabolites libérées par ces souches, qui affectent fortement l'environnement, en augmentant la disponibilité des éléments nutritifs des plantes (**Charest et al., 2005**). Les espèces de Bacillus utilisées comme biofertilisants ont probablement des effets directs sur la croissance des plantes grâce à la synthèse des hormones de croissance (**Amer et Utkhede, 2007**) et des effets indirects dans le biocontrôle comme agent de lutte biologique ( **Akkermans et al., 1996 ; Munsch et Alatosava, 2002** ) . Les souches de Bacillus solubilisatrices de phosphate stimulent la croissance des plantes grâce à une meilleure absorption de N, P, K et Fe. Les biofertilisants phosphoriques pourraient aider à accroître la disponibilité de phosphates accumulés dans le sol et favoriser la croissance des

## Synthèse bibliographique

---

plantes en augmentant l'efficacité de la fixation biologique de l'azote et la disponibilité du fer et le zinc à travers la production des substances de croissance (**Sivasakthi et al., 2014**).

### 2-3 Le genre *Pseudomonas* :

#### -Taxonomie du genre *Pseudomonas* :

- Règne : Bacteria
- Division : Proteobacteria
- Classe : Gammaproteobacteria
- Ordre : Pseudomonadales
- Famille : Pseudomonadaceae
- Genre : *Pseudomonas* (**Migula, 1894**).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* appartiennent à la famille des Pseudomonadaceae . Ce sont des bacilles à Gram négatif ,aérobies stricts ,droits et fins , aux extrémités arrondies ,d'une taille moyenne (**Palleroni, 1984**). Ces bactéries sont mobiles grâce à des flagelles en position polaire. Métabolisme oxydatif, elles évoluent à un pH neutre et leur température optimale de croissance est de 25 à 30 C (**Palleroni, 1984**) Elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie .

La famille des Pseudomonadaceae appartient à un vaste groupe de bactéries dont la création remonte à **1894 par Migula**. Ces bactéries sont principalement des microorganismes saprophytes d'origine essentiellement telluriques et aquatiques. Toutefois, ils peuvent être isolés des végétaux, des selles, des sécrétions, de la surface de la peau, et des produits alimentaires. L'action des bactéries du genre *Pseudomonas* varie selon les espèces et l'hôte. Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, les animaux (**Nishimori et al., 2000**) et les plantes (**Akkermans et al., 1996 ; Munsch et Alatosava, 2002**) alors que d'autres sont en revanche utiles. Parmi les espèces utiles, certaines exercent des effets stimulants pour la croissance des plantes, d'autres pourraient être utilisées comme fertilisants des sols puisqu'elles décomposent la matière organique. Les souches les plus efficaces de *Pseudomonas* sont les *Pseudomonas fluorescens et putida* . Ces dernières aident dans le maintien de la santé de la plante et elles sont métaboliquement et fonctionnellement très diversifiées (**Lata et al., 2002**).

Les *Pseudomonas* sont des PGPR importantes utilisées comme biofertilisants , inoculants et phytostimulateurs de la croissance et sont en mesure d'améliorer le développement des plantes par des mécanismes directs et indirects (**Walsh et al., 2001**). En effet, elles produisent une variété de substances biologiquement actives parmi lesquels, des composés favorisant la croissance qui représentent un vif intérêt (**Rodriguez Sr, 2006**). Ces souches sont capables de solubiliser le phosphore dans le sol et d'augmenter sa disponibilité pour la croissance des plantes (**Sundara et al., 2002**).

Les *Pseudomonas* fluorescents sont capable de produire des sidérophores peptidiques complexes appelés pyoverdines ou pseudobactines, qui sont des pigments fluorescents jaune-verts qui fixent efficacement le fer de l'environnement et le rendent indisponible pour d'autres composantes de la microflore du sol, les sidérophores sont des métabolites essentiels pour la

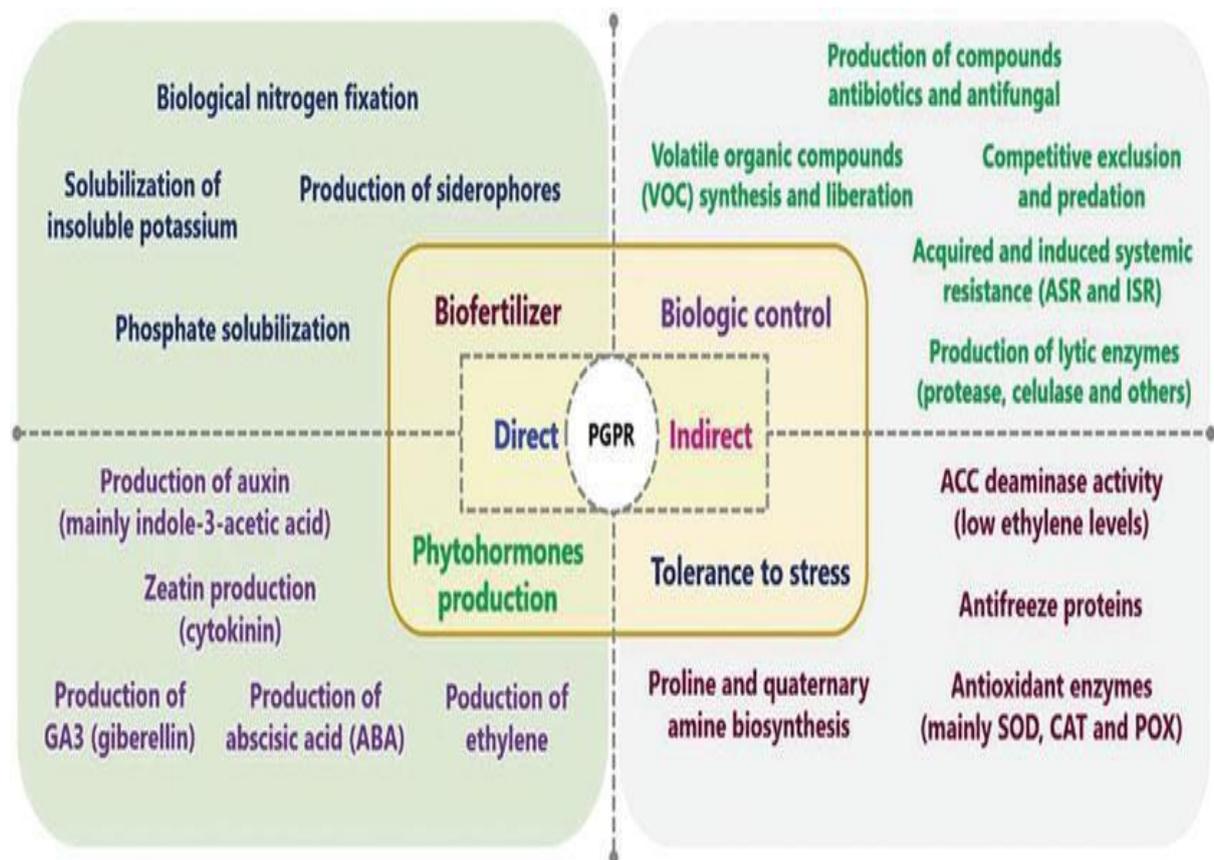
## **Synthèse bibliographique**

---

régulation du fer surtout en cas de carence en fer dans le sol (**Fallahzadeh-Mamaghani et al., 2009**), ces molécules sont des transporteurs des ions ferriques à l'intérieur des cellules microbiennes, par la suite le  $\text{Fe}^{3+}$  est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  dans le cytoplasme en augmentant la solubilité du fer dans leur rhizosphère, et elles sont également en mesure d'atténuer les effets défavorables des agents pathogènes (**Ravel et Cornelis, 2003 ; Cornelis et al., 2008**).

## Chapitre 03 : Mécanismes d'action des PGPR

Les effets bénéfiques de ces PGPR telles que : Les rhizobium, azotobacter, azospirillum, bacillus et pseudomonas, peuvent être directs, ou indirects. Les mécanismes indirects sont liés à la croissance des plantes et sont impliqués dans la réduction/suppression des pathogènes des plantes. Ainsi les mécanismes directs de la promotion de la croissance des plantes sont le résultat du pouvoir d'acquisition des nutriments ou de la stimulation des hormones de la croissance (CHENNAOUI Nabila, 2008) (fig.08).



**Figure 08.** Mécanismes directs et indirects médiés par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Figueiredo *et al.*, 2016).

### 1-Mécanismes indirects des PGPR :

Les PGPR aident indirectement la croissance des plantes par la suppression des micro-organismes délétères qui inhibent la croissance des plantes, ou des pathogènes des racines par antibiose, parasitisme, compétition pour les nutriments et l'espace à proximité des racines des plantes, et/ou l'activation des réactions de défense de la plante hôte (Podile et Kishore, 2007). Les *Bacillus subtilis* sont les PGPR les plus utilisées en raison de leur capacité de produire des antibiotiques et de réduire la nuisibilité de la maladie (Kokalis-Burelle *et al.*, 2006). Les

## **Synthèse bibliographique**

---

*Pseudomonas* sont également connues d'avoir la capacité de supprimer les pathogènes telluriques en produisant des métabolites antifongiques et antibactérien en séquestrant le fer dans la rhizosphère par la libération de sidérophores chélatrices du fer, le rendant indisponible pour les autres organismes (**Dwivedi et Johri, 2003**). La suppression des micro-organismes nuisibles par les PGPR repose principalement sur la production d'enzymes hydrolytiques (chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase) qui dégradent la paroi cellulaire des champignons pathogènes (**Tanaka et Watanabe ., 1995**) qui produisent des toxines et qui induisent la résistance en activant la réponse de défense des plantes contre les pathogènes (lutte biologique) (**Podile et Kishore, 2007**).

### **2- Mécanismes directs des PGPR :**

#### **2-1- Biofertilisation :**

##### **2-1- 1- Fixation d'azote :**

L'azote est un nutriment vital pour la croissance et la productivité des plantes. Différents microorganismes de la rhizosphère assurent une fixation biologique de l'azote et le transforment en ammoniac, forme assimilable par la plante à l'aide d'un système enzymatique complexe connu sous le nom de nitrogénase (**Sathya et al., 2017**). Les PGPR ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et le fournir aux plantes par deux mécanismes : symbiotique et non symbiotique (**Gouda et al., 2018**). La fixation symbiotique de l'azote est une relation de mutualisme entre la plante et la bactérie (**Gupta et al., 2015**). Les associations les plus connues sont celles des Rhizobiaceae et des Actinobacteria (**Sathya et al., 2017**). Les Rhizobia, comme décrit précédemment, établissent des relations symbiotiques avec des légumineuses caractérisées par la formation de nodosités sur les racines hôtes. En plus des rhizobia, le genre *Frankia* appartenant aux Actinobacteria sont des fixateurs polyvalent d'azote, chez les non légumineuses (arbres et arbustes ligneux) dans des conditions de symbiose et de vie libre, ils infectent les cellules racinaires des plantes actinorhiziennes soit par une infection intracellulaire des poils racinaires ou par une invasion des racines intercellulaires (**Nimaichand et al., 2016**).

La fixation de l'azote peut aussi être non symbiotique chez les non légumineuses. Elle peut être assurée par plusieurs Actinobacteria endophytes comme *Arthrobacter*, *Agromyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, et *Streptomyces* (**Sathya et al., 2017**). En effet, la fixation non symbiotique fournit en général un flux d'azote plus faible aux plantes associées que la fixation symbiotique (**Swarnalakshmi et al., 2016 ; Numan et al., 2018**). Cependant, elle présente une grande importance agronomique (**Gupta et al., 2015**).

##### **1-2 -Solubilisation du Phosphate :**

Le phosphore est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance (**Franco-Correa et Chavarro-Anzola, 2016**). Il joue un rôle important dans pratiquement tous les processus métaboliques majeurs de la plante, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse de macromolécules et la respiration (**Gouda et al., 2018**).

## Synthèse bibliographique

---

Le phosphore est présent dans le sol à la fois sous forme organique (phosphomonoesters et phosphotriesters) et inorganique (composés minéraux insolubles) (Oteino et al., 2015). Malgré son abondance dans le sol, les plantes ne l'assimilent que sous deux formes solubles (les ions monobasiques et diabasiques). La capacité de certains micro-organismes à convertir le phosphate insoluble en une forme accessible est une caractéristique importante des PGPR pour augmenter leur rendement (Zaidi et al., 2015). Les principaux mécanismes de la solubilisation des phosphates employés par les PGPR comprennent :

la solubilisation après libération d'acides organiques de faible poids moléculaire (Gouda et al., 2018), comme l'acide citrique, gluconique, lactique, malique, oxalique, propionique, et succinique (Sathya et al., 2017). La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduit à l'acidification de l'environnement des cellules microbiennes et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique (Saharan et Nehra, 2011 ; Nimaichand et al., 2016).

Plusieurs genres bactériens solubilisent le phosphate comme les Rhizobia (*R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *M. mediterraneum*, *Bradyrhizobium* sp. et *B. japonicum*) (Gopalakrishnan et al., 2015), *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* et *Serratia* (Gouda et al., 2018) et les Actinobacteria comme *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Nocardia* (Sathya et al., 2017). Ces bactéries pourraient donc constituer une source prometteuse comme agents biofertilisants dans l'agriculture (Oteino et al., 2015 ; Zaidi et al., 2015).

### 1-3 -Solubilisation du potassium :

Le potassium est un macronutriment essentiel pour la croissance des plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% existe sous forme de roches insolubles et de minéraux silicatés. En plus d'augmenter la résistance des plantes aux maladies, aux parasites et aux stress abiotiques, le potassium joue également un rôle important dans l'activation enzymatique, la synthèse protéique et la photosynthèse (Amaresan et al., 2018). Sans potassium adéquat, les plantes ont des racines mal développées, une faible production de graines, un taux de croissance lent et un rendement inférieur. La capacité de quelques micro-organismes à convertir le potassium insoluble en forme accessible est un trait important des PGPR (Gouda et al., 2018). Le principal mécanisme de solubilisation du potassium de ces bactéries est la production d'acides organiques tels que l'oxalate, le succinate et le citrate (Figueiredo et al., 2016). Les bactéries les plus impliquées dans la solubilisation du potassium sont notamment *Arthrobacter* sp., *Streptomyces* spp. (Etesami et al., 2017), *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Klebsilla*, *Erwinia* (Wang et al., 2020), *Acidithiobacillus* spp., *Bacillus edaphicus*, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia* spp. et *Paenibacillus* spp. (Dos Santos et al., 2020).

### 2 –Phyostimulation :

#### 2-1- Production d'hormones de croissances :

L'un des mécanismes directs de promotion de la croissance des plantes utilisé par les PGPR est la production de phytohormones telles les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscissique. Ce sont des composés organiques naturels qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations (Vejan et al., 2016 ;

## Synthèse bibliographique

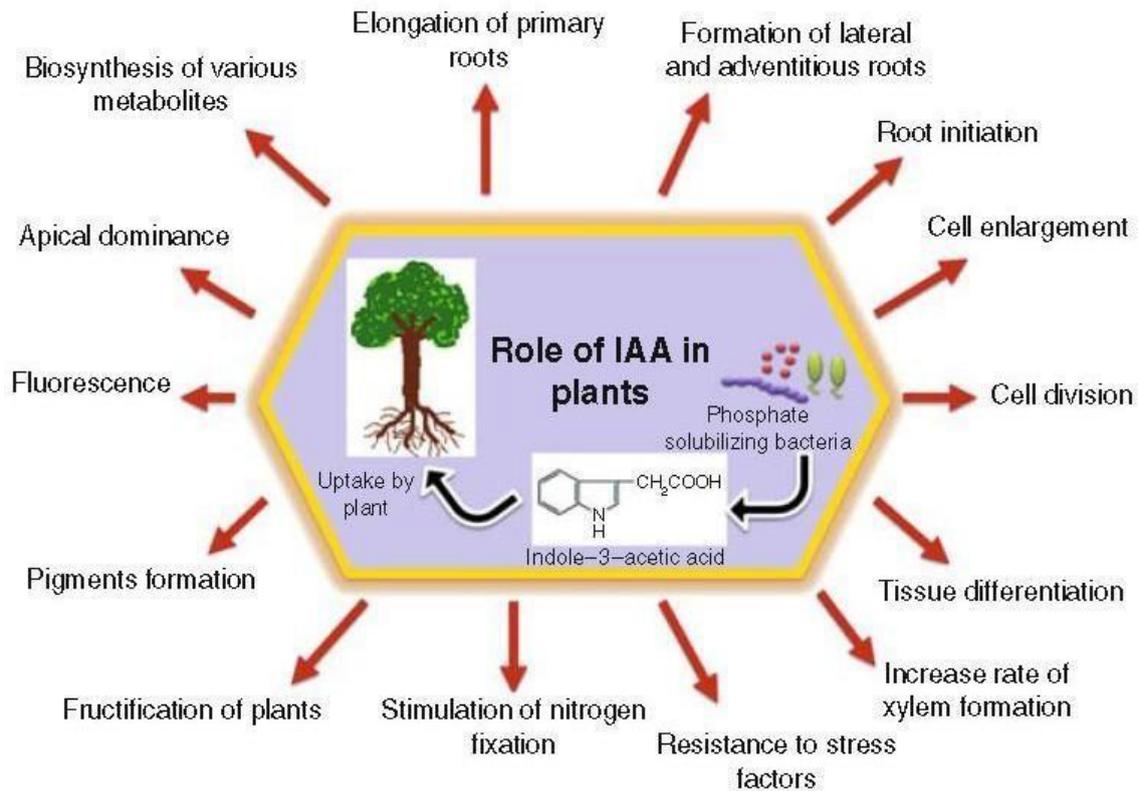
---

Vargas *et al.*, 2017). Ces phytohormones sont impliquées dans la régulation de plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaire, la différenciation tissulaire et l'augmentation de l'absorption des nutriments et de l'eau (Gouda *et al.*, 2018).

### 2-1-1-Acide indole acétique (AIA) :

L'acide indole acétique est l'auxine naturelle la plus répandue chez les plantes (Franco-Correa et Chavarro-Anzola, 2016) et quantitativement la plus produite par les PGPR (Gouda *et al.*, 2018). L'AIA fonctionne comme une molécule de signal importante dans la régulation du développement des plantes (Ruzzi et Aroca, 2015). Généralement, il affecte la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales ; stimule la germination des graines des semences et des tubercules; augmente le taux de développement du xylème et des racines; contrôle les processus de croissance végétative et initie la formation des racines latérales et adventives. Il intervient également dans les tropismes en réponse à la gravité (gravitropisme) ou à la lumière (phototropisme), affecte la photosynthèse, la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites et la résistance aux conditions de stress (fig.09) (Ahemad et Kibret, 2014 ; Gupta *et al.*, 2015). L'AIA est également impliqué dans la fixation d'azote (Sahasrabudhe, 2011) et l'initiation et le développement des nodules chez les légumineuses telles que *Medicago* (Martinez-Hidalgo *et al.*, 2014).

La capacité à produire cette phytohormone est rapportée chez (80%) des bactéries rhizosphériques. En effet, le tryptophane est le principal précurseur de la biosynthèse de l'AIA chez les bactéries, le récupérant à partir des exsudats racinaires (Gupta *et al.*, 2015). Selon Ahemad et Kibret (2014), au moins cinq voies ont été décrites pour la biosynthèse de l'AIA chez les microorganismes, dont la plupart présentent une similarité avec celles décrites chez les plantes, bien que certains intermédiaires puissent différer. Cependant, la formation de l'AIA via la voie de l'acide indole-3-pyruvique et la voie de l'indole-3-acétaldéhyde est le mécanisme le plus commun chez les bactéries (Gupta *et al.*, 2015). En effet, il a été rapporté que parmi les communautés bactériennes du sol, plusieurs genres tels que *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Gupta *et al.*, 2015), *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* (Ferreira *et al.*, 2019) *Streptomyces*, *Frankia*, *Nocardia* et *Kitasatospora* sont capables de produire l'AIA participant ainsi à la promotion de la croissance de plusieurs plantes économiquement importantes (Numan *et al.*, 2018).



**Figure 09.** Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan et al., 2009).

### 2-1-2-Cytokinines :

Les cytokinines sont des phytohormones qui jouent un rôle crucial dans pratiquement tous les aspects de la croissance et du développement des plantes tels que la division cellulaire, l'activation de la germination des graines, la régulation de la différenciation vasculaire, la promotion de la ramification, la croissance des racines et le développement des plantes.

Cependant, l'effet physiologique le plus dominant des cytokinines est l'élongation des tiges (Vejan et al., 2016) et le développement des nodules fixateurs d'azote chez les légumineuses (Davies, 2018), en particulier pour l'initiation des divisions des cellules corticales des racines et l'induction de l'expression des gènes dans la voie de signalisation des facteurs Nod (Wang et al., 2018).

En effet, ce type de molécules peut être produit par plusieurs PGPR comme *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis* (Gupta et al., 2015) et divers genres d'Actinobacteria (Van der Meij et al., 2017) tels que *Streptomyces* (Sharma et al., 2014) et *Arthrobacter* (Gouda et al., 2018).

Cependant, les souches de *Rhizobium* sont signalées comme les bactéries les plus productrices des cytokinines (Patil et al., 2017) et en particulier *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Sinorhizobium meliloti* (Goswami et al., 2016).

### 2-1-3-Gibbérellines :

Les gibbérellines sont principalement impliquées dans plusieurs processus de développement des plantes tels que la division cellulaire, la germination des graines, l'élongation des tiges,

## Synthèse bibliographique

---

la floraison et le développement des plantes (Vejan *et al.*, 2016). Elles semblent être nécessaires à différentes étapes de la nodulation des légumineuses (Vargas *et al.*, 2017). Leur production est détectée chez diverses PGPR telles *Azotobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* (Gupta *et al.*, 2015), *Rhizobium*, *S. meliloti* (Gopalakrishnan *et al.*, 2015) et diverses Actinobacteria rhizosphériques et endophytes (Van der Meij *et al.*, 2017).

### 2-1-4- Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase :

L'éthylène est une hormone végétale synthétisée d'une manière endogène par les plantes (Aamir *et al.*, 2013). Elle est impliquée dans beaucoup de processus physiologiques, comme la croissance et l'élongation des racines, la germination des graines, la floraison, la maturation des fruits, l'abscission des feuilles, la régulation de la sénescence et la formation de nodules (Dos Santos *et al.*, 2020). Cependant, dans des conditions de stress telles que celles générées par la salinité, la sécheresse, l'exploitation de l'eau, les métaux lourds et la pathogénicité, le taux d'éthylène endogène augmente significativement, ce qui affecte négativement la croissance globale des plantes (Ahemad et Kibret, 2014). Certaines des conséquences de la surproduction de cette molécule comprennent l'induction de la défoliation et les processus cellulaires qui conduisent à l'inhibition de la croissance des racines et des tiges en même temps que la sénescence prématurée, ce qui entraîne une plus faible performance des cultures (Vejan *et al.*, 2016). De plus, l'éthylène, à forte concentration, empêche le développement des nodules (Aamir *et al.*, 2013) et affecte la fixation de l'azote chez les légumineuses (Vejan *et al.*, 2016).

La surproduction de l'éthylène en réponse aux stress biotiques et abiotiques conduit à l'inhibition de la croissance de la plante dans son ensemble (Ahemad et Kibret, 2014). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme capable de cliver l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique), le précurseur immédiat de l'éthylène en ammoniac et en  $\alpha$ -cétobutyrate, favorisant ainsi la croissance et le développement des plantes en diminuant les niveaux d'éthylène (Ruzzi et Aroca, 2015). Les PGPR produisant cette enzyme soulageraient ainsi la plante de plusieurs stress causés par la salinité élevée, la sécheresse, les métaux lourds et les effets des agents pathogènes (Van de Poel et Van Der Straeten, 2014).

L'ACC désaminase est synthétisée par plusieurs genres bactériens tels *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Rhizobium* (Kenneth *et al.*, 2019), *Bradyrhizobium* (Gopalakrishnan *et al.*, 2015) et de nombreuses Actinobacteria comme *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardia* et *Rhodococcus* (Sathya *et al.*, 2017).

De nombreuses souches telles *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. hedysari*, *R. japonicum*, *R. gallicum*, *B. japonicum*, *B. elkani*, *M. loti* et *S. meliloti* peuvent aussi produire l'ACC désaminase (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). L'inoculation par ces bactéries favorise l'élongation racinaire de la plante, stimule la croissance des tiges, facilite l'absorption de N, P et K, améliore la nodulation rhizobienne et induit la tolérance à la salinité et la sécheresse chez diverses cultures (Ahemad et Kibret, 2014). Ainsi, l'inoculation des semences avec des rhizobactéries productrices de l'ACC désaminase est l'approche la plus prometteuse afin d'améliorer la production et le rendement des cultures dans les régions touchées par la salinité (Chaudhary et Sindhu, 2017).

## Synthèse bibliographique

**Tableau 03:** Exemples de phytohormones et d'enzyme stimulateurs de croissances produites par les PGPR (Kaymak, 2010).

Phytohormones	PGPR	références
Gibbérellines	Acetobacter diazotrophicus Herbospirillum seropedicae Bacillus licheniformis Bacillus pumilus Bacillus cereus MJ-1 Bacillus macroides CJ-29 Bacillus pumilus CJ-69	<b>Bastian et al. (1998)</b> <b>Gutierrez-Manero et al. (2001)</b> <b>Joo et al. (2004)</b>
AIA	Agrobacterium sp. Alcaligenes piechaudii Comamonas acidovorans Azospirillum brasilense Aeromonas veronii Enterobacter cloacae Enterobacter sp. Comamonas acidovorans RC41 Paenibacillus polymyxa RC05 Bacillus RC23 Bacillus simplex RC19 Bacillus RC03 Bacillus megaterium RC01	<b>Barazani et Friedman (1999)</b> <b>Kaushik et al. (2000)</b> <b>Mehnaz et al. (2001)</b> <b>Erturk et al. (2008)</b> <b>Mirza et al. (2001)</b>
Cytokinine	Paenibacillus polymyxa Pseudomonas fluorescens	<b>Timmusk et al. (1999)</b> <b>de Salamone et al. (2001)</b> <b>Bent et al. (2001)</b>
ACC deaminase	Pseudomonas putida Pseudomonas cepacia Enterobacter cloacae Pseudomonas brassicacearum Am3 Variovorax paradoxus 5C-2 Pseudomonas putida Biovar B Pseudomonas putida N21 Pseudomonas aeruginosa N39 Serratia proteamaculans M35	<b>Mayak et al. (1999)</b> <b>Cattelan et al. (1999)</b> <b>Saleh et Glick (2001)</b> <b>Belimov et al. (2007)</b> <b>Belimov et al. (2009)</b> <b>Rodriguez et al. (2008)</b> <b>Zahir et al. (2009)</b>

## **Partie 02 : Partie expérimentale**

## **Matériels et Méthode**

---

Dans ce travail nous avons essayé de faire une synthèse à partir de travaux publiés, portant sur l'utilisation des rhizobactéries dans la phytostimulation de la culture de luzerne. (légumineuse) (Annexe 01) dans certaines régions en Algérie.

Le 1<sup>er</sup> article traité est : **(Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara), 2022 Salim Azib et al.**

Le 2<sup>ème</sup> article porté sur : **(Improvement of *Medicago sativa* Crops Productivity by the Co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*–Actinobacteria Under Salt Stress). 2021, Samira Saidi et al.**

Dans ces articles les auteurs ont réalisés :

- L'isolement et l'identification des souches de rhizobiums dans les régions du : Sahara Algérien, (Salim Azib., 2022) ; Est algérien (Samira Saidi., 2021) .

- Des essais in situ des PGPR isolés et identifiés sur la biostimulation de la croissance des plantes.

- Des essais contrôlés sous serre (ex situ) de la luzerne.

### **Partie I :**

#### **1- Matériels :**

##### **a-Matériels non biologique :**

- Milieu de culture (Annexe 02).

- Appareillage et verrerie (Annexe 03).

##### **b-Matériels biologique :**

- Matériel végétale : Les semences de Luzerne .

- Matériel microbien : Deux souches de référence *Sinorhizobium meliloti* 1021(R1) et *Sinorhizobium meliloti* 2011(R2) ,elles ont été transmises par Dr Hélène BERGES , du Centre National de Ressources Génomiques Végétales,( INRA-France).

#### **2-Méthodes :**

##### **2-1 Les sites et périodes de la collecte des échantillons :**

Pour les deux travaux la collecte des nodules a été réalisée pendant le stade de floraison-début gousses. La récolte a été effectuée au printemps. Car cette période de l'année, les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines leur couleur rougeâtre indiquant la fixation active de l'azote.

Les échantillons du sol d'Actinobacteria sont collectés à partir de deux sites géographiquement distincts : Melghir Sebkh de Biskra et Guerbes Senhadja de Skikda.

Dans les deux travaux : Ils ont fait la même méthode d'isolement et de purification des isolats rhizobiums sous des conditions aseptiques.

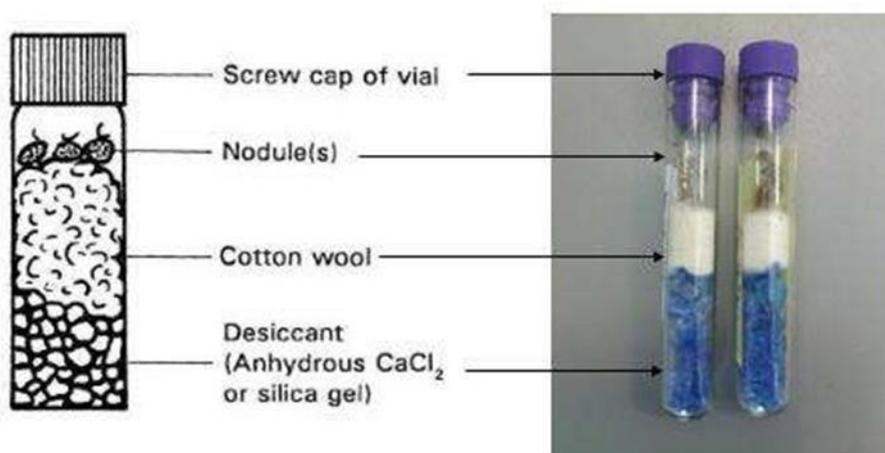
## Matériels et Méthode

Concernant les travaux 01, les nodules ont été collectés directement (*in situ*) des racines de luzerne dans 9 Stations appartenant aux régions de Ouargla , Ghardaïa et à El Oued, des échantillons de sol ont été prélevés dans 5 stations ayant comme précédent cultural la luzerne. Le piégeage des bactéries symbiotiques, potentiellement présentes dans les échantillons de sols prélevés, a été réalisé en conditions contrôlées sous serre (*ex situ*) en utilisant la luzerne comme plante piège.

-Concernant les travaux 02 : la collecte des nodules des racines de luzerne est effectuée à partir de trois sites d'échantillonnage localisés à :

- Site 01 : ITGC (Institut Technologique des Grandes Cultures ) Sétif .
- Site 02 : Ferme pilote de Béni Fouada (Sétif).
- Site 03 : Ain Oulmene (Sétif).

Pour les deux travaux la collecte des nodules à partir des racines des plantes de luzerne a été réalisée de la même manière selon les techniques préconisées par **Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994)**. Il s'agit de creuser manuellement environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire, puis se débarrasser des racines de leur sol sans toutefois endommager les nodules, puis les racines avec leurs nodules sont placées dans des sacs en plastique stériles et transportées immédiatement au laboratoire. Une fois arrivée au laboratoire, ils les racines sont lavées délicatement à l'eau de robinet pour enlever les restes de terre , puis les nodules sont détachés des racines en coupant à l'aide d'un couteau à 0.5 cm des deux côtés du nodule puis ils sont séchés dans du papier filtre (**Vincent, 1970 ; Beck et al., 1993**). Les nodules frais sont traités immédiatement ou bien conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h pour une utilisation ultérieure. Pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur, le silica gel (fig 10) (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994**) .



**Figure 10.** Conservation des nodules dans des tubes.

## **Matériels et Méthode**

---

Pour les utilisations après une longue conservation les nodules seront hydratés avec l'eau distillée dans des tubes Eppendorf. Après élimination de l'eau, les nodules sont désinfectés par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium 2% pendant 10 mn puis dans l'éthanol 75 % pendant 5 mn, ensuite, rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile et séchés .

-Concernant les souches d'actinobactéries des travaux 02 sont collectés à partir de :

-La Sebkhia Melghir de Biskra.

-Guerbes-Senhadja de Skikda.

### **2-2 Isolements et Purifications des isolats :**

#### **2-2-1 Isolement et purification des rhizobium à partir des nodules :**

Pour les deux auteurs : les nodules désinfectés ont été écrasés dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. L'opération a été réalisée dans des conditions d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire. A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le broyat a été étalé sur boîte de Pétri contenant le milieu YMA (annexe 02) (**Vincent, 1970**). L'ensemencement a été réalisé selon la technique des quatre cadrans ou par épuisement de manière à avoir des colonies isolées et faciles à caractériser. Les différentes boîtes ont été incubées trois jours à 28°C. Pour chaque échantillon, Les colonies qui présente une similarité a été prélevée parmi des colonies morphologiquement similaires, puis repiquer plusieurs fois sur le milieu YMA jusqu'à purification.

-Après purification les colonies ont été conservé :

-Soit par transfère sur gélose YMA et conserver a 4°C .

-Soit par transfère sur YMA bouillon puis ajouter le glycérole et congeler (conserver) à -80°C.

#### **2-2-2 Isolement et purification des Actinobacteria :**

**Deux méthodes ont été employées pour l'isolement de ces bactéries :**

-L'isolement des Actinobacteria à partir du sol sableux situé dans la Sebkhia Melghir a été effectué en diluant 10 g de sol dans 90 ml d'eau physiologique stérile. L'ensemble a été agité vigoureusement pendant 1h. Des dilutions décimales (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-5</sup>) ont été réalisés à partir de cette suspension dans une solution d'eau physiologique. 100 µl de chaque dilution serviront à ensemencer deux milieux de culture différents, le milieu International Streptomyces Program 2 (ISP2) (annexe02) (**Shirling et Gottlieb, 1966**) et le milieu Luedemann (annexe 02) (**Luedemann, 1968**), supplémentés de cycloheximide (50 µg/ml). L'incubation a été effectué à 28 °C pendant deux semaines. De chaque boîte incubée, des colonies bien isolées ayant des aspects ou morphologie similaire aux actinobactérie sont prélevée puis repiquées sur de nouvelles géloses en boîtes de Pétri. Cette opération a été renouvelée jusqu'à l'obtention de cultures pures.

-Un second isolement a été réalisé à partir des nodules d'*Alnus glutinosa* provenant de la région de Guerbes-Senhadja. Les racines avec leurs nodules avaient subi une série de lavage à l'eau distillée stérile afin d'éliminer le sol rhizosphérique, puis à l'aide d'un couteau,

## **Matériels et Méthode**

---

les nodules ont été détachés, stérilisés en surface par immersion dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) pendant 10 mn ensuite, rincés plusieurs fois (5 à 10 fois) à l'eau distillée stérile.

Chaque lobe nodulaire stérilisé a été ensemencé dans un tube à essai contenant 5 ml du milieu BAP (Annexe 02) et incubé à 28 °C pendant plusieurs semaines, ils ont éliminé à chaque fois les tubes de culture contaminés généralement par des bactéries à croissance **rapide (Louati et al., 2019)**. Après incubation, 13 cultures bactériennes ont été obtenus et repiqués sur milieu ISP2 solide puis incubées à 28 °C pendant 2 semaines. Ainsi, toutes les cultures bactériennes ont été examinés pour leurs activités PGP. Puis conserver pour d'autre test et la souche Ag1 est sélectionnée pour les expériences ultérieures de caractérisation et d'inoculation des plantes. Tous les isolats ont été maintenus sur des géloses inclinées pour le stockage à court terme et dans le milieu additionné de glycérol 30% à -20 °C pour une conservation plus longue.

### **3-Identifications et Caractérisations des isolats :**

#### **-Travaux 01 :**

L'auteur après isolement et purification a réaliser plusieurs étapes pour identifier et caractériser les souches :

- Première étape :

#### **3-1 Caractérisations des isolats des rhizobium :**

##### **3-1-1 Authentification des isolats :**

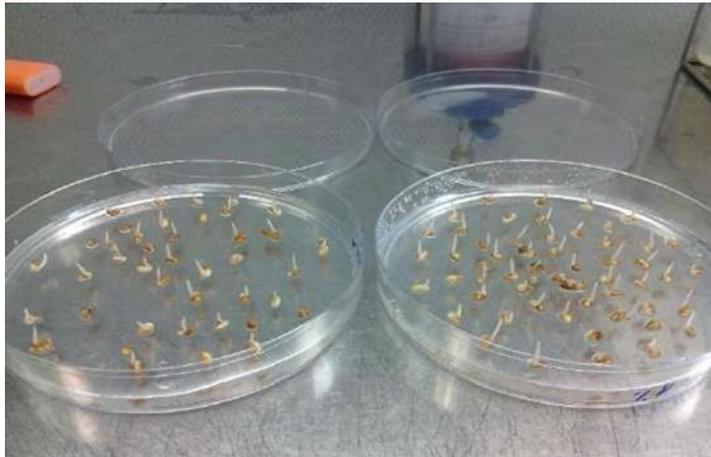
La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia. L'authentification, autrement appelée test de nodulation, permet d'évaluer le pouvoir infectieux de chaque isolats obtenus vis-à-vis des plantules de luzerne dans des conditions microbiologiquement contrôlées, comme décrit par **Vincent (1970) et Beck et al. (1993)**.

Sous une hotte à flux laminaire, les graines de luzerne sont lavées dans l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0,1% (annexe 2) pendant 5 à 7 minutes. Les graines sont rincées 5 fois à l'eau distillée stérile et au dernier rinçage on les laisse gonfler dans l'eau distillée stérile pendant 1 heure (**Somasegaran et Hoben, 1985**). Elles sont ensuite déposées dans des boîtes gélosées (YMA) (annexe 02) et placées dans une chambre de culture à 22°C à l'obscurité pendant 48 heures. Les boîtes sont ensuite renversées afin que les radicelles ne s'enfoncent pas dans l'agar.

Une fois germés (photo 01), les plantules ont été transférées dans les tubes de Gibson (photo 02) (**Gibson, 1980**) contenant le milieu incliné de Fahraeus sans azote (annexe 02) (**Fahraeus, 1957**) et inoculées avec 1ml d'une suspension bactérienne, provenant des isolat mis en bouillon YMB (annexe 02) incubé à 28°C pendant 72h sous agitation continue. Les tubes ont été placés dans une chambre de culture, pendant six semaines, avec une photopériode lumière/obscurité de 16 h / 8 h et une température de 22°C.

## Matériels et Méthode

---



**Photo 01:** Germination des graines de luzerne sur boîte gélosée



**Photo02:** Letube Gibson contenant milieu de culture solide

Deuxième étape :

### **3-1-2 Caractérisation physiologique des isolats :**

Dans ce travail ,seul les souches ayant le profil de rhizobium et ayant formés des nodules chez les plantes de luzerne , on subit quelques test physiologiques pour une meilleure caractérisation . Les souches qui ont présenté une macromorphologie similaires aux rhizobia et capables de former des nodules fixateurs d'azote chez les plantes de luzerne ont subit quelques tests physiologiques telles que : la tolérance à la température , aux pH et à la salinité.

A ces souches (locales ) ,deux souches de références (Sm1021, Sm 2011) ont été utilisées comme témoin.

#### **a-Tolérance à la température :**

Afin d'estimer la croissance des isolats à différentes températures, les souches sont mises en culture sur le milieu YM liquide et solide (annexe 02) et incubées pendant 72 heures à

## **Matériels et Méthode**

---

différentes températures : 4°C, 28°C, 37°C et 45°C (à raison de trois répétition par température). Sur milieu liquide , les tubes ont étéensemencés par 100 µl d'une préculture fraîche et incubés dans un incubateur-agitateur à 200 tpm. Sur milieu YM solide , l'ensemencement des différents isolats est effectué en surface (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994**). La croissance est estimée, sur milieu liquide, par la mesure de la DO à 600 nm (**Wei et al., 2004**) et sur milieu solide par la présence ou absence de colonies sur les boites de Pétri.

### **b-Tolérance au pH :**

Les isolats ont été évalués pour leur tolérance au pH, sur milieu YM solide et liquide (annexe 02) , selon la procédure décrite pour le test précédent. Les valeurs de pH retenues pour ce test sont : 4 ; 5 ; 6 ; 6.8 ; 8 et 9.

### **c-Tolérance à la salinité :**

L'objectif de ce test est d'étudier la capacité des bactéries à résister aux conditions de salinité élevées et à déterminer les valeurs inhibitrices sur milieu YM (annexe 02) . La tolérance à la salinité a été évaluée pour le NaCl. Le sel a été ajouté au milieu avant autoclavage aux concentrations suivantes : 1.7 mM, 40mM, 80mM, 160mM, 320mM, 640mM et 1280 mM. Sur milieu solide, les boites ont étéensemencées comme dans les tests précédents et ont été ensuite mises en incubation à 28°C pendant 72 heures. Sur milieu liquide, ils ont utilisé la méthode de Bioscreen (annexe 07) ou des plaques composés de centaines de puits et de concentration différentes en sel (mode opératoire ,voir annexe 05) sont inoculés avec les différents isolats et les deux souches de références . La lecture des isolats est effectués dans un appareil entièrement automatisé et développé pour effectuer une large gamme d'expériences en microbiologie. C'est Microbiology Reader (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, FINLAND (<http://www.bioscreen.fi/>)), A cette caractérisation phénotypique basé sur les critères morphologique, symbiotique et physiologique. Les souches ont subit une caractérisation phylogénétique .

### **3-1-3 Caractérisation phylogénétique :**

Toutes les souches qui ont été caractérisés phénotypiquement ont été caractérisés phylogénétiquement afin d' évaluer et confirmer leur position taxonomique. Pour cela les souches ont subit : l'extraction de l'ADN , une amplification et quantification de l'ADN par technique PCR pour qu'ils peuvent purifier les produit obtenus .

### **- Travaux 02 :**

L'auteur après isolement et purification a réaliser plusieurs étapes pour identifier et caractériser les souches :

### **3-2 Caractérisations des isolats des rhizobium :**

#### **3-2-1 Caractères morphologiques :**

## Matériels et Méthode

---

Après isolement sur YMA (annexe 02) une description macromorphologique selon Somasegaran et Hoben (1994) a été faite et basé à la forme, la taille, la couleur et la texture des colonies.

Afin de différencier les *Rhizobia*, les souches décrites au préalable sur milieu YMA ont été transférés sur le milieu YMA (annexe 02) contenant le rouge Congo (0,0025%) puis incubé à 28°C pendant 24 à 48h. Les colonies typiques aux *Rhizobia* n'absorbent pas le rouge Congo ou l'absorbent faiblement par rapport aux contaminants (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Les souches ayant pas absorber le rouge congo ont été transférés dans le milieu YMA (annexe 02) additionné de 1% de bleu de Bromothymol en spot et incubé pendant 48 h à 28°C (**Vincent., 1970**). Le bleu de bromothymol est un indicateur colorant de variation de Ph. Il permet de mettre en évidence l'acidification du milieu par un virage au jaune. Les souches ayant une croissance rapide (notamment les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, etc) acidifie le milieu en moins de 24h

.Les autres souches à croissance lente (notamment *Bradyrhizobium*) acidifient le milieu tardivement après 5 à 6 jours (Pagano, 2008).

Toutes les souches ayant le profil proche des rhizobium, ont subit la coloration de Gram (annexe 08).

### **a-Test au 3-Cétolactose :**

Le test du 3-Cétolactose permet de distinguer entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (**Bernaerts et De Ley, 1963**). Ce dernier est le seul genre capable de produire l'enzyme 3-cétoglucosidase. Les souches ont été mises en culture à 28°C pendant trois jours sur le milieu yeast-lactose-agar (Annexe 02). La révélation est mise en évidence par l'inondation des boites avec le réactif de Benedict (Annexe 02) à température ambiante. La présence de l'enzyme 3-cétoglucosidase se manifeste par la formation d'un halo jaune de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu dû au réactif de Benedict, alors que l'absence d'un halo jaune signifie un résultat négatif.

### **b-Test au bleu de Méthylène et au violet de Gentiane :**

Le test consiste à cultiver les souches isolées sur le milieu YEMA (annexe 02) contenant le bleu de Méthylène (0,1%) ou le violet de Gentiane (0,1%). Après incubation à 28°C pendant 2 à 7 jour, l'absence de croissance traduit leur appartenance aux *Rhizobia* qui ont été incapables de croître sur ces milieux (**Wei et al.,2003**).

### **3-2-2 Activités PGP des souches *Rhizobium* :**

Les souches ayant un profil proche des rhizobium selon les caractéristiques phénotypiques ont été testées pour leurs potentialités PGP.

#### **a- Solubilisation du phosphate sur un milieu liquide :**

La capacité de solubilisation des phosphates a été testée sur milieu PVK (annexe 02) contenant du phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3\text{HPO}_4$ ) comme seule source de phosphate. Ce milieu a été ensemencé par un volume (1%) de chaque culture bactérienne et incubé à 28 °C/7jours. Les cultures ont été ensuite centrifugées à 12000 rpm / 5mn. La quantité du phosphate soluble a été mesuré par un dosage colorimétrique. Dans un tube à essai contenant 0.5 ml du surnageant, ils ont ajoutés 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% et 4ml du réactif

## **Matériels et Méthode**

---

coloré . Le mélange a été incubé à une température ambiante pendant 15 mn. La production du phosphate soluble se traduit par une couleur bleue plus ou moins intense selon le taux du phosphate produit. La concentration du phosphate a été déterminé par la mesure de la densité optique à 630 nm.

### **b- Production d'Acide Indole Acétique :**

La production de l'AIA a été testée sur milieu DF (Annexe 02 ) additionné de tryptophane (1g /l) (**Dworkin et Foster, 1958**). Le milieu a été ensemencé par 100 µl des cultures bactériennes. Après incubation à 28 °C/7jours, les cultures sont centrifugées à 12000 rpm/ 5mn et l'estimation de la quantité d'AIA dans le surnageant a été réalisée par dosage colorimétrique selon la méthode de Loper et Scroth (1986). Un volume de 1ml du surnageant est mélangé à 2ml du réactif de Salkowski (annexe 02) La DO a été mesurée à 530 nm.

### **c- Production de sidérophores :**

Etant donné sa composition exempte en fer, Le milieu King B liquide (Annexe 02) a été préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores. Ce milieu est ensemencé par 100 µl de chaque culture et incubé à 28°C pendant 72 h. Les cultures ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 30mn. 500 µl des surnageants sont mélangés à 500 µl de la solution CAS ( annexe 02) (**Shwyn et Neilands, 1987**).

## **3-3 Caractérisation des isolats d'Actinobacteria :**

Après isolement et purification , les souches ont été décrites macromorphologiquement puis ont subi quelques tests biochimiques telles que :

### **a-Production d'amylase :**

La mise en évidence de la production de l'amylase a été réalisée sur la gélose GYP (Glucose Yeast extract Peptone) additionnée de 1% d'amidon soluble (Annexe 02). Les boîtes de Pétri ont été ensemencés par des spots (10µl) de chaque culture bactérienne. Après incubation à 28°C/7 jours. L'activité amylolytique a été détectée par la révélation d'un halo clair autour de la colonie après inondation du milieu avec une solution d'iode (1% d'iode dans 2% d'iodure de potassium) (**Mefteh et al., 2017**).

### **b-Production de chitinase :**

La production de la chitinase a été effectuée sur un milieu gélosé à base de chitine (Annexe 02). Le milieu est inoculé par des spots (10µl) de cultures fraîches de chaque isolat puis incubé à 28°C /7 jours. L'activité chitinasique a été détectée par la révélation d'un halo clair autour de la colonie (**Slama et al., 2019a**).

### **c-Production de cellulase :**

La capacité des isolats à dégrader la cellulose a été effectuée sur la gélose contenant 1% de carboxyméthylcellulose (CMC) (Annexe 02). Un volume de 10µl de la culture de chaque isolat a été déposé à la surface du milieu sous forme de spot. Après incubation à 28°C /7 jours, la surface de la gélose a été recouverte d'une solution du rouge Congo (0,1%), puis rincée par une solution de NaCl (1M). La présence d'une zone claire autour des colonies indique la production de l'enzyme (**Slama et al., 2019b**).

## **Matériels et Méthode**

---

### **d-Production de protéase :**

La capacité des isolats à produire une protéase a été évaluée sur gélose au lait écrémé (25%) (Annexe 02). Après inoculation du milieu avec 10 $\mu$ l de chaque isolat, les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C / 7 jours. L'activité protéolytique a été détectée par la présence d'une zone claire autour des colonies bactériennes (Mohanasrinivasan *et al.*, 2012).

### **e-Production de gélatinase :**

La production de la gélatinase a été mise en évidence sur le milieu gélatine (Annexe 02). Les tubes de gélatine solidifiée (en culot) ayant séjourné préalablement dans l'eau froide, ont étéensemencés par piqûre centrale avec les souches bactériennes et incubés à 28°C /7 jours. La gélatine étant une protéine liquide à la température d'incubation, il est donc nécessaire de mettre les tubes au froid (4°C/24 h) avant de les observer. Ainsi, les tubes où la gélatine n'est pas dégradée se solidifient, alors que ceux qui restaient liquides révèlent une activité hydrolytique des souches (Ekpenyong *et al.*, 2016).

### **3-3-1 Mesure des activités PGP des souches d'Actinobacteria :**

#### **a-Fixation d'azote :**

La fixation d'azote moléculaire a été testée sur milieu solide exempt d'azote. Le milieu au sel de Winogradsky (WS) (Annexe 02) (Holt *et al.*, 1994) a étéensemencé par stries à partir des cultures bactériennes et incubé à 28°C /7 jours. Toute croissance sur ce milieu traduit la capacité des bactéries à fixer l'azote.

#### **a-Production d'ammoniac :**

La production d'ammoniac par les souches isolées a été testée sur eau peptonée selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992) (Annexe 02). Ce test consiste à inoculer 100 $\mu$ l de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau peptonée. Après incubation à 28°C /7 jours, l'addition de 500 $\mu$ l du réactif de Nessler donnant une couleur jaune à marron indique la production de NH<sub>3</sub>.

#### **c-Production d'acide cyanhydrique :**

La production d'acide cyanhydrique a été évaluée sur gélose nutritive additionnée de glycine (4,4g/l) (Lorck, 1948). Les cultures bactériennes ont étéensemencées par stries sur la gélose en boîtes de Pétri. Du papier Whatman imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) a été déposé à l'intérieur du couvercle de la boîte. Celle-ci a été scellée avec du papier parafilm et incubée à 28°C /7 jours. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production d'HCN.

#### **d-Solubilisation des phosphates :**

La capacité de solubilisation des phosphates a été testée sur milieu (PVK) contenant du phosphate tricalcique (Ca<sub>3</sub>HPO<sub>4</sub>) (Annexe 02) comme seule source de phosphate. Un volume

## **Matériels et Méthode**

---

de 10 $\mu$ l de chaque culture bactérienne a été déposé en spot à la surface de la gélose PVK selon la méthode décrite par **Gaur (1990)**.

Après incubation à 28°C/7 jours, un halo transparent apparaît autour des colonies ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates. Les résultats ont été exprimés par la mesure du diamètre de la zone transparente autour de la colonie (diamètre total moins le diamètre de la colonie) permettant ainsi d'évaluer l'intensité de la solubilisation.

### **e-Production de sidérophores :**

La production de sidérophores des souches d'Actinobacteria est effectuée comme décrit précédemment. ( de la meme méthode des rhizobia).

### **f-Production d'Acide Indole Acétique :**

La production d'AIA des souches d'Actinobacteria est suivie selon la méthode décrite précédemment ( meme méthode utilisé pour les rhizobia ) .

-Puis ils ont fait une identification moléculaire des isolats d'Actinobacteria par amplification et séquençage des gènes de l'ARNr 16S .Les isolats sont purifiés sur milieu ISP2 (annexe 02), les cultures pures et jeunes feront l'objet des étapes d'identification pour confirmer le genre des souches d'Actinobacteria.

### **3-3-2 Étude de la tolérance au stress :**

L'étude de l'effet de la salinité, du pH, de l'activité d'eau (aw) et de la température sur la croissance de toutes les souches isolés a été évaluée sur le bouillon ISP2 (annexe 02) pour les Actinobacteria et le bouillon YMA (annexe 02) pour les Rhizobia répartis dans des microplaques stériles de 96 puits. Les milieux ont été répartis à raison de 180  $\mu$ l par puits en triplicata. Ces derniers ont été inoculés par 20  $\mu$ l de chaque suspension bactérienne.

#### **a-Effet de la salinité :**

L'effet du stress salin sur la croissance bactérienne a été déterminé dans le milieu ISP2 ou YMA(annexe 02) inoculés dans la microplaque supplémenté de NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 mM). L'incubation a été effectuée à 28°C pendant 7 jours.

#### **b-Effet du pH :**

La réponse des souches bactériennes testées à la variation du pH du milieu de culture a été évaluée aux différentes valeurs du pH (4, 7, 9 et 11). Les microplaques ont été incubées à 28°C pendant 7jours.

#### **c-Effet de l'activité d'eau (aw) :**

L'effet de l'aw a été évalué en ajoutant au milieu de culture du polyéthylène glycérol (PEG) à des concentration de 10%, 20%,30 % et 40%. L'incubation des microplaques a été effectuée à 28°C pendant 7jours.

#### **d-Effet de la température d'incubation :**

L'étude de l'effet des stress hypothermique et hyperthermique sur la croissance des souches examinées a pour but de déterminer et évaluer la température optimale de chaque souche.

## **Matériels et Méthode**

---

L'incubation des microplaques a été réalisée à 4°C, 30°C, 37°C, 45°C et 55 °C pendant 7 jours.

La lecture des microplaques pour chaque effet a été réalisée en utilisant le lecteur des microplaques (Bio Tek ELx800)(annexe ) pour mesurer l'absorbance à 600 nm.

### **3-3-3 Identification moléculaire des isolats d'Actinobacteria :**

L'identification moléculaire des souches se base sur l'amplification et le séquençage des gènes de l'ARNr 16S. Avant toute manipulation, les isolats sont purifiés sur milieu ISP2. Les cultures pures et jeunes feront l'objet des étapes d'identification moléculaire suivantes :

- A. Extraction de l'ADN génomique
- B. Dosage de l'ADN
- C. Amplification par PCR
- D. Electrophorèse sur gel d'agarose
- E. Séquençage
- F. Analyse phylogénétique

## **Partie II : Utilisation des rhizobactéries dans la phytostimulation de la luzerne.**

### **I- Utilisation des rhizobium dans la phytostimulation de la luzerne dans des conditions de stress hydrique et salin (travaux 01) de Salim Azib., 2022 .**

#### **I-1-Souches bactériennes et conditions de croissance :**

Cancernant les deux stress (salin et hydrique ) six souches rhizobiennes.dont Quatre souches locales(O152, O172, E131 et E222) (annexes 06 ) , ont été sélectionnées d'après les facteurs pédoclimatiques dans les régions ou ils sont isolés(pH,température et salinité) et de souches de références *Sm1021* et *Sm2011* de *Sinorhizobium meliloti*.

Les souches bactériennes ont été cultivées dans le bouillon YMA (annexe 02) 28°C pendant 72h sur un incubateur agitateur (200 tr /min)

#### **I-2-Matériel végétal :**

Une population locale de luzerne (*Medicago sativa* L.) originaire de l'oasis de Ouargla, où elle est cultivée depuis plusieurs décennies et toujours largement utilisée par les agriculteurs locaux, a été choisie pour cette étude pour les deux stress. Un test de germination des graines a été mis en œuvre afin de vérifier leur capacité germinative selon la méthode décrite par **Mouradi et al. (2015) et Farissi et al. (2016)**. Les graines ont été mises à germer à 25 °C à l'obscurité totale dans des boîtes de Pétri contenant un papier filtre arrosé par l'eau distillée. Trois répétitions de 40 graines par répétition ont été effectuées. Une graine a été considérée germée lorsque la radicule dépasse de 2 mm le tégument de la graine. La durée de l'expérience recommandée était de 06 jours, pendant laquelle on comptait quotidiennement le nombre de graines germées.

Une fois la capacité germinative vérifiée, les graines ont été désinfecté en surface par immersion dans l'éthanol 95% pendant 10 secondes, puis dans une solution de HgCl<sub>2</sub> acidifiée à 0,1% pendant 5 à 7 minutes et suivi de six rinçages successifs à l'eau distillée

## Matériels et Méthode

stérile (Somasegaran et Hoben, 1985). Après cela, les graines ont été trempées pendant une nuit dans de l'eau distillée stérile au réfrigérateur à 4 °C.

### 1-3 Substrat de culture :

Ils ont utilisé comme substrat de culture pour le stress salin et hydrique un sable qui provient de la zone de Sidi Khouiled (région de Ouargla), qui avait subi une série d'opérations avant d'être utilisés, selon la méthode indiquée par Djerroudi *et al.* (2017). Il a été préalablement tamisé pour enlever toutes traces d'impuretés d'origine végétale ou animale puis lavé avec d'Acide Chlorhydrique (HCl) pendant 15 à 20 minutes pour éliminer les carbonates, les chlorures etc... Ensuite, il a subi une série de lavage successifs à l'eau distillée (5 à 6 fois) afin d'éliminer toute trace de chlorure et mis à sécher à l'air libre. Enfin, Une stérilisation a été suivie au four pasteur pendant 2 heures à 180°C.

### 1-4 Etude du stress hydrique :

Les graines ont été semées dans des pots en plastique de forme carrée, d'un litre de volume et remplis de sable stérile. Six graines ont été semées par pot: deux graines ont été placées dans chacune des 3 petites cavités dans lesquelles 1 ml d'inoculum fraîchement récolté a été ajouté. Des graines non inoculées ont été utilisées comme témoins (T) (photo 03) (Salim Azib., 2022).



**Photos 03:** Description de quelques étapes de la mise en place du protocole expérimental et lacroissance des plantes: **A)** semis des graines ; **B)** inoculation bactérienne ; **C)** germination etlevée desjeunesplantules;**D)**plantulesenphasede croissance.

## Matériels et Méthode

---

Les pots étaient arrosés tous les deux jours (stress hydrique), pendant les deux premières semaines, avec 100 ml de la solution nutritive de Fahraeus exempte d'azote (annexe 02) (Vincent, 1970) dont la composition est mentionnée en annexe 2. Après 15 jours, les plantules ont été éclaircies à trois plantes par pot et un arrosage avec les différentes doses d'eau a été appliqué pendant huit semaines. Les limites d'eau imposées étaient de 25% (D2), 50% (D3) et 75% (D4) de la capacité au champ (100% = D4= 100 ml).

### 1-5 Etude du stress salin :

Pendant les deux premières semaines, les pots étaient arrosés tous les deux jours avec 100 ml (capacité au champ) de la solution nutritive de Jensen exempte d'azote (annexe 02) (Zhao et al., 1997).

Après 15 jours, les plantules ont été éclaircies à trois plantes par pot et un arrosage sous différents niveaux de salinité été appliqué pendant huit semaines. Les trois concentrations de salinité retenues dans cette étude étaient : C0 = 0 mM, C1 = 40 mM/l et C2 = 80 mM/l d'NaCl/litre. Le traitement consistait à inoculer ou non les graines de luzerne par une seule souche de *Sinorhizobium* sp. à un seul niveau de dose d'irrigation (chaque traitement est répété 03 fois).

### 1-6 Mesures de paramètres de croissances suite aux stress :

Les plantes ont été prélevées 10 semaines après le semis. Les plantes ont été soigneusement retirées du substrat et lavées doucement sous l'eau du robinet . L'excès d'eau a été éliminé en pressant doucement les racines dans du papier absorbant. Les racines ont été coupées au niveau du collet et des mesures individuelles ont été moyennées sur les trois plantes pour obtenir une moyenne par pot. Les données de la hauteur des plantes (HT), la longueur des racines (LR) et le nombre de nodules (NN) ont été enregistrées (photo 04). Les racines et les tiges ont été séchées séparément à 75 °C dans une étuve pendant 48 h (Wang et al., 2018).



## Matériels et Méthode

---



**Photo 04 :** Croissance différentielle des plantes de luzerne en fonction de la quantité d'eau d'arrosage.

### **II-L'utilisation de rhizobium dans l'inoculation simple et en co-inoculation avec les actinobactéries dans la bio-stimulation de la luzerne (Traveau02) de Samira Saidi ,2021.**

**II-1 Inoculations bactériennes, croissance végétale et test de nodulation :** La capacité d'induire la formation de nodosités sur les racines de la légumineuse hôte est un critère de base pour la caractérisation des Rhizobia (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1985). De ce fait, des essais de nodulation sont effectués afin d'évaluer la capacité symbiotique des isolats et de déterminer leur infectivité et leur efficacité. L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodules formés sur la racine de chaque plante et l'efficacité est estimée par l'observation de la couleur des nodules et la détermination de gain en matière sèche (partie aérienne) des plantes inoculées.

#### **II-1-1 Germination aseptique des graines :**

Les graines de luzerne sont désinfectées à l'éthanol absolu pendant 5 à 10 s puis à l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 3 mn. Ensuite, elles sont rincées abondamment à l'eau distillée stérile et mises à germer dans des boîtes de Pétri stériles contenant de l'eau gélosée (0,8%) et placées à l'obscurité à 28°C pendant 48h.

#### **II-1-2 Culture et inoculation des plantules :**

Culture et inoculation des plantules Les bactéries sont cultivées sur milieu YEM incubées à 28°C pendant 48h, centrifugées à (12000rpm pendant 10mn) et rincées deux fois avec l'eau distillée stérile puis ajustées à une densité voisine de  $10^8$  bactéries/ml. Les graines bien germées sont transférées dans des pots contenant 200g de sable tamisé et préalablement lavé puis désinfecté une heure à 121°C en trois cycles séparés par 24h. Trois graines sont semées aseptiquement dans chaque pot, puis inoculées avec 1 ml de la suspension bactérienne de chaque isolat. Cette opération est répétée deux fois durant l'expérimentation. Trois pots sont utilisés pour chaque souche. Les plantes non inoculées sont utilisées comme témoins négatif (non azoté) et témoins positif (ayant reçu de l'azote :  $\text{KNO}_3$  0,5g/L). Enfin, les pots sont placés dans une chambre de croissance à température ambiante avec une photopériode lumière (16h)/ obscurité (8h). Les plantules sont arrosées deux fois par semaine avec la solution nutritive dépourvue d'azote (solution de Fährus) (Annexes 2) et de l'eau distillée

## Matériels et Méthode

stérile pour éviter toute contamination extérieure. Après 45 jours de culture, les plantes sont déterrées et inspectées pour la présence ou l'absence de nodules.

### II-2 Effets de la co-inoculation *Rhizobium*-Actinobacteria sur La croissance de la luzerne :

#### II-2-1 Matériel végétal :

Les graines de *Medicago sativa* L , ont été obtenues auprès de l'Institut Technique des Grandes Cultures de Sétif. Les graines ont été désinfectées à l'éthanol à 70% pendant 30 secondes puis à l'hypochlorite de sodium à 4% pendant 3 mn (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994**). Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée stérile et mises à germer à l'obscurité dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (Agar 0,8%) à 28°C pendant 48 h.

#### II-2-2 Préparation des inoculats bactériens :

Les Actinobacteria ont été cultivés sur le milieu ISP2 liquide (annexe 02) alors que celles des Rhizobia ont été cultivés sur le milieu YMA liquide (annexe 02) incubés à 28°C pendant 2 à 7 jours (tableau 04).

**Tableau 04: Origine de l'isolement des souches bactériennes utilisées**

Groupe bactérien	Code	Méthode d'isolements	Type d'échantillons	Détails de la localisation géographique
Groupe d'Actinobactérie	MS1 MS2 MS3 MS4	milieu ISP2 (28 ± 2 °C/depuis 2 à 15 jours)	Sable	Melghir Sebkhia de Biskra région(34° 17' 56.6" N 6° 21' 54.56" E) Zone saline et aride CE = 54,2 ± 2,7mS/cm, pH 7.56 ± 0.35
	Ag1	Milieu BAP (28 ± 2 °C/de 7 à 30 jours) Réimplantation sur milieu ISP2	Nodules d' <i>Alnus glutinosa</i>	Guerbes Senhadja de Skikda région (36° 55' N 7° 16' E) Zone humide
Groupe de <i>Rhizobium</i> de références	R1 R2	Milieu YMA (28 ± 2 °C/2 jours)	Symbiose de la luzerne	-

## **Matériels et Méthode**

---

### **II-2-3 Inoculation et co-inoculation bactérienne dans des conditions normales de croissance :**

Les graines stérilisées et germées ont été semées dans des pots en plastique dont la surface interne est désinfectée avec de l'éthanol à 70% et ont été remplis de quantités égales de sable lavé abondamment à l'eau et stérilisé (121 °C/ 1h en 3 cycles séparés par 24h). Les graines ont été semées aseptiquement à une profondeur de 1cm de la surface à raison de trois graines par pot. Après une semaine, les plantes ont été inoculées avec 1ml de 10<sup>8</sup> puissance de la suspension bactérienne de chaque isolat .

L'inoculation et la co-inoculation ont été suivies par l'utilisation des souches de Rhizobia R1 et R2 séparément ou conjointement avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées (Tableau 05). Les pots étaient ensuite placés dans une chambre de croissance avec une photopériode lumière/ obscurité de 16h/8h et un cycle de température jour et nuit de 26°C/18°C. Les pots ont été arrosés deux fois par semaine avec de la solution nutritive dépourvue d'azote (Fahraeus, 1957) (Annexe 02) et de l'eau distillée stérile au besoin. L'expérience a été répétée 6 fois. Après 2 mois de culture, les plantules de *M. sativa* ont été récoltées. Leur croissance a été appréciée par la présence ou absence de nodules.

### **II-2-4 Effets de la co-inoculation bactérienne sur la croissance de *Medicago sativa* sous stress salin :**

Sur la base des résultats qu'ils ont obtenus précédemment, trois souches d'Actinobacteria (MS1, MS2 et Ag1) ont été co-inoculées avec les rhizobia ayant amélioré la nodulation sur les racines de *Medicago sativa* ont été choisies pour évaluer l'efficacité de leur co-inoculation avec les souches de *Sinorhizobium meliloti* (R1 et R2) sous stress salin.

L'expérience a été réalisée comme décrit précédemment, les plantes ont été inoculées par les souches R1 et R2 séparément ou co-inoculées avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées ou inoculées avec les Actinobacteria seules, en présence et en absence de sel (Tab. 05).

## Matériels et Méthode

**Tableau 05: Différents traitements utilisés dans l'expérience sous stress salin et conditions normales**

Traitements sans NaCl	Traitement avec 100mM de NaCl	Souches bactériennes
T-	T-	non inoculé (Control négatif)
T+	T+	non inoculé additionné de KNO <sub>3</sub> (0,5M) (control positif)
R1	R1	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R1)
R1+MS	R1+MS	R1+MS1, R1+MS2, R1+ Ag1
R2	R2	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R2)
R2+MS	R2+MS	R2+MS1, R2+MS2, R2+ Ag1
Act	Act	MS1, MS2, Ag1

### II-2-5 Inoculation bactérienne et condition sous stress salin de croissance :

Les conditions de croissance et les suspensions bactériennes ont été préparées comme décrit précédemment. Après une semaine, les plantules ont été inoculées avec 1 ml de la suspension bactérienne de chaque isolat à 10<sup>8</sup> cellules/ml. L'inoculation a été répétée 3 fois / 3 semaines et les pots ont été irrigués deux fois par semaine avec la solution nutritive dépourvue d'azote (Fahraeus, 1957) (Annexe 02) et de l'eau distillée stérile au besoin. Deux semaines après la co-inoculation, les pots du deuxième groupe (100mM NaCl) ont été arrosés avec la solution saline une fois par semaine durant un mois (4 fois).

### II-2-6 Mesure des paramètres morphologiques :

Après 2 mois de culture, les plantules de *M. sativa* ont été récoltées. Leur croissance a été appréciée par la mesure des paramètres morphologiques. Les poids frais (g) des tiges et des racines des plantes, la hauteur (cm) de la partie aérienne, la longueur des racines, le nombre de feuilles et de nodules par plante ont été estimés.

### II-2-7 Dosage des pigments photosynthétiques :

La teneur en pigments photosynthétiques a été déterminée selon la méthode de Arnon (Arnon, 1949). Pour cela, 0.5g de feuilles de chaque échantillon ont été découpées en petits segments (1mm<sup>2</sup>), homogénéisées dans 10 ml d'acétone à 80% et conservées à -10°C pendant une nuit. L'extrait est ensuite centrifugé à 14000rpm/5mn et l'absorbance du surnageant est lue à 663, 645 et 470 nm.

### a-Dosage des acides aminés solubles et de la proline :

Les échantillons des feuilles et des racines fraîches ont été conservés au dessous de -15°C avant analyse. L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par Naidu (1998) : 500mg de feuilles ont été placés dans des tubes de centrifugation contenant 5ml d'un mélange

## **Matériels et Méthode**

---

méthanol, chloroforme, eau . Les tubes scellés ont été chauffés dans un bain marie (60°C) pendant 2 h et centrifugés à 10000 rpm/10 mn. Le surnageant servira ensuite aux dosages des acides aminés solubles et de la proline.

### **b-Acides aminés solubles**

Un ml de tampon acide acétique /acétate de sodium (pH= 4, 3) et 1ml de réactif de ninhydrine (5% dans l'éthanol) ont été additionnés à 1ml de surnageant. Les échantillons ont été agités puis chauffés au bain marie (95°C) pendant 15mn. L'absorbance des échantillons a été déterminée à 570nm. La concentration en acides aminés solubles a été obtenue en utilisant la glycine comme étalon.

### **c-Proline :**

La proline a été déterminée par une méthode rapide développée par Singh et al., (1973) : 1ml de surnageant, 4ml de solution de ninhydrine, 4ml d'acide acétique glacial et 1ml d'eau distillée ont été mis dans des tubes de centrifugation de 10 ml. Ce mélange a été chauffé au bain marie (90°C) pendant 45mn et refroidissait à la température ambiante. L'absorbance a été lue à 520 nm et la concentration de proline.



## Résultats et discussions

---

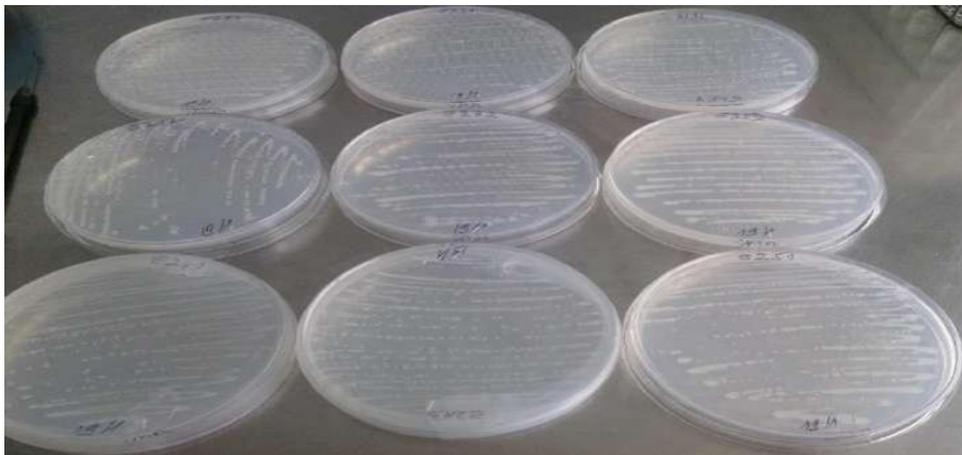
### Résultats et discussions :

#### Partie I : Les résultats des Travaux 01( Salim Azib.,2022)

##### I-1 Isolement et caractérisation :

###### I-1-1 Caractéristiques morphologiques et de croissance des isolats :

148 souches ont été isolés à partir de la rhizosphère des différents régions de Ghardaia, Ouargla, El Oued Les colonies formées sont de couleur blanchâtre , translucide, de forme circulaire et à contour régulier avec un aspect lisse et un diamètre variant de 1 a 3mm (photo 05) . Cette description est en accord avec celles déjà faites pour les rhizobia dans la littérature (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984). Il est a remarqué que les isolats provenant des sols de Ghardaïa ont formé des colonies plus muqueuses que celles des autres régions.



**Photo05** :Aspect descolonies sur milieuYMA.

###### I-1-2 Authentification des isolats :

Permis les 148 souches isolés 117 ont aboutit a la formation de nodosités chez la luzerne (photo 06) . Ce qui indique leur capacité a créer une symbiose avec les légumineuses en formant des nodosités , ce qui permet de fixer un maximum d'azote atmosphérique pour améliorer la nutrition des plantes . Ceci confirme les recherches de Vincent et Jordan 2011 et affirme l'affiliation des souches isolés et authentifiés aux rhizobium .



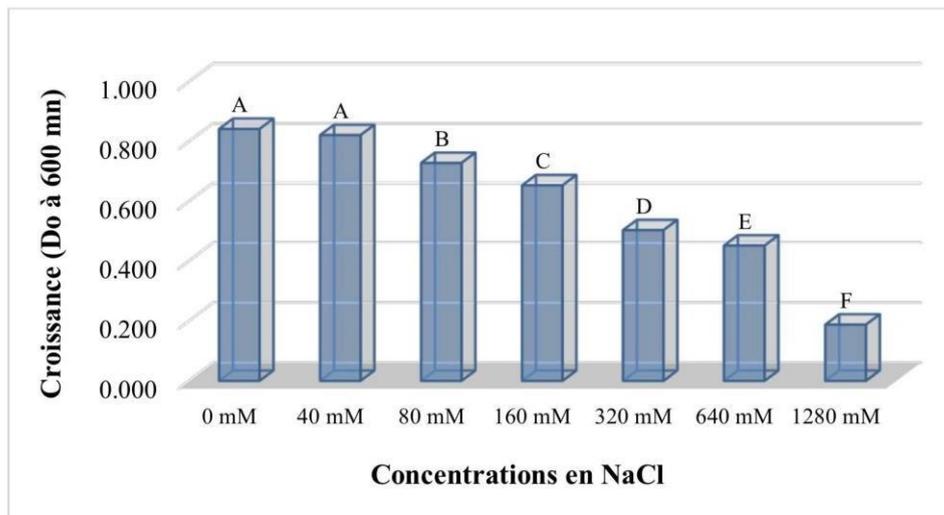
**Photo 06:** Formation de nodosités sur les racines de jeunes plantes de luzerne après inoculation.

### I-2 Caractérisation physiologique des isolats :

#### a-Tolérance à la salinité :

Les résultats montrent que toutes les souches ont présenté un large spectre de tolérance à la salinité. Car elles ont été capables de se développer en présence de NaCl allant de 1,7 mM à 640 mM. Il convient de mentionner que la tolérance à une concentration donnée de NaCl ne signifie pas nécessairement une bonne croissance des souches. Effectivement, aux faibles concentrations de salinité (1,7 mM à 40 mM) (fig 11) les souches G132 et G424 isolées dans les sols de Ghardaïa, ont eu une meilleure croissance. Il est constaté que de 80 mM jusqu'à 160 mM, les souches O152, O211, et E141 isolées de Ouargla et El Oued étaient plus résistantes dans les concentrations plus élevées. Aux concentrations plus élevées de (640 mM) les souches E543 et E452 de la région d'El Oued ont eu les meilleures performances. Ceci s'explique du fait que la région d'El Oued est une zone aride avec des sols salins. Ce qui est confirmé par les travaux de plusieurs auteurs (**Fatima and Arora, 2019 ; Etesami and Glick, 2020**) qui disent que la salinité est un problème majeur dans la productivité agricole dans les zones arides et semi arides par la salinité.

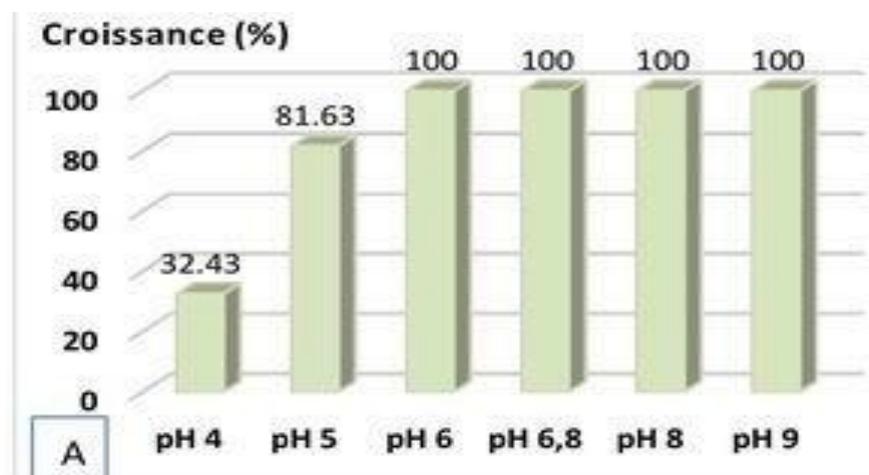
## Résultats et discussions



**Figure 11.** effet de l'augmentation des concentrations en NaCl sur la croissance des souches nodulant la luzerne.

### b- Tolérance au pH :

La croissance des souches rhizobiennes différait en fonction des valeurs de pH. Elles ont mieux toléré aux pH alcalins et neutres que les pH acides. Leur croissance maximal au pH alcalin et neutre, au fur à mesure que le pH diminue. Effectivement au pH 5 le taux de croissance est de 81,63% et au pH 4 le taux de croissance est 32,43% (Fig 12). Il est à constater que la majorité des souches qui ont résisté aux pH 4 étaient isolés de Ouargla et de Ghardaia ( O152, O413 , G424,G431 ). Effectivement le pH est l'un des forts prédécatéur de la diversité des communautés microbiennes dans le sol et il joue un rôle dans la biodisponibilité des nutriments particulièrement le P,Fe,Zn et Cu (**Edwards et al., 2015**).



**Figure 12.** Tolérance des souches à différents pH.

## Résultats et discussions

### c-Tolérance à la température :

De 28°C à 37°C, toutes les souches isolées ont montré une bonne croissance, par l'apparition d'un trouble assez opaque. À 4°C, seules les deux souches de référence, Sm2011 et Sm1021, ont pu se développer. L'augmentation de la température à 45°C a réduit de manière significative la croissance de la majorité des isolats et seul 13 isolats (O144, O152, E251, E521, E532, G242, G321, G421, G422, G431, G432, G514, G522) et les deux souches de références Sm2011 et Sm1021 (fig.13) étaient thermotolérantes. Ces résultats concordent avec les travaux de Skujins, 1986 qui constate que la majorité des souches sélectionnées ont vu de leur utilisation comme biofertilisant avaient un large spectre de tolérance à la température (-10 à +50°C). Cette caractéristique est un des facteurs clés dans le choix de méthodes de conservation des souches et les traitements technologiques ont vue d'une éventuelle formulation.

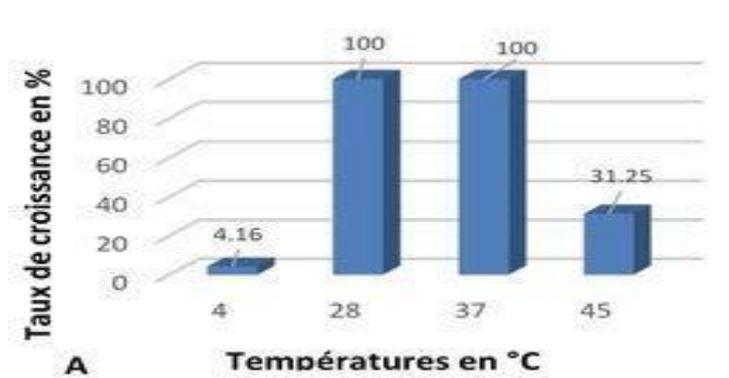


Figure 13. Tolérance des souches à différentes températures.

### d- Caractérisation phylogénétique :

La caractérisation phylogénétique a confirmé que les souches isolées des différents sols et qui ont été phénotypiquement caractérisées appartiennent toutes aux genres *Sinorhizobium*. Il a été constaté que les souches provenant de Ghardaia étaient classées dans un groupe assez proche de la classe des souches de références, ce qui confirme leur similarité aux genres *Sinorhizobium*. Selon Rodrigues et al. (2018), les bactéries appartenant à des taxons différents peuvent présenter des profils métaboliques similaires, ce qui indique la capacité des bactéries appartenant à différents groupes taxonomiques à occuper la même niche écologique.

## II- Les travaux 02 (Samira Saidi., 2021) :

### II-1 Caractérisation morpho-biochimique des isolats :

#### a- Caractérisation morphologique et culturale :

29 souches isolées ont présenté une macromorphologie bien distincte une croissance sur milieu YMA (annexe 02). Les colonies sont d'une couleur blanchâtre, circulaire avec un contour régulier, une surface lisse. Elles ont été translucides, un aspect visqueuses et brillantes et une élévation convexe. Leur taille varie entre 2 et 4 mm (Fig.14). La macromorphologie, la taille,

## Résultats et discussions

---

l'aspect et la texture sont comparables aux caractéristiques morphologiques et culturelles des *Rhizobia* décrites par **Vincent (1970)** et **Holt et al. (1994)**. Selon **Holt et al. (1994)**,

Tous les isolats n'ont pas absorbé le rouge Congo et apparaissaient de couleur roses à blanchâtres. En général, les *Rhizobium* produisent des colonies blanches ou absorbent faiblement le rouge Congo. Ce dernier est souvent rajouté au milieu de culture pour isoler les *Rhizobium* ou pour tester la purification des cultures rhizobiales, (Fig. 15).

Le Bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Les souches à croissance rapide ont été considérés comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BBT vers le jaune) (Fig16), contrairement aux souches à croissance lente qui ont été considérés comme des bactéries alcalinisantes qui donnaient un virage de couleur au bleu. Pratiquement tous les isolats modifient le pH sur milieu YMA+BBT après 48 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes, ce qui indique que les souches qu'ils ont utilisé présentent une croissance rapide.

L'observation microscopique de tous les isolats révèle des bâtonnets courts à Gram négatif (Fig.17).



**Figure 14.** Aspect des colonies sur milieu YMA.



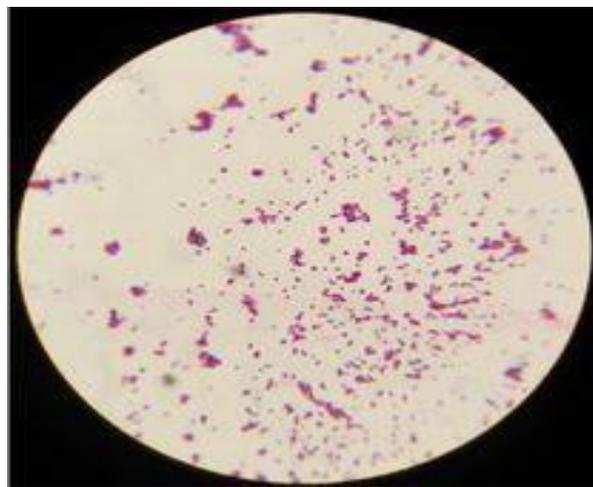
**Fig 15 .** Aspect des colonies sur milieu YMA+ RC.

## Résultats et discussions

---



**Fig 16.** Aspect des colonies sur milieu YMA+ BBT (acidification).



**Figure 17.** Observation microscopique de bacilles courts à Gram négatif (Gx100).

06 souches des 29 souches isolées absorbent très peu ou pas le rouge Congo sur milieu YMA et les colonies restent ainsi roses claires à blanchâtre. Selon Vincent (1970) et Jordan (1984), ceci est observé chez la majorité des *Rhizobium* et cette propriété est aussi commune pour le genre *Bradyrhizobium*. Par contre, le genre *Agrobacterium* et les formes contaminantes absorbent fortement ce colorant et apparaissent rouges. Puis ils sont repiqués sur milieu YMA + BBT supplémenté du bleu de Bromothymol, elles ont toutes acidifié le milieu, certains ont produit une acidification nette (6 souches : A1 ;A2 ;B1 ;C1 ;C2 ;C3), les souches à croissance rapide sont généralement des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du bleu de Bromothymol vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisant le milieu de culture, de ce fait, les 6 isolats sont considérés comme des bactéries à croissance rapide. Ce qui laisse prédire que les 6 souches peuvent appartenir au rhizobium. Cependant, le reste des isolats pourraient être des souches *Bradyrhizobium* ou bien des contaminants. Ces résultats concordent aussi avec ceux trouvés par **Menna et al. (2006)** ayant rapporté dans une étude faite sur des Rhizobia que les souches testées de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* ont acidifié le

## Résultats et discussions

---

milieu YMA + BBT après 24h d'incubation, alors que les souches de Bradyrhizobium ont toutes donné des réactions négatives sur le même milieu.

### b-Test du bleu de Méthylène et du violet de Gentiane :

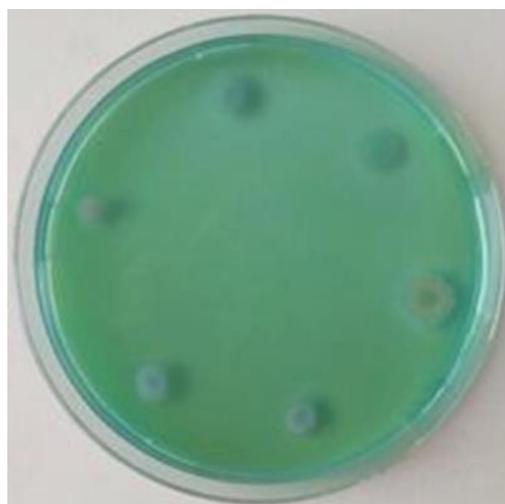
La croissance de tous les isolats sur milieu YMA supplémenté du bleu de Méthylène ou du violet de Gentiane a été inhibée par ces deux colorants. D'après les résultats obtenus, il y a eu absence totale de la croissance de tous les isolats ensemencés sur milieu YMA contenant le bleu de Méthylène (0,1%) ou le violet de Gentiane (0,1%). Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans plusieurs travaux où les Rhizobia isolés ne peuvent pas croître sur le milieu YMA contenant le bleu de Méthylène ou le violet de Gentiane (Wei et al., 2003). Des résultats qui vont dans le même sens font état de l'isolement de souches de Rhizobia dont la croissance a été inhibée par ces deux colorants (Singh et al., 2008 ; Gauri et al., 2013).

### c-Test du 3-Cétolactose :

Après incubation, toutes les souches isolées ont montré un résultat négatif après l'addition du réactif de Benedict (annexe 02) (aucun halo n'est observé autour des colonies). De ce fait les isolats ne produisaient pas l'enzyme 3- céto-glucosidase (Fig. 18). Le test céto-lactose a été largement utilisé pour différencier les *Rhizobium* des autres bactéries contaminantes.

L'absence de zones jaunâtres autour des colonies de *Rhizobium* indique que l'enzyme 3- céto-glucosidase n'existe pas et que les souches sont probablement des *Rhizobium* et non des *Agrobacterium*.

La recherche de l'enzyme 3- céto-glucosidase est un test spécifique pour la distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*. La présence de cette enzyme (résultat positif) est indiquée par l'apparition d'un halo jaune autour de la colonie bactérienne après l'addition du réactif de Benedict, alors que l'absence d'un halo jaune signifie un résultat négatif. Les résultats ont révélé l'absence d'un halo jaune autour des colonies de tous les isolats. De ce fait ces isolats n'oxydent pas le C3 du glycosyl du lactose et ne produisent pas l'enzyme 3- céto-glucosidase (Bernaerts et De Ley, 1963), ce qui les distingue du genre *Agrobacterium* ayant la capacité de produire cette enzyme (Kersters et Deley., 1984) qui se manifeste par la formation d'un halo jaune autour des colonies (Lindström et Lehtomaki., 1988).



**Fig 18 .** Aspect des colonies sur milieu yeast-lactose-agar Absence d'halo autour des colonies

## Résultats et discussions

---

### II-2 Activités PGP des souches *Rhizobium* isolées :

Les 6 souches rhizobiennes sélectionnées en plus de leur faculté endogène fixatrice d'azote, elles produisaient des sidérophores, de l'AIA et solubilisait les phosphates .

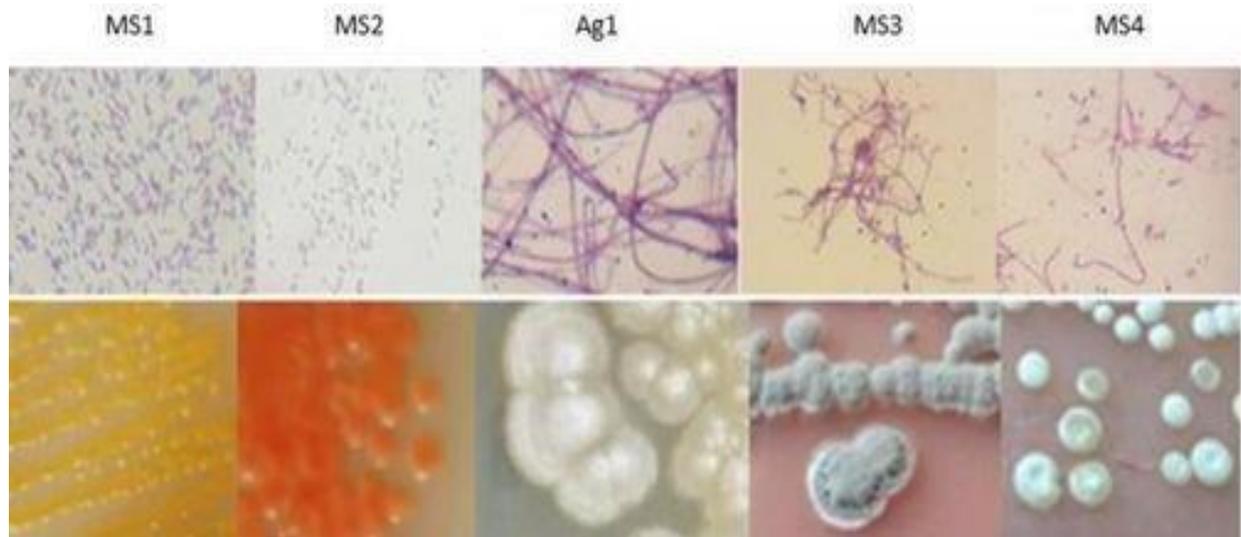
Les souches isolées pour leur activités PGP montre que la synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA, est une faculté très commune chez les Rhizobia. Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (**Dastager et al., 2010**). L'AIA est synthétisé par les souches sélectionnées à des taux variables. Les bactéries sécrétant une grande quantité d'auxine dans le sol causent une augmentation maximale de la croissance et le rendement des récoltes (**Khalid et al., 2004**). La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (**Miraza et al., 2001**). La production des sidérophores influence la croissance des plantes en liant le fer sous sa forme disponible :  $Fe^{3+}$  (**Whipps, 2001**). Par ces fonctions les sidérophores procurent une protection des plantes contre plusieurs maladies fongiques ou bactériennes (**Siddiqui, 2006**). Ces composés inhibent la croissance des champignons phytopathogènes (**Ramette et al., 2003**). Toutes les souches isolées produisent les sidérophores avec des taux relativement faibles à cause de leurs potentialités intrinsèques ou des conditions environnementales (**Valdebinito et al., 2006**). La solubilisation du phosphate a été observée pour l'ensemble des souches. Les meilleurs taux sont obtenus pour les souches A1, B1 et C3, qui solubilisent une quantité supérieure à 60 $\mu$ g/ml. Ces espèces améliorent la croissance des plantes en augmentant la disponibilité en phosphore assimilable. Plusieurs espèces du genre *Rhizobium* solubilisent les phosphates et pourraient constituer une source prometteuse comme biofertilisant en plus de leur capacité endogène de la fixation d'azote (**Li et al., 2020**).

### II-3 Caractérisation des isolats d'actinobacteria

#### II-3-1 Caractérisation morphologique et culturale :

5souches d' Actinobacteria ont été isolés sur milieu ISP2 à 28°C pendant 2 à 7 jours . Certaines avaient des colonies lisses ayant un pigment non diffusible de couleur orange petite taille pour c'est le cas de MS1 et rouge pour MS2 par contre les colonies des souches Ag1, MS3 et MS4 sont rugueuses et cotonneuse présentent un mycélium aérien et un mycélium de substrat de couleur blancheatre ou griseatre .Toutes les souches presentaint une morphologie mycilienne sous microscope (Fig.19).

## Résultats et discussions



**Fig 19.** Examen microscopique (partie supérieure) et morphologie des colonies (partie inférieure) des souches actinobactériennes MS1, MS2, Ag1, MS3 et MS4.

### II-3-2 Caractérisation biochimique

#### a- Activités enzymatiques :

Après 7 jours d'incubation sur un milieu spécifique pour chaque enzyme, les souches actinobactériennes produisent différentes enzymes telles que : amylase, protéase, chitinase et cellulase. Alors que la gélatinase, n'est présente que chez quatre souches (MS1, MS2, MS3, MS4), la souches (Ag1) est incapable de produire la gélatinase (annexe 06).

### II-3-3 Caractérisation physiologique :

Toutes les souches ont été caractérisées du point de vue physiologique afin de déterminer les conditions optimales de leur croissance .

#### a-Effet du pH

L'ensemble des souches se développe à pH 7 et ne tolère pas les valeurs extrêmes à l'exception de MS2 et MS3 qui sont capables de se développer à pH 9.

#### b-Effet du PEG

Les actinobactéries semblent plus adaptées au stress hydrique ce qui est montré par leur capacité de croissance à des concentrations élevées de PEG. Les souches MS2 et MS3 tolèrent jusqu'à 60%.

#### c-Effet de la température

Les cinq souches actinobactériennes qu'ils ont testées sont sensibles aux températures extrêmes (4°C et 55°C). La température optimale de croissance des souches actinobactériennes est 30°C. Toutefois, les souches Ag1 et MS3 ont été capables de croître jusqu'à 45°C.

## Résultats et discussions

---

### **d-Effet du sel**

La croissance des souches à des concentrations de sel allant de 0 à 1200 mM révèle une bonne capacité de tolérance des souches MS2 et MS4 se développant à des taux élevés jusqu'à 800mM de NaCl et MS1 sont capables de croître à 400 mM et la souche Ag1 peut tolérer une concentration de sel de 600 mM, par contre la souche MS3 ne tolère que 200mM de NaCl.

Les actinobactéries sont largement répandues dans les habitats aquatiques et terrestres, y compris les habitats extrêmes et les sols désertiques hyperarides (Fernandez, et al., 2017). Ce qui est clairement montré par la tolérance de ces souches aux stress abiotiques notamment l'aridité et la salinité. Etant donné l'origine de leur isolement, certaines souches peuvent tolérer des concentrations de sel allant jusqu'à 800mM, un pH alcalin de 9, une température de 45°C et une pression osmotique de PEG de 60%. Les caractéristiques des sols jouent un rôle prédominant dans le processus de sélection microbienne. Les bactéries isolées des environnements extrêmes sont capables de survivre à des paramètres inhibiteurs par rapport à celles isolées d'habitats non stressants (Okoro et al., 2009).

### **II-3-4 Activités PGP des Actinobacteria :**

Les réponses des actinobactéries qu'ils ont sélectionnés aux différents tests PGP permettent la mise en évidence des potentialités de chaque souche .

#### **a-Fixation d'azote :**

La fixation d'azote a été évaluée qualitativement par la croissance des bactéries sur milieu minimum au sel (DF) exempt d'azote à 28 °C pendant 7 jours. Cette capacité a été trouvée chez toutes les souches .

#### **b-Production d'ammoniac :**

Après incubation à 28C pendant 7 jours de l'eau peptonée inoculée avec les suspensions bactériennes des isolats, la production d'ammoniac a été mise en évidence par addition du réactif de Nessler. L'apparition d'une couleur jaune-marron traduit une production intense du NH<sub>3</sub>. Toutes les souches testées avaient la capacité de produire du NH<sub>3</sub> à des taux variables .

#### **c-Production d'acide cyanidrique :**

Après 7 jours d'incubation à 28°C, aucune souche n'étaient capable de produire l'HCN, la couleur jaune du papier Whatman reste inchangée .

#### **d-Production des sidérophores :**

La production de sidérophores a été effectuée sur milieu King B connu par sa composition exempte de fer permettant ainsi la libération des sidérophores dans le milieu. L'estimation quantitative de la production des sidérophores (après addition de la solution CAS) déterminée après 7 jours d'incubation à 28°C existe chez toutes les souches mais à des taux variables. Elle atteint des taux élevés notamment pour les souches MS2, MS3 et MS4 produisant respectivement 63% ,13%, 80.9% et 74.62% .

#### **e-Solubilisation des phosphates :**

## Résultats et discussions

---

La solubilisation des phosphates sur milieu gélosé PVK, révélée par un halo de transparence autour de la colonie est appréciable pour seulement deux souches MS1 et MS4 où les diamètres atteignent 18mm et 13mm respectivement. Par contre, les autres souches solubilisent faiblement les phosphates.

### f- Production d'AIA :

La capacité des souches à produire l'AIA a été testée sur milieu (DF) additionné de tryptophane (1g/l). Après incubation 7 jours à 28°C, il ressort que l'activité de production de l'AIA était présente chez toutes les souches mais à des taux variables.

La fixation biologique de l'azote joue un rôle important dans l'amélioration de la productivité des sols (Thilakarathna et al., 2019). Par conséquent, la carence en azote limite fortement la croissance des plantes (Wang et al., 2019). La symbiose légumineuses – Rhizobia est une source d'azote peu coûteuse et une pratique agronomique efficace fournissant un apport suffisant d'azote par rapport à l'application d'engrais chimiques (Cherrad et al., 2018 ; Sachs et al., 2019). Cependant, divers facteurs environnementaux limitent la fixation de l'azote, affectent la survie et le taux d'infectivité des Rhizobia (Andrews et Andrews, 2019 ; Ferguson et al., 2019). La meilleure option pour développer des cultures tolérantes au stress peut être l'utilisation de microorganismes PGP en tant que moyens d'améliorer la fixation biologique de l'azote (Htwe et al., 2019).

Comme les autres PGPR, les actinobactéries utilisent également des mécanismes directs et indirects pour améliorer la croissance et la protection des plantes. Dans le cadre de cette étude, tous les isolats produisent l'AIA à des taux variables. La capacité de production de phytohormones de plusieurs actinobactéries rhizosphériques et endophytes a été démontrée par divers chercheurs sur l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006; El-Tarabily et al., 2020). L'AIA est la phytohormone principale qui accélère la croissance et le développement des plantes en améliorant la croissance des racines, des tiges et la vigueur des plantules. L'AIA est impliqué dans la division cellulaire, la différenciation et la formation de faisceaux vasculaires et est une hormone essentielle à la formation de nodules (Choudhury et al., 2019).

Il ressort des résultats obtenus dans cette étude que toutes les souches testées présentent l'activité de solubilisation du phosphate. En effet, la disponibilité du phosphate dans les plantes. La solubilisation du phosphate a été observée pour l'ensemble des souches. Les meilleurs taux sont obtenus pour les souches A1, B1 et C3, qui solubilisent une quantité supérieure à 60µg/ml. Ces espèces améliorent la croissance des plantes en augmentant la disponibilité en phosphore assimilable. Plusieurs espèces du genre *Rhizobium* solubilisent les phosphates et pourraient constituer une source prometteuse comme biofertilisant en plus de leur capacité endogène de la fixation d'azote (Li et al., 2020).

### II-3-5 Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries :

Selon l'analyse de la séquence partielle de l'ADNr 16S, les souches MS1 et MS2 appartiennent au genre *Arthrobacter* : MS1 (MK894856) et MS2 (MK894855). Par contre, les souches MS3 et MS4 sont apparentées au genre *Streptomyces* (MN005930) et *Umezawaea* (MK894857), respectivement. Tandis que, la souche Ag1 appartient au genre *Nocardiopsis* (MN420819).

## **Résultats et discussions**

---

### **Partie II : Utilisation des rhizobactéries dans la phytostimulation de la luzerne.**

#### **II-1 Utilisation des rhizobium dans la phytostimulation de la luzerne dans des conditions de stress hydrique et salin (travaux 01) de Salim Azib., 2022 .**

Aux doses d'irrigation D2 et D3, la croissance par rapport aux plantes non stressées D1 a été réduite respectivement de 30% à 80% de la hauteur de la plante et de 31% à 72% de la longueur des racines. Les quatre traitements d'irrigation ont permis de développer différents degrés de réponse au stress hydrique chez les plants de luzerne. La croissance totale et le rendement ont été significativement affectés . Le stress hydrique croissant (D2, D3 et D4) a progressivement réduit la croissance de la plante exprimée en hauteur, longueur de la racine et des tiges et nombre de nodules par rapport aux plantes non stressées (D1). Un nombre réduit de nodules a également été observé après l'application d'un stress hydrique. Des réductions de 54,79 % et 91,62% ont été observées avec les doses D2, D3 et D4 respectivement par rapport à la dose D1.

Les effets négatifs de la salinité étaient prononcés de la même manière sur les tiges et sur les racines . Les hauteurs des tiges et longueurs des racines ont été réduites de 51.08% à 83%, 54% à 77.62% respectivement à 40 et 80 mM de NaCl par rapport à la situation témoin sans salinité.. Ils ont signalé que le nombre de nodules n'a pas été affecté à la concentration C1, alors qu'il a été réduit de 66.74% à la concentration C2. La nodulation des plantes a montré des différences significatives en réponses à l'inoculation avec les six souches rhizobiennes, sous les trois niveaux de salinité. Il semble que les souches Sm1021 et O172 soient des microsymbiotes hautement compétitifs à la forte salinité allant de 1,7mM (0,1g/l) à 640 mM (37,4g/l), avec une augmentation de la nodulation de l'ordre de 19 à 100% par rapport aux autres souches. Il est à signaler que les témoins T0, T1 et T2 n'ont pas formé de nodules.

D'après les résultats qu'ils ont obtenus , l'inoculation et son interaction avec les niveaux d'irrigation avaient un effet significatif sur la promotion de la croissance et le rendement des plantes . Les souches rhizobiennes ont affecté de manière significative la longueur des racines sous stress hydrique par rapport aux témoins non inoculés. Par contre, l'augmentation de la concentration saline influe négativement sur les paramètres de croissance et de la nodulation des plantes de luzerne . Cependant, les réponses des plantes, face à la salinité, étaient clairement différentes selon les souches inoculantes .

Le déficit en eau réduisait de manière significative la croissance totale et le rendement de la luzerne. Le stress hydrique croissant a progressivement affecté la croissance de la plante, exprimée par la hauteur de la plante, la longueur des racines, le poids sec des racines et des tiges et le nombre de nodules par rapport aux plantes non stressées. L'inoculation avec des souches de *S. meliloti* a amélioré la capacité de la plante à résister à la sécheresse. Les réponses des plantes de luzerne étaient clairement différentes selon les souches inoculantes. D'après les résultats de ce travail les souches Sm2011 et O152 augmentaient la nodulation et tous les paramètres de croissance étudiés et formaient les meilleurs couples symbiotiques par rapport aux autres souches et cela pour tous les niveaux de stress hydrique.

## Résultats et discussions

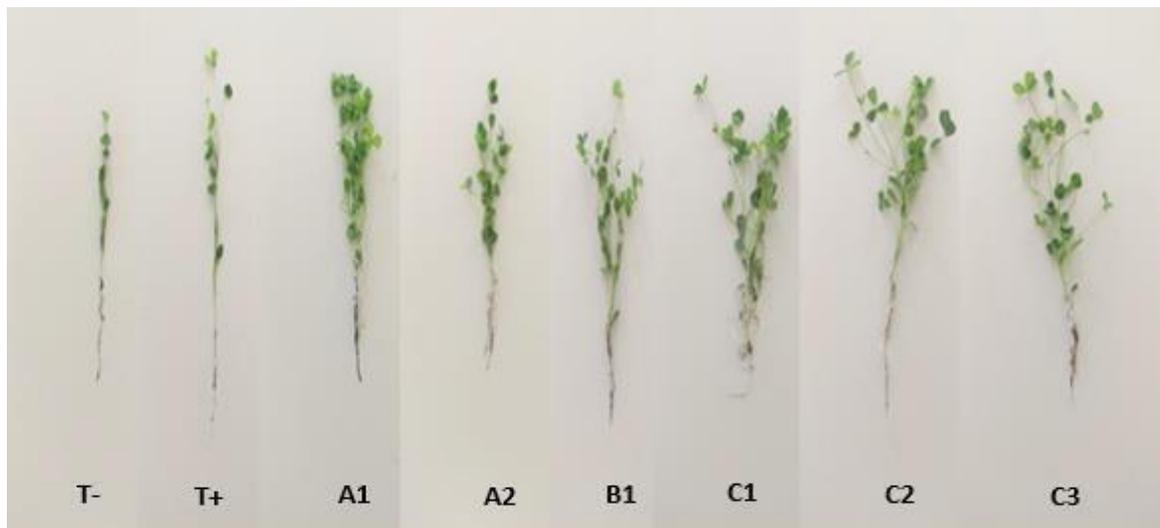
La salinité affecte négativement la croissance et le rendement de la luzerne cultivée. Les souches rhizobiennes utilisées affectent différenciellement la capacité de la plante à résister à la salinité. En condition non saline, les souches Sm1021 et O152 se sont montrées très

efficaces avec la plante hôte et contribuent à de meilleurs résultats symbiotiques. La souche O172, halotolérante in vitro, a confirmé aussi in vivo et a fourni aux plantes de luzerne des avantages majeurs leur permettant de résister à un stress important dû au NaCl. L'utilisation de souches tolérantes dans les sols salés, tels que les sols des régions d'étude, ouvre ainsi une stratégie potentielle et prometteuse en agriculture durable et permet de maintenir la productivité des légumineuses dans des conditions difficiles.

### II-2 L'utilisation de rhizobium dans l'inoculation simple et en co-inoculation avec les actinobactéries dans la bio-stimulation de la luzerne (Traveau02) de Samira Saidi .,2021.

#### II-2-1 L'effet de l'inoculation des rhizobium sur la croissance de la luzerne :

La capacité des souches isolées à former des nodules sur les racines de luzerne demeure le critère de base pour les caractériser comme étant des Rhizobia. Ainsi, le pouvoir infectieux a été examiné pour leur capacité à induire la formation de nodules sur les racines des plantes hôtes cultivées sur sable stérile sous conditions contrôlées. Après 45 jours de culture, aucun nodule n'a été observé sur les racines de la luzerne.



**Figure 20:** Effet de l'inoculation par *Rhizobium* sur la croissance végétale de la luzerne.

l'effet de l'inoculation sur les paramètres morphologiques de croissance de la luzerne par les six souches de Rhizobia (Fig.20) révèle une augmentation significative de l'allongement racinaire, de la hauteur de la plante ainsi que du poids frais et sec. Toutefois, cet effet bénéfique sur les poids frais et sec des tiges est constaté seulement avec les souches B1, C1, C2 et C3.

l'inoculation par les isolats en pots sous conditions contrôlées a échoué. Aucun nodule n'a été observé sur les racines des plantes cultivées. Des résultats comparables ont été obtenus par **Muresu et al. (2008)** dont le travail a porté sur des bactéries isolées des nodules de huit légumineuses qui n'ont pas pu réinfecter leur plante hôte sur plusieurs supports. Ces résultats

## Résultats et discussions

---

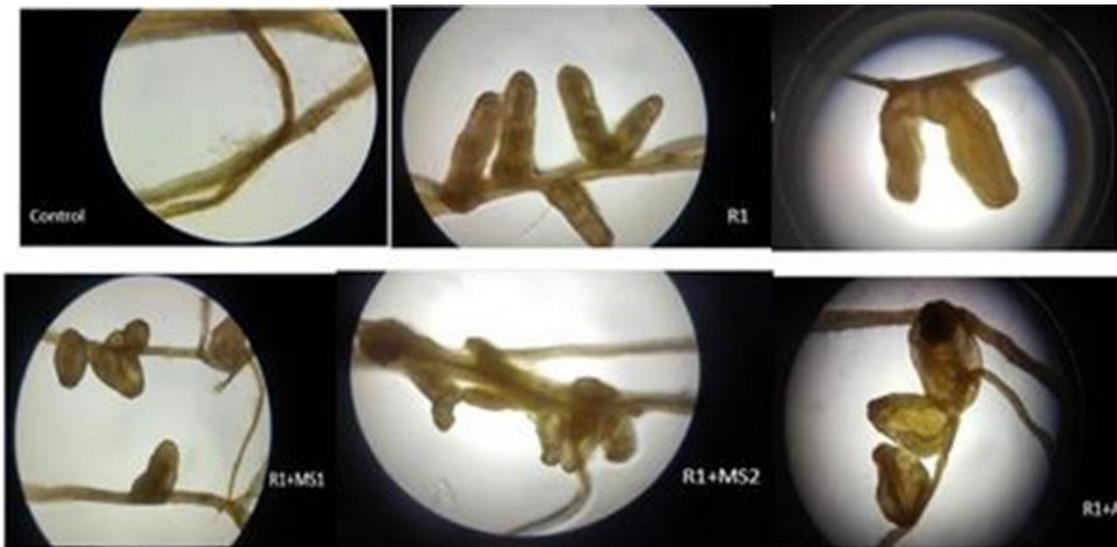
sont similaires également avec ceux rapportés par **Zakhia et al. (2006)** sur des légumineuses sauvages en Tunisie. Ces résultats concordent aussi avec ceux trouvés par **Brundu et al. (2004)** ayant rapporté que parmi 125 souches isolées à partir des nodules de 15 espèces de *Medicago*, 29 isolats seulement ont pu renoduler leur plante hôte.

Cette incapacité des souches isolées à réinfecter leur plante hôte peut avoir plusieurs explications. Elle peut être due à une insuffisance dans leur compétence d'invasion, la spécificité entre les deux partenaires (bactérie- hôte), la dose optimale de la densité cellulaire de l'inoculum appliqué et la composition des exsudats racinaires de la plante hôte (**Nadeem et al., 2013**). En effet, il est rapporté dans de nombreux travaux que la symbiose légumineuse-Rhizobia exige la présence de souches bactériennes rhizosphériques compatibles, compétitives et infectives. Ces souches doivent être en nombre suffisant pour maximiser la nodulation et présenter une forte effectivité pour la fixation d'azote (**Tian et al., 2010 ; Saidi et al., 2014**). En outre, la relation symbiotique Rhizobia-légumineuse peut également être limitée par l'acidité du sol qui peut affecter tous les aspects de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote. L'acidité perturbe également l'adhésion bactérienne à la surface des poils racinaires, lors de la phase d'infection (**Richardson et al., 2009**). De plus, selon **Zahran (2001)**, les Rhizobia qui survivent dans des conditions défavorables peuvent perdre leur infectivité, à la suite de la perte du plasmide (qui porte les gènes responsables de la symbiose) ou à une modification dans la composition des polysaccharides cellulaires nécessaires pour l'infection. Donc, les facteurs environnementaux affectant la plante hôte ainsi que les Rhizobia doivent être optimaux pour l'établissement d'une symbiose effective (**Somasegaran et Hoben., 1994**). La nature du substrat utilisé (sable) est un autre facteur qui peut expliquer la faible infectivité observée chez nos isolats. En effet, des recherches ont montré que dans la culture en sols sablonneux, la productivité des plantes et l'efficacité symbiotique étaient de 5 à 8 fois inférieures que dans la culture hydroaéroponique. De ce fait, la culture en sable ne peut être adéquate pour sélectionner les partenaires symbiotiques les plus efficaces (**Jebara et al., 2001**). D'après **Slattery et Pearce (2002)**, l'inoculation des plantes avec des Rhizobia sélectionnés ne donne pas toujours l'effet positif sur les légumineuses fixatrices d'azote sur lesquelles elle a été appliquée. La réponse positive ou l'absence de réponse à l'inoculation peuvent dépendre soit de la qualité de l'inoculum lui-même, soit des caractéristiques symbiotiques de la plante ou des propriétés du sol, soit encore d'une ou de plusieurs composantes du système sol-plante-microorganismes. En dépit d'une nodulation défectueuse, l'effet PGP est largement visible sur la croissance végétale de la luzerne.

### II-2-2 Effets de la co-inoculation *Rhizobium*-Actinobacteria sur La croissance de la luzerne (biostimulation) :

La capacité de nodulation des actinobactéries testées en co-inoculation avec les souches de *S. meliloti* montrent que trois souches MS1, MS2 et Ag1 ont amélioré la nodulation sur les racines de *Medicago sativa* (Fig. 21).

## Résultats et discussions



**Fig. 21 : Aspect des nodules de *Medicago sativa* inoculés ou co-inoculés**

Dans les deux conditions de traitements sans sel et en présence de sel, les paramètres morphologiques des plantes de *M. sativa* inoculées avec les Rhizobia seuls et en présence d'Actinobacteria montrent une augmentation significative de ces paramètres lorsqu'il s'agit de la co-inoculation des souches *S. meliloti* R1 et R2 avec MS1, MS2 et Ag1

Les résultats montrent que la salinité affecte tous les paramètres morphologiques des plantes. Cependant, la co-inoculation a montré une amélioration significative de la longueur des tiges (131-256%) et des racines (56-135%) des plantes inoculées par *S. meliloti* R1 ou R2 associées aux actinobactéries par rapport au contrôle négatif. En effet, la longueur optimale a été atteinte dans le cas de la co-inoculation des souches *S. meliloti* R1 et R2 avec MS1, MS2 et Ag1.

L'aspect positif de cette co-inoculation se manifeste également par l'augmentation des nombres de feuilles et de nodules. En effet, le nombre de nodules a augmenté de 61% et 51% pour les souches *S. meliloti* R1 et R2 associées aux actinobactéries, respectivement par rapport aux plantes inoculées avec les souches *S. meliloti* R1 et R2 seules. Cependant, en présence de sel, le nombre de nodules a été sensiblement plus élevé avec les souches *S. meliloti* R1 (36%) et R2 (80%) que les inoculations de contrôle sous stress salin

La capacité de nodulation des souches actinobactériennes dans les expériences de co-inoculation avec *S. meliloti* R1 et R2, a clairement montré que trois souches MS1, MS2 et Ag1 étaient capables de permettre la formation de nodules sur les racines de *M. sativa*.

Les teneurs en chlorophylle et caroténoïdes sont significativement élevées chez les plantes co-inoculées en absence et en présence de sel. Pour ce qui est des autres paramètres biochimiques, l'accumulation de proline et d'acides aminés dans les feuilles de *M. sativa* co-inoculées est nettement inférieure ce qui signifie que les actinobactéries atténuent le stress salin se traduisant par une diminution du taux de la proline et des acides aminés dans les feuilles des plantes inoculées et co-inoculées.

## Résultats et discussions

---

Dans le cadre de cette étude, les résultats qu'ils ont trouvés ont montré que la co-inoculation avec des actinobactéries et *Sinorhizobium* dans des conditions normales et stressantes présentait une croissance de plantes accrues par rapport aux plantes avec une seule inoculation. Les actinobactéries aident les *Rhizobium* à élargir sa gamme d'hôtes (**Martinez-Hidalgo et al., 2014**) et améliorent la fixation d'azote des symbiotes légumineuses – *Rhizobia*. L'augmentation de la croissance des plantes co-inoculées avec des souches d'actinobactéries comparées à celles des plantes inoculées avec la souche rhizobienne *S. meliloti* peuvent être attribuées à la tolérance plus élevée de la salinité et à la sécheresse et à leur plus grande capacité.

L'amélioration de la nodulation et de la fixation de l'azote chez les cultivars de luzerne était liée au traitement de co-inoculation. Selon les résultats de cette étude, les bactéries MS1 et MS2 peuvent être exploitées comme biofertilisants et peuvent être utilisées à grande échelle dans le domaine agricole après avoir mené à grande échelle sur leur application in situ et leur formulation et tout cela dans le but d'améliorer le rendement et la qualité de la culture de luzerne tout en protégeant la santé des bétails et de l'homme et préserver les écosystèmes, particulièrement dans les sols salins et les régions semi arides et arides.

## Résultats et discussions

---

### Conclusion et perspectives :

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluants et qui permettent de réduire l'usage d'engrais notamment riches en azote a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote. En effet, durant les dernières décennies, la reconnaissance de l'importance de la symbiose rhizobia-légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

La symbiose Rhizobium-légumineuse est une source importante d'azote fixé sous forme d'ammoniac dans la rhizosphère . Elle est par conséquent un mécanisme alternative utilisé pour réduire l'application d'engrais azoté chimique, coûteux en production agronomique. Le Rhizobium ayant la capacité de noduler les légumineuses, peut être utilisé en toute sécurité dans les pratiques agricoles pour augmenter la productivité des plantes. La stratégie visant l'isolement des Rhizobia à partir de nodules de la luzerne a permis de sélectionner les souches présentant les critères morphologiques, physiologiques, biochimiques et la tolérance à différents stress confirment le genre Rhizobium. Ces souches testées pour leur capacité de production d'AIA, de sidérophores et de solubilisation des phosphates confirme leurs potentialités d'amélioration de la croissance des plantes. Les expériences en pots ont montré que l'inoculation bactérienne de la plante hôte *Medicago sativa* pouvait favoriser la croissance des plantes et augmenter leurs paramètres morphologiques et biochimiques. L'effet PGP est visiblement clair supporté par la capacité phytostimulatrice et fertilisante des isolats. Dans un souci d'améliorer la réponse des légumineuses à l'inoculation de Rhizobium notamment en conditions stressantes , la co-inoculation avec d'autres PGPR est une stratégie efficace qui aurait de meilleures chances d'agir en synergie avec Rhizobium pour une meilleure productivité par rapport à une simple inoculation. La co-inoculation a été suivie par l'utilisation des souches de *S. meliloti* R1 et R2 avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées (MS1, MS2 ,MS3 , MS4 et Ag1). Les résultats montrent une meilleure nodulation sur les racines de *Medicago sativa* et une augmentation significative des paramètres de croissance et des teneurs en pigments chlorophylliens de la plante hôte. La co-inoculation a permis également d'avoir une meilleure réponse au stress salin en améliorant les stratégies d'adaptation. En effet, ces bactéries recherchées et caractérisées ont montré des aptitudes intéressantes pour rétablir la symbiose en augmentant le nombre de nodules et rééquilibrer les perturbations physiologiques des plantes engendrées par le stress salin. De ce fait ces bactéries peuvent être associées aux Rhizobia pour l'application dans la bioinoculation des légumineuses des sols affectés par la salinité et d'autres facteurs abiotiques

Pour compléter ce travail, il est nécessaire d'optimiser les conditions de croissance pour améliorer le processus de nodulation et considérer comme un moyen prometteur des interactions entre PGPR (les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) et la symbiose Rhizobium-légumineuse). Les effets interactifs des Rhizobia avec d'autres PGPR dans des conditions normales et stressantes pourraient améliorer la production agricole.

Dans une perspective future et vue que la situation économique en algérie et mondiale , il est intéressant d'améliorer la promotion de la croissance des fourrages en Algérie en faisant la co-inoculation par deux agents PGPR qui joue un role important dans la phytostimulation et la phytoprotection (par exemple : rhizobium-pseudomonas...) contre les agents pathogènes pour

## **Résultats et discussions**

---

avoir une bonne production quantitativement et qualitativement et arrivés à assurer une auto-suffisance alimentaire sachant que beaucoup de problèmes sont apparus à l'échelle mondiale ce qui pourra influencer sur la sécurité alimentaire et l'économie d'un pays.

Selon les résultats des articles la souche (O172), halotolérante in vitro, l'a confirmé aussi in vivo. Et les deux souches (MS1 et MS2) peuvent être des biofertilisants appropriés dans la formulation produits agricoles améliorant le développement des plantes, la santé et la productivité dans les régions aride et semi-aride.

Co-inoculation de Sinorhizobium-Arthrobacter sur des cultures fourragères sous différent stress.

## Références bibliographiques :

- ABDELGUERFI A., et al (2008) . Les productions fourrageres et pastorales en Algerie : situation et possibilites d'amelioration.
- Antoun H, Prévost D (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization, Springer, Dordrecht 1-38.
- Abolfazl, A., R.H. Zabihi, S. Movafegh et A.A.M Hossein (2009). The efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of two varieties of wheat in salinity condition. Am. Eurasian J. Sustain. Agric., 3: 824–828. N.K. Arora et al.
- Antoun H, Prévost D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: PGPR:Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui ZA. (eds.). Springer, The Netherlands.pp: 16-39.
- Amir HG, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Marziah M, Ramlan MF.(2005). Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil plum seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. Communications in soil science and plant analysis. 36(15-16), 2059-2066
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological research, 163(2), 173-181
- Abbasdokht, H., et Gholami, A. (2010). The effect of seed inoculation (*Pseudomonas putida*+ *Bacillus lentus*) and different levels of fertilizers on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. World Acad. Sci. Eng. Technol,68, 979-983
- Adesemoye, A. O., Obini, M., et Ugoji, E. O.v (2008). Comparison of plant growth- promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. Brazilian Journal of Microbiology, 39(3), 423-426.
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., et Lalande, R. (1998). Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant and soil, 204(1), 57-67.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, I.S., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of azotobacter and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turk J Biol 29, 29–34.

- Agarwal, P., Gupta, R., & Gill, I. K. (2018). Importance of biofertilizers in agriculture biotechnology. *Annals of Biological Research*, 9(3), 1-3 .
- Anelise Beneduzi, Adriana Ambrosini and Luciane M.P. ( 2012 ) . Plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl), 1044-1051.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E., 1992. Ethylene in plant biology. 2nd edn Academic Press. New York 414.
- Ahmad, F., Ahmad, I., KHAN, M.S., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* 29, 29–34.
- Ali, B., Sabri, A.N., Hasnain, S., 2010. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 1379–1384.
- Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology* 8, 971.
- Amir, H., Lagrange, A., Hassaïne, N., Cavaloc, Y., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza* 23, 585–595.
- Arora, N.K., Tewari, S., Singh, R., 2013. Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs, in *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, pp. 411–449.
- Arshad, M., Shaharoon, B., Mahmood, T., 2008. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere* 18, 611–620.
- Azcón, R., Barea, J.M., 1975. Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant and Soil* 43, 609–619.
- Apostol, L., S. Iorga, C. Mosoiu, R. C. Racovita, O. M. Niculae et G. Vlasceanu (2017). Alfalfa concentrate-A rich source of nutrients for use in food products. *Agric.Food*, 5: 66-73.
- Alka G., Murali G., 2008. Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Agricultural Research*, 42, (2), pp 153-156.
- Anderson A.J., Habibadegah-Tari P. and Tepper C.S., 1988 Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Applied & Environmental Microbiology*, 54, pp 375-380.

- Berggren, I., J. W. L. van Vuurde et A. M. Martensson (2001). Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Appl. Soil Ecol.* 17: 97-105.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., & Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilisation by '*Arthrobacter*' Sp. And '*Bacillus*' sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*, 4(6), 378-383
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. (2005). Bacteria/plant growth promotion. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Vol. 1 (Hillel D, ed).
- Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters*, 32(11), 1559-1570.
- Banerjee, M. R., Yesmin, L., et Vessey, J. K. (2006). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. *Handbook of microbial biofertilizers*. Food Products Press, Ney York, 137-181
- Belimov, A. A., Kojemiakov, A. P., et Chuvarliyeva, C. N. (1995). Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, 173(1), 29-37
- Bakker, P., Berendsen, R., Doornbos, R., Wintermans, P., Pieterse, C., (2013). The Rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front. Plant Sci.* N°4 P 165.
- Basu, A.; Prasad, P.; Das, S.N.; Kalam, S.; Sayyed, R.Z.; Reddy, M.S.; El Enshasy, H. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability*, 13, 1140
- Basu, A.; Prasad, P.; Das, S.N.; Kalam, S.; Sayyed, R.Z.; Reddy, M.S.; El Enshasy, H. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability*, 13, 1140
- Benharkat M, ; Feredj N. (2018). Isolement et caractérisations des bactéries nodulantes la luzerne (*Medicago sativa* L). master en biologie appliqué. Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, 80 p
- Bouchentouf, L., Laabas, S., Boukhatem, Z., Ighil, H., Bekki, A. (2015). Study of culture of six symbiotic cultivars bean and survey of their nodulation under field

natural conditions in West Algeria. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. Vol., 8 (4), 631-637

- Bal, H.B., Nayak, L., Das, S., Adhya, T.K., 2013. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil* 366, 93–105.
- Baniaghil, N., Arzanesh, M.H., Ghorbanli, M., Shahbazi, M., 2013. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth parameters, antioxidant enzymes and microelements of canola under salt stress. *J Appl Environ Biol Sci* 3, 17–27.
- Barazani, O.Z., Friedman, J., 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* 25, 2397–2406.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2014. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of plant physiology* 171, 884–894.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2012. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry* 58, 227–235.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.-P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil* 378, 1–33.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., Ahmane, Z., 2019. Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University-Science* 31, 706–712.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1327–1350.
- Bhatti, A.A., Haq, S., Bhat, R.A., 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis* 111, 458–467.
- Balesdent, J., Derrien, D., Fontaine, S. et al. (2011). Contribution de la rhizodéposition aux matières organiques du sol, quelques implications pour la modélisation de la dynamique du carbone. *étude et Gestion des Sols*, Volume 18, 3, 2011 - pages 201 à 216.

- Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ. (1999). Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early. Soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J., 63: 1670-1680
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., et Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied soil ecology, 34(1), 33-41.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R Tadeo, F., et Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211
- Curl EA ,1982. The rhizosphere: relation to pathogen behaviour and root disease. *Plant Dis* 66, 624-630
- Coineau Yves. (1995).Le sol: un milieu de vie. Fondation pour la nature et l'homme Repères pour l'éducation à l'environnement.2, 02p
- Cleyet-Marel, J. C. & Hinsinger, P. 2000. Le sol milieu vivant, un territoire qui reste à découvrir et à valoriser. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 7, 490-493. Article fertilisation
- Cora Miquel-Guennoc . (2017). Étude de l'interaction physique entre le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N et la bactérie auxiliaire de la mycorhization *Pseudomonas fluorescens* BBc6 . Laboratoire Interactions Arbres/Micro-organismes, UMR 1136, INRA, Nancy .
- Dommergues Y. and Mangenot F. (1970). *Écologie Microbienne du sol*. Masson,Paris
- Elkoca EF , Kantar , Sahin KF. (2008). Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria in the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *J. Plant Nutr.* 31: 157-171
- Figueiredo, MVB., HA. Burity, CR. Martinez et CP. Chanway (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1187–1193.
- Frankenberger Jr, W. T., et Arshad, M. (1995). *Phytohormones in soils: microbial production and function*. Marcel Dekker, Inc., 509

- Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP et al. (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J Plant Nutr SoilSci* 176 (6):876–882
- Grayston. S. J, «Rhizodeposition and its impact on microbial community structure and function in trees». *Phyton-Annales Rei Botanicae*, N° 40, 2000,pp. 27 - 36.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K., et Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(5), 404-411
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R Tadeo, F., et Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211
- Hugenholtz P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* 3, Reviews 0003. Diversité taxonomique des PGPR
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., et Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4),579-598
- HELEN, E. A. (2015), NODULATION AND NITROGEN FIXATION OF INDIGENOUS RHIZOBIA IN SOILS CULTIVATED AND UNCULTIVATED WITH AFRICAN YAM BEAN (*SPHENOSTYLIS STENOCARPA*), MASTER OF PHILOSOPHY DEGREE IN SOIL SCIENCE. University of Ghana, 170 p
- Heil M. and Bostock R.M., 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Oxford Journals*, 89, (5), pp503-512.
- Kohler J., Hernández J.A., Caravaca F., and Roldán A., 2008. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*, 35 (2) 141-151.
- Kamboj D, Kumar R, Kumari A et al. (2008). Rhizobia, nod factors and nodulation—a review. *Agric Rev* 29(3):200–206
- Kloepper. J.W. and Schroth. M.N, «Plant growth– promoting rhizobacteria on radishes», In: *Proc int Conf Plant Pathol Bact Angers*, 1978, pp. 379 - 382.

- Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. A., Barry, G. F., et Kishore, G. M. (1991). Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell*, 3(11), 1187-1193
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA. (2007). Role of phosphate solubilizing microorganisms insustainable agriculture-a review. *Agronomy for sustainable development*. 27 (1):29-43
- Klopper, J. W. (1993). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, In: *Soil Microbial Ecology*, (Ed.) F. B. Jr., Metting. Marcel Dekker inc., N. Y. p.255-273. diversité de PGPR
- Lemanceau. P, «Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: Exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents», *Agronomie*, N° 12, 1992, pp. 413 – 437
- Liu, G., Kong, Y., Fan, Y., Geng, C., Peng, D., & Sun, M. (2017). Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology*.
- Lynch. J.M, «The rhizosphere», John Wiley et Sons Ltd., Chichester, 1990, p.458.
- Miller M.B. and Bassler B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55,165-199.
- Martinez-Hidalgo, P., Galindo-Villardón, J. M. Igual et E. Martínez-Molina (2014). *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.): A new promising plant probiotic bacteria. *Sci. Rep.*, 4:1–9 .
- Marek-Kozaczuk M, Leszcz A, Wielbo J et al. (2013). *Rhizobium pisi* sv. *trifolii* K3.22 harboring nod genes of the *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* cluster. *Syst Appl Microbiol* 36:252–258
- Meghdas, I ., Hamze , M ., Dabboussi , F et al . (2004) . TAXONOMIE DU GENRE PSEUDOMONAS : RETROSPECTIVE ET ACTUALITE .Lebanese Science Journal,Vol. 5 , No. 1 ,.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Meena, S. K., Meena, R. K., Kumar, A., Verma, J. P., & Singh, N. P. (2017). Can bacillus species enhance nutrient availability in agriculturalsoils? In *Bacilli and Agrobiotechnology*.
- Oehl , F., Jansa, J., Ineichen, K .,2011. Champignons mycorhiziens arbusculaires, bioindicateurs dans les sols agricoles suisses *Recherche Agronomique Suisse* 2 (7–8): 304–311, 2.

- P. N. Bhattacharyya ;, D. K. Jha. (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.1327–1350
- Palleroni N.J , 1983. The taxonomy of bacteria. *BioScience*, 33, pp 370-377. Palleroni N.J., 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64 (3-4), pp 231-251.
- Rodríguez-Romero, A. S. (2004). Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated bananas.*Fruits*, 59(02), 83-90
- [\*Rhizobium\* Frank, 1889 emend. Young et al., 2001 emend. Young & al., 2001 \[archive\]](#) (consulté le 11 décembre 2020)
- Subbarao, NS. (1988). Phosphate solubilizing microorganism In: *Biofertilizer in agriculture and forestry*. Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, pp133-142
- Steenhoudt, O., and Vanderleyden, J (2000). *Azospirilum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbial. Rev.* 24: 487-506
- Séverine Lopez . (2018). Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de nickel. Thèse doctorat .
- Salim Azib et al., (2022) . Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara.
- Samira Saidi et al., (2021) . Improvement of *Medicago sativa* Crops Productivity by the Co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*-Actinobacteria Under Salt Stress.
- Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**, 571–586 (2003).
- Verma, L. N. (1993). Biofertiliser in agriculture. In: *Organics in soil health and crop production*. Thampan, P.K (Ed.), Peekay Tree Crops Development Foundation, Cochin, India. pp. 152-183
- Weert S.D. and Bloemberg G ., 2006. Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontrol. *Plant-Associated Bacteria* , 2, pp 317-333.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/361119168>

## Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicagosativa* (L.) in the Algerian Sahara

Article in *Jordan Journal of Biological Sciences* · June 2022

DOI: 10.54319/ijbs/150210

CITATION

S

0

READS

78

5 authors, including:



**Azib Salim**

Université Kasdi Merbah Ouargla

7 PUBLICATIONS 4 CITATIONS

SEE PROFILE



**Hamid Cheloufi**

Université Kasdi Merbah Ouargla

19 PUBLICATIONS 27 CITATIONS

SEE PROFILE



**Sara Attab**

5 PUBLICATIONS 8 CITATIONS

SEE PROFILE



**Noureddine Bouras** Université de Ghardaïa

229 PUBLICATIONS 1,345 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Mycotoxins and phytotoxins [View project](#)



In silico characterization of enzymes [View project](#)

# Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara

Salim Azib<sup>1,\*</sup>, Hamid Cheloufi<sup>2</sup>, Sara Attab<sup>1</sup>, Noureddine Bouras<sup>3,4</sup> and Michael D. Holtz<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Bioressources Sahariennes. Préservation et Valorisation, Université de Ouargla, BP 511, Ouargla 30000, Algeria; <sup>2</sup> Laboratoire de Recherche en Phœniciculture, Université de Ouargla, BP 511, Ouargla 30000, Algeria; <sup>3</sup> Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algeria; <sup>4</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algeria; <sup>5</sup> Field Crop Development Centre, Alberta Agriculture and Forestry, 5030 – 50 Street, Lacombe, Alberta T4L1W8, Canada.

Received: February 16, 2021; Revised: June 2, 2021; Accepted: July 1, 2021

## Abstract

This work was conducted to evaluate the phenotypic and phylogenetic diversity of 48 rhizobial strains. All rhizobial strains exhibited a broad tolerance to salinity and pH. In general, they grew well at 28°C and 37°C but poorly at 4°C and 45°C. The rhizobial strains showed an array of antibiotic sensitivity patterns. The numerical (UPGMA) analysis of phenotypic traits and the phylogenetic tree of concatenated housekeeping genes produced highly similar results. Phylogenetic analysis of *recA* and *glnII* showed that all the isolates were affiliated to the genus *Sinorhizobium*, but belong to two distinct groups: Group I, originating in Ghardaïa, was close to the species *S. meliloti* and *S. kummerowiae*. Group II, originating in Ouargla and El Oued, clustered separately from sequences of known *Sinorhizobium* species, which suggests they could be a new lineage. The classifications resulting from the *nodC* gene reflect host specificity, while phylogeny based on chromosomal genes is independent of the host plant. Based on the studies documented in the literature, the genetically characterized rhizobial strains can be used as an effective inoculant for the improvement of forage yields in Saharan regions.

**Keywords:** Abiotic stress, phylogeny, alfalfa, rhizobia, arid environment.

## 1. Introduction

Alfalfa (*Medicago sativa*) is one of the oldest forage crops and contributes immensely to world food production (Massimi *et al.*, 2017). It is vital due to its high protein content, high biomass yield, excellent nutritive value and high digestibility. It is widely planted throughout the world, especially in the arid and semi-arid areas (Zhang and Wang, 2015). This forage crop provides fixed nitrogen to agricultural ecosystems and reduces dependence on synthetic N fertilizers (Mouradi, 2016; Ahmad *et al.*, 2016). However, in adverse conditions such as high salinity and drought, the survival of rhizobia is greatly affected (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006) and therefore, nodulation and effectiveness in alfalfa can be significantly reduced (Brígido *et al.*, 2013; del Pozo *et al.*, 2017; Azib *et al.*, 2020).

Very little is known about the diversity of rhizobial strains nodulating Saharan varieties of alfalfa, despite the alfalfa-sinorhizobia symbiosis being one of the best studied plant-microorganism interactions. So far, only two closely related species are known to be able to nodulate alfalfa: *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* (Tabares-da Rosa *et al.*, 2019).

The development of polyphasic taxonomy (phenotypic, genotypic and phylogenetic characteristics) and the use of

*16S rRNA* as a taxonomic marker has led to many changes in the taxonomy of rhizobia (Zakhia and de Lajudie, 2006). A highly conserved gene like *16S rRNA* is not suitable for the discrimination of closely related *Sinorhizobium* (or *Ensifer*) species (Martens *et al.*, 2007). To overcome these limitations, the multilocus sequence analysis (MLSA) of several protein encoding housekeeping genes (*atpD*, *recA* and *glnII*, etc.) has been suggested as alternative phylogenetic markers (Stackebrandt *et al.*, 2002).

The aim of this study was to investigate phenotypic and genotypic diversity of 48 strains nodulating alfalfa in 14 Algerian Saharan sites affected by salt and drought. Firstly, phenotypic characterization for tolerance to salinity, temperature, pH and antibiotics was assessed; secondly, housekeeping genes *recA* and *glnII*, and symbiotic gene *nodC* were used to establish phylogeny of these strains.

## 2. Materials and methods

### *Nodule collection and isolation of rhizobia*

During the period from February to March of 2014, root nodules of alfalfa plants were collected from 14 sites (Table 1) and rapidly dried and kept in tubes containing desiccant according to the method described by Somasegaran and Hoben (1985).

\* Corresponding author e-mail: s\_azib@hotmail.com.

Desiccated nodules were rehydrated before sterilization. Nodules were placed in small beakers with clean cool water and left in the refrigerator to soak overnight. Then, they were surface sterilized with 95% ethanol for 10 seconds, and transferred to 3% (v/v) solution of sodium hypo-chlorate for 3-4 minutes. The surface sterilized nodules were then rinsed in five changes of sterile distilled water to completely rinse the sterilizing chemicals (Somasegaran and Hoben, 1985).

The rhizobia were isolated following the standard method on yeast extract mannitol medium (YEM) (Vincent, 1970). Each nodule was crushed in a drop of sterile distilled water and suspension was streaked onto YEM Agar. Bacterial colonies appeared after incubation at 28°C for 3-5 days. A single representative colony, for each sample, was restreaked on freshly prepared YEM plates in order to obtain pure cultures.

**Table 1.** Site description, and strain names, location, type of climate, soil type, salinity of irrigation water and year of sampling.

Site	Station	Strains	Geographical position	Soil texture	Salinity of irrigation water (g/l)*	Period of sampling
Ouargla	Hassi Ben Abdallah	O114, O144, O152, O172	Lat. 32°00'77''N Long. 5°46'27''E	Sandy	2 to 42 to 4 2 to 4	February 2014
	Oum Erraneb	O211, O213, O223	Lat. 32°05'03''N Long. 5°34'46''E		2 to 4	February 2014
	ITAS	O313, O321, O344	Lat. 31°94'11''N Long. 5°29'54''E			March 2014
	Chott Ain Beida	O413, O422, O434, O442, O452, O461	Lat. 31°97'76''N Long. 5°38'96''E			March 2014
Ghardaia	Daya Ben Dahoua	G131, G132, G122, G124	Lat. 32°53'53''N Long. 4°40'35''E		1 to 41 to 1.5 1 to 1.5	March 2014
	Mansoura	G211, G241, G242	Lat. 31°98'25''N Long. 3°57'52''E	Sandy	1 to 1.5 1 to 1.5	March 2014
	Oued Laroui	G312, G315, G321	Lat. 32°57'01''N Long. 3°62'86''E			March 2014
	Sebseb	G42, G422, G424, G431, G432	Lat. 32°17'01''N Long. 3°57'52''E			March 2014
	Guerrara	G514, G522	Lat. 32°67'89''N Long. 4°73'77''E			March 2014
El Oued	Tenedla	E114, E131, E141	Lat. 33°67'58''N Long. 6°03'72''E	Sandy	2 to 62.5 to 6 2 to 6	April 2014
	El-Meghaier	E213, E222, E251	Lat. 33°56'25''N Long. 5°92'71''E		2 to 4	April 2014
	Djamaa	E353	Lat. 33°52'30''N Long. 6°02'32''E		2 to 4	April 2014
	Guemmar	E414, E421, E432, E441, E452	Lat. 33°51'07''N Long. 6°78'26''E			April 2014
	Reguiba	E52, E532, E543	Lat. 33°56'25''N Long. 6°71'74''E			April 2014

\*: values taken from OSS (2003).

#### Nodulation tests

All the cultures obtained were tested for nodulation in the host plant *Medicago sativa* (Alfalfa). Isolates were used to inoculate surface sterilized alfalfa seeds growing in tubes containing Jensen's N-free agar medium (Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003) and evaluated after six weeks according to presence or absence of nodules (Gibson, 1980). The experiment was conducted in a plant growth chamber with 16/8 h day/night and 22°C.

Two day old seedlings were transferred into test tubes (15 cm × 2 cm) with one seedling per tube, containing 10 ml of agar slant medium and inoculated with 1 ml of standardized bacterial suspension (OD<sub>600nm</sub> of 0.9).

#### Phenotypic characterization

Isolates that induced nodulation in alfalfa were used in this study. Two closely related *Sinorhizobium meliloti* strains, Sm1021 and Sm2011 received from Dr. Helene Berges, Plant Genomic Center (CNRGV, INRA-France), were used as reference strains.

The tolerance of isolates to NaCl was tested by using YEM supplemented with 1.7, 40, 80, 160, 320, 640 and 1280 mM NaCl. The tolerance to pH was assessed by adjusting the pH to 4.0, 5.0, 6.0, 6.8, 8.0 and 9.0 through the addition of acid or base to the YEM (Vincent, 1970). Isolates were examined for tolerance to temperature by

incubating at 4, 28, 37 and 45°C as described by Niste *et al.* (2015).

The resistance to ten antibiotics ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ ): fusidic acid: 10  $\mu\text{g}$  (FA), amikacin: 30  $\mu\text{g}$  (AK), amoxicillin: 25  $\mu\text{g}$  (AMX), chloramphenicol: 30  $\mu\text{g}$  (C), colistin: 10  $\mu\text{g}$  (CS), erythromycin: 15  $\mu\text{g}$  (E), kanamycin: 30  $\mu\text{g}$  (K), penicillin: 6  $\mu\text{g}$  (P), spiramycin: 100  $\mu\text{g}$  (SP) and vancomycin: 30  $\mu\text{g}$  (VA), was tested on YEM plates by adding antibiotic discs on the surface of the agar.

The growth was recorded after 72 h of incubation at 28°C in liquid YEM by measuring the OD at 600 nm (Wei *et al.*, 2004) and on solid YEM by counting the colonies appearing on the plates. Tests tubes containing 10 ml of liquid YEM were inoculated with 0.1 ml of a fresh culture of each isolate and incubated under shaking (200 rpm). On solid YEM, supplemented with 1.5% agar, inoculation is carried out by streaking on Petri plates (Vincent, 1970; Somasegaran and Hoben, 1985).

#### *DNA extraction and PCR amplification and purification*

Total genomic DNA of the isolates was extracted using DNeasy® Blood and Tissue Kit columns in accordance with the manufacturer's protocol (QIAGEN Ltd.) from cells grown for 3 days in yeast extract mannitol broth (YMB) at 28°C under shaking (200 rpm). After extraction, the DNA was quantified to determine its approximate quantity and relevance for further analysis using agarose gel electrophoresis.

Housekeeping genes *glnII* and *recA*, and symbiotic gene *nodC* were amplified by PCR using the following primers: GSII-1F (5'-AACGCAGATCAAGGAATTCCG-3') and GSII-4R (5'-GCGACGATCTGGTAGGGGT-3') (Turner and Young, 2000); *recA*\_41F (5'-TTCGGCAAGGGMTTCGRTSATG-3') and *recA*\_640R (5'-ACATSACRCCGATCTTCATGC-3') (Vinueza *et al.*, 2005); *nodC*\_for540 (5'-TGATYGAYATGGARTAYTGGCT-3') and *nodC*\_rev1160 (5'-CGYGACARCCARTCGCTRTTG-3') (Sarita *et al.*, 2005). The quantity of DNA was determined by using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop ND1000). The PCR reaction was carried out in a 25  $\mu\text{l}$  volume containing 2.5  $\mu\text{l}$  10 $\times$ Standard Reaction Buffer with MgCl<sub>2</sub> (Biotools), 2  $\mu\text{l}$  DNA, 1  $\mu\text{l}$  *Taq* DNA polymerase (Biotools), 0.5  $\mu\text{l}$  dNTP, 1  $\mu\text{l}$  of each primer and 17  $\mu\text{l}$  of distilled water.

The thermal program for PCR reactions of *glnII* and *recA* was carried out at 95°C for 90s; 35 cycling times at 95°C for 45s, 55°C for 45s and 72°C for 2min and a final cycle was 72°C for 7min. For *nodC*, it was at 95°C for 3min; 35 cycling times at 94°C for 1min, 55°C for 1min and 72°C for 2min and a final cycle was 72°C for 7min. Unincorporated primers and dNTPs were removed from PCR mixes with PCR Clean-up (Macherey-Nagel). PCR products were verified by electrophoresis in 1% agarose gel submerged in TBE buffer (Del Papa *et al.*, 1999) and visualized with a Gel Doc EZ system (Bio-Rad).

Sequencing reactions were outsourced to Stabvida (Lisbon, Portugal).

#### *Phylogenetic analysis*

The quality of the sequences was checked and edited manually using BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) and automatically using DNA Baser Assembler v4.36.0 (2013) (Heracle BioSoft, <http://www.DnaBaser.com>).

Initially, a blast search (Altschul *et al.*, 1990) conducted using the National Center of Biotechnological Information (NCBI) website was carried out for preliminary identification and *recA*, *glnII* and *nodC* gene sequences of the reference species related to our strains were downloaded. The phylogenetic analyses were performed using MEGA 6.06 software (Tamura *et al.*, 2013). A neighbor-joining tree was constructed using the Kimura two-parameter model of evolution (Kimura, 1980) and support of internal branches was assessed using 1000 bootstrap replications.

#### *Statistical analysis*

The phenotypic characters results were analyzed by utilizing XLSTAT software (version 2016.02.28451). Bacterial growth in liquid medium was subjected to analyses of variance (ANOVA) and treatment means compared using Tukey's HSD (honest significant different) test. Numerical analysis of phenotypic traits was evaluated by UPGMA algorithm to infer a dendrogram on the basis of growth (+) or no growth (-) for each of the isolate in solid medium.

### 3. Results

#### *Morphologic characterization and authentication*

After 3 days of incubation at 28°C, all isolates formed visible colonies on YEM Agar medium. Colonies were whitish and translucent, varying in diameter from 1 to 3 mm, circular, convex, with a regular outline and a smooth surface. Furthermore, the isolates formed nodules on the roots of alfalfa plants six weeks after inoculation.

#### *Phenotypic characterization*

The results show that all strains exhibited a broad spectrum of tolerance to salinity. All strains were able to grow in the presence of 1.7 mM to 640 mM NaCl (Table 2). In contrast, no strain grew at 1280 mM NaCl. It is worth mentioning that tolerance to a given concentration of NaCl does not necessarily mean good growth of the strains. Analysis of variance shows significant differences between the salt concentrations of 80, 160, 320 and 640 mM with the average growth of the strains decreased with increasing salt concentrations (Figure 1a).

At low salinities (1.7 and 40 mM), strains G132 and G424, from Ghardaia, had the best growth. At 80 and 160 mM, strains O152, O211 and E141 from Ouargla and El Oued were the most resistant. At the highest concentrations, the E543 and E452 strains from the El Oued region performed the best (Table 3).

**Table 2.** Results of strains tolerance to some environmental stress factors and antibiotics.

Strains	Temperature (C°)			pH			NaCl (mM)		Antibiotic									
	4	28 and 37	45	4	5	6 to 9	1.7 to 640	1280	FA	AK	AMX	C	CS	E	K	P	SP	VA
O114	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
O144	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
O152	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
O172	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
O211	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
O213	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
O223	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
O313	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
O321	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
O344	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
O413	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
O422	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O442	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
O452	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
O461	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
E114	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
E131	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
E141	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
E213	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
E222	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
E251	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
E353	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
E421	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
E432	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
E441	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
E452	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E521	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
E532	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
E543	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
G131	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
G132	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
G241	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
G242	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
G122	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
G124	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
G211	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
G312	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
G315	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
G321	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
G421	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
G422	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
G424	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
G431	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
G432	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
G514	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
G522	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Sm1021	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Sm2011	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+

The resistant strains for the different factors were coded as “+” and the sensitive strains as “-”.

Growth of rhizobial strains differed with differences in pH values. They tolerated alkaline and neutral pH better than acidic pH (Figure 1c). The strains were affected by excessively acidic pHs and registered growth rates of 32.43% and 81.63% at pH 4 and 5, respectively. At slightly acidic, neutral and alkaline pH, all rhizobial strains

grew well. The ANOVA test showed significant differences between the growths of strains at different pH (Figure 1d). Eleven strains (O152, O413, O422, O452, G241, G124, G321, G424, G431, G4311 and G514), from Ouargla and Ghardaïa, were resistant to pH 4.

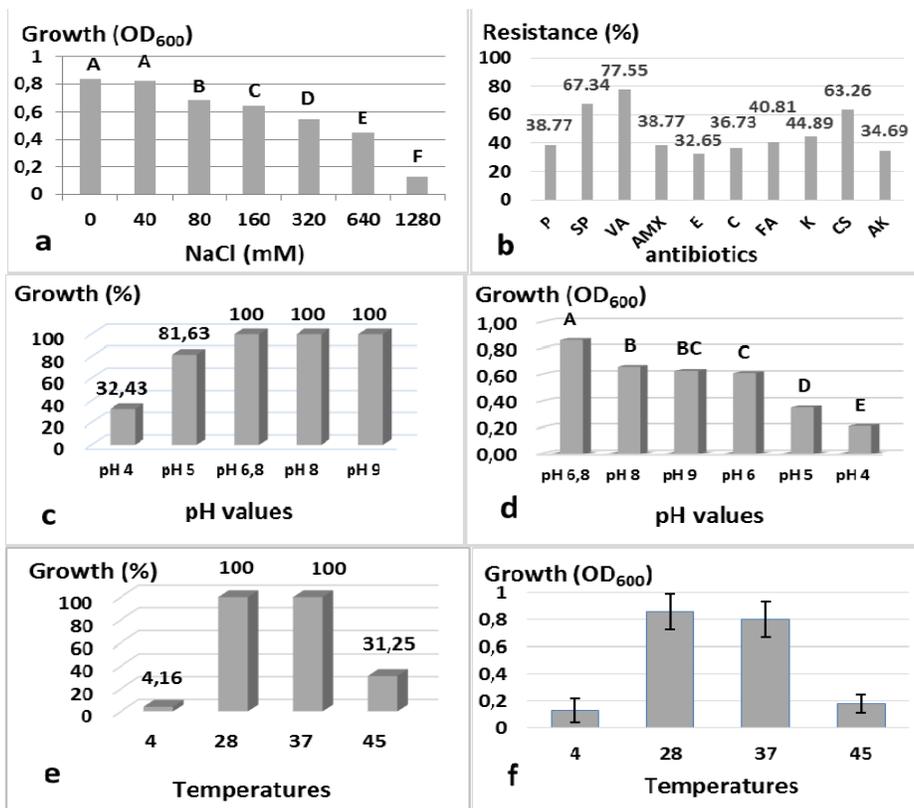
**Table 3.** Selection of strains tolerant to different NaCl concentrations.

strains	NaCl Concentrations						
	1.7 mM	40 Mm	80 mM	160 mM	320 mM	640 Mm	1280 mM
G132 <sup>a</sup>	G132 <sup>a</sup>	O152 <sup>a</sup>	E141 <sup>a</sup>	G241 <sup>a</sup>	E543 <sup>a</sup>	-	-
O211 <sup>ab</sup>	G424 <sup>ab</sup>	O211 <sup>a</sup>	O223 <sup>ab</sup>	E521 <sup>a</sup>	E452 <sup>a</sup>	-	-
O114 <sup>abc</sup>	E222 <sup>abc</sup>	O172 <sup>ab</sup>	O172 <sup>abc</sup>	E141 <sup>a</sup>	O461 <sup>ab</sup>	-	-
O452 <sup>abc</sup>	G122 <sup>abc</sup>	O223 <sup>ab</sup>	O321 <sup>abcd</sup>	E114 <sup>ab</sup>	O442 <sup>abc</sup>	-	-
G321 <sup>abcd</sup>	O152 <sup>abcd</sup>	E222 <sup>ab</sup>	E114 <sup>abcd</sup>	G124 <sup>ab</sup>	E251 <sup>abcd</sup>	-	-
O144 <sup>abcde</sup>	O172 <sup>abcde</sup>	E521 <sup>ab</sup>	O313 <sup>abcd</sup>	O313 <sup>ab</sup>	E213 <sup>abcde</sup>	-	-
O313 <sup>abcde</sup>	E131 <sup>abcde</sup>	E131 <sup>ab</sup>	G422 <sup>abcde</sup>	O211 <sup>abc</sup>	O144 <sup>abcdef</sup>	-	-

For each parameter, the means in the same column followed by the same letter are not significantly different, as determined by Tukey's HSD test at P = 0.05.

At 28 and 37°C, all strains showed good growth, produced visible colonies on solid medium (Figure 1e) and high optical densities (OD) (Figures 1f). At 4°C, only the two reference strains, Sm2011 and Sm1021, were able to grow. Increasing the temperature to 45°C significantly reduced growth and only 15 isolates (O144, O152, E251, E521, E532, G242, G321, G421, G422, G431, G432, G514, G522, Sm2011 and Sm1021) were thermotolerant (Table 2).

The strains showed different resistance profiles to antibiotics. They exhibited strong resistance to spiramycin 100 µg (SP), vancomycin 30 µg (VA) and colistin 10 µg (CS), while their resistance was low, but comparable, for the other antibiotics (Figure 1b). Strains from Ghardaïa and reference strains are, generally, more tolerant to antibiotics (61.17% and 65% respectively) than those from Ouargla and El Oued that show low levels of resistance (around 35% and 43.5%), apart from a few that are resistant to a single antibiotic.



**Figure 1.** Growth of strains under: salinity (a), antibiotics (b), different pH (c, d) and temperatures (e, f) (done at the Saharan Bioresources Laboratory of the University of Ouargla, in 2017).

Numerical analysis of phenotypic traits

The 27 phenotypic characters of the strains were used to construct a dendrogram using the UPGMA method (Figure 2). At about 60% dissimilarity, rhizobial strains have been classified into three phenotypic groups. Group 3 has 29 strains, all from the Ouargla and El Oued regions. Group 1 consists of 17 strains exclusively from the Ghardaïa region. The two reference strains Sm1021 and Sm2011 were in a separate group (group 2), closer to group 1 than to group 3.

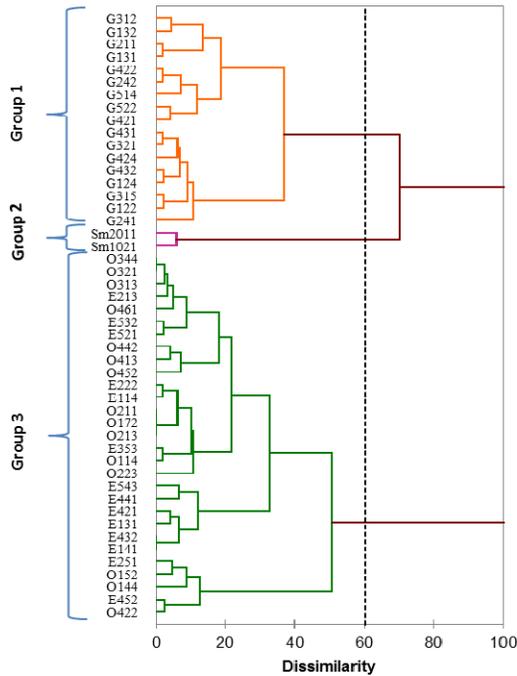


Figure 2. Dendrogram showing the phenotypic diversity of 48 strains constructed using the UPGMA method, based on a binary matrix of 27 physiological characters.

Table 4. Sequence similarities for *recA*, *glnII* and *nodC* genes relatedness among the 48 strains and related type strains.

Type strain	Gene marker and sequence similarity with type strains %							
	<i>glnII</i> Similarity %	Stains number	<i>recA</i> Similarity %	Isolate numbers	<i>glnII+recA</i> Similarity %	Isolate numbers	<i>nodC</i> Similarity %	Isolate Numbers
<i>S. meliloti</i> USDA 1002 <sup>T</sup>	99%	14	100%	05	99%	14	99%	18
	98%	10	99%	06	98%	27	97%	08
	97%	24	98%	37	97%	07	96%	18
<i>S. kummerowiae</i> CCBAU 71714 <sup>T</sup>	100%	04	99%	04	99%	13	96%	02
	99%	10	98%	44	98%	35	95%	13
	98%	33					94%	29
<i>S. medicae</i> A321 <sup>T</sup>	97%	01					90%	04
	91%	01	91%	48	92%	47		
<i>S. medicae</i> USDA 1037	92%	46			91%	01		
	93%	01					100%	02
							99%	13
							96%	29
							90%	04

***glnII* gene phylogeny**

The phlogenetic tree corresponding to *glnII* (Figure 3) showed that the strains clustered into two groups with high bootstrap support (99 for group I and 72 for group II).

Phylogenetic analysis

Forty-eight strains were chosen for the phylogenetic examination of housekeeping genes (*recA* and *glnII*) and the symbiotic gene *nodC*. Phylogenetic trees were constructed for each gene utilizing the Neighbor-joining method and Kimura's two-parameter model. Bootstrap analysis was based on 1000 replications.

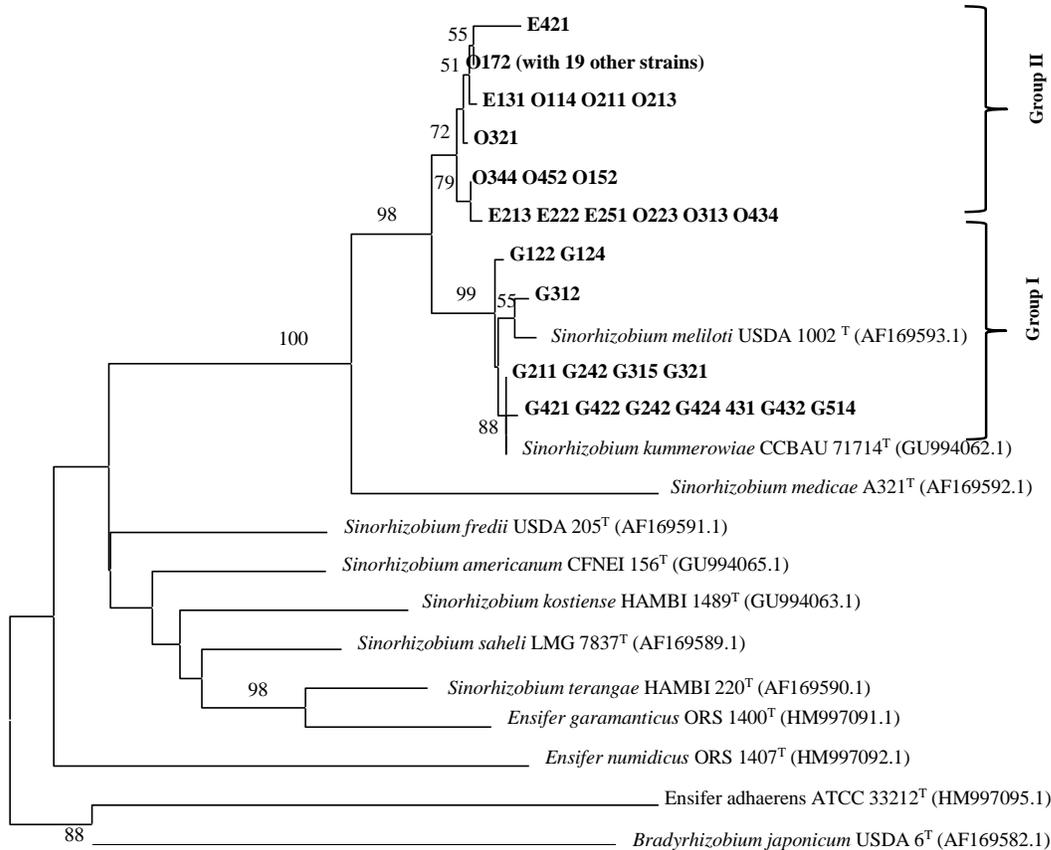
Housekeeping gene phylogenies

Strains were more closely related to *S. meliloti* and *S. kummerowiae* (De Lajudie *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 2002) than to other species according to the housekeeping gene phylogenies (Table 4). Sequence analysis of *recA* and *glnII* respectively revealed 98–100% and 97–99% similarities with type strains *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup>, 98–99% and 97–100% with type strains *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> and 91% and 91–93% with type strains *S. medicae* A321<sup>T</sup> (Rome *et al.*, 1996).

Group I consisted of 14 strains, originating exclusively from Ghardaïa, closely related to reference strains *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> and *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup>. There were 13 strains (G421, G422, G242, G424, G431, G432, G514, G211, G242, G315, G321, G122

and G124) clustered with *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> at sequence similarities of 99.82 to 100% and one strain (G312) clustered only with *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> at sequence similarity of 99.52%. Group II contained 34 strains, coming from the El Oued and Ouargla (except G131, G132 and G522), which were separated from the

reference strains. Similarities between the strains in this group and type strains *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> and *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> were 97.69 to 98.58% and 97.46 to 98.19%, respectively.

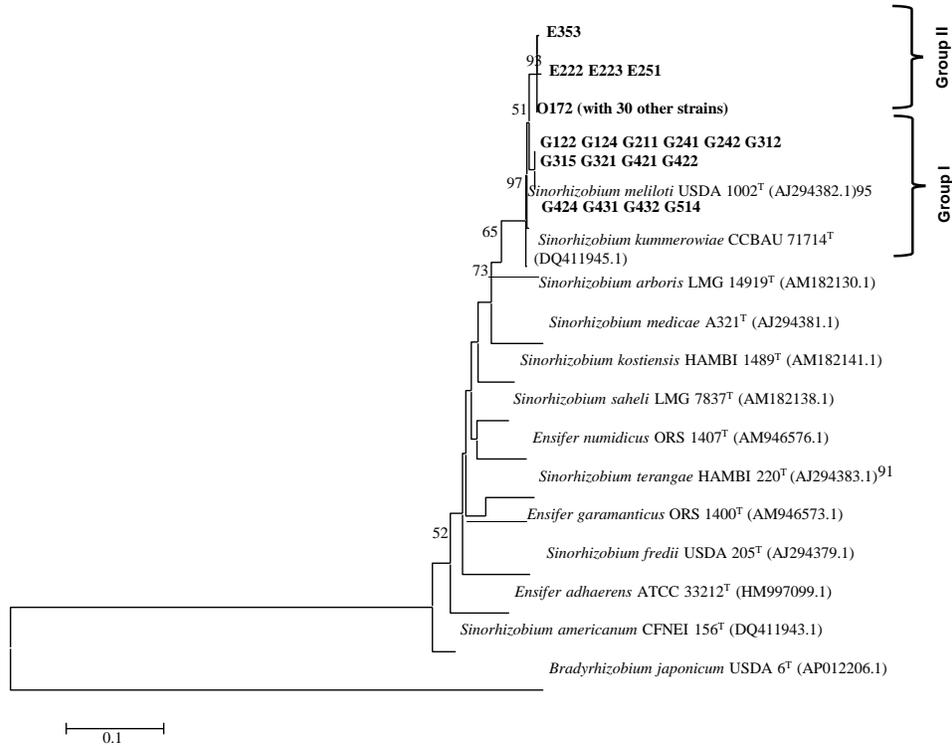


**Figure 3.** Neighbor-joining phylogenetic tree constructed from *glnII* gene (555 bp) showing the relationship among strains nodulating alfalfa and related species of the *Sinorhizobium*–*Ensifer* group. Bootstrap values (1000 replicates; only values over 50 % are given) are indicated above the branches. *Bradyrhizobium japonicum* USDA6<sup>T</sup> was used as an outgroup. Type strains are indicated with a superscript<sup>T</sup>.

#### recA gene phylogeny

The strains clustered into 2 groups with very high bootstrap values (97 for group I and 93 for group II) (Figure 4). There were 14 strains from Ghardaïa in group I, and they were closely related to type strains *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> and *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup>. There were 10 strains (G122, G124, G211, G241, G242, G312, G315, G32, G421 and G422) clustered with *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> at sequence similarities of 100% and 4

strains clustered with the reference strain *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> at sequence similarity of 99.24%. Thirty-four strains in group II from the El Oued and Ouargla regions (except G131, G132 and G522) are not grouped with any of the known reference strains and form an individualized clade on the tree. The similarities between these strains and *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> and *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> were 98.22 to 98.67%.

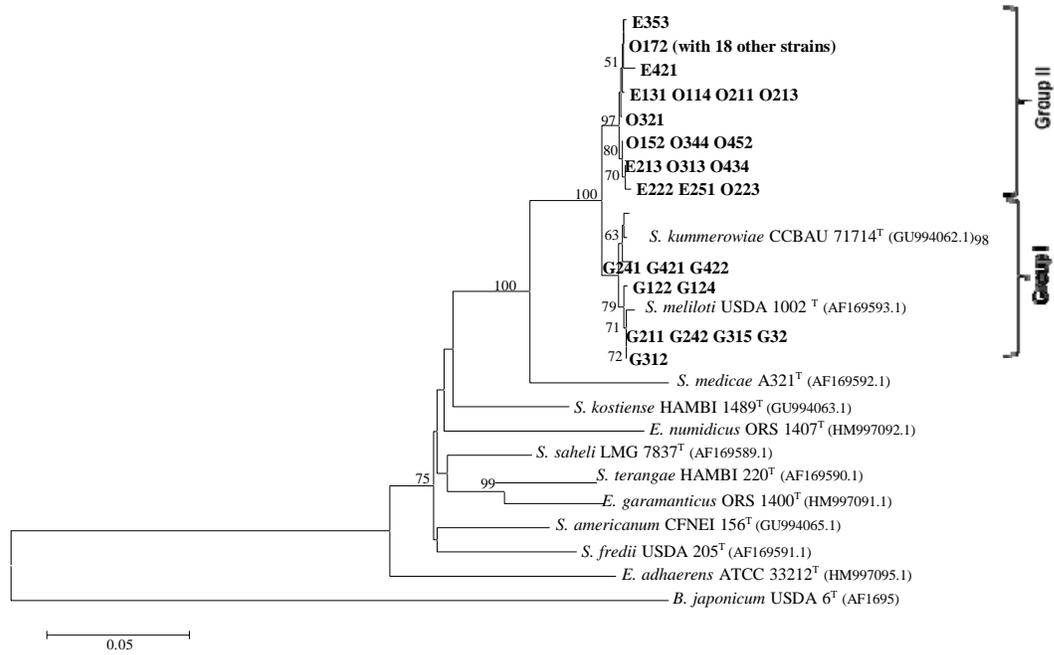


**Figure 4.** Neighbor-joining tree constructed from *recA* gene (430 bp) showing phylogenetic relationships of strains nodulating alfalfa and related species of the *Sinorhizobium-Ensifer* group. Only values over 50 % are indicated above the branches.

#### Concatenated housekeeping gene phylogeny

In order to refine the phylogeny of the studied strains, a phylogenetic tree was constructed from concatenated *glnII* and *recA* gene sequences (Figure 5). The grouping results were similar to those of the individual gene trees. The 48 strains clustered into 2 different groups. Fourteen strains belong to group I with a bootstrap value of 98. Seven strains (G122, G124, G211, G242, G315, G321 and G312) were grouped with the *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> at sequence similarity of 99.48 to 99.69% and seven others (G431, G432, G514, G424, G241, G421 and G422) were linked with *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> at similarity

rates of 99.38 to 99.69%. It should be noted that all the strains composing group I came from the region of Ghardaïa. Group II, composed of 34 strains coming exclusively from the El Oued and Ouargla regions (except G131, G132 and G522), formed a clearly separated group from the reference strains with 97 bootstrap support and suggested that these novel strains may represent a distinct lineage from defined species. Similarities between the group 2 strains and the closest reference strains are 97.73–98.25% with *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> and 98.04–98.56% with *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup>, respectively.

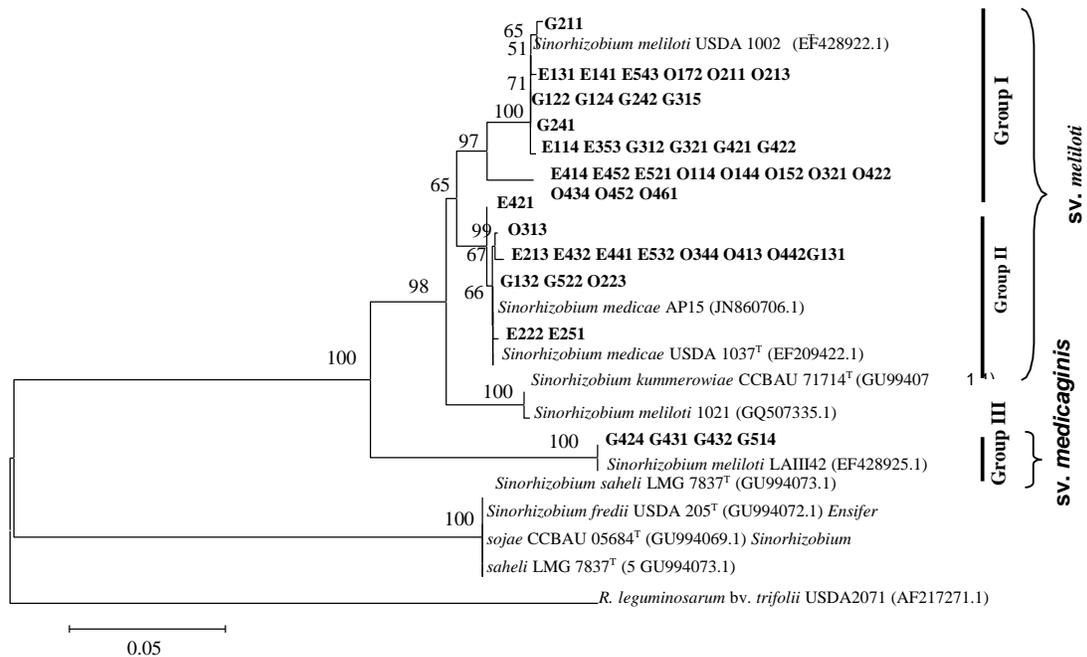


**Figure 5.** Neighbor-joining tree constructed from concatenated housekeeping genes *glnII* and *recA* (985 bp) showing phylogenetic relationships of strains nodulating alfalfa and related species of the *Sinorhizobium-Ensifer* group. Bootstrap values (1000 replicates; only values over 50 % are given) are indicated above the branches.

*nodC* gene phylogeny

The *nodC* phylogenetic tree showed three well-supported distinct groups, at bootstrap value of 100 for groups I and II, and 99 for group III, as presented in Figure 6. The group I and II strains from different areas were clustered with type strains *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> at similarity of 97.05 to 99.66% and *S. medicae* A321<sup>T</sup> at

similarity of 99.65 to 100%, respectively. The strains G424, G431, G432 and G514 composing group III displayed high sequence identities with *S. meliloti* LAIII42 (99.66% similarity) and came from the region of Ghardaia. Thus, the strains used in this study belong to two types of symbiovars: *meliloti* (groups I and II) and *medicaginis* (group III) described by Villegas *et al.* (2006).



**Figure 6.** Neighbor-joining tree constructed from *nodC* genes showing phylogenetic relationships of strains nodulating alfalfa and related species of the *Sinorhizobium-Ensifer* group. Bootstrap values (1000 replicates; only values over 50 % are given) are indicated above the branches.

#### 4. Discussion

In this study, we analyzed for the first time a collection of 48 strains obtained from *Medicago sativa* root nodules collected from three different regions in the North eastern Algerian Sahara. This study included both phenotypic and phylogenetic analyses and was the first time such an investigation was conducted on rhizobial isolates from this region.

The phenotypic characterization showed that morphological and growth characteristics of the strains were in agreement with those already described in the literature (Vincent, 1970; Latrache *et al.*, 2017). The results of the plant nodulation tests showed that all strains could produce nodules.

Salinity is an important stress factor for rhizobia, as it inhibits their growth and development (Graham, 1998; Farissi *et al.*, 2014). In the present study, all strains were able to tolerate salt concentrations from 1.7 mM to 640 mM (Table 2). In contrast, no strains were able to grow at 1280 mM. Our results are in agreement with those of Mohammad *et al.* (1991), Embalomatis *et al.* (1994) and Jebara *et al.* (2000) who indicated that strains of *S. meliloti* were tolerant of NaCl concentrations between 300–700 mM in American, Greek and Tunisian soils respectively. Likewise, a tolerance of up to 800 mM of NaCl was observed in rhizobia collected in the Sebkhah of Misserghine (north-western Algeria) (Merabet *et al.*, 2006). Elbouthahiri *et al.* (2010) were able to isolate strains of *S. meliloti* capable of growing at 1711 mM NaCl. These were sampled in areas heavily affected by salinity in southern Morocco.

At 80 and 160 mM, the most resistant strains were O152, O211 and E141 and at the highest concentrations, strains E543 and E452 performed best. Adaptation to salinity in a few *Rhizobium* species is the result of intracellular accumulation of low molecular weight organic solutes called osmolytes, as described by Boscardi *et al.* (2002)

At pH of 4.0 and 5.0, strains were sensitive thus confirming the results of Elbouthahiri *et al.* (2010) and Thami-Alami *et al.* (2010) that strains tolerated acidic pH of 5.5 to 6.0 where most isolates grow (Latrache *et al.*, 2017). Our results are also in agreement with those of Abolhasani *et al.* (2010), Thami-Alami *et al.* (2010) and Hameed *et al.* (2014) who indicate that the strains of *S. meliloti* nodulating alfalfa were all resistant to the alkaline pH 8.0 and 9.0. At pH 6.8, all strains showed maximum growth, which is in agreement with Rodrigues *et al.* (2006) and Shetta *et al.* (2011) who stated that the optimum pH for rhizobia multiplication is between 6.5 and 7.0.

At temperatures 28°C and 37°C, we recorded 100% growth. Our results agree with those of Zahran (1999) and Dekak (2018) who found that rhizobia are mesophilic bacteria and optimum growth of most strains is between 28°C and 31°C. At 4°C and 45°C, the strains that were able to grow only produced a few small colonies on solid medium and low OD's in liquid medium. High and low temperatures have been reported to be among the main factors limiting growth and nitrogen fixation by rhizobia (Niste *et al.*, 2015).

We found that the strains show different antibiotic resistance profiles. The sensitivity to antibiotics, which is higher in some strains, can be attributed to the less

abundant microbial biomass in the rhizosphere (Grego *et al.* 1995). The more pronounced resistance in Ghardaïa strains can be explained by the use of large amounts of intensive livestock manure in this region as noted by Guessoum *et al.* (2014), where antibiotics are commonly added to animal feed to treat diseases and promote growth (McManus, 1997).

Many studies have described *S. meliloti* and *S. medicae* as the only rhizobia capable of nodulating alfalfa. Phylogenetic analysis of *recA* and *glnII* showed that instead it is *S. meliloti* and *S. kummerowiae*, which are the microsymbionts of *M. sativa* in the Saharan regions of Algeria. The strains were more closely related to *S. meliloti* and *S. kummerowiae* than to other species. Sequence analysis of *recA* and *glnII* revealed high similarities with type strains *S. meliloti* USDA1002<sup>T</sup> and *S. kummerowiae* CCBAU71714<sup>T</sup>. Our results converge with those of Wei *et al.* (2002) and Toularoud *et al.* (2016) who mentioned that alfalfa could be efficiently nodulated by *S. kummerowiae* in Chinese and Turkish soils. The presence of *S. kummerowiae* in the study areas was reported recently by Arbi *et al.* (2015) and Chaïch *et al.* (2017) as dominant microsymbiont, with *S. meliloti*, of the spontaneous legumes *Medicago littoralis*, *Melilotus indicus* and *Genista saharae*.

The concatenated housekeeping gene phylogeny showed that the strains were grouped into 2 different groups. Group I comprises strains from Ghardaïa, strongly related to type strains *S. kummerowiae* CCBAU 71714<sup>T</sup> and *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup>. The thirty four strains composing group II were separated from the reference strains, and this suggested that these novel strains may represent a distinct lineage from defined species. As suggested by Toularoud *et al.* (2016), housekeeping gene phylogenetic analyses may help to further resolve the taxonomic relationship between *S. kummerowiae* and *S. meliloti*, which may belong to a single species. The grouping results were, generally, similar to those of the individual gene (Figures 3 and 4).

The results obtained were very similar to those of the concatenated housekeeping gene phylogenetic tree (Figure 5). The strains originating from the region of Ghardaïa are phylogenetically and phenotypically linked to the species *S. kummerowiae* and *S. meliloti* and separated from those of the regions of Ouargla and El Oued. These results revealed geographic variation in the rhizobial population composition as shown in many works (Fierer and Jackson, 2006; Talebi *et al.*, 2008).

Neighbor-joining phylogenetic tree of *nodC* gene sequences revealed three distinct well-supported clusters (Figure 6). Twenty-four strains were in group I that consisted of strains related to *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup>. Group II consisted of thirteen strains related to the type strain *S. medicae* A321<sup>T</sup>. Four separate strains forming group III showed 100% similarity to *S. meliloti* LAIII42. To label resulting groups, we used the system of symbiovars proposed by Rogel *et al.* (2011) and De Meyer *et al.* (2011). So, the *Sinorhizobium* isolates used in this study belonged to two symbiovar types, *meliloti* (group I and II) and *medicaginis* (group III) as described by Villegas *et al.* (2006). These results are explained by the fact that the tested strains and *S. meliloti* and *S. medicae* have the same host plant.

Several studies have shown that the evolutionary history of chromosomal genes may be different from that of symbiotic genes. Our results are in agreement with those of Laguerre *et al.* (2001) who indicated that the classification resulting from the analysis of the symbiotic *nodC* gene reflects host specificity, while the phylogeny based on chromosomal genes is independent of the host plant. Symbiovars can be shared by different species due to lateral transfer of symbiotic genes (Rogel *et al.*, 2011).

## 5. Conclusion

This study showed that the bacteria isolated from the root nodules of *Medicago sativa*, cultivated in the Algerian Sahara, are genetically and phenotypically diverse. Phenotypic analysis showed that many strains have interesting characteristics. This may allow them to be used as an effective inoculum for Saharan soils, which are subjected to many edaphoclimatic stress conditions. Phylogenetic analysis showed that our strains are strongly related to *S. meliloti* and *S. kummerowiae*, which are the effective symbiotic partners of alfalfa in the study area. There was a similarity between the genotypic and phenotypic profiles suggesting the existence of a relationship between the groups of strains and their geographic distribution.

## Acknowledgements

The authors would like to thank M. Juan Imperial and all the members of the GEBIOPAD laboratory, of the Centre for Plant Biotechnology and Genomics (UPM-INIA) in Madrid, for their invaluable help during the realization of the molecular part of this study.

## References

- Abolhasani M, Lakzian A, Tajabadipour A and Haghnia G. 2010. The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline condition. *Aust J Basic & Appl Sc*, **4**: 882-886.
- Ahmad E, Zaidi A, Khan MS (2016) Effects of plant growth promoting rhizobacteria on the performance of greengram under field conditions. *Jordan J Biol Sci* **9**: 79-88.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**: 403-410.
- Arbi SB, Chekireb D, Quatrini P, Catania V, Cheriet D and Ouarts A. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. growing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara. *Symbiosis*, **66**: 75-87.
- Azib S, Chelouf H, Attab S and Bouras N. 2019. Improvement of alfalfa growth under water stress by inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains from the Algerian Sahara. *International Journal*, **75**(7): 35-43.
- Boscari A, Mandon K, Dupont L, Poggi MC and Le Rudulier D. 2002. BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, **184**: 2654-2663.
- Brígido C, Nascimento FX, Duan J, Glick BR and Oliveira S. 2013. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Mesorhizobium* spp. reduces the negative effects of salt stress in chickpea. *FEMS Microbiol Lett*, **349**(1): 46-53.
- Chaïch K, Bekki A, Bouras N, Holtz MD, Soussou S, Mauré L, Brunel B, De Lajudie P and Cleyet-Marel JC. 2017. Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis*, **71**: 111-120.
- Dekak A, Chabi R, Menasria T and Benhizia Y. 2018. Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. *J. Adv. Res*, **14**:35-42.
- De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins DM, Dreyfus B, Kersters K and Gillis M. 1994. Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **44**: 715-733.
- De Meyer SE, Van Hoorde K, Vekeman B, Braeckman T and Willems A. 2011. Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Sci Am J*, **43**: 2384-2396.
- Del Papa MF, Balagué LJ, Sowinski SC, Wegener C, Segundo E, Abarca FM, Toro N, Niehaus K, Pühler A, Aguilar OM, Martínez-Drets G and Lagares A. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 1420-1427.
- del Pozo A, Ovalle C, Espinoza S, Barahona V, Gerding M and Humphries A. 2017. Water relations and use-efficiency, plant survival and productivity of nine alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in dryland Mediterranean conditions. *Eur J Agron*, **84**: 16-22.
- Domínguez-Ferreras A, Pérez-Arnedo R, Becker A, Olivares J, Soto MJ and Sanjuán J. 2006. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid *pSymB* for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, **188**(21): 7617-7625.
- Elbouthhiri N, Thami-Alami I and Udupa SM. 2010. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiol*, **10**: 1-13.
- Embalomatis A, Papaxosta D and Katinakis P. 1994. Evaluation of *Rhizobium mloti* strains isolated from indigenous populations in Northern Greece. *J Agron Crop Sci*, **172**: 73-80.
- Farissi M, Ghoulam C and Bouzgaren A. 2014. The effect of salinity on yield and forage quality of alfalfa populations in the Marrakech region (Morocco). *Fourrages*, **219**: 271-275.
- Fierer N and Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci*, **103**: 626-631.
- Gibson A. 1980. Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In: Bergersen F.J. (Eds.), **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK, pp. 139-184.
- Graham PH. 1998. Biological dinitrogen fixation: symbiotic. Principles and applications of soil microbiology, **2**: 222-241.
- Grego S, Quatrini P, Badalucco L, De Cesare F, Zanotti C and Cacciari I. 1995. Souches résistantes de *Rhizobium* dans une rhizosphère caractérisée d'Acacia au nord et au sud du Sahara. In : Ed. Pontanier R., M'Hiri A., Akrimi N., Aronson J., Le Floc'h E. (Eds.), **L'homme peut-il refaire ce qu'il a défait ?**. John Libbey Eurotext, Paris, 201-210.
- Guessoum H, Benbrahim F, Halilat M, Laouar F, Bensalama M and Darem S. 2014. Pollution biologique des eaux phréatiques de la région de Ghardaïa (Cas de Sebseb). *Int J Adv Sci Technol*, **3**: 35-43.
- Hall TA.1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, **81**: 95-98.
- Hameed RA, Hussain NN and Aljibouri AM. 2014. Phenotypic Characterization of Indigenous Iraqi *Sinorhizobium meliloti* Isolates for Abiotic Stress Performance. *J Life Sci*, **8**(1): 1-9.

- Jebara M, Aouani ME, Mhamdi R, Ghir R and Mars M. 2000. Effet du sel sur des isolats de *Sinorhizobium* sp. de Tunisie *in vitro* ou en association avec *Medicago* sp. *Cah Agric*, **9**: 99-102.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, **16**: 111-120.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P and Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, **147**: 981-993.
- Latrach L, Mouradi M, Farissi M, Bouzigaren A and Ghoulam C. 2017. Physiological characterization of rhizobial strains nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) isolated from soils of Southeastern Morocco. *Appl J Envir Eng Sci*, **3**(4):353-364.
- Martens M, Delaere M, Coopman R, De Vos P, Gillis M and Willems A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**: 489-503.
- Massimi M, Haseeb M, Kanga L and Legaspi J. 2017. Enhancement of silage sorghum and corn production using best management practices. In: Proceeding, Association of 1890 Research Directors Symposium, Georgia, Atlanta, United States of America.
- McManus MC. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health-Syst Pharm*, **54**: 1420-1433.
- Merabet C, Bekki A, Benrabah N, Baba-Hamed Bey M, Bouchentouf L, Ameziane H, Rezki MA, Domergue O, Cleyet-Marel JC, Avarre JC, Béna G, Bailly X and De Lajudie P. 2006. Distribution of *Medicago* species and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Res Manag*, **20**: 219-231.
- Mohammad R, Akhavan-Kharazian M, Campbell W and Rumbaugh M. 1991. Identification of salt-and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant Soil*, **134**: 271-276.
- Mouradi M, Bouzigaren A, Farissi M, Latrach L, Qaddoury A and Ghoulam C. 2016. Seed osmopriming improves plant growth, nodulation, chlorophyll fluorescence and nutrient uptake in alfalfa (*Medicago sativa* L.) rhizobia symbiosis under drought stress. *Sci Hortic*, **213**: 232-242.
- Niste M, Vidican R, Rotar I and Pop R. 2015. The Effect of temperature stress on *Rhizobium trifolii* and *Sinorhizobium meliloti* strains *in vitro*. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj Napoca*, **72**(1): 297-298.
- OSS. 2003. **Système aquifère du Sahara septentrional: gestion commune d'un bassin transfrontière**. Rapport de synthèse, Observatoire du Sahara et du Sahel, Tunisie.
- Rodrigues CS, Laranjo M and Oliveira S. 2006. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. *Curr Microbiol*, **53**: 1-7.
- Rogel MA, Ormeno-Orrillo E and Romero EM. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol*, **34**: 96-104.
- Rome S, Fernandez MP, Brunel B, Normand P and Cleyet-Marel JC. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Evol Microbiol*, **46**: 972-980.
- Sarita S, Sharma PK, Priefer UB and Prell J. 2005. Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol Ecol*, **54**: 1-11.
- Shetta N, Al-Shaharani T and Abdel-Aal M. 2011. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, **10**: 410-418.
- Somasegaran P and Hoben HJ. 1985. **Methods in legume-Rhizobium technology**. University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy And Soil Science Hawaii Institute Tropical Agriculture Human research.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ ... and Whitman WB. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**: 1043-1047.
- Tabares-da Rosa S, Signorelli S, Del Papa M, Sabatini O, Reyno R, Lattanzi F, Rebuffo M, Sanjuan J and Monza Galetti J. 2019. *Rhizobium* inoculants for alfalfa in acid soils. *Agrocienc Urug*, **23**(2): 1-13.
- Talebi MB, Bahar M, Saeidi G, Mengoni A and Bazzicalupo M. 2008. Diversity of *Sinorhizobium* strains nodulating *Medicago sativa* from different Iranian regions. *FEMS Microbiol Lett*, **288**: 40-46.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, **30**: 2725-2729.
- Thami-Alami I, Elbouthhiri N and Udupa S. 2010. Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *Options Mediterr, Série A. Séminaires Méditerranéens*, **92**: 265-269.
- Toularoud AS, Asersec AA, Alikhanian HA, Jouzanid GRS, Rahmanid HA, Khavazid K, Räsänene LA and Lindström K. 2016. Taxonomic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial strains obtained from nodules of *Medicago sativa* growing in Iran. *Ann Biol Res*, **7**: 29-38.
- Turner SL and Young JPW. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, **17**: 309-319.
- Villegas MDC, Rome S, Mauré L, Domergue O, Gardan L, Bailly X, Cleyet-Marel JC and Brunel B. 2006. Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar *medicaginis* of *S. meliloti*. *Syst Appl Microbiol*, **29**: 526-538.
- Vincent JM. 1970. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. Blackwell Science Ltd., UK.
- Vinuesa P, Silva C, Werner D and Martínez-Romero E. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenetics Evol* **34**: 29-54.
- Wei GH, Wang ET, Tan ZY, Zhu ME and Chen WX. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**: 2231-2239.
- Wei W, Jiang J, Li X, Wang L and Yang S. 2004. Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance. *Lett Appl Microbiol*, **39**: 278-283.
- Zahrán HH. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**: 968-989.
- Zakhia F and De Lajudie P. 2006. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses BNL. *Can J Microbiol*, **52**: 169-181
- Zhang F and Smith DL. 1996. Inoculation of soybean *Glycine max*.L. Merr. with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant Soil*, **179**: 233-241.
- Zhang WJ and Wang T. 2015. Enhanced salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) by *rstB* gene transformation. *Plant Sci*, **234**: 110-118.



# Improvement of *Medicago sativa* Crops Productivity by the Co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*–Actinobacteria Under Salt Stress

Samira Saidi<sup>1</sup> · Hafsa Cherif-Silini<sup>1</sup> · Ali Chenari Bouket<sup>2</sup> · Allaoua Silini<sup>1</sup> · Manal Eshelli<sup>3</sup> · Lenka Luptakova<sup>4</sup> · Faizah N. Alenezi<sup>5</sup> · Lassaad Belbahri<sup>6,7</sup> 

Received: 25 August 2020 / Accepted: 7 February 2021 / Published online: 1 March 2021  
© The Author(s) 2021

## Abstract

Biotic and abiotic stresses are severely limiting plant production and productivity. Of notable importance is salt stress that not only limits plant growth and survival, but affects the soil fertility and threatens agricultural ecosystems sustainability. The problem is exacerbated in fragile arid and semi-arid areas where high evaporation, low precipitation and the use of salty water for irrigation is accelerating soil salinization. Legumes, considered very nutritious foods for people and providing essential nutrients for ecosystems are a fundamental element of sustainable agriculture. They can restore soil health by their ability to fix nitrogen in a symbiotic interaction with the rhizobia of the soil. However, salt stress is severely limiting productivity and nitrogen fixation ability in legumes. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and mainly actinobacteria promote plant growth by producing phytohormones, siderophores, antibiotics and antifungal compounds, solubilizing phosphate and providing antagonism to phytopathogenic microorganisms. In addition, actinobacteria have beneficial effects on nodulation and growth of legumes. In this study, actinobacteria isolated from different niches and having PGP activities were used in co-inoculation experiments with rhizobia in *Medicago sativa* plants rhizosphere submitted to salt stress. The results indicate that drought- and salinity-tolerant Actinobacteria with multiple PGP traits can potentially increase alfalfa growth under saline conditions, in the presence or absence of symbiotic rhizobial bacteria. Actinobacteria discovered in this study can, therefore, be suitable biofertilizers in the formulation of agricultural products improving plant development, health and productivity in saline soils, a necessary alternative for modern agriculture and sustainable development.

□ Lassaad Belbahri  
lassaad.belbahri@unine.ch

- <sup>1</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas Setif, Sétif, Algeria
- <sup>2</sup> Plant Protection Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran
- <sup>3</sup> Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, University of Tripoli, Tripoli, Libya
- <sup>4</sup> Department of Biology and Genetics, Institute of Biology, Zoology and Radiobiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kosice, Slovakia
- <sup>5</sup> Department of Environmental Technology Management, College of Life Sciences, Kuwait University, Safat, Kuwait
- <sup>6</sup> NextBiotech, 98 Rue Ali Belhouane, Agareb, Tunisia
- <sup>7</sup> Laboratory of Soil Biology, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland

## Introduction

Adverse conditions due to biotic and abiotic stresses are the main factors limiting agricultural production and productivity [1–4]. Salinity is a major factor affecting soil fertility and limiting the growth and survival of plants in various parts of the world, particularly in arid and semi-arid areas where high evaporation and low precipitation make irrigation necessary to meet plant water needs [5]. About one-third of irrigated land is affected by salinity [4], mainly because of high temperatures, lack of fresh water and/or poor quality, salt-rich irrigation water [3] and poor management of irrigation [6]. Thus, salt accumulation in soils and groundwater has threatened productivity and soil sustainability [7] and the adverse effect of salinity on plant growth is well established [3]. Plant responses to NaCl stress include a series of changes at the molecular, biochemical and physiological levels, causing a disturbance of the homeostasis and the distribution of ions in the cell and denaturation of structural and

functional proteins [4, 8]. Plants often face rapid fluctuations and adversity of environmental conditions due to their intrinsic metabolic abilities [9]. Plants also have the potential to reduce the impact of environmental stresses through the microbiome they harbour [4, 10]. The microbiota provides plants fundamental support for nutrient acquisition, disease resistance and abiotic stress tolerance [4, 11]. Its interaction with plants evokes various types of local and systemic responses that improve the metabolic capacity of plants to fight abiotic stresses [4, 10–12].

Legumes are a fundamental element of sustainable agriculture and can offer many economic and environmental benefits. They are very nutritious foods for people and essential nutrients for ecosystems [4]. The integration of legumes into agricultural techniques, such as intercropping, cover crops and crop rotation can restore soil health by their ability to fix nitrogen in a symbiotic interaction with the rhizobia of the soil. Based on their ability to grow on soils low in nitrogen, they can be used effectively to improve saline soil fertility and contribute to the reintroduction of agriculture on these lands [13]. In this line, *Sinorhizobium meliloti* (strain 1021) and its symbiotic interaction with *Medicago sativa* is a widely recognized model system for studies of symbiosis and nitrogen fixation. However, salt stress imposes a significant limitation of productivity in legumes. Salinity affects the infection process by inhibiting the growth of absorbent hairs, by decreasing the number of nodules per plant and the amount of nitrogen fixed per unit weight of nodules. Thus, in saline soils, legume yield is reduced due to unsuccessful symbiosis [14].

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are a group of rhizosphere-colonizing bacteria that enhance plant growth, increase yield, improve soil fertility and reduce pathogens and biotic or abiotic stresses. PGPRs help plants by producing growth phytohormones, solubilizing phosphate and by providing antagonism to phytopathogenic microorganisms by producing siderophores, antibiotics and antifungal compounds [4, 10–12]. Actinobacteria are widely present in the rhizosphere of plants and produce various agro-active compounds. In the recent years, this group of bacteria, based on its high antimicrobial potential and its dominant saprophytic nature in the soil, has attracted much attention [15]. Actinobacteria promote plant growth by producing phytohormones (Indole Acetic Acid; IAA), siderophores and solubilizing phosphate. Some genera, such *Streptomyces* exert an immense biocontrol effect on various phytopathogens [14]. By these intrinsic abilities, they colonize successfully plants root systems by releasing many hydrolytic enzymes and can survive in hostile conditions by forming spores. Actinobacteria have long been considered as free-living soil inhabitants, but recently the importance of their complex interactions with plants and other organisms is being discovered and widely documented [16].

Actinobacteria have beneficial effects on nodulation and growth of legumes. Tokala et al. [17] found that the soil isolates *Streptomyces lydicus* WYEC108 increased the number of nodules, height and weight of pea (*Pisum sativum* L.) plants. Similarly, co-inoculation of soybean with *Streptomyces* sp. [18] or *Nocardia* sp. [19] and *Bradyrhizobium japonicum* improved the growth of soybean plants. Specific studies on alfalfa have shown growth enhancement associated with an application of *Micromonospora* spp. [20] alone or in co-inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. Solans et al. [21] found that actinobacteria other than *Frankia* isolated on the surface of the root nodules of *Discaria trinervis* improved the nodulation of alfalfa in the presence of high levels of nitrogen in the soil which usually inhibit nodulation. A comparative study of total bacterial profiles in soil with those specific for actinobacteria indicates an abundance of actinobacteria in the rhizosphere of legumes [22]. Subsequent studies have shown the beneficial effects of these isolates on legume growth and generated interest in their potential use as co-inoculants with rhizobia in legume crops [22].

Our primary results documented that multiple PGP traits of the salinity-tolerant actinobacteria, can increase alfalfa growth under saline conditions, in the presence or absence of symbiotic rhizobial bacteria. This finding highlights their possible use as biofertilizers for improvement of plant development, health and productivity in saline soils [23]. Therefore, this study aimed to enhance the colonization of the rhizosphere of *Medicago sativa* host plant by strains of *Sinorhizobium meliloti* under salt stress after co-inoculation with symbiotic and non-symbiotic actinobacteria isolated from different niches and having PGP activities. The Actinobacterial effect is checked through successful establishment of nitrogen-fixing symbiosis, particularly the formation of nodules and by the morphological and biochemical variations of the host plant.

## Materials and Methods

### Rhizobial Strains

Rhizobial strains *Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) and *S. meliloti* 2011(R2) have been obtained from Prof. Eric Boncompagni (University of Nice Sophia Antipolis, France) [24] and used in this study. Rhizobial strains have been cultured on mannitol yeast extract agar media and incubated for optimal growth at  $28 \pm 2$  °C for 48 h. For storage, cultures have been stored at 4 °C on agar media until subsequent use (Table 1) [25].

**Table 1** Origin and isolation details of actinobacterial and rhizobial strains used in the study

Bacterial group	Code	Isolation method	Type of samples	Number of selected isolates/total isolates	Geographical Location details
Actinobacteria group	MS1	ISP2 medium (28 ± 2 °C/ from 2 to 15 days) [25]	Sand	4/20	Melghir Sebkhya of Biskra region (34° 17' 56.6" N 6° 21' 54.56" E) Saline and arid area EC = 54.2 ± 2.7 mS/cm, pH 7.56 ± 0.35
	MS2				
MS3					
MS4					
	Ag1	BAP medium (28 ± 2 °C/ from 7 to 30 days) Re-streaked on ISP2 medium [25]	Nodules of <i>Alnus glutinosa</i>	1/13	Guerbes Senhadja of Skikda region (36° 55' N 7° 16' E) Humid area
Rhizobia group	R1	YEM medium (28 ± 2 °C/ 2 days)	Symbiont of Alfalfa	2	–
	R2				

### Sand Sampling

Five samples of sands were obtained from two geographically distinct locations. The sand of “Melghir Sebkhya” located in South East Biskra region [34° 17' 56.6" N 6° 21' 54.56" E. pH 7.56 ± 0.35, electrical conductivity (EC) = 54.2 ± 2.7 mS/cm] representing saline and arid area and the nodules of *Alnus glutinosa* which grow in the humid area in front of Guerbes Senhadja river of Skikda region (36° 55' N 7° 16' E). No permission was required to collect such samples of sands.

### Isolation and Cultivation of Actinobacteria Strains

Two methods were used for bacterial isolation; firstly, the bacteria were isolated from the sand of “Melghir Sebkhya”. The bacterial isolation was performed by homogenizing 10 g of sand in 90 mL of sterile physiological water and vigorous shaking for 1 h. The resulting supernatant was diluted in tenfold series (10<sup>-1</sup> to 10<sup>-5</sup>) and plated out on two different media, International *Streptomyces* Program 2 ISP2 medium and Luedemann medium [25] supplemented with cycloheximide (50 µg/mL). Plates were then incubated at 28 ± 2 °C for 2 weeks. Growing colonies with different morphologies were re-streaked on new Petri dishes until obtaining pure bacterial cultures. Twenty colonies have been collected and tested for their PGP activities. Based on the PGP activities of the bacterial collection 4 strains designated MS1, MS2, MS3 and MS4 were selected for further characterization and plant inoculation studies (Table 1).

The second bacterial isolation was from the second sample, the nodules of *Alnus glutinosa* were harvested from plant roots after the removal of rhizosphere soil, washed in sterile distilled water, surface-sterilized by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% vol/vol) immersion for 10 min and rinsed with sterile distilled water. Each lobe of nodules was incubated in 5 mL of BAP

medium and incubated at 28 ± 2 °C for several weeks with daily removal of culture tubes contaminated with fast-growing bacteria [25]. Thirteen bacterial cultures were obtained and re-streaked on ISP2 agar medium for further growth at 28 ± 2 °C for 2 weeks. All bacterial cultures were screened for their PGP activities and strain Ag-1 selected for subsequent characterization and plant inoculation experiments (Table 1). All isolates were maintained on plates for short-term storage and in medium supplemented with 30% glycerol at -80 °C for long-term storage.

### Identification of Actinobacteria by 16S-rRNA Gene Amplification, Sequencing and Phylogenetic Analysis

Bacterial genomic DNA was extracted by a CTAB-SDS lysis protocol [1]. PCR amplification of the 16S-rRNA gene was performed using the universal primers 27 F (5'-AGA GTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1496R (5'-CTACGG CTACCTTGTTACGA-3') [26]. PCR mixture, amplification conditions and PCR products sequencing were conducted according to Prospero et al. [2]. Partial 16S-rRNA sequences of the isolates were compared with available sequences in the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) by BLAST search. Actinobacterial 16S-rDNA sequence alignment and phylogenetic analysis were performed using standard procedures detailed in Mlaik et al. [26].

### Biochemical Characterization

Bacterial strains phenotypic screening was performed using different carbon sources and evaluated using standard methods. Degradation of sugars and amino acids used in the time course of the study was evaluated on minimal salt medium [10, 11]. To detect putative extracellular enzymes production

of selected isolates, 10  $\mu$ L of each bacterial suspension culture was plated in specific media. Amylase production was performed on starch media, protease production was performed on skim milk media, chitinase was checked on colloidal chitin agar and cellulase production was evaluated on CMC agar [10–12]. After incubation at  $28 \pm 2$  °C for 7 days, positive isolates (after adding revealing reagent) were identified by the presence of a clear zone halo around bacterial colonies suggesting enzyme production by the bacterial isolate. Three replicates were performed per experiment.

### Stress Tolerance Studies

Several conditions were used to optimize the growth contention for the bacteria strains used in the current study. First, the ability of bacterial strains to tolerate salt stress, hydric stress and different pH values was performed on ISP2 broth for actinobacteria and YEM broth for rhizobia, supplemented with NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 mM), PEG<sub>8000</sub> (10, 20, 40 and 60%) and having different pH values (4, 7, 9 and 11), respectively. The media were inoculated with 100  $\mu$ L of bacterial cultures and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 7 days. Bacterial growth was then determined by measuring the optical density at 600 nm using a spectrophotometer (Spectronic Genesys 20 Visible Spectrophotometer, Setif, Algeria) and plating on solid media with similar results.

The ability of the strains to tolerate different temperatures was performed by incubating the bacterial cultures at 4, 30, 37, 45 and 55 °C for 7 days and optical density measurement at 600 nm using a spectrophotometer (Spectronic Genesys 20, Setif, Algeria). Minimum of three replicates were performed per experiment.

### PGP Activities of Actinobacterial Strains

#### Growth on Nitrogen-Free Medium

Molecular nitrogen fixation was tested by the ability of the bacterial strains to grow on nitrogen-free medium, the DF salt minimal medium [12].

#### Ammonia (NH<sub>3</sub>) and Hydrogen Cyanide (HCN) Production

Ammonia production was revealed by the addition of Nessler's reagent (0.5 mL) giving a yellow-to-brown colour of peptone water inoculated by bacterial cultures and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 7 days [12].

The production of hydrogen cyanide (HCN) was performed on nutrient agar supplemented with glycine (4.4 g/L) [12]. The medium was inoculated with the bacterial strains. Whatman paper impregnated with a solution of sodium picrate (5% picric acid and 2% sodium carbonate) was placed

inside the lid of the plates and then sealed with parafilm and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 7 days. The development of an orange-brown colour on Whatman paper indicated hydrogen cyanide production.

### Phosphate Solubilization

The phosphate solubilization ability was tested on Pikovskaya (PVK) medium containing tricalcium phosphate (Ca<sub>3</sub>HPO<sub>4</sub>) as the sole source of phosphate. A volume of 10  $\mu$ L bacterial culture was spotted on the surface of the PVK agar as described by [11]. After incubation at  $28 \pm 2$  °C for 7 days, the diameter of the clear halo around the colony was measured and used to estimate bacterial ability for phosphate solubilization.

### Siderophores Production

Siderophore production was tested in Chrome Azurol S (CAS) medium according to [10]. The actinobacterial inoculated King B liquid medium was incubated at  $28 \pm 2$  °C for 72 h and the resulting cultures were centrifuged at 5000 rpm for 30 min. 500  $\mu$ L of the supernatant was then mixed with 500  $\mu$ L CAS solution and OD measured at 630 nm after 20 min of incubation. The percentage of siderophores was evaluated using the following formula:  $S_t - S_0 / S_t \times 100$ , where  $S_t$  was the OD of the CAS solution (intense blue colour, control) and  $S_0$  was the OD of the test solution (light blue to orange colour depending on the intensity of production).

### Indole Acetic Acid (IAA) Production

The production of indole acetic acid (IAA) was tested on Dworkin and Foster (DF) medium supplemented with 1 g/L tryptophan according to Slama et al. [10]. The cultures were then incubated at  $28 \pm 2$  °C for 7 days and a colourimetric assay was performed using the method detailed in Slama et al. [10]. Briefly, the cultures were centrifuged at 5000 rpm for 20 min and 1 mL of supernatant was mixed with 2 mL Salkowski reagent (50 mL perchloric acid and 1 mL 35% FeCl<sub>3</sub> 0.5 M). The OD was measured at 530 nm. Concentrations of IAA were determined using a calibration curve prepared from an IAA solution in the range 0 to  $10^{-5}$  M.

## Effects of Bacterial Inoculation and Co-inoculation Experiments on the Nodulation of *Medicago sativa*

### L. Plants

#### Plant Materials

*Medicago sativa* L. seeds were obtained from the "Institut Technique des Grandes Cultures" (I.T.G.C.) of the city of Setif, Algeria. Alfalfa seeds were surface sterilized using

successive incubations in ethanol 70% for 30 s, 4% sodium hypochlorite for 3 min followed by 4 successive washings by sterile distilled water [4]. Surface sterilized seeds were then germinated in dark, in Petri dishes amended with 0.8% water agar solution and incubated at 28 °C for 48 h.

### Bacterial Inocula Preparation

Actinobacterial and rhizobial strains were grown on liquid ISP2 and YEM media as previously described and incubated at  $28 \pm 2$  °C for 2 to 7 days. Bacterial cultures densities were then calibrated at  $10^8$  cells/mL using a specific correlation between OD and bacterial count in the medium [4].

### Bacterial Inoculations and Co-inoculations and Plant Growth Conditions

Surface sterilized alfalfa seeds were sown in sterilized internal surface plastic pots (by several washes using ethanol 70%). Pots were then filled with equal quantities of sand that was previously thoroughly washed with sterilized distilled water and autoclaved (121 °C for 1 h during three cycles separated by 24 h). Surface sterilized seeds were sown aseptically at 1 cm depth at a density of three seeds per pot. After 1 week, alfalfa plants were inoculated with 1 mL of each isolate bacterial suspension taken during the exponential growth phase and calibrated at  $10^8$  cells/mL [4]. Inoculation and co-inoculations were performed using rhizobial strains R1 and R2 and actinobacterial strains MS1-4 and Ag1 alone or by joint inoculation with one rhizobial and each actinobacterial selected strains (Table 2). Pots were then placed in a growth chamber with 16 h day/8 h night photoperiod and 26/18 °C day/night temperature. Pots were watered twice weekly with a nitrogen-depleted nutritive solution. The experiment had been repeated six times and after 2 months of culture alfalfa plantlets were collected and the presence of nodules recorded.

**Table 2** Different treatments used in the experiment

Treatment	Bacterial strains
C–	Non-inoculation (negative control)
C+	Non-inoculation with addition of KNO <sub>3</sub> (0.5 M) (Positive control)
R1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
R1+MS	R1+MS1, R1+MS2, R1+Ag1, R1+MS3, R1+MS4
R2	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
R2+MS	R2+MS1, R2+MS2, R2+Ag1, R2+MS3, R2+MS4

### Bacterial Inoculations and Co-inoculations and Plant Growth Conditions Under Salt Stress

Based on the results obtained in the “Bacterial inoculations and co-inoculations and plant growth conditions” section experiments, three actinobacterial strains MS1-3 having induced nodulation had been selected to evaluate their efficiency in co-inoculation experiments with rhizobial strains under salt stress. Experiments had been conducted as previously described in the section “Bacterial inoculations and co-inoculations and plant growth conditions” except that plants had been grown with and without salt stress. The experimental set-up was explained in Table 3. Briefly, after 1 week of alfalfa plant growth, bacterial inoculation and co-inoculations had been performed using 1 mL of bacterial suspensions of each isolate at a density of  $10^8$  cells/mL. Inoculations and co-inoculations had been repeated three times during 3 weeks and the pots were watered two times a week with a nitrogen depleted nutritive solution. Two weeks post-inoculation and co-inoculation pots of the second group (100 mM NaCl) were watered with the 100 mM saline solution once a week during 1 month (4 times).

### Monitoring of Morphological Parameters

After 2 months of culture, alfalfa plantlets were collected and their growth evaluated by estimation of root and shoot fresh weight (g), plantlet aerial part height (cm), root length (cm), leaves and nodules numbers.

### Estimation of Photosynthetic Chlorophyll Content

Photosynthetic chlorophyll contents have been determined using the procedure described by Rekek et al. [3]. Briefly, 0.5 g of leaf material of each sample were cut in 1 mm<sup>2</sup> pieces and homogenised in 10 mL 80% acetone and incubated at –10 °C overnight. Extract was then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min and optical density of the supernatant estimated at 663, 645 and 470 mM. Chlorophyll

**Table 3** Different treatments used in NaCl stress experiment

Treatment without NaCl	Treatment with 100 mM NaCl	Bacterial strains
C–	C–	Non-inoculation (negative control)
C+	C+	Non-inoculation with addition of KNO <sub>3</sub> (0.5 M) (positive control)
R1	R1	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R1)
R1+MS	R1+MS	R1+MS1, R1+MS2, R1+Ag1
R2	R2	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R2)
R2+MS	R2+MS	R2+MS1, R2+MS2, R2+Ag1
MS	MS	MS1, MS2, Ag1

a ( $Ch_a$ ), b ( $Ch_b$ ) and total chlorophyll a and b contents ( $Ch_{a+b}$ ) and carotenoids expressed in mg/g were evaluated according to the following equations:

$$Ch_a(\text{mg/g}) = 12.41 OD_{(663)} - 2.59 OD_{(645)}$$

$$Ch_b(\text{mg/g}) = 22.9 OD_{(645)} - 4.68 OD_{(663)}$$

$$Ch_{a+b} = CH_a + CH_b$$

Carotenoids (mg/g)

$$= \frac{1000 \times OD_{(470)} - 1.82 Ch_a - 85.02 Ch_b}{198}$$

### Soluble Amino Acids and Proline Content

Amino acids and proline extraction procedures have been detailed in Cherif-Silini et al. [4]. Briefly, 0.5 g plantlet fresh material was harvested in 5 mL methanol:chloroform:water solution 60:25:15 respectively. The samples were then heated in a water bath at 60 °C for 2 h and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was then used to estimate soluble amino acids and proline contents.

For soluble amino acids content, 1 mL of supernatant was added to 1 mL of acetate buffer (pH 4.3) and 1 mL of ninhydrin solution (5% in ethanol). Samples were then vigorously shaken and heated in a water bath at 95 °C for 15 min. OD was then measured at 570 nm and concentration of soluble amino acids obtained using glycine as standard.

Free proline content had been measured according to Cherif-Silini et al. [4]. Briefly, 1 mL of the supernatant described earlier had been added to 4 mL of ninhydrin solution (5% in ethanol), 4 mL of glacial acetic acid and 1 mL of sterile distilled water. The mixture was then heated in a water bath at 90 °C for 45 min and left to settle and reach room temperature. Then, 4 mL toluene had been added to the mixture and OD of the organic phase estimated at 520 nm. Free proline concentration was determined using a calibration curve with known amounts of free proline added.

### Statistical Analysis

All the experiments were performed in triplicate, the results expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) The statistical analysis of the data was conducted using GraphPad prism 8, one-way- and two-way ANOVA was used to identify the variance between different treatments. The results were

considered significant when  $P$  values were less than 0.05. post hoc Tukey's HSD test comparison tests were conducted when a significant difference was encountered.

### GenBank Accession Numbers

GenBank accession numbers of the bacteria isolates MS-1, MS-2, Ag-1, MS-3 and MS-4 are MK894856, MK894855, MN420819, MN005930 and MK894857, respectively.

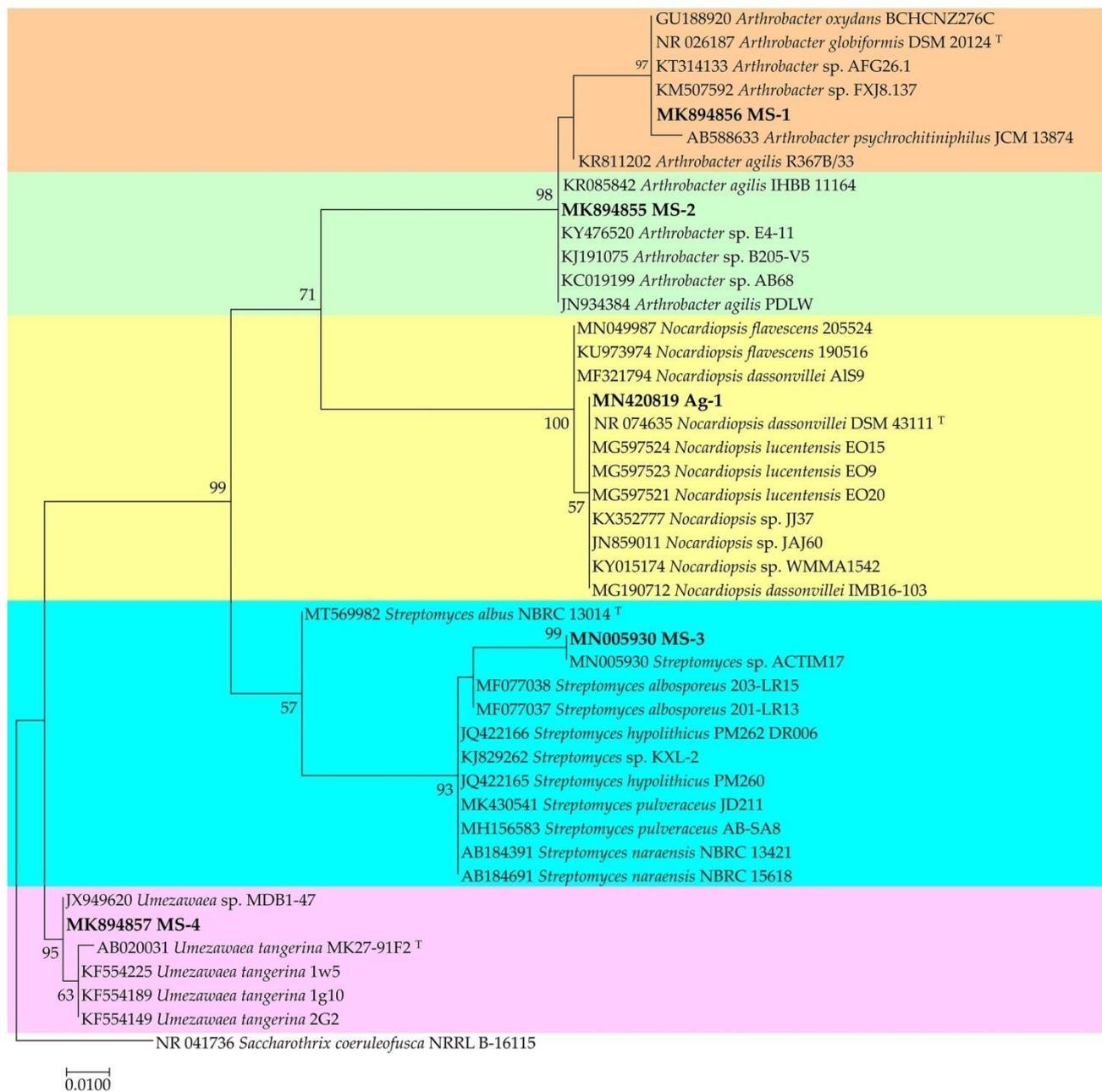
## Results

### Isolation, Morphological and Molecular Characterization of Rhizobial and Actinobacterial Strains

Growth of rhizobial strains *S. meliloti* R1 and R2 on yeast mannitol agar (YEM) at 28 °C for 48 h revealed small colonies (1 mm in diameter) of rod-shaped cells. Actinobacterial strains selected cultured on ISP2 media at 28 °C after 2 to 7 days of culture showed smooth colonies having an orange- and red-coloured non-diffusible pigments for MS1 and MS-2, respectively. However, colonies of Ag1, MS3 and MS4 had rough aspects and presented aerial mycelia and a white or grey coloured substrate mycelium. The morphological microscopy of these strains was additionally filamentous (Fig. S1). Majority of the rhizobial and actinobacterial strains catabolized numerous carbon sources and produced different enzymes, such as amylase, protease, chitinase and cellulose (Table S1). 16S-rDNA phylogenetic analysis unambiguously documented that MS1 and MS2, MS3 and MS4 had a homology with the genera *Arthrobacter*, *Streptomyces* and *Umezawaea*, respectively, while Ag-1 lied within the genus *Nocardiopsis* see (Fig. 1).

### Physiological Characterization of Rhizobial and Actinobacterial Strains

In this study, we had optimised the condition for the bacterial strains, the effect of initial pH and temperature were studied to identify the optimum condition for these bacteria. All strains had been characterized at the physiological level and results were presented in Fig. 2a. Actinobacteria strains were able to grow at pH 7, and can tolerate the extreme pH values. Except MS2 and MS3 were able to tolerate pH values of 9 (Fig. 2a). Among all strains tested for tolerance to different concentrations of PEG rhizobial strains were sensitive to hydric stress. *S. meliloti* R1 could not grow beyond a 10% PEG concentration compared to *S. meliloti* R2 strain that could tolerate up to 20% PEG. Actinobacteria on the other hand seemed more adapted to hydric stress mirrored by their ability to grow at high PEG concentrations. MS2 and MS3 for example tolerated up to 60%



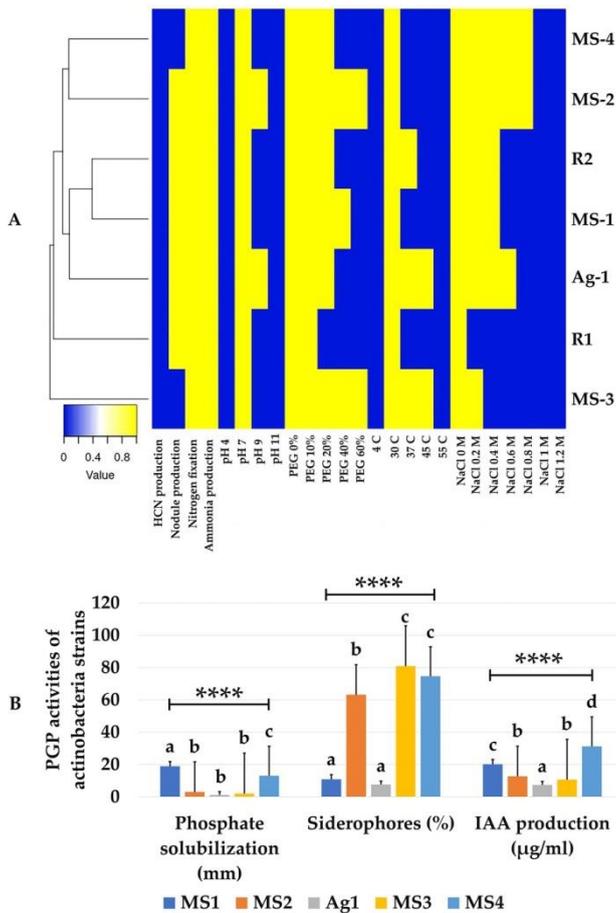
**Fig. 1** Maximum likelihood phylogenetic tree of actinobacterial strains (Ag1, MS1, MS2, MS3 and MS4). The tree was rooted to *Saccharothrix coeruleofusca* NRRL B-16115. Bar, the number of expected changes per site. *T* refers to type strains

PEG concentrations (Fig. 2a). All examined rhizobacterial and actinobacterial strains were sensitive to extreme temperatures (4 and 55 °C). Optimal growth temperature for all actinobacterial strains was around 30 °C with strains Ag1 and MS3 was able to grow up to 45 °C (Fig. 2a). Growth of the strains at salt concentrations ranging from 0 to 1200 mM revealed a good ability of MS2 and MS4 to tolerate up to 800 mM salt in the culture medium. NaCl sensitivity was noticed for *S. meliloti* R1 that did not tolerate salt at any of the salt tested

concentrations. *S. meliloti* R2 and MS1, however, were able to grow up to 400 mM salt concentrations. MS3 was also able to tolerate up to 200 mM salt (Fig. 2a).

### PGP Activities of Rhizobial and Actinobacterial Strains

All selected actinobacterial strains produced ammonia and efficiently fixed nitrogen, however, none of them was able



**Fig. 2** a PGP activities and stress tolerance of bacterial and actinobacterial strains used in the study. b PGP activities of actinobacterial strains. The data present mean  $\pm$  standard error. Bars labelled with different letters are significantly different among the treatments at  $P < 0.05$  using Tukey's HSD test

to produce HCN (Fig. 2a). Siderophore, IAA and phosphate solubilization were detected in all actinobacterial strains but to varying levels. IAA production varied from 7.3 to 31.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with strains MS1 and MS4 being the best producers with 20.15 and 31.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Siderophore production reached high levels of activity mainly for strains MS2, MS3 and MS4 producing 63.13, 80.9 and 74.62%, respectively (Fig. 2b). Phosphate solubilization was observed only for two strains MS1 and MS4 with halo diameters reaching 18 and 13 mm, respectively. All other strains had weak phosphate solubilization abilities (Fig. 2b).

### Morphological Parameters of Bacterial Plants Inoculation and Co-inoculation Experiments

Variance analysis of root and shoot length, root and shoot fresh weight and leaves and nodule numbers documented that bacterial inoculation was beneficial to alfalfa plants and that salinity

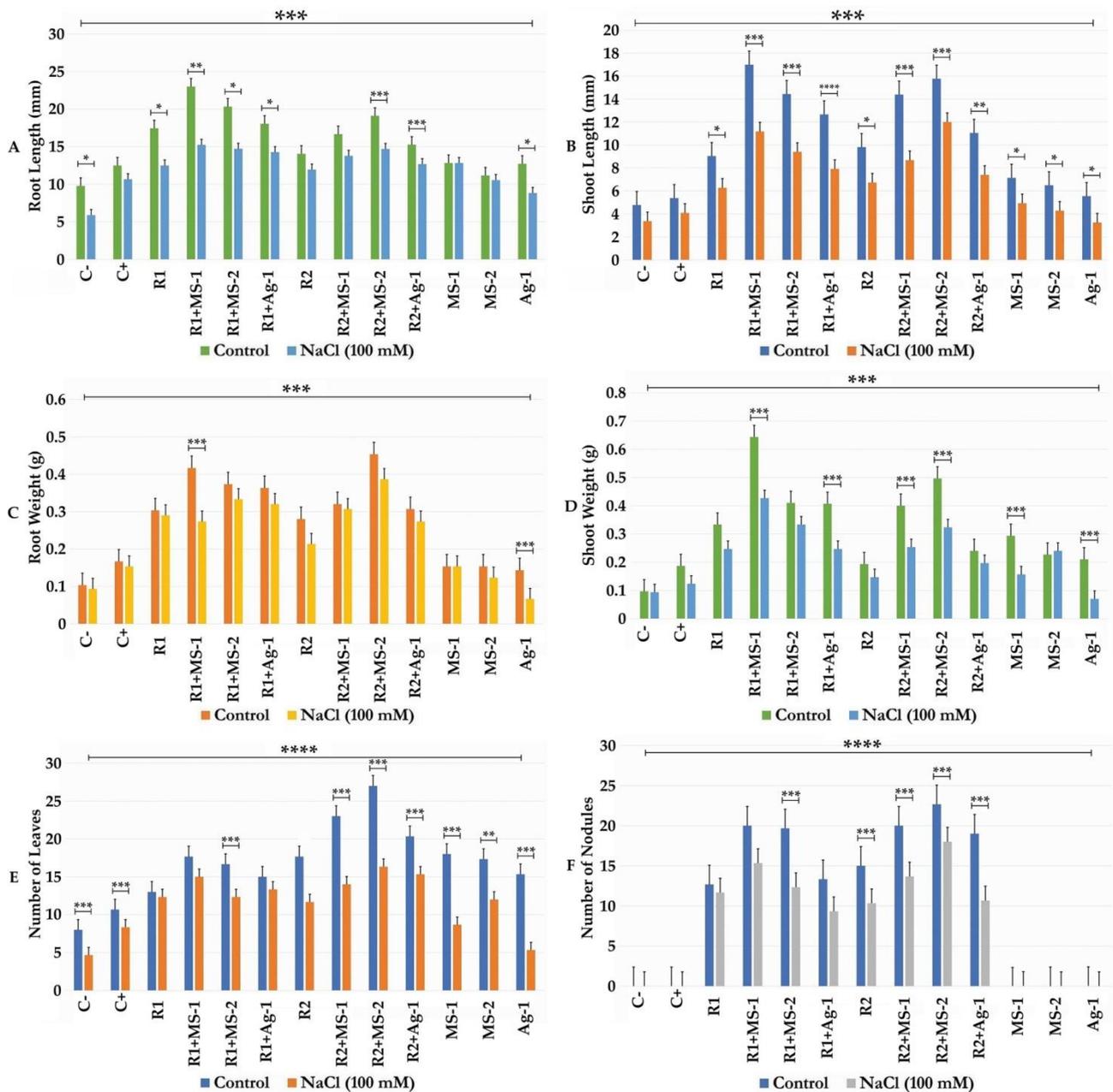
severely and significantly interfered with these growth parameters ( $P < 0.05$ ). In both inoculation and co-inoculation experiments with and without salt stress, morphological parameters of alfalfa plants inoculated with rhizobia alone or co-inoculated with actinobacteria showed a significant effect of co-inoculation of *S. meliloti* R1 and R2 strains with actinobacterial isolates MS1, MS2 and Ag1 (Fig. 3). Bacterial inoculation experiments and plant growth under salt stress results indicated that salinity affected the shoot part and the root length. However, the treatment with co-inoculation showed a significant increase  $P < 0.0001$  in the shoot (131–256%) and root length (56–135%) in comparison to the negative control. The optimum length was achieved in the inoculant by the plants *S. meliloti* R1 and R2 strains with actinobacterial isolates MS1, MS2 and Ag1 (Fig. 3a, b). Plant aerial parts and roots fresh weight were significantly improved in alfalfa plants co-inoculated with *S. meliloti* R1 and R2 strains. The actinobacterial strains MS1, MS2 and Ag1 showed a significant increase of 2 to 3 times the weight of shoots and roots in the absence and in the presence of salt stress as compared to the negative control (Fig. 3c, d). In addition, bacterial co-inoculation experiments improved the numbers of leaves and nodules. The plants co-inoculated showed a number of nodules increased by 61 and 51% for the strains R1 and R2, respectively as compared to the plants inoculated alone (Fig. 3e, f). In experimental conditions with NaCl stress, nodule number was significantly higher with R1 (36%) and R2 (80%) than control inoculations under NaCl stress (Fig. 3f). Nodulation ability of actinobacterial strains in co-inoculation experiments with *S. meliloti* R1 and R2, clearly documented that three strains MS1, MS2 and Ag1 were able to allow nodule formations on *Medicago sativa* roots (Fig. 3f).

### Biochemical Parameters of Bacterial Plants Inoculation and Co-inoculation Experiments

Chlorophyll a, b (Fig. 4a, b) and total chlorophyll (Fig. 4c) and carotenoid contents (Fig. 4d) were significantly improved in co-inoculated plants with and without NaCl stress. Proline accumulation and free amino acid levels in leaves of alfalfa plants co-inoculated with rhizobial and actinobacterial strains were significantly lower than control levels. These finding clearly illustrated that actinobacterial strains could mitigate salt stress that was reflected by lower levels of proline and free amino acids in leaves of inoculated and co-inoculated plants (Fig. 5a, b).

### Discussion

Biological nitrogen fixation plays a crucial role in improving soil productivity [27]. Therefore, nitrogen deficiency severely limits plant growth and productivity [5]. Rhizobium Legume Symbiosis is an economically sound nitrogen



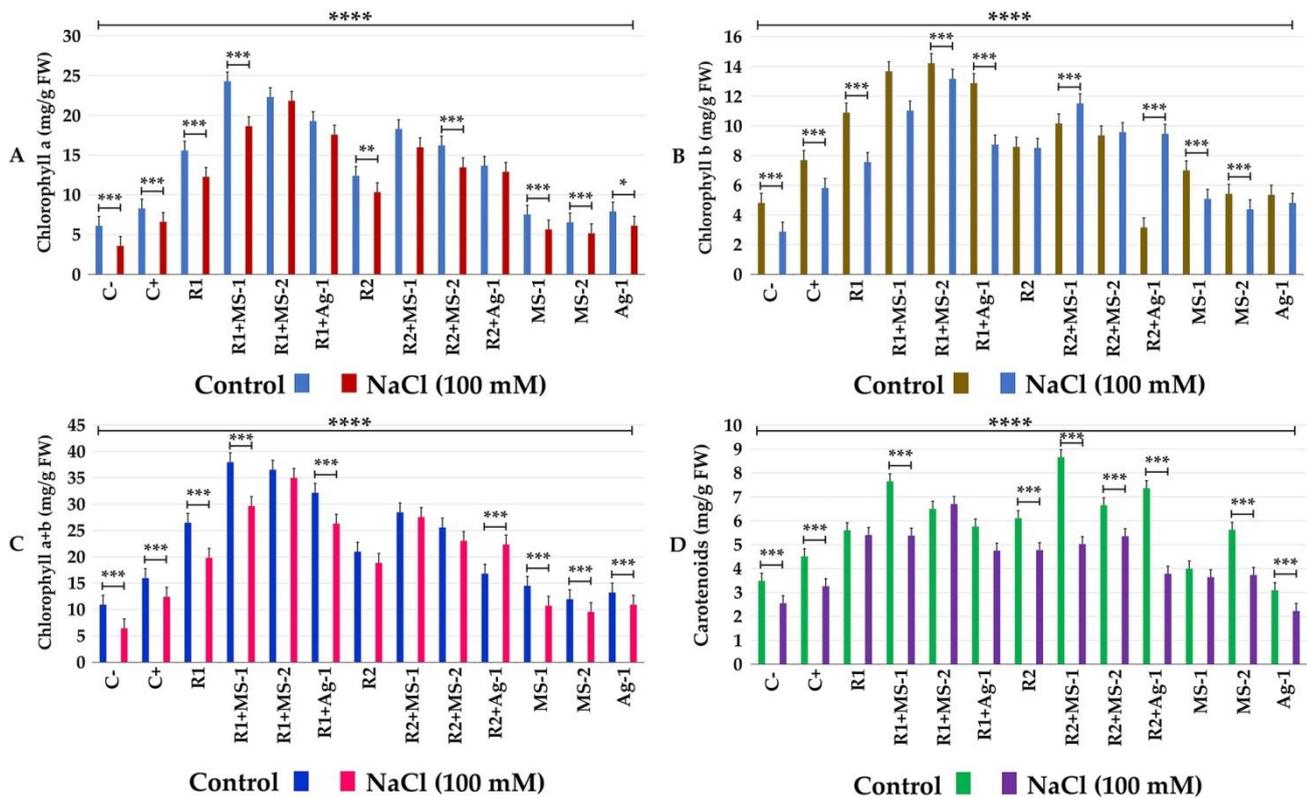
**Fig. 3** a, b Root length and shoot length (mm) of *Medicago sativa* against different treatments of rhizobacterial and actinobacterial strains and NaCl treatments. c, d Root weight and shoot weight (g) of *Medicago sativa* against different treatments of rhizobacterial and actinobacterial strains and NaCl treatments. e, f Number of leaves and

nodules of *Medicago sativa* against different treatments of rhizobacterial and actinobacterial strains and NaCl treatments. The data present mean  $\pm$  standard error. Bars labelled with asterisk are significantly different among the treatments at  $P < 0.05$  using ANOVA analysis

source providing necessary nitrogen amounts for efficient plant growth and development and an efficient sustainable agricultural practice as compared to external fertilizer supplies that are costly for the farmers and damaging to the environment [28, 29]. Unfortunately, numerous environmental factors limit nitrogen fixation affecting survival and rhizobia and the rate of infectivity [30, 31]. Recent trends

in the field aiming the development of stress-tolerant crops suggest the use of plant growth-promoting (PGP) bacteria as an efficient mean to improve biological nitrogen fixation [32].

In the current study, three selected bacterial strains affiliated to the Actinobacteria phylum were able to enhance nitrogen-fixing symbiosis between *S. meliloti* and the



**Fig. 4** a Chlorophyll a, b Chlorophyll b, c Chlorophyll a + b, d Carotenoids (mg/g FW) of *Medicago sativa* against different treatments of rhizobacterial and actinobacterial strains and NaCl treatments. The

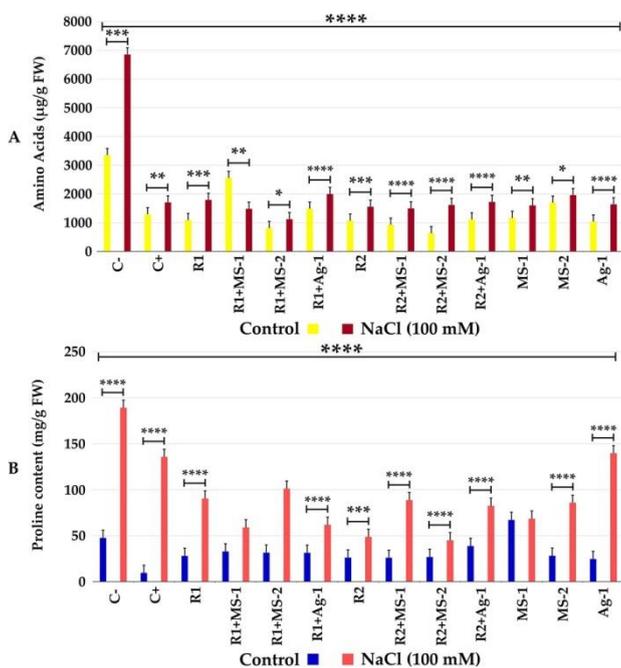
data present mean  $\pm$  standard error. Bars labelled with different letters are significantly different among the treatments at  $P < 0.05$  using Tukey's HSD test

legume *M. sativa*. The promotion of nitrogen-fixing symbiosis by actinobacteria has been widely documented [33]. Recent studies focus more on PGP potential of actinobacteria as compared to other bacteria, due to their relative abundance in the soil and their ability to produce a variety of metabolites. The selected strains showed these abilities, they can degrade various carbonaceous substances. These characteristics allowed not only to study their metabolic profile but also to understand their ability to compete and survive [34].

Also, it has been reported that a large part of their genome (~5–10%) is devoted to the production of secondary metabolites which help them to grow even in extreme conditions.

Actinobacteria are widespread in aquatic and terrestrial habitats, including extreme habitats and hyper-arid desert soils [13]. This was clearly shown by the tolerance of these strains to abiotic stress, particularly aridity and salinity. Given the origin of their isolation, some strains can tolerate salt concentrations up to 800 mM, an alkaline pH 9, a temperature of 45 °C and a PEG osmotic pressure of 60%. Soil characteristics play a prominent role in the microbial selection process. Bacteria isolated from extreme environments can survive inhibitory parameters compared to those isolated from non-stressful habitats [35].

It is well documented that Actinobacteria, like other PGPRs, employ direct and indirect mechanisms to boost crops growth and protection against diseases. In the present study, all our isolates produced IAA at variable rates. It is well documented that rhizospheric and endophytic actinobacteria can provide phytohormones to their plant hosts [16, 36]. IAA is the main phytohormone that boosts plant growth and development. IAA, besides being critical for nodule formation, have also been reported as essential trigger of cell proliferation and differentiation and formation of vascular bundles [37]. As previously reported in previous studies, the phosphate solubilization ability was also present in our isolates [38]. It is worth noticing that in the report of Fernandez et al. [39] phosphate solubilizing bacteria have favourable effects on soybean growth. This improved the nutrient supply of *Rhizobium* symbionts and subsequent nodules formation. Other PGP traits have been shown in the selected actinobacteria like siderophores production. The genus *Streptomyces* was well known for its characteristic siderophores types, such as desferrioxamine and coelichelin [40] that not only play a major role in plant nutrition, but also provided plant protection via phytopathogen control. The ability to fix nitrogen in these strains, revealed by strains



**Fig. 5** **a** Amino acids and **b** proline content ( $\mu\text{g/g}$  FW) of *Medicago sativa* against different treatments of rhizobacterial and actinobacterial strains and NaCl treatments. The data present mean  $\pm$  standard error. Bars labelled with different letters are significantly different among the treatments at  $P < 0.05$  using Tukey's HSD test

growth on nitrogen-free medium, has also been reported [41]. It has been documented that PGP actinobacteria can minimize and cope with the adverse effects of biotic and abiotic stresses [14, 42]. Numerous studies suggested that biotic abiotic stresses mitigation in plants by PGP actinobacteria is done through cell wall degrading enzymes (protease, cellulase, chitinase), secondary metabolite production, low molecular weight inhibitors substances (ammonia for example) and nutrients competition. Jog et al. [42] suggested that these modes of actions should be major properties of any effective fertilizer. In the present study, all selected strains showed multiple PGP traits, independently of their isolation origin. Except the Ag1 strain, all other strains were non-rhizospheric or endophytic bacteria and to our knowledge, this is the first study showing that this kind of bacteria can be used as a plant growth promoter.

Our results clearly showed the importance of actinobacterial inoculants in stimulating the growth of *M. sativa* plants. Improvement in nodulation and nitrogen fixation in alfalfa cultivars was related to the co-inoculation treatment. It was noted that plants co-inoculated with actinobacteria and *Sinorhizobium* had increased nodulation and plant growth compared to plants with single inoculation. Similar results have been previously reported by Gregor et al. [43] using *Streptomyces kanamyceticus* and *Bradyrhizobium japonicum* combination for inoculation of soybean. The authors

reported an increased nodulation (55%) and nitrogen composition (41%) of soybean stems. In another study Soe and Yamakawa [44] reported an improved nodulation, nitrogen fixation and seed yield of different soybean varieties after co-inoculation of *Bradyrhizobium yuanmingense* MAS34 and *Streptomyces griseoflavus* P4. Moreover, the study of Volpin et al. [45] suggested the evidence of a more direct effect of *Azospirillum brasilense* on nodulation mediated by increased flavonoids exudation in the rhizosphere of alfalfa and common bean. Flavonoids are believed to be plant signalling molecules essential for the establishment of rhizobia–legume symbiosis. It is widely believed that legume nodules are often occupied by a phylogenetically diverse bacterial microbiome. These bacteria have wide effects on plant growth and health as well as nodule formation and nitrogen fixation. However, their precise ecological roles remain unknown [46]. A non-passive role of the non-rhizobial bacteria in nodules has been suggested including manipulation of the plant host [47]. Liu et al. [20] proved that some non-rhizobial bacteria improve the nodulation and nitrogen fixation of leguminous symbionts–rhizobia and help *Rhizobium* extending its host range. They selectively control the entry of bacteria in this specific niche, the root nodule and allow their survival [48]. Molecular studies have shown that many actinobacteria can occur as endophytes in various leguminous plants [11]. *Streptomyces* inoculants application to enhance plant nodulation and increase soil nitrogen content indicated their potent effect on rhizobia–legume symbiosis non-specifically [26]. However, in our case, *Streptomyces* did not seem to contribute to nodulation as compared to the genus *Arthrobacter* which not only improved nodulation, but also all the plant growth parameters, in the presence of *S. meliloti* R1 or R2.

Variance analysis showed that alfalfa growth parameters were negatively affected by salinity. Bacterial inoculation has been reported to reduce the undesirable effects of stress on plant growth [4]. Our results were in agreement with earlier findings that inoculated plants grew better and had higher biomass than non-inoculated plants under salt stress conditions. Legume–rhizobia symbiosis and the process of initiation of nodules on legumes were both sensitive to salt stress [49]. Salt stress inhibited the early stages of rhizobia–legume symbiosis. The adverse effects of salinity on symbiosis may also result from the suppression of nodule function and the reduction of plants' ability to grow [49]. The increased growth of plants co-inoculated with non-rhizobial strains as compared to plants inoculated with the rhizobial strain *S. meliloti* alone can be attributed to the higher tolerance of actinobacteria strains to salinity and drought and to their greater ability to produce IAA hormone (MS1 and MS2).

Saline stress had also deleterious effect on biochemical parameters resulting in a decrease in chlorophyll

concentration [50] due to the weakening of protein–lipid complexes [50] and consequently to the reduction in interception of light, an increase in the activity of chlorophyllase and the synthesis of nitrogen compounds that consumes a large quantity of nitrogen [51]. It was also known that higher concentrations of ions in saline soils accumulate in plant cells, inactivate enzymes and inhibit protein synthesis and photosynthesis [3].

Analysis of the leaf proline content revealed that salinity stimulated its intracellular synthesis. This synthesis was at the maximum level at 100 mM NaCl. Inoculation induced a decrease in leaf content under the effect of salt stress. Proline is the amino acid most widely accumulated by plants in saline soil [4]. Inoculated plants can improve their growth rate and salt tolerance and suppress the harmful effects of stress, allowing them to adapt to salt conditions [4]. The results of this study indicate that drought- and salinity-tolerant actinobacteria with multiple PGP traits can potentially increase alfalfa growth under saline conditions, in the presence or absence of symbiotic rhizobial bacteria. This knowledge will be useful to define strategies for the application of these bacteria as bio-inoculants, alone or associated with rhizobial bacteria. Such approaches will improve the performance or persistence of rhizobia and reduce the use of chemical fertilizers [28]. According to the results of this study, MS1 and MS2 bacteria can be suitable biofertilizers in the formulation of agricultural products improving plant development, health and productivity in saline soils, a necessary alternative for modern agriculture and sustainable development.

## Conclusions

Our study highlights the potential use of Actinobacteria and mainly those discovered in this study as biofertilizers in the formulation of agricultural products improving plant development, health and productivity in saline soils, a necessary alternative for modern agriculture and sustainable development.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02394-z>.

**Acknowledgements** This manuscript received funding from Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research to HCS. This organizations provided finance support for this study, but did was not involved in the study design, data analysis, decision to publish, or in writing this manuscript.

**Author Contributions** Conceived and designed the experiments: CHS, AS and LB. Performed the experiments: SS, CHS, AS, LL and LB. Analyzed the data: SS, CHS, ACB, AS, FNA, LL and ME. Contributed reagents/materials/analysis tools: LB, CHS, and AS. Wrote and

enriched the literature: LB, CHS, ME, ACB and AS. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** Open Access funding provided by Université de Neuchâtel.. There is no financial support for this work.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Luchi N, Ghelardini L, Belbahri L, Quartier M, Santini A (2013) Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by quantitative real-time PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 79(17):5394–5404. <https://doi.org/10.1128/AEM.01484-13>
- Prospero S, Vercauteren A, Heungens K, Belbahri L, Rigling D (2013) *Phytophthora* diversity and the population structure of *Phytophthora ramorum* in Swiss ornamental nurseries. *Plant Pathol* 62:1063–1071. <https://doi.org/10.1111/ppa.12027>
- Rekik I, Chaabane Z, Missaoui A, Chenari Bouket A, Luptakova L, Elleuch A, Belbahri L (2017) Effects of untreated and treated wastewater at the morphological, physiological and biochemical levels on seed germination and development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), alfalfa (*Medicago sativa* L.) and fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *J Hazard Mater* 326:165–176
- Cherif-Silini H, Thissera B, Bouket AC, Saadaoui N, Silini A, Eshelli M, Alenezi FN, Vallat A, Luptakova L, Yahiaoui B, Cherad S, Vacher S, Rateb ME, Belbahri L (2019) Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *Int J Mol Sci* 20:3989
- Wang C, Wu J, Zeng W, Zhu Y, Huang J (2019) Five-year experimental study on effectiveness and sustainability of a dry drainage system for controlling soil salinity. *Water* 11(1):111. <https://doi.org/10.3390/w11010111>
- Plaut J, Wadsworth WD, Pangle R, Yopez EA, McDowell NG, Pockman WT (2013) Reduced transpiration response to precipitation pulses precedes mortality in a piñon–juniper woodland subject to prolonged drought. *New Phytol* 200(2):375–387. <https://doi.org/10.1111/nph.12392>
- Daliakopoulos IN, Tsanis IK, Koutroulis A, Kourgialas NN, Varouchakis AE, Karatzas GP, Ritsema CJ (2016) The threat of soil salinity: a European scale review. *Sci Total Environ* 573:727–739. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.177>
- Hashem A, Abd-Allah EF, Alqarawi A, Al-Huqail AA, Wirth S, Egamberdieva D (2016) The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of

- Acacia gerrardii* under salt stress. *Front Plant Sci* 7:1089. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01089>
9. Simontacchi M, Galatro A, Ramos-Artuso F, Santa-María GE (2013) Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Front Plant Sci* 6:977. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>
  10. Slama HB, Cherif-Silini H, Chenari Bouket A, Qader M, Silini A, Yahiaoui B, Alenezi FN, Luptakova L, Triki MA, Vallat A, Oszako T, Rateb ME, Belbahri L (2019) Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Front Microbiol* 9:3236. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
  11. Slama HB, Triki MA, Chenari Bouket A, Mefteh FB, Alenezi FN, Luptakova L, Cherif-Silini H, Vallat A, Oszako T, Gharsallah H, Belbahri L (2019) Screening of the high-rhizosphere competent *Limoniastrum monopetalum* culturable endophyte microbiota allows the recovery of multifaceted and versatile biocontrol agents. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080249>
  12. Mefteh FB, Daoud A, Chenari Bouket A, Thissera B, Kadri Y, Cherif-Silini H, Eshelli M, Alenezi F, Vallat A, Oszako T, Kadri A, Ros-Garcia JM, Rateb M, Gharsallah N, Belbahri L (2018) Date palm trees root-derived endophytes as fungal cell factories for diverse bioactive metabolites. *Int J Mol Sci* 19(7):1986. <https://doi.org/10.3390/ijms19071986>
  13. Fernandez AL, Fabrizzi KP, Tautges NE, Lamb JA, Sheaffer CC (2017) Cutting management and alfalfa stand age effects on organically grown corn grain yield and soil N availability. *Renew Agric Food Syst* 34(2):1–11
  14. Mathew BT, Torky Y, Amin A, Mourad A-HI, Ayyash MM, El-Keblawy A, El-Keblawy A, AbuQamar SF, El-Tarabily KA (2020) Halotolerant marine rhizosphere-competent actinobacteria promote *Salicornia bigelovii* growth and seed production using seawater irrigation. *Front Microbiol* 11:552
  15. Frikha DD, Zarai Z, Najah S, Abdennabi R, Belbahri L, Rateb ME, Mejdoub H, Maalej S (2017) Antagonistic properties of some halophilic Thermoactinomycetes isolated from superficial sediment of a solar saltern and production of cyclic antimicrobial peptides by the novel isolate *Paludifilum halophilum*. *Biomed Res Int* 2017:1205258. <https://doi.org/10.1155/2017/1205258>
  16. El-Tarabily KA, ElBaghdady KZ, AlKhajeh AS, Ayyash MM, Aljneibi RS, El-Keblawy A, AbuQamar SF (2020) Polyamine-producing actinobacteria enhance biomass production and seed yield in *Salicornia bigelovii*. *Biol Fertil Soils* 56:499–519
  17. Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ (2002) Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol* 68:2161–2171
  18. Soe KM, Bhromsiri A, Karladee D, Yamakawa T (2012) Effects of endophytic actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* strains on growth, nodulation, nitrogen fixation and seed weight of different soybean varieties. *Soil Sci Plant Nutr* 58:319–325. <https://doi.org/10.1080/00380768.2012.682044>
  19. Nimmnoi P, Pongsilp N, Lumyong S (2014) Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with act in oomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant growth. *J Plant Nutr* 37:432–446
  20. Martinez-Hidalgo P, Galindo-Villardón P, Igual JM, Martínez-Molina E (2014) *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.): a new promising plant probiotic bacteria. *Sci Rep* 4:1–9
  21. Solans M, Vobis G, Wall LG (2009) Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high nitrogen. *J Plant Growth Regul* 28:106–114
  22. Liu C, Zhuang X, Yu Z, Wang Z, Wang Y, Guo X, Xiang W, Huang S (2019) Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria of healthy and diseased soybean. *Microorganisms* 7:243
  23. Belbahri L, Chenari Bouket A, Rekek I, Alenezi FN, Vallat A, Luptakova L, Petrovova E, Oszako T, Cherrad S, Vacher S, Rateb ME (2017) Comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome. *Front Microbiol* 8:1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>
  24. Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P et al (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293(5530):668–672
  25. Louati M, Ennis NJ, Ghodhbane-Gtari F, Hezbri K, Sevigny JL, Fahnestock MF, Cherif-Silini H, Bryce JG, Tisa LS, Gtari M (2019) Elucidating the ecological networks in stone-dwelling microbiomes. *Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14700>
  26. Mlaik N, Bakonyi J, Borsodi A, Woodward S, Belbahri L, Mechichi T (2015) Microbial diversity in tanning wastewaters treatment reactors. *Environ Prog Sustain Energy* 34(2):401–410. <https://doi.org/10.1002/ep.12000>
  27. Thilakarathna MS, Chapagain T, Ghimire B, Pudasaini R, Tamang BB, Gurung K, Choi K, Rai L, Magar S, Bk B, Gaire S, Raizada MN (2019) Evaluating the effectiveness of *Rhizobium* inoculants and micronutrients as technologies for nepalese common bean smallholder farmers in the real-world context of highly variable hillside environments and indigenous farming practices. *Agriculture* 9:20
  28. Sachs JL, Quides KW, Wendlandt CE (2019) Legumes versus rhizobia: a model for ongoing conflict in symbiosis. *New Phytol* 219(4):1199–1206
  29. Cherrad S, Charnay A, Hernandez C, Steva H, Belbahri L, Vacher S (2018) Emergence of boscalid-resistant strains of *Erysiphe necator* in French vineyards. *Microbiol Res* 216:79–84. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.007>
  30. Andrews M, Andrews ME (2019) Specificity in legume–rhizobia symbioses. *Int J Mol Sci* 18(4):26
  31. Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM (2019) Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ* 42(1):41–51
  32. Htwe AZ, Moh SM, Soe KM, Moe K, Yamakawa T (2019) Effects of biofertilizer produced from *Bradyrhizobium* and *Streptomyces griseoflavus* on plant growth, nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake, and seed yield of mung bean, cowpea, and soybean. *Agronomy* 9(2):77. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020077>
  33. Solans M, Ruiz OA, Wall LG (2015) Effect of actinobacteria on *Lotus tenuis*–*Mesorhizobium loti* symbiosis: preliminary study. *Symbiosis* 65:33–37
  34. Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37:189–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>
  35. Okoro CK, Brown R, Jones AL et al (2009) Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:121. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9295-2>
  36. El-Tarabily KA, Sivasithamparam K (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* 34:1–16
  37. Choudhury SR, Johns SM, Pandey S (2019) A convenient, soil-free method for the production of root nodules in soybean to

- study the effects of exogenous additives. Plant Direct. <https://doi.org/10.1002/pld3.135>
38. Jog R, Pandhya M, Nareshkumar G, Rajkumar S (2014) Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. Microbiology 160:778–788
  39. Fernandez LA, Zalba P, Gomez MA, Sagordoy MA (2007) Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. Soil Fertil Soil 43:805–810
  40. Barona-Gomez F, Lautru S, Francou FX, Leblond P, Pernodet JL, Challis GL (2006) Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. Microbiology 152(Pt 11):3355–3366
  41. Sellstedt A, Richau KH (2013) Aspects of nitrogen-fixing actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. FEMS Microbiol Lett 342:179–186
  42. Jog R, Nareshkumar G, Rajkumar S (2016) Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. In: Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R (eds) Plant growth promoting actinobacteria. Springer, Singapore, pp 33–45
  43. Gregor AK, Klubek B, Varsa EC (2003) Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. Can J Microbiol 49:483–491
  44. Soe KM, Yamakawa T (2013) Evaluation of effective Myanmar *Bradyrhizobium* strains isolated from Myanmar soybean and effects of co-inoculation with *Streptomyces griseoflavus* P4 for nitrogen fixation. Soil Sci Plant Nutr 59:361–370
  45. Volpin H, Burdman S, Castro-Sowinski S, Kapulnik Y, Okon Y (1996) Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial nod-gene inducers by alfalfa roots. Mol Plant–Microbe Interact 9(5):388–394
  46. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ (2015) Bacterial associations with legumes. Crit Rev Plant Sci 34:17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
  47. Gano-Cohen KA, Stokes PJ, Blanton MA, Wendlandt CE, Hollowell AC, Regus JU, Kim D, Patel S, Pahua VJ, Sachs JL (2016) Non-nodulating *Bradyrhizobium* spp. modulate the benefits of legume-rhizobium mutualism. Appl Environ Microbiol 82(17):5259–5268. <https://doi.org/10.1128/AEM.01116-16>
  48. Mus F, Crook MB, Garcia K, Costas AG, Geddes BA, Kouri ED et al (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. Appl Environ Microbiol 82:3698–3710. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>
  49. Elsheikh EAE, Wood M (1990) Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). J Exp Bot 41:1263–1269
  50. Rosa-Ibarra MDL, Maiti RK (1995) Biochemical mechanism in glossy sorghum lines for resistance to salinity stress. J Plant Physiol 146(4):515–519
  51. Levitt J (1980) Chilling, freezing, and high temperature stresses. In: Responses of plants to environmental stress, 2nd eds., vol 1

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Terms and Conditions

Springer Nature journal content, brought to you courtesy of Springer Nature Customer Service Center GmbH (“Springer Nature”).

Springer Nature supports a reasonable amount of sharing of research papers by authors, subscribers and authorised users (“Users”), for small-scale personal, non-commercial use provided that all copyright, trade and service marks and other proprietary notices are maintained. By accessing, sharing, receiving or otherwise using the Springer Nature journal content you agree to these terms of use (“Terms”). For these purposes, Springer Nature considers academic use (by researchers and students) to be non-commercial.

These Terms are supplementary and will apply in addition to any applicable website terms and conditions, a relevant site licence or a personal subscription. These Terms will prevail over any conflict or ambiguity with regards to the relevant terms, a site licence or a personal subscription (to the extent of the conflict or ambiguity only). For Creative Commons-licensed articles, the terms of the Creative Commons license used will apply.

We collect and use personal data to provide access to the Springer Nature journal content. We may also use these personal data internally within ResearchGate and Springer Nature and as agreed share it, in an anonymised way, for purposes of tracking, analysis and reporting. We will not otherwise disclose your personal data outside the ResearchGate or the Springer Nature group of companies unless we have your permission as detailed in the Privacy Policy.

While Users may use the Springer Nature journal content for small scale, personal non-commercial use, it is important to note that Users may not:

1. use such content for the purpose of providing other users with access on a regular or large scale basis or as a means to circumvent access control;
2. use such content where to do so would be considered a criminal or statutory offence in any jurisdiction, or gives rise to civil liability, or is otherwise unlawful;
3. falsely or misleadingly imply or suggest endorsement, approval, sponsorship, or association unless explicitly agreed to by Springer Nature in writing;
4. use bots or other automated methods to access the content or redirect messages
5. override any security feature or exclusionary protocol; or
6. share the content in order to create substitute for Springer Nature products or services or a systematic database of Springer Nature journal content.

In line with the restriction against commercial use, Springer Nature does not permit the creation of a product or service that creates revenue, royalties, rent or income from our content or its inclusion as part of a paid for service or for other commercial gain. Springer Nature journal content cannot be used for inter-library loans and librarians may not upload Springer Nature journal content on a large scale into their, or any other, institutional repository.

These terms of use are reviewed regularly and may be amended at any time. Springer Nature is not obligated to publish any information or content on this website and may remove it or features or functionality at our sole discretion, at any time with or without notice. Springer Nature may revoke this licence to you at any time and remove access to any copies of the Springer Nature journal content which have been saved.

To the fullest extent permitted by law, Springer Nature makes no warranties, representations or guarantees to Users, either express or implied with respect to the Springer nature journal content and all parties disclaim and waive any implied warranties or warranties imposed by law, including merchantability or fitness for any particular purpose.

Please note that these rights do not automatically extend to content, data or other material published by Springer Nature that may be licensed from third parties.

If you would like to use or distribute our Springer Nature journal content to a wider audience or on a regular basis or in any other manner not expressly permitted by these Terms, please contact Springer Nature at

[onlineservice@springernature.com](mailto:onlineservice@springernature.com)

## **Annexe 1 : la culture de luzerne (légumineuse)**

Les légumineuses (Fabaceae) constituent la troisième plus grande famille d'Angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidaceae et les Asteraceae) avec environ 750 genres et près de 20 000 espèces (Cronk et al. 2006 ; Laamari et al., 2016). Elles sont groupées en trois sous familles : les Mimosoideae, les Caesalpinoideae et les Papillionoideae (Guignard et Dupont, 2005).

Cette famille présente une importance économique majeure ; de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo). Les légumineuses sont cultivées à travers le monde dans presque tous les pays. La culture des légumineuses occupe une place primordiale au niveau des agrosystèmes vu leurs intérêts agronomiques, économiques et nutritionnels. La présence de légumineuses dans les systèmes de production agricoles concourt à l'augmentation de la diversité fonctionnelle des agroécosystèmes. Elles contribuent, ainsi à plusieurs titres, à l'équilibre des systèmes agroécologiques (Farissi et al., 2014 ; Sobti et al., 2015). Outre leur rôle dans le cycle de l'azote, la production de légumineuses interagit avec d'autres cycles biogéochimiques. En effet, cette symbiose fournit l'azote nécessaire pour la croissance et le développement des plantes et permet, à la fois d'enrichir le sol en matière organique et d'épargner les engrais azotés par l'exploitation d'un processus naturel (Farissi et al., 2014 ; Sobti et al., 2015).

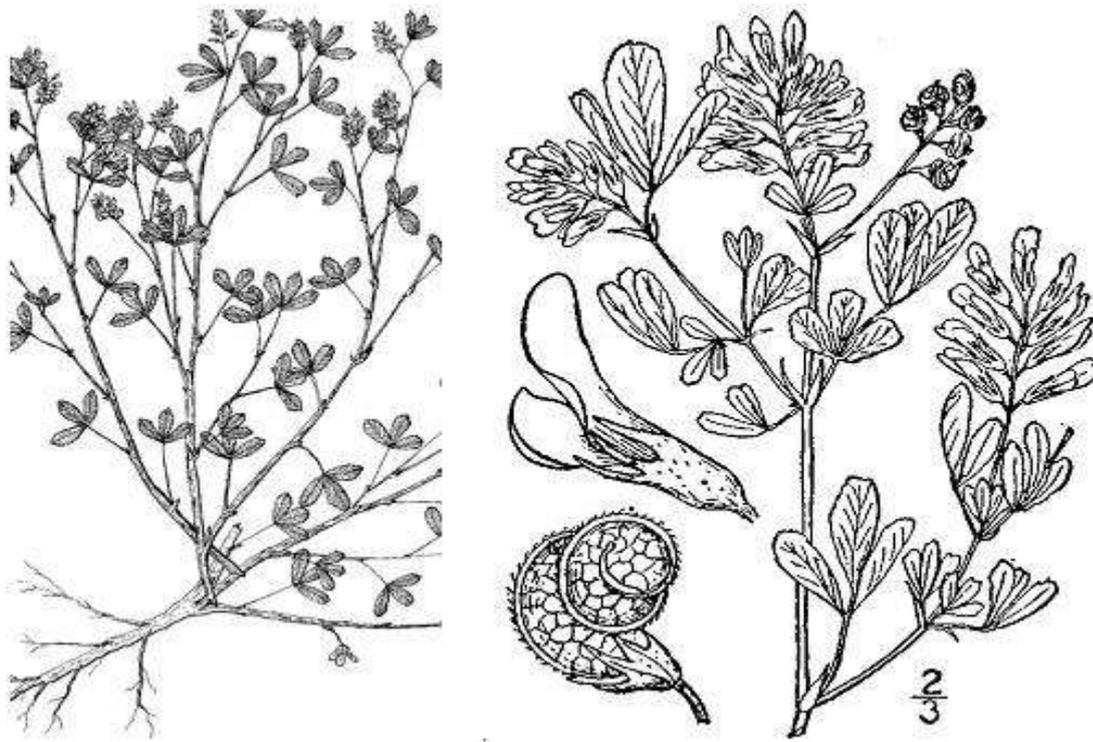
Selon le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (MADR) (1992), l'Algérie renferme 3300 espèces vasculaires spontanées dont 168 sont endémiques. Elle se classe en deuxième position après le Maroc et elle est suivie par la Tunisie. A eux trois, ces pays se partagent un héritage de plus de 6151 espèces vasculaires spontanées dont 710 sont endémiques au Maghreb. Dans la flore algérienne, les Fabaceae sont représentées par environ 360 espèces et sous-espèces, dont 41 % rares à très rares et 13 % endémiques au sens large (Quézel et Santa 1962).

### **I.2. La luzerne :**

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est l'une des légumineuses fourragères les plus populaires dans le monde en raison de son rendement élevé et de sa valeur nutritionnelle (digestibilité et teneur en protéines) (Martin 2014; Biazzi et al. 2017). C'est une plante vivace qui peut régénérer rapidement de nombreuses nouvelles tiges après la récolte et peut être récoltée plusieurs fois au cours de la saison de croissance (Lamm et al., 2012; Brink et al., 2015). En tant que légumineuse, elle peut améliorer la structure du sol grâce à son système racinaire profond et améliorer l'apport en azote des cultures subséquentes grâce à sa capacité de fixation biologique de l'azote (Huyghe et al. 2014). La luzerne est une légumineuse fourragère de haute qualité, en particulier pour le bétail laitier, et elle peut augmenter le rendement en matière sèche lorsqu'elle est en culture mixte (Bélangier et al. 2014).

La morphologie générale de la plante a été décrite par Teuber et Brick (1988) ainsi que Barnes et Sheaffer (1995). À maturité, la plante possède une longue racine pivotante. En sol profond, humide et bien drainé, cette racine peut atteindre six mètres de longueur, ou même davantage, et produire au niveau du collet des racines latérales parfois nombreuses. Le collet, structure complexe située près de la surface du sol, conserve son activité méristématique d'une

année à l'autre et produit des bourgeons qui donnent naissance à de nouvelles tiges. Les feuilles sont alternes et comportent au moins trois folioles. Des rameaux secondaires et tertiaires peuvent se former à l'aisselle des feuilles. Dans les conditions normales de production fourragère, chaque pied compte 5 à 15 tiges et peut atteindre près d'un mètre de hauteur. Les fleurs sont de couleur variable mais sont le plus souvent violettes, panachées, jaunes, crème ou blanches. Après la pollinisation, elles donnent généralement une gousse spiralée.



**Figure 22.** Représentation schématique de la Morphologie générale de la plante de luzerne Teuber et Brick (1988).

La luzerne est largement cultivée, particulièrement dans les régions limitées en eau, en raison de sa capacité d'absorber l'eau des couches profondes du sol via son système de racines profondes (Zhu et al., 2016; Sim et al., 2017) et favorise la prévention de l'érosion des sols dans les zones arides et semi-arides (Quan et al., 2015), ce qui lui confère un niveau relativement élevé de tolérance à la sécheresse par rapport aux autres cultures (Kang et al., 2011; Tang et al., 2014).

En Afrique, la luzerne est cultivée dans quelques pays situés dans les régions du nord et du sud. En Algérie, la luzerne occupe environ 10 000 ha, le Sahara algérien (voir photo 1), caractérisé par un climat désertique, la luzerne est de loin la principale espèce fourragère cultivée (Chaabena et al., 2012).

## Annexe 2 : les Compositions des milieux de cultures :

### -Le milieu **YMA (Yeast-Extract-Mannitol)(g/l)**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Mannitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
Agar	15
ph	6,8

-La composition de milieu de culture **YMB (Yeast Mannitol Broth )** c'est la composition de milieu YMA mais sans Agar.

### Le Milieu **Pikovskaya (PVK) (g /l):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
D-Glucose	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
NaCl	0.2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1
KCl	0.2
Extraitdelevure	0,5
MnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.002
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.002
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5
Eaudistillée	1000ml

la solution nutritive de Fahraeus (Fahraeus, 1957).

Macroéléments	
Composants	Quantité(g/l)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.12
Citrate de ferre	0.005
Solution mère de microéléments	1ml
Eaudistillée	1000ml
Ajustement du pH à 6.8-7.0	
Autoclavage à 120°C pendant 20 min.	

Microéléments	
Composants	Quantité(g/l)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.03
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.08
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.14
Eaudistillée	1000ml

**-Milieu Dworkin et Foster (DF):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10µg
MnSO <sub>4</sub>	10µg
ZnSO <sub>4</sub>	70µg
CuSO <sub>4</sub>	50µg
MoO <sub>3</sub>	10µg
Glucose	2g
Acide gluconique	2 g
Acide citrique	2 g
Eaudistillée	1000ml

**LeMilieuKingB (g/l):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Peptonedecaséine	10
Peptonedeviande	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
Eaudistillée	1000 ml

**SolutionChromeAzuroIS(CAS)**

- Mettre 6ml de HDTMA (Hexam ethylammonium bromure) 10mM dans une éprouvette de 100ml et diluerà 50 ml avec de l'eau désionisée.(1)
- Mélanger1,5ml de FeCL3+(1mM FeCL3+.6H20;10mM HCL) et 7,5ml de CAS 2mM.(2)
- Ajouter(2) à (1).
- Dissoudre4,307g de pipera zinean hydre dans de l'eau et ajouter 6,25 ml de HCL 12M(Solution tampon pH= pKa= 5.6).
- Ajouter la solution tampon et continuer avec de l'eau jusqu'à 100ml.

**Le Milieu International *Streptomyces* Program(ISP2)(g/l):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Extraitdelevure	4g
Extraitde malt	10g
Glucose	4g
Agar	20g
Eaudistillée	100ml
pH	7,3

**-Le chlorure de mercure acidifié 0,1% :**

(1g HgCl<sub>2</sub> + 5 ml HCl + 1 litre d'eau distillée)

**Milieu Luedemann (g/l)**

<b>Les composants</b>	<b>Quantité (g/l d'eau distillée)</b>
Extrait de levure	5 g
Extrait de malt	15 g
Amidon soluble	10 g
Glucose	10 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

**Le Milieu BAP (g/l):**

<b>Les composants</b>	<b>Quantité (g/l d'eau distillée)</b>
Propionate de sodium	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,95 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,60 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,025 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,003 g
Biotine	4,5 g
Solution stock FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 ml
O/EDTA	
Solution stock de Hoagland	1 ml
d	
Eau distillée	1000 ml
pH	6,7

**Le Milieu minimum ausel :**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Glucose	2.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.36 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.4g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.02 g
NaCl	0.2 g
FeCl <sub>3</sub>	6.6 mg
EDTA	15mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.16 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.2 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.25 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.2 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.02mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1μg
thiamine-HCl	1mg
Calcium pantothenate	2mg
Biotin	1μg
Eau distillée	1000ml

**- Les Gélose aulaitécrémé (25%)(g/l):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Peptone decaséine	5g
Extraitdelevure	3g
Agar	15
Eaudistillée	1000ml
Autoclavage120°C/20mn	
Ajouter250mldelaitécréméstérile	

**Réactifde Benedict (g/l) :**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Citrate de sodium	173
Carbonate de sodium anhydre	100
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	17.3
Eaudistillée	1000ml

**Gélose GYP (Glucose Yeast Extract Peptone) additionnée de  
1% d'amidon soluble (g/l):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Glucose	1
Yeastextract	0.5
Peptone	0.5
Agar	15
Amidonsoluble	1%
Eaudistillée	1000ml

**Gélose à base de chitine (g/l) :**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Chitine colloïdale	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01
Agar	15
Eaudistillée	1000ml

**Milieu Luria Bertani (LB) additionné de 1% de Carboxyméthylcellulose (CMC) (g/l)**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	5
Agar	15
Carboxyméthylcellulose (CMC)	1%
Eau distillée	1000ml

**Milieu gélatine nutritive (g/l):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Peptone	4
Yeast extract	1
Gélatine	15
Agar	15
Eau distillée	1000 ml

**Milieu de Winogradsky exempte d'azote (g/l)****-Solution stock (g/l)**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	25
NaCl 25,0	25
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1
Eau distillée	1000ml
pH	7,2 ajusté avec du NaOH

**Milieu Winogradsky exempted'azote:**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Solution stock	5ml
D Glucose	0,5g
CaCO <sub>3</sub>	0,1g
Eau distillée	1000ml

**Eau peptonée (g /l):**

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
Peptones	10
NaCl	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1000ml
pH : 7.2	

**Annexe 03 :l'appareillage**

Une hotte à flux laminaire

Anse de platine

Bec Bunsen

Boite de Pétri

Tubes Gibson

Un incubateur-agitateur

Autoclave

Un papier filtre

Papier parafilm

Papier whatman

Four pasteur

Couteau

**Annexe4 :**

**Tableau 04 : Représente les régions de collecte des nodules de la luzerne selon (Salim Azib et al, 2022) et (Samira Saidi et al, 2021).**

Régions	Travaux01 : (Salim Azib et al, 2022).	Travaux02 : (Samira Saidi et al, 2021).
1	Ghardaïa( 32°57'01''N . 3°62'86''E)	Sétif
2	El Oued( 33°52'30''N . 6°02'32''E)	Melghir Sebkhha de Biskra (34° 17' 56.6" N 6° 21' 54.56" E)
3	Ouargla(32°05'70''N 5°46'37''E)	GuerbesSenhadja de Skikda(36° 55' N 7° 16' E)

**Annexe 05 :**

**Tableau 5 : Identification des stations, type de climat, type de sol, salinité des eaux d'irrigation, mode de culture de la luzerne et mode d'échantillonnage.**

Identification dusite	Lebiocli mat	Texture dusol	Salinité deseaux d'irrigation(g/l)	Mode de culture deluzerne	Mode d'échantillonnage
O1	Hyperaride	Sableuse	2à 4	Souspalmierdattier	Collectedes nodules <i>insitu</i>
O2	Hyperaride	//	2à 4	//	//
O3	Hyperaride	//	2à 4	//	//
O4	Hyperaride	//	2à 4	Pleinchamp	//
E1	Hyperaride	//	2à 6	Souspalmierdattier	Piégeageàpartir du sol
E2	Hyperaride	//	2,5à6	//	//
E3	Hyperaride	//	2à 6	//	//
E4	Hyperaride	//	2à 4	//	//
E5	Hyperaride	//	2à 4	//	//
G1	Hyperaride	//	1à 4	Pleinchamp	Collectedes nodules <i>insitu</i>
G2	Hyperaride	//	1à1,5	//	//
G3	Hyperaride	//	1à1,5	//	//
G4	Hyperaride	//	1à1,5	Culturemixteavec del'orge	//
G4	Hyperaride	//	1à1,5	//	//

## Annexe06 :

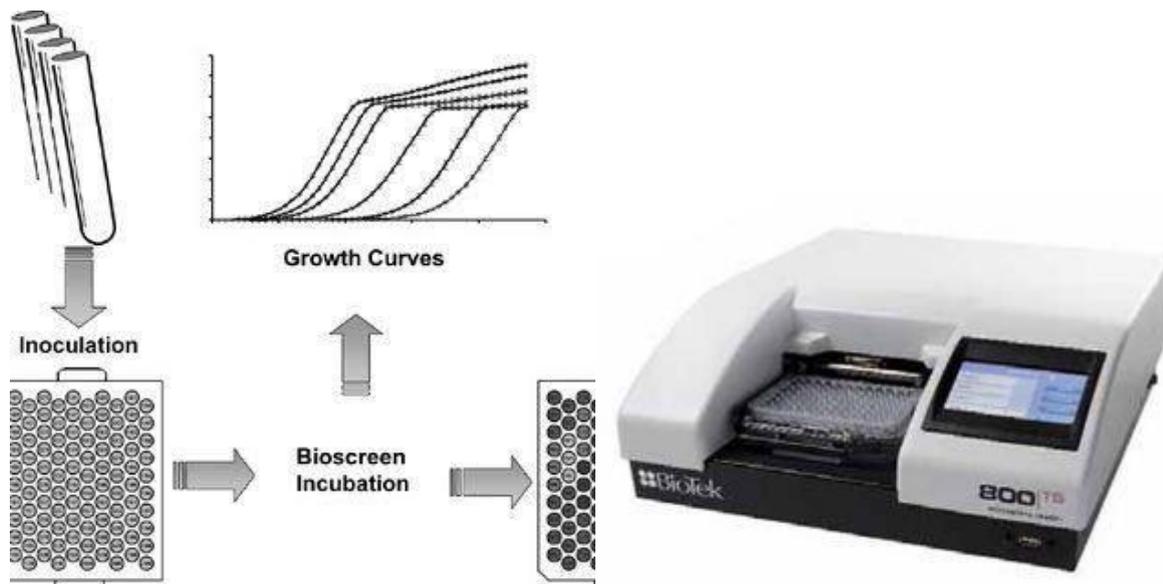
### Codes des souches, plante hôte d'isolement, localisation géographique et type de climat.

Souches	Plante hôte	Sited'échantillonnage	Localisation	Types de climat
E131	<i>M.sativa</i>	Tenedla	Lat.33°67'58''N Long.6°03'72''E	Hyperarid
E222	<i>M.sativa</i>	El-Meghaier	Lat.33°56'25''N Long.5°92'71''E	Hyperarid
O152	<i>M.sativa</i>	HassiBenAbdallah	Lat.32°00'77''N Long.5°46'27''E	Hyperarid
O172	<i>M.sativa</i>	HassiBenAbdallah	Lat.32°00'77''N Long.5°46'27''E	Hyperarid

## Annexe 07 :

### Protocole du bioscreen

Préparer les plaques pour Bioscreen : les plaques sont composées de 100 puits, d'une capacité de 300 µl/puit. La première et la dernière ligne, ainsi que la première et la dernière colonne sont remplies d'eau distillée. Dans la deuxième colonne, le milieu sans inoculum est toujours utilisé comme témoin. Le reste des lignes et des colonnes sont utilisées pour les différentes concentrations de sel et souches à étudier ; La DO final dans les puits est de 0,04 et le volume final est de 300 µl. Pour cela, nous mesurons la DO de notre inoculum et nous l'ajustons à 0,4. À partir de là, nous ferons une dilution au 1/10 (270 µl de milieu YEM + 30 µl d'inoculum de la souche à étudier à DO = 0.4) ; Recouvrir la plaque et la fermer avec un parafilm et la placer dans le bioscreen ; Réglage de l'appareil : l'incubation s'est effectuée à 28°C pendant 72 heures, sous agitation continue à une vitesse moyenne. La DO est réglée à 600 nm avec un intervalle de lecture de 2 heures.



## Annexe08 :

**Tab.: Caractérisation biochimique des souches actinobactériennes utilisées dans l'étude.**

	MS1	MS2	Ag1	MS3	MS4
Diamètre des Colonies(mm)	3	4	5	3	4
Couleur des colonies sur mycélium aérien	Orange	Rouge	Grise	Blanche	Grise
Couleur du mycélium du substrat	-	-	Blanche	Beige	Blanche
Morphologie microscopique	Coco-bacille	Coco-bacille	filamenteuse	filamenteuse	filamenteuse
Coloration de Gram	+	+	+	+	+
Pigments diffusibles	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	+	-	-
Amygdaline	+	-	+	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	+	-	-	-
Fructose	+	+	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	-
Melibiose	-	-	-	+	-
Raffinose	-	-	+	-	-
Rhamnose	+	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	+	-
Sorbose	-	-	+	-	-
Sucrose	+	-	-	+	-
Xylose	-	-	-	+	-

**Tab.: Caractérisation biochimique des souches actinobactériennes utilisées dans l'étude (suite).**

	MS1	MS2	Ag1	MS3	MS4
Citrate	+	+	+	+	+
$\beta$ -galactosidase	+	-	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+
Ornithinedecarboxylase	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Butanediol	+	+	-	+	+
Urease	+	-	+	+	+
Amylase	+	+	+	+	+
Protéase	+	+	+	+	+
Chitinase	+	+	+	+	+
Cellulase	+	+	+	+	+
Gélatinase	+	+	-	+	+