



## Avant-propos

- **Nom et prénom de l'auteur :** AALLAM Yassine
  - Intitulé du travail : **Application biotechnologiques des Actinobactéries pour l'amélioration de l'efficacité agronomique du phosphate et du potassium naturels en vue d'une meilleure productivité de la betterave à sucre.**
  
- **Encadrante :**
  - Nom, Prénom et Grade : HAMDALI Hanane, PH, FST Béni Mellal
  - Laboratoire et institution : Laboratoire de Biotechnologies et de valorisation des ressources phylogénétiques (LBVRP), FST-BM
  
- **Co-encadrant :**
  - Nom, Prénom et Grade : HADDIOUI Abdelmajid, PES, FST-BM
  - Laboratoire et institution : Laboratoire de Biotechnologies et de valorisation des ressources phylogénétiques (LBVRP), FST-BM
  
- **Lieux de réalisation des travaux (laboratoires, institutions, ...)**
  - Laboratoire de Biotechnologies et de valorisation des ressources phylogénétiques (LBVRP), FST-BM
  - Institut International de Recherche sur l'Eau, Université Mohammed 6 Polytechnique (UM6P) de Benguerir.
  - Laboratoire de Recherche et d'Analyse Médicale de la Gendarmerie Royale (LRAM) de Rabat.
  - Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE), Tunisie
  
- **Rapporteurs autres que l'encadrant (Nom, Prénom, Grade, Institution) :**
  - Pr. OUFDOU Khalid, Professeur, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech.
  - Pr. OUKARROUM Abdallah, Professeur, Université Mohammed VI Polytechnique, Ben Guerir.
  - Pr. BOUSSERRHINE Nouredine, Professeur, Université Paris Est Créteil, Paris, France.

## Liste des publications:

1. **Aallam Y**, Dhiba D, Lemriss S, Souiri A, Karray F, El Rasafi T, Saïdi N, Haddioui A, El Kabbaj S, Virolle MJ et Hamdali H (2021) Isolation and characterization of phosphate solubilizing *Streptomyces* spp. endemic from sugar beet fields of the Beni-mellal region in Morocco. **Microorganisms** 9:1–15. (IF: 4.152)
2. **Aallam Y**, El Rasafi T, Hakkou R, Dhiba D, Nouri M, Haddioui A et Hamdali H (2021) Assessing the contamination of trace toxic elements in the soils of sugar beet field (Beni-Mellal , Morocco). **Arabien Journal of Geoscience** 14:1–12 (IF : 1.327)
3. **Aallam Y**, El Maliki B, Dhiba D, Lemriss S, Souiri A, Haddioui A, Tarkka M, et Hamdali H (2021) Multiple potential plant growth promotion activities of endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan sugar beet fields with their inhibitory activities against *Fusarium* spp. **Microorganisms** 9:1-15 (IF: 4.152)
4. Elhamdouni D, Arioua A, Karaoui I et **Aallam Y** (2021) Waste compost quality assessment for efficient use in agriculture : case of the developing countries. **Journal of Sediment Environnement** 1-7.
5. **Aallam Y**, Dhiba D, El Rasafi T, Lemriss S, Haddioui A, Tarkka M, et Hamdali H (2022) Effect of two rock phosphate and potassium solubilizing *Streptomyces* spp. on growth promotion and biocontrol against root rot of sugar beet (*beta vulgaris* L.) under greenhouse experiments. **Plant and Soil** (2022). (IF: 4.192)
6. **Aallam Y**, Dhiba D, El Rasafi T, Tarkka M, et Hamdali H (2022) Effect of soil amendment with rock phosphate and Actinomycetes as bio-phosphate fertilizer on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under field conditions. **Article soumis au Journal “Microbiological Research”** (IF: 5.415)
7. Bousselham M, Lemriss S, Dhiba D, **Aallam Y**, Souiri A, Abbas Y, Saidi N, Kassem K.M et Hamdali H (2022) Streptomycetaceae and *Promicromonosporaceae*: Two Actinomycetes family from Moroccan Oat Soils enhancing Solubilization of Natural Phosphate. **Article soumis pour publication au journal “Agronomy”** (IF:3.417)

## Liste des communications:

1. **Aallam Y**, Dhiba D, El Rasafi T, Damrani I, El Ossmani H, Haddioui A, Tarkka M, Hamdali H (2021). Effect of endemic rock phosphate solubilizing Actinobacteria on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) growth under field experiments. Sustainable agriculture: tools and innovation “AgriNov2021”, 27-30 Octobre, Béni Mellal, Maroc. **(Oral)**
2. **Aallam Y**, Dhiba D, El Rasafi T, Lemriss S, Haddioui A, Tarkka M, Hamdali H (2021). Growth promotion and protection against root rot of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by two rock phosphate and potassium solubilizing *Streptomyces* spp. under greenhouse conditions. Sustainable agriculture: tools and innovation “AgriNov2021”, 27-30 Octobre, Béni Mellal, Maroc. **(Oral)**
3. Aguenouz R, **Aallam Y**, Haddioui A, Hamdali H (2021). Isolation of endophytic bacteria from rhizospheric soils of *Anacyclus pyrethrum* in agulmame azegza (Beni Mellal-Khenifra region). Sustainable agriculture: tools and innovation “AgriNov2021”, 27-30 Octobre, Béni Mellal, Maroc. **(Poster)**
4. Damrani I, **Aallam Y**, El Ossmani H, Haddioui A, Hamdali H (2021). Bio solubilization of mineral compounds by *Streptomyces bellus* isolated from sugar beet soil of Beni Mellal region. Sustainable agriculture: tools and innovation “AgriNov2021”, 27-30 Octobre, Béni Mellal, Maroc. **(Oral)**
5. Bouselham M, Lemriss S, Dhiba D, **Aallam Y**, Souiri A, Haddioui A, Saïdi N, Hamdali H (2021). Actinomycetes isolated from Moroccan oat soils: Diversity and screening for phosphate biosolubilization. Sustainable agriculture: tools and innovation “AgriNov2021”, 27-30 Octobre, Béni Mellal, Maroc. **(Oral)**
6. **Aallam Y**, Bouselham M, Hakkou R, Haddioui A et Hamdali H (2018). Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from sugar beet soils of Beni-Mellal (Morocco). The international conference for research on phosphates and derivatives. 12-13 November, Phosphate days 2018, Benguerir, Maroc. **(Poster)**
7. Bouselham M, **Aallam Y**, Haddioui A, Saïdi N et Hamdali H (2018). Screening of Moroccan phosphate solubilizing Actinomycetes for the cereals growth. The international conference for research on phosphates and derivatives. 12-13 November, Phosphate days 2018, Benguerir, Maroc. **(Oral)**
8. Bouselham M, **Aallam Y**, Haddioui A, Saïdi N et Hamdali H (2018). Screening for Actinobacteria from Moroccan cereal soils: Plant nutrition and biocontrol. Congrès Internationale de Biotechnologie Verte. 1-3 November, Taroudant, Maroc. **(Oral)**
9. **Aallam Y**, Bouselham M, Haddioui A et Hamdali H (2018). Screening of Actinobacteria from sugar beet soils in Beni Mellal region (Morocco) for their Phosphate solubilizing capacities. The Fourth International American Moroccan Agricultural Sciences Conference. 9-11 May, Meknès, Maroc. **(Poster)**
10. **Aallam Y**, Bouselham M, Ouhdouch Y, Haddioui A et Hamdali H (2018). Phosphate-solubilizing Actinomycetes from sugar beet soils of Morocco: screening for their antimicrobial activities. Sixth food safety congress. 3-4 May, Istanbul, Turquie. **(Poster)**
11. **Aallam Y**, Bouselham M, Nouri M, Haddioui A et Hamdali H (2017). Isolation of phosphate rock solubilizing Actinobacteria from sugar beet soils of Beni-Mellal. The first International

conference on Biotechnology: perspective Beyond 2020. 18-19 December, Beni Mellal, Maroc. **(Poster)**

- 12.** Bouta W, Bouda S, **Aallam** Y, El Hansali M et Haddioui A (2017). Valorisation des ressources génétiques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) au profit de l'agroécologie au Maroc. Workshop National sur la Biotechnologie. 25 Février, Béni Mellal, Maroc. **(Poster)**
- 13.** Bouta W, Bouda S, **Aallam** Y, El Hansali M et Haddioui A (2016). Le lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) : culture fourragère potentielle et une alternative au niveau des zones affectées par la sécheresse. Forum International sur les changements climatiques. 18-19 Octobre, Béni Mellal, Maroc. **(Poster)**

## Remerciements

Avant de commencer, je remercie Allah tout-puissant, de m'avoir guidé durant toutes ces années de préparation de doctorat et de m'avoir donné la volonté, la patience et le courage pour finaliser ce travail. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Président de l'Université Sultan Moulay Slimane, **Prof. Dr. Nabil HMINA**, et à Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences et techniques de Beni Mellal, **Prof. Dr. Saïd MELLIANI**, pour l'intérêt qu'ils accordent à la recherche scientifique au sein de notre établissement.

Je remercie également le **Pr. Abdelmajid HADDIOUI**, responsable du Laboratoire de Biotechnologies et Valorisation des Ressources Phytogénétiques (LBVRP) pour son soutien moral aux doctorants, pour les conseils stimulants et pour les moyens fournis pour assurer le bon avancement de ma thèse. Qu'il trouve en ces peu de mots tout mon estime et ma reconnaissance.

Je voudrais remercier tout particulièrement la personne qui m'a proposé le sujet de thèse et qui m'a encadré tout au long de ces années d'études : **Pr. Hanane HAMDALI**. Je souligne surtout sa rigueur, son sens de la pédagogie et son humanisme. Elle a toujours été disponible, à l'écoute de mes nombreuses questions, et s'est toujours intéressée à l'avancée de mes travaux. Sa capacité d'analyse et son enthousiasme m'ont montré que le monde de la recherche pouvait être vraiment un univers passionnant. Enfin, ses nombreuses relectures et corrections de cette thèse ont été primordiales pour rehausser son niveau rédactionnel. Cette thèse lui doit beaucoup et pour tout cela Merci !

Un grand merci est également adressé au **Dr. Driss DHIBA**, Vice-Président – Recherche & Développement du groupe OCP dont l'aide sur le plan technique, la gentillesse inestimable, et les grandes qualités humaines m'ont permis de mener à bien mon travail. C'est également grâce à sa collaboration et son soutien incessant qui nous a ouvert les portes à d'autres collaborations très fructueuses avec d'autres organismes : UM6P-Benguerir/ LRAM-Rabat. Non seulement, il a été toujours à l'écoute mais aussi par son appui continu à notre projet de thèse par son intervention rapide et très efficace lors des corrections/révisions des publications.

Je voudrais remercier aussi **Pr. Sanaâ LEMRISS**, Chef du département de Biosécurité PCL3 et Responsable du Laboratoire de Bactériologie Mycologie Médicale de la Gendarmerie Royale de Rabat, qui nous a ouvert les portes de son laboratoire pour les analyses moléculaires des souches Actinomycétales et fongiques. Qu'elle trouve toute ma gratitude et ma reconnaissance pour tous ces efforts déployés pour avancer au mieux notre recherche.

Je remercie **Dr. Taoufik EL RASAFI** de m'avoir transmis les bonnes méthodes de travail et de m'avoir guidé pour acquérir des connaissances en essais agronomiques, la récolte et les analyses des données. Et surtout pour son soutien et appui incessant tout au long de mes travaux de thèse.

Je profite de cette occasion pour exprimer mes remerciements chaleureux aux autres membres du LBVRP spécialement le **Pr. Saïd BOUDA**, pour les conseils, encouragements et les efforts déployés quant à l'avancement de la recherche scientifique au sein du LBVRP.

Je remercie aussi les rapporteurs et les membres de jury de cette thèse.

# Sommaire

Liste des abréviations .....	13
Liste des Tableaux.....	14
Liste des figures.....	16
Résumé.....	21
Abstract.....	22
ملخص الطروحة .....	23
Introduction Générale .....	24
<b>CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	28
<b>I. Généralités sur la betterave sucrière</b> .....	29
<b>1.1. Taxonomie et botanique</b> .....	29
<b>1.2. Répartition et production mondiale de la culture de la betterave sucrière</b> .....	30
<b>1.3. Répartition et production de la betterave sucrière au Maroc</b> .....	31
<b>1.4. Importance agricole et industrielle de la betterave sucrière.</b> .....	33
<b>1.5. Contraintes de rendement de la betterave sucrière</b> .....	33
<b>1.5.1. Carence d'azote, phosphore et potassium (NPK)</b> .....	33
<b>1.5.2. Les maladies et les ravageurs de la betterave sucrière</b> .....	34
□ <b>Maladies virales</b> .....	34
□ <b>Maladies fongiques</b> .....	36
□ <b>Maladies bactériennes</b> .....	37
<b>II. Le phosphore et le potassium dans le système sol-plante</b> .....	38
<b>2.1. Phosphore</b> .....	38
<b>2.1.1. Cycle de phosphore</b> .....	38
<b>2.1.2. Le phosphate naturel</b> .....	40
<b>2.1.3. Répartition et production mondiale et Marocaine</b> .....	41
<b>2.2. Potassium</b> .....	43
<b>2.2.1. Cycle de potassium</b> .....	43
<b>2.2.2. Production et réserve mondiale de potassium</b> .....	44
<b>2.2.3. Importance agricole de potassium</b> .....	45
<b>2.3. Facteurs influençant la disponibilité du phosphore et du potassium dans la rhizosphère</b> .....	46

2.3.1.	Facteurs physiques.....	46
2.3.2.	Facteurs chimiques .....	47
2.3.3.	Facteurs biologiques .....	48
<b>III.</b>	<b>Impacts des fertilisants et des pesticides chimiques.....</b>	<b>48</b>
3.1.	Impacts environnementaux .....	48
3.2.	Impacts économiques .....	49
<b>IV.</b>	<b>Bio fertilisation des plantes et lutte biologique par les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). .....</b>	<b>50</b>
4.1.	Solubilisation de phosphate, de potassium et fixation d'azote.....	50
4.2.	La production de phytohormones.....	51
4.3.	Production des antibiotiques et le biocontrôle.....	52
<b>V.</b>	<b>Les Actinomycètes.....</b>	<b>53</b>
5.1.	Généralités .....	53
5.2.	Taxonomie.....	54
5.2.1.	Caractérisation morphologique.....	54
5.2.2.	Caractérisation physiologique et chimiotaxonomique .....	56
5.2.3.	Caractérisation génétique .....	57
5.3.	Importance agricole et environnementale des Actinomycètes .....	58
5.3.1.	Intérêt écologique.....	58
5.3.2.	Solubilisation de phosphate et de potassium naturel.....	59
5.3.3.	Production de phytohormones.....	60
5.3.4.	Production d'antibiotique .....	61
5.3.5.	Production des sidérophores.....	62
5.3.6.	Production des acides organiques.....	63
<b>CHAPITRE II : ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION D'ACTINOMYCÈTES SOLUBILISATRICES DU PHOSPHATE ET DU POTASSIUM NATURELS PRÉSENTANT DES APTITUDES MULTIPLES DE PROMOTION DE LA CROISSANCE ET DE PROTECTION DE LA BETTERAVE SUCRIÈRE.....</b>		
<b>64</b>		
<b>PARTIE 2.1. Isolement et criblage d'Actinomycètes solubilisatrices du phosphate naturel à partir des champs de la Betterave sucrière.....</b>		
<b>65</b>		
<b>I.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>65</b>
<b>II.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>66</b>
2.1.	Site d'étude et prélèvement d'échantillons de sol.....	66
2.2.	Analyse physico-chimique des échantillons de sol.....	67



2.3.	Isolement de la flore totale et des Actinomycètes .....	68
2.4.	Criblage des Actinomycètes capables d'utiliser la roche phosphatée (RP) et le tri-calcium phosphate (TCP) comme sources uniques de phosphore .....	68
2.5.	Estimation quantitative du phosphate soluble libéré dans le milieu de croissance par les souches d'Actinomycètes sélectionnées.....	69
2.6.	Production et détection de sidérophores.....	69
2.7.	Caractérisation morphologique, physiologique et chimiotaxonomique des souches sélectionnées.....	69
2.8.	Amplification et séquençage de l'ADNr 16S des souches sélectionnées .....	70
2.9.	Les analyses statistiques .....	71
III.	Résultats .....	71
3.1.	Analyse de sol.....	71
3.2.	Répartition de la flore totale et des Actinomycètes dans les champs de betterave sucrière étudiés .....	72
3.3.	Cinétique de croissance des souches d'Actinomycètes sélectionnées dans MMS + RP et MMS + TCP.....	73
3.4.	Estimation de la quantité de phosphate soluble libérée du TCP et du RP par les souches d'Actinomycètes sélectionnées.....	75
3.5.	Production des sidérophores et évaluation du pH du milieu de culture .....	76
3.6.	Caractérisation taxonomique des isolats sélectionnés.....	78
IV.	Discussion .....	82
V.	Publication 1: Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing <i>Streptomyces</i> spp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco.....	84
	PARTIE 2.2. Criblage et caractérisation d'Actinomycètes solubilisatrices du potassium naturel et présentant des aptitudes au biocontrôle contre <i>Fusarium</i> spp.....	85
I.	Introduction .....	85
II.	Matériel et Méthodes .....	87
2.1.	Les souches d'Actinomycètes.....	87
2.2.	Capacités des Actinomycètes à utiliser l'orthoclase comme seule source de potassium.....	87
2.3.	Estimation de la quantité de potassium solubilisée par les souches d'Actinomycètes sélectionnées.....	88
2.4.	Dosage de la quantité d'acide indole acétique produite (AIA).....	88
2.5.	Isolement des champignons à partir des racines de betterave sucrière infectées...	89

2.6. Identification moléculaire des champignons isolés (extraction d'ADN et amplification d'ITS).....	90
2.7. Essais <i>in vitro</i> d'activité antagoniste .....	91
2.8. Analyse statistique et détection des souches les plus prometteuses pour des applications simultanées de biofertilisation et de biocontrôle.....	92
<b>III. Résultats</b> .....	93
3.1. Cinétique de croissance des souches d'Actinomycètes sélectionnées dans MMA + Orthoclase .....	93
3.2. Estimation de la quantité de potassium solubilisée par les souches d'Actinomycètes sélectionnées.....	94
3.3. Evolution du pH du milieu .....	95
3.4. Production d'acide indole acétique (AIA).....	96
3.5. Identification des champignons isolés .....	97
3.6. Essais <i>in vitro</i> d'activité antagoniste .....	99
<b>IV. Discussion</b> .....	101
<b>V. Conclusion</b> .....	104
<b>VI. Publication 2 : Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic <i>Streptomyces</i> spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against <i>Fusarium</i> spp.</b> .....	105
<b>CHAPITRE III : EFFICACITÉ AGRONOMIQUE DES SOUCHES D'ACTINOMYCÈTES SÉLECTIONNÉES SOLUBILISATRICES DE PHOSPHATE ET DE POTASSIUM NATURELS ET LA PROTECTION CONTRE LA POURRITURE DES RACINES DE LA BETTERAVE SUCRIÈRE (<i>Beta Vulgaris</i> L.)</b> .....	106
<b>PARTIE 3.1. Caractérisation du sol et evaluation de la contamination des sols des sites d'étude en oligo-éléments toxiques des champs de la betterave sucrière.</b> .....	107
<b>I. Introduction</b> .....	107
<b>II. Matériel et méthodes</b> .....	108
2.1. Zone d'étude et échantillonnages de sol .....	108
2.2. Les analyses chimiques .....	110
2.3. Évaluation de la contamination des sols à l'aide des indices de pollution.....	110
2.3.1. Facteur d'enrichissement (EF).....	110
2.3.2. Indice de géo-accumulation.....	111
2.3.3. Facteur de contamination et degré de contamination .....	111
2.3.4. Indice de contamination potentielle .....	112
2.3.5. Indice de charge polluante (PLI) .....	112

2.4. Les analyses statistiques .....	113
<b>III. Les résultats .....</b>	<b>114</b>
3.1. Propriétés physico-chimiques des échantillons de sols .....	114
3.2. Concentrations des éléments traces dans les sols étudiés .....	114
3.3. Facteur d'enrichissement .....	116
3.4. Indice de géo-accumulation .....	117
3.5. Facteur de contamination et degré de contamination.....	117
3.6. Indice de charge polluante (PLI) .....	118
3.7. Indice de contamination potentielle.....	119
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>120</b>
<b>V. Conclusion.....</b>	<b>123</b>
<b>VI. Publication 3 : Assessing the contamination of trace toxic elements in the soils of sugar beet field (Beni-Mellal, Morocco) .....</b>	<b>124</b>
<b>PARTIE 3 .2. Efficacité agronomique des souches d'Actinomycètes solubilisatrices sélectionnées et ayant une aptitude au biocontrôle sur la croissance de la betterave sucrière (Essais agronomiques sous serre) .....</b>	
<b>125</b>	
<b>I. Introduction .....</b>	<b>125</b>
<b>II. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>127</b>
2.1. Échantillonnage et analyse du sol .....	127
2.2. Préparation de l'inoculum .....	128
2.3. Traitement des semences et expériences en pot.....	128
2.4. Analyses des plantes et des sols .....	129
2.5. Préparation de <i>Fusarium</i> spp. et conditions d'infection du sol.....	130
2.6. Analyse statistique.....	131
<b>III. Résultats .....</b>	<b>132</b>
3.1. Effet des sources de nutriments et de l'inoculation avec <i>Streptomyces bellus</i> (SB) ou <i>S. saprophyticus</i> (SS) sur la croissance de la betterave sucrière.....	132
3.2. Effet des <i>Streptomyces</i> sur la teneur en chlorophylles .....	135
3.3. Effet de l'inoculation des souches sur les teneurs en P et K dans les plantes .....	135
3.4. Effet de <i>Streptomyces</i> sur les teneurs en N, P et K dans le sol.....	137
3.5. Biocontrôle de la pourriture racinaire causée par <i>Fusarium</i> par les deux <i>Streptomyces</i> spp. sélectionnées .....	138
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>139</b>
<b>V. Conclusion.....</b>	<b>143</b>

<b>VI. Publication 4. Growth promotion and protection against root rot of sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) by two rock phosphate and potassium solubilizing <i>Streptomyces</i> spp. under greenhouse conditions</b> .....	144
<b>PARTIE 3.3. L'effet de l'inoculation des souches d'Actinomycètes sélectionnées sur le rendement agronomique de la betterave sucrière</b> .....	145
<b>(Essai agronomique au champ)</b> .....	145
<b>I. Introduction</b> .....	145
<b>II. Matériel et méthodes</b> .....	146
<b>1.1. Description de la zone d'étude et d'échantillonnages</b> .....	146
<b>1.2. Analyse physico-chimique du site d'étude</b> .....	146
<b>1.3. Préparation de l'inoculum et traitement des graines</b> .....	148
<b>1.4. Essai en plein champ sur la betterave sucrière</b> .....	148
<b>1.5. Échantillonnage des plantes et analyse des paramètres agronomiques</b> .....	150
<b>1.6. Analyses statistiques</b> .....	150
<b>III. Résultats</b> .....	151
<b>3.1. L'effet de l'inoculation avec <i>Streptomyces bellus</i> (SB) ou <i>S. saprophyticus</i> (SS) sur la croissance de la betterave sucrière</b> .....	151
<b>3.2. Effet de l'inoculation des <i>Streptomyces</i> spp. sur le rendement de la betterave à sucre</b> .....	153
<b>3.3. Effet des <i>Streptomyces</i> spp. sur la teneur en saccharose</b> .....	155
<b>3.4. Effet des <i>Streptomyces</i> spp. sur la teneur en pigments, la teneur relative en eau et la surface des feuilles</b> .....	155
<b>3.5. Effet de l'inoculation des souches sur les teneurs en N, P et K dans la betterave à sucre</b> .....	158
<b>3.6. Effet des <i>Streptomyces</i> spp. sur les teneurs en N, P et K dans le sol</b> .....	159
<b>IV. Discussion</b> .....	159
<b>SYNTHÈSE ET CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	163
<b>SCHEMA RECAPITULATIF DU TRAVAIL RÉALISÉE DANS LA THÈSE</b> .....	163
<b>PERSPECTIVES</b> .....	176
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	177

## Liste des abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
AIA :	Acide Indole Acétique
Al:	Aluminium
ATP :	Adénosine Triphosphate
ARN:	Acide Ribonucléique Ribosomique
C :	Cytosine
Ca:	Calcium
Cd :	Cadmium
Cl :	Chlore
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone (= gaz carbonique)
Fe :	Fer
G :	Guanine
h:	Heure
HPLC:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
ISP:	International <i>Streptomyces</i> Project
K :	Potassium
Mg :	Magnésium
min:	Minutes
mM:	Millimoles, millimolaires
Mn :	Manganèse
MSP :	Microorganismes solubilisatrice de phosphate
N :	Azote
Na :	Sodium
NPK :	Engrais complexe contenant de l'azote, du phosphore et de la potasse
P :	Phosphore (élément)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> :	Pentoxyde de phosphore (phosphate)
PGPB:	Plant growth promoting bacteria (bactéries promotrices de la croissance des plantes)
PM:	Poids moléculaire
PN :	Phosphate naturel
PSB :	Bactéries solubilisatrices de phosphate
rpm:	Rotations par minute
spp.:	Espèce
TSP :	Triple superphosphate

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classement des pays producteurs de la betterave à sucre selon le taux de production de 2019 en millions de tonnes (FAOSTAT 2021a).....	<b>31</b>
<b>Tableau 2.</b> La superficie occupée par la betterave sucrière dans chaque région au Maroc (COSUMAR 2020).....	<b>32</b>
<b>Tableau 3.</b> Production et réserves mondiale de la roche phosphatée (USGS 2021a).....	<b>42</b>
<b>Tableau 4.</b> Production et réserves mondiale de la roche potassique (USGS 2021b).....	<b>44</b>
<b>Tableau 5.</b> Différents chémotypes de la paroi cellulaire et leurs constituants majeurs chez les Actinomycètes (Ait Barka et al. 2016). ....	<b>57</b>
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques physico-chimiques des trois sols de betterave sucrière de la région de Béni Mellal.....	<b>72</b>
<b>Tableau 7.</b> Répartition de la flore totale et des souches d'Actinomycètes dans les trois sites de betterave à sucre de la région de Béni Mellal. ....	<b>73</b>
<b>Tableau 8.</b> Caractéristiques biochimiques et morphologiques des dix isolats sélectionnés. ....	<b>79</b>
<b>Tableau 9.</b> Identification de l'ARNr 16S des dix isolats sélectionnés. ....	<b>80</b>
<b>Tableau 10.</b> Activités antagonistes <i>in vitro</i> des dix souches de <i>Streptomyces</i> contre les trois isolats de <i>Fusarium</i> provenant des racines infectées de betterave sucrière de Béni Mellal- Maroc : Deux <i>Fusarium fujikuroi</i> (CHAMP1 ; CHAMP3) et un <i>F. equiseti</i> (CHAMP2) ; une levure : <i>Candida albicans</i> CCMM/L11 ; des bactéries pathogènes pour l'homme : <i>Escherichia coli</i> CCMM/B4 ; <i>Salmonelle sp.</i> CCMM/B17, <i>Klebsiella pneumonie E40</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> CCMM/B2 ; <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9524, <i>Streptocoque sp.</i> CCMM/B24, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCMM/B90 (zone d'inhibition ± SD cm ; pourcentage d'inhibition ± SD mm). Différentes lettres minuscules à côté des chiffres montrent des différences significatives entre les traitements à $p \leq 0,05$ . ....	<b>100</b>
<b>Tableau 11.</b> Le score des critères de sélection des 10 <i>Streptomyces</i> spp. avec des activités PGP multifonctions à partir des sols rhizosphériques de la betterave sucrière à Béni Mellal- Maroc. Les chiffres du tableau représentent un score sur 10, attribué à chaque souche en fonction de sa capacité de solubilisation, de son activité antimicrobienne et du taux de libération d'AIA et de sidérophores. ....	<b>101</b>
<b>Tableau 12 :</b> Classification des indices de pollution des sols utilisés dans la présente étude ...	<b>113</b>
<b>Tableau 13 :</b> Caractérisation physico-chimique des sols agricoles de la betterave sucrière des trois différents sites de la région de Béni-Mellal. ....	<b>114</b>
<b>Tableau 14 :</b> Concentrations en métaux lourds et métalloïdes des trois sols agricoles de la betterave à sucre de la région de Béni-Mellal.....	<b>115</b>
<b>Tableau 15 :</b> Comparaison des concentrations obtenues de certains métaux lourds et métalloïdes dans les sols agricoles de la betterave sucrière des sites testés dans la région de Béni-Mellal avec d'autres recommandations de certaines recherches dans le monde sur la qualité des sols .....	<b>116</b>
<b>Tableau 16.</b> Facteur d'enrichissement (EF), Indice de Géoaccumulation (Igeo) et Facteur de Contamination (CF) des métaux lourds et métalloïdes analysés dans les trois sols agricoles de la betterave à sucre de Béni-Mellal.....Error! Bookmark not defined.	<b>119</b>
<b>Tableau 17.</b> Indice de contamination potentielle des métaux lourds et métalloïdes analysés dans les sols agricoles de la betterave à sucre testés de la région de Béni Mellal .....	<b>119</b>

<b>Tableau 18</b> : Traitements testés dans la présente étude .....	<b>129</b>
<b>Tableau 19.</b> Estimation des concentrations de N (Azote), P (phosphate) et K (Potassium) dans le sol et effet de l'inoculation de <i>S. bellus</i> (SB) et <i>S. saprophyticus</i> (SS) avec ou sans l'ajout de phosphate naturel et/ou d'orthoclase après 60 jours de croissance de la betterave à sucre. Les valeurs sont la moyenne de cinq échantillons $\pm$ SD. ....	<b>137</b>
<b>Tableau 20.</b> Caractéristiques physico-chimiques du sol du test agronomique au champ.....	<b>147</b>
<b>Tableau 21.</b> Estimation des concentrations de N, P et K dans le sol après 180 jours de croissance de la betterave sucrière en conditions du champ. RP : graines de betterave sucrière inoculées par le phosphate naturel comme seule source de P ; SB : graines de betterave sucrière inoculées par <i>S. bellus</i> (SB) avec RP ; SS : graines de betterave sucrière inoculées avec <i>S. saprophyticus</i> (SS) ; N <sub>0</sub> P <sub>0</sub> K <sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif avec la fertilisation recommandée. Les valeurs sont la moyenne de trois échantillons $\pm$ SD. ....	<b>159</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Cycle de vie végétatif de la betterave sucrière (Drmić 2016) .....	<b>29</b>
<b>Figure 2.</b> Morphologie d'une betterave à sucre avec les noms communs des parties principales (Biancardi et al. 2010).....	<b>30</b>
<b>Figure 3.</b> Répartition nationale de la betterave sucrière (COSUMAR 2020).....	<b>32</b>
<b>Figure 4.</b> Symptômes d'infection de la betterave sucrière par (a) <i>Beet yellow virus</i> BYV, (b) <i>Beet soil-borne mosaic virus</i> , (c) <i>Beet chlorosis virus</i> et (d) <i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (Hossain et al. 2021; Fernando Gil et al. 2020). .....	<b>35</b>
<b>Figure 5.</b> Symptômes d'infection de la betterave sucrière par : <i>Rhizoctonia solani</i> (a) ; <i>Fusarium oxysporum</i> (b) ; <i>Cercospora beticola</i> (c) ; <i>Erysiphe betae</i> (d) ; <i>Aphanomyces cochlioides</i> (e). (Nechwatal et al. 2012; Jiang 2016; Vakalounakis and Kavroulakis 2017; Cao et al. 2018; Vojvodić et al. 2019).....	<b>36</b>
<b>Figure 6.</b> Les symptômes des maladies bactériennes causées par <i>Xanthomonas beticola</i> (a), <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>betavasculorum</i> , (b), <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Sepedonicus</i> (c), <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>Beticola</i> (d) et <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Aptata</i> (e) chez la betterave sucrière (Zidack and Jacobsen 2001; Chen and Yin 2007; Moliszewska et al. 2018; Nampijja et al. 2021).....	<b>37</b>
<b>Figure 7.</b> Cycle du phosphate de sol (Shen et al. 2011).....	<b>39</b>
<b>Figure 8.</b> Les réserves mondiales estimées en millions de tonnes selon l'USGS en 2007 et 2017 (De Boer 2019) .....	<b>41</b>
<b>Figure 9.</b> Dynamique du potassium dans le système du sol (Sattar et al. 2019).....	<b>44</b>
<b>Figure 10.</b> Symptômes de carence de potassium chez des plantes de maïs (Zörb et al. 2013)....	<b>45</b>
<b>Figure 11.</b> Les différents types de spores rencontrées chez les Actinomycètes (Ait Barka et al. 2016). .....	<b>55</b>
<b>Figure 12.</b> Classification phylogénétique des Actinobactéries basée sur la comparaison des séquences ADNr/ARNr 16S. La barre d'échelle représente 5 substitutions de nucléotides pour 100 nucléotides (Stackebrandt and Schumann 2006). .....	<b>58</b>
<b>Figure 13.</b> Carte des sites d'échantillonnage des trois sols agricoles de la betterave sucrière située dans la région de Béni-Mellal au Maroc. ....	<b>67</b>
<b>Figure 14.</b> Evolution de la biomasse (traits continus) et du pH du milieu (traits pointillés) des isolats d'Actinomycètes sélectionnés cultivés en MMS+ TCP (cercle noir) et MMS+ RP (cercle gris). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répliques de culture indépendants. ....	<b>74</b>
<b>Figure 15.</b> Concentration de phosphate soluble libérée ( $\mu\text{g/ml}$ ) de TriCalcium Phosphate (TCP, histogrammes gris foncé) et de Rock Phosphate naturel (RP, histogrammes gris clair) dans les flacons nonensemencés (témoins) et dans le surnageant des cultures des dix isolats sélectionnés d'Actinomycètes cultivés pendant 5 jours dans du MMS contenant 0,5 g/l de RP ou 0,5 g/l de TCP. Le rendement maximal en biomasse en $\mu\text{g/ml}$ des dix souches d'Actinomycètes sélectionnées est indiqué au-dessus des histogrammes pour TCP (cercles noirs) et RP (cercles gris). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de culture indépendantes.....	<b>75</b>



**Figure 16.** Halo de décoloration de la gélose CAS autour des bouchons de gélose des dix isolats d'Actinomycètes solubilisants les TCP/RP les plus efficaces provenant de sols de betterave sucrière de la région de Béni-Mellal cultivés pendant 5 jours dans le milieu MMS solide contenant 0,5 g/l de la surface d'une plaque de gélose CAS-bleu. La formation du halo autour des bouchons serait due à l'excrétion des sidérophores. Les diamètres des halos exprimés en mm sont indiqués à proximité du nom des isolats. .... 77

**Figure 17.** Arbre phylogénétique de proximité (Neighbor-Joining) des 10 souches isolées et 42 espèces de *Streptomyces* basé sur des séquences de gènes d'ARNr 16S presque complètes (1400 nt). Les nombres aux nœuds indiquent les niveaux de prise en charge du bootstrap (%) sur la base d'une analyse de jointure de voisins de 1 000 ensembles de données ré-échantillonnés ; seules les valeurs >50 % sont données. Les numéros d'accès sont indiqués entre parenthèses. Barre, 0.005 substitutions de nucléotides par site..... 81

**Figure 18.** Symptômes d'infection racinaire et du champ de betterave sucrière par les *Fusarium* spp., agents causaux de la pourriture des racines du site d'étude de Béni Mellal (Maroc). ..... 89

**Figure 19.** Evolution de la biomasse des souches d'Actinomycètes sélectionnées cultivées dans le liquide MMA + orthoclase. Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de culture indépendantes. .... 93

**Figure 20.** Concentration de potassium soluble libéré (mg/l) de l'orthoclase dans le surnageant des cultures des dix souches d'Actinomycètes sélectionnées (barres vertes) cultivées pendant cinq jours dans de le MMA contenant 2 g/l d'orthoclase avec des valeurs soustraites de celles des flacons non ensemencés. Le rendement maximal de la biomasse en µg/ml des 10 souches d'Actinomycètes sélectionnées est indiqué dans l'histogramme (barres bleues). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions indépendantes de culture. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements à  $p \leq 0,05$ . .... 95

**Figure 21.** Evolution du pH du milieu des souches d'Actinomycètes sélectionnées cultivées en MMA + orthoclase. Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de cultures indépendantes. .... 96

**Figure 22.** Concentration d'acide indole acétique libérée (µg/ml) dans les flacons non ensemencés (contrôle) et dans le surnageant des cultures des dix souches d'Actinomycètes sélectionnées cultivées pendant 72 h en milieu LB liquide contenant du L-tryptophane (1 g/l). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de cultures indépendantes. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements à  $p \leq 0,05$ . .... 97

**Figure 23.** Arbre phylogénétique voisin des trois souches fongiques isolées (CHAMP 1, CHAMP 2 et CHAMP 3) et 28 espèces de *Fusarium* basé sur le gène d'ARN ribosomique de petite sous-unité, séquence de l'espaceur interne transcrit 1 et le gène d'ARN ribosomique 5.8S et les séquences d'espaceur interne 2 transcrites (513 nt). Les nombres aux nœuds indiquent les niveaux de prise en charge du bootstrap (%) sur la base d'une analyse de jointure par voisins de 1000 ensembles de données ré-échantillonnés ; seules les valeurs >50% sont données. Les numéros d'accès sont indiqués entre parenthèses. La barre marque une substitution de nucléotide par site. .... 98

**Figure 24.** Comparaison de l'activité antagoniste des cinq *Streptomyces* spp. les plus performantes (1 : DE2, 2 : AYD, 3 : BYC, 4 : AI et 5 : AV) contre les trois champignons phytopathogènes isolés de la rhizosphère de betterave sucrière située à Béni Mellal-Maroc : (A) *Fusarium fujikuroi*

(CHAMP1) et (B) *F. equiseti* (CHAMP2), (C) levure : (a) *Candida albicans* CCMM/L11, bactéries pathogènes : (b) *Escherichia coli* CCMM/B4, (c) *Salmonella* sp. CCMM/B17, (d) *Klebsiella pneumonia* E40, (e) *Staphylococcus aureus* CCMM/B2..... 99

**Figure 25.** Les sites de prélèvement des trois sols agricoles de la betterave à sucre dans la région de Béni-Mellal (Maroc). ..... 109

**Figure 26.** Influence de la présence des deux souches de *Streptomyces* (*Streptomyces bellus*, SB ; *S. saprophyticus*, SS) sur la longueur et le poids sec de tissus végétaux de betterave sucrière cultivés dans un sol stérile déficient à la fois en phosphate soluble et en potassium (expérimentation en pot, un plant par pot, durée de croissance 2 mois). N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : sol sans N, P ou K et sans inoculation. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>+ SB : sol sans N, P ou K et ensemencé avec la souche SB. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>+ SS : sol sans N, P ou K et ensemencé avec la souche SS. NPK : sol avec standard N + P + K et sans inoculation. NK<sub>OT</sub>RP : sol au standard N + OT seule source de K + RP seule source de P et sans inoculation. RP + SB : sol avec standard N + OT + RP et ensemencé avec SB. RP + SS : sol avec standard N + OT + RP et ensemencé avec SS. .... 132

**Figure 27.** Effets des sources de nutriments et des *Streptomyces* sur la croissance et la physiologie de la betterave sucrière. Analyse en composantes principales des variables combinées de la croissance végétale (nombre de feuilles, poids sec des feuilles et des racines, longueur des feuilles et des racines) et des variables physiologiques de la plante (chlorophylle a, chlorophylle b, caroténoïdes, teneur en P et K des feuilles) de plantules de betterave sucrière sans inoculation par la bactérie ou avec *S. bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS), et en présence de phosphate naturel (RP) et/ou d'orthoclase (OT) comme seules sources de P et de K. Les points de données pour chaque groupe représentent des pots individuels. Sur la base d'une analyse multivariée permutative de la variance, R-carré (R<sup>2</sup>) représente la proportion de la variance qui est expliquée par le stade de croissance, les valeurs de P et le niveau de signification. .... 133

**Figure 28.** Paramètres de croissance des plantules de betterave sucrière. (A) poids sec des feuilles, (B) poids sec des racines, (C) nombre de feuilles, (D) longueur des feuilles et (E) longueur des racines des plantules de betterave sucrière sans inoculation bactérienne ou avec *Streptomyces bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS), et en présence de phosphate naturel (RP) et/ou d'orthoclase (OT) comme seules sources de P et de K. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> présente le témoin négatif. Les boxplots représentent cinq répétitions après 60 jours de culture. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements dans un p ≤ 0,05. .... 134

**Figure 29.** Paramètres physiologiques des plantules de betterave sucrière. Valeurs moyennes de (A) : chlorophylle a, (B) : chlorophylle b, (C) : teneur relative en caroténoïdes, (D) : teneur en P dans les feuilles et (E) : teneur en K dans les feuilles des plantules de betterave sucrière après inoculation de *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) et/ou d'orthoclase (OT) comme seules sources de P et de K. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif. Les valeurs sont la moyenne de cinq répétitions après 60 jours de culture et les barres d'erreurs représentent l'écart type. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements dans un p ≤ 0,05. .... 136

**Figure 30.** Influence de la présence de *Streptomyces bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS) sur la longueur des feuilles et le poids sec de betterave sucrière cultivée dans un sol inoculé avec les champignons CH1 : *Fusarium fujikuroi*, CH2 : *Fusarium equiseti* et CH3 : *Fusarium fujikuroi*. CH1 : sol ensemencé avec *F. fujikuroi*. CH2 : sol ensemencé avec *F. equiseti*. CH3 : sol ensemencé avec *F. fujikuroi*. SB+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemencé avec la souche SB et *F. fujikuroi* ou

*F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. SS+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemencé avec la souche SS et *F. fujikuroi* ou *F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. Témoin (contrôle) : Sol sans inoculation. Expérience en cinq semaines de culture. .... 138

**Figure 31.** Evaluation de l'effet des Streptomycètes sous serre contre le fusarium agent causal de la pourriture des racines chez la betterave à sucre (A) Niveaux d'infection des racines de betterave à sucre, (B) longueurs des feuilles et des racines, (C) nombre de feuilles et (D) teneur en chlorophylles et en caroténoïdes des plantules de betterave à sucre, après cinq semaines de culture, avec inoculation de *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de trois champignons CH1 : *Fusarium fujikuroi*, CH2 : *Fusarium equiseti* et CH3 : *Fusarium fujikuroi*. CH1 : sol ensemencé avec *F. fujikuroi*. CH2 : sol ensemencé avec *F. equiseti*. CH3 : sol ensemencé avec *F. fujikuroi*. SB+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemencé avec la souche SB et *F. fujikuroi* ou *F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. SS+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemencé avec la souche SS et *F. fujikuroi* ou *F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. Témoin : Sol sans inoculation. Les moyennes de cinq répétitions et les barres d'erreurs représentent l'écart type. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements dans un  $p \leq 0,05$ . .... 139

**Figure 32.** Schéma de l'expérimentation sur le terrain..... 149

**Figure 33.** La zone d'étude et les résultats obtenus de l'expérience en plein champ ..... 151

**Figure 34.** Suivi de la longueur des racines et des tiges (cm) de betteraves sucrières pendant 6 mois après l'inoculation par *Streptomyces bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif ; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions et les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements et les majuscules indiquent des différences significatives entre les mois dans la limite de  $p \leq 0,05$ . .... 152

**Figure 35.** Suivi de la matière sèche des racines et des tiges de betteraves sucrières pendant 6 mois après inoculation de *Streptomyces bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif ; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les valeurs sont la moyenne de quatre répétitions et les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements à l'intérieur de  $p \leq 0,05$ . .... 153

**Figure 36.** Paramètres de croissance des plantes de betterave à sucre. (A) Rendement en tiges, (B) Rendement en racines et (C) Diamètre des racines des plants de betteraves sucrières sans inoculation bactérienne ou avec *S. bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS), et en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> marque le témoin négatif. Les boxplots représentent quatre répétitions après 6 mois de culture. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements dans la limite de  $p \leq 0,05$ . .... 154

**Figure 37.** Teneur en saccharose des betteraves sucrières après inoculation par *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif ; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les boxplots représentent quatre répétitions après 6 mois de culture. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements dans la limite de  $p \leq 0,05$ . .... 155

**Figure 38.** Effets de l'inoculation de *Streptomyces* sur les valeurs moyennes de (A): teneur en chlorophylle a, (B) : teneur en chlorophylle b, (C): teneur en caroténoïdes et (D) : contenu relatif en eau. (NPK) représente le témoin positif avec l'engrais minéral recommandé, (RP) : traitement avec le phosphate naturel seul, et (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>) représente le témoin négatif sans fertilisation et sans inoculation bactérienne. Des plantes de betterave à sucre avec inoculation bactérienne avec *Streptomyces bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS) et le RP comme seule source de P. Les valeurs sont la moyenne de quatre répétitions et les barres d'erreur représentent l'écart type. Les lettres différentes au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements et les lettres majuscules indiquent des différences significatives entre les mois dans la limite de  $p \leq 0,05$ .

..... 157

**Figure 39.** Estimation de N, P et K dans les racines et les tiges de betterave à sucre après inoculation de *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif ; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les boxplots représentent quatre répétitions après 6 mois de culture. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements dans la limite de  $p \leq 0,05$ .

..... 158

## Résumé

L'objectif de cette thèse est d'explorer la capacité des souches d'Actinomycètes isolés de la rhizosphère de la betterave sucrière dans la région de Béni Mellal-Khenifra (Maroc) à solubiliser le phosphate (P) et le potassium (K) naturels et à limiter la croissance des *Fusarium* spp., champignons phytopathogènes isolés des champs infectés de la betterave à sucre, en vue de développer de nouveaux bio-produits ayant à la fois les activités de biofertilisants et de biocontrôle.

Parmi les 164 isolats d'Actinomycètes étudiés, seuls 27 avaient la capacité de croître sur un milieu minimum synthétique (MMS) contenant le phosphate naturel (PN) et le tri-calcium phosphate (TCP) insolubles comme seules sources de P. Seuls les 10 isolats ayant montré la croissance la plus active sur MMS+PN ont été retenus pour les études ultérieures. Par la suite, le suivi de la concentration du P relarguée dans le MMS+ PN et MMS+ TCP liquides a été réalisé pendant 5 jours de culture pour les 10 isolats sélectionnés. Une solubilisation effective et marquante a été démontrée pour les deux formes de P insolubles et pour les isolats étudiés. Ainsi, la quantité de P solubilisée varie de 148.05 µg/ml à 3.05 µg/ml dans le cas du PN et de 180.83 µg/ml à 1.94 µg/ml dans le cas de TCP. De plus, ces 10 isolats ont montré la capacité à produire des sidérophores. Cette aptitude peut être l'un des mécanismes impliqués dans la solubilisation de P puisqu'une acidification significative a été aussi soulevée lors de la culture pour certaines souches.

Les 10 isolats étudiés ont montré aussi une capacité à solubiliser le potassium naturel (KN), sous forme d'orthoclase, comme seule source de K. La quantité de K soluble libérée allait de 3,8 mg/l à 216,6 mg/l après 5 jours de culture sur le milieu Alexandrof liquide. Une évaluation de la production de l'acide indole acétique (AIA) a été réalisées sur le milieu liquide Luria-Bertani supplémenté en L-tryptophane et a révélé la capacité des 10 isolats à produire de l'AIA à un taux très élevé allant jusqu'à 22,3 g/ml. Nous avons par la suite montré que les 10 isolats ont une activité de biocontrôle contre des microorganismes tests et contre les trois espèces de *Fusarium* spp. isolés et identifiées à partir des champs de la betterave à sucre infectés et ceux à différents pourcentages d'inhibition (PI) allant de 6,9 % à 55,4 %. La caractérisation moléculaire des 10 isolats a montré qu'ils appartenaient au genre *Streptomyces*.

Par la suite une évaluation de la contamination des sols des sites d'étude en oligo-éléments toxiques a été réalisée en utilisant les différents indices spécifiques. Les résultats obtenus montrent que certains sols agricoles étudiés étaient contaminés par divers métaux lourds et métalloïdes tels que l'As, Ba, B, Co, Ge, Nb et Mo. Un sol non pollué a ainsi pu être sélectionné pour nos études ultérieures sur l'efficacité agronomique des souches d'actinomycètes les plus performantes.

Par ailleurs, l'effet de l'inoculation des graines certifiées de la betterave sucrière par deux souches (*Streptomyces bellus*, SB, et *S. saprophyticus*, SS) les plus performantes dans un sol enrichi par le PN ou le KN a été évalué lors des essais sous serre en conditions contrôlées. Les résultats montrent que ces souches augmentent le taux de la matière sèche des racines, le nombre des feuilles et la longueur des tiges et des racines de la betterave sucrière par rapport aux traitements non inoculés. De plus, la souche SB, en particulier, influencent positivement les taux de chlorophylles et des caroténoïdes de la betterave sucrière. Ainsi, ces deux souches ont montré un effet protecteur efficace contre la pourriture racinaire causée par *Fusarium equiseti* et *F. fujikuroi* qui est de 100% et 75%, respectivement. D'autres essais agronomiques au champ ont été conduits dans un champ non pollué, non prétraité par l'intrant chimique et naturellement pauvre en P et K. Les deux souches testées ont amélioré le rendement de la betterave à sucre par rapport aux témoins (plantes non inoculées).

Cette étude a démontré que les Actinomycètes endémiques de la rhizosphère de la betterave à sucre possèdent des capacités intéressantes et multiples de leurs aptitudes de solubilisation de PN et KN, de productions des hormones de croissance, des acides organiques et des sidérophores jusqu'à des capacités de biocontrôle contre les phytopathogènes. Ce travail de thèse pourrait contribuer à l'élaboration d'un nouveau BIO-ENGRAIS et BIO-FONGICIDE bénéfique pour la nutrition et la protection des plantes et plus respectueux de l'environnement que les engrais chimiques actuellement utilisés.

**Mots clés :** Actinomycètes, isolement, solubilisation, phosphate naturel, potassium naturel, betterave sucrière, biocontrôle.

## Abstract

The objective of this thesis was to explore the ability of Actinomycete strains isolated from the rhizosphere of sugar beet in the Beni Mellal-Khenifra region (Morocco) to solubilize natural rock phosphate (RP) and rock potassium (RK) and to limit the growth of *Fusarium* spp., phytopathogenic fungi isolated from infected sugar beet fields in order to develop new bio-products with both biofertilizer and biocontrol activities.

Among the 164 Actinomycete isolates, only 27 isolates had the ability to grow on a synthetic minimum medium (SMM) containing insoluble rock phosphate (RP) and tri-calcium phosphate (TCP) as the unique P sources. Only the 10 isolates that showed the most active growth on SMM+RP were retained for further studies. Thereafter, the monitoring of the concentration of P released in the liquid SMM+ RP and SMM+ TCP was carried out for 5 days of culture for the 10 selected isolates. An effective and significant solubilization was demonstrated for both insoluble P forms. Thus, the amount of solubilized P varied from 148.05 µg/ml to 3.05 µg/ml in the case of RP and from 180.83 µg/ml to 1.94 µg/ml in the case of TCP. In addition, all 10 isolates have showed the ability to produce siderophores. This ability may be one of the mechanisms involved in the solubilization of P in addition to a significant acidification observed during culture for some strains.

These 10 isolates studied also showed an ability to solubilize natural rock potassium (RK), in the form of orthoclase, as the only source of K. The amount of soluble K released varied greatly between strains and ranged from 3.8 mg/l to 216.6 mg/l after 5 days of culture on liquid Alexandrof medium. An evaluation of the production of indole acetic acid (IAA) was carried out on Luria-Bertani liquid medium supplemented with L-tryptophan and revealed the capacity of the 10 isolates to produce IAA at a very high level up to at 22.3 g/ml. We subsequently showed that all isolates have biocontrol activity against test microorganisms and against the three species of *Fusarium* spp. isolated and identified from infected sugar beet fields and those at different inhibition percentage (IP) ranging from 6.9% to 55.4%. Molecular characterization of the 10 isolates showed that they belonged to the genus *Streptomyces*.

An evaluation of the of the study sites soils contamination with toxic trace elements was carried out using various specific indices. The results obtained show that some agricultural soils studied were contaminated by various heavy metals and metalloids such as As, Ba, B, Co, Ge, Nb and Mo. The results obtained show that some of the agricultural soils studied were contaminated by various heavy metals and metalloids such as As, Ba, B, Co, Ge, Nb and Mo. This allowed us to select the best (unpolluted) soil for our further studies on the agronomic efficiency of the selected best performing strains.

In addition, the effect of inoculating certified sugar beet seeds with two strains (*Streptomyces bellus*, SB, and *S. saprophyticus*, SS) that more effective in soil enriched with RP or RK was conducted in greenhouse trials under controlled conditions. The results showed that these strains improve the root dry matter rate, the number of leaves and the length of stems and roots of sugar beet compared to non-inoculated treatments. In addition, the SB strain, in particular, positively influences the chlorophyll and carotenoid levels of sugar beet. Thus, these two strains showed an effective protective effect against root rot caused by *Fusarium equiseti* and *F. fujikuroi* which is 100% and 75%, respectively. Other agronomic field trials were conducted in an unpolluted field, not pre-treated with chemical inputs and naturally low in P and K. Both strains tested improved sugar beet yields compared to the controls (non-inoculated plants).

This study demonstrated that Actinomycetes endemic to the rhizosphere of sugar beet in the Beni Mellal region have interesting and multiple capacities for the solubilization of RP and RK, the production of growth hormones, organic acids, siderophores and also for biocontrol against phytopathogens. This thesis work could contribute to the development of a new BIO-ENGRAIS and BIO-FUNGICIDE beneficial for plant nutrition and protection and more environmentally friendly than the chemical fertilizers currently used.

**Key words:** Actinomycetes, isolation, solubilization, rock phosphate, rock potassium, sugar beet, biocontrol.

## ملخص الطروحة

كان الهدف من هذه الأطروحة هو استكشاف قدرة سلالات الأكتينوميستات المعزولة من جذور الشمندر السكري في منطقة بني ملال خنيفرة (المغرب) على إذابة الفوسفات (P) والبيوتاسيوم (K) والحد من نمو *Fusarium spp*. وهي فطريات ممرضة للنبات معزولة من حقول الشمندر السكري مصابة بالفطريات، و تهدف أطروحتنا لتطوير منتجات بيولوجية جديدة كالأسمدة الحيوية ومبيدات مكافحة البيولوجية.

من بين 164 نوع من الفطريات الشعاعية الأكتينوميستات المعزولة ، كان لدى 27 نوع فقط القدرة على النمو في وسط صناعي صغير (MMS) يحتوي على فوسفات طبيعي غير قابل للذوبان (PN) وفوسفات ثلاثي الكالسيوم (TCP) كمصدر وحيد للفوسفات. تم الاحتفاظ فقط بالعشر العزلات التي أظهرت النمو الأكثر نشاطاً على MMS + PN لمزيد من الدراسات. بعد ذلك ، تم إجراء مراقبة لتركيز الفوسفور المحرر في سائل MMS + PN و MMS + TCP لمدة 5 أيام من الثقافة للعزلات العشر المختارة. تم إثبات ذوبان فعال وهام لشكلي الفوسفور غير القابل للذوبان بالنسبة للسلالات المدروسة وهكذا ، فإن كمية الفوسفور المذاب تختلف من 148.05 ميكروغرام / مل إلى 3.05 ميكروغرام / مل في حالة PN ومن 180.83 ميكروغرام / مل إلى 1.94 ميكروغرام / مل في حالة TCP. بالإضافة إلى ذلك ، فإن هذه السلالات العشر لديها القدرة على إنتاج حوامض الحديد. قد تكون هذه القدرة واحدة من الآليات المشاركة في إذابة الفوسفور حيث تم رفع نسبة الحموضة بشكل كبير أثناء نمو بعض السلالات. وتشير هذه النتائج إلى أن آلية ذوبان تعتمد على إنتاج الأحماض العضوية وكذلك المواد المخيلية (حوامض الحديد) بواسطة سلالات محدد.

أظهرت العزلات العشر التي تمت دراستها أيضاً قدرة على إذابة البيوتاسيوم الطبيعي (KN)، في شكل أورثوكلاز ، كمصدر وحيد للبيوتاسيوم. تراوحت كمية البيوتاسيوم القابل للذوبان من 3.8 مجم / لتر إلى 216.6 مجم / لتر بعد 5 أيام من الزراعة على وسط الكسندروف السائل. تم إجراء تقييم لإنتاج حمض الأسيتيك الإندول (IAA) على وسط سائل Luria-Bertani المضاف إليه L-tryptophan وكشف عن قدرة 10 عزلات على إنتاج IAA بمعدل مرتفع جداً يصل إلى 22.3 جم / مل. أظهرنا لاحقاً أن العزلات العشر لها نشاط مكافحة الحيوية ضد الكائنات الحية الدقيقة المختبرة وضد الأنواع الثلاثة من *Fusarium spp*. معزولة ومحددة من حقول بنجر السكر المصابة وتلك ذات النسب المئوية المختلفة للكبح (PI) والتي تتراوح من 6.9% إلى 55.4%. أظهر التوصيف الجزيئي للعزلات العشر أنها تنتمي إلى جنس الستربتوميثاسات.

بعد ذلك ، تم إجراء تقييم لتلوث تربة مواقع الدراسة بالعناصر النزرة السامة باستخدام مؤشرات محددة مختلفة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن بعض أنواع التربة الزراعية التي تمت دراستها ملوثة بالعديد من المعادن الثقيلة والمعادن مثل As و Ba و B و Co و Ge و Nb و Mo. وبالتالي يمكن اختيار تربة غير ملوثة لدراساتنا اللاحقة حول الكفاءة الزراعية للسلالات الشعاعية الأكثر كفاءة.

بالإضافة إلى ذلك، فإن تأثير تلقيح البذور المعتمدة من الشمندر السكري بسلالتين (*Streptomyces bellus* : SB، *S. saprophyticus* : SS) الأكثر فعالية في تربة مخصبة بالفوسفات والبيوتاسيوم الطبيعيين داخل البيوت المغطاة تحت ظروف خاضعة للرقابة. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن هذه السلالات تحسن المادة الجافة للجذور وعدد الأوراق وطول سيقان وجذور الشمندر السكري مقارنة بالنباتات غير الملقحة. بالإضافة إلى ذلك ، تؤثر سلالة SB، على وجه الخصوص، بشكل إيجابي على مستويات الكلوروفيل والكاروتينات في بنجر السكر. كذلك، أظهرت هاتان السلالتان تأثير وقائي فعال ضد تعفن الجذور الناجم عن *F. fujikuroi* و *Fusarium equiseti* بنسبة 100% و 75% على التوالي. أجريت تجارب ميدانية زراعية أخرى في حقل غير ملوث، ولم تتم معالجته مسبقاً بالمدخلات الكيميائية ومنخفضة بشكل طبيعي في P و K. حسنت السلالتان المختبرتان محصول بنجر السكر مقارنة بالضوابط (النباتات غير الملقحة).

أوضحت هذه الدراسة أن الفطريات الشعاعية المستوطنة في جذر الشمندر السكري في منطقة بني ملال، تمتلك قدرات مثيرة للاهتمام ومقدرة على إذابة PN و KN، وإنتاج هرمونات النمو ، والأحماض العضوية وحوامض الحديد ، وكذلك مكافحة البيولوجية ضد مسببات الأمراض النباتية. يمكن أن يساهم هذا البحث في تطوير سماد حيوي جديد ومبيد حيوي للفطريات مفيد لتغذية وحماية النباتات وأكثر احتراماً للبيئة من الأسمدة الكيماوية المستخدمة حالياً.

**الكلمات المفتاحية:** الأكتينوميستات، العزل، إذابة، الفوسفات الطبيعي، البيوتاسيوم الطبيعي، الشمندر السكري، مكافحة البيولوجية.

## Introduction Générale

L'accroissement de la population mondiale exerce une pression sur la production agricole afin d'assurer les besoins nutritionnels des populations. Cet accroissement de production agricole épuise les sols en éléments nutritifs et surtout le phosphore et le potassium. Ces deux éléments représentent des facteurs limitants à la croissance des plantes. Dans les cellules végétales, le phosphore (P) est un composant majeur des acides nucléiques, des lipides membranaires et des intermédiaires phosphorylés du métabolisme énergétique (Shen et al. 2011). Ainsi, le potassium (K) contribue à la résistance des plantes aux maladies, aux ravageurs et aux stress abiotiques, par activation de plus de 80 enzymes différentes responsables des processus végétaux et des enzymes importantes de la tolérance à la sécheresse et de l'efficacité de l'utilisation de l'eau (Bagyalakshmi et al. 2017; Etesami et al. 2017). Donc, pour compenser l'épuisement des sols en P et K et avoir un meilleur rendement les agriculteurs reposent principalement sur l'agriculture intensive et l'utilisation des engrais chimiques. L'utilisation de ces derniers provoque des dommages environnementales tels que la pollution des eaux de surface et souterraines, l'eutrophisation des cours d'eau, l'épuisement de la fertilité des sols et l'accumulation de métaux lourds dans le sol et dans les tissus végétaux, affectant ainsi la valeur nutritionnelle des produits agricoles et de la santé humaine (Alori et al. 2017; Musa et al. 2020). En plus de la pollution, les engrais chimiques sont très chères ce qui engendre une augmentation des coûts de production agricole (Zhao et al. 2014; Nyoki and Ndakidem 2016).

Aujourd'hui, les chercheurs doivent s'orienter vers le développement des produits complémentaires écologiques qui remplacent les pratiques traditionnelles d'utilisation des produits agrochimiques et qui assure une production agricole rentable pour l'agriculteur et sains pour le consommateur. Ainsi, les méthodes alternatives de fertilisation du sol sont la fertilisation organique, y compris l'ajout de fumier et de résidus végétaux, l'utilisation de légumineuses comme fertilisation verte et l'utilisation de microorganismes du sol (Miransari 2011).

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes «Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)» font partie des microorganismes du sol qui contribuent grandement à l'amélioration de la croissance des plantes et de l'augmentation des rendements (Miransari 2011; Chauhan et al. 2013; Prasad et al. 2019). Les PGPR stimulent la croissance des plantes par la fixation des nutriments dans la rhizosphère, la production des stimulants de croissance pour les



plantes, l'amélioration de la stabilité du sol, assurer le contrôle biologique, la biodégradation des substances, le recyclage des nutriments, la stimulation de la symbiose des mycorhizes et le développement des processus de bioremédiation dans les sols contaminés par des substances toxiques (Rivera-cruz et al. 2008; Mosa et al. 2014). Ces bactéries sont capables de solubiliser les formes inorganiques de P telle que la roche phosphatée (RP) et du potassium minéral tel que K-feldspath (Das and Pradhan 2016; Xiao et al. 2019). D'ailleurs, plusieurs études ont rapporté le rôle de différentes bactéries isolées de plusieurs écosystèmes dans la solubilisation de P et du K minéral (Sugumaran and Janarthanam 2007; Diep and Hieu 2013; Majeed et al. 2015; Meena et al. 2015; Suleman et al. 2018; Reyes-castillo et al. 2019). De plus, certaines bactéries solubilisatrices de P et de K naturels montrent des activités de biocontrôle de certains phytopathogènes par excrétion des molécules antimicrobiennes et antifongiques comme l'exemple de *Burkholderia gelatini* et *Pseudomonas geniculate* (Lau et al. 2020), *Bacillus subtilis* (Bolivar-anillo et al. 2021), *Brevibacterium antiquum* et *Acinetobacter tandoii* (Gopalakrishnan et al. 2012).

Les Actinomycètes font partie des PGPR et le sol représente leur habitat le plus important (Anandan et al. 2016). Une intention particulière a attiré plusieurs chercheurs au rôle des Actinomycètes dans la solubilisation de P et du K naturels (Hamdali et al. 2008a,b,c; Hamdali et al., 2010, 2011, 2012, 2021; Olanrewaju and Babalola 2018; Hamid et al. 2020; Aallam et al. 2021a,b; Boubekri et al. 2021). Ces dernières produisent aussi une multiple variété de métabolites secondaires avec des intérêts commerciaux intéressants (Anandan et al. 2016) tels que l'acide indole acétique (AIA), l'acide gibbérellique, la cyanure d'hydrogène et l'ammoniac (Zamoum et al. 2017; Lau et al. 2020; Aallam et al. 2021a; Boubekri et al. 2021). De plus, les Actinomycètes sont une source importante de nouveaux antibiotiques tels que les bêtalactamines, les tétracyclines, les rifamycines, les aminosides, les macrolides et les glycopeptides (Genilloud 2017; Simeis and Serra 2021). Tandis que, 70% des antibiotiques découverts jusqu'à maintenant sont produits par les Actinomycètes (Nanjwade et al. 2010). Pour cela, plusieurs souches Actinomycétales sont utilisées dans le contrôle biologique des phytopathogènes tel que : *Fusarium* spp. (Aallam et al. 2021a,b) *Rhizoctonia solani* (Zamoum et al. 2017), *Cercospora sojina* et *Macrophomia phaseolina* (Solans et al. 2016). Cependant, les Actinomycètes produisent d'autres substances impliquées dans le mécanisme de bio-contrôle tel que les chitines et les sidérophores ( Hamdali et al. 2008a; Musa et al. 2020; Aallam et al. 2021a; Hamdali et al. 2021).

À cet égard, l'objectif principal de notre projet de thèse s'installe dans ce cadre. Donc, nous visons à explorer la capacité des souches d'Actinomycètes isolés de la rhizosphère de la betterave sucrière dans la région de Béni Mellal - Khenifra (Maroc) à solubiliser le P et le K naturels et à limiter la croissance des *Fusarium* spp., champignons phytopathogènes isolés des champs infectés de la betterave à sucre, en vue de développer de nouveaux bio-produits ayant à la fois les activités de biofertilisants et de biocontrôle

Afin d'atteindre cet objectif, le présent manuscrit est organisé en quatre chapitres :

**Le chapitre 1** présente une synthèse bibliographique comprenant des généralités sur la betterave sucrière, son importance au niveau mondial et national, son besoin nutritionnel en élément majeur tels que l'azote, le phosphore et le potassium, aussi bien les maladies virales, bactériennes et fongiques attaquant la betterave à sucre. Par la suite, nous avons cité l'importance des deux éléments 'phosphore' et 'potassium' dans le système sol-plante et en agriculture, leurs réserves mondiales et à l'échelle nationale ainsi que les facteurs influençant leurs disponibilités aux plantes. Nous enchaînons par le problème d'utilisation des engrais chimiques et leur impact environnemental. Par la suite, nous avons montré l'importance des PGPR et leurs rôles comme alternative/complémentarité des engrais chimiques et des pesticides. A la fin de ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur les Actinomycètes, leurs caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques et génétiques, et leurs importances agricoles et environnementales.

**Le chapitre 2** intitulé « Isolement et caractérisation d'Actinomycètes solubilisatrices du phosphate et du potassium naturel présentant des aptitudes multiples de promotion de la croissance et de protection de la betterave sucrière ». La première partie de ce chapitre est consacré à la caractérisation des échantillons de sol et au criblage des souches d'Actinomycètes à partir du sol de la betterave sucrière de la région Béni Mellal - Khenifra. Après, nous avons examiné leurs capacités à solubiliser la roche phosphatée (RP) et le triple calcium phosphate (TCP) en tant que sources insolubles de phosphate. Les meilleures souches sélectionnées, selon leurs capacités solubilisatrices de RP et de TCP, ont été identifiées morphologiquement, chimiquement et génotypiquement. Les 10 souches sélectionnées ont été également testées pour leurs capacités à produire les sidérophores. La deuxième partie de ce chapitre illustre la capacité des souches sélectionnées à solubiliser le potassium naturel et la quantité libérée de K à partir d'orthoclase (source insoluble de K) ainsi que leur capacité à produire l'acide indole acétique (AIA). Cette

partie met aussi l'accent sur la capacité antagoniste de nos souches contre des bactéries pathogènes et des champignons phytopathogènes isolés à partir des plantes de betterave à sucre dans un champ contaminé.

**Le chapitre 3** intitulé « Caractérisation du sol et évaluation de la contamination des sols des sites d'étude en oligo-éléments toxiques des champs de la betterave sucrière. » Nous évaluons à travers ce chapitre la contamination des échantillons de sol de la betterave sucrière par les éléments traces toxiques. Cette évaluation a été réalisée par le calcul des indices de pollution tels que le facteur d'enrichissement (EF), l'indice de géo-accumulation (Igeo), le facteur de contamination (CF), le degré de contamination (Cdeg) et l'indice de contamination potentielle (Cp).

**Le chapitre 4** intitulé « Efficacité agronomique des souches d'Actinomycètes sélectionnées solubilisatrices de phosphate et de potassium naturels et protection contre la pourriture des racines de la betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) ». Ce chapitre est subdivisé en deux parties. La première est consacrée aux essais agronomiques sous serre. Nous avons testé l'impact de l'inoculation de deux souches les plus performantes d'Actinomycètes sélectionnées combinées avec la RP et l'orthoclase comme source de P et K, sur la croissance et la nutrition de la betterave sucrière. Nous avons évalué aussi leurs capacités de biocontrôle de la pourriture des racines causée par des espèces de *Fusarium* spp. La seconde partie porte sur les essais agronomiques au champ. Nous évaluons à travers cette dernière partie la possibilité d'utiliser les souches d'Actinomycètes en synergie avec la RP comme un biofertilisant qui améliore le rendement agronomique de la betterave sucrière en des essais agronomiques en plein champ.

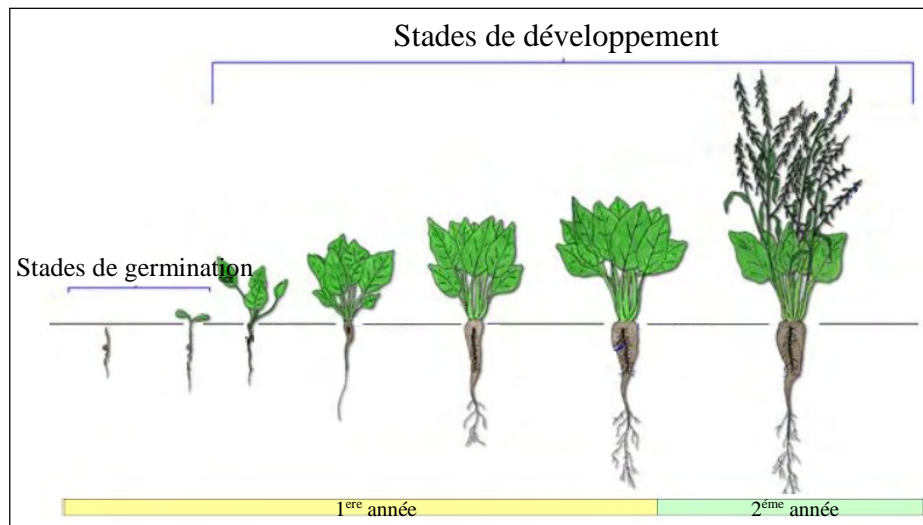
La dernière partie de ce manuscrit, présente une **synthèse et conclusion générale**, qui résume les résultats les plus importants obtenus dans le cadre de cette thèse. Le manuscrit s'accomplit par des **perspectives et des recommandations** à fin d'assurer une continuité du travail.

# **CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Généralités sur la betterave sucrière

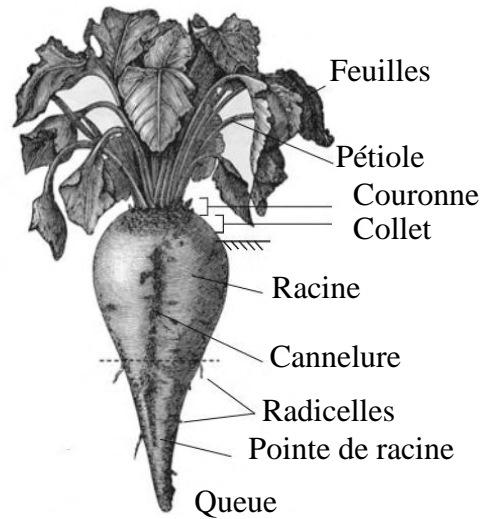
### 1.1. Taxonomie et botanique

La betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) appartient au genre *Beta*, famille des *Chenopodiaceae*. Elle est originaire du bassin méditerranéen (Draycott 2006). Elle est cultivée pour sa racine riche en saccharose, dont la teneur varie de 15 à 20% (Fasahat et al. 2018). La betterave est une plante bisannuelle. Au cours de la première année du cycle, appelée période végétative, la plante se développe et accumule un stock de sucre dans sa racine (Figure 1) (Jung 2005). La deuxième année correspond à la phase reproductive pendant laquelle la plante puise ses réserves pour produire des fleurs et des graines (Rodrigues et al. 2020). Toutes les betteraves sucrières connues aujourd'hui au monde prennent leur origine de la betterave sauvage *B. vulgaris ssp. maritima* qui serait la forme ancestrale de la betterave cultivée (Jung 2005).



**Figure 1.** Cycle de vie végétatif de la betterave sucrière (Drmić 2016)

La betterave sucrière possède un système racinaire aussi puissant qui se divise en 4 parties : la couronne, le collet, la racine pivotante et la queue (Figure 2). La tête est une partie au-dessus du sol, sur laquelle les feuilles croissent. Sa hauteur est de 2 à 3 cm. Le collet est une partie haute rétrécie qui est également située au-dessus du sol, sa hauteur est de 3 à 8 cm. La racine pivotante est la partie la plus importante de la betterave sucrière, habituellement sa longueur moyenne est de 25 à 27 cm. Les cannelures, sur lesquels les racines croissent se trouvent des deux côtés de la racine. Les racines peuvent atteindre une longueur de 2,5 m (Biancardi et al. 2010; Loginova 2011).



**Figure 2.** Morphologie d'une betterave à sucre avec les noms communs des parties principales (Biancardi et al. 2010)

### 1.2. Répartition et production mondiale de la culture de la betterave sucrière

Une fois établie en Europe, la betterave à sucre a été transportée dans d'autres régions du monde de l'Amérique vers l'Asie et aussi dans l'Afrique du Nord. Malgré sa répartition dans le monde entier, la betterave est essentiellement une culture cultivée dans les régions tempérées, comme culture d'été dans les climats maritimes, des prairies semi-continentales et dans certains climats semi-arides et arides et comme culture d'hiver et / ou d'été en Méditerranée et dans d'autres conditions semi-arides et arides (Draycott 2006; Taški-Ajduković et al. 2017).

La betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) est l'une des premières matières principales pour la production de sucre dans de nombreux pays. Elle est considérée comme la deuxième culture la plus importante au monde après la canne à sucre, pour la production de saccharose (Leilah and Khan 2021). En effet, 30% des besoins des sucres au niveau mondial sont assurés par la betterave sucrière (Zhang et al. 2017). Les champs de la betterave occupent une surface d'environ  $4.6 \times 10^6$  hectares, avec une production de  $2.8 \times 10^8$  tonnes en 2019. La Russie et la France sont les principaux producteurs de betterave sucrière dans le monde entier (FAOSTAT 2021a) (Tableau 1). Selon les dernières statistiques présentées par la FAO (Food and Agricultural Organisation) en 2019, la Fédération de Russie était la plus grande productrice de betterave à sucre au monde avec

une production totale de 54,3 millions de tonnes, suivie par la France avec 38.02 millions de tonnes, et l'Allemagne avec 29.73 millions de tonnes (FAOSTAT 2021a).

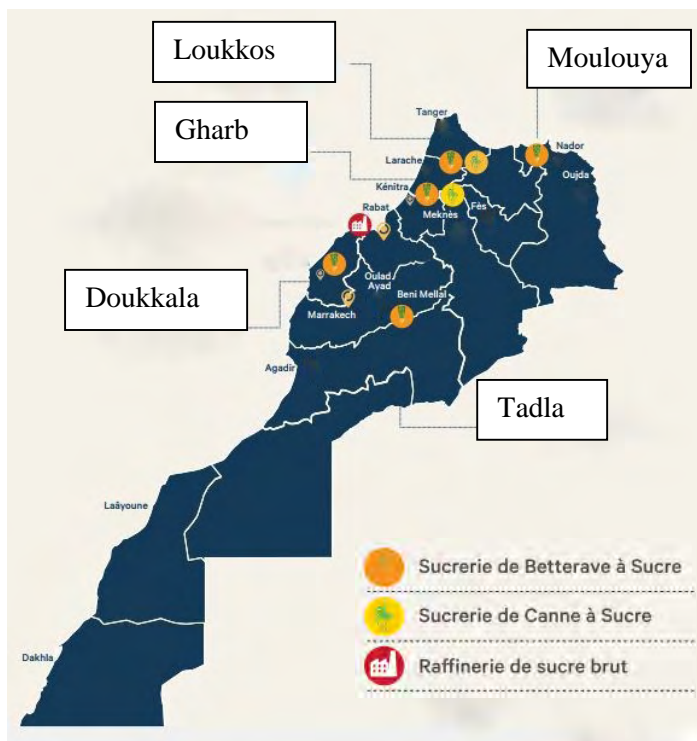
**Tableau 1.** Classement des pays producteur de la betterave à sucre selon le taux de production de 2019 en millions de tonnes (FAOSTAT 2021a).

<b>Production de la betterave à sucre en millions de tonnes. Chiffres 2019</b>	
 Russie	54,35
 France	38,02
 Allemagne	29,73
 États-Unis	25,95
 Turquie	18,09
 Pologne	13,84
 Chine	12,27
 Égypte	10,53
 Ukraine	10,20
 Royaume-Uni	7,45
<b>Total Mondial</b>	<b>278,50</b>

### **1.3. Répartition et production de la betterave sucrière au Maroc**

Au Maroc, la filière sucrière a constitué une composante essentielle de la politique de développement du secteur agricole national et a bénéficié d'importants investissements publics. En effet, au Maroc une augmentation très significative de la production de la betterave à sucre a été enregistré depuis son introduction en 1962. Elle occupe annuellement une superficie d'environ 65.000 hectares pour une production de près de 500.000 tonnes de sucre, cela a permis d'atteindre un taux d'autosuffisance alimentaire en sucre de près de 50% (Redani 2015). Au niveau national, la betterave sucrière couvre plus de 80% de la superficie totale des cultures sucrières, répartie dans cinq régions, Loukkos, Tadla, Moulouya, Doukkala et Gharb (Figure 3) (Chenaoui et al. 2017; Tobi et al. 2021). Au Maroc, cette culture représente la plus importante source de sucre blanc après la canne à sucre (Chenaoui et al. 2017). Selon le rapport financier annuel de COSUMAR, la betterave à sucre occupe une superficie de 15 000 hectare dans la région de Béni Mellal-Khenifra

(COSUMAR 2020) (Tableau 2), ce qui représente environ 26 pourcent de la production nationale de sucre et joue un rôle essentiel dans le développement économique local (Jabir et al. 2021).



**Figure 3.** Répartition nationale de la betterave sucrière (COSUMAR 2020)

**Tableau 2.** La superficie occupée par la betterave sucrière dans chaque région au Maroc (COSUMAR 2020).

Région	Superficie en ha
<b>Doukkala</b>	20 000
<b>Gharb</b>	17 000
<b>Tadla</b>	15 000
<b>Moulouya</b>	6 000
<b>Loukkos</b>	4 000



#### **1.4. Importance agricole et industrielle de la betterave sucrière.**

La betterave à sucre a d'abord été développé pour le fourrage et comme légume de jardin bien avant d'être valorisée pour sa teneur en sucre (Fasahat et al. 2018). Cette plante est devenue une source importante de sucre dont elle assure 30% des besoins mondiaux (Zhang et al. 2017). Un hectare de la betterave sucrière peut accumuler 7-8 tonnes de sucre (Azamovna et al. 2020). En plus de la production de sucre, l'industrie sucrière produit annuellement une large quantité de sous-produits tels que la mélasse et la pulpe de betterave à sucre, qui sont utilisés comme compléments alimentaires pour le bétail (Taški-Ajduković et al. 2017). La mélasse est aussi utilisée dans l'industrie de la fermentation des levures, l'industrie pharmaceutique et dans l'alimentation animale (Rajaeifar et al. 2019). Généralement, la mélasse de betterave est fermentée en alcool et pourrait être utilisée comme matière première pour la production d'éthanol-carburant afin d'être valorisée dans le secteur des transports. En outre, les restes de mélasse sont riches en azote et sont utilisés soit comme alimentation animale, soit comme engrais (Finkenstadt 2014; Rajaeifar et al. 2019).

La pulpe de la betterave peut aussi être valorisée comme un aliment de bétail. Elle convient principalement à l'alimentation des ruminants en leur fournissant d'énergie (Cheesman 2004). En plus, la pulpe pourrait être détournée vers la production d'autres produits à valeur ajoutée plutôt que d'être utilisée uniquement comme alimentation de bétail. Elle pourrait être utilisée comme matière première pour la production d'éthanol par des voies biologiques ou comme matière première pour la production de biogaz (Rajaeifar et al. 2019). De plus, la pulpe est traitée pour obtenir des films thermoplastiques et ceci en la combinant avec l'acide polylactique pour former des composites polymères avec des propriétés de traction similaires à celles des plastiques de base (Finkenstadt 2014).

#### **1.5. Contraintes de rendement de la betterave sucrière**

##### **1.5.1. Carence d'azote, phosphore et potassium (NPK)**

Généralement, les producteurs de betteraves sucrières se soucient de connaître la quantité exacte d'engrais azoté nécessaire pour réaliser un profit net maximal. De nombreuses études menées ont conclues que la fertilisation de la betterave à sucre avec trop peu d'azote entraîne une réduction du tonnage des racines (Leilah and Khan 2021). Cependant, l'azote joue un rôle essentiel dans la croissance et la productivité des cultures sucrières, ainsi que ses indices de qualité. Il

améliore également l'efficacité d'utilisation de l'eau du sol (Mekdad and Shaaban 2020). Pourtant, la sur-fertilisation pourrait réduire la concentration de saccharose et augmenter les impuretés de la betterave à sucre, ce qui affectera la récupération du saccharose (Afshar et al. 2019; Maharjan and Hergert 2019).

Après l'azote, le phosphore est considéré comme le deuxième facteur le plus limitant dans la production de betteraves sucrières (Hadir et al. 2021). La carence en cet élément reste la plus difficile à reconnaître chez les betteraves sucrières même pour les experts (Yi et al. 2020). Le P est impliqué de manière importante dans la synthèse des lipides et des acides nucléiques, par conséquent, il améliore le développement des racines, la production et le transport des sucres dans la betterave sucrière (Makhlouf et al. 2020). C'est un macronutriment essentiel requis pour de nombreuses fonctions de la plante, y compris la production d'énergie, la photosynthèse, la glycolyse, la respiration, le métabolisme des glucides et la fixation de l'azote (Ghaly et al. 2019). Cependant, dans les conditions de faible apport en phosphore, les graines poussent lentement et produisent de petites plantes (Christenson and Draycott 2006). Donc, un bon apport en phosphore peut assurer une croissance rapide des racines et une bonne absorption d'autres nutriments (Ghaly et al. 2019). D'autre part, il a été démontré que le potassium est un élément nutritif important dans la croissance de la betterave à sucre car il joue un rôle important dans l'activation enzymatique, l'équilibre des charges, l'osmorégulation et la réduction des effets négatifs lié au stress hydrique (Cakmak 2005; Aksu and Altay 2020a). Dans la betterave sucrière, le potassium est également impliqué dans la biosynthèse et le transfert du saccharose vers les racines de stockage (Barlog et al. 2013). Hadir et al. (2021) ont rapporté que tout faible apport en K entraînait une diminution de l'activité photosynthétique de la betterave sucrière. Donc, afin d'assurer une production optimale, la betterave sucrière nécessite une fertilisation équilibrée par les trois éléments majeurs : azote (N), phosphore (P) et potassium (K).

### **1.5.2. Les maladies et les ravageurs de la betterave sucrière**

#### **➤ Maladies virales**

La betterave à sucre est particulièrement sensible à un certain nombre de maladies d'origine virale qui peuvent être transmises par des champignons, des insectes, des nématodes, des graines et ou via un contact physique. Ces virus peuvent diminuer le rendement potentiel de la plante-racine ainsi que la capacité d'extraction du sucre par le transformateur dans l'absence de protection à leur

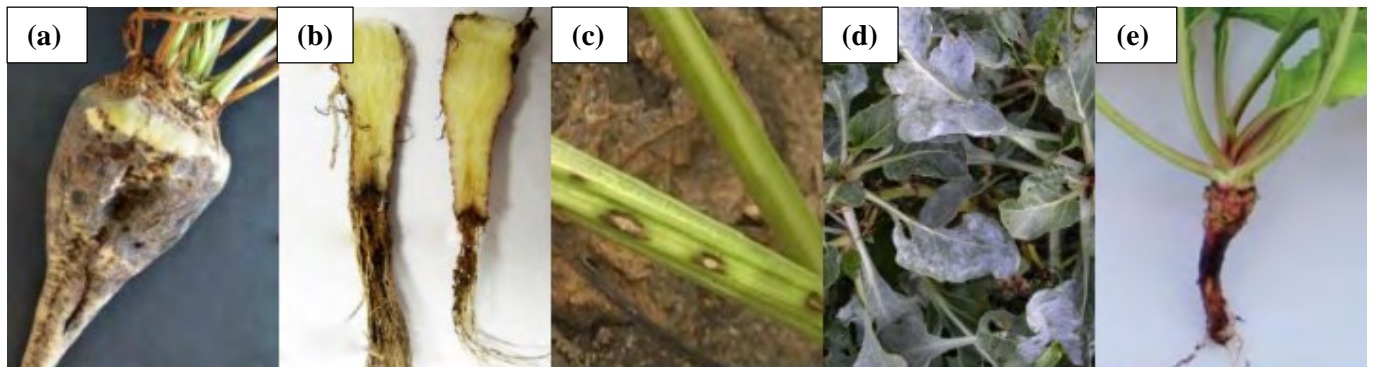
égard (Draycott 2006). Parmi ces virus, on trouve le virus de la veine jaune nécrotique de la betterave (BNYVV : *Beet necrotic yellow vein virus*), l'agent causal de la rhizomanie (Asher 1993). BNYVV est transmis par le parasite obligatoire infectant les racines : *Polymyxa betae*. Le premier signe de rhizomanie dans un champ de betterave sucrière apparaît sous forme de plaques de forme irrégulière vert clair ou jaune sur le terrain. En regardant de plus près, la betterave infectée montre une prolifération caractéristique des racines fibreuses autour de la racine pivotante (Graham et al. 2009). Nous trouverons aussi le virus de la jaunisse de la betterave (*Beet yellows virus BYV*) (Figure 4). L'infection de la betterave par ce virus se manifeste par une légère compensation veineuse visible sur les feuilles au début de l'infection, suivie plus tard par le développement d'un jaunissement interveinal sur les feuilles suivantes (Wintermantel 2005). En outre, la betterave peut aussi être contaminé par le virus BSBV (*Beet soil-borne virus*) qui, comme le virus BNYVV, il est transmis par la parasite *Polymyxa betae* (Laufer et al. 2018). Cependant, les plantes fortement infectées par le virus BSBV présentent un brunissement et une nécrose des faisceaux vasculaires ainsi qu'une réduction de la croissance des semis (Draycott 2006). En plus, la betterave à sucre fait l'objet d'attaque par une multiple variété de virus, parmi eux : virus de la betterave Q, BVQ (*Beet virus Q*), virus de la mosaïque du sol de la betterave BSBMV (*Beet soil-borne mosaic virus*), virus de la chlorose de la betterave BChV (*Beet chlorosis virus*) et virus cryptique de la betterave BCV (*Beet cryptic virus*). Ces virus sont les plus abondants et induisent des pertes de rendement très élevées (Figure 4) (Draycott 2006; Laufer et al. 2018; Hossain et al. 2021).



**Figure 4.** Symptômes d'infection de la betterave sucrière par (a) *Beet yellows virus BYV*, (b) *Beet soil-borne mosaic virus*, (c) *Beet chlorosis virus* et (d) *Beet necrotic yellow vein virus* (Hossain et al. 2021; Fernando Gil et al. 2020).

## ➤ Maladies fongiques

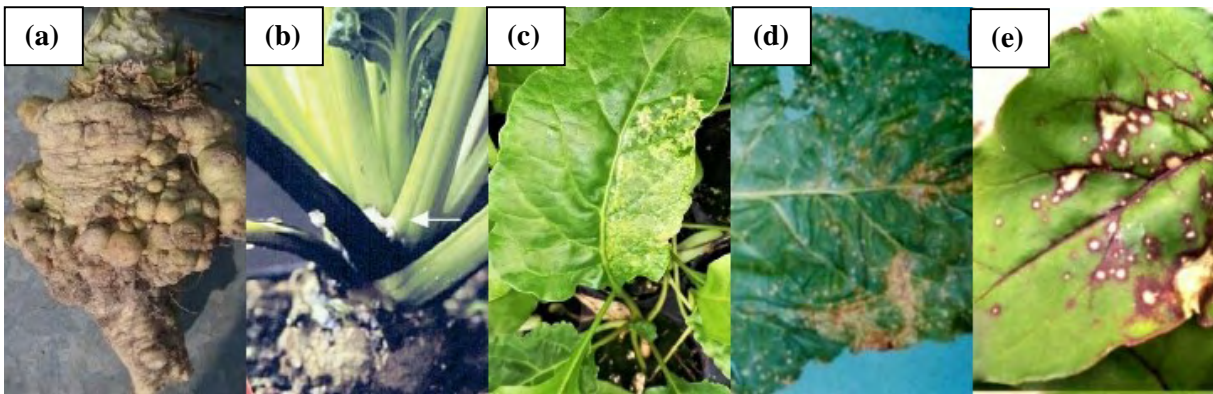
Comme toutes les plantes, la betterave à sucre est parasitée par un certain nombre de champignons qui sont capables d'attaquer un ou plusieurs de ses organes et réduisant sa croissance et les réserves qu'elle s'accumule dans sa racine. Par exemple, le champignon *Rhizoctonia solani* représente l'une des contraintes majeures de la production de la betterave sucrière dans le monde (Hillnhütter et al. 2011). En effet, *Rhizoctonia solani* provoque une fonte des semis sévère chez les plants de betteraves et par conséquent réduit le nombre de plantes au début de croissance (Figure 5) (Hossain et al. 2021). Cependant, les champignons *Aphanomyces cochlioides*, *Fusarium oxysporum*, et *F. andiyazi*, sont d'autres agents causals de la fonte des semis et de la pourriture racinaire de la betterave à sucre (Figure 5). Les plantes infectées par ces champignons montrent des symptômes précoces, notamment le brunissement des racines et l'hypocotyle qui devient noir ressemblant à un fil (Almquist et al. 2016; Hanson et al. 2017; Taha 2020). D'autres champignons infectent les parties aériennes de betterave sucrière comme exemple *Erysiphe betae*, *Uromyces betae*, et *Ramularia beticola* qui provoquent les maladies suivantes: l'Oïdium, la Rouille, la Cercosporiose et la Ramulariose (Heick et al. 2020).



**Figure 5.** Symptômes d'infection de la betterave sucrière par : *Rhizoctonia solani* (a) ; *Fusarium oxysporum* (b) ; *Cercospora beticola* (c) ; *Erysiphe betae* (d) ; *Aphanomyces cochlioides* (e). (Nechwatal et al. 2012; Jiang 2016; Vakalounakis and Kavroulakis 2017; Cao et al. 2018; Vojvodić et al. 2019)

### ➤ Maladies bactériennes

Comme les champignons, les bactéries sont aussi un agent causal de pas mal de maladies chez la betterave. Par exemple, la bactérie *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* provoque le flétrissement des plantes de la betterave sucrière, ainsi que l'enroulement des jeunes pétioles et la déformation des feuilles (Ignatov et al. 2017). Cependant, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* a été identifiée comme l'agent causal de la maladie des taches foliaires (leaf spot) chez la betterave (Stojšin et al. 2015; Nikolić et al. 2018). Cette maladie se manifeste en des lésions nécrotiques circulaires brun pâle imbibées d'eau, de 2 à 3 mm de diamètre, entourées d'un halo rouge (Rotondo et al. 2020). La betterave sucrière peut également être menacée par un certain nombre de bactéries pathogènes telles que *Xanthomonas beticola* qui provoquent la tuberculeuse chez la betterave, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae* agent causal de flétrissure bactérienne, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* et *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* responsables de la pourriture molle des racines de la betterave (Figure 6) (Moliszewska et al. 2018; Tumbarski et al. 2018; Abdalla et al. 2019).



**Figure 6.** Les symptômes des maladies bactériennes causées par *Xanthomonas beticola* (a), *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*, (b), *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* (c), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Beticola* (d) et *Pseudomonas syringae* pv. *Aptata* (e) chez la betterave sucrière (Zidack and Jacobsen 2001; Chen and Yin 2007; Moliszewska et al. 2018; Nampijja et al. 2021)

## II. Le phosphore et le potassium dans le système sol-plante

### 2.1. Phosphore

#### 2.1.1. Cycle de phosphore

Le phosphore (P) constitue le deuxième élément le plus important après l'azote en tant que nutriment minéral des plantes et le cinquième élément composant la matière vivante (Sharma et al. 2013; Plassard et al. 2015). Dans une plante, P représente environ 0,2% de son poids sec (Alori et al. 2017). Cependant, le P joue un rôle important dans la nutrition végétale car il s'agit d'un constituant structurel des biomolécules impliquées dans plusieurs processus végétaux clés, notamment la photosynthèse, la biosynthèse des acides nucléiques et des phospholipides, la respiration et le transfert d'énergie (Battini et al. 2017). Cet élément clé à la croissance des plantes existe sous deux formes : phosphate assimilable (soluble) et phosphate non assimilable.

Naturellement, le sol contient d'une à trois tonne de phosphore (P) total dans les 20 premiers centimètres (Beaudin et al. 2008). Malgré cette quantité de phosphore dans le sol, l'approvisionnement en P à partir du milieu reste toutefois une contrainte majeure pour les plantes, ceci est dû au fait que seuls les ions orthophosphates ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) peuvent être absorbés par les plantes (Jones and Oburger 2011; Plassard et al. 2015). Aussi bien, les concentrations de P disponibles dans la solution du sol sont généralement faibles (< 0,01 à 1 mg/l) en raison de la faible teneur en P dans les roches-mères, mais aussi en raison de sa forte réactivité qui se traduit par une forte rétention par des minéraux du sol tels que Ca, Fe ou Al ce qui conduit à la précipitation de P et réduise son utilisation par les plantes (Jones and Oburger 2011; Kaur and Reddy 2015).

La physico-chimie du P dans la plupart des sols minéraux est assez complexe, du fait de l'existence d'une série de réactions instantanées et simultanées qui affectent sa concentration dans le sol telles que dissolution-précipitation (équilibres minéraux), sorption-désorption (interactions entre le P en solution et les surfaces solides du sol) et immobilisation de la minéralisation (conversions biologiquement méditées de P entre les formes inorganiques et inorganiques) (Figure 7) (Sims and Pierzynski 2005). La disponibilité de P est aussi affectée par le type de sol. Dans les sols acides, le phosphore est fixé sous des formes légèrement solubles par des réactions de précipitation et d'adsorption avec des composés de fer (Fe) et d'Aluminium (Al) ainsi que des colloïdes cristallins et amorphes (Pizzeghello et al. 2011). Les minéraux argileux et les oxydes Fe/Al ont de grandes surfaces spécifiques, qui fournissent un grand nombre de sites d'adsorption

(Shen et al. 2011). Avec d'autres réactions, P peut être occlus dans les nanopores qui se produisent fréquemment dans les oxydes de Fe/Al, et devenir indisponible pour les plantes (Shen et al. 2011). Pour les sols calcaires (alcalin), l'adsorption en surface et la précipitation sont des processus majeurs de rétention du P qui diminuent sa disponibilité et sa mobilité (Pizzeghello et al. 2011). Or, dans les sols riches en carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ), le phosphate se précipite avec le calcium (Ca) en générant le dicalcium de phosphate (DCP). Le DCP se transforme à des formes plus stables telles que l'octacalcium phosphate et l'hydroxyapatite (HAP), qui sont moins disponibles pour les plantes à pH alcalin. Cependant, les HAP représentent plus de 50% du P total dans les sols calcaires et leurs dissolutions augmentent avec la diminution du pH du sol (Shen et al. 2011).

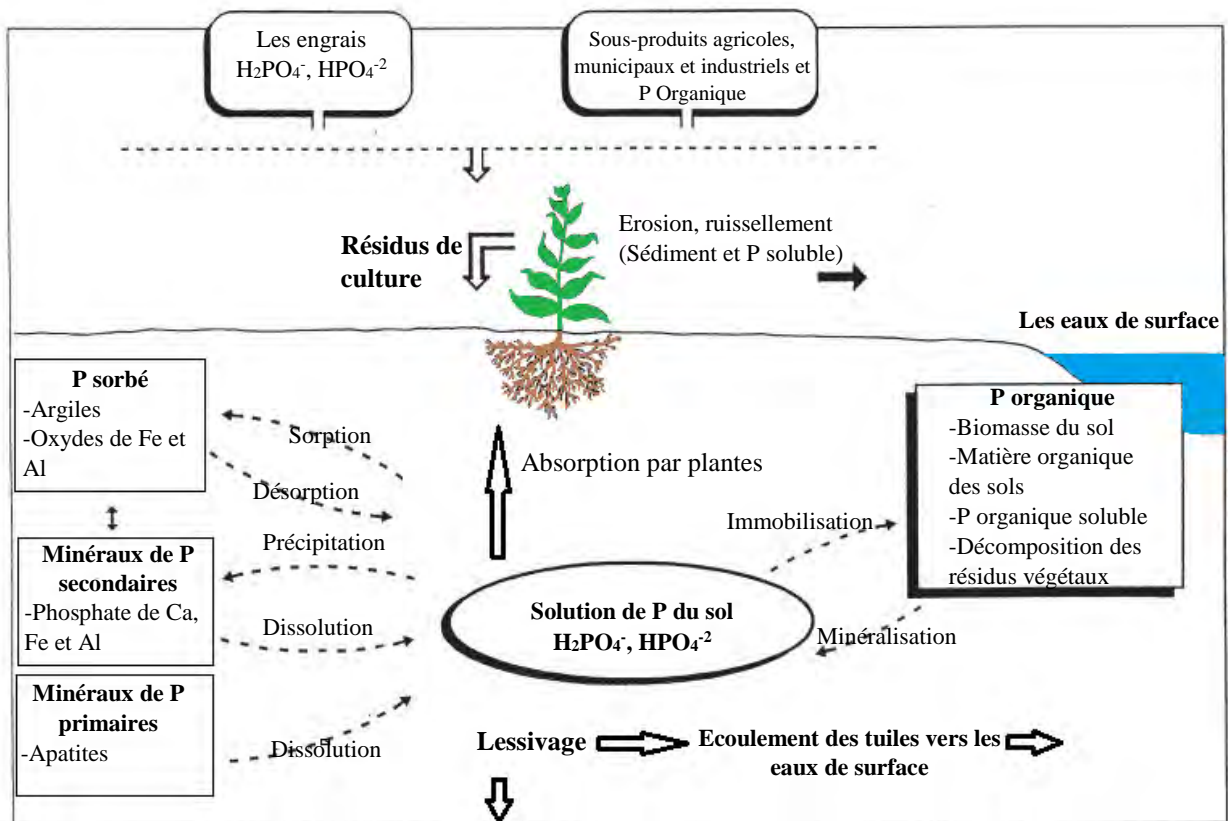


Figure 7. Cycle du phosphore de sol (Shen et al. 2011).

### 2.1.2. Le phosphate naturel

Selon Zapata et Roy (2004), le phosphate naturel (PN) désigne le produit issu de l'exploitation et du traitement ultérieur des minerais contenant du phosphore. Or un phosphate naturel se caractérise par sa richesse en  $P_2O_5$ , sa réactivité et ses composants utiles autres que le phosphore, en particulier le calcium, le magnésium et les oligoéléments (Montange and Truong 1998). Donc, ce PN convient pour une application directe comme engrais toute en évitant le procédé humide d'acidification traditionnel employé pour les engrais phosphatés solubles et évite le cycle de production de déchets polluants et les gaz à effet de serre. Aussi le PN adapté à l'application directe peut être plus efficace que des engrais phosphatés en termes d'absorption de phosphore par les plantes dans certaines conditions (Zapata and Roy 2004). Or, la disponibilité de ce dernier dépend principalement de sa réactivité (solubilité, finesse de mouture, surface spécifique) et des conditions pédoclimatiques, en particulier l'acidité et l'humidité du sol (Montange and Truong 1998).

Depuis l'antiquité, les agriculteurs assurent le développement continu des cultures et la croissance des plantes en utilisant des matières organiques naturelles telles le guano par les Incas bien avant l'arrivée des Espagnols en Amérique du Sud (Pereira 2003). Cependant, dans l'autre côté du globe, les Chinois utilisaient les excréments humains comme engrais dès les premiers stades de leur civilisation, comme l'ont fait les Japonais au 12<sup>ème</sup> siècle (Cordell et al. 2009). Aux 17<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> siècles en Europe, la dégradation des sols et les famines récurrentes ont créé la nécessité de compléter les excréments animal et humain avec d'autres sources de phosphore. Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, par exemple, l'Angleterre a importé d'importantes quantités d'os provenant d'autres pays européens (Cordell et al. 2009).

C'est au 19<sup>ème</sup> siècle que les chimistes et les agronomes ont identifié les éléments minéraux qui constituaient des facteurs limitant de la production, et l'importance du phosphate dans les phénomènes de la vie ce qui accélère la découverte et l'exploitation des gisements et des minerais riches en roche phosphatée. A savoir qu'il existe trois types de roche de phosphate (RP) selon De Boer et al. (2019):

1. Roche sédimentaire : est la roche phosphatée la plus courante. Plus de 80% du phosphate produit provient de ce type de roche, qui est souvent composée de coquillages fossilisés accumulés et d'animaux aquatiques. La roche sédimentaire contient plus de 7,8 % de  $P_2O_5$

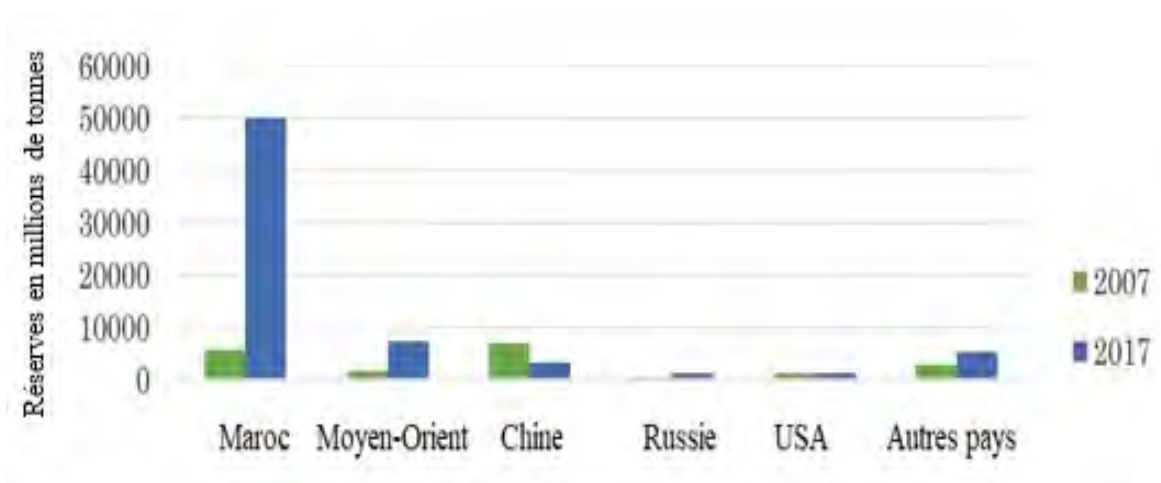


et elle se compose de l'apatite minérale, un phosphate de calcium combiné avec un ion hydroxyde, fluorure ou chlorure. Cette composition chimique de la roche sédimentaire présente une large gamme de sous-produits possibles au cours du traitement, tels que le fluor, le cadmium, l'uranium et les éléments des terres rares. Reste que cette roche sédimentaire est peu soluble dans l'eau.

2. Roche magmatique (ignée) : Cette roche est formée par cristallisation de la lave ou du magma après refroidissement, Ces gisements magmatiques peuvent fournir de la roche phosphatée avec une teneur de 35 à 40 % en  $P_2O_5$  via des méthodes d'enrichissement (souvent broyage suivi d'une flottation pour éliminer le quartz et calcination pour éliminer les impuretés organiques).
3. Roche métamorphique : Les gisements de roches métamorphiques sont souvent des gisements de phosphate profonds, qui contiennent à la fois des gisements sédimentaires et magmatique. A savoir qu'elle contient souvent 0,01 à 1,3 % de  $P_2O_5$

### 2.1.3. Répartition et production mondiale et Marocaine

Selon la commission géologique des États-Unis (USGS: United States Geological Survey), les ressources mondiales de la roche phosphatée sont de plus de 300 milliards de tonnes (Figure 8) (De Boer et al. 2019; Qarni et al. 2021). Alors que, la Chine, les États-Unis et le Maroc sont les principaux pays producteurs de phosphate dans le monde (Tableau 3) (Sørensen et al. 2015).



**Figure 8.** Les réserves mondiales estimées en millions de tonnes selon l'USGS en 2007 et 2017 (De Boer 2019).

En outre, l'Egypte, l'île Navassa, la Tunisie, le Togo et la Jordanie ont également de grandes industries minières de phosphate (Mukherjee and Biswas 2020). Selon De Boer et al (2019), les réserves mondiales de la RP sont autour de 68 milliards de tonnes et 75% des réserves totales estimées se trouvent au Maroc. De point de vue production, en 2020 le Maroc est classé au deuxième rang après la Chine avec une production annuelle de 37.000 tonnes (Tableau 3) (USGS 2021a).

**Tableau 3.** Production et réserves mondiales de la roche phosphate (USGS 2021a).

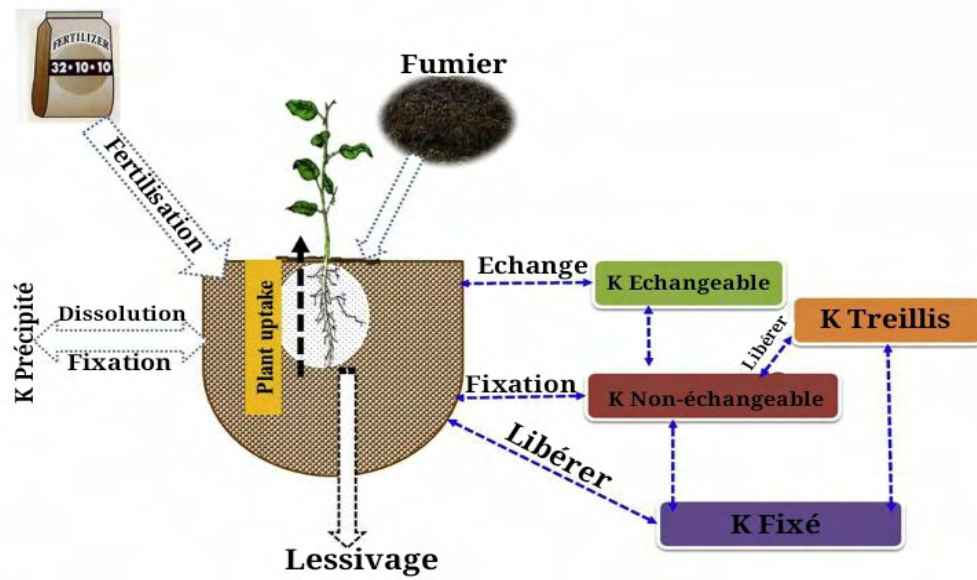
<b>Pays</b>	<b>Production minière (tonne)</b>		<b>Reserve (tonne)</b>
	2019	2020	
<b>Chine</b>	95.000	90.000	3.200.000
<b>Maroc</b>	35.500	37.000	50.000.000
<b>USA</b>	23.300	24.000	10.000.000
<b>Russie</b>	13.100	13.000	600.000
<b>Jordanie</b>	9.220	9.200	800.000
<b>Saudia Arabe</b>	6.500	6.500	1400.000
<b>Egypte</b>	5.000	5.000	2.800.000
<b>Brasil</b>	4.700	5.500	1.600.000
<b>Vietnam</b>	4650	4700	30000
<b>Tunisie</b>	4110	4000	100000
<b>Pérou</b>	4000	4000	210000
<b>Sénégal</b>	3420	3500	50000
<b>Australie</b>	2700	2700	1100000
<b>Afrique du sud</b>	2100	2100	1.400.000
<b>Syrie</b>	2000	360	1.800.000
<b>Kazakhstan</b>	1500	1500	260.000
<b>Inde</b>	1480	1500	46000
<b>Algérie</b>	1300	1300	2.200.000
<b>Finlande</b>	995	1000	1.000.000
<b>Ouzbékistan</b>	900	900	100.000
<b>Togo</b>	800	800	30.000
<b>Autres pays</b>	1.140	1.100	840.000
<b>Totale</b>	227.000	223.000	71.000.000

## 2.2. Potassium

### 2.2.1. Cycle de potassium

Les réserves de potassium (K) dans le sol sont très élevées et représentent près de 2,1 à 2,3 % de la croûte terrestre (Hasanuzzaman et al. 2018). Le K est connu comme un métal alcalin et ces composés chimiques sont très solubles dans l'eau (Brouder 2011). Chimiquement, le K est principalement ionique car il ne forme pas de liaisons fortes avec l'oxygène, l'azote et le carbone (Brouder 2011). Afin de simplifier sa dynamique complexe dans le sol, le K est souvent classé en quatre groupes en fonction de sa disponibilité pour les plantes : formes hydrosolubles, échangeables, non échangeables et structurales (Zörb et al. 2013) (Figure 9). Cependant, la majeure partie du K dans le sol, environ 90 à 98 % du K total se trouve dans des minéraux relativement peu disponibles tels que le feldspath, l'orthoclase et les micas (muscovite, biotite, ...etc.) (Bahadur et al. 2015).

Selon le type de sol, la concentration de  $K^+$  dans la solution de sol est d'environ 0,1 à 1 mM (Asher and Ozanne 1967). Les ions  $K^+$  sont extrêmement abondants dans le sol, en revanche leur disponibilité est très faible en raison de leur forte adsorption minérale (Garcia and Zimmermann 2014). En outre, le comportement et la disponibilité du K pour les cultures est contrôlé par sa taille et sa charge en conjonction avec la capacité d'échange cationique (CEC) du sol et l'altération des minéraux primaires et secondaires. Alors que, les précipitations ou l'irrigation peuvent entraîner un mouvement de K dans les plans d'eau par lessivage ou érosion. Chez les plantes, le potassium n'est pas réellement incorporé dans les composés organiques mais il reste sous forme ionique ( $K^+$ ) dans les solutions de tissus cellulaires et vasculaires (Brouder 2011).



**Figure 9.** Dynamique du potassium dans le système du sol (Sattar et al. 2019).

### 2.2.2. Production et réserve mondiale de potassium

En 2020, la capacité de production mondiale de potasse était 64 millions de tonnes qui devrait passer à 69 millions de tonnes en 2024 (USGS 2021b). Canada été le premier pays producteur mondial avec une production de 14.000 tonnes en 2020 suivi par Belgique avec une production de 7.300 tonnes en 2020 (Tableau 4).

**Tableau 4.** Production et réserves mondiale de la roche potassique (USGS 2021b)

Pays	Production minière		Réserve
	2019	2020	
<b>Canada</b>	12.300	14.000	1.000.000
<b>Belarusse</b>	7.350	7.300	750.000
<b>Russie</b>	7340	7600	600.000
<b>Chine</b>	5.000	5.000	350.000
<b>Allemagne</b>	3.000	3.000	150.000
<b>Jordanie</b>	1.520	1.500	Large
<b>Chili</b>	840	900	100.000
<b>USA</b>	510	470	220.000
<b>Laos</b>	400	400	75.000
<b>Brésil</b>	247	250	2.300
<b>Autres pays</b>	310	300	300.000
<b>Totale mondiale</b>	41.300	43.000	3.700.000

### 2.2.3. Importance agricole de potassium

Le potassium (K) est un nutriment essentiel dont toutes les plantes ont besoin en quantités relativement importantes. Après l'azote et le phosphore, le potassium est le troisième nutriment qui limite la productivité des cultures (Sattar et al. 2018). Cet important élément joue un rôle régulateur important dans de nombreux processus physiologiques des plantes, à savoir : germination et émergence des graines, régulation stomatique, équilibre cation-anion, transport du phloème, photosynthèse, synthèse des protéines, transfert d'énergie, activation enzymatique, résistance au stress et équilibre des nutriments (Marschner 2012). Le K aide à la germination des graines en initiant l'imbibition rapide de l'eau et il facilite également d'autres processus physiologiques (Hasanuzzaman et al. 2018). En plus, le K contribue à la résistance des plantes aux maladies, aux ravageurs et aux stress abiotiques, par activation de plus de 80 différentes enzymes responsables des processus végétaux et des enzymes importantes de la tolérance à la sécheresse et de l'efficacité de l'utilisation de l'eau (Bagyalakshmi et al. 2017; Etesami et al. 2017). Sustr et al. (2019) rapportent que le développement et la croissance du système racinaire repose sur le potassium. A cet effet, sans un apport suffisant en K, les plantes auront des racines peu développées, pousseront lentement, produiront de petites graines et auront des rendements inférieurs (Meena et al. 2014). De même, en cas de carence en K, les plantes montrent des signes de brûlure ou la brûlure jaune (chlorose) le long du bord des pointes des feuilles de la surface dorsale (Figure 10) (Zörb et al. 2013). En cas de carence sévère, le bord de la feuille se brûle et peut aussi tomber (Bagyalakshmi et al. 2017).



**Figure 10.** Symptômes de carence de potassium chez des plantes de maïs (Zörb et al. 2013)

## **2.3. Facteurs influençant la disponibilité du phosphore et du potassium dans la rhizosphère**

La rhizosphère est un environnement complexe où les racines interagissent avec les propriétés physiques (température, disponibilité de l'eau et structure), chimiques (pH, potentiel redox, concentration en nutriments, exsudats racinaires) et biologiques (association microbienne) du sol (Richardson et al. 2009). Cependant, les mécanismes d'adaptation des plantes influencent ces propriétés physiques, chimiques et biologiques de la rhizosphère. Ces changements affectent la solubilité, le transport et l'absorption des nutriments et par conséquent la croissance des plantes (Sustr et al. 2019).

### **2.3.1. Facteurs physiques**

La température du sol constitue l'un des facteurs agissant sur la disponibilité de phosphore et potassium pour les plantes. Or une température atmosphérique élevée augmente l'absorption des nutriments de 100 à 300 % en agrandissant la surface racinaire et en augmentant le taux de diffusion des nutriments et l'afflux d'eau dans le maïs (Dotaniya and Meena 2014). D'après Barker et Pilbeam (2007), la température influence le potentiel d'absorbance de phosphore par le système racinaire. En fait à mesure que le sol se réchauffe, le taux des réactions dans le sol, les racines et les microbes augmentent ce qui accélère la libération de P du sol (Barker and Pilbeam 2015). Ainsi que le phosphore, la disponibilité du potassium est également affectée par la température du sol. A savoir qu'à une température élevée, le K indisponible se transforme plus rapidement en K disponible, car la température chaude accélère la libération de K des roches mère (Yadav and Sidhu 2016). Aussi, l'activité racinaire, les fonctions des plantes et les processus physiologiques augmentent avec l'augmentation de la température du sol, ce qui entraîne une augmentation de l'absorption de K (Yadav and Sidhu 2016). Outre que la température, l'humidité affecte également la disponibilité de potassium et du phosphore. He et al. (2002) ont démontré que l'augmentation de la disponibilité en eau du sol (pluie sur le terrain) augmentera considérablement l'absorption totale de P, en particulier, lorsque l'approvisionnement en P du sol est relativement faible. De même, l'humidité implique un certain nombre de fonctions telles que le mouvement de masse du K vers les racines des plantes et sa diffusion vers les racines pour être absorbé par ces dernières (Yadav and Sidhu 2016).

L'aération, la structure et le labour sont aussi des facteurs influençant la disponibilité de P et K dans le sol. A savoir que la liaison des particules de sol en agrégats détermine la structure du sol, alors, la taille, la disposition et la stabilité de ces agrégats ont une grande influence sur les processus physiques et chimiques du sol, la croissance des racines et par conséquent, l'absorption des nutriments telles que le P et le K (Fageria and Stone 2006). Yadav and Sidhu (2016) rapportent que l'oxygène est un facteur nécessaire à la respiration des racines et l'absorption de K, alors que dans les systèmes de plantation sans labour la disponibilité du K est réduite en raison de la croissance restreinte et d'une distribution limitée des racines.

### **2.3.2. Facteurs chimiques**

Le pH du sol est l'un des facteurs chimiques les plus importants qui influencent la solubilité des nutriments et par conséquent, la disponibilité des nutriments pour les plantes. La disponibilité du K est réduite à mesure que le pH du sol diminue. Yadav et Sidhu (2016) rapportent que lorsque le pH du sol diminue la disponibilité de K se réduit car l'acidité du sol provoque une mauvaise croissance des racines suite à des toxicités par les ions  $Al^+$  et  $Mn^+$ , ce qui empêche l'absorption de K. En revanche, pour le phosphore les plantes préfèrent la forme  $H_2PO_4^-$  plus que  $HPO_4^{2-}$ , alors que la première forme est plus abondante à un pH acide (Penn and Camberato 2019). En outre, à un pH faible ( $< 5,5$ ) la disponibilité du P se diminue, principalement dans les sols riches en aluminium (Al) et en fer (Fe). Car dans ce type de sols et avec un pH aussi bas, Al et Fe peuvent former des liaisons très fortes avec les ions phosphate et se transforment par la suite à des composés très insolubles qui ressemblent à la variscite cristalline et la strengite (Batjes 2011).

Également, la libération des composés organiques par le système racinaire des plantes et un autre facteur chimique qui agit sur la disponibilité des nutriments. Les racines des plantes absorbent non seulement l'eau et les nutriments pour soutenir la croissance des plantes, mais ils libèrent également dans la rhizosphère des composés organiques et inorganiques. Ces composés apportent plusieurs changements chimiques dans l'environnement racinaire, affectant la population microbienne et la disponibilité des nutriments (Fageria and Stone 2006). Aussi, l'application d'humus au sol pourrait minimiser l'effet des conditions salines et calcaires du sol sur l'absorption des nutriments et le développement des plantes (Çelîk et al. 2010).

### **2.3.3. Facteurs biologiques**

Les micro-organismes représentent l'un des facteurs biologiques les plus importants qui contrôlent la disponibilité des nutriments (N, P et K) pour les plantes. En effet un changement biologique important associé à la rhizosphère et à la colonisation des racines par de nombreux types de micro-organismes bénéfiques (Fageria and Stone 2006). Les micro-organismes bénéfiques pour les plantes comprennent les bactéries fixatrices d'azote (N) (Richard et al. 2018), les bactéries solubilisatrices de phosphate naturel (Mohamed et al. 2018), les bactéries solubilisatrices de potassium (Sattar et al. 2018) et les champignons sont aussi des solubilisatrices de phosphate et de potassium (Haro and Benito 2019; Mehta et al. 2019). En plus, les caractères morphologiques des racines tels que leurs nombres, leurs longueurs et la densité des poils absorbants sont tous des facteurs influençant l'absorption des nutriments par les plantes (Barker and Pilbeam 2015).

### **III. Impacts des fertilisants et des pesticides chimiques**

En tant qu'engrais chimiques, les fertilisants phosphatés et potassiques comptent parmi les produits les plus utilisés en agriculture. Toutefois, l'utilisation incontrôlée et inadéquate de ces produits sous formes d'engrais (NPK) ainsi que des pesticides (organophosphorés) conduit à une pollution accrue de l'environnement et des pertes économiques considérables.

#### **3.1. Impacts environnementaux**

Au cours des 50 dernières années, la production agricole a été intensifiée via l'utilisation intensive des ressources en eau et des produits agrochimiques tels que les engrais chimiques et les pesticides (Koohafkan et al. 2013). L'utilisation intensive et inadéquate de ces produits agrochimiques exerce des dommages environnementaux très graves. En effet, lorsque des engrais phosphorés sont appliqués, seule une faible proportion de celui-ci est disponible pour les plantes. Le reste est stocké dans les sols sous une forme indisponible aux plantes (Farhat et al. 2015), ce qui pousse les agriculteurs à appliquer le phosphore en excès pour le rendre plus disponible pour les plantes cultivées. Bien que cela augmente également le risque que la majeure partie du phosphore soit perdue par ruissellement, lessivage ou érosion des sols, pour finalement se retrouver dans les lacs, les rivières et les océans (Tirado and Allsopp 2012). Ce qui entraîne une augmentation de la concentration de P dans les eaux et par conséquent une accentuation de la pollution par phénomène d'eutrophisation. C'est une forme naturelle de déséquilibre de certains



écosystèmes aquatiques dû à l'apport excessif de nutriments, caractérisée par des proliférations d'algues, provoquant une détérioration de la qualité de l'eau et la perte de la faune (Wang and Wang 2009). Cependant, le P est une ressource non renouvelable qui dépend exclusivement des roches phosphatées extraites des mines (Tirado and Allsopp 2012). L'agriculture est le principal utilisateur de phosphore extrait dans le monde, représentant entre 80 et 90 % de la demande mondiale (Childers et al. 2011). Comme toutes les mines, les mines de phosphate transforment intensément les paysages, en plus de ce qu'elles consomment de grandes quantités d'eau et elles contaminent l'eau, le sol et l'air qui les entourent (Tirado and Allsopp 2012).

Chen et al. (2007) rapportent que les fertilisants représentent une source constante d'apports des métaux lourds telle que l'Arsenic (As) et de Cadmium (Cd) pour les sols des terres cultivées. Ces deux éléments ont un impact négatif sur la santé humaine, ainsi le Cd s'accumule dans les reins et peuvent provoquer une insuffisance rénale (Schwoebel et al. 2013). Aussi, l'As peut provoquer des lésions et le cancer de la peau (Schwoebel et al. 2013). De plus, l'utilisation abusive des engrais chimiques dans la protection des cultures peut produire plusieurs problèmes, liés à l'apparition résistante des mauvaises herbes aux herbicides et à un impact élevé produit sur la santé humaine et l'environnement (Macías et al. 2003).

### **3.2. Impacts économiques**

L'utilisation d'engrais est l'un des enjeux économiques majeurs de la production agricole. De point de vue énergétique, la production d'engrais chimiques représente environ 1,2 % de la consommation énergétique mondiale (IFA 2009). De plus Macías et al. (2003) rapportent que 6 milliards \$ ont été dépensés sur les produits chimiques pour lutter contre 7000 espèces de mauvaises herbes. En plus du coût énergétique et financier, l'utilisation croissante des engrais chimiques entraîne une dégradation des sols, des émissions de gaz à effet de serre et une contamination de l'eau (Smith and Siciliano 2015; Kılıç et al. 2020) ce qui implique des coûts supplémentaires liés à la décontamination des eaux, des sols et à la préservation de l'environnement.

#### **IV. Bio fertilisation des plantes et lutte biologique par les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).**

Les problèmes environnementaux causés par les fertilisants chimiques tels que la pollution des eaux douces, l'érosion des sols et les économies d'énergie obligent les agriculteurs à introduire des méthodes de culture ayant un impact moindre sur l'environnement. En effet, l'utilisation des microorganismes du sol peut être une solution alternative, complémentaire et écologique des engrais chimiques et des pesticides.

##### **4.1. Solubilisation de phosphate, de potassium et fixation d'azote**

Comme déjà cité, le phosphore est un élément important à la croissance des plantes. Or la majorité de P dans le sol est sous une forme insoluble et seulement 0.1% est disponible à la nutrition des plantes (Alori et al. 2017). Cependant, divers organismes sont impliqués dans le cycle du P, mais les micro-organismes jouent le rôle le plus important (Zhu et al. 2018). Ces microorganismes possèdent la capacité à solubiliser le phosphate naturel (PN) insoluble et le rendent assimilable pour les plantes (Soumare et al. 2020). Certains des exemples les plus courants des microorganismes solubilisatrices de phosphate (MSP) sont les espèces de *Bacillus* tels que *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus atropheus* (Hu et al. 2013; Wang et al. 2014a; Mahdi et al. 2021) ; des espèces de *Pseudomonas* comme *P. plecoglossicida*, *P. aeruginosa* et *P. putida* (Paul and Sinha 2016; Rai et al. 2017; Astriani et al. 2020). D'autres espèces bactériennes comme les *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Pantoea*, *Agrobacterium* et les Actinomycètes sont aussi des solubilisateurs de phosphate naturel (Hamdali et al. 2008a; Sharma et al. 2013; Thakur and Putatunda 2017; Boubekri et al. 2021; Hamdali et al. 2021).

Afin de solubiliser le PN, les bactéries solubilisatrices de phosphate (PSB) impliquent de nombreux mécanismes en sécrétant des acides organiques, en particulier l'acide gluconique (GA), l'acide citrique, l'acide 2-cétogluconique, l'acide tartrique, l'acide oxalique et d'autres acides carboxyliques. Les groupes hydroxyle et carboxyle de ces acides chélatent les cations liés au phosphate ou solubilisent les cations par la libération de protons H<sup>+</sup> en les convertissant en formes de phosphate solubles (Raj et al. 2014; Alaylar et al. 2019). Le règne des champignons pas moins important que le règne des bactéries de point de vue solubilisation, puisque plusieurs espèces fongiques ont montré leur capacité à solubiliser les formes insolubles de phosphate. Par exemple *Penicillium oxalicum* et *Aspergillus niger* isolés à partir d'un sol calcaire (Yin et al. 2015). De

plus, plusieurs études ont découvert des MSP à partir du sol comme nouvelles espèces d'*Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Enterobacter ludwigii*, et de *Streptomyces* (Hamdali et al. 2011; Lee et al. 2019; Doilom et al. 2020).

Pour le potassium (K), plus de 90% du K dans le sol existent sous formes insolubles (Parmar and Sindhu 2018). Plusieurs microorganismes ont montré leur capacité à solubiliser le K comme l'exemple de *Bacillus licheniformis* et *B. subtilis* isolés de la rhizosphère de maïs (Parmar et al. 2019), *Pseudomonas entomophila* isolé d'un sol salin (Fatima and Arora 2020), *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. asburiae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Microbacterium foliorum*, *Klebsiella variicola*, *Myroides odoratimimus*, et *Burkholderia cepacia* originaires de la rhizosphère de tabac (Zhang and Kong 2014), *Rhizobium pusense*, *Acinetobacter pittii*, *Cupriavidus oxalaticus* et *Ochrobactrum ciceri* isolés de la rhizosphère de riz (Ashfaq et al. 2020). Les souches précitées solubilisent le potassium de différentes roches potassiques telles que la roche de Mica et la roche de feldspath-K.

#### **4.2. La production de phytohormones**

Plusieurs études scientifiques ont été rapportées sur l'importance de phytohormones telles que les auxines, les cytokinines, l'éthylène, les gibbérellines et l'acide abscissique dans la promotion de la croissance des plantes (Iqbal et al. 2017; Xu et al. 2018) qui sont produits par de nombreuses bactéries rhizosphériques (Bal et al. 2013; Resende et al. 2014) mais aussi par des champignons comme l'acide jasmonique et l'acide salicylique (Patel et al. 2015). Ces hormones déclenchent diverses fonctions métaboliques nécessaires à la croissance des plantes. Comme ainsi, les gibbérellines (GA) qui stimulent la germination des graines, l'allongement de la tige, l'expression sexuelle, la formation des fruits, la floraison et la sénescence (Kang et al. 2012). Cette importante hormone est produite par une large gamme de microorganismes tel que *Sphingomonas* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Pseudomonas koreensis* et Actinobactéries (Hamayun et al. 2010; Khan et al. 2014; Kang et al. 2019; Mathew et al. 2020). De même, les auxines par leur forme bioactive la plus étudiée, l'acide indole-3-acétique (AIA) est requis pour le développement des organes, la ramification des racines et des tiges (Emenecker and Strader 2020). Cependant, plusieurs microorganismes libèrent les auxines sous forme d'AIA comme l'exemple de : *Bacillus megaterium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* spp., *Azotobacter* sp. et *Streptomyces* spp. (Babalola 2010; Keswani et al. 2020). Aussi, les hormones de cytokinines influencent de nombreux aspects

du développement des plantes y compris la division cellulaire et la différenciation des chloroplastes, mais aussi l'interaction avec d'autres organismes, y compris les agents pathogènes (Akhtar et al. 2020). Ce type des hormones ne se produit pas seulement par les plantes, mais également par d'autres microorganismes (Akhtar et al. 2020) tels que *Bacillus stratosphericus*, *Staphylococcus xylosus* et *Rhizophagus irregularis* (Pons et al. 2020; Wang et al. 2021).

#### **4.3. Production des antibiotiques et le biocontrôle**

Suite aux impacts environnementaux négatifs des pesticides, le développement des moyens alternatifs pour contrôler les agents pathogènes est devenu une nécessité. Alors que les PGPR représentent cet alternatif durable, écologique et respectueux à l'environnement. En fait plusieurs microorganismes ont montré une activité significative contre des phytopathogènes soit en produisant des antibiotiques, des métabolites antifongiques, des enzymes lytiques et des sidérophores ou par induction du système de défense chez les plantes (Nihorimbere et al. 2011; Ahmed and Holmström 2014). A savoir que les genres de *Streptomyces*, *Bacillus* et *Stenotrophomonas* produisent une large gamme des antibiotiques tels que l'oligomycine A, la kanosamine, la zwitterine, et la xanthobaccin. De même le genre des *pseudomonades* libère des antibiotiques avec des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales tels que l'amphisine, le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la tropolone, la pyrrolnitrine et les lipopeptides cycliques (Singh et al. 2019).

Concernant la productions des antibiotiques Nihorimbere et al. (2011) rapportent que les *Pseudomonas* et les *Bacillus* sont les PGPR les plus étudiés. Par exemple *Bacillus amyloliquefaciens* inhibe la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* en libérant des lipopeptides et des sidérophores antimicrobiens (Palyzová et al. 2019). De même *Pseudomonas fluorescens* montre une activité contre des ravageurs des cultures (David et al. 2018). *Paenibacillus polymyxa* une souche endophytique qui montre aussi une activité antagoniste contre *Fusarium oxysporum* l'agent causale de la maladie de flétrissement fusariose chez la tomate et le tabac (Naoufal et al. 2018). En plus des bactéries il y en a des champignons qui montrent une activité de biocontrôle des phytopathogènes, comme exemple *Trichoderma harzianum* qui inhibe la croissance mycélienne des isolats de *Fusarium solani* par mycoparasitisme (Azevedo et al. 2021).

## V. Les Actinomycètes

### 5.1. Généralités

Les Actinomycètes sont un groupe spécifique de bactéries qui ressemblent morphologiquement à des champignons en raison de leurs cellules allongées ramifiées, filamenteuses ou de type hyphe (Singh et al. 2018). Ce sont des bactéries à Gram positif qui se caractérisent par une teneur élevée en G + C dans leur génome (Hozzein et al. 2019). Dans des conditions défavorables telles qu'une déficience en nutriment ou bien en eau et afin de résister à ces conditions les Actinomycètes sporulent. Cette propriété permet au Actinomycètes de se disperser par le vent ce qui explique leur présence dans différents écosystèmes et dans différents types de sols, y compris les sols agricoles. Ils ont un potentiel intéressant de recyclage des minéraux naturels et des substances organiques dans le monde naturel (Singh et al. 2018; Hozzein et al. 2019).

Ce groupe de bactéries produit environ 75% à 80% de tous les métabolites microbiens bioactifs y compris les antibiotiques d'origine microbienne (Moncheva et al. 2002). En fait l'actinomycine été le premier antibiotique produit par une Actinomycète découvert en 1940 qui a été purifié à partir d'une culture de *Streptomyces antibioticus* (Waksman and Woodruff 1940). Les Actinomycètes représentent une source intéressante des nouveaux antibiotiques, y compris les classes de médicaments antimicrobiens les plus importantes telles que les tétracyclines, les rifamycines, b-lactames, les aminoglycosides, les macrolides et les glycopeptides (Genilloud 2017). En plus, les Actinomycètes ont d'autre fonctions importantes, notamment, la solubilisation de phosphate et du potassium, la fixation d'azote et la dégradation/la décomposition de toutes sortes de substances organiques telles que la cellulose, les polysaccharides, les graisses protéiques, les acides organiques, etc. Ils sont également responsables de la décomposition ultérieure de l'humus (matériau résistant) dans le sol et de l'odeur des sols fraîchement labourés (Anandan et al. 2016; Nouioui et al. 2018).

## 5.2. Taxonomie

Les Actinomycètes appartiennent au phylum des Actinobactéries, qui sont des bactéries à Gram positive. Le phylum des Actinobactéries est grand et plus complexe. Il regroupe 6 classes, 25 ordres, 52 familles et 232 genres et représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les 18 grandes lignées actuellement reconnues dans le domaine des bactéries (Sathya et al. 2017).

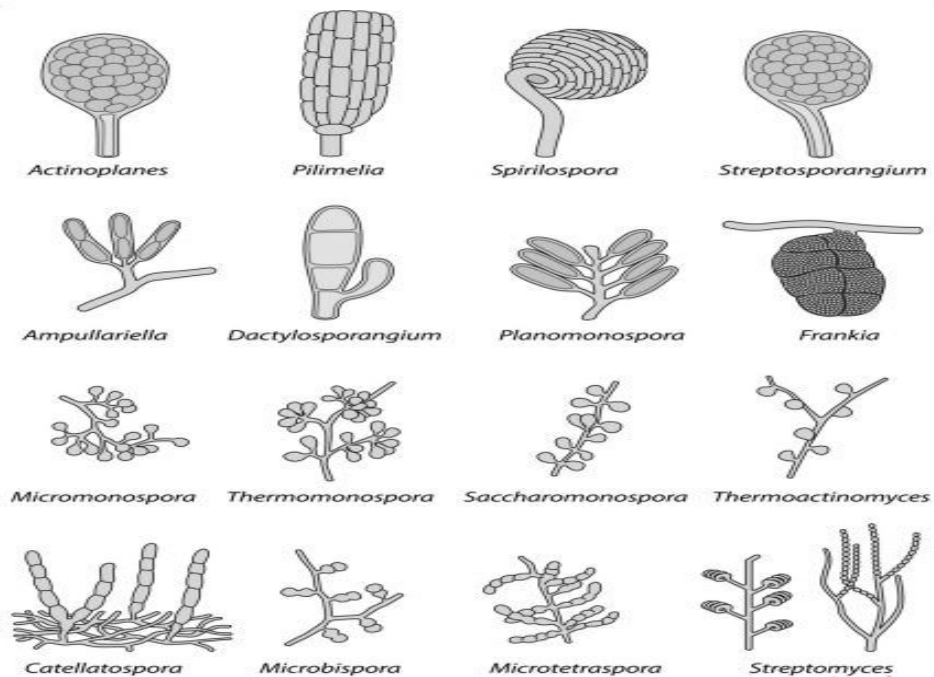
Les Actinomycètes sont classés en se basant sur un ensemble de caractères morphologiques, chimiotaxonomiques et génétiques :

### 5.2.1. Caractérisation morphologique

La diversité morphologique a été une caractéristique importante pour identifier les isolats d'Actinobactéries. Ceci est fait en utilisant divers milieux de culture standard, y compris les ISP (International Streptomyces Project) (Shirling and Gottlieb 1966). Diverses propriétés morphologiques sont utilisées pour classer et caractériser les genres et les espèces Actinomycétales comme : l'allongement et la ramification du mycélium végétatif, la germination des spores, la formation du mycélium aérien, la couleur du mycélium aérien et du mycélium basal et la production de pigments.

Pendant les premiers stades de croissance, les Actinomycètes se caractérisent par la formation des fils ou des tiges ramifiées qui donnent naissance à un mycélium typique unicellulaire (Waksman 1940). Ainsi que la plus part des actinomycètes possèdent un mycélium basal et un mycélium aérien (Anandan et al. 2016). Le mycélium aérien est généralement plus épais que le mycélium du basal. Il représente un critère important de classification du genre *Streptomyces* en espèces. Cependant tous les genres d'actinomycètes possèdent un mycélium basal à l'exception des *Sporichthya* qui se fixe au milieu à l'aide des crampons. Le mycélium basal appelé aussi mycélium de substrat peut être pigmenté par différentes couleurs comme le blanc, jaune, vert, noir, marron, rose, rouge, oronge ou pratiquement incolore. La couleur du mycélium du substrat est déterminée en observant l'envers de la face arrière (inférieure) de la croissance de la masse sur des différents milieux (Shirling and Gottlieb 1966).

Les Actinomycètes se reproduisent à travers des corps sporulants spéciaux ou à partir de parties du mycélium végétatif (Waksman 1940). A savoir que les différents genres d'Actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certains hyphes pour former des conidies qui résiste aux conditions défavorables ou par production des endospores comme chez les *Thermoactinomyces* (McVitte et al. 1972). D'autres Actinomycètes tels que les *Streptosporangium* sporulent en produisant des sporanges (Kalakoutsii and Agre 1976). Cette capacité de sporulation représente un critère essentiel dans la différenciation entre les genres Actinomycétales en se basant sur leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes et la présence des sporanges. Selon leur positionnement, on différencie entre les *Micromonospora* qui sont des spores produites isolément, les *Microbispora* positionnés en deux à deux, les *Actinomadura* des spores forment des courtes chaînes et les *Streptomyces* produisent des spores en chaîne longue. Ces chaînes peuvent être spirales, droites, ramifiées ou flexibles. De même, d'autres espèces Actinomycétales possèdent des spores avec des structures différentes comme exemple les endospores chez les *Thermoactinomyces*, les vésicules chez les *Frankia*, les sclérotés chez les *Chainia* et les sporanges chez les *Ampulariella*, *Actinoplanes*, *Planobispora*, *Streptosporangium* ainsi de suite (Figure 11).



**Figure 11.** Les différents types de spores rencontrées chez les Actinomycètes (Ait Barka et al. 2016).

### 5.2.2. Caractérisation physiologique et chimiotaxonomique

Les caractéristiques physiologiques telles que les besoins nutritionnels, les conditions de croissance, la sensibilité aux antibiotiques, l'activité enzymatique, les caractéristiques chimiotaxonomiques tels que les acides aminés de la paroi cellulaire, les lipides, les protéines et les sucres sont utilisés pour l'identification des espèces d'Actinobactéries.

De point de vue nutritionnel, la plupart des Actinomycètes sont des micro-organismes chimioorganotrophes (Mohammadipanah and Dehghani 2017). Ils sont capables d'utiliser différentes sources de carbone tels que : le fructose, le galactose, le glucose, le mannitol, le glycérol, le rhamnose, le maltose, le saccharose et le xylose ; et des polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Mohammadipanah and Dehghani 2017). Aussi, la température optimale de croissance représente un facteur de différenciation précieux. Elle va nous permettre de différencier entre les Actinobactéries thermophiles (65-70°C), psychrophiles (<0 et 10°C) et mésophiles optimales pour la plupart des espèces Actinomycétales (25 à 35°C). On peut aussi différencier entre les espèces d'Actinomycètes par des tests de résistance aux antibiotiques ainsi que la tolérance à la salinité, au pH et l'activité enzymatique (Harir 2018).

L'analyse de la composition de la paroi cellulaire des Actinobactéries est précieuse sur le plan taxonomique car elle diffère entre les sous-ordres (Berdi 1973). En particulier, les caractéristiques des peptidoglycanes de la paroi cellulaire, notamment l'identité de l'acide aminé en position 3 de la chaîne latérale tétrapeptidique, la présence ou l'absence de glycine dans les ponts interpeptidiques et la teneur en sucre du peptidoglycane va permettre de classer les Actinomycètes (Ait Barka et al. 2016) La présence ou l'absence de l'acide diaminopimélique (DAP) au niveau de la paroi cellulaire est une autre caractéristique importante du point de vue chimiotaxonomique. Cet acide se présente sous deux formes isomériques : soit la forme LL soit la forme DL ou *meso* selon le genre. Prenons en considération les isomères de DAP et la présence/absence d'autres acides aminés et sucres (aminés), on distingue neuf chémotypes de la paroi cellulaire (Lechevalier and Lechevalier 1980) (Tableau 5). De même, les glucides de la paroi permettent d'identifier et de classer les groupes d'Actinomycètes en cinq. Le groupe A comprend les espèces dont les parois cellulaires contiennent de l'arabinose et du galactose, le groupe B contiennent du madurose (3-O-méthyl-D-galactose), le groupe C comprend ceux qui



n'ont pas de sucres diagnostiques, le groupe D contient de l'arabinose et du xylose et le groupe E qui contient du galactose et du rhamnose (Lechevalier et al. 1971; Ait Barka et al. 2016).

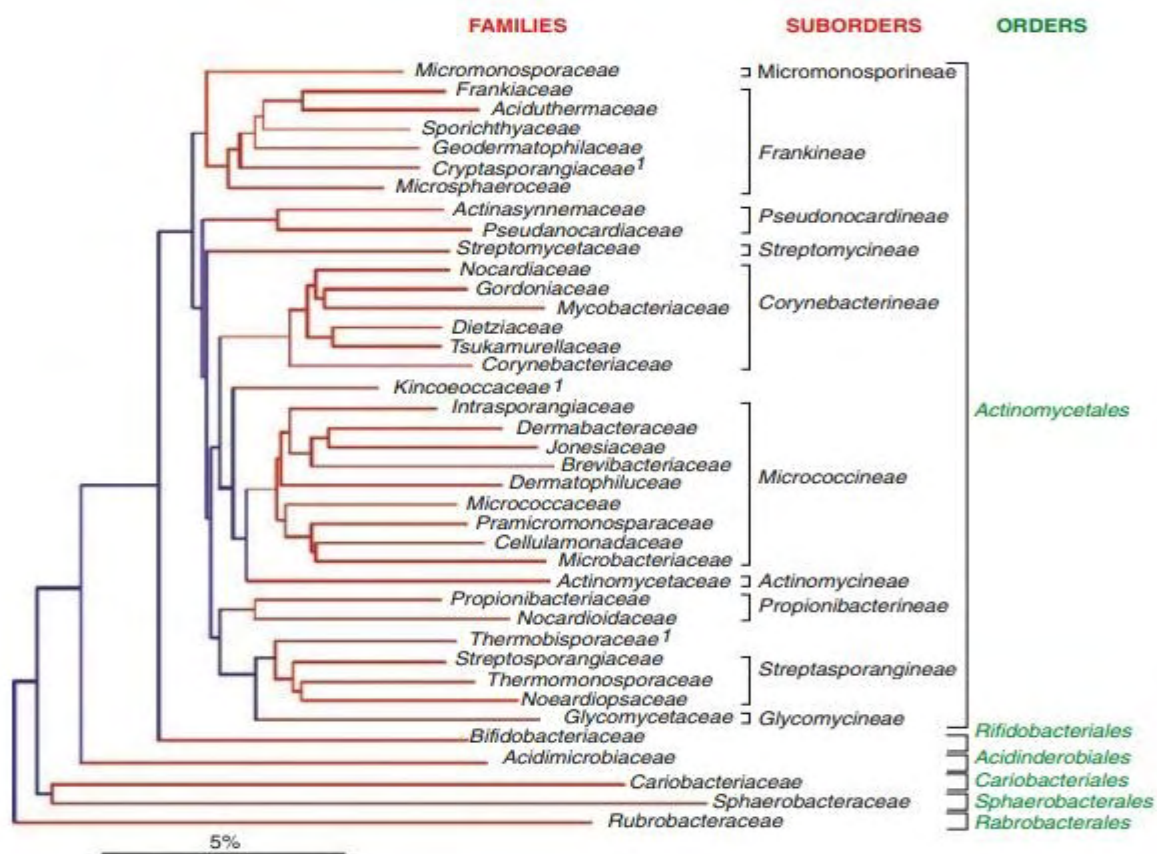
**Tableau 5.** Différents chémotypes de la paroi cellulaire et leurs constituants majeurs chez les Actinomycètes (Ait Barka et al. 2016).

Type de paroi cellulaire	Constituant(s) pariétal majeur(s)	Genres
<b>I</b>	LL-DAP, glycine, sans sucre	<i>Arachnia, Nocardioides, Pimelobacter, Streptomyces</i>
<b>II</b>	DL-DAP, glycine, arabinose, xylose	<i>Actinomyces, Actinoplanes, Ampulariella, Catellatosporia, Dactylosporangium, Glycomyces, Micromonospora, Pilimelia</i>
<b>III</b>	DL-DAP, madurose (3-O-méthyl-D-galactose)	<i>Actinocorallia, Actinomadura, Dermatophylus, Frankia, Geodermatophilus, Kitasatospora, Maduromyces, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea, Planobispora, Planomonospora, Planotetraspora, Spirillosporina, Streptosporangium, Thermoactinomyces, Thermomonospora</i>
<b>IV</b>	DL-DAP, arabinose, galactose	<i>Micropolyspora, Nocardioforms</i>
<b>V</b>	Privé de DAP, possède de la lysine et de l'ornithine	<i>Actinomyces</i>
<b>VI</b>	Privé de DAP, présence variable d'aspartique acide, galactose	<i>Arcanobacterium, Actinomyces, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora</i>
<b>VII</b>	Privé de DAP, acide diamino butyrique, glycine, avec variable lysine	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
<b>VIII</b>	Privé de DAP, ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

### 5.2.3. Caractérisation génétique

Il s'est avéré que la classification morphologique et chimiotaxonomique est insuffisante pour avoir une classification raisonnable des genres d'Actinomycètes et de différencier entre les souches proches (Goodfellow et al. 1988). Cependant, dès les années 1980, la biologie moléculaire est devenue un système primordiale pour étudier la taxonomie et différencier entre les espèces de bactérie (Harir 2018). Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, à savoir l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S, l'utilisation des gènes alternatifs, l'hybridation ADN-ADN, détermination du pourcentage G+C, le séquençage du génome entier et le typage moléculaire (Hopwood et al. 1985; Mohammadipanah and Dehghani 2017). La classification actuelle des Actinobactéries est basée sur des séquences d'ARNr 16S. cette technique a permis de construire un arbre phylogénique des Actinomycètes et la reconnaissance de 39

familles et 6 ordres présentés dans la figure 12 (Stackebrandt and Schumann 2006). Cependant, il y a une grande attention dans l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires pour construire des arbres phylogénétiques et résoudre les limitations accompagnées de la classification basée sur le gène de l'ARNr 16S (Mohammadipanah and Dehghani 2017). À l'heure actuelle, une nouvelle espèce ne peut être revendiquée sans analyse génétique basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN, et même le séquençage du génome devient une routine (Ait Barka et al. 2016).



**Figure 12.** Classification phylogénétique des Actinobactéries basée sur la comparaison des séquences ADN/ARNr 16S. La barre d'échelle représente 5 substitutions de nucléotides pour 100 nucléotides (Stackebrandt and Schumann 2006).

### 5.3. Importance agricole et environnementale des Actinomycètes

#### 5.3.1. Intérêt écologique

Les Actinobactéries sont bien connues pour leur production de métabolites primaires et secondaires. Cette capacité métabolique permet aux Actinomycètes de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aliphatiques (Anandan et al. 2016). Baoune et al.

(2018) ont démontré la capacité de dégrader le pétrole par des souches de *Streptomyces* spp., endophytiques isolées à partir de plantes cultivées dans un sol contaminé. De même Kolekar et al. (2014) démontrent que les Actinomycètes dégradent les pesticides pour les utiliser comme source de carbone et d'azote ce qui contribue à la dépollution des sols contaminés. Ainsi, le genre des *Rhodococcus* appartenant au phylum des Actinobactéries jouent un rôle important dans la dégradation de différents polluants par leur capacité de dégrader des pesticides les moins solubles (Alvarez et al. 2017).

Les Actinomycètes suscitent une attention considérable dans le développement d'outils de bio-remédiation en raison de leurs caractéristiques favorables telles que la structure filamenteuse, la sporulation, la résistance à la sécheresse et la capacité à sécréter des enzymes hydrolytiques (Shivlata and Satyanarayana 2017). A savoir que les Actinomycètes sont capables de détoxifier les métaux par modification des états de cantonnière des métaux en convertissant les contaminants en formes immobiles ou moins toxiques (Khurana and Gaur 2019). Rathore et al. (2021) rapportent que les genres prédominants dans la dégradation et la bioremédiation sont : *Nocardiopsis*, *Streptomyces*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Actinopolyspora*, *Rhodococcus*, *Amycolicococcus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Salinispora*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptomonospora*, *Prauserella*, *Actinomadura*, *Pseudonocardia*, *Aeromicrobium*, *Marinactinospora*, et *Microbacterium*.

En plus de leur rôle détoxifiant, les Actinomycètes peuvent être une source biologique de biocarburants tels que l'éthanol, l'hydrogène, le biogaz et le biodiesel à partir de matières premières abondantes telles que la cellulose, le xylène et la lignocellulose (Elshahed 2010). En effet, de nombreuses espèces d'Actinobactéries sont puissantes de point de vue dégradation de la biomasse cellulosique et hémicellulosique et sont donc des candidats pour une industrie économique des biocarburants (Hamedi et al. 2017)

### **5.3.2. Solubilisation de phosphate et de potassium naturel**

Après l'azote, le phosphore représente le deuxième élément le plus important pour la promotion de la croissance des plantes, bien que sa disponibilité soit limitée aux plantes malgré son abondance dans le sol, en raison de sa présence sous forme insoluble (Singh et al. 2018). Cela induit une réduction significative de la croissance des plantes. Ainsi, les Actinomycètes solubilisatrices du phosphate (ASP) représentent une excellente solution au problème de non-disponibilité de P et un moyen écologique de solubilisation du P naturel. Plusieurs études ont

rapporté l'aptitude de solubilisation de phosphate par des Actinomycetes isolés du sol (Hamdali et al. 2008a,b,c, 2012, 2021; Boubekri et al. 2021; Djebaili et al. 2020). La solubilisation du phosphate naturel tel que la roche phosphatée par les Actinomycètes facilite l'absorption des nutriments et améliore la croissance des plantes dans des conditions contrôlées, comme l'exemple du blé dur (Hamdali et al. 2008b; Boubekri et al. 2021), du maïs (Soumare et al. 2021) et de l'oignon (Selvakumar et al. 2015).

En plus de phosphate, le potassium est le troisième macronutriment le plus important à la croissance des plantes (Sattar et al. 2018). Cependant 90 à 98% de potassium n'est pas disponible aux plantes (Etesami et al. 2017). Afin d'éviter l'utilisation excessive des fertilisants chimiques pour améliorer la nutrition potassique et pour une agriculture durable, plusieurs études se focalisent sur l'utilisation des microorganismes tel que les Actinomycètes pour augmenter la solubilisation du potassium naturel (Boubekri et al. 2021; Haro and Benito 2019; Reyes-castillo et al. 2019). Par exemple, une souche de *Streptomyces* sp. a été utilisée pour dégrader la poudre de silicate (roche potassique) et qui a montré une forte activité de solubilisation pouvant être utilisée comme inoculum dans la production de biofertilisant potassique (Liu et al. 2016). De plus, le rôle des Actinomycètes, en particulier la souche *Nocardiopsis dassonvillei*, dans la solubilisation du potassium a été rapporté par Patel and Thakker (2019). Par conséquent, l'application des Actinomycètes solubilisant le phosphate et le potassium naturels en tant que biofertilisants pour améliorer l'agriculture peut réduire l'utilisation des produits agrochimiques et soutenir une production agricole durable.

### **5.3.3. Production de phytohormones**

Les phytohormones, ou les régulateurs de croissance des plantes, sont des substances organiques, favorisent, inhibent ou modifient la croissance et le développement des plantes même à de faibles concentrations (<0,1 mM) (Damam et al. 2016). En effet, les Actinomycètes sont des excellents producteurs des phytohormones tels que l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines, les gibbérellines et les inhibiteurs de la production d'éthylène. La production d'AIA est une propriété majeure des Actinobactéries. Cette phytohormone est la principale forme d'auxine, qui régule de nombreux processus cellulaires de base, notamment la division cellulaire, l'élongation et la différenciation (Sharma et al. 2014). La production de cette hormone végétale et les voies de sa synthèse par divers Actinomycètes tels que des espèces de *Streptomyces* spp. de *Nocardiopsis* spp.

et *Leifsonia* sp. ont été décrits par plusieurs études (Hamdali et al. 2008b; Passari et al. 2015; Djebaili et al. 2020; Boubekri et al. 2021). De même, plusieurs études rapportent l'habilité des Actinomycètes à produire les cytokinines (Muliani et al. 2015; Chukwuneme et al. 2020; Djebaili et al. 2020). Cette hormone stimulent la division cellulaire des plantes et contrôlent le développement des racines en inhibant l'allongement des racines primaires et la formation des racines latérales (Prasad et al. 2019). Cependant, les Actinomycètes produisent non seulement de l'AIA et les cytokinines, mais les études ont indiqué qu'elles sont d'excellents producteurs de gibbérellines (Dalal and Kulkarni 2014; Djebaili et al. 2020). Solans et al. (2011) ont isolé une souche endophytique de *Micromonospora* qui produit des gibbérellines à des taux élevés. Ces derniers favorisent le développement du tissu de la tige, l'élongation des racines, l'extension latérale des racines et améliorent les processus photosynthétiques des plantes (Kenneth 2017).

#### **5.3.4. Production d'antibiotique**

Suite à leur distribution dans différents environnements tels que le sol et leur association avec des plantes, les Actinobactéries représentent un phylum de microorganismes prometteur dans le domaine de la biotechnologie (Hamedi et al. 2017). De plus, les Actinomycètes sont la source la plus fructueuse de microorganismes pour tous les types de métabolites bioactifs, y compris le type agroactif (Sharma et al. 2014). Ils sont connus pour la production d'un large spectre d'antibiotiques, par exemple l'actinomycétine, la micromonosporine, la mycétine, l'actinomycine, la proactinomycine, la streptothricine et la streptomycine (Singh et al. 2018). Ces bactéries confèrent généralement des avantages physiologiques et environnementaux à leurs plantes hôtes, en produisant des enzymes capables de dégrader les facteurs virulents des phytopathogènes (Hamedi and Mohammadipanah 2015). Également, les Actinomycètes endophytes ont attiré une attention particulière, en raison de leur capacité d'offrir une sorte de résistance aux agents pathogènes aux plantes hôtes (Hamedi et al. 2017). En particulier, le genre *Streptomyces* semble être de bons candidats pour lutter contre les maladies des plantes. Du fait que sur les 10 000 molécules antimicrobiennes produites par les Actinomycètes, plus de 50 % ont été isolées de Streptomycètes (Evangelista-Martínez 2014). Alors que de nombreuses espèces de Streptomycètes et leurs composés bioactifs ont donc été formulées et commercialisées en tant que biofertilisants et biopesticides pour la protection des cultures et l'amélioration des rendements des cultures. Comme le fongicide Actino-Iron<sup>®</sup> qui contient la souche *Streptomyces lydicus* WYEC 108 impliqué dans la lutte biologique contre la pourriture des racines, Plantomycin<sup>®</sup> contenant un

antibiotique Actinobactérien produit par la souche *Streptomyces griseus* commercialisé comme un bactéricide, Kasumin™ à base des antibiotiques produits par *Streptomyces kasugaensis* et agissent en même temps comme antibactériens et antifongiques pour les maladies des plantes et le PH-D® un fongicide à base de polyoxine D produit par *Streptomyces cacaoi var. asoensis* (Hamedi et al. 2017).

Récemment, des chercheurs se sont focalisés à la recherche des Actinomycètes rares (autres que *Streptomyces* sp.) dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives. Ainsi, plusieurs antibiotiques antifongiques, produits par des Actinomycètes non-*Streptomyces*, ont été purifiés. Cependant, 2-méthylbutyle isonicotinate a été produit par *Micromonospora auratinigra*, une souche rare d'Actinobactéries possédant une activité antibactérienne considérable contre les agents pathogènes redoutés par les humains (Talukdar et al. 2016). En outre, d'autres Actinomycètes rares : *Saccharopolyspora*, *Blastococcus* et *Actinocoralila* isolés à partir de nombreuses plantes médicinales sont doués de potentiel d'activité antimicrobienne (Qin et al. 2009).

### 5.3.5. Production des sidérophores

Les sidérophores sont des agents chélatants, de faible poids moléculaire (200–2000 Da) produits par des bactéries, des champignons et des plantes pour faciliter l'absorption du fer (Wang et al. 2014b). Cette capacité de production des sidérophores est observée aussi chez certaines souches d'Actinomycètes, elle représente un aspect important dans la promotion de la croissance des plantes (Singh et al. 2018). Selon Bagyalakshmi et al. (2017), la stimulation de la croissance des plantes de riz par des souches de *Streptomyces*, est attribuée à leurs capacités de libérer les sidérophores et les AIA. En effet, les streptomycètes sont bien connus par leur capacité de produire plusieurs sidérophores, qui agissent en permanence pour être plus compétitif dans l'environnement (Challis and Hopwood 2003). Par exemple, Hamdali et al. (2021) ont mis en évidence la capacité solubilisatrice de PN par *Streptomyces griseus*, en produisant une molécule appartenant à la famille des Viridomycines, qui chélate les ions positives de la roche phosphatée. Cette molécule montre aussi une activité antagoniste contre des champignons phytopathogènes et des bactéries à Gram positif.

En plus de leur capacité promotrice de croissance, les sidérophores ont reçu plus d'attention en raison de leur rôle dans la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes. Wang et al. (2014b) rapportent que la biosynthèse des sidérophores est une cible intéressante dans le

développement de nouveaux antibiotiques de défense contre les infections multirésistantes. En chélatant le fer, les sidérophores créent un environnement compétitif aux autres microbes pathogènes à proximité des racines (Glick 2012). Comme exemple, des souches de *Streptomyces* produisent de sidérophores efficaces contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*, agent pathogène de pois chiche (Gopalakrishnan et al. 2011). De même, des souches de *Streptomyces* inhibent la croissance d'*Alternaria alternata* et induisent le biocontrôle de la maladie du mildiou chez les plantes de tomate (Verma et al. 2011).

### 5.3.6. Production des acides organiques

Les acides organiques (AO) du sol constituent une partie importante des fractions hydrosolubles des molécules organiques libérées dans la rhizosphère (Adeleke et al. 2016). Ces acides organiques se caractérisent par la possession d'un ou plusieurs groupes carboxyle. Selon les propriétés de dissociation et le nombre de ces groupes carboxyliques, les AO peuvent porter des charges négatives variables, permettant la complexation des cations métalliques en solution et le déplacement des anions de la matrice du sol, ce qui facilite la mobilisation et l'absorption des nutriments par les plantes et les micro-organismes (Jones 1998).

Cependant, parmi les divers mécanismes impliqués par les bactéries dans la promotion de la croissance des plantes, on trouve la libération des acides organiques. À savoir que les microorganismes solubilisent le phosphate par production des AO, qui par leurs groupes hydroxyle et carboxyle chélatent les cations liés au phosphate et le converti en formes solubles (Yadav et al. 2018). Très peu d'études rapportent la capacité des Actinomycètes à produire des acides organiques (Jog et al. 2012; Bhatti et al. 2017). En revanche, des *Streptomyces* isolés de la rhizosphère de pin produisent un certain nombre d'acides organiques tels que l'acide lactique, succinique, citrique, malique, oxalique et pyruvique (Rozycki and Strzelczyk 1986). De plus, des *Streptomyces* ont montré la capacité de solubiliser le carbonate de calcium et de produire des acides organiques (Groth and Saiz-Jimenez 1999). Jog et al. (2014) rapportent que la souche *Streptomyces* mhcr0816 solubilise le phosphate naturel par libération d'acide malique, ce qui améliorer la disponibilité de phosphore dans le sol.

**CHAPITRE II : ISOLEMENT ET  
CARACTÉRISATION D'ACTINOMYCÈTES  
SOLUBILISATRICES DU PHOSPHATE ET DU  
POTASSIUM NATURELS PRÉSENTANT DES  
APTITUDES MULTIPLES DE PROMOTION DE  
LA CROISSANCE ET DE PROTECTION DE LA  
BETTERAVE SUCRIÈRE**



## **PARTIE 2.1. Isolement et criblage d'Actinomycètes solubilisatrices du phosphate naturel à partir des champs de la Betterave sucrière**

### **I. Introduction**

Le phosphore (P) est l'un des 16 éléments essentiels à la croissance des plantes (Krishnaraj and Dahale 2014). La disponibilité du phosphate détermine grandement la croissance et l'aptitude des plantes et donc la qualité et les rendements des cultures (Secco et al. 2017). En cas de carence en P, le développement des racines des plantes est inhibé et cela entraîne un retard de croissance des plantes (Ha and Tran 2014). La concentration de P dans les sols naturels varie de 50 à 3000 mg/kg de sol, pourtant seulement 0,1% du phosphore total est réellement accessible aux plantes (Zou et al. 1992; Zhu et al. 2018). En effet, la plupart des phosphates sont immobilisés dans le sol (Chabot et al. 1996), soit via son adsorption sur les particules du sol, la précipitation avec divers minéraux (Al, Fe et Ca) ou l'interconversion en formes organiques par les micro-organismes du sol (Kishore et al. 2015). Pour surmonter ce problème, près de deux millions de tonnes d'engrais de phosphate chimiques solubles sont répartis chaque année sur les champs agricoles dans le monde entier (Tirado and Allsopp 2012). Cependant, encore une fraction importante de ces engrais est convertie en formes insolubles (Mishra et al. 2016).

La prise de conscience croissante des enjeux environnementaux liés aux intrants agrochimiques stimule le développement d'une agriculture durable et la complémentation des engrais chimiques par d'autres procédés plus écologiques et respectueux de l'environnement (Ben Farhat et al. 2015). L'utilisation directe du phosphate naturel dans l'agriculture traditionnelle au Maroc est l'un de ces processus (Bargaz et al. 2018). Cependant, le Maroc possède les trois quarts des réserves mondiales de phosphate naturel (RP) (De Boer et al. 2019). Le RP est une hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \text{CaF}_2$ ) non directement utilisable par les plantes (Vassilev et al. 2001) sauf dans certains sols acides ou dans des sols riches en micro-organismes spécifiques capables de transformer le phosphate insoluble en une forme facilement assimilable par les plantes (Karimi et al. 2016). Plusieurs études ont démontré que ces micro-organismes solubilisateurs de P (MSP) pouvaient augmenter la croissance et les rendements des cultures de plusieurs plantes agricoles, y

compris le blé (Hamdali et al. 2008a), le pois chiche (Verma et al. 2014), le riz et la tomate (Walpola and Yoon 2013) et peut potentiellement être utilisé comme biofertilisants phosphatés.

La betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) est la principale culture industrielle cultivée dans les vastes terres agricoles de la région de Beni-Mellal au Maroc. Elle constitue 21,2% de la production nationale de betterave sucrière (Redani 2015). Étant donné que l'augmentation de la croissance et du rendement de cette culture, de grande importance économique, est une préoccupation constante, nous avons étudié la présence des MSP endémiques des sols agricoles spécifiques de la région de Béni Mellal.

Parmi ces MSP, les Actinobactéries, dont *Actinoplanes*, *Streptomyces* et *Micromonospora* (Vassilev et al. 2001; Kishore et al. 2015), sont d'un intérêt particulier. Car, en plus de leurs capacités de MSP, ils produisent également des métabolites secondaires bioactifs capables de limiter la croissance de divers agents phytopathogènes (Hamdali et al. 2008b; Saravanakumar et al. 2013; Mishra et al. 2016; Hamim et al. 2019; Soumare et al. 2020) et/ou des molécules stimulant la croissance ou suscitant des défenses naturelles des plantes (Majeed et al. 2015; Ait Barka et al. 2016). L'exploration de la richesse des Actinobactéries-MSP endémiques des sols agricoles utilisés pour la culture de la betterave sucrière est fort intéressante pour développer de nouveaux agents bio-fertilisants adéquats et bien adaptés afin de stimuler la croissance de la betterave sucrière dans la région de Béni-Mellal. Nous avons ainsi recherché à isoler des Actinomycètes endémiques à ces sols rhizosphériques de betterave sucrière qui peuvent se développer et libérer du phosphate soluble à partir des sources de phosphate insolubles dans des conditions de laboratoire. Les mécanismes de solubilisation putatifs utilisés par ces bactéries ont été discutés et aussi leur caractérisation taxonomique a été réalisée.

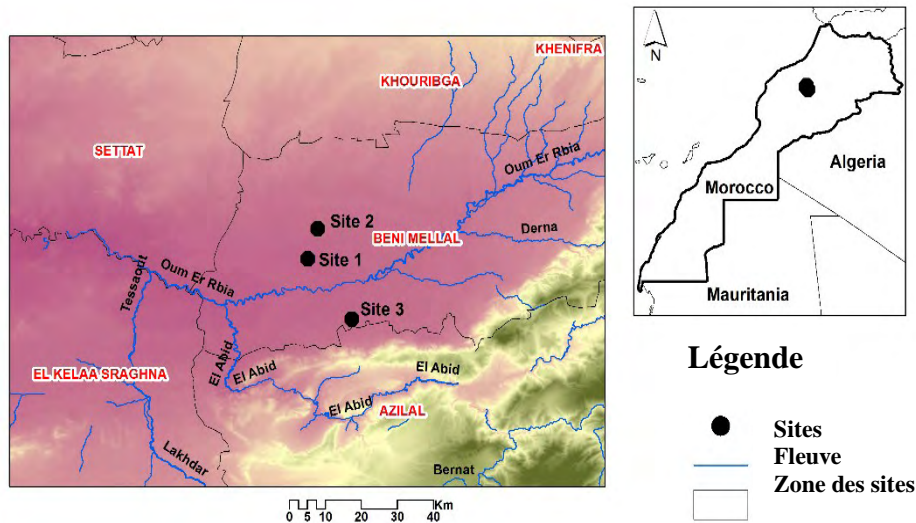
## **II. Matériel et méthodes**

### **2.1. Site d'étude et prélèvement d'échantillons de sol**

Le site d'étude est situé dans la région de Béni-Mellal-Khenifra au Maroc, qui a une altitude d'environ 400 m. Cette région est située dans le périmètre irrigué de Béni Amir-Béni Moussa séparé par la rivière d'Oum Errabia (Elbehri et al. 2011); ce qui crée deux périmètres irrigués indépendants : Béni-Moussa et Béni-Amir (Figure 13; Tableau 6) de 69 500 ha et de 33 000 ha, respectivement (El Hammoumi et al. 2013). Cette région est caractérisée par un climat semi-aride

avec une pluviométrie moyenne, généralement, inférieure à 280 mm et une température moyenne de 19 °C (Barakat et al. 2012; El Baghdadi et al. 2012).

Des échantillons de sol ont été collectés en juin 2017 dans trois champs différents (Figure 13; Tableau 6). À partir de chaque point d'échantillonnage, d'abord on a éliminé 3 cm des résidus de surface et après trois sous-échantillons, séparés d'une distance de 10 m les uns des autres et dans des directions différentes, ont été prélevés de 0 à 10 cm de profondeur et soigneusement mélangés pour assurer l'homogénéité des échantillons. Tous les échantillons de sol ont ensuite été séchés à l'air, homogénéisés, tamisés (<2 mm), placés dans un sac stérile en polyéthylène hermétiquement fermé, conservés à 4 °C. Les sols ont été utilisés et étudiés durant les 48 h qui suivent pour les expériences convenues.



**Figure 13.** Carte des sites d'échantillonnage des trois sols agricoles de la betterave sucrière située dans la région de Béni-Mellal au Maroc.

## 2.2. Analyse physico-chimique des échantillons de sol

La conductivité et le pH (dans l'eau) ont été mesurés dans une suspension sol-eau (1 : 5 v/v). L'acidité potentielle a été déterminée après dilution de l'échantillon de sol dans une suspension de chlorure de potassium KCl 1N (Carter and Gregorich 2006). Les matières organiques (MO) et minérales (MM) ont été déterminées par allumage à 550 °C pendant 5 h dans un four tel que décrit dans les études de Barakat et al. (2012). L'humidité du sol a été évaluée en mesurant l'évolution de la masse de 10 g de chaque échantillon maintenu dans une étuve à 105 °C

pendant 24 h (Carter and Gregorich 2006). La méthode de Kjeldahl a été utilisée pour déterminer la concentration d'azote total. La détermination de la teneur en phosphore ( $P_2O_5$ ) a été réalisée par ICP-AES (Inductively coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) (Hakkou et al. 2016).

### **2.3. Isolement de la flore totale et des Actinomycètes**

Deux grammes (poids humide), de chaque échantillon de sol, ont été mis en suspension dans 18 ml de sérum physiologique stérile (9 g/l, NaCl), homogénéisés et soniqués comme il a été décrit précédemment (Quin et al. 2015). Ensuite, 0,1 ml de diverses dilutions des échantillons traités ont été étalés en trois répétitions à la surface de gélose nutritive (Difco, Sparks, MD, USA) pour l'isolement des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et de milieu minimum synthétique (MMS) contenant 10 g/l glucose, 2 g/l  $NaNO_3$ , 0,5 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g/l KCl, 0,01 g/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  et  $K_2HPO_4$  (0,5 g/l, 4,38 mM) comme décrit précédemment (Hamdali et al. 2008a). Le pH du MMS a été ajusté à 7 et il a été stérilisé à 121 °C pendant 20 min. Ce milieu a été additionné de 40 mg/ml d'actidione et de 10 mg/ml d'acide nalidixique pour l'inhibition respective de la croissance des champignons et des bactéries à Gram négatif. Après étalement, les plaques de gélose ont été incubées pendant 21 jours à 28 °C afin de permettre la croissance des Actinomycètes à croissance lente. Les Actinomycètes ont été reconnus sur la base de leurs caractéristiques morphologiques décrites dans l'International Streptomyces Project (ISP) (Shirling and Gottlieb 1966).

### **2.4. Criblage des Actinomycètes capables d'utiliser la roche phosphatée (RP) et le tri-calcium phosphate (TCP) comme sources uniques de phosphore**

La sélection des Actinomycètes capables d'utiliser la RP, provenant de la mine de phosphate de Khouribga- Maroc, comme seule source de P a été réalisée en ensemençant 300 colonies (100 colonies de chaque sol étudié) sur le MMS contenant soit 0,5 g/l de RP (équivalent à environ 2,2 mM de phosphore) comme seule source de P, soit du phosphate soluble sous forme de  $K_2HPO_4$  (0,5 g/l, 4,38 mM) ou soit sans aucune source de P (Hamdali et al. 2008a). Les spores des isolats d'Actinomycètes présentant la plus forte croissance active sur le milieu MMS contenant du RP comme seule source de P ont été stockées dans 20% (p/v) de glycérol stérile à -20 °C et ont ensuite été testés pour leur capacité à croître sur des MMS contenant du TCP (0,5 g/l,  $Ca_3(PO_4)_2$ ) (Sigma Aldrich, Isère, France) comme seule source de P.

## **2.5. Estimation quantitative du phosphate soluble libéré dans le milieu de croissance par les souches d'Actinomycètes sélectionnées.**

Les isolats d'Actinomycètes sélectionnés ont été inoculés à  $10^6$  spores/ml dans des flacons d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu MMS liquide contenant 0,5 g/l de RP ou 0,5 g/l de TCP comme seules sources de P et cultivés pendant 5 jours à 28 °C en agitation rotatif (180 g/min) (Hamdali et al. 2008a). Ce test a été effectué en trois cultures répétitives indépendantes. Chaque jour, un aliquot de 1 ml de chaque culture a été prélevé et centrifugé à 10 000 x g pendant 10 min. La biomasse sèche ainsi que le pH du surnageant ont été déterminés. Le surnageant a été analysé pour la teneur en  $P_2O_5$  par la méthode colorimétrique au bleu de l'acide molybdophosphorique du chlorostannique réduit (Olsen and Sommers 1982). Des mesures similaires ont été effectuées dans des flacons non ensemencés incubés dans les mêmes conditions pour déterminer la quantité de phosphate libérée spontanément par le RP et le TCP.

## **2.6. Production et détection de sidérophores.**

La production de sidérophores par les isolats d'Actinomycètes, qui solubilisent efficacement à la fois le RP et le TCP, a été déterminée à l'aide de la méthode de gélose Chrome Azurol S (CAS) décrite précédemment par Schwyn et Neilands (1987). Des bouchons de gélose (10 mm de diamètre) de cultures d'Actinobactéries cultivées sur du milieu MMS solide contenant 0,5 g/l de TCP comme seule source de P pendant 5 jours à 28 °C ont été placés de manière aseptique sur une plaque de gélose CAS et incubés pendant 3 jours à 30 °C. Après incubation, l'apparition d'un halo jaune autour des bouchons indique la production de sidérophores (Louden et al. 2011).

## **2.7. Caractérisation morphologique, physiologique et chimiotaxonomique des souches sélectionnées.**

Les caractéristiques morphologiques, culturelles, physiologiques et biochimiques des isolats sélectionnés ont été évaluées comme décrit dans l'International Streptomyces Project (Shirling and Gottlieb 1966). Les caractéristiques culturelles ont été observées après croissance sur des milieux de gélose à l'extrait de levure-malt (ISP2), gélose à l'avoine (ISP3) et gélose aux sels inorganiques-amidon (ISP4) pendant 7 à 21 jours à 30 °C. La série de couleurs obtenue a été déterminée comme proposé précédemment par Nonomura (1974). L'assimilation des glucides a été déterminée en utilisant le milieu ISP9 contenant 10 glucides différents, comme seules sources

de carbone, à une concentration de 1% (p/v). Les analyses chimiques de l'isomère de l'acide diaminopimélique ont été effectuées comme décrit précédemment (Becker et al. 1964).

## **2.8. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S des souches sélectionnées**

Les 10 isolats d'Actinobactéries solubilisatrices du TCP et du RP ont été cultivés pendant 2 jours à 28 °C dans des flacons de 500 ml contenant 100 ml de milieu Hickey Tresner (1 g/l d'extrait de levure, 1 g/l d'extrait de bœuf, 2 g/l d'amine A NZ (Sigma), 10 g/l de dextrine et 20 mg/l de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) (Hopwood et al. 1985) sous agitation constante de 180 rpm. La biomasse a été récoltée par centrifugation (16 000 x g pendant 10 min) et le culot mycélien a été utilisé pour l'extraction automatique de l'ADN avec l'instrument de Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega, Madison, WI, USA) et la Maxwell<sup>®</sup> RSC Pure Food OGM et Kit d'authentification (Promega).

L'ADNr 16S a été amplifié par la méthode PCR en utilisant les amorces universelles 27F (AGAGTTTGAMCCTGGCTCAG) et 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). L'amplification a été réalisée dans 25 ml de mélange réactionnel contenant 10 µl d'AccuPower Taq PCR PreMix (Bioneer, Oakland, CA, USA), 1,25 µmol de chaque amorce et 50 ng d'ADN. Les conditions de PCR étaient les suivantes : après dénaturation initiale (96 °C pendant 1 min), 30 cycles de 96 °C pendant 30 s, 60 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 1 min 30 s ont été effectués, suivis d'une prolongation (5 min, 72 °C). L'amplification a été réalisée en utilisant un système GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Des témoins négatifs ont été inclus sans ajout de la matrice ADN. Les produits amplifiés ont été visualisés sur un gel d'agarose à 2 % (p/v) coloré au bromure d'éthidium. Les produits de PCR de chaque isolat ont été séquencés en utilisant les amorces 27F et 1492R. Des recherches de similarité de séquences ont été effectuées par rapport aux séquences correspondantes des membres de la famille des *Streptomycetaceae* à l'aide de la base de données LEBIBI des ressources d'analyse de séquences en ligne (Flandrois et al. 2015) et GenBank via Nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> consulté : 29 mars 2021). L'arbre phylogénétique non enraciné a été déduit à l'aide de la méthode Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). Le pourcentage d'arbre répliqué dans lequel les taxons associés se sont regroupés dans le test de bootstrap (1000 répliques) est affiché à côté des branches (Felsenstein 1985). Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode Kimura à 2 paramètres (Kimura 1980) et sont exprimés en nombre de substitutions de base par site. Cette analyse portait

sur 52 séquences nucléotidiques. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA X (Kumar et al. 2018a).

## **2.9. Les analyses statistiques**

L'analyse statistique des paramètres chimiques du sol, de la flore totale et de la distribution des souches d'Actinomycètes a été réalisée par ANOVA. Le test de Duncan a été utilisé pour comparer l'abondance moyenne et la distribution (en pourcentage) des isolats d'Actinomycètes par rapport à la flore totale dans les trois sites étudiés. Toutes les valeurs sont des moyennes de trois répétitions de plaques du même échantillon de sol. La différence la moins significative (LSD) a été utilisée pour comparer les concentrations de paramètres entre les sites d'échantillonnage et l'écart type a été calculé à l'aide du logiciel SPSS 20.0 pour Windows.

## **III. Résultats**

### **3.1. Analyse de sol**

Les propriétés physico-chimiques des échantillons de sol sont présentées dans le tableau 6. Les sols agricoles de la betterave sucrière testés contenaient en moyenne 5% de matière organique (MO) et 86% de matière minérale (MM) dont 2% d'azote; 3,5% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 0,35% de K<sub>2</sub>O; MgO (1,4%) et MnO (0,08 %). Le pH des sols était proche de la neutralité ou légèrement basique (pH= 7,4 en moyenne). La conductivité électrique des échantillons de sol du site 2 est la plus élevée indiquant la salinité des sols de ce site avec une moyenne de 0,47 (µS/cm).

**Tableau 6.** Caractéristiques physico-chimiques des trois sols de betterave sucrière de la région de Béni Mellal.

Paramètres	Site 1	Site 2	Site 3	ANOVA
<b>Périmètre</b>	Béni Amir		Béni Moussa	
<b>Situation graphique</b>	32°24'3.888" N, 6°50'29.04"W	32°28'24.402" N, 6°48'54.828" W	32°15'47.2644" N, 6°44' 1.068" W	
<b>pH<sub>eau</sub></b>	7,44±0,27 <sup>a</sup>	7,31±0,26 <sup>a</sup>	7,49±0,14 <sup>a</sup>	
<b>pH<sub>KCL</sub></b>	6,49±0,16 <sup>a</sup>	6,93±0,06 <sup>b</sup>	7,09±0,04 <sup>c</sup>	P<0.001
<b>Matière organique (%)</b>	4±0,3 <sup>a</sup>	6±0,3 <sup>b</sup>	4±0,2 <sup>a</sup>	P<0.001
<b>Matière minérale (%)</b>	89±0,2 <sup>a</sup>	81±0,2 <sup>b</sup>	88±0,1 <sup>c</sup>	P<0.001, P=0.026
<b>Teneur en eau (%)</b>	7.4±0,2 <sup>a</sup>	1.2±0,1 <sup>b</sup>	7.2±0,1 <sup>a</sup>	P<0.001
<b>Conductivité électrique (µS/cm)</b>	0,40±0,13 <sup>a</sup>	0,47±0,009 <sup>ab</sup>	0,25±0,002 <sup>ac</sup>	P=0.015
<b>Azote total (%)</b>	2,62±0,00 <sup>a</sup>	1,75±0,87 <sup>a</sup>	2,33±0,50 <sup>a</sup>	
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (%)</b>	4,96±1,22 <sup>a</sup>	5,23±1,24 <sup>a</sup>	0,34±0,02 <sup>b</sup>	P=0.001
<b>Oxyde de magnésium MgO (%)</b>	0,95±0,16 <sup>a</sup>	1,00±0,11 <sup>a</sup>	2,22±0,28 <sup>b</sup>	P<0.001
<b>Oxyde de potassium K<sub>2</sub>O (%)</b>	0,25± 0,03 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,14 <sup>c</sup>	P=0.026, P<0.001
<b>Oxyde de manganèse MnO (%)</b>	0,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,006 <sup>b</sup>	P=0.009, P=0.019

Les différentes lettres indiquent des différences significatives à  $p < 0.05$ .

Le test LSD a été utilisé pour comparer les concentrations de paramètres entre les sites d'échantillonnage.

### 3.2. Répartition de la flore totale et des Actinomycètes dans les champs de betterave sucrière étudiés

La distribution de la flore totale et des Actinomycètes des sols de la betterave sucrière collectés dans les trois sites est présentée dans le tableau 7. Parmi les 164 isolats d'Actinomycètes retenus, 57 avaient la capacité de croître sur le milieu MMS + RP comme seule source de phosphate. Parmi ces 57 isolats, seuls 27 isolats (47,36 %) avaient également la capacité de croître sur le milieu MMS + TCP comme source unique de P. Dix des 27 isolats, montrant le rendement de biomasse le plus élevé sur MMS + RP et avec des caractéristiques morphologiques différentes, ont été sélectionnés pour des études ultérieures. Sept de ces dix isolats d'Actinomycètes provenaient du site 1 (AI, AYD, AV, AZ, BYC, BX et BP), un (CYM) du site 2 et deux du site 3 (DE1 et DE2).



**Tableau 7.** Répartition de la flore totale et des souches d'Actinomycètes dans les trois sites de betterave à sucre de la région de Béni-Mellal.

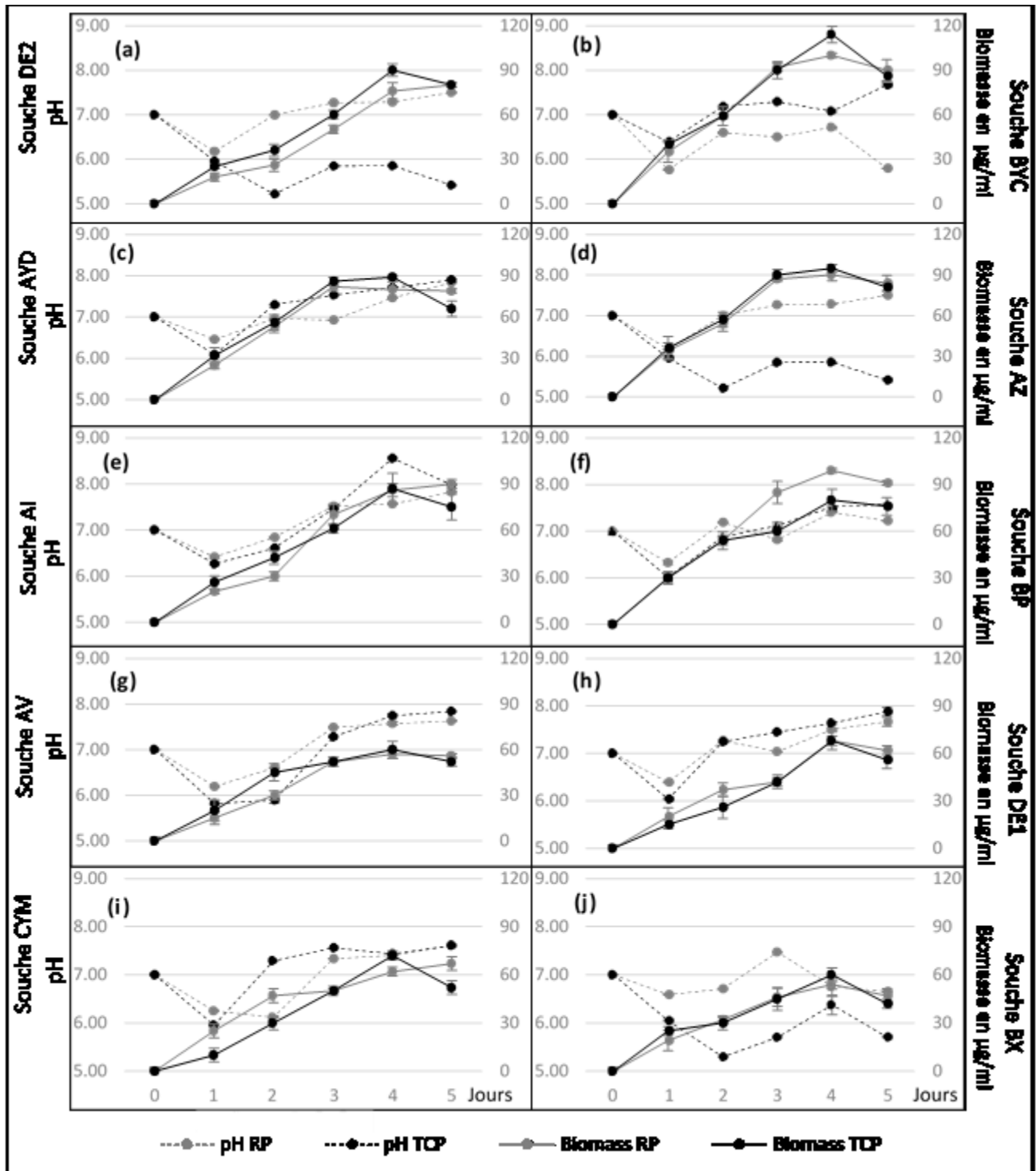
	Site 1	Site 2	Site 3	ANOVA
<b>Périmètre</b>	Béni Amir		Béni Moussa	
<b>Flore totale (x10<sup>8</sup> UFC/g of soil)</b>	2.57 <sup>a</sup>	2.59 <sup>a</sup>	1.71 <sup>b</sup>	
<b>Actinomycètes (x10<sup>7</sup> UFC/g of soil)</b>	1.84 <sup>a</sup>	1.27 <sup>ab</sup>	1.15 <sup>b</sup>	P=0.03
<b>% des Actinomycètes/Flore totale</b>	7.2%	4.90%	6.73%	

Les lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$ .

Le test de Duncan a été utilisé pour comparer les pourcentages moyens et la densité des actinomycètes .

### **3.3. Cinétique de croissance des souches d'Actinomycètes sélectionnées dans MMS + RP et MMS + TCP**

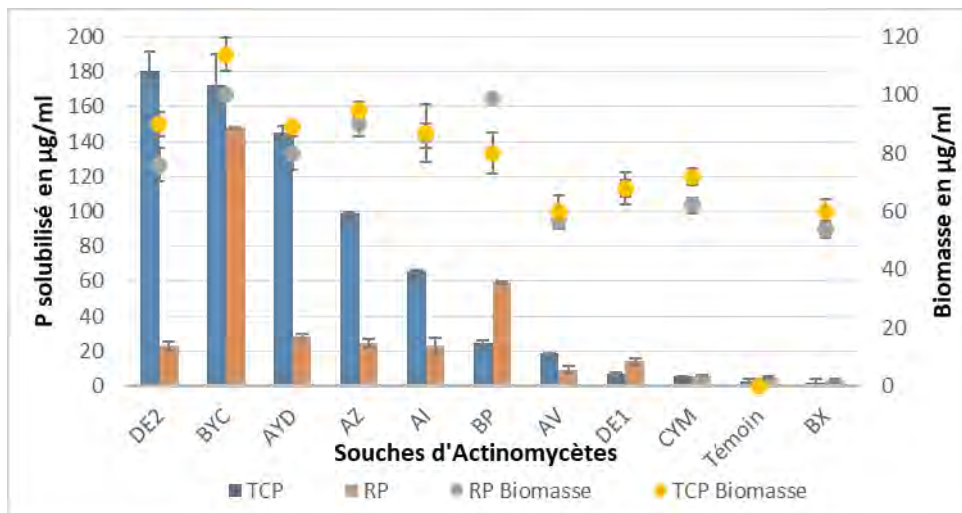
La figure 14 montre clairement que la cinétique de croissance de la plupart des souches était similaire à la fois dans les milieux de culture avec le TCP et la RP. Cela indiquait que les souches étaient capables d'assimiler des quantités similaires de phosphore à partir de ces sources insolubles de phosphate, avec une efficacité comparable, et de l'utiliser pour leur propre croissance. La seule exception était la souche BP qui a montré une meilleure croissance sur MMS + RP que sur MMS + TCP. On note que, principalement dans le MMS+ TCP, la plupart des souches ont donné une biomasse plus faible au jour 5 qu'au jour 4, suggérant une lyse cellulaire. Cependant, le rendement en biomasse n'était pas le même pour toutes les souches. Ainsi, les souches pouvaient être regroupées en deux classes, la classe I avec un rendement en biomasse supérieur à 70  $\mu\text{g/ml}$  (DE2, BYC, AYD, AZ, AI et BP) et la classe II avec le rendement en biomasse compris entre 50 et 70  $\mu\text{g/ml}$  (AV, DE1, CYM et BX) (Figure 14). On note que les souches avec les rendements en biomasse les plus faibles sont aussi celles qui produisent la plus faible quantité de phosphate soluble (Figure 14).



**Figure 14.** Evolution de la biomasse (traits continus) et du pH du milieu (traits pointillés) des isolats d'Actinomycètes sélectionnés cultivés en MMS+ TCP (cercle noir) et MMS+ RP (cercle gris). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répliques de culture indépendants.

### 3.4. Estimation de la quantité de phosphate soluble libérée du TCP et du RP par les souches d'Actinomycètes sélectionnées

La concentration de phosphate libre solubilisée spontanément par le TCP et la RP dans le flacon témoin non ensemencé par les souches était respectivement de 2,5 et 5 µg/ml. La concentration de phosphate soluble dans le surnageant de la plupart des souches (sauf les souches CYM et BX) dépassait cette valeur (Figure 15). Cela indiquait que la plupart des souches étaient capables de libérer du phosphate à partir de ces deux différentes sources de phosphate insolubles en excès de leur besoin en phosphate pour assurer leur croissance. Cependant, la quantité de phosphate soluble libérée variait considérablement avec la nature de la source de phosphate et d'une souche à l'autre. Cinq souches ont libéré une quantité élevée de phosphate libre (> 60 µg/ml). Cependant, on remarque que la quantité de phosphate solubilisée est plus élevée en présence de TCP qu'en présence du RP indiquant que le TCP était solubilisé plus efficacement que la RP (Figure 15). La présence de grandes quantités de phosphate dans le surnageant des cultures de ces Actinobactéries en présence de TCP indiquait que le taux de Pi libéré par le TCP dépassait son taux de consommation pour la croissance bactérienne



**Figure 15.** Concentration de phosphate soluble libéré (µg/ml) de TriCalcium Phosphate (TCP) et de Roche Phosphate naturel (RP) dans les flacons non ensemencés (témoins) et dans le surnageant des cultures des dix isolats sélectionnés d'Actinomycètes cultivés pendant 5 jours dans du MMS contenant 0,5 g/l de RP ou 0,5 g/l de TCP. Le rendement maximal en biomasse en µg/ml des dix souches d'Actinomycètes sélectionnées est indiqué au-dessus des histogrammes pour TCP (cercles jaune) et RP (cercles gris). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de culture indépendantes.

La souche DE2 (classe I) a libéré une concentration maximale de phosphate soluble (180 µg/ml) du TCP, tandis que les souches BYC (classe I) et BP (classe I) ont libéré des quantités maximales de phosphate soluble du RP (148,05 µg/ml et 59,44 µg/ml, respectivement).

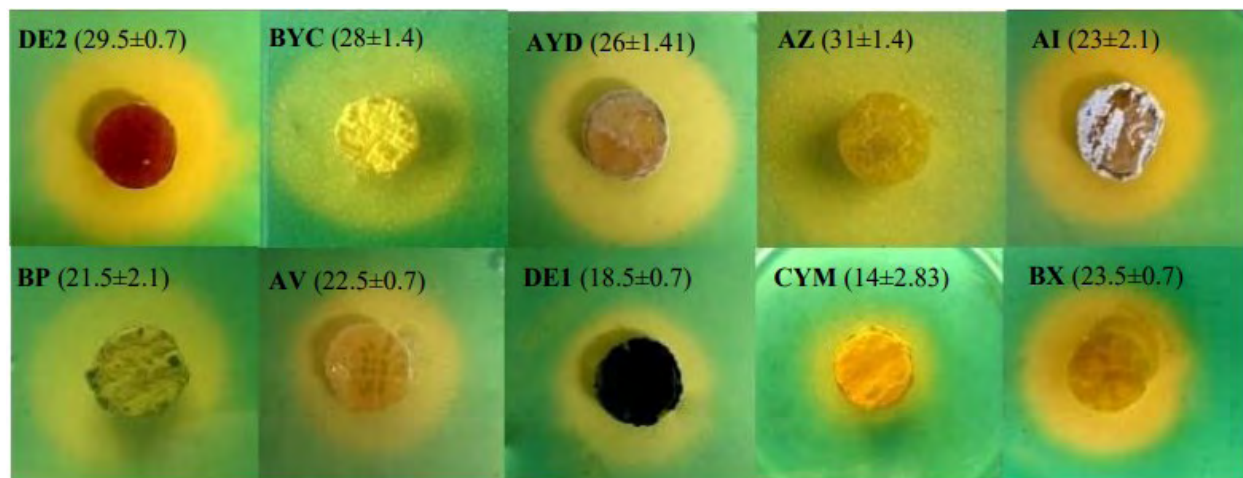
La souche BYC (classe I) est particulièrement intéressante car elle a pu libérer une quantité similaire de Pi à partir du RP (150 µg/ml) et du TCP (170 µg/ml) et son rendement en biomasse était similaire avec les deux sources de phosphate insolubles d'étude (seulement 12 % plus élevé en MMS + RP qu'en MMS + TCP). Les souches BP (classe I) et DE1 (classe II) ont libéré plus de 2 fois plus de phosphate soluble en présence de RP (60 µg/ml et 15 µg/ml, respectivement) qu'en présence de TCP (25 µg/ml et 7 µg/ml, respectivement). Le rendement en biomasse de la souche BP était 20 % plus élevé en MMS + RP qu'en MMS + TCP alors que celui de la souche DE1 était similaire sur les deux sources de P. C'est intéressant de signaler que les souches BX (classe II) et CYM (classe II) ont consommé la totalité du phosphate libéré. Cela suggérerait que la capacité de solubilisation de ces souches était moins efficace que celle des autres souches.

### **3.5. Production des sidérophores et évaluation du pH du milieu de culture**

Le test CAS-agar a indiqué que les six souches d'Actinomycètes solubilisant le TCP les plus efficaces (DE2, AYD, BYC, AZ, AI, BP) produisaient des sidérophores (Figure 16) comme indiqué précédemment pour d'autres bactéries PSM (Ahemad and Kibret 2013; Hamim et al. 2019). Cependant, parmi ces souches, seul BYC était capable de libérer efficacement le phosphate du RP. Les souches BX, AV, DE1 et CYM produisaient apparemment peu de sidérophores (Figure 16) et faisaient partie des souches libérant très peu de phosphate à partir du TCP ou du RP (Figure 15). Cela suggère que la production de sidérophores contribue au processus de solubilisation du P.

Le pH du milieu de croissance de toutes les souches dans les milieux en présence du TCP comme en présence du RP se situait entre 6 et 6,5 au jour 1 et augmentait ensuite dans la plupart des cas. Cela indiquait que le premier processus de solubilisation pourrait impliquer l'excrétion d'acides organiques. Le pH du milieu est resté en dessous de 6 pour les souches DE2, AZ et BX en présence du TCP les jours suivants mais a atteint 7 ou plus en présence du RP. Les souches DE2 et AZ libèrent une bonne quantité de P du TCP (180 µg/ml et 100 µg/ml, respectivement) mais une quantité plutôt faible de RP (20 µg/ml) alors que la souche BX n'a libéré de P d'aucune de ces sources insolubles de phosphate. Les souches DE2 et AZ ont peut-être excrété plus de sidérophores que la souche BX (Figure 16).

En RP, le pH du milieu est resté supérieur à 7 pour la plupart des souches à l'exception de BYC (pH compris entre 6,5 et 6,8 aux jours 2, 3 et 4) et CYM (pH 6 aux jours 1 et 2). BYC a libéré une bonne quantité de phosphate dans le cas de RP ainsi que dans le cas de TCP (150 µg/ml et 170 µg/ml, respectivement) alors que CYM a libéré une très faible quantité de P de ces deux sources de phosphate. On peut conclure que la souche BYC, mais pas CYM, excrète des sidérophores (Figure 16).



**Figure 16.** Halo de décoloration de la gélose CAS autour des bouchons de gélose des dix isolats d'Actinomycètes solubilisants les TCP/RP les plus efficaces provenant de sols de betterave sucrière de la région de Béni-Mellal cultivés pendant 5 jours dans le milieu MMS solide contenant 0,5 g/l de la surface d'une plaque de gélose CAS-bleu. La formation du halo autour des bouchons serait due à l'excrétion des sidérophores. Les diamètres des halos exprimés en mm sont indiqués à proximité du nom des isolats.

Le pH du milieu des 5 souches restantes (AYD, BP, AV, DE1 et AI) était assez similaire en présence du TCP et du RP et au-dessus de 7. Les souches AYD et AI ont produit des sidérophores et ont libéré une bonne quantité de phosphate du TCP (140 µg/ml et 60 µg/ml, respectivement) mais une quantité plutôt faible en présence du RP (20 µg/ml). La souche BP, qui produit des sidérophores, libère plus de phosphate du RP (60 µg/ml) que du TCP (24 µg/ml). Les deux dernières souches AV et DE1 étaient de faibles producteurs de sidérophores et ont produit une faible quantité de phosphate du TCP (18 µg/ml et 7 µg/ml, respectivement) ainsi que du RP (10 µg/ml et 14 µg/ml, respectivement).

### 3.6. Caractérisation taxonomique des isolats sélectionnés

Afin de déterminer si les dix isolats étaient des souches similaires ou différentes, leur capacité à assimiler dix différentes sources de carbone a été testée. La plupart des souches ont pu utiliser le mannitol, le lactose, le glucose, le fructose, le maltose, le galactose, le saccharose, le sorbitol et le glycérol comme seules sources de carbone. Sauf la souche AV qui n'a pas utilisé le mannitol, le lactose, le maltose, le fructose et le sorbitol : DE2, BYC, BP, AV et BX n'utilisant pas de fructose, AYD n'utilisant pas de maltose (tableau 8) et DE2, BP et BX n'utilisant ni maltose ni fructose. Cette analyse préliminaire a suggéré que ces souches étaient probablement différentes.

Ces dix isolats ont également été évalués pour leur capacité à résister au stress salin en se développant à des concentrations de NaCl de 5, 7 et 10 g/l. Toutes les souches ont montré la meilleure croissance à 5 et 7 g/l de NaCl (tableau 8) sauf DE2, AYD et DE1, CYM, BX qui ont montré une meilleure croissance à 10 g/l de NaCl (tableau 8). Par conséquent, ces souches pourraient potentiellement être halotolérantes.

L'analyse des constituants cellulaires de tous les isolats a révélé la présence de l'isomère de l'acide L-diaminopimélique (DAP) (tableau 8), confirmant qu'ils appartiennent aux genres *Streptomyces*.

**Tableau 8.** Caractéristiques biochimiques et morphologiques des dix isolats sélectionnés.

Les isolats d'Actinomycètes solubilants le TCP										
Origine	Site 3			Site 1				Site 3	Site 2	Site 1
Souche	DE2	BYC	AYD	AZ	AI	BP	AV	DE1	CYM	BX
ISP 3	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
ISP4	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISP6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<b>Couleur des spores du mycélium aérien</b>	Blanche	Blanche	Grise	Grise	Verte	Blanche	Blanche	Vert clair	Blanche	Blanche
<b>Pigment soluble</b>	Jaune	-	-	-	-	-	-	Jaune	-	-
<b>Colonie inversée</b>	Jaune	Jaune vif	Brun	Jaune	Gris clair	Jaune	Brun	Brun	Jaune	Verte
<b>DAP- isomère</b>	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL
<b>utilisation des sources de carbone</b>										
<b>Mannitol</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Lactose</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Glucose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Maltose</b>	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<b>Galactose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Glycerol</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sucrose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Citrate</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<b>Fructose</b>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
<b>Sorbitol</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Croissance à différentes concentrations de NaCl (g/l)</b>										
<b>5(g/l)</b>	++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
<b>7(g/l)</b>	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>10(g/l)</b>	++	++	+	++	++	+	-	+++	+++	+++
+: Testé positif / utilisé comme substrat; - : testé négatif / non utilisé comme substrat; +++ : Forte croissance /production; ++ : Croissance moyenne /production; +: Faible croissance /production										

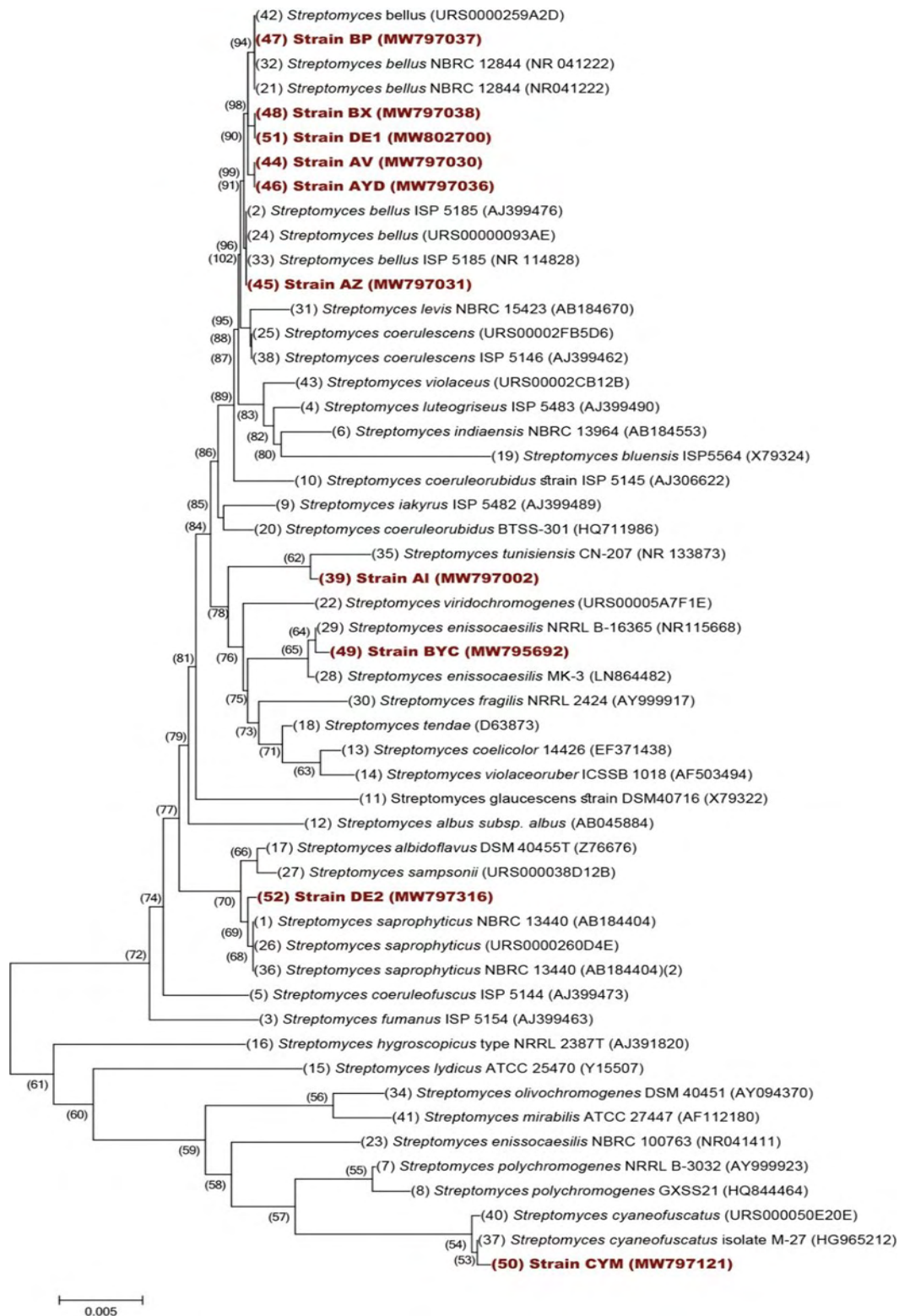
Les séquences du gène ARNr 16S des 10 souches ont été analysées en utilisant BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) et le LEBIBI (Flandrois et al. 2015) et les bases de données GenBank. Ils se sont tous avérés appartenir au genre *Streptomyces* ayant une identité d'au moins de 99%. Les séquences nucléotidiques de l'ARNr 16S partiel des isolats identifiés ont été déposées dans la base de données Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), sous les numéros d'accession indiqués dans le tableau 9.

**Tableau 9.** Identification de l'ARNr 16S des dix isolats sélectionnés.

<b>Les souches</b>	<b>16S rRNA Identification</b>	<b>Numéro d'accès</b>
AYD	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797036
DE2	<i>Streptomyces saprophyticus</i>	MW797316
BYC	<i>Streptomyces enissocaesilis</i>	MW795692
AI	<i>Streptomyces tunisiensis</i>	MW797002
AZ	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797031
BP	<i>Streptomyces coeruleus</i>	MW797037
AV	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797030
CYM	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	MW797121
BX	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797038
DE1	<i>Streptomyces bellus</i>	MW802700

Les séquences d'ADNr 16S des espèces *Streptomyces* récupérées dans Genbank ainsi que celle de nos souches ont été utilisées pour la construction d'un arbre phylogénique (Figure 17). Six souches (BP, BX, DE1, AV, AYD et AZ) étaient étroitement apparentées à *Streptomyces bellus*, AI était apparentée à *S. tunisiensis*, BYC à *S. enissocaesilis*, DE2 à *S. saprophyticus* et CYM à *S. cyaneofuscatus*.





**Figure 17.** Arbre phylogénétique de proximité (Neighbor-Joining) des 10 souches isolées et 42 espèces de *Streptomyces* basé sur des séquences de gènes d'ARNr 16S presque complètes (1400 nt). Les nombres aux nœuds indiquent les niveaux de prise en charge du bootstrap (%) sur la base d'une analyse de jointure de voisins de 1 000 ensembles de données ré-échantillonnés ; seules les valeurs >50 % sont données. Les numéros d'accès sont indiqués entre parenthèses. Barre, 0.005 substitutions de nucléotides par site.

#### IV. Discussion

La plupart des publications décrivant l'isolement de bactéries solubilisatrices du phosphate (BSP) ont utilisé la croissance des souches en présence du TCP, plutôt que du RP. La littérature scientifique mentionne que le substrat TCP pourrait ne pas être le plus approprié pour dépister les BSP capables d'améliorer la croissance des plantes (Mahamuni et al. 2012; Nath et al. 2017). En conséquence, nous avons plutôt utilisé la croissance sur RP comme premier critère pour isoler les BSP.

Notre étude a révélé que 28 % des Actinomycètes isolés des sols de la betterave sucrière avaient la capacité de croître sur le milieu MMS + RP comme seule source de phosphate. Parmi eux seulement 47 % avaient également la capacité de croître sur le milieu MMS + TCP comme seule source de phosphate. Cette différence est difficile à expliquer mais suggère que les processus de solubilisation du TCP et du RP peuvent impliquer des mécanismes différents ou que la plus grande diversité d'éléments minéraux présents dans le RP par rapport au TCP est nécessaire à la croissance de certaines souches.

Cinq souches (DE2, BYC, AYD, AZ et AI), parmi les dix souches étudiées, étaient capables de libérer une quantité significative de phosphore à partir de TCP (> 60 µg/ml). Leur activité de solubilisation était comparable à celle d'*Azospirillum* sp., *Pantoea agglomerans* et *Pseudomonas fluorescens* isolés de la rhizosphère de blé en culture sur le milieu Jensen (Narula et al. 2000). Cette activité est beaucoup plus élevée que celle rapportée par un *Streptomyces* sp. (Souche AH6) isolé du sol rhizosphérique de *Calluna vulgaris* L. (Pikovskaya 1948; Hamim et al. 2019). Cependant, parmi ces cinq souches performantes solubilisatrices du P, une seule souche, BYC apparentée à *Streptomyces enissocaesilis* (Figure 15), a pu libérer une quantité similaire de phosphore du RP et du TCP et une autre souche, BP, a pu libérer encore plus de phosphate du RP que du TCP. Ces deux souches présentent donc un intérêt particulier et l'analyse des molécules présentes dans leur surnageant devrait conduire à la purification et à la caractérisation structurale de sidérophores et/ou d'acides organiques potentiellement nouveaux et contribuant à l'efficacité de leur processus de solubilisation du RP.

Dans le cas de MMS + RP, le pH du milieu de culture de toutes les souches, sauf celui de BYC, était compris entre 7 et 8 ce qui suggère que le processus de solubilisation n'implique pas

l'excrétion d'acides organiques mais plutôt des sidérophores (Felsenstein 1985; Illmer and Schinner 1992). Le processus très efficace de solubilisation du BYC pourrait impliquer à la fois l'acidification du milieu de croissance et l'excrétion des sidérophores. Dans le cas de MMS + TCP, le milieu de croissance de DE2 et AZ s'est avéré acide mais celui des autres souches était proche ou supérieur à 7. Cela suggère que le processus de solubilisation du TCP des souches DE2 et AZ pourrait impliquer l'excrétion d'acides organiques. À notre connaissance, c'est la première fois qu'on rapporte que des souches d'Actinomycètes solubilisent le P insoluble via la production d'acides organiques. Dans ce processus, on pense que les acides organiques via le groupement  $\text{COO}^{2-}$  chélatent les ions  $\text{Ca}^{2+}$  présent dans la structure du phosphate insoluble (Narula et al. 2000). Un processus similaire a été rapporté en présence d'autres champignons tels que *Penicillium aurantiogriseum* (Whitelaw et al. 1999) et *Penicillium radicum* (Felsenstein 1985; Illmer and Schinner 1992; Narula et al. 2000; Panda et al. 2015).

En conclusion, nous prévoyons que la combinaison de phosphate naturel avec la souche BYC la plus performante de point de vue solubilisation du RP, pourrait constituer un nouveau type d'engrais utile pour solubiliser le phosphate naturel dans le sol afin de nourrir et stimuler la croissance de la betterave sucrière. Une telle stratégie contribuerait au développement d'une agriculture durable et plus respectueuse de l'environnement.

## V. Publication 1: Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco



Article

### Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco

Yassine Aallam <sup>1</sup>, Driss Dhiba <sup>2</sup>, Sanaâ Lemriss <sup>3</sup>, Amal Souiri <sup>3</sup>, Fatma Karray <sup>1</sup>, Taoufik El Kasafi <sup>1,5</sup>,  
Nezha Saïdi <sup>6</sup>, Abdelmajid Haddioui <sup>1</sup>, Saâd El Kabbaj <sup>3</sup>, Marie Joëlle Virolle <sup>7,\*,†</sup> and Hanane Hamdali <sup>1,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biotechnology and Valorization of Plant Genetic Resources, Faculty of Sciences and Technology, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, Beni-Mellal 23000, Morocco; yassine.aallam@gmail.com (Y.A.); elkasafi\_taoufik@hotmail.com (T.E.R.); ahaddioui@yahoo.fr (A.H.)

<sup>2</sup> International Water Research Institute, University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), Moulay Rachid, Ben Guerir 43150, Morocco; driss.dhiba@um6p.ma

<sup>3</sup> Laboratory of Research and Medical Analysis of Gendarmerie Royale, Department of Biosafety PCL3, Rabat, Morocco; slemriss@lram-igr.ma (S.L.); asouiri@lram-igr.ma (A.S.); selkabbaj@lram-igr.ma (S.E.K.)

<sup>4</sup> Center of Biotechnology of Sfax (CBS), Laboratory of Environmental Bioprocesses (LBPE), Sfax BP: 1177-3018, Tunisia; karray.fatma@gmail.com

<sup>5</sup> HTMR Laboratory, University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), Moulay Rachid, Ben Guerir 43150, Morocco

<sup>6</sup> CRRA Rabat, Plant Breeding, Conservation and Valorization of Plant Genetic Resources Research Unit, B.P. 6356-Rabat Institutes, Rabat 415, Morocco; nezsaïdi@yahoo.fr

<sup>7</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France

\* Correspondence: marie-joelle.virolle@i2bc.paris-saclay.fr (M.J.V.); hamdali\_hanane@yahoo.fr (H.H.); Tel.: +212-523485112 (H.H.)

† Hanane Hamdali and Marie Joëlle Virolle contributed equally.



**Citation:** Aallam, Y.; Dhiba, D.; Lemriss, S.; Souiri, A.; Karray, F.; Kasafi, T.E.; Saïdi, N.; Haddioui, A.; El Kabbaj, S.; Virolle, M.J.; et al. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco. *Microorganisms* 2021, 9, 914. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050914>

Academic Editors: Pedro M. Santos and Pedro Castro

Received: 7 April 2021  
Accepted: 22 April 2021  
Published: 24 April 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In the course of our research, aimed at improving sugar beets phosphorus nutrition, we isolated and characterized *Streptomyces* sp. strains, endemic from sugar beet fields of the Beni-Mellal region, which are able to use natural rock phosphate (RP) and tricalcium phosphate (TCP) as sole phosphate sources. Ten *Streptomyces* sp. isolates yielded a comparable biomass in the presence of these two insoluble phosphate sources, indicating that they were able to extract similar amount of phosphorus (P) from the latter for their own growth. Interestingly, five strains released soluble P in large excess from TCP in their culture broth whereas only two strains, BP, related to *Streptomyces bellus* and BYC, related to *Streptomyces enissocaealis*, released a higher or similar amount of soluble P from RP than from TCP, respectively. This indicated that the rate of P released from these insoluble phosphate sources exceeded its consumption rate for bacterial growth and that most strains solubilized TCP more efficiently than RP. Preliminary results suggested that the solubilization process of BYC, the most efficient RP and TCP solubilizing strain, involves both acidification of the medium and excretion of siderophores. Actinomycete strains possessing such interesting RP solubilizing abilities may constitute a novel kind of fertilizers beneficial for plant nutrition and more environmentally friendly than chemical fertilizers in current use.

**Keywords:** insoluble phosphate; biosolubilizing; biofertilizer; Actinobacteria; sugar beet

#### 1. Introduction

Phosphorus (P) is one of the 16 elements essential for plant growth [1]. Phosphate availability greatly determines growth and fitness of the plants and thus crops quality and yields [2]. In condition of P deficiency, plant root development is inhibited and this leads to a delay in plant growth [3]. Phosphorus concentration in natural soils varies from 50 to 3000 mg kg<sup>-1</sup> of soil, yet only 0.1% of total phosphorus is really accessible to plants [4,5]. Indeed, most phosphate is immobilized in the soil [6] either via its adsorption

## **PARTIE 2.2. Criblage et caractérisation d'Actinomycètes solubilisatrices du potassium naturel et présentant des aptitudes au biocontrôle contre *Fusarium* spp.**

### **I. Introduction**

L'une des plantes les plus couramment cultivées et utilisées dans l'industrie sucrière est la betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.). La production de sucre de cette culture est classée la deuxième au monde après la production de canne à sucre (Lateef, Abd El et al. 2019). Cependant, la betterave sucrière est la plus résistante face aux conditions défavorables de l'environnement que la canne à sucre (Jbawi et al. 2013). Au Maroc, la betterave sucrière occupe une superficie de 57 171 hectares avec une production de 3,7 millions de tonnes en 2019 (FAOSTAT 2021b). La région de Béni Mellal-Khenifra (à l'Est de Casablanca) située dans une vaste plaine agricole au Maroc représente 26% de la production nationale avec une superficie de 15 000 hectares et contribue respectivement à 20,5% et 21,2% à la superficie nationale et à la production de betterave sucrière au Maroc.

La betterave sucrière nécessite une fertilisation équilibrée par les trois macronutriments : l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K). Le potassium est l'un des éléments les plus importants pour la nutrition de la betterave sucrière et joue un rôle important dans l'activation enzymatique, l'équilibre de charge, l'osmorégulation et la réduction des effets négatifs du stress hydrique (Cakmak 2005; Aksu and Altay 2020b). Dans la betterave sucrière, le K est également impliqué dans la biosynthèse et le transfert du saccharose aux racines de stockage (Barlog et al. 2013). Hanafy et al. (2019) ont constaté que l'application de K améliorait significativement le rendement des racines, la longueur, le diamètre et le poids des racines fraîches de la betterave sucrière. De plus, de nombreuses études ont rapporté que le K et l'N améliorent la biosynthèse des métabolites organiques qui augmentent le rendement et la qualité de la betterave sucrière (Abdel-Motagally and Attia 2009). Dans le sol, le K est un élément minéral qui représente une partie mineure soluble, allant de 1,00 à  $1,5 \times 10^{-3}$  mmol/l, et est donc indisponible pour l'absorption par les plantes (Sparks and Huang 1985). Dans le sol, le potassium (98 %) existe sous forme de minéraux silicatés (orthoclase, feldspath, muscovite, microline, etc.) (Sugumaran and Janarthanam 2007).

Contrairement à l'action bien documentée des micro-organismes solubilisant le phosphate et fixant l'azote dans la nutrition des plantes en P et N (Wang et al. 2019; Li et al. 2020c), l'importance de l'activité microbienne sur la nutrition potassique des plantes est moins bien étudiée. Cependant, il a été démontré que les bactéries et les champignons mycorhiziens solubilisent le K minéral par divers mécanismes tels que la production de substances alcalines, notamment l'ammoniac et d'autres métabolites lors de la lyse des cellules microbiennes et de la protéolyse ultérieure (Baghel et al. 2020; Ben-laouane et al. 2020). Les bactéries solubilisatrices du K (BSK) ont attiré plus d'attention en raison de leur capacité à augmenter la croissance et le rendement des plantes (Sattar et al. 2018). Cependant, très peu d'études ont démontré ces capacités de BSK (Meena et al. 2014; Saha et al. 2016; Xiao et al. 2017; Ali et al. 2020; Sun et al. 2020; Boubekri et al. 2021). A ce jour et à notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle étude est entreprise, notamment sur les Actinobactéries endémiques des rhizosphères de betterave sucrière de la région de Béni-Mellal avec ces critères PGPR.

Comme toutes les plantes, les betteraves sucrières sont parasitées par un certain nombre de champignons capables de s'attaquer à un ou plusieurs de leurs organes en réduisant leur croissance et les réserves accumulées dans les racines. *Rhizoctonia solani* représente l'une des contraintes majeures de la production de betterave sucrière dans le monde (Hillnhütter et al. 2011) et la principale cause de diverses maladies des plantes en particulier la pourriture des racines (Wolfgang et al. 2020). *Fusarium* sp. est un autre agent destructeur de la betterave sucrière, provoquant la pourriture racinaires (Harveson and Rush 1997, 1998; Lucchi et al. 2017). Les plantes infectées par *Fusarium* sp. présentent des symptômes précoces : la couleur des feuilles vire au jaune et elles meurent, les pétioles flétrissent également autour de la couronne et le rendement des racines et le pourcentage de saccharose sont réduits (Hanson et al. 2009). De plus, *Rhizoctonia crocorum*, *Phoma betae*, *Aphanomyces cochlioides*, *Macrophomina phaeseolina*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora drechsleri*, *Sclerotium rolfsii* et *Rhizopus stolonifer* sont également des agents responsables de la pourriture des racines de la betterave sucrière (Jacobsen 2006; Errakhi et al. 2009)

Les Actinobactéries sont connues pour la production de phytohormones telles que l'éthylène, l'acide gibbérellique, l'acide indole-3-acétique (AIA), les cytokines et les ACC désaminases (Elbendary et al. 2017; Yoolong et al. 2019; Djebaili et al. 2020; Gebauer et al. 2021). De plus, les Actinomycètes peuvent avoir des activités antimicrobiennes et des effets contre les

phytopathogènes (Hamdali et al. 2008b, 2021; Olanrewaju et al. 2017). Sur les 10 000 molécules antimicrobiennes produites par les Actinomycètes, plus de 50 % ont été isolées de Streptomycètes (Evangelista-Martínez 2014).

Par conséquent, cette recherche visait à évaluer si les 10 souches de *Streptomyces* présélectionnées solubilisatrices du P isolées des rhizosphères de la betterave sucrière a Béni-Mellal (Aallam et al. 2021a) possèdent des activités PGPR à fonctions multiples, en testant leurs capacités à solubiliser le K à partir de l'orthoclase insoluble, à produire des auxines et à inhiber les agents pathogènes des racines de betterave à sucre dans des conditions de laboratoire. Grâce à ces expériences, nous nous attendions à identifier les souches les plus performantes de la collection pour de futurs essais sur le terrain.

## II. Matériel et Méthodes

### 2.1. Les souches d'Actinomycètes

Dix souches d'Actinomycètes sélectionnées, utilisées dans cette étude, ont été isolées de trois rhizosphères différentes de betterave sucrière et qui ont été préalablement sélectionnées pour leurs capacités à solubiliser des formes phosphatées insolubles (un phosphate naturel marocain, RP, et un phosphate tricalcique synthétique, TCP) en utilisant le milieu MMS et à produire des sidérophores (Aallam et al. 2021a): AYD, AZ, AV et BX apparentés à *Streptomyces bellus* ; BYC : *Streptomyces enissocaesilis* ; AI : *Streptomyces tunisiensis* ; BP : *Streptomyces coerulescens* ; CYM : *Streptomyces cyaneofuscatus* ; DE1 : *Streptomyces bellus* et DE2 : *Streptomyces saprophyticus*. Les spores des isolats d'Actinomycètes sélectionnés ont été conservés dans du glycérol stérile à 20 % à -20 °C pour les tests suivants.

### 2.2. Capacités des Actinomycètes à utiliser l'orthoclase comme seule source de potassium

La solubilisation du potassium par les 10 souches d'Actinomycètes a été réalisée sur le milieu gélosé modifié d'Aleksandrov (MMA) (Meena et al. 2015), contenant 5,0 g/l de glucose, 0,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l de CaCO<sub>3</sub>, 0,006 g/l de FeCl<sub>3</sub>, 2,0 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et de poudre d'orthoclase (2,0 g/l) (Hu et al. 2006) comme source unique de K, ou sur MMA contenant du K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> soluble (0,5 g/l) comme témoin positif ou sur MMA sans aucune source de K comme témoin négatif. Après l'ensemencement, les boîtes de gélose ont été incubées pendant 21 jours à 28 °C afin de permettre la croissance des Actinomycètes à croissance lente.

### **2.3. Estimation de la quantité de potassium solubilisée par les souches d'Actinomycètes sélectionnées**

Trois tests différents avec  $10^6$  spores/ml de chacune des dix souches d'Actinomycètes sélectionnées ont été inoculés dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml d'MMA liquide avec 2 g/l d'orthoclase comme seule source naturelle de K. Les cultures ont été cultivées pendant 5 jours à  $28 \pm 2$  °C sur un agitateur rotatif (180 g/min) (Meena et al. 2015). Chaque jour, une aliquote de 1 ml de chaque culture a été prélevée et centrifugée à  $10\ 000 \times g$  pendant 10 min. La biomasse sèche et le pH du surnageant ont été déterminés. Le surnageant a été analysé pour la teneur en K soluble par spectroscopie d'émission atomique à plasma et à couplage inductif selon Liu et al. (2016). Des mesures similaires ont été effectuées dans des flacons nonensemencés incubés dans les mêmes conditions.

### **2.4. Dosage de la quantité d'acide indole acétique produite (AIA)**

La production d'AIA a été évaluée sur le milieu Lauria-Burtani (LB) liquide supplémenté en L-tryptophane (Merck, Darmstadt, Allemagne) (1 g/l) (Sachdev et al. 2009). Le milieu de croissance utilisé contenait du tryptone (Merck) (10 g), extrait de levure (Merck) (5 g), NaCl (5 g) dans 1 l d'eau désionisée. Ce milieu a été stérilisé à 121°C pendant 20 min. Après, des tubes stérilisés contenant 10 ml de milieu ont étéensemencés avec 20 ml de cultures d'Actinobactéries ( $10^7$  cfu/ml) et incubés à 28 °C pendant 72 h sous une agitation modérée à 130 rpm/min. La détermination de la concentration en AIA a été réalisée par l'ajout de 2 ml de réactif de Salkowski (2% (w/v) 0,5 M  $\text{FeCl}_3$  dans 35% d'acide perchlorique) à 1 ml du surnageant de culture préalablement centrifugé pendant 10 min à  $10\ 000 \times g$ . Une couleur rose indiquait la présence d'AIA. La concentration d'AIA produite a été estimée en mesurant la DO à 530 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité (Loper and Schroth 1986). La concentration d'AIA produite par chaque souche d'Actinomycète a été déterminée par la génération d'une courbe étalon standard.



## 2.5. Isolement des champignons à partir des racines de betterave sucrière infectées

Des champignons filamenteux ont été collectés lors d'une campagne de récolte de betteraves sucrières en juin 2020. Le site de betterave sucrière contaminé était situé à 25 km de la ville de Béni Mellal (32°29'34.2" N 6°10'56,1" W, du centre du Maroc). Ce site infecté a un climat méditerranéen chaud avec une température comprise entre 1,1 °C et 40 °C et une pluviométrie annuelle moyenne généralement comprise entre 350 et 650 mm/an (Barakat et al. 2019). Dans des sacs en plastique stériles, les racines présentant des symptômes d'infection fongique ont été récoltées et isolées de manière aseptique (Figure 18).



**Figure 18.** Symptômes d'infection racinaire et du champ de betterave sucrière par les *Fusarium* spp., agents causaux de la pourriture des racines du site d'étude de Béni Mellal

Selon le protocole modifié de Chenaoui et al. (2017), le sol rhizosphérique de betterave sucrière contaminé a été enlevé. Pour cultiver des champignons rhizoplaniques qui peuvent être associés aux symptômes racinaires et interagir avec les Streptomycètes de la rhizosphère, le mycélium à la surface des racines a été gratté avec une anse de platine stérile et étalé sur un milieu de gélose de dextrose de pomme de terre (PDA) (Merck, France). Le milieu PDA utilisé contenait de l'infusion de pomme de terre (4 g), du dextrose (20 g) et de la gélose (17 g) dans 1 l d'eau déminéralisée à un pH final de  $5,6 \pm 0,2$ . Les boîtes de Pétri ont été incubées dans l'obscurité à  $26 \pm 2$  °C pendant 7 à 8 jours et contrôlées chaque jour. Les hyphes ont été purifiés et conservés sur milieu PDA pour une étude plus approfondie.

## **2.6. Identification moléculaire des champignons isolés (extraction d'ADN et amplification d'ITS)**

L'identification préliminaire des trois champignons sélectionnés (CHAMP1, CHAMP2 et CHAMP3) a été réalisée par observation microscopique des plaques au bleu de lacto phénol, par examen direct à l'encre de Chine 20 % KOH et par description des caractéristiques macroscopiques des colonies après une période d'incubation de 8 à 10 jours à 25 °C.

Pour l'identification moléculaire, l'ADN fongique a été isolé à partir de cultures pures sur milieu gélosé de Sabouraud des trois isolats sélectionnés. Environ 1 cm<sup>2</sup> de mycélium a été collecté et ajouté à un tube Eppendorf contenant 1 ml d'eau distillée et 12 à 15 billes de verre de 3 mm de diamètre (Merck). Après agitation à vitesse maximale pendant 2 min, 300 µl de la suspension contenant du mycélium fragmenté ont été utilisés pour l'extraction automatisée de l'ADN avec l'instrument Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega, Madison, WI, USA) et le Maxwell RSC PureFood GMO et Authentication Kit (Promega) selon les instructions du fabricant. La région nucléaire ribosomique ITS1-5.8S-ITS2 a été amplifiée avec les amorces universelles ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Leaw et al. 2006). Le segment d'ADNr nucléaire correspondant à la région D2 de l'ARN ribosomique 28S fongique (ADNr 28S-D2) a été amplifié avec les amorces NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3') et NL4 (5'-GGTCCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Vainio and Hantula 2000). La région de l'ARN ribosomique 18S a été amplifiée avec les amorces FR1 (5'-ANC CAT TCA ATC GGT ANT-3') et FF390 (5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3') (Leaw et al. 2006).

Les amplifications ont été réalisées dans un mélange réactionnel de 25 µl contenant 5 µL de PuRe Taq Ready-To-Go PCR Mix (GE Healthcare Little Chalfont, UK), 4,5 pmol de chaque amorce, 9.1 µL d'eau et 50 ng d'ADN. Les conditions de PCR étaient les suivantes : après dénaturation initiale (95 °C pendant 3 min), 45 cycles de 95 °C pendant 1 min, 54 °C pendant 1 min s et 72 °C pendant 2 min, suivis d'une extension finale (7 minutes, 72 °C). Toutes les amplifications ont été réalisées en utilisant un système GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems). Des témoins négatifs ont été inclus sans ajout d'ADN matrice. Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose à 2 % (p/v) coloré au bromure d'éthidium. La région nucléaire ribosomique ITS1-5.8S-ITS2, la région d'ARN ribosomique 28S et la région d'ARN ribosomique

18S ont été séquencées de manière bidirectionnelle avec les amorces ITS1 et ITS4, NL1 et NL4, et FR1 et FF390, respectivement.

Des similitudes de séquences ont été effectuées contre des séquences correspondantes d'espèces de *Fusarium* en utilisant GenBank via Nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (consulté le 3 avril 2021)). Un arbre phylogénétique non enraciné a été inféré en utilisant la méthode de jointure des voisins (Saitou and Nei 1987). Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés se sont regroupés dans le test de bootstrap (1000 répliqués) est indiqué à côté des branches (Felsenstein 1985). Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode à 2 paramètres de Kimura (Kimura 1980) et sont exprimées en unités du nombre de substitutions de bases par site. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA X (Kumar et al. 2018a).

## **2.7. Essais *in vitro* d'activité antagoniste**

La méthode de diffusion sur les boîtes de pétrie a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne à large spectre des 10 souches sélectionnées (Bauer et al. 1966) contre les bactéries Gram-négatives suivantes : *Escherichia coli* CCMM/B4 et *Pseudomonas aeruginosa* CCMM/B90, *Klebsiella pneumonia* E40, *Salmonelle* sp. CCMM/B17, les bactéries Gram-positives suivantes : *Bacillus subtilis* ATCC 9524, *Staphylococcus aureus* CCMM/B2, *Streptococcus* sp. CCMM/B24 et la levure *Candida albicans* CCMM/L11 (toutes les souches de la collection du Laboratoire BVRP, USMS Béni Mellal) et trois champignons isolés du champ infecté des rhizosphères de betterave sucrière, Béni Mellal, Maroc, comme décrit ci-dessus. Ces 10 *Streptomyces* sp. ont été cultivés sur MMS solide (Hamdali et al. 2008b) pendant 14 jours puis trois disques (diamètre 10 mm) ont été découpés et placés sur des pelouses cultivées pendant 48 h des différents microorganismes sur gélose nutritive (Difco, Sparks, MD, USA) pour les bactéries et les levures testés. D'abord, les boîtes ont été conservées à -4 °C pendant au moins 2 h pour permettre la diffusion de toutes les substances produites, puis incubées à 28 °C. Les tailles des zones d'inhibition ont été déterminées après 24 h d'incubation pour les bactéries et les levures. Les contrôles impliquaient l'utilisation de bouchons de gélose stériles. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque isolat dans chaque test de microorganisme.

Pour les champignons, nous avons suivi la technique de double culture de Karimi et al. (2016) qui a été légèrement modifiée. Brièvement, des disques de 10 mm de diamètre provenant de

cultures de champignons âgées de 5 jours ont été placés au centre de plaques de gélose Sabouraud et les disques de souches d'Actinomycètes testées ont été placés de part et d'autre des plaques de Sabouraud à une distance de 2,5 cm. Après 5 jours d'incubation à 28 °C, le diamètre de propagation des champignons a été enregistré et le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé :  $PI = [(T - S)/T] \times 100$  ; où T représente le rayon de la colonie mycélienne (mm) d'une culture témoin et S représente le rayon de la colonie mycélienne du champignon en présence de la souche *Streptomyces* (Aallam et al. 2021a).

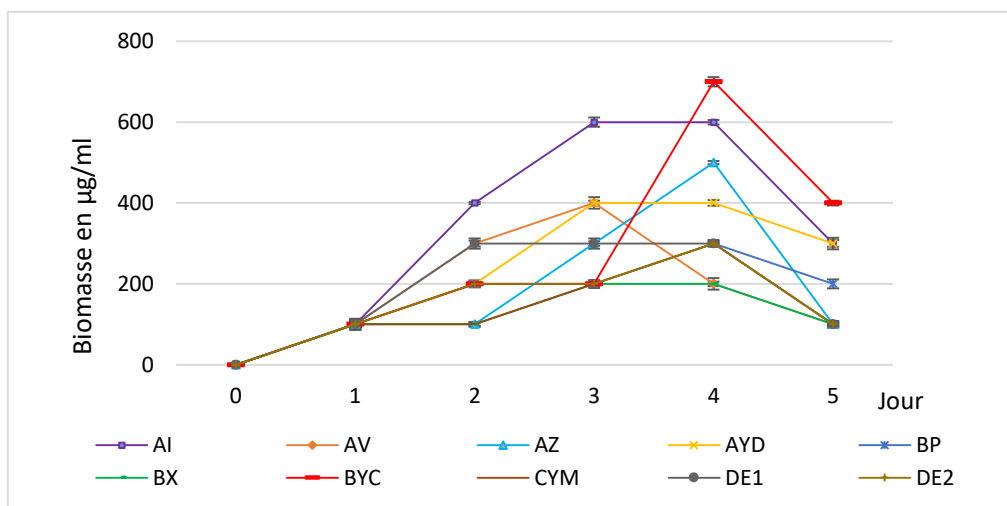
## **2.8. Analyse statistique et détection des souches les plus prometteuses pour des applications simultanées de biofertilisation et de biocontrôle**

Tous les résultats expérimentaux ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel statistique SPSS, version 23.0 (IBM, New York, USA). Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Les moyennes ont été comparées à l'aide du test de différence la moins significative (LSD),  $p < 0,05$  indique des différences significatives. Pour sélectionner les isolats de streptomycètes les plus prometteurs pour des applications combinées de biofertilisation et de lutte biologique, leurs activités relatives dans le phosphate naturel et le phosphate tricalcique et de solubilisation du potassium, l'activité antifongique contre *Fusarium* spp., l'activité antibactérienne et la production d'AIA et de sidérophores ont été comparées entre les souches et utilisées pour les noter de 1 (le plus bas) à 10 (l'activité la plus élevée). Afin d'atteindre l'objectif de sélectionner des biofertilisants et des agents de lutte biologique combinés, les valeurs de notation pour la solubilisation du phosphate naturel et du potassium, la production d'AIA et l'inhibition de *Fusarium* ont été multiplié par 2 (doublées).

### III. Résultats

#### 3.1. Cinétique de croissance des souches d'Actinomycètes sélectionnées dans MMA + Orthoclase

Les dix souches d'Actinomycètes testées présentent une meilleure croissance sur le MMA solide avec l'orthoclase comme seule source de potassium. La figure 19 montre que la cinétique de croissance de la plupart des souches était variable d'une souche à l'autre. Cela indiquait que les souches étaient capables d'assimiler des quantités variables de potassium à partir de ces sources de K insolubles, avec une efficacité différente, et de l'utiliser pour leur propre croissance. Les seules exceptions étaient les souches BYC et AI qui ont montré une meilleure croissance sur MMA + orthoclase. Principalement, dans le MMA + orthoclase, toutes les souches ont donné une biomasse plus faible au jour 5 qu'au jour 4, suggérant une lyse cellulaire. Cependant, le rendement en biomasse n'était pas le même pour toutes les souches et les souches ont pu être regroupées en trois classes : classe I avec un rendement en biomasse  $\geq 600 \mu\text{g/ml}$  (BYC et AI), classe II avec un rendement en biomasse entre 300 et 600  $\mu\text{g/ml}$  (AZ, DE1, BP, CYM, DE2, AV et AYD) et classe III avec un rendement en biomasse inférieur à 200  $\mu\text{g/ml}$  (souche BX) (Figure 20).



**Figure 19.** Evolution de la biomasse des souches d'Actinomycètes sélectionnées cultivées dans le liquide MMA + orthoclase. Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de culture indépendantes.

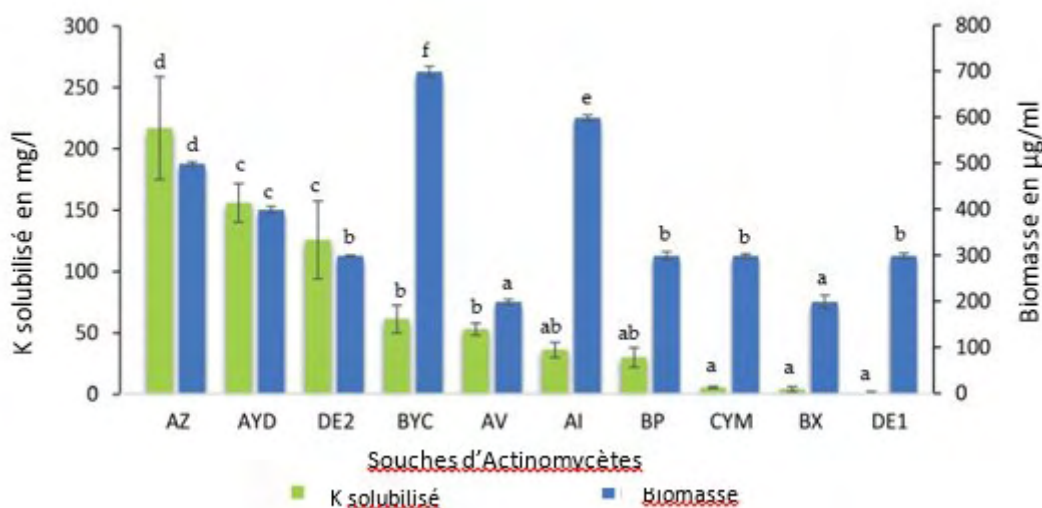
### **3.2. Estimation de la quantité de potassium solubilisée par les souches d'Actinomycètes sélectionnées**

La concentration de K soluble dans le surnageant des 10 souches de Streptomyces sélectionnées dans les rhizosphères de betterave sucrière a été évaluée (figure 20).

Toutes les souches ont pu libérer du potassium, à l'exception de la souche DE1 qui l'a probablement utilisé pour sa propre croissance. La quantité de K soluble libérée variait grandement d'une souche à l'autre et allait de 3,8 mg/l à 216,6 mg/l. Trois souches (AZ, AYD et DE2) ont libéré une grande quantité de potassium dans les surnageants du MMA (> 100 mg/l) (Figure 20). La présence de grandes quantités de K dans le surnageant de ces souches en présence d'orthoclase indiquait simplement que le taux de K libéré par l'orthoclase dépassait son taux de consommation pour la croissance bactérienne. Comme prévu, les souches avec les rendements de biomasse les plus faibles (Figure 20) ont solubilisé les plus petites quantités de potassium (Figure 20).

Les souches AZ et AYD (classe II) ont libéré la concentration maximale de K soluble (216,6 mg/l et 155,6 mg/l, respectivement), tandis que les souches BYC et AI (classe I) ont libéré des quantités environ 2 à 3 fois plus petites de K soluble de l'orthoclase (61 mg/l et 35,8 mg/l, respectivement) (Figure 20).

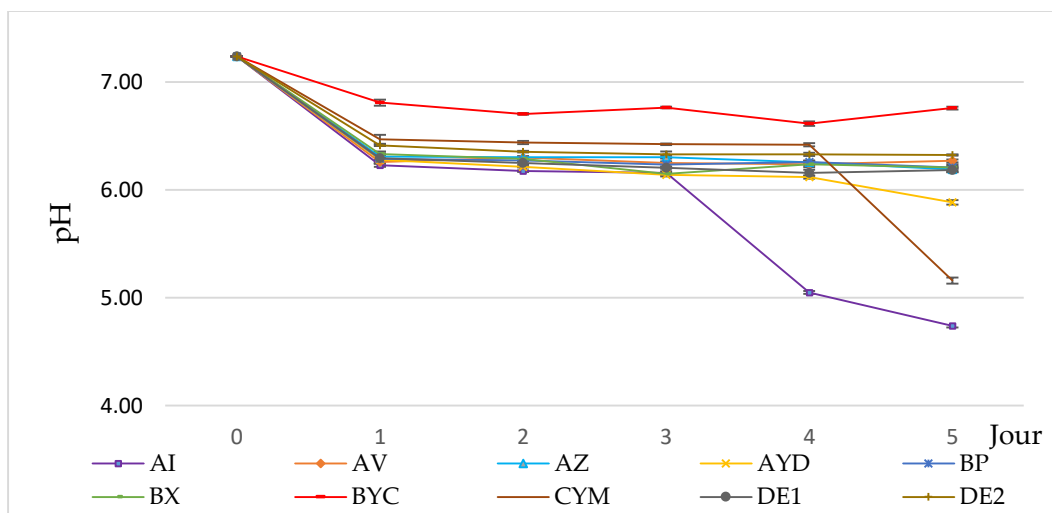
La souche BYC (classe I) est particulièrement intéressante car elle a pu libérer une grande quantité de K à partir de l'orthoclase (61 mg/l) et son rendement en biomasse était le plus élevé (Figure 20). Les souches AYD et DE2 (classe II) ont libéré deux fois plus de K soluble de l'orthoclase (155,6 mg/l et 125,4 mg/l, respectivement) que la souche BYC (Figure 20). Le rendement en biomasse de la souche AI était inférieur de 14 % à celui de la souche BYC dans des conditions de culture similaires. C'est intéressant de signaler que les souches DE1 (classe II) et BX (classe III) n'ont pas augmenté la quantité de potassium soluble dans le milieu de culture. Cela suggérait que la capacité de solubilisation du K de ces souches était moins efficace que celle des autres.



**Figure 20.** Concentration de potassium soluble libéré (mg/l) de l'orthoclase dans le surnageant des cultures des dix souches d'Actinomycètes sélectionnées (barres vertes) cultivées pendant cinq jours dans de le MMA contenant 2 g/l d'orthoclase avec des valeurs soustraites de celles des flacons non ensemencés. Le rendement maximal de la biomasse en µg/ml des 10 souches d'Actinomycètes sélectionnées est indiqué dans l'histogramme (barres bleues). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions indépendantes de culture. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements à  $p \leq 0,05$ .

### 3.3. Evolution du pH du milieu

Le pH du milieu de croissance de toutes les souches était compris entre 7,2 et 6,2 au 1<sup>er</sup> jour et s'est stabilisé ensuite dans la plupart des cas à environ pH 6,2, sauf pour les souches AI, CYM et AYD (Figure 21). Cela indiquait que le processus de solubilisation pourrait impliquer l'excrétion d'acides organiques. Le pH du milieu a diminué en dessous de 6 pour la souche AI à partir du 3<sup>ème</sup> jour (Figure 21). La souche AYD a libéré la plus grande quantité de K (155,6 mg/l) tandis que l'AI a libéré une bonne quantité de K de l'orthoclase (35,8 mg/l) et CYM a libéré une quantité plutôt faible (5,15 mg/l) (Figure 20). Le pH du milieu des sept souches restantes (AZ, AYD, DE2, BYC, AV, BP et BX) était similaire et stabilisé à pH 6 (Figure 21), suggérant leurs capacités à solubiliser le K par la production d'acides organiques.

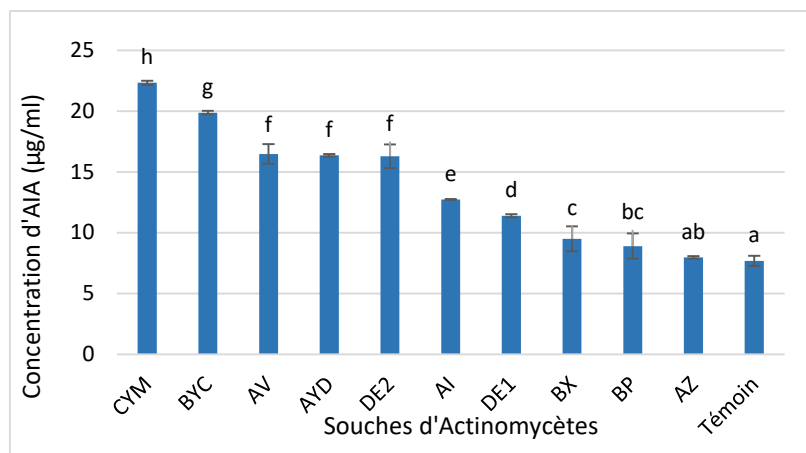


**Figure 21.** Evolution du pH du milieu des souches d'Actinomycètes sélectionnées cultivées en MMA + orthoclase. Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de cultures indépendantes.

### 3.4. Production d'acide indole acétique (AIA)

Les résultats de la production d'AIA des 10 *Streptomyces* spp. sont illustrés à la figure 22. La production d'AIA a été détectée chez toutes les souches avec des quantités significativement différentes, allant de 7,9 à 22,3 g/ml. La concentration la plus élevée a été produite par les souches CYM et BYC ( $22,3 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  et  $19,8 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ , respectivement) suivies par AV ( $16,4 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ ), AYD ( $16,3 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ ) et DE2 ( $16,2 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$ ). Les valeurs les plus faibles sont  $7,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  et  $8,8 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$  obtenues respectivement par les souches BP et AZ (Figure 22).





**Figure 22.** Concentration d'acide indole acétique libérée (µg/ml) dans les flacons non ensemencés (contrôle) et dans le surnageant des cultures des dix souches d'Actinomycètes sélectionnées cultivées pendant 72 h en milieu LB liquide contenant du L-tryptophane (1 g/l). Les barres d'erreur représentent les écarts types des valeurs moyennes des résultats de trois répétitions de cultures indépendantes. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements à  $p \leq 0,05$ .

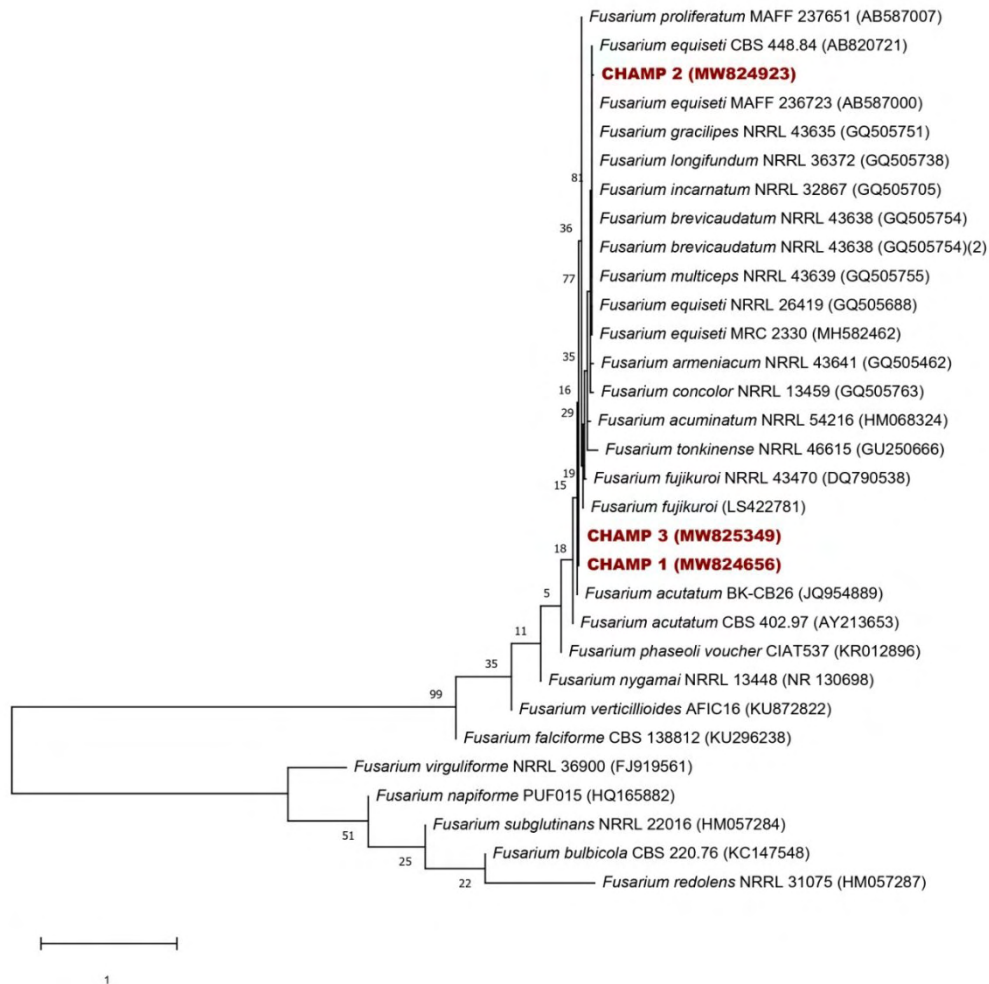
### 3.5. Identification des champignons isolés

Le résultat de l'identification préliminaire montre que les trois isolats sélectionnés (CHAMP1, CHAMP2 et CHAMP3) appartiennent au genre *Fusarium*. Macroscopiquement, la plupart des colonies étaient caractérisées par leur aspect cotonneux, leur pigmentation saumon et leur couleur pourpre, lilas, brun clair, jaune ou grise. Au microscope, les colonies étaient caractérisées par des hyphes hyalins, cloisonnés et filamenteux, des macroconidies cloisonnées et fusiformes avec un aspect caractéristique d'alantospore, des microconidies ovales et, dans certains cas, des chlamydoconidies à parois épaisses.

Les séquences des champignons de trois isolats sélectionnés ont été analysées à l'aide de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (consulté le 3 avril 2021)). Ils appartenaient au genre *Fusarium*, portant une identité d'au moins 99% et ont confirmé notre résultat d'identification préliminaire.

Les séquences nucléotidiques des champignons identifiés ont été déposées dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/> (consulté le 3 avril 2021)), et ont reçu le numéro d'accèsion. MW824656 (*Fusarium equiseti*), MW824923 (*Fusarium fujikuroi*) et MW825349 (*Fusarium fujikuroi*).

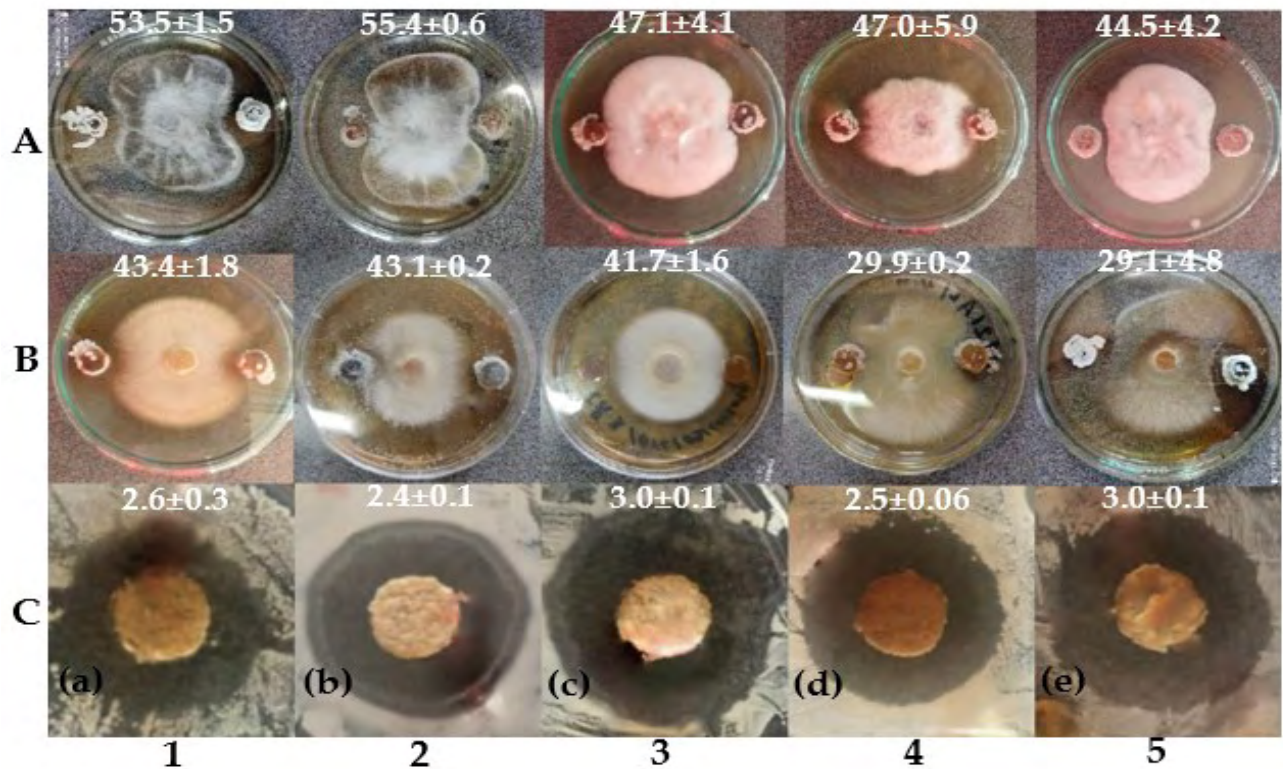
Un gène d'ARN ribosomal de petite sous-unité, un espaceur interne transcrit 1 et un gène d'ARN ribosomique 5.8S et des séquences d'espaceur 2 interne transcrit (513 nt) de 28 espèces de *Fusarium* récupérées de GenBank, ainsi que celles de nos souches ont été utilisés pour la construction d'un arbre phylogénétique (Figure 23). Les résultats montrent que deux champignons (CHAMP1 et CHAMP3) étaient étroitement apparentés à *F. fujikuroi* et l'isolat CHAMP2 était apparenté à *F. equiseti*.



**Figure 23.** Arbre phylogénétique voisin des trois souches fongiques isolées (CHAMP 1, CHAMP 2 et CHAMP 3) et 28 espèces de *Fusarium* basé sur le gène d'ARN ribosomique de petite sous-unité, séquence de l'espaceur interne transcrit 1 et le gène d'ARN ribosomique 5.8S et les séquences d'espaceur interne 2 transcrites (513 nt). Les nombres aux nœuds indiquent les niveaux de prise en charge du bootstrap (%) sur la base d'une analyse de jointure par voisins de 1000 ensembles de données ré-échantillonnés ; seules les valeurs >50% sont données. Les numéros d'accès sont indiqués entre parenthèses. La barre marque une substitution de nucléotide par site.

### 3.6. Essais *in vitro* d'activité antagoniste

Nous avons évalué l'activité antagoniste des 10 *Streptomyces* spp. sélectionnées contre les trois champignons isolés et identifiés des sols rhizosphériques des champs infectés de la betterave sucrière, les bactéries pathogènes et les levures (Figure 24). Tous les *Streptomyces* spp. ont montré une activité antagoniste à différents pourcentages d'inhibition (PI). Les PI enregistrés sont de 6,9 % (souche BX) à 55,4 % (souche AYD). La souche AYD a présenté un effet inhibiteur (PI) significativement plus élevé contre les deux champignons identifiés, *Fusarium fujikuroi* (CHAMP1) et *F. equiseti* (CHAMP2), à 55,4 %  $\pm$  0,6 et 43,1 %  $\pm$  0,2, respectivement (Figure 24) ; alors que l'activité la plus faible a été montrée par la souche AZ.



**Figure 24.** Comparaison de l'activité antagoniste des cinq *Streptomyces* spp. les plus performantes (1 : DE2, 2 : AYD, 3 : BYC, 4 : AI et 5 : AV) contre les trois champignons phytopathogènes isolés de la rhizosphère de betterave sucrière située à Béni Mellal-Maroc : (A) *Fusarium fujikuroi* (CHAMP1) et (B) *F. equiseti* (CHAMP2), (C) levure : (a) *Candida albicans* CCMM/L11, bactéries pathogènes : (b) *Escherichia coli* CCMM/B4, (c) *Salmonella* sp. CCMM/B17, (d) *Klebsiella pneumonia* E40, (e) *Staphylococcus aureus* CCMM/B2.

Aucun des 10 isolats de *Streptomyces* testés n'a montré d'activité contre les Gram positif : *Bacillus subtilis* ou *Streptococcus* sp., ou contre la Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa*. Une action inhibitrice significative a été montrée par les souches CYM, DE1 et AZ contre *Staphylococcus aureus*. Les 10 *Streptomyces* spp. n'ont pas pu limiter la croissance de la bactérie à Gram négatif, *Escherichia coli*, à l'exception de la souche AYD. Seules les souches BYC et AYD avaient une activité inhibitrice significativement forte contre *Salmonella* sp. À l'exception des souches AYD et AV, toutes les souches testées avaient une activité inhibitrice contre *Klebsiella pneumoniae*. Les souches BYC, BP et DE1 ont produit les plus grandes zones d'inhibition. Neuf des dix *Streptomyces* spp. (À l'exception de la souche BX) ont inhibé la croissance de *Candida albicans* et les souches DE2, CYM et DE1 ont produit les plus grandes zones d'inhibition (Tableau 10).

**Tableau 10.** Activités antagonistes *in vitro* des dix souches de *Streptomyces* contre les trois isolats de *Fusarium* provenant des racines infectées de betterave sucrière de Béni Mellal- Maroc : Deux *Fusarium fujikuroi* (CHAMP1 ; CHAMP3) et un *F. equiseti* (CHAMP2) ; une levure : *Candida albicans* CCMM/L11 ; des bactéries pathogènes pour l'homme : *Escherichia coli* CCMM/B4 ; *Salmonelle* sp. CCMM/B17, *Klebsiella pneumoniae* E40, *Staphylococcus aureus* CCMM/B2 ; *Bacillus subtilis* ATCC 9524, *Streptocoque* sp. CCMM/B24, *Pseudomonas aeruginosa* CCMM/B90 (zone d'inhibition  $\pm$  SD cm ; pourcentage d'inhibition  $\pm$  SD mm). Différentes lettres minuscules à côté des chiffres montrent des différences significatives entre les traitements à  $p \leq 0,05$ .

Souches de <i>Streptomyces</i>	Champignons			Bactéries à Gram+	Bactéries à Gram –			Levure
	CHAMP 1	CHAMP 2	CHAMP 3	<i>S. aureus</i> CCMM/B2	<i>Salmonella</i> sp. CCMM/B17	<i>K. pneumoniae</i> E40	<i>E. coli</i> CCMM/B4	<i>C. albicans</i> CCMM/L11
	Pourcentage d'inhibition (PI $\pm$ SD mm)			Zone d'inhibition $\pm$ SD cm				
AYD	55.4 $\pm$ 0.60f	43.1 $\pm$ 0.3e	36.6 $\pm$ 11.7b	0	1.3 $\pm$ 0.2a	0	1.6 $\pm$ 0.1a	2.4 $\pm$ 0.1c
DE2	53.5 $\pm$ 1.5ef	23.4 $\pm$ 12.8abcd	17.9 $\pm$ 13.6ab	0	0	2.6 $\pm$ 0.15bc	0	0
AV	47.1 $\pm$ 4.1def	8.2 $\pm$ 7.5a	27.1 $\pm$ 17.1ab	2.7 $\pm$ 0.1d	0	2.5 $\pm$ 0.0b	0	2.0 $\pm$ 0.1b
AI	47.1 $\pm$ 5.9def	41.7 $\pm$ 1.6e	27.7 $\pm$ 3.8ab	1.9 $\pm$ 0.1b	0	0	0	1.8 $\pm$ 0.2b
BYC	44.5 $\pm$ 4.2de	29.1 $\pm$ 4.8bcde	20.7 $\pm$ 5.6ab	0	2.6 $\pm$ 0.1b	3.0 $\pm$ 0.1d	0	2.7 $\pm$ 0.1cd
CYM	41.3 $\pm$ 8.8d	35.4 $\pm$ 3.5de	30.7 $\pm$ 5.7b	2.8 $\pm$ 0.1e	0	2.7 $\pm$ 0.1bc	0	2.9 $\pm$ 0.1d
BP	24.2 $\pm$ 1.2c	8.2 $\pm$ 7.5a	23.8 $\pm$ 5.3ab	1.3 $\pm$ 0.0a	0	3.0 $\pm$ 0.1d	0	1.3 $\pm$ 0.1a
DE1	20.4 $\pm$ 4.2bc	13.7 $\pm$ 7.3ab	23.0 $\pm$ 4.3ab	2.5 $\pm$ 0.2cd	0	2.8 $\pm$ 0.2c	0	2.6 $\pm$ 0.1c
AZ	7.6 $\pm$ 3.4a	19.2 $\pm$ 11abc	18.5 $\pm$ 2.6ab	2.3 $\pm$ 0.2c	0	2.2 $\pm$ 0.1a	0	1.7 $\pm$ 0.5ab
BX	12.7 $\pm$ 3.3ab	7.6 $\pm$ 0.7a	6.9 $\pm$ 0.4a	2.2 $\pm$ 0.4c	0	2.3 $\pm$ 0.1a	0	2.3 $\pm$ 0.3c

Finalement, les résultats ont été combinés pour identifier les souches à effets multiples avec les meilleures potentialités pour la promotion de la croissance et la protection de la betterave sucrière afin de les utiliser pour d'autres expériences dans les essais au champ (Tableau 11).

**Tableau 11.** Le score des critères de sélection des 10 *Streptomyces* spp. avec des activités PGP multifonctions à partir des sols rhizosphériques de la betterave sucrière a Béni Mellal- Maroc. Les chiffres du tableau représentent un score sur 10, attribué à chaque souche en fonction de sa capacité de solubilisation, de son activité antimicrobienne et du taux de libération d'AIA et de sidérophores.

Souches de Streptomyces	Solubilisation du RP * $\Psi$	Solubilisation TCP *	Solubilisation du K $\Psi$	Activité antifongique $\Psi$	Activité antibactérienne	Production d'AIA $\Psi$	Production des Sidérophores *	Note finale
BYC	20	9	14	16	4	18	9	90
AYD	16	8	18	20	3	14	8	87
DE2	10	10	16	18	7	12	10	83
AZ	14	7	20	4	6	2	7	60
AI	12	6	10	14	1	10	6	59
CYM	8	2	6	10	10	20	2	58
AV	4	4	12	12	5	16	4	57
BP	18	5	8	8	9	4	5	57
DE1	6	3	2	6	8	8	3	36
BX	2	1	4	2	2	6	1	18

\* : Aallam et al. (2021a)

$\Psi$  : Score des critères doublés

#### IV. Discussion

Lors de nos recherches précédentes (Aallam et al. 2021a), nous avons réussi à isoler 10 *Streptomyces* spp. et révélé leurs capacités de solubilisation du phosphate et de production de sidérophores. Dans cette étude, nous avons cherché à savoir si ces *Streptomyces* spp. représentent des aptitudes PGP à multiples fonctions en testant leurs capacités à solubiliser aussi le potassium de l'orthoclase, comme seule source de K, à produire des hormones de l'AIA et à évaluer leurs activités inhibitrices contre les *Fusarium* spp., agents causaux de la pourriture racinaire de la betterave sucrière dans la région de Béni Mellal (Maroc).

Plus de 90% du potassium existe dans les sols sous forme de roche insoluble et, généralement, la quantité de K soluble est très faible (Prasad et al. 2019). Il est devenu nécessaire d'isoler et de cribler les microorganismes solubilisateurs du K afin d'améliorer la quantité de K soluble dans le sol et de répondre aux besoins de croissance des plantes. Ainsi, les résultats de cette étude ont montré que les 10 *Streptomyces* spp. ont pu solubiliser le K en utilisant le MMA avec l'orthoclase comme seule source de K. Par conséquent, dans le MMA liquide, la quantité de K soluble variait de 3,8 mg/l à 216,6 mg/l après 5 jours de culture. De même, Han et al. (2018) ont rapporté que *Streptomyces rochei* et *S. sundarbansensis* libéraient des quantités de K de 7,46 à 13,71 mg/l dans les mêmes conditions. D'autres études ont montré que *Streptomyces alboviridis* P18, *S. griseorubens* BC3, *S. griseorubens* BC10 et *Nocardiopsis alba* BC11 avaient la capacité de solubiliser le K dans le MMA et les quantités de K variaient de 2,6 à 41,45 mg/l après 11 jours de culture (Boubekri et al. 2021). Reyes-castillo et al. (2019) ont rapporté que *Bacillus mucilaginosus* dissout le K de la motmorillonite, de la kaolinite et du K-feldspath avec des quantités de 90 à 140 mg/l après 7 jours de culture.

Les microorganismes ont de nombreux mécanismes de solubilisation du K à partir d'une source minérale. Des chercheurs ont suggéré que cette solubilisation pourrait être due soit à l'excrétion de protons,  $H^+$  ou  $CO_2$  et d'acides organiques, provoquant ainsi une acidification du milieu extérieur, soit à l'excrétion de substances chélatrices (comme les sidérophores) qui forment des complexes stables avec les adsorbants (aluminium, fer et calcium) de la roche potassique (Yuan et al. 2015; Dominguez-Nunez et al. 2016; Etesami et al. 2017; Bashir et al. 2019; Prasad et al. 2019). Dans cette étude, le pH du milieu de croissance de toutes les souches en MMA liquide avec l'orthoclase, comme seule source de K, était compris entre 7,2 et 6,2 au 1<sup>er</sup> jour de culture et s'est stabilisé par la suite dans la plupart des cas à environ pH 6,2, sauf pour les souches AI et CYM (Figure 20). Cela indiquait que le processus de solubilisation pourrait impliquer l'excrétion d'acides organiques. Il est intéressant de noter que la souche AI a produit une meilleure biomasse (Figure 20) et a montré qu'elle excréta des sidérophores, mais pas la souche CYM (Aallam et al. 2021a) ; alors que la souche BYC libérait une quantité plutôt faible (2 fois moins, 61 mg/l). Cependant, cette souche a produit des siderophores et a été sélectionnée comme la meilleure souche solubilisatrice du phosphate à partir du RP et du TCP (Aallam et al. 2021a). La purification et la caractérisation structurale de sidérophores et/ou d'acides organiques, potentiellement nouveaux, produits par cette souche sont en cours. Nos résultats sont en accord avec d'autres

recherches menées par Bagyalakshmi et al. (2017) qui ont rapporté que les BSK préfèrent une gamme de pH acide à neutre. De plus, d'autres chercheurs ont rapporté que la production de différentes protéines primaires et de polysaccharides peut également contrôler la libération de K à partir de minéraux porteurs de K (Liu et al. 2006; Sheng and He 2006; Shelobolina et al. 2012). En revanche, Dhiman et al. (2019) ont observé qu'à pH 7 les souches présentent la meilleure activité de solubilisation du K en présence de *Proteus mirabilis* MG738216.

De plus, les 10 *Streptomyces* spp. sélectionnées, à l'exception de la souche DE1, avaient la capacité de produire de l'AIA (Figure 22). Les souches CYM, BYC, AV, AYD et DE2 ont été les meilleures productrices d'AIA, avec des valeurs de plus de 15 µg/ml à 22,3 µg/ml. Selon Djebaili et al. (2020) les bactéries capables de produire plus de 13,0 µg/ml ont une activité PGP. De même, *Streptomyces atrovirens* a montré une activité stimulante intéressante sur l'arachide, le coton et le maïs (Reddy et al. 2016). Plusieurs autres études ont démontré la capacité des Actinomycètes à sécréter l'AIA dans plusieurs autres rhizosphères végétales (Han et al. 2018; Boubekri et al. 2021).

De multiples activités PGP potentielles par les 10 *Streptomyces* spp. ont été réalisées par leur activité antagoniste contre trois *Fusarium* spp. isolés et identifiés à partir de la rhizosphère de betterave sucrière infectée (Figure 18 ; Figure 24). En test de confrontation, *S. bellus* (AYD) a eu un effet inhibiteur plus élevé contre les trois agents fongiques responsables de la pourriture racinaire de la betterave sucrière : un *Fusarium equiseti* et deux *F. fujikuroi* à 55, 43 et 36 %, respectivement. De même Getha et al. (2005) ont démontré la capacité d'une *Streptomyces* sp. à inhiber la croissance de la fusariose du bananier. De plus, *Streptomyces bikiniensis* HD-087 isolé du sol des prairies de Hulunbeier montre une activité fortement antagoniste contre le *Fusarium oxysporum* (Zhao et al. 2012). *Streptomyces* a également montré une capacité à contrôler la flétrissure Fusarienne de la tomate en conditions de serre (Anitha and Rabeeth 2009). Selon Yang et al. (2019), 60% des antibiotiques utilisés en agriculture sont produits par différentes espèces de *Streptomyces*. Pour expliquer la capacité de biocontrôle des Actinomycètes, de nombreux mécanismes ont été suggérés tels que la sécrétion d'hydrolases de la paroi cellulaire extracellulaire (Li et al. 2017a), la production de métabolites secondaires (Soares et al. 2006), l'induction de la résistance des plantes (Kurth et al. 2014; Li et al. 2020b), la compétition sur des nutriments tels que le fer (sidérophores) dans l'environnement et en produisant des enzymes hydrolytiques notamment la chitinase qui dégradent la chitine qui est le constituant essentiel de la paroi cellulaire fongique (Singh et al. 2015; Musa et al. 2020).

## V. Conclusion

Les résultats suggèrent que les espèces sélectionnées dans cette étude, *Streptomyces enissocaesilis* (BYC), *S. bellus* (AYD) et *S. saprophyticus* (DE2), présentent les meilleures activités PGPR multifonctions et peuvent représenter des biofertilisants et des agents de biocontrôle efficaces (Tableau 11). D'autres études sur l'efficacité de leur utilisation dans des expériences en pots contrôlés et aux champs ont été réalisées. L'utilisation de ces souches de *Streptomyces* spp. en tant que solubilisatrices du P et du K, en plus de leur capacité de contrôle biologique, elles pourraient être considérées comme une voie innovante pour une utilisation durable de P et K naturels et le développement une agriculture durable et plus respectueuse de l'environnement.



## VI. Publication 2 : Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp.



Article

### Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp.

Yassine Aallam <sup>1</sup>, Bouchra El Maliki <sup>2</sup>, Driss Dhiba <sup>3</sup>, Sanaa Lemriss <sup>1,4</sup>, Amal Souiri <sup>4</sup>, Abdelmajid Haddioui <sup>1</sup>, Mika Tarkka <sup>5</sup> and Hanane Hamdali <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Biotechnology and Valorization of Plant Genetic Resources, Faculty of Sciences and Technology, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, Beni-Mellal 23000, Morocco; yassine.aallam@gmail.com (Y.A.); slemriss@lram-fgr.ma (S.L.); ahaddioui@yahoo.fr (A.H.)
- <sup>2</sup> Faculty of Medicine and Pharmacy, University Hassan II, Casablanca 20250, Morocco; b.elmaliki@gmail.com
- <sup>3</sup> International Water Research Institute (IWRI), Moulay Rachid, University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), Ben Guerir 43150, Morocco; driss.dhiba@um6p.ma
- <sup>4</sup> Laboratory of Research and Medical Analysis of Gendarmerie Royale, Department of Biosafety PCL3, Rabat 10090, Morocco; asouiri@lram-fgr.ma
- <sup>5</sup> UFZ—Helmholtz-Centre for Environmental Research, Soil Ecology Department, Theodor-Lieser-Straße 4, 06120 Halle, Germany; mika.tarkka@ufz.de
- \* Correspondence: hanane.hamdali@usms.ac.ma; Tel.: +212-523485112; Fax: +212-523485201



**Citation:** Aallam, Y.; Maliki, B.E.; Dhiba, D.; Lemriss, S.; Souiri, A.; Haddioui, A.; Tarkka, M.; Hamdali, H. Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp.. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1429. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071429>

**Academic Editors:** Pedro M. Santos and Pedro Castro

Received: 29 May 2021  
Accepted: 11 June 2021  
Published: 2 July 2021

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



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The characterized 10 *Streptomyces* isolates were previously selected by their abilities to solubilize phosphates. To investigate whether these isolates represent multifaceted plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), their potassium-solubilizing, auxin-producing and inhibitory activities were determined. The 10 *Streptomyces* spp. yielded a variable biomass in the presence of insoluble orthoclase as the sole potassium (K) source, indicating that they were able to extract different amounts of K from this source for their own growth. Three strains (AZ, AYD and DE2) released soluble K from insoluble orthoclase in large amounts into the culture broth. The production levels ranged from 125.4 mg/L to 216.6 mg/L after 5 days of culture. Only two strains, *Streptomyces enissocaeusilis* (BYC) and *S. tunisiensis* (AI), released a larger amount of soluble K from orthoclase and yielded much more biomass. This indicated that the rate of K released from this insoluble orthoclase exceeded its consumption rate for bacterial growth and that some strains solubilized K more efficiently than others. The results also suggest that the K solubilization process of AZ, AYD and DE2 strains, the most efficient K-solubilizing strains, involves a slight acidification of the medium. Furthermore, these 10 *Streptomyces* spp. were able to secrete indole acetic acid (IAA) in broth medium and ranged from  $7.9 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$  to  $122.3 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ . The results of the antibiosis test proved the potential of the 10 tested strains to limit the growth of fungi and bacteria. In dual culture, *S. bellus* (AYD) had highest inhibitory effect against the three identified fungal causal agents of root rot of sugar beet: *Fusarium equiseti* and two *F. fujikuroi* at 55, 43 and 36%, respectively. *Streptomyces enissocaeusilis* (BYC), *S. bellus* (AYD) and *S. saprophyticus* (DE2) exhibited higher multifaceted PGPR with their potassium-solubilizing, auxin-producing and inhibitory activities, which could be expected to lead to effectiveness in field trials of sugar beet.

**Keywords:** *Streptomyces* spp.; potassium solubilization; orthoclase; biocontrol; root rot; sugar beet

#### 1. Introduction

One of the most commonly cultivated plants used in the sugar industry is sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Production of sugar from this crop is the second largest in the world after production from sugar cane [1], but sugar beet is more resilient, coping with less favorable environmental conditions than sugar cane [2]. In Morocco, sugar beet occupies an area of 57,171 hectares with a production of 3.7 million tons in 2019 [3]. The Beni Mellal- Khenifra

**CHAPITRE III : EFFICACITÉ AGRONOMIQUE  
DES SOUCHES D'ACTINOMYCÈTES  
SÉLECTIONNÉES SOLUBILISATRICES DE  
PHOSPHATE ET DE POTASSIUM NATURELS ET  
LA PROTECTION CONTRE LA POURRITURE  
DES RACINES DE LA BETTERAVE SUCRIÈRE  
(*Beta Vulgaris* L.)**

## **PARTIE 3.1. Caractérisation du sol et évaluation de la contamination des sols des sites d'étude en oligo-éléments toxiques des champs de la betterave sucrière.**

### **(Caractérisation des sols)**

#### **I. Introduction**

Au cours des dernières décennies, la croissance de la population humaine dans le monde a accru le besoin d'approvisionnement alimentaire pour assurer la sécurité alimentaire. Cela conduit à l'utilisation, en agriculture, de divers pesticides, d'engrais et d'amendements organiques qui pourraient être une source potentielle d'altération des sols. Plusieurs auteurs ont signalé que les pratiques agricoles telles que l'application de pesticides, l'utilisation non adéquate d'engrais et l'utilisation excessive de fumier et de compost peuvent entraîner une contamination du sol par des éléments traces toxiques (Doyi et al. 2018; Khalifa and Gad 2018; Keshavarzi and Kumar 2019; Li et al. 2020a). Les éléments traces toxiques dans les sols agricoles pollués pourraient être transférés aux produits alimentaires et entraînent des risques importants à la santé humaine (Oumenskou et al. 2018; Adimalla et al. 2019; Qiuguo et al. 2021). Notamment, en raison de leur persistance, la non biodégradabilité et le caractère irréversible de la contamination (Cai et al. 2012; Jing et al. 2018; El Rasafi et al. 2020).

L'identification des sources de contamination, l'évaluation du degré de pollution et l'évaluation des risques écologiques des sols agricoles contaminés ont suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années. L'évaluation des risques sanitaires liés aux sols agricoles contaminés en Chine (Zhang et al. 2013; Eziz et al. 2018; Hu et al. 2019), en Egypte (Khalifa and Gad 2018), en Inde (Bhatti et al. 2018; Adimalla et al. 2019) et en Tunisie (Chabbi et al. 2020) ont montré une forte contamination par divers métaux lourds et métalloïdes tels que Cu, Zn, Fe, Cr, Ni, Cd, Pb et As. Cependant, très peu d'études ont été menées dans la région de Béni Mellal -Maroc qui est connue pour son agriculture riche et variée (Barakat et al. 2019). Cette étude a démontré que les concentrations de Cr, Fe, Zn, Cu et Cd étaient supérieures aux valeurs de fond géochimiques locales suggérant une contamination extrême des sols par ces éléments. Dans toutes ces études, les auteurs ont utilisé des indices et des facteurs tels que le facteur d'enrichissement (EF), le facteur de contamination (CF), l'indice de géoaccumulation (Igeo) et l'indice de risque écologique (RI). Ces indices sont très utiles dans la détermination de la qualité des sols (Kowalska et al. 2016; Kumar et al. 2018b; Afshar et al. 2019).

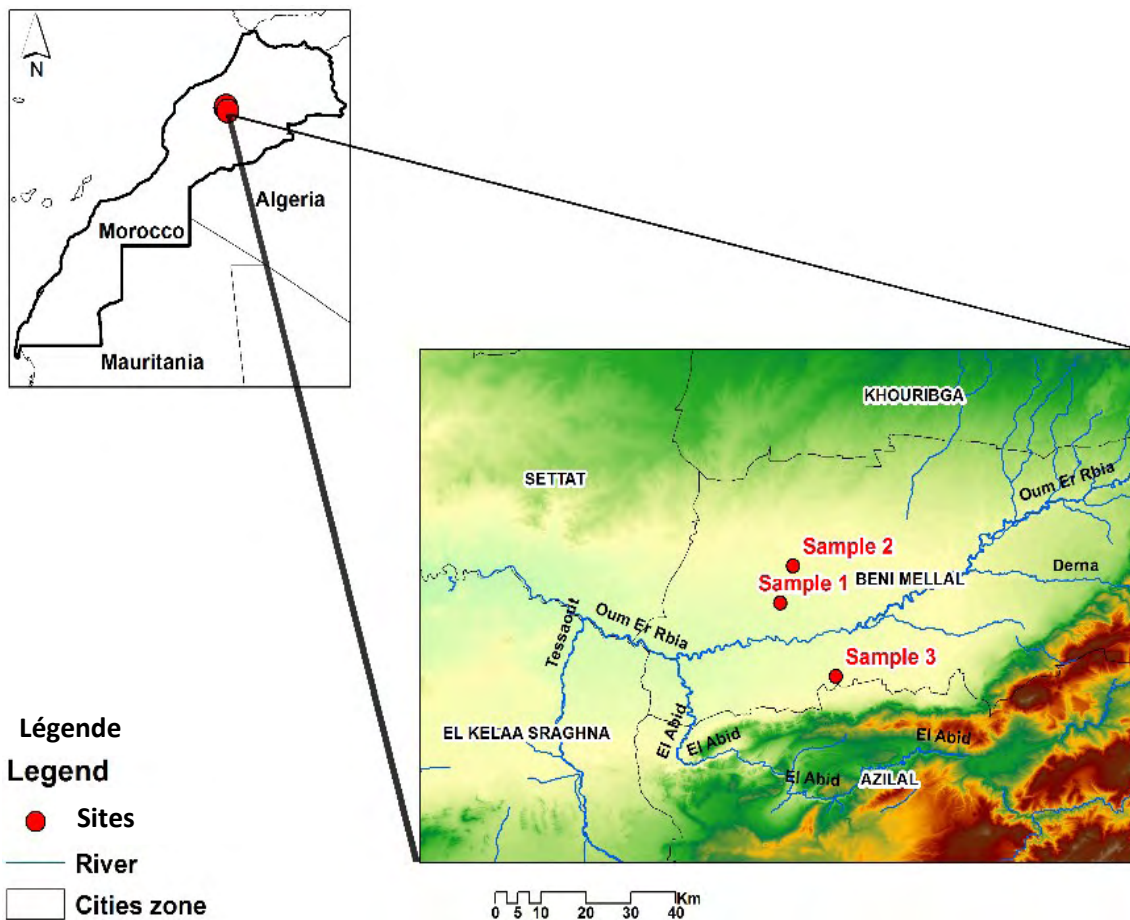
La région de Béni-Mellal est située dans une vaste plaine agricole au Maroc et elle est connue pour ses vastes superficies de terres arables consacrées aux cultures céréalières, à la plantation des olives et des agrumes, aux légumes et aux cultures industrielles. La betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) est la principale culture industrielle de cette région et contribue de 20,5% aux superficies nationales de la betterave et 21,2% à la production nationale de betterave sucrière au Maroc (Redani 2015). Par conséquent, dans cette grande terre cultivée, une longue période de culture et une grande quantité de betterave sucrière produite ont causé divers risques pour l'environnement. Il a été rapporté que les pratiques agricoles et l'eau d'irrigation peuvent entraîner l'enrichissement des sols en métaux lourds tels que Cd, Cr, Cu, Pb, Zn et Fe (Afshar et al. 2019; Barakat et al. 2019; Alam et al. 2020). En fait, il a été rapporté que la betterave sucrière est sensible à des niveaux accrus de métaux lourds tels que le cadmium (Nada et al. 2007). À notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle étude est entreprise notamment sur les sols agricoles de betteraves sucrières de cette région avec une évaluation importante des éléments traces toxiques. Ainsi, les principaux objectifs de la présente étude étaient les suivants : (i) détermination des concentrations d'éléments traces toxiques dans trois différents sols agricoles de betterave sucrière de la région de Béni-Mellal et (ii) répartition de la source de contamination à l'aide des indices de la pollution.

## **II. Matériel et méthodes**

### **2.1. Zone d'étude et échantillonnages de sol**

La zone d'étude est située dans la région de Béni-Mellal au centre du Maroc (32° 20' 22" N, 6° 21' 39" W). Cette région distribuée dans le périmètre irrigué de Béni-Amir et de Béni-Moussa, séparée par la rivière d'Oum Errabiâ ce qui crée deux périmètres irrigués indépendants : Béni-Moussa et Béni-Amir montré ci-dessus (Figure 25) (Elbehri et al. 2011). Ces zones sont caractérisées par deux périmètres irrigués de 33 000 ha et 69 500 ha, respectivement (El Hammoumi et al. 2013). Le climat de cette zone est semi-aride avec une température moyenne de 19°C (El Baghdadi et al. 2012) et une pluviométrie annuelle moyenne généralement inférieure à 280 mm (Barakat et al. 2012).

Des échantillons de sol ont été collectés en juin 2017 à partir des sols de culture de betterave sucrière de la région de Béni-Mellal. Ces zones ont été connues comme étant les plus cultivées par la betterave sucrière dans la dite région (Elbehri et al. 2011). Les échantillons ont été collectée, en trois répétitions, d'une profondeur de 0 à 10 cm après élimination des résidus de surface à partir de trois différents sites (Figure 25). Le site 1 ( $32^{\circ} 24' 3.888''$  N,  $6^{\circ} 50' 29.04''$  W), le site 2 ( $32^{\circ} 28' 24.402''$  N,  $6^{\circ} 48' 54.828''$  W) et le site 3 ( $32^{\circ}15' 47.2644''$  N,  $6^{\circ}44' 1.068''$  W). Chaque échantillon de sol (par site) consistait en un composite de trois sous-échantillons prélevés sur une superficie de  $10\text{ m} \times 10\text{ m}$  et ont ensuite été homogénéisés, séchés à l'air et tamisés à travers un tamis de 2 mm et placés dans un sac en polyéthylène stérile, hermétiquement fermé et transportés au laboratoire pour la caractérisation physico-chimique.



**Figure 25.** Les sites de prélèvement des trois sols agricoles de la betterave à sucre dans la région de Béni-Mellal (Maroc).

## 2.2. Les analyses chimiques

La conductivité et le pH (dans l'eau) sont mesurés dans une suspension de sol-eau (1:5 v/v). L'acidité potentielle a été mesurée après dilution dans une suspension de chlorure de potassium 1N KCl (FAOUN 1984). La matière organique et la matière minérale ont été déterminées après calcination à 550 °C pendant 5 heures dans un four (Vassilev and Tasco 2003). Les cendres issues de l'inflammation représentent la matière minérale, tandis que la quantité disparue après l'inflammation représente la matière organique (poids total = matière minérale + matière organique). L'humidité a été évaluée en mesurant l'évolution de la masse de 10 g de chaque échantillon après passage à l'étuve à 105°C (FAOUN 1970). La méthode de Kjeldahl a été utilisée pour déterminer la concentration d'azote total. Pour les analyses chimiques, les échantillons de sol ont été broyés à l'aide d'un mortier d'agate et digérés à l'aide d'une méthode multi acide forte (HNO<sub>3</sub>/Br<sub>2</sub>/HF/HCl) qui dissout la plupart des minéraux. Ensuite, les solutions ont été analysées en utilisant la spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) (PerkinElmer Optima DV 7000 ICP-OES, précision relative de 5%).

## 2.3. Évaluation de la contamination des sols à l'aide des indices de pollution

Le degré de contamination du sol peut être évalué à l'aide de plusieurs indices tels que le facteur d'enrichissement (EF), l'indice de géo-accumulation (Igeo), le facteur de contamination (CF), le degré de contamination (Cdeg) et l'indice de contamination potentielle (Cp) (Weissmannová and Pavlovský 2017).

### 2.3.1. Facteur d'enrichissement (EF)

Le facteur d'enrichissement (EF) est utilisé pour mesurer l'impact possible de l'activité anthropique sur la concentration d'éléments traces toxiques dans les sols (Aiman et al. 2016; Bhatti et al. 2018). Dans cette étude, le facteur d'enrichissement des sols agricoles de betterave sucrière a été calculé en utilisant le Fe comme élément de référence. EF a été calculé en utilisant l'équation généralisée suivante selon Baltas et al. (2020) :

$$EF = \frac{C(s)/Fe(s)}{C(b)/Fe(b)}$$

C(s) est la concentration de l'élément dans l'échantillon, Fe(s) est la concentration de fer dans l'échantillon, C(b) est la concentration des oligo-éléments dans la référence et Fe(b) est la

concentration de fer dans la référence. La concentration de la référence de fer est celle dans la croûte continentale (Rudnick and Gao 2003). Les valeurs EF ont été interprétées selon Saddik and Fadili (2019) (Tableau 12).

### 2.3.2. Indice de géo-accumulation

L'indice de géo-accumulation (*Igeo*) a été utilisé pour évaluer le degré de pollution par des éléments traces toxiques dans le sol. Les valeurs *Igeo* peuvent être calculées par la formule suivante donnée par (Baltas et al. 2019) :

$$Igeo = \text{Log}_2 (C(s)/1.5 * C(b))$$

*C(s)* est la concentration de l'élément dans les échantillons de sol et *C(b)* est la valeur de fond géochimique d'un élément donné. Les valeurs, données par Rudnick and Gao (2003), sont utilisées comme valeurs des références. Le facteur 1,5 est le facteur de correction de la matrice de référence dû aux variations pathologiques (Bhutiani et al. 2017). Les sept classifications de l'indice de géoaccumulation sont données par Saddik et Fadili (2019) (Tableau 12).

### 2.3.3. Facteur de contamination et degré de contamination

Le facteur de contamination (*CF*) est le quotient obtenu en divisant la concentration de chaque métal dans le sol par la valeur de référence (Hakanson 1980) . Cet indice est calculé à l'aide de la formule donnée par (Hakanson 1980) :

$$CF = C(s)/C(b)$$

*C(s)* est la concentration de l'élément dans les échantillons de sol et *C(b)* est la valeur de fond géochimique d'un élément donné. De plus, Hakanson (1980) propose de calculer le degré de contamination (*Cdeg*) afin de simplifier le contrôle de la contamination et d'avoir une évaluation globale de la pollution des sols. *Cdeg* est la somme de toutes les valeurs *CF* de chaque métal dans tous les sites de prélèvement. Il a été calculé comme suivant :

$$Cdeg = \sum_{i=1}^n CF$$

Hakanson (1980) suggère cette classification indiquant une pollution anthropique (Tableau 12). Dans cette étude n le nombre d'éléments mesurés égale à 18.

#### **2.3.4. Indice de contamination potentielle**

L'indice de contamination potentielle (Cp) est calculé à l'aide de la formule de Nouri et Haddioui (2016) :

$$C_p = C(s)_{max}/C(b)$$

C(s)max est la concentration maximale d'un métal dans les sédiments et C(b) est la valeur moyenne du même élément dans la référence. Les valeurs de Cp ont été interprétées comme proposé par Dauvalter and Rognerud (2001) (Tableau 12).

#### **2.3.5. Indice de charge polluante (PLI)**

Le PLI est calculé en utilisant les valeurs CF obtenues de tous les métaux étudiés (n) en utilisant la formule suivante donnée par Tomlinson et al. (1980) :

$$PLI = \sqrt[n]{CF_1 * CF_2 * \dots * CF_n}$$

Les classes de PLI sont données dans le tableau 12.



**Tableau 12** : Classification des indices de pollution des sols utilisés dans la présente étude

Index de pollution	Formule	Classification	Qualité du sol
<i>EF</i>	$EF = \frac{C(s)/Fe(s)}{C(b)/Fe(b)}$	$EF < 1$	No enrichment
		$1 < EF < 3$	Minor enrichment
		$3 < EF < 5$	Moderate enrichment
		$5 < EF < 10$	Moderately severe enrichment
		$10 < EF < 25$	Severe enrichment
		$25 < EF < 50$	Extremely severe enrichment
<i>I<sub>geo</sub></i>	$I_{geo} = \text{Log}_2 (C(s) / 1.5 C(b))$	$I_{geo} \leq 0$	Uncontaminated
		$0 < I_{geo} < 1$	slightly contaminated
		$1 < I_{geo} < 2$	Moderately contaminated
		$2 < I_{geo} < 3$	Moderately to heavily contaminated
		$3 < I_{geo} < 4$	Heavily contaminated
		$4 < I_{geo} < 5$	Heavily to extremely contaminated
$I_{geo} > 5$	Extremely contaminated		
<i>CF</i>	$Cf = C(s)/C(b)$	$CF < 1$	Low contamination factor
		$1 \leq CF \leq 3$	Moderate contamination factor
		$3 \leq CF \leq 6$	Considerable contamination factor
		$6 \leq CF$	Very high contamination factor
<i>Cdeg</i>	$Cdeg = \sum_{i=1}^n Cf$	$Cdeg < n$	Low degree of contamination
		$n < Cdeg < 2n$	Moderate degree of contamination
		$2n < Cdeg < 4n$	Considerable degree of contamination
		$Cd > 4n$	High degree of contamination
<i>Cp</i>	$Cp = C(s)_{max}/C(b)$	$Cp \leq 1$	indicates low pollution
		$1 < Cp \leq 3$	moderate pollution
		$Cp > 3$	severe or very severe pollution
<i>PLI</i>	$PLI = \sqrt[n]{CF1 * CF2 * \dots * CFn}$	$PLI < 1$	Unpolluted soil
		$PLI = 1$	pollutant present in soil
		$PLI > 1$	deterioration of site quality

#### 2.4. Les analyses statistiques

Les statistiques descriptives telles que la moyenne, le minimum, le maximum et l'écart type ont été calculées à l'aide du logiciel SPSS 20.0 pour Windows. De plus, le coefficient de variation a été calculé en utilisant l'équation  $CV = (\text{écart-type}/\text{moyenne}) \times 100 \%$ .

### III. Les résultats

#### 3.1. Propriétés physico-chimiques des échantillons de sols

Le pH du sol, trouvé neutre dans les trois sites d'étude variait entre 7,31 et 7,49 avec une valeur moyenne de 7,41 (Tableau 13). La conductivité électrique (CE) varie de 0,25 à 0,47  $\mu\text{s}/\text{cm}$  dans les sols des sites étudiés. La matière organique était similaire dans les sites 1 et 3 (0,04 g/sol), tandis que le site 2 présentait 0,06 g/sol de matière organique. Le site 2 a montré une teneur en eau plus élevée avec 0,12 g par rapport au site 3 (0,072 g) et au site 1 (0,074 g) (Tableau 13). De faibles valeurs de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (0,34 %) et de CaO (3,51 %) ont été trouvées dans le site 3 et l'azote total (1,75 %) et le  $\text{K}_2\text{O}$  (0,04 %) dans le site 2.

**Tableau 13** : Caractérisation physico-chimique des sols agricoles de la betterave sucrière des trois différents sites de la région de Béni-Mellal.

Paramètres	Site 1	Site 2	Site 3	Valeur moyenne
pHeau	$7.44 \pm 0.27$	$7.31 \pm 0.26$	$7.49 \pm 0.14$	7.41
pH <sub>KCl</sub>	$6.49 \pm 0.16$	$6.93 \pm 0.06$	$7.09 \pm 0.04$	6.84
Matière organique (1g)	$0.04 \pm 0.003$	$0.06 \pm 0.003$	$0.04 \pm 0.002$	0.05
Matière minérale (1g)	$0.89 \pm 0.002$	$0.81 \pm 0.002$	$0.88 \pm 0.001$	0.86
Teneur en eau (1g)	$0.074 \pm 0.002$	$0.12 \pm 0.001$	$0.072 \pm 0.001$	0.09
Conductivité électrique ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	$0.40 \pm 0.13$	$0.47 \pm 0.009$	$0.25 \pm 0.002$	0.37
Azote totale	$2.62 \pm 0.00$	$1.75 \pm 0.87$	$2.33 \pm 0.50$	2.23
$\text{P}_2\text{O}_5$ (%)	$4.96 \pm 1.22$	$5.23 \pm 1.24$	$0.34 \pm 0.02$	3.51
CaO (%)	$10.13 \pm 0.82$	$8.95 \pm 1.06$	$3.51 \pm 0.46$	7.53
$\text{K}_2\text{O}$ (%)	$0.25 \pm 0.03$	$0.04 \pm 0.03$	$0.77 \pm 0.14$	0.35

#### 3.2. Concentrations des éléments traces dans les sols étudiés

Les concentrations de métaux lourds et de métalloïdes dans les sols agricoles testés de la betterave sucrière dans la région de Béni-Mellal ont été répertoriées dans le tableau 14. Les concentrations des métaux (mg/kg) étaient variables dans les trois sites d'étude. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées pour Ba (186,50-213,50 mg/kg), Sr (74,00-105,67 mg/kg), B (73,00-103,67 mg/kg), et Cr (48,33-60,00 mg/kg). Tandis que le Cd (<2 mg/kg) a les concentrations les plus faibles dans tous les sites (Tableau 14). Les concentrations de Co, Ni, Zn, Cr et As vont de 24,67 à 34,67 ; 34,67 à 45,33 ; 12 à 26,00 ; 34,50 et < 8 mg/kg dans tous les sites, respectivement (Tableau 14). En général, les concentrations des éléments testés des trois sites des

sols agricoles de betterave sucrière testés de la région de Béni-Mellal suivait l'ordre : Ba > Sr > B > Cr > Ni > Mo > Co > As > Y > Zn > Cu > Nb > Ge > Cd.

**Tableau 14** : Concentrations en métaux lourds et métalloïdes des trois sols agricoles de la betterave à sucre de la région de Béni-Mellal

Éléments	Unités	Site 1			Site 2			Site 3		
		Moyenne-SD	Min-Max	CV (%)	Moyenne-SD	Min-Max	CV (%)	Moyenne-SD	Min-Max	CV (%)
MnO		0.10 -0.03	0.08-0.13	30	0.09 -0.01	0.07-0.10	11.11	0.04 -0.006	0.03-0.04	15.00
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	%	7.22-0.98	6.62-8.35	13.57	7.36-0.64	6.74-8.03	8.70	10.06-0.62	9.60-10.77	6.16
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		1.89-0.68	1.43-2.68	35.98	1.66-0.53	1.15-2.22	31.93	3.51-0.31	3.25-3.85	8.83
MgO		0.95-0.16	0.79-1.12	16.84	1.00-0.11	0.87-1.09	11.00	2.22-0.28	1.95-2.51	12.61
TiO <sub>2</sub>		0.33 -0.04	0.30-0.38	12.12	0.32 -0.04	0.28-0.36	12.50	0.47-0.01	0.46-0.49	2.13
As		34.50-0.71	34-166	2.06	12.50-3.5	10-15	28.00	<8	-	-
B		<b>78.00-11.4</b>	<b>70.0-91.0</b>	<b>14.62</b>	<b>73.00-8.00</b>	<b>65.0-81.0</b>	<b>10.96</b>	<b>103.67-3.79</b>	<b>101.0-108.0</b>	3.66
Ba		<b>213.50-19.09</b>	<b>200.0-268.0</b>	<b>8.94</b>	<b>241.00-8.48</b>	<b>207.0-247.0</b>	<b>3.52</b>	<b>186.50-12.02</b>	<b>178.0-348.0</b>	6.45
Co		34.67-4.04	31.0-39.0	11.65	24.67-3.79	22.0-29.0	15.36	31.67-10.26	23.0-43.0	32.40
Cr		60.00-3.36	57.0-65.0	5.60	48.67-13.01	36.0-62.0	26.73	48.33-4.73	43.0-52.0	9.79
Ge		12.33-2.08	10-14	16.87	10.67-0.58	11-11	5.44	25.67-3.78	23 -30	14.73
Mo		35.00-3.60	32-39	10.29	32.33-7.37	24-38	22.80	33.67-0.58	33-34	1.72
Nb	Mg/kg	16.00-4.24	8-19	26.50	11.50-0.71	3-12	6.17	25.50-6.36	21-30	24.94
Ni		45.33-3.21	43.0-49.0	7.08	34.67-3.05	32.0-38.0	8.80	36.33-2.52	34.0-39.0	6.94
Pb		55.00-41.01	26-84	74.56	30.50-6.36	26-35	20.85	<26	-	-
Sr		<b>105.67-7.57</b>	<b>97.0-111.0</b>	<b>7.16</b>	<b>88.33-3.78</b>	<b>84.0-91.0</b>	<b>4.28</b>	<b>74.00-8.18</b>	<b>67.0-83.0</b>	11.05
Y		27.67-8.08	26-27	29.20	19.00-7.55	11-26	39.74	<2	-	-
Cu		22.50-12.50	10-35	55.56	14.00-0.00	14-14	0	<2	-	-
Zn		26.00-0.00	113-164	0.00	19.00-0.00	19-19	0	12-0.00	12 -12	0
Se		<40	-	-	<40	-	-	<40	-	-
Cd		<2	-	-	<2	-	-	<2	-	-

Min : minimum, Max : maximum, écart type : SD ; le coefficient de variation est calculé à l'aide de l'équation  $CV = (\text{écart-type}/\text{moyenne}) \times 100 \%$

**Tableau 15** : Comparaison des concentrations obtenues de certains métaux lourds et métalloïdes dans les sols agricoles de la betterave sucrière des sites testés dans la région de Béni-Mellal avec d'autres recommandations de certaines recherches dans le monde sur la qualité des sols

Unités	Site 1	Site 2	Site 3	CCME <sup>1</sup>	croûte continentale <sup>2</sup>	Sol agricole		
						Maroc <sup>3</sup>	Espagne <sup>4</sup>	Inde <sup>5</sup>
As	34.5	12.5	<8	12	2	-	-	2.4-5.3
B	78	73	103.67	2	15	-	-	-
Ba	213.5	241	186.5	750	550	-	-	576.7-895.2
Co	34.67	24.67	31.67	40	17	-	2.9-10.1	12.7-35.6
Cr	60	48.67	48.33	64	85	16.07-294.0	14.8-42.5	55.9-135.8
Ge	12.33	10.67	25.67	-	1.6	-	-	-
Mo	35	32.33	33.67	5	1.5	-	-	-
Nb	16	11.5	25.5	-	12	-	-	-
Ni	45.33	34.67	36.33	50	44	-	11.4-32.0	0.5-27.6
Pb	55	30.5	<26	70	17	3.4-134.7	6.8-101.3	5.9-26.8
Sr	105.67	88.33	74	-	350	-	-	-
Y	27.67	19	<2	-	22	-	-	-
Cu	22.50	14	<2	63	25	1.46-191.2	12.6-76.8	12.7-69.6
Zn	26.00	19.00	12	200	71	24.5-1272.0	20.3-88.8	71.3-173
Se	<40	<40	<40	1	0.083	-	-	-
Cd	<2	<2	<2	1.4	0.098	2.5-40.1	0.1-0.9	-

<sup>1</sup> (CCME 2001)

<sup>2</sup> (Rudnick and Gao 2003)

<sup>3</sup> (Oumenskou et al. 2018)

<sup>4</sup> (Recatala et al. 2006)

<sup>5</sup> (Adimalla et al. 2019)

### 3.3. Facteur d'enrichissement

Le calcul du facteur d'enrichissement de tous les sols testés a montré une variation entre les métaux et les sites (Tableau 16). Un enrichissement extrêmement sévère en Mo a été observé dans les sites 1 et 2 avec des valeurs élevées d'EF (92,16 et 99,04, respectivement). Cependant, le site 3 était caractérisé par un enrichissement très accentué en Mo ( $25 \leq EF < 50$ ). En ce qui concerne le Ge, le site 3 a montré un enrichissement très élevé ( $25 \leq EF = 26,44 < 50$ ), tandis que les deux sites 1 et 3 ont montré un enrichissement très marquant ( $10 \leq EF < 25$ ). De plus, un enrichissement élevé a été observé pour As (site 1) et B (sites 1 et 2). Le site 2 pour As, le site 3 pour B et le site 1 pour Co ont montré un enrichissement modérément sévère. Les valeurs de EF les plus faibles sont observées pour Sr et Fe avec une fourche de 0,33 à 0,93 et 0,39 à 0,90 ; respectivement, indiquant l'absence d'enrichissement (Tableau 16). En revanche, les valeurs de EF du Cr (1,41),

Ni (2,08), Al (1,26), Mn (1,95), Ti (1,36) et Mg (1,22) indiquent un enrichissement mineur de ces éléments.

### **3.4. Indice de géo-accumulation**

Les valeurs de l'indice de géo-accumulation ( $I_{geo}$ ) des éléments traces toxiques dans les sols des sites étudiés sont présentées dans le tableau 16. Les valeurs d' $I_{geo}$  pour les métaux mesurés dans les trois sols agricoles varie de la classe 0 ( $I_{geo} \leq 0$ ) à la classe 5 ( $3 < I_{geo} < 4$ ). L' $I_{geo}$  de la plupart des éléments (par exemple, Fe, Ba, Cr, Sr, Y, Al, Mn, Ti, Mg, Zn et Ni) était  $\leq 1$  ce qui indiquait que les sols sont classés non contaminés à légèrement contaminés. Cependant, les sites 1 et 3 sont considérés comme des sols modérément contaminés ( $1 < I_{geo} < 2$ ) en As et B, respectivement. Les sites 1 et 2 sont modérément contaminés, et le site 3 est considéré comme un sol fortement contaminé pour le Ge. Les valeurs les plus élevées d' $I_{geo}$  (allant de 5,90 à 6,39) ont été trouvées dans les trois sites en Mo et qui ont révélé un sol extrêmement contaminé par ce métal.

### **3.5. Facteur de contamination et degré de contamination**

Le CF est classé de faible contamination ( $CF < 1$ ) à très haut facteur de contamination ( $CF > 6$ ). Dans cette étude, les résultats du CF calculé sont présentés dans le tableau 16. Les valeurs de CF de plusieurs éléments tels que Fe, Ba, Cr, Sr, Al, Mn, Ti, Mg et Zn dans les trois sites d'étude, allant de 0,18 à 0,97 ; indiquent un faible facteur de contamination ( $CF < 1$ ). Tandis que des éléments tels que Co, Y, Nb et B dans le site 1 ; Co, As et B (2,60) dans le site 2 ; et Co et Nb dans le site 3 montrent un facteur de contamination modéré à considérable ( $1 \leq CF \leq 6$ ) dans les sols agricoles de betteraves sucrières testés. Les valeurs de CF les plus élevées ont été trouvées pour B dans le site 3 (6,10). As dans le site 1 (7,19). Ge (7,86–10,33) et Mo (29,40–31,81) dans tous les sites d'étude indiquent qu'ils sont très fortement contaminés par ces éléments.

Les résultats de degrés de contamination dans les sites étudiés étaient compris entre 48,38 et 64,14, indiquant un degré de contamination considérable due à la pollution anthropique.

### 3.6. Indice de charge polluante (PLI)

L'évaluation du statut de toxicité des sols des sites testés indique un niveau inférieur à 1 (PLI<1) dans le site 2 suggérant l'absence de sol pollué. Cependant, un PLI > 1 dans les deux autres sites 1 et 3 indique une pollution des sols et une détérioration des sols agricoles étudiés (Tableau 16).

**Tableau 16.** Facteur d'enrichissement (EF), Indice de Géoaccumulation (Igeo) et Facteur de Contamination (CF) des métaux lourds et métalloïdes analysés dans les trois sols agricoles de la betterave à sucre de Béni-Mellal.

		EF				Igeo				CF			
		Moyenne	SD	Min	Max	Moyenne	SD	Min	Max	Moyenne	SD	Min	Max
Fe	Site 1	0.39	0.15	0.30	0.57	0.08	0.03	0.06	0.11	0.38	0.14	0.28	0.53
	Site 2	0.44	0.10	0.34	0.54	0.07	0.02	0.05	0.09	0.33	0.11	0.23	0.44
	Site 3	0.90	0.05	0.84	0.94	0.14	0.01	0.13	0.15	0.70	0.06	0.64	0.76
As	Site 1	18.30	7.13	13.32	23.41	1.44	0.03	1.42	1.46	7.19	0.15	7.08	7.29
	Site 2	7.26	3.57	4.73	9.78	0.52	0.15	0.42	0.63	2.60	0.74	2.08	3.13
	Site 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	Site 1	12.81	2.56	10.07	15.13	0.92	0.13	0.83	1.07	4.59	0.67	4.12	5.35
	Site 2	13.67	2.98	10.82	16.76	0.86	0.09	0.77	0.96	4.29	0.47	3.82	4.76
	Site 3	8.78	0.50	8.32	9.30	1.22	0.04	1.19	1.27	6.10	0.22	5.94	6.35
Ba	Site 1	1.04	0.24	0.81	1.28	0.07	0.01	0.06	0.09	0.37	0.05	0.32	0.43
	Site 2	1.18	0.30	0.85	1.45	0.07	0.01	0.07	0.08	0.37	0.03	0.33	0.40
	Site 3	0.43	0.02	0.41	0.44	0.06	0.00	0.06	0.06	0.30	0.02	0.29	0.31
Co	Site 1	5.80	2.12	3.70	7.95	0.40	0.05	0.36	0.45	2.00	0.23	1.79	2.25
	Site 2	4.78	2.27	3.02	7.35	0.29	0.04	0.26	0.34	1.43	0.22	1.27	1.68
	Site 3	2.60	0.65	1.95	3.25	0.37	0.12	0.27	0.50	1.83	0.59	1.33	2.49
Cr	Site 1	1.85	0.45	1.33	2.18	0.13	0.01	0.12	0.14	0.65	0.05	0.62	0.71
	Site 2	1.63	0.09	1.53	1.71	0.11	0.03	0.08	0.14	0.53	0.14	0.39	0.67
	Site 3	0.75	0.06	0.71	0.83	0.11	0.01	0.09	0.11	0.53	0.05	0.47	0.57
Ge	Site 1	24.60	5.52	18.81	29.81	1.77	0.30	1.43	2.01	8.81	1.49	7.14	1.00
	Site 2	21.22	4.78	17.84	24.60	1.58	0.00	1.58	1.58	7.86	0.00	7.86	7.86
	Site 3	26.44	4.55	22.44	31.40	3.68	0.54	3.30	4.30	18.33	2.70	16.43	21.43
Mo	Site 1	92.16	33.43	58.13	124.96	6.39	0.66	5.84	7.12	31.81	3.28	29.09	35.45
	Site 2	99.04	45.64	49.53	139.45	5.90	1.34	4.38	6.93	29.40	6.70	21.81	34.54
	Site 3	44.16	4.44	39.27	47.93	6.14	0.11	6.02	6.20	30.60	0.52	30.0	30.90
Nb	Site 1	3.44	2.16	1.25	5.58	0.22	0.09	0.13	0.32	1.11	0.46	0.67	1.58
	Site 2	2.57	0.42	2.27	2.87	0.19	0.01	0.18	0.20	0.96	0.06	0.92	1.00
	Site 3	2.99	0.40	2.71	3.27	0.43	0.11	0.35	0.50	2.13	0.53	1.75	2.50
Ni	Site 1	2.78	0.88	1.76	3.35	0.19	0.01	0.21	0.18	0.96	0.07	0.91	1.04
	Site 2	2.36	0.58	1.84	2.98	0.15	0.01	0.14	0.16	0.74	0.07	0.68	0.81
	Site 3	1.11	0.07	1.06	1.19	0.16	0.01	0.15	0.17	0.77	0.05	0.72	0.83
Sr	Site 1	0.94	0.27	0.65	1.20	0.07	0.00	0.06	0.07	0.33	0.02	0.30	0.35
	Site 2	0.90	0.30	0.65	1.23	0.06	0.00	0.05	0.06	0.28	0.01	0.26	0.28
	Site 3	0.33	0.02	0.31	0.35	0.05	0.01	0.04	0.05	0.23	0.03	0.21	0.26
Y	Site 1	3.73	0.91	2.69	4.36	0.26	0.02	0.25	0.29	1.32	0.10	1.24	1.43
	Site 2	2.70	0.36	2.30	2.98	0.18	0.07	0.11	0.25	0.90	0.36	0.52	1.24
	Site 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Al	Site 1	1.31	0.26	1.02	1.52	0.09	0.01	0.09	0.11	0.47	0.06	0.42	0.54
	Site 2	1.53	0.37	1.18	1.92	0.10	0.01	0.09	0.10	0.48	0.04	0.44	0.52
	Site 3	0.94	0.03	0.92	0.97	0.13	0.01	0.13	0.14	0.65	0.04	0.62	0.70
Mn	Site 1	2.61	0.19	2.44	2.82	0.19	0.06	0.16	0.26	0.97	0.29	0.80	1.30
	Site 2	2.72	0.41	2.27	3.07	0.17	0.03	0.14	0.20	0.87	0.15	0.70	1.00
	Site 3	0.52	0.06	0.47	0.59	0.07	0.01	0.06	0.08	0.37	0.06	0.30	0.40
Ti	Site 1	1.44	0.30	1.12	1.71	0.10	0.01	0.06	0.09	0.52	0.07	0.47	0.59
	Site 2	1.59	0.32	1.28	1.92	0.10	0.01	0.09	0.09	0.50	0.06	0.44	0.56
	Site 3	1.06	0.07	1.00	1.14	0.15	0.00	0.14	0.15	0.74	0.02	0.72	0.77

Mg	Site 1	1.07	0.25	0.85	1.35	0.08	0.01	0.06	0.09	0.38	0.07	0.32	0.45
	Site 2	1.31	0.45	1.00	1.82	0.08	0.01	0.07	0.09	0.40	0.05	0.35	0.44
	Site 3	1.29	0.12	1.15	1.38	0.18	0.02	0.16	0.20	0.90	0.11	0.79	1.01
Zn	Site 1	1.37	-	1.37	1.37	0.08	-	0.08	0.08	0.39	-	0.39	0.39
	Site 2	0.89	-	0.89	0.89	0.06	-	0.06	0.06	0.28	.	0.28	0.28
	Site 3	0.23	-	0.23	0.23	0.04	-	0.04	0.04	0.18	.	0.18	0.18
		<i>Cdeg</i>				PLI							
		Moyenne	SD	Min	Max	Moyenne	SD	Min	Max				
Sol 1		60.13	2.72	58.23	63.24	1.19	0.18	1.06	1.40				
Sol 2		48.38	8.31	41.75	57.70	0.95	0.17	0.76	1.09				
Sol 3		64.14	1.50	62.41	65.06	1.22	0.07	1.17	1.30				

SD: Écart type, Min : minimum, Max : maximum

### 3.7. Indice de contamination potentielle

Sur la base des résultats de Cp présentés dans le tableau 17, les éléments étudiés pourraient être regroupés en 3 classes. Dans tous les sites d'étude, le Cp de Fe, Cr, Al, Sr, Ti, Ba et Mg était compris entre 0,23 et 1,0 ; indiquant une pollution faible des sols. La seconde classe regroupait Co, Nb et Y où  $1 < Cp < 3$  ; révélant une pollution modérée. Les valeurs les plus élevées de Cp ont été trouvées pour B, As, Ge et Mo ; comprises entre 3,13 et 35,45 ; ce qui indique des niveaux de pollution sévères à très sévères.

**Tableau 17.** Indice de contamination potentielle des métaux lourds et métalloïdes analysés dans les sols agricoles de la betterave à sucre testés de la région de Béni Mellal

	Site 1	Site 2	Site 3
<b>Fe</b>	0.53	0.44	0.76
<b>As</b>	7.29	3.13	-
<b>B</b>	5.35	4.76	6.35
<b>Ba</b>	0.43	0.40	0.31
<b>Co</b>	2.25	1.68	2.49
<b>Cr</b>	0.71	0.67	0.57
<b>Ge</b>	10.00	7.86	21.43
<b>Mo</b>	35.45	34.55	30.91
<b>Nb</b>	1.58	1.00	2.50
<b>Ni</b>	1.04	0.81	0.83
<b>Sr</b>	0.35	0.28	0.26
<b>Y</b>	1.43	1.24	-
<b>Zn</b>	2.45	-	0.00
<b>Al</b>	0.53	0.51	0.68
<b>Mn</b>	1.30	1.00	0.40
<b>Ti</b>	0.55	0.52	0.71
<b>Mg</b>	0.24	0.23	0.54

#### IV. Discussion

L'une des caractéristiques importantes du sol est le pH qui a été trouvé, dans les sites d'étude, neutre avec une valeur moyenne de 7,41. Il a été rapporté que le pH du sol (compris entre 6 et 8) joue un rôle essentiel dans la mobilité et la rétention des oligo-éléments toxiques (Jing et al. 2018; Barakat et al. 2019) et dans la croissance des plantes (Day and Ludeke 1993). La matière organique se situait entre 4 et 6 % ce qui indique que les sols testés sont fertiles. Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Oumenskou et al. (2019) dans la même zone (Béni Amir) et à ceux trouvés par d'autres recherches (Park et al. 2011; Khalifa and Gad 2018; Ahmadi et al. 2019). L'intervalle de la conductivité électrique (CE) enregistrée lors de notre étude variait de 0,25 à 0,47  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , ce qui indique que les sols testés ne sont pas salins puisque les valeurs de CE étaient inférieures à 4  $\text{mS}/\text{cm}$  (Shrivastava and Kumar 2015). Les concentrations de métaux lourds et de métalloïdes dans les échantillons de sol étudiés, en particulier ceux qui sont toxiques (As, Co, Ni et Cr), ont une concentration plus élevée que celle enregistrée dans d'autres sols agricoles marocains (Kao et al. 2007; Mohcine et al. 2016; Barakat et al. 2019). Récemment, El Hamzaoui et al. (2020) indiquent que le périmètre de Béni-Moussa, cultivé en betterave sucrière, blé, pomme de terre, carotte, pois, olivier, oranger, luzerne et canne à sucre, est légèrement contaminé par les métaux lourds avec une corrélation positive entre Cr, Zn, Cu, Fe, Ni, As et Cd. De plus, une comparaison des concentrations de métaux lourds et de métalloïdes obtenues avec d'autres recommandations pour la qualité des sols (RQS) a été utilisée (Tableau 15). La comparaison des résultats obtenus et ceux des valeurs de référence, trouvées dans les RQS, est utilisée pour évaluer la contamination des sols par les métaux lourds et les métalloïdes (Nemr et al. 2016; Ahmad et al. 2017). À ce jour, et à notre connaissance, aucune directive environnementale n'est établie au Maroc afin d'être utilisée dans l'évaluation de la contamination des sols agricoles. Ainsi, les RQS, données par le conseil Canadien des ministres de l'environnement dans le sol agricole (CCME 2001), ont été appliquées à titre de mesures provisoires. Les résultats ont montré que les concentrations d'Arsenic (As), de Bore (B) et de Molybdène (Mo) étaient supérieures aux valeurs du CCME (12,2 et 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , respectivement) et les concentrations de ces éléments dans la croûte continentale (2,15 et 1,5  $\text{mg}/\text{kg}$ , respectivement) comme suggéré par Rudnick and Gao (2003). La concentration obtenue de Ge dépassait (1,6  $\text{mg}/\text{kg}$ ) les concentrations de référence de la croûte continentale (Rudnick and Gao 2003; Wiche et al. 2018). Alors que les concentrations d'éléments tels que Ba, Co, Cr, Ni, Cu et Zn étaient inférieures aux lignes directrices établies par le CCME. Par rapport à



d'autres sols agricoles, la concentration de Cr était inférieure aux valeurs maximales trouvées dans d'autres sols au Maroc et en Inde (Tableau 14). Tandis que les valeurs de Cu et de Zn étaient plus élevées que celles trouvées lors des travaux d'Oumenskou et al. (2018) au Maroc, de Recatala et al. (2006) en Espagne et d'Adimalla et al. (2019) en Inde. En Général, lors de cette étude, les concentrations d'As, B, Co, Ge, Nb et Mo étaient plus élevées que les niveaux proposés par les recommandations Canadiennes pour la qualité des sols agricoles et/ou leurs niveaux dans la croûte continentale.

Afin d'évaluer l'origine de la contamination par les métaux lourds dans les sols de la betterave sucrière, nous avons calculé le facteur EF. Il a été rapporté que les valeurs de  $EF < 1$  indiquaient que les métaux provenaient de sources naturelles, tandis que les valeurs de  $EF > 1$  provenaient de sources anthropiques (Sakan et al. 2009; Maanan et al. 2015). Dans la présente étude, des valeurs élevées de EF des éléments Mo, Ge, As et Co ont été trouvées, suggérant que ces éléments peuvent être introduits dans le sol en raison des activités agricoles telles que l'utilisation excessive d'engrais chimiques, d'herbicides et d'insecticides.

L'EF calculé pour d'autres éléments tels que Nb, Y, Mn, Ni et Cr indiquait un enrichissement faible à modéré. Il est à noter que le site 3 (zone de Béni-Moussa) présentait les niveaux d'enrichissement les plus faibles, alors que le site 1 (zone de Béni Amir) a montré le plus haut niveau d'enrichissement. Des résultats similaires sont obtenus dans d'autres sols agricoles irrigués dans les régions de Béni-Moussa et de Béni-Amir (Oumenskou et al. 2018; Barakat et al. 2019; El Hamzaoui et al. 2020).

De plus, l'indice de géo-accumulation est utilisé pour évaluer la contamination des sols et juger ainsi la qualité des sols en termes de pollution par les éléments traces (Aiman et al. 2016; Alam et al. 2020; Keshavarzi and Kumar 2020). Les valeurs les plus élevées d'Igeo (allant de 5,90 à 6,39) ont été trouvées dans les trois sites d'étude car l'élément Mo a révélé un sol extrêmement contaminé par ce métal. Les valeurs les plus élevées obtenues étaient probablement dues aux pesticides, aux engrais et à l'irrigation par les eaux usées (Jing et al. 2018). Les valeurs d'Igeo varient d'un site à l'autre et de métal à métal comme il a été signalé dans les sols agricoles de la région de Béni-Amir (Oumenskou et al. 2018) et de la région de Béni-Moussa (Barakat et al. 2019; El Hamzaoui et al. 2020). Barakat et al. (2019) ont rapporté que la faible contamination anthropique avec certains éléments tels que Cd, Cr, Cu, Zn et Fe varient de modérément à

considérablement enrichis par ces métaux lourds cela dû à l'irrigation des terre agricole par les eaux usées dans la région de Beni-Mellal.

Le facteur de contamination est calculé pour évaluer le degré de contamination par les différents métaux (Naveedullah et al. 2013; Giri et al. 2017) et leurs sources dans les sols agricoles (Keshavarzi and Kumar 2020). Des résultats similaires obtenus par plusieurs auteurs ont montré que les valeurs de CF pour Fe, Ni, Cu, Mn, Cr et Zn dans les sols agricoles indiquaient un niveau de pollution très faible à modéré (Varol 2011; Naveedullah et al. 2013; Baltas et al. 2019). De plus, nos résultats ont montré que As dans le site 1, Ge et Mo dans le site 2 ; et B, Ge et Mo dans le site 3 désignent les valeurs les plus élevées de CF comprises entre 6,10 et 31,81 indiquant un facteur de contamination très élevé de ces derniers éléments, qui peut être attribuée à des apports anthropiques.

De plus, en calculant le PLI nous pouvons également évaluer la contamination des sols causée par les activités anthropiques (Boamponsem et al. 2010). El Hamzaoui et al. (2020) ont montré que les valeurs PLI indiquent une contamination anthropique qui provient des activités humaines et agricoles situées autour d'Oulad Ayad, Had Bou Moussa et Afourer (zone de Béni-Moussa). De plus, l'indice de contamination potentielle a été utilisé pour évaluer le degré de pollution par les métaux dans les sols agricoles (Adimalla et al. 2019). Dans notre cas, les valeurs les plus élevées de Cp ont été trouvées pour B, As, Ge et Mo, détectées dans le site 1 existant dans la zone de Béni-Amir, ce qui indiquait des niveaux de pollution sévères ou très sévères. De même, Barakat et al. (2019) ont signalé que les sols agricoles irrigués a Béni-Amir étaient modérément a considérablement enrichis en métaux lourds en raison des activités anthropiques, en particulier, la réutilisation des eaux usées dans l'irrigation.

## V. Conclusion

Dans cette étude, la pollution environnementale en plusieurs oligo-éléments dans les trois sols agricoles de la betterave à sucre de la région de Béni-Mellal a été examinée. Sur la base des indices de pollution évalués, de la comparaison avec les recommandations pour la qualité des sols de Béni Mellal, et d'autres sols agricoles ; les sols testés sont considérés comme pollués par des métaux lourds et des métalloïdes. Notre comparaison a révélé que certains éléments tels que As, B, Co, Ge, Nb et Mo dépassaient les niveaux standards indiquant une pollution considérable des sols de betterave sucrière de la région de Béni-Mellal. De plus, d'autres éléments traces tels que Ba, Cr, Ni, Sr, Cu et Zn ne présentaient pas de risque écologique puisque leurs concentrations étaient inférieures aux limites des normes. L'EF démontre que le sol de la zone d'étude était extrêmement sévère et enrichi en Mo en plus sévère et enrichi en Ge. De plus, l'Igeo des éléments Fe, Ba, Cr, Sr, Y, Al, Mn, Ti, Mg et Zn indique que les sites d'étude étaient non contaminés à légèrement contaminés. Les CF indiquent une contamination modérée à considérable des sols de la zone d'étude par le Co, le Mo, le Ni, le Nb, le Zn Y, l'As et le B.

Ces résultats fourniront des informations de base pour l'amélioration de la gestion de l'environnement des sols et la prévention de la pollution par les éléments traces toxiques dans la région de Béni-Mellal qui devraient être pris en compte pour surveiller et améliorer l'accumulation d'éléments traces toxiques dans le sol et réduire les taux d'application de produits agrochimiques. En outre, d'autres études des teneurs en éléments traces toxiques dans la région sont nécessaires pour évaluer les risques pour la santé humaine. Cependant, des recherches supplémentaires doivent être menées dans d'autres sols agricoles et pour d'autres types de cultures afin d'établir une image claire de la pollution de l'environnement par les éléments traces toxiques dans la région de Béni-Mellal.

De plus, les résultats de cette étude révèlent que le site 3 (zone de Béni-Moussa) présentait les niveaux d'enrichissement les plus faibles, alors que le site 1 (zone de Béni Amir) a montré le plus haut niveau d'enrichissement. Ainsi, le sol du site 3 a fait l'objet des études ultérieures des essais agronomiques sous serre afin d'évaluer l'efficacité des souches d'Actinomycètes sélectionnées sur la croissance et la protection de la betterave sucrière.

## VI. Publication 3 : Assessing the contamination of trace toxic elements in the soils of sugar beet field (Beni-Mellal, Morocco)

Arabian Journal of Geosciences (2021) 14:822  
https://doi.org/10.1007/s12517-021-07217-w

ORIGINAL PAPER



### Assessing the contamination of trace toxic elements in the soils of sugar beet field (Beni-Mellal, Morocco)

Aallam Yassine<sup>1</sup> · El Rasafi Taoufik<sup>2</sup> · Hakkou Rachid<sup>3</sup> · Dhiba Driss<sup>2</sup> · Nouri Mohamed<sup>4</sup> · Haddioui Abdelmajid<sup>1</sup> · Hamdali Hanane<sup>1</sup>

Received: 21 September 2020 / Accepted: 29 April 2021  
© Saudi Society for Geosciences 2021

#### Abstract

Trace toxic elements concentrations (arsenic (As), boron (B), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), germanium (Ge), molybdenum (Mo), niobium (Nb), nickel (Ni), selenium (Se), zinc (Zn), yttrium (Y)) in sugar beet soils of Beni-Mellal region in Morocco were analyzed to evaluate their potential contamination level. The pollution was evaluated in three different sugar beet soils using enrichment factor (EF), geo-accumulation index ( $I_{geo}$ ), contaminant factor (CF), potential contamination index (Cp), and pollution load index (PLI). The obtained results show that the studied agricultural soils were contaminated with various heavy metals and metalloids such as As (<8–34.5 mg kg<sup>-1</sup>), Ba (186.5–241.0 mg kg<sup>-1</sup>), B (73.0–103.7 mg kg<sup>-1</sup>), Co (24.7–34.7 mg kg<sup>-1</sup>), Ge (10.7–25.7 mg kg<sup>-1</sup>), Nb (11.5–25.5 mg kg<sup>-1</sup>), and Mo (32.3–35.5 mg kg<sup>-1</sup>). The results of EF (99.04–2.60), CF (31.81–1.43) indices showed that these soils are heavily polluted with various elements (Mo > Ge > As > B > Co) suggesting their anthropogenic source. Moreover, these elements are higher than the limits proposed by the Canadian soil quality guidelines which oblige farmers to change their farming habits in order to protect and maintain ecological balance of the soil.

**Keywords** Heavy metals · Trace toxic elements · Agricultural soil · Sugar beet · Contamination

#### Introduction

In the last decades, the human population growth around the world increased the need of food supply to ensure the food safety. This leads to the use in agriculture of various pesticides, fertilizers, and organic amendments which might be a potential

source of soil alteration. Several authors have reported that agricultural practices such as pesticide application, non-adequate use of fertilizers, and excessive use of manure and compost may cause soil contamination with trace toxic elements (Doyi et al. 2018; Khalifa and Gad 2018; Keshavarzi and Kumar 2019; Li et al. 2020). Trace toxic elements in the polluted agricultural soil could be transferred to food products leading to significant health hazards (Oumenskou et al. 2018; Adimalla et al. 2019; Qiuguo et al. 2020) especially, due to their persistence, non-biodegradability and irreversible nature of contamination (Cai et al. 2012; Jing et al. 2018; El Rasafi et al. 2020).

The identification of sources of contamination, the assessment of pollution degree, and the evaluation of the ecological risks of contaminated agricultural soil have gained much interest in recent years. The evaluation of the health risks connected to contaminated agricultural soils in China (Zhang et al. 2013; Eziz et al. 2018; Hu et al. 2019), in Egypt (Khalifa and Gad 2018), in India (Bhatti et al. 2018; Adimalla et al. 2019), and in Tunisia (Chabbi et al. 2020) have shown high contamination with various heavy metals and metalloids such as Cu, Zn, Fe, Cr, Ni, Cd, Pb, and As. However, very few studies have been carried out in Beni-

Responsible Editor: Hanoun Chenchoumi

✉ Hamdali Hanane  
hamdali\_hanane@yahoo.fr

<sup>1</sup> Laboratory of Biotechnology and Valorization of Plant Genetic Resources, Faculty of Sciences and Technology, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, 23000 Beni-Mellal, Morocco

<sup>2</sup> University Mohammed VI Polytechnic (UM6P), Hay Moulay Rachid, 43150 Ben Guerir, Morocco

<sup>3</sup> Imed-Lab, Faculty of Sciences and Technology, Cadi Ayyad University, Abdelkarim Elkhattabi Avenue, Gueliz, P.O. Box 549, 40000 Marrakech, Morocco

<sup>4</sup> Laboratory of Biotechnology and Sustainable Development of Natural Resources, Faculty of Polydisciplinary, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, 23000 Beni-Mellal, Morocco

Published online: 04 May 2021

Springer

## **PARTIE 3.2. Efficacité agronomique des souches d'Actinomycètes solubilisatrices sélectionnées et ayant une aptitude au biocontrôle sur la croissance de la betterave sucrière**

### **(Essais agronomiques sous serre)**

#### **I. Introduction**

Le phosphate (P) et le potassium (K) sont des éléments majeurs qui interviennent dans la croissance et le développement des plantes (Alori et al. 2017; Parmar and Sindhu 2018). De nombreuses études ont rapporté le rôle crucial de P et K dans l'amélioration du rendement et de la qualité de la betterave sucrière (Zengin et al. 2009; Mekdad et al. 2021). Par conséquent, l'application de P améliore le développement du système racinaire, la croissance des plantes et l'allocation du carbone aux racines de la betterave sucrière (Madani et al. 2017; Ghaly et al. 2019). Il est également impliqué dans la synthèse des lipides et des acides nucléiques (Makhlouf et al. 2020). De même, le potassium contribue à plusieurs fonctions essentielles chez la betterave à sucre telles que la biosynthèse et le transfert de saccharose aux racines, la régulation du potentiel osmotique et la régulation de l'absorption d'eau (Barlog et al. 2013; Hanafy et al. 2019). De plus, Abdel-Motagally and Attia (2009) rapportent que le pourcentage de saccharose, la qualité du rendement et la pureté du jus de la betterave à sucre sont corrélés positivement avec l'absorption de K.

L'utilisation excessive d'engrais chimiques peut avoir des effets négatifs sur l'environnement, notamment la pollution des eaux souterraines et l'eutrophisation des rivières, et cela affectera la santé humaine (Naik et al. 2019). Cependant dans les sols acides, l'utilisation de la roche phosphate (RP) peut constituer une alternative écologique aux engrais chimiques, car la RP peut être partiellement solubilisée dans les sols acides, ce qui rend le P disponible à la nutrition des plantes. Malheureusement, il y a un grand vide au niveau des technologies qui rendent le RP applicable dans les sols alcalins (Maharana et al. 2020).

Le potassium existe dans le sol sous diverses formes minérales telles que l'orthoclase, le silicate, la biotite, la muscovite, le feldspath, le mica et la vermiculite (Sattar et al. 2018). Cependant, 90 à 98 % de ce K n'est pas disponible pour une utilisation végétale (Etesami et al. 2017). En considérant les dommages environnementaux liés aux pratiques de fertilisation

actuelles, il est devenu nécessaire de réduire les intrants d'engrais et de pesticides et de chercher des systèmes agricoles à faibles intrants qui se base sur l'exploitation de la flore du sol (Jacoby et al. 2017).

Les micro-organismes solubilisateurs de P et de K ont été reconnus par leur capacité d'améliorer l'absorption des nutriments chez les plantes (Sattar et al. 2018; Soumare et al. 2020). Plusieurs bactéries de la rhizosphère utilisent la RP et le potassium minéral comme substrats (Han and Lee 2006; Bagyalakshmi et al. 2017; Meena et al. 2018; Maharana et al. 2020). Les Actinobactéries est un groupe de bactéries qui présentent un intérêt particulier avec leur capacité à solubiliser le P et le K à partir des minéraux de la roche (Hamdali et al. 2008a, 2012, 2021; Liu et al. 2016; Han et al. 2018; Boubekri et al. 2021). De plus, ce groupe de bactéries filamenteuses produit une large gamme d'antibiotiques contre les champignons phytopathogènes (Hamdali et al. 2008b, c, 2021; Hamid et al. 2020; Zhang et al. 2020). Plusieurs études ont rapporté l'efficacité des Actinobactéries contre la pourriture racinaire causée par *Fusarium* spp. dans différentes plantes telles que le concombre (Hatamy et al. 2014), le blé (Orakçi et al. 2010), la tomate (Goudjal et al. 2016) et la betterave sucrière (Cao et al. 2018). En revanche, seules quelques études ont été rapportées, en conditions *in vitro*, sur les Actinomycètes solubilisatrices du P et du K (PKSA) (Han et al. 2018; Nafis et al. 2019; Aallam et al. 2021a; Boubekri et al. 2021). Cependant, et à notre connaissance, il n'existe aucun rapport décrivant la capacité des Actinobactéries, à la fois, à solubiliser le P et le K et à contrôler la pourriture racinaire chez la betterave sucrière dans des expériences en conditions contrôlés.

À cet égard, nous avons évalué les effets, à la fois, sur la croissance de la betterave sucrière et la résistance aux maladies fongiques de deux souches PKSA présélectionnés, *Streptomyces bellus* MW797036 (AYD) et *Streptomyces saprophyticus* MW797316 (DE2) (Aallam et al. 2021a, b). Pour atteindre cet objectif, des graines de betterave sucrière ont été cultivés en serre en utilisant des sols (site 3 de Béni Moussa, Chapitre III) additionnés de phosphate naturel et/ou d'orthoclase et cultivés en présence et en absence de *Fusarium* sp., l'agent causale de la pourriture des racines isolés de la même région du site d'étude. Nos travaux antérieurs ont montré les performances de la souche *Streptomyces bellus* qui a des activités de solubilisation de P et de K, de production d'auxine et une activité antifongique contre des *Fusarium* spp. plus élevées que *S. saprophyticus* (Aallam et al. 2021b).

Par conséquent, ce travail s'est appuyé sur les hypothèses suivantes : i) *S. bellus* favorise la croissance et le rendement de la betterave sucrière plus efficacement que *S. saprophyticus*. Étant donné que les deux souches solubilisent les deux minéraux ii) l'effet positif des bactéries sur la croissance des plantes et le taux de solubilisation en P et K soit le plus fort dans le traitement combiné avec du phosphate naturel et de l'orthoclase ; on s'attendait aussi à ce que iii) le biocontrôle de la pourriture racinaire des plantules de betterave à sucre causée par *Fusarium* spp. soit observé par les deux souches : *Streptomyces bellus* et *S. saprophyticus*.

## II. Matériel et Méthodes

### 2.1. Échantillonnage et analyse du sol

Des échantillons de sol ont été précédemment collectés à partir d'un champ de betterave sucrière situé à 40 km au sud de la région de Béni Mellal- Maroc en juin 2017 (Aallam et al. 2021a). Selon la classification de la FAO-UNESCO (1990), le sol est un calcisol calcaire à faible teneur en P et K soluble. Les échantillons de sol ont été prélevés d'une profondeur de 0 à 10 cm, après avoir enlevé 3 cm de la surface du sol, séchés à l'air, homogénéisés, tamisés (<2 mm), mélangés au sable à 3:1 (v/v) (Chandra et al. 2019) et stérilisés pendant 2 h à 121 °C à deux jours consécutifs afin d'éliminer les microorganismes autochtones. Le sol a été utilisé lors de ces expériences dans les 48 heures.

Les caractéristiques physico-chimiques du sol ont été précédemment décrites comme suit : pH (H<sub>2</sub>O) 7,49 ; pH (KCl) 7,09; Matière organique 4% ; Matière minérale 88 % ; teneur en eau 7,2 % ; conductivité électrique 0,25 µS/cm ; azote total 2,33 % ; phosphate soluble PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0,34% ; Mg<sup>2+</sup> 2,22 % ; potassium échangeable K<sup>+</sup> 0,77 % ; MnO 0,04 % ; phosphate soluble 0,34 % et K échangeable 0,77 % (Aallam et al. 2021a). La roche phosphatée broyée, et utilisée en complément, est une hydroxyapatite calcique constituée de O : 56,53 % ; F : 2,42 % ; Na : 1,81 % ; mg : 1,94 % ; Al : 2,03 % ; P : 9,37 % ; S : 0,77 % ; Sn : 0,12 % ; Ca : 16,35 % ; Fe : 0,60 % (Hamdali et al. 2008a). La poudre d'orthoclase utilisée est constituée de K<sup>+</sup> : < 0,1% ; PO<sub>4</sub> : 0,07 % ; SiO<sub>2</sub> : 78,14 % ; Na<sub>2</sub>O : 0,10 % ; Al<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 13,76 % ; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : 0,21 % ; Ca<sup>++</sup> : 0,41 % ; Mg<sup>++</sup> : < 0,1 % ; MnO : < 0,01 % ; TiO<sub>2</sub> : 0,4 % ; S : 0,04 % (Hajjaji et al. 2008).

## 2.2. Préparation de l'inoculum

*Streptomyces bellus* MW797036 (SB) et *Streptomyces saprophyticus* MW797316 (SS), isolées du champ de la betterave sucrière, ont été précédemment sélectionnées pour leurs multiples capacités PGP (Aallam et al. 2021a,b). Les spores de ces souches, conservées dans du glycérol stérile (20 %) à - 20 °C, ont été utilisées pour ensemercer (à 10<sup>6</sup> spores/ml) 50 ml de cultures de milieu Bennett liquide (Jones 1949) incubées dans des erlenmeyers de 250 ml pendant 3 jours à 28 °C sous agitation constante (180 g/min) sur un agitateur rotatif (New Brunswick Innova 2000, New Jersey, USA). Le mycélium a été centrifugé à 10 000 × g pendant 10 min, lavé deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS ; pH 7.2, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,14 M NaCl), fragmenté à travers l'aiguille d'une seringue stérile et remis en suspension dans 10 ml d'eau déminéralisée stérile. Cinq ml de la suspension mycélienne ont été ajoutés à 2,5 g de carboxyméthylcellulose humide (CMC, Merck, Darmstadt, Germany). Cette pâte a ensuite été mélangée à 50 g de graines de betterave sucrière stérilisées en surface. Chaque graine a été recouverte d'une fine couche de CMC humide contenant 10<sup>6</sup> unités formant colonie (ufc) comme déterminé par les dilutions appropriées et l'étalement sur gélose du milieu Bennett solide.

## 2.3. Traitement des semences et expériences en pot

Les expériences ont été menées avec des graines de la betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.), variété *Macumba*. Les graines de cette variété ont été obtenues en octobre 2019 auprès de COSUMAR- Maroc ([www.cosumar.co.ma](http://www.cosumar.co.ma)). Une stérilisation en surface a été réalisée en trempant les graines dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,4% et de Tween 80 à 0,1% pendant 5 min. Par la suite, les graines ont été rincées avec de l'eau désionisée stérile et inoculées comme décrit précédemment.

Un jour avant le semis, des pots en plastique stérilisés en surface (14 cm de diamètre, 12 cm de hauteur) ont été remplis de 1 kg de sol autoclavés comme décrit ci-dessus. Des graines avec ou sans inoculation (10<sup>6</sup> ufc par graine) ont été semées, cinq par pot, à 2 cm de profondeur et arrosées tous les deux jours avec 50 ml d'eau déminéralisée stérile. Après germination, le nombre des graines a été réduit à une plante par pot. L'expérience a été complètement randomisée et consistait en 12 traitements, comme décrit dans le Tableau 18, avec cinq répétitions. Dans toutes les expériences, les plantules de betterave sucrière ont été cultivés en serre à 24°C sous lumière



artificielle ( $\approx 140 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) pendant 16h et 17°C pendant 8h dans l'obscurité pour une durée de deux mois de culture.

**Tableau 18** : Traitements testés dans la présente étude

Traitement	N	P	K	RP	OT	<i>Streptomyces bellus</i> (SB)	<i>Streptomyces saprophyticus</i> (SS)
N <sub>0</sub> K <sub>0</sub> P <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-	-
N <sub>0</sub> K <sub>0</sub> P <sub>0</sub> +SB	-	-	-	-	-	+	-
N <sub>0</sub> K <sub>0</sub> P <sub>0</sub> +SS	-	-	-	-	-	-	+
RP	+	-	+	+	-	-	-
RP+SB	+	-	+	+	-	+	-
RP+SS	+	-	+	+	-	-	+
OT	+	+	-	-	+	-	-
OT+SB	+	+	-	-	+	+	-
OT+SS	+	+	-	-	+	-	+
RP+OT	+	-	-	+	+	-	-
RP+OT+SB	+	-	-	+	+	+	-
RP+OT+SS	+	-	-	+	+	-	+

+ : l'élément a été ajouté au sol ; - : l'élément n'a pas été ajouté au sol

#### 2.4. Analyses des plantes et des sols

Les plantules de la betterave à sucre ont été arrachées et les racines ont été lavées pour éliminer les particules de sol et les débris organiques. Les tiges et les racines ont été séparées. Les poids frais et secs (une nuit à 105 °C) ont été mesurés et le nombre de feuilles a été enregistré. La matière sèche et la longueur des tiges et des racines ont été déterminées pour chaque plantule et pour chaque traitement. Des échantillons (plante et sol) ont été séchés à l'air et leur teneur en azote total a été déterminée selon la méthode de Kjeldahl. Les concentrations de P total, de K total et la teneur en P disponible (Olsen-P) ont été déterminées selon NF ISO 11263 et le K disponible selon NFX 31-103. L'estimation des teneurs en N, P et K a été effectuée à l'aide de l'ICP-OES (Agilent 5110 ICP-OES, Santa Clara, USA).

Les teneurs en chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes ont été quantifiées selon Arnon (1949). Des feuilles fraîches de betterave sucrière (entre 0,25 et 0,5g) ont été laissées 24h à 4°C en présence de 80% d'acétone. Après centrifugation (4000 g/10 min), l'absorbance a été enregistrée à 470 nm, 537 nm, 647 nm et 663 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Macy Instruments Inc, Shanghai, China). L'estimation de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et des caroténoïdes ( $\mu\text{mol/g PF}$ ) a été effectuée comme décrit par Sims et Gamon (2002):

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{mol/g PF}) = ((0.01373 * A_{663}) - (0.000897 * A_{537}) - (0.003046 * A_{647})) \text{ Df} * W$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{mol/g PF}) = (0.02405 * A_{647} - 0.004305 * A_{537} - 0.005507 * A_{663}) \text{ Df} * W$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{mol/g PF}) = ((A_{470} - (17.1 * (\text{Chl a} + \text{Chl b}) - 9.479 - \text{anthocyanin})) \text{ Df} * W$$

Où : Anthocyanine  $0.08173 * A_{537} - 0.00697 * A_{647} - 0.002228 * A_{663}$ ;  $A_x$ : est l'absorbance à la longueur d'onde x (nm) Df : signifie facteur de dilution (ml) ; W : poids de la feuille (g).

## 2.5. Préparation de *Fusarium* spp. et conditions d'infection du sol

L'efficacité des deux souches de *Streptomyces* contre *Fusarium fujikuroi* et *Fusarium equiseti*, agents responsables de la pourriture des racines précédemment isolées d'un champ de betterave sucrière contaminé dans la région de Béni Mellal (Aallam et al. 2021b), a été évaluée dans des conditions contrôlés en expériences en pots. Des mycéliums de souches de *Fusarium* ont été cultivés à la surface de la gélose de dextrose de pomme de terre (PDA) (Merck, France) pendant 72 h. Puis, deux disques de gélose (10 mm de diamètre) ont été découpés et utilisés pour ensemercer des cultures de 50 ml de milieu PDA liquide dans des erlenmeyers de 250 ml. Ensuite, les erlenmeyers sont cultivés à  $28 \pm 2$  °C sur un agitateur rotatif (180 g/min) pendant 48 h. Par la suite, les cultures ont été centrifugées à 10 000 g pendant 10 min, lavées deux fois avec du PBS (10 mM) et fragmentées à travers de l'aiguille d'une seringue stérile. Afin d'assurer l'infection, le mycélium de chaque *Fusarium* sp. a été remis en suspension dans 50 ml de PBS stérile (0,25 mM) pour donner une suspension moins concentrée (100 ufc/ml) comme vérifié en étalant les dilutions appropriées sur un milieu PDA (technique de dénombrement sur milieu solide). Des pots en plastique stérilisés en surface (7 cm de diamètre) ont été remplis par 300 g de sol autoclavé, originaire d'un champ contaminé par *Fusarium* (Aallam et al. 2021b), et infesté ou non avec 1 ml de la dilution appropriée de chacun des deux *Fusarium* spp. correspondant à 3 ufc/g de sol.

Pour commencer l'expérience en serre, cinq graines de betterave sucrière inoculées ou non par les espèces de *Streptomyces* sélectionnées ( $10^6$  ufc par graine) ont été semées dans chaque pot à 2 cm de profondeur. Trois situations expérimentales ont été examinées : (1) sol non infesté avec graines non inoculées (témoin) ; (2) sol infesté par *Fusarium* spp. (*Fusarium fujikuroi* ou *Fusarium equiseti*) avec des graines non inoculées, (3) sol infesté par *Fusarium* spp. (*Fusarium fujikuroi* ou *F. equiseti*) avec des graines inoculées. Avec quatre répétitions par traitement. Les pots ont été incubés pendant cinq semaines avec une photopériode de 16 h sous lumière artificielle ( $\approx 140 \mu\text{mol/m}^2 \text{s}^{-1}$ ) à 24 °C et de 8h à 17 °C dans l'obscurité et arrosés tous les deux jours avec 50 ml d'eau déminéralisée stérile. Après, la sévérité de la pourriture des racines a été évaluée par comparaison des plantules entre les sols sains (témoins) et les sols infestés. Les plantules de betterave sucrière ont été arrachées et les racines ont été lavées pour éliminer les particules de sol et les débris organiques afin de mesurer la longueur de la partie aérienne et la partie racinaire, les chlorophylles a, b et les caroténoïdes, le taux d'infection et le nombre de feuilles pour chaque plante et pour chaque traitement.

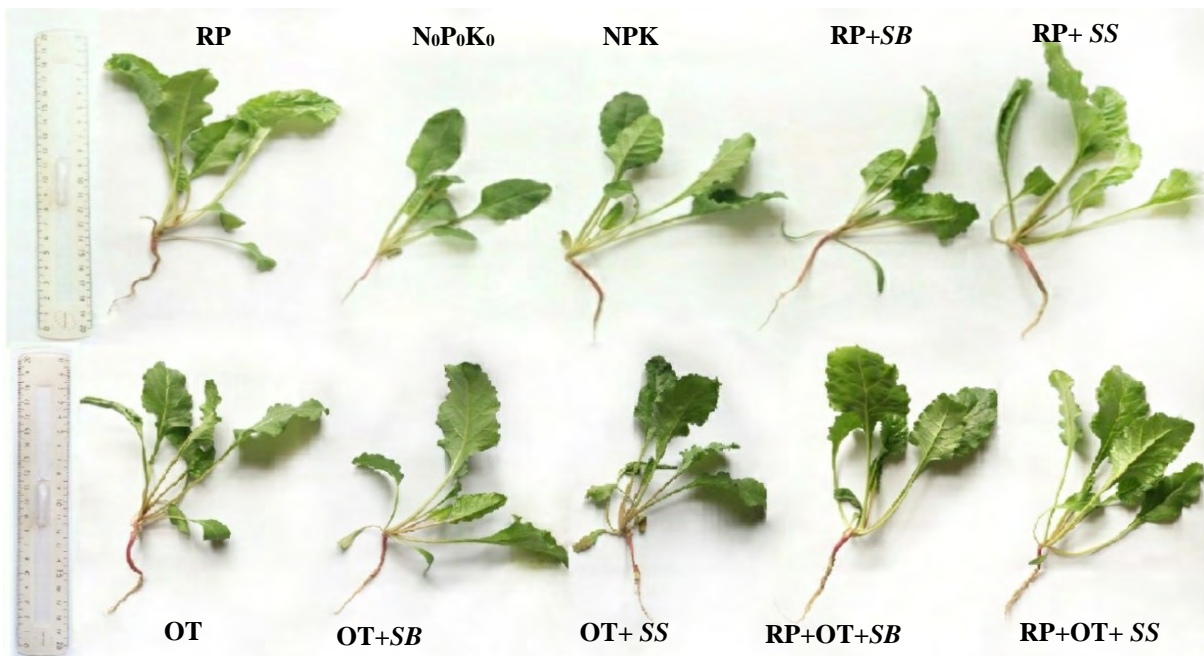
## **2.6. Analyse statistique**

Les données ont été traitées par une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) à l'aide du logiciel SPSS 20.0 pour Windows et les différences significatives entre les moyennes ont été comparées au test LSD protégé de Duncan à  $P < 0,05$ . Les pourcentages de plantes saines ont été transformés à l'arcsine ( $\sqrt{x}$ ) avant l'analyse statistique. Superanova1 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA) a été utilisé pour toutes les analyses. L'effet des sources de nutriments et de l'inoculation avec les deux souches testées sur la croissance de la betterave sucrière a été évalué en utilisant PERMANOVA du package *vegan* au sein de R (R Core Team 2020).

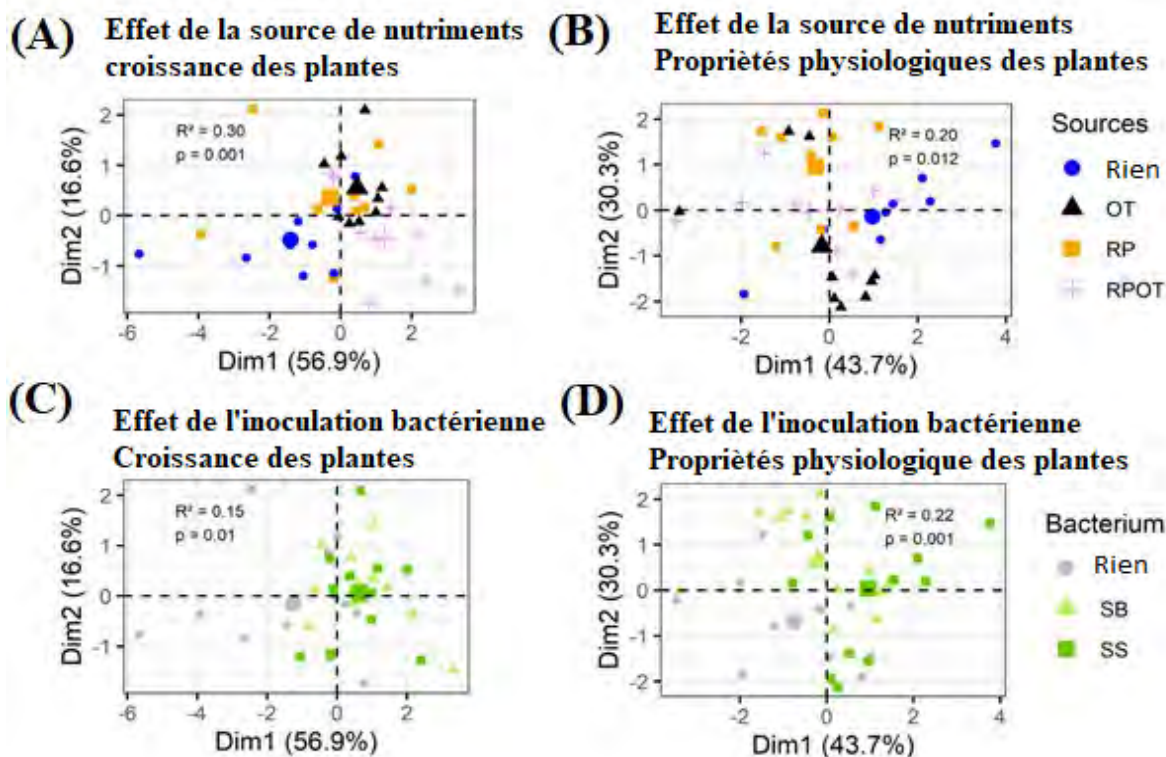
### III. Résultats

#### 3.1. Effet des sources de nutriments et de l'inoculation avec *Streptomyces bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS) sur la croissance de la betterave sucrière

La betterave sucrière a été cultivée pendant 60 jours en serre sans ajout de nutriments en absence ou en présence des souches SB ou SS et/ou de l'orthoclase (OT) et la roche phosphatée (RP) (Figure 26). PERMANOVA a indiqué des différences significatives entre la croissance et les propriétés physiologiques de la betterave sucrière liées à la source de nutriments et à l'inoculation par les souches d'Actinomycètes. Un effet significatif des nutriments a été observé à la fois pour la croissance des plantes ( $P = 0,001$ ,  $R^2 = 0,30$  ; Figure 27A) et les paramètres physiologiques des plantes ( $P = 0,012$ ,  $R^2 = 0,20$  ; Figure 27B), ainsi que par les bactéries ( $P = 0,001$ ,  $R^2 = 0,22$  ; Figure 27C) et ( $P = 0,001$ ,  $R^2 = 0,22$  ; Figure 27D).



**Figure 26.** Influence de la présence des deux souches de *Streptomyces* (*Streptomyces bellus*, SB ; *S. saprophyticus*, SS) sur la longueur et le poids sec de tissus végétaux de betterave sucrière cultivés dans un sol stérile déficient à la fois en phosphate soluble et en potassium (expérimentation en pot, un plant par pot, durée de croissance 2 mois). NoP0K0 : sol sans N, P ou K et sans inoculation. NoP0K0+ SB : sol sans N, P ou K et ensemencé avec la souche SB. NoP0K0+ SS : sol sans N, P ou K et ensemencé avec la souche SS. NPK : sol avec standard N + P + K et sans inoculation. NKOTPRP : sol au standard N + OT seule source de K + RP seule source de P et sans inoculation. RP + SB : sol avec standard N + OT + RP et ensemencé avec SB. RP + SS : sol avec standard N + OT + RP et ensemencé avec SS.



**Figure 27.** Effets des sources de nutriments et des *Streptomyces* sur la croissance et la physiologie de la betterave sucrière. Analyse en composantes principales des variables combinées de la croissance végétale (nombre de feuilles, poids sec des feuilles et des racines, longueur des feuilles et des racines) et des variables physiologiques de la plante (chlorophylle a, chlorophylle b, caroténoïdes, teneur en P et K des feuilles) de plantules de betterave sucrière sans inoculation par la bactérie ou avec *S. bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS), et en présence de phosphate naturel (RP) et/ou d'orthoclase (OT) comme seules sources de P et de K. Les points de données pour chaque groupe représentent des pots individuels. Sur la base d'une analyse multivariée permutationnelle de la variance, R-carré ( $R^2$ ) représente la proportion de la variance qui est expliquée par le stade de croissance, les valeurs de P et le niveau de signification.

En absence d'inoculation par les souches de *Streptomyces*, les paramètres de croissance des plantes étaient les plus faibles dans le sol non supplémenté ( $N_0P_0K_0$ ), qui était considéré comme un traitement témoin (Figure 28). La longueur des plantules a augmenté en présence de la roche phosphate + orthoclase (RP + OT) et l'OT seule avec l'enregistrement d'une différence significative par rapport au témoin ( $p > 0,05$ ) (Figure 28D). L'ajout de l'isolat SB a stimulé la longueur des feuilles en présence de l'OT. La biomasse des feuilles (Figure 28A) a augmenté par l'ajout de l'isolat SB comparée aux traitements témoins :  $N_0P_0K_0$  et RP seul. Le nombre de feuilles a augmenté avec les traitements OT et RP+OT (Figure 28C). Aussi, la biomasse racinaire est plus élevée dans le cas des traitements RP+ SS et de RP +OT + SB (Figure 28B).

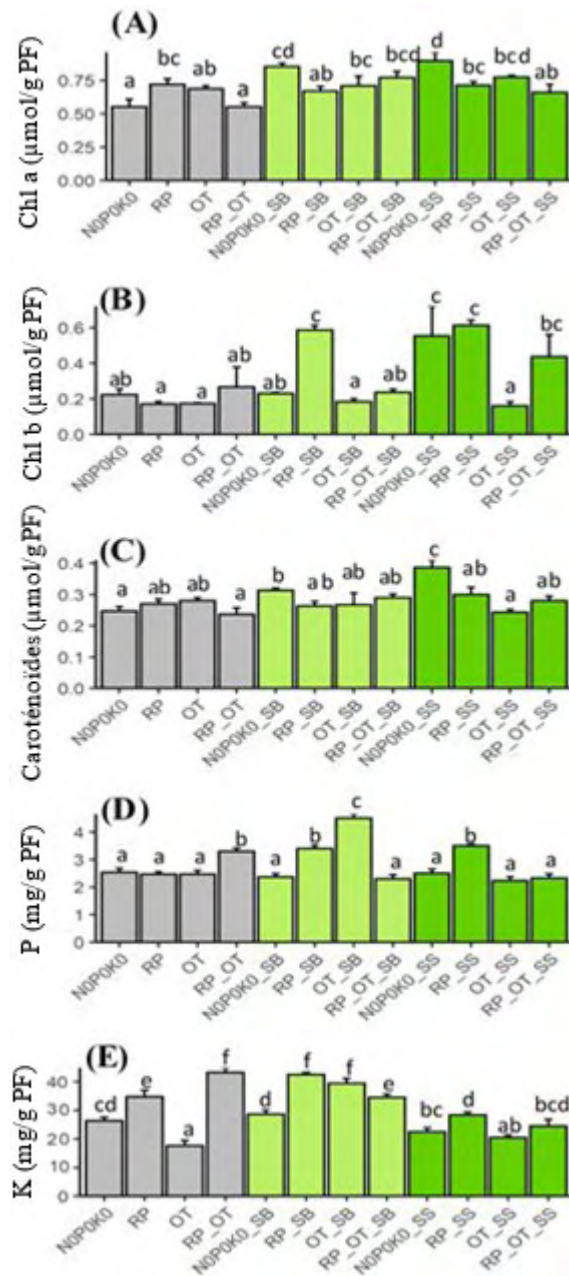


### **3.2. Effet des *Streptomyces* sur la teneur en chlorophylles**

Généralement, l'application de l'inoculant d'Actinomycètes montre un effet significatif sur la teneur en pigment des plantules de la betterave sucrière par rapport aux plantules non inoculées (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>; RP; OT; RP+OT) (Figure 29). La plus faible concentration en chlorophylle (a) a été observée chez les deux traitements N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> et RP+OT (0,55 µmol/g PF). Les teneurs en chlorophylle a, dans les traitements où SS et SB sont combinés avec RP et/ou OT, étaient presque similaires et variaient entre 0,66 et 0,77 µmol/g PF (Figure 29A). De même une variation nette de la teneur en chlorophylle b a été observée après 60 jours de croissance (Figure 29B). Les valeurs les plus faibles ont été enregistrées en présence de RP, OT, OT+SS et OT+SB (entre 0,16 et 0,183 µmol/g PF). En revanche, les traitements RP+SB et RP+SS ont montré des valeurs élevées en Chl b de 0,59 et 0,61 µmol/g PF, respectivement. En général, l'inoculation par l'une des deux souches a augmenté la quantité de caroténoïdes par rapport aux plantes non fertilisées et non inoculées (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>) (Figure 29C). En présence de SB, la teneur en caroténoïdes était comprise entre 0,26 et 0,29 µmol/g PF dans les traitements RP+SB et OT+SB RP+OT+SB. Cependant, en présence de SS, la quantité de caroténoïdes était comprise entre 0,24 µmol/g PF et 0,3 µmol/g PF en traitements OT+SS et RP+SS (Figure 29C).

### **3.3. Effet de l'inoculation des souches sur les teneurs en P et K dans les plantes**

Par rapport aux plantes non fertilisées et non inoculées (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>) (2,5 mg/g), la teneur en P a augmenté progressivement dans les traitements RP+OT, RP+SB, RP+SS et OT+SB qui étaient de 3,3, 3,4, 3,5 et 4,5 mg/g ; respectivement (Figure 29D). La concentration de K dans N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> était de 26,3 mg/g. Alors que l'inoculation avec SS a donné une teneur en K des feuilles comprises entre 20,4 et 28,3 mg/g, des valeurs plus élevées ont été détectées en particulier dans les traitements inoculés avec SB (RP+OT+SB ; OT+SB et RP+SB). La valeur la plus élevée a été trouvée dans le traitement RP+OT (43.2 mg/g) (Figure 29E).



**Figure 29.** Paramètres physiologiques des plantules de betterave sucrière. Valeurs moyennes de (A) : chlorophylle a, (B) : chlorophylle b, (C) : teneur relative en caroténoïdes, (D) : teneur en P dans les feuilles et (E) : teneur en K dans les feuilles des plantules de betterave sucrière après inoculation de *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) et/ou d'orthoclase (OT) comme seules sources de P et de K. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif. Les valeurs sont la moyenne de cinq répétitions après 60 jours de culture et les barres d'erreurs représentent l'écart type. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements dans un p ≤ 0,05.



### 3.4. Effet de *Streptomyces* sur les teneurs en N, P et K dans le sol

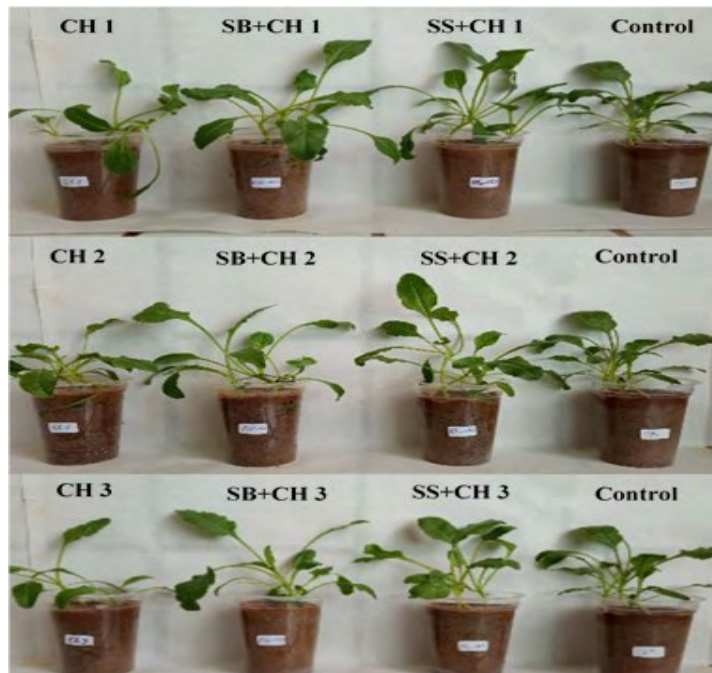
Les traitements de betterave sucrière avec SB et SS ont conduit à des teneurs plus élevées en P et K soluble dans le sol. La combinaison de *S. bellus* ou *S. saprophyticus* avec RP et OT a augmenté remarquablement la concentration de P totale (RP+OT+SS : 2,1 g/kg ; RP+OT+SB : 2,3 g/kg) et de K (RP+OT+SS : 7,51 g/kg ; RP+OT+SB : 7,60 g/kg) dans le sol par rapport au témoin (P : 1,15 g/kg ; K : 7,1 g/kg). En revanche, les traitements RP+SS et OT+SB ont augmenté la teneur en P disponible du sol qui était de 0,05 g/kg et 0,06 g/kg, respectivement par rapport au témoin négatif N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> (P : 0,04 g/kg). De plus, le K disponible dans le sol a été augmenté suite à la combinaison de SB avec RP et SS avec OT (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : 0,29 g/kg, RP+SB : 0,40 g/kg, OT+SS : 0,52 g/kg) (Tableau 19).

**Tableau 19.** Estimation des concentrations de N (Azote), P (phosphate) et K (Potassium) dans le sol et effet de l'inoculation de *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) avec ou sans l'ajout de phosphate naturel et/ou d'orthoclase après 60 jours de croissance de la betterave à sucre. Les valeurs sont la moyenne de cinq échantillons ± SD.

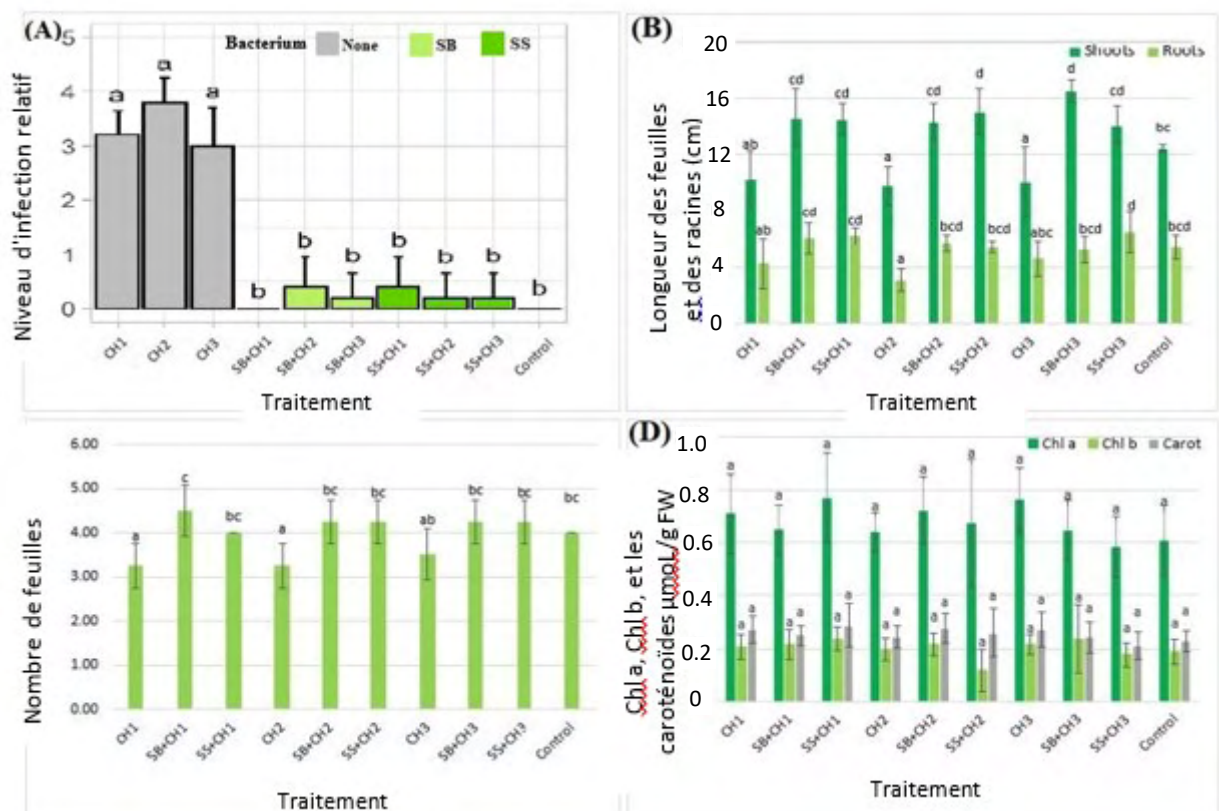
	Total			Assimilable	
	N	P	K	P	K
	%	g/kg			
<b>N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub></b>	0.09 ± 0.01e	1.15 ± 0.003 <sup>e</sup>	7.11 ± 0.003c	0.04 ± 0.001b	0.29 ± 0.004c
<b>RP+OT</b>	0.06 ± 0.04bcde	2.46 ± 0.004k	7.02 ± 0.003b	0.04 ± 0.002d	0.29 ± 0.001c
<b>RP</b>	0.04 ± 0.01abc	1.50 ± 0.005g	7.45 ± 0.004h	0.04 ± 0.001bc	0.45 ± 0.003h
<b>OT</b>	0.04 ± 0.02abcd	1.10 ± 0.008d	7.22 ± 0.003e	0.06 ± 0.003ef	0.35 ± 0.004f
<b>N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>+SB</b>	0.07 ± 0.03cde	0.97 ± 0.006a	7.01 ± 0.001a	0.03 ± 0.002ab	0.30 ± 0.003d
<b>RP+OT+SB</b>	0.08 ± 0.01de	2.34 ± 0.002j	7.60 ± 0.003j	0.04 ± 0.002b	0.27 ± 0.005a
<b>RP+SB</b>	0.01 ± 0.03a	1.79 ± 0.005h	7.14 ± 0.004d	0.04 ± 0.002c	0.40 ± 0.001g
<b>OT+SB</b>	0.04 ± 0.02abc	1.15 ± 0.004 <sup>e</sup>	7.23 ± 0.006e	0.06 ± 0.005f	0.31 ± 0.002e
<b>N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>+SS</b>	0.05 ± 0.01abc	1.01 ± 0.004b	7.26 ± 0.004f	0.04 ± 0.007bc	0.28 ± 0.005b
<b>RP+OT+SS</b>	0.03 ± 0.03ab	2.11 ± 0.005i	7.51 ± 0.005i	0.04 ± 0.003bc	0.28 ± 0.002bc
<b>RP+SS</b>	0.06 ± 0.03cde	1.18 ± 0.004c	7.45 ± 0.004g	0.05 ± 0.001a	0.30 ± 0.003i
<b>OT+SS</b>	0.08 ± 0.02bcde	1.04 ± 0.004f	7.38 ± 0.004h	0.03 ± 0.003e	0.52 ± 0.005d

### 3.5. Biocontrôle de la pourriture racinaire causée par *Fusarium* par les deux *Streptomyces* spp. sélectionnées

Lorsque le mycélium de l'une des deux souches de *Streptomyces* a été utilisé pour enrober les graines de betterave sucrière, l'inhibition de la croissance des plantules de la betterave sucrière causée par les deux *Fusarium* spp. était significativement réduite après cinq semaines de culture (Figure 30; Figure 31). Les deux souches *Streptomyces bellus* et *S. saprophyticus* ont significativement réduit le pourcentage d'infection et la gravité de la maladie (Figure 31) par rapport aux plantes contaminées sans inoculation par les *Streptomyces*. *Fusarium fujikuroi* (CH1 et CH3) et *F. equiseti* (CH2) ont montré des pourcentages élevés d'infection racinaire (la valeur moyenne la plus élevée était pour CH2 avec 93,5 %) par rapport aux plantes inoculées avec CH1, CH2 ou CH3 en présence de SB (12 %) ou SS (6%). En plus, la longueur des tiges et des racines (Figure 31B) a augmenté par l'inoculation de SB et SS par rapport aux plantes infestées par *Fusarium* en absence d'inoculation. Les teneurs en chlorophylle b et en caroténoïdes sont restées comparables entre les traitements.



**Figure 30 :** Influence de la présence de *Streptomyces bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS) sur la longueur des feuilles et le poids sec de betterave sucrière cultivée dans un sol inoculé avec les champignons CH1 : *Fusarium fujikuroi*, CH2 : *Fusarium equiseti* et CH3 : *Fusarium fujikuroi*. CH1 : sol ensemené avec *F. fujikuroi*. CH2 : sol ensemené avec *F. equiseti*. CH3 : sol ensemené avec *F. fujikuroi*. SB+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemené avec la souche SB et *F. fujikuroi* ou *F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. SS+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemené avec la souche SS et *F. fujikuroi* ou *F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. Témoin (contrôle) : Sol sans inoculation. Expérience en cinq semaines de culture.



**Figure 31.** Evaluation de l'effet des deux *Streptomyces* sous serre contre le *Fusarium* agent causal de la pourriture des racines chez la betterave à sucre (A) Niveaux d'infection des racines de betterave à sucre, (B) longueurs des feuilles et des racines, (C) nombre de feuilles et (D) teneur en chlorophylles et en caroténoïdes des plantules de betterave à sucre, après cinq semaines de culture, avec inoculation de *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de trois champignons CH1 : *Fusarium fujikuroi*, CH2 : *Fusarium equiseti* et CH3 : *Fusarium fujikuroi*. CH1 : sol ensemencé avec *F. fujikuroi*. CH2 : sol ensemencé avec *F. equiseti*. CH3 : sol ensemencé avec *f. fujikuroi*. SB+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemencé avec la souche SB et *F. fujikuroi* ou *F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. SS+CH1 ou CH2 ou CH3 : sol ensemencé avec la souche SS et *F. fujikuroi* ou *F. equiseti* ou *F. fujikuroi*. Témoin : Sol sans inoculation. Les moyennes de cinq répétitions et les barres d'erreurs représentent l'écart type. Différentes lettres minuscules au-dessus des barres montrent des différences significatives entre les traitements dans un  $p \leq 0,05$ .

#### IV. Discussion

Nos résultats, *in vivo*, démontrent que les deux souches de *Streptomyces* testés, SB et SS, favorisent la croissance et améliorent les paramètres physiologiques de la betterave sucrière, en plus de leurs capacités de protection contre la pourriture fusarienne des racines. Ce qui supportent l'idée que les streptomycètes rhizosphériques fournissent de multiples traits bénéfiques aux plantes

(Hamdali et al. 2008b; Gebauer et al. 2021; Kurth et al. 2015; Raymond et al. 2020; Worsley et al. 2020; Yuan et al. 2015). Des deux souches testées, la souche SB était la plus efficace et mérite une attention particulière en vue de son utilisation potentielle pour des applications sur le terrain.

Comme déjà signalé dans notre deuxième hypothèse, effectivement, SS et SB en combinaison avec RP et OT ont amélioré la matière sèche des racines, le nombre des feuilles et la longueur des tiges et des racines de la betterave sucrière par rapport aux traitements non inoculés. Cela suggère que la mobilisation de P et de K peut être l'effet principal de la promotion de la croissance des plantes par ces souches de streptomycètes. De même, l'inoculation de graines de blé avec *Micromonospora aurantiaca* (Hamdali et al. 2008b) et de graines de noyer avec *Pseudomonas chlororaphis* et *Arthrobacter pascens* (Yu et al. 2012) en présence de RP ont favorisé la croissance des racines et des feuilles. Plusieurs études ont rapporté que les bactéries favorisent la croissance des plantes lorsque la roche P et la roche K sont appliquées au sol. Ces études incluent du blé inoculé avec *Bacillus* sp. MWT-14 (Tahir et al. 2018) et du maïs inoculé avec *Agrobacterium tumefaciens* (Meena et al. 2018).

Lorsque le RP et/ou l'OT sont ajoutés au sol, les teneurs en P et K de la betterave sucrière ont augmenté par l'inoculation de SB ou SS. Ceci est en accord avec les résultats de Sacristán-pérez-minayo et al. (2020) utilisant *P. fluorescens* et *P. chlororaphis*, ainsi que les résultats de Kaur and Reddy (2015) avec *Pantoea cypripedii* et *Pseudomonas plecoglossicida*. De plus, la teneur en P disponible dans le sol a augmenté en présence de SB avec OT et en présence de SS avec RP et le K disponible dans le sol en présence de SS avec OT ou RP. Cela indique que les deux bactéries présentent des effets complémentaires sur la solubilisation des nutriments minéraux et les effets de l'inoculation combinée de SB et SS doivent être testés. La disponibilité de P et de K est très importante pour la croissance de la betterave sucrière, ces nutriments ont des rôles alternatifs dans la physiologie des plantes. Ainsi, P représente souvent un facteur limitant de la croissance chez la betterave sucrière en raison de son rôle important dans le transfert d'énergie ou comme constituant d'acides nucléiques et de membranes (Hadir et al. 2021). Elhaisoufi et al. (2020) ont montré que l'inoculation de *Pseudomonas* spp. en combinaison avec RP augmente non seulement la teneur en P mais aussi en N dans les feuilles et les racines des plants de blé, indiquant que, par la mobilisation du P, l'assimilation de N par la plante peut également être stimulée. En plus, il a été démontré que l'inoculation de la betterave sucrière avec *Bacillus* spp. fixent l' $N_2$ , solubilisent les phosphates et augmentent aussi le rendement des racines, des feuilles et les teneurs

en sucres (Sahin et al. 2004). L'inoculation par une seule souche de *Bacillus* avec des bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> a augmenté le rendement des racines de la betterave à sucre, tandis que l'inoculation en combinaison avec une autre bactérie solubilisatrice du P a donné des rendements encore plus élevés. Cela suggère qu'on devrait, testé au champ, si les deux PSB du présent travail, SB et SS, interagissaient positivement avec les bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère de la betterave sucrière.

Aucun effet significatif n'a été montré de l'inoculation ni par SB ni par SS sur la croissance de la betterave à sucre et sur l'absorption de P ou de K. Cependant, chaque bactérie a montré des effets spécifiques sur la betterave sucrière selon le substrat P ou K. Ainsi, des effets positifs constants, des deux bactéries testées, ont été significativement trouvés au niveau de la chlorophylle a et de caroténoïdes des feuilles de la plante d'étude. Nous suggérons que ces incohérences reposent très probablement sur des processus de rétroaction entre les feuilles, les racines, les exsudats racinaires, le sol, les sources de K ou P et les isolats de *Streptomyces* (Vetterlein et al. 2020). Gao et al. (2018) ont montré que la solubilisation du potassium est induite par les exsudats racinaires tel que les acides phénoliques, et que les effets de l'exsudation racinaire par apport de phosphore sont également significatifs (Zhang et al. 2016). Il a été rapporté que les changements dans la composition des exsudats racinaires sont un facteur majeur non seulement dans la régulation de la formation des mycorhizes et/ou des rhizobactéries, mais aussi d'autres bactéries du rhizosphère comme les streptomycètes, qui sont plus susceptibles de se nourrir de la matière organique complexe que des exsudats racinaires (Worsley et al. 2021). Néanmoins, leur physiologie et leur potentiel d'acquisition de nutriments sont fortement affectés par les niveaux de P et de K (Aharonowitz and Demain 1977; Chater et al. 2010) et nos données suggèrent que les changements liés au P et au K affectent fortement les interactions betterave sucrière et *Streptomyces*.

En revanche, le K joue un rôle important dans la photosynthèse et la respiration ainsi que dans l'osmorégulation, y compris dans la réduction des effets négatifs liés au stress hydrique (Aksu and Altay 2020; Hadir et al. 2021). Il est reconnu que les microorganismes solubilisateurs de P et de K peuvent stimuler la nutrition des cultures (Kour et al. 2020; Saleemi et al. 2017; Vasseur-coronado et al. 2021). Il convient de noter que la capacité des souches SB et SS de produire les sidérophores (Aallam et al. 2021a), d'influencer positivement les niveaux de chlorophylles de la betterave sucrière, qui est un indicatif d'une meilleure nutrition en N, favorisent d'avantage le rôle

de ces deux souches dans l'amélioration de la nutrition de la betterave sucrière en cas de carence en nutriments.

Boubekri et al. (2021) ont isolé *Streptomyces* spp. produisant des AIA et des sidérophores à double capacité de solubiliser les sources minérales de P et de K (RP et poudre de mica) et d'améliorer la germination des plantules de blé en conditions de serre. Il était donc plausible que vue la capacité de nos souches appliquées (SB et SS) à produire de l'AIA (Aallam et al. 2021a,b) cela va favoriser la prolifération des racines de la betterave sucrière. À l'appui de cela, une augmentation de la biomasse racinaire a été détectée dans les traitements en RP par SS et en RP+OT par SB. Notamment, *Variovorax paradoxus* NG-T6, *Micrococcus yunnanensis* TGT-R7 et *Planococcus rifietoensis* LH-T4 améliorent la germination de la betterave sucrière sous stress salin (Zhou et al. 2017) ce qui représente un autre trait intéressant à la lumière des applications au champ pour une meilleure tolérance au stress. A savoir que le site d'isolement au Maroc, la région de Béni Mellal, se caractérise par des températures élevées, un rayonnement intense et une faible humidité des sols. L'augmentation des teneurs en caroténoïdes par la SB et la SS, qui sont des pigments antioxydants qui remplissent des fonctions essentielles dans la photosynthèse pour l'assemblage du photosystème, la récolte de la lumière, la photoprotection (Yuan et al. 2015) et la représentation de l'activité ACC désaminase par les streptomycètes de la rhizosphère (Gebauer et al. 2021), pourrait également contribuer à la croissance de la betterave sucrière dans les conditions du champ de la région de Béni Mellal.

Il y avait une relation claire entre l'activité inhibitrice *in vitro* récemment rapportée (Aallam et al. 2021b) contre les souches de *Fusarium* spp. et le niveau de protection contre la pourriture des racines par SB et SS en conditions sous serre. Cela suggère un antagonisme direct contre *Fusarium* (Smith et al. 1990) et non une résistance induite par *Streptomyces* (Lehr et al. 2008). Les déterminants de l'inhibition peuvent être multiples. Ils comprennent les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire fongique, les chitinases ou bêta-glucanases et le cyanure d'hydrogène, générées par les *Streptomyces* (Sahin et al. 2004). En plus, des métabolites secondaires de *Streptomyces* tels que l'antibiotique polyène faeriefungine (Smith et al. 1990). D'une façon intéressante, Xiao et al. (2002) ont observé que la taille des zones d'inhibition *in vitro* des isolats individuels de *Streptomyces* contre des agents pathogènes spécifiques n'était pas significativement corrélée avec l'étendue du contrôle biologique de ces agents pathogènes. Plutôt, l'activité de lutte biologique était en corrélation avec le poids des plantules lorsqu'elles étaient inoculées avec les

souches de *Streptomyces* en l'absence et en présence des agents pathogènes. La recherche des souches de *Streptomyces* spp. effective par inhibition *in vitro*, peut conduire à une protection efficace dans des conditions de champ, avec une diminution de la gravité des maladies (Colombo et al. 2019; Sahin et al. 2004; Smith et al. 1990).

## V. Conclusion

Les résultats des essais en serre confirment les hypothèses de ce travail indiquant les capacités de solubilisation du P et du K par les souches SS et SB, précédemment observées *in vitro*, et leur capacité d'améliorer la nutrition phosphatée et la croissance de la betterave sucrière en sol, en particulier par la souche SB. Les performances de ces bactéries contre la pourriture fusarienne des racines renforcent à la fois leur potentiel de promotion de la croissance de la betterave sucrière qui était le plus élevé dans le traitement combiné à la roche phosphatée et à l'orthoclase. Les travaux futurs testeront si les souches de *Streptomyces bellus* et *Streptomyces saprophyticus* conservent leur efficacité dans des conditions du champ.

## VI. Publication 4. Growth promotion and protection against root rot of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by two rock phosphate and potassium solubilizing *Streptomyces* spp. under greenhouse conditions

Plant Soil  
https://doi.org/10.1007/s11104-021-05252-w

REGULAR ARTICLE



### Growth promotion and protection against root rot of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by two rock phosphate and potassium solubilizing *Streptomyces* spp. under greenhouse conditions

Yassine Aallam · Driss Dhiba · Taoufik El Rasafi · Sanaa Lemriss · Abdelmajid Haddioui · Mika Tarkka · Hanane Hamdali

Received: 28 July 2021 / Accepted: 30 November 2021  
© Springer Nature Switzerland AG 2021

#### Abstract

**Purpose** Phosphorus (P) and potassium (K) shortages inhibit crop production, and soil borne plant diseases such as root rot by *Fusarium* spp. can cause extensive damage to crops. *Streptomyces bellus* (SB) and *S. saprophyticus* (SS) solubilize P and K and inhibit sugar beet (*Beta vulgaris* L.) associated *Fusarium* strains in laboratory conditions.

**Methods** To address their performance in vivo, their effects on sugar beet growth and root rot development was tested.

**Results** The tested strains showed a significant beneficial effect on growth and yield parameters of sugar beet when mixed in the soil with insoluble natural rock phosphate (RP) and/or K mineral orthoclase (OT). Compared to the non-inoculated treatment, the highest shoot and root dry biomass were recorded with RP+OT+SB. Highest P and K levels in leaves were with OT+SB and RP+SB, and the treatment RP+OT+SB increased both soil P and K. Interestingly, these SS and SB strains exhibited high protection effects of 100% and 75%, respectively, when the soil was infested by *F. equiseti* and *F. fujikuroi*, causal agents of root rot disease of sugar beet in Beni Mellal region.

**Conclusions** These results can be exploited to mitigate the detrimental impacts of nutrient limitation for and disease susceptibility of sugar beet.

Responsible Editor: Luz E. de-Bashan.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05252-w>.

Y. Aallam · T. El Rasafi · S. Lemriss · A. Haddioui · H. Hamdali (✉)  
Laboratory of Biotechnology and Valorization of Plant Genetic Resources, Faculty of Sciences and Technology, University of Sultan Moulay Slimane, B.P: 523, Beni-Mellal 23000, Morocco  
e-mail: hanane.hamdali@usms.ac.ma

D. Dhiba  
University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), International Water Research Institute (IWRI), Moulay Rachid, 43150 Ben Guerir, Morocco

T. El Rasafi  
IFTMR Laboratory, University Mohammed VI Polytechnic (UM6P), Moulay Rachid, 43150 Ben Guerir, Morocco

S. Lemriss  
Department of Biosafety PCL3, Laboratory of Research and Medical Analysis of Gendarmerie Royale, Rabat, Morocco

M. Tarkka  
UFZ - Helmholtz-Centre for Environmental Research, Soil Ecology Department, Theodor-Lieser-Straße 4, 06120 Halle, Germany

M. Tarkka  
German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv) Halle-Jena-Leipzig, Deutscher Platz 5e, 04103 Leipzig, Germany

Published online: 13 January 2022

Springer



### **PARTIE 3.3. L'effet de l'inoculation des souches d'Actinomycètes sélectionnées sur le rendement agronomique de la betterave sucrière (Essai agronomique au champ)**

#### **I. Introduction**

La fertilisation des champs à l'aide des engrais chimiques est largement utilisée par les agriculteurs, ce qui peut avoir un effet négatif sur la santé humaine. Les engrais synthétiques sont capables de traverser la chaîne alimentaire (Anwar et al. 2016), les eaux souterraines et de détériorer la fertilité des sols (Naik et al. 2019). Le développement des plantes et la production des cultures sont fortement liés à la disponibilité des nutriments dans le sol tels que le phosphore (P). Malgré la distribution abondante de P dans le sol sous forme organique et inorganique, de nombreuses terres à travers le monde sont déficientes en P facilement disponible à la croissance des plantes (Xiao et al. 2013), ce qui rend impératif de corriger ses concentrations en ajoutant des engrais chimiques phosphatés. Malheureusement, cela peut conduire à une nette perturbation de l'environnement local. Alors que, le problème le plus important constaté après l'apport de phosphore est que de grandes quantités de P appliquées sont rapidement converties en formes insolubles et ne sont donc pas disponibles pour les plantes (Ben Farhat et al. 2015; Alori et al. 2017).

La fertilisation des sols avec des produits naturels tels que la roche phosphatée (RP) comme source de P est très efficace et peut être utilisée comme une alternative aux engrais phosphatés chimiques car elle est naturelle, moins coûteuse et disponible (Xiao et al. 2011). Cependant, l'application directe du RP n'est efficace que dans les sols acides (Maharana et al. 2021) et ne peut être utilisée dans les autres sols (Xiao et al. 2013; Manzoor et al. 2016; Azaroual et al. 2020). À cet égard, les microorganismes solubilisateurs de phosphate (MSP) tels que les Actinomycètes pourraient jouer un rôle crucial dans la solubilisation du RP et l'amélioration de la fertilité du sol (Moharana et al. 2018). Les Actinomycètes sont connus par leur capacité de sporulation et de formation de mycélium qui les aide à résister dans des conditions extrêmes, à coloniser la rhizosphère et les systèmes racinaires des plantes (Ghorbani-Nasrabadi et al. 2013; Trujillo et al. 2015; Olanrewaju and Babalola 2019). En outre, les Actinomycètes ont la capacité de produire des sidérophores, de fixer l'azote et de solubiliser le phosphate naturel et le potassium inorganique (Hamdali et al. 2008b, c, a, 2021; Kakoi et al. 2014; Nafis et al. 2019; Aallam et al. 2021a, b). Ils

affectent aussi positivement la régulation de la croissance des plantes en synthétisant des phytohormones: cytokinines, gibbérellines, acide 1 aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), chitinase et acide indole-acétique (AIA) (Hamdali et al. 2008a; Tarkka and Hampp 2008; Nafis et al. 2019; Aallam et al. 2021a, b).

Nous supposons qu'une bonne compréhension du rôle des Actinomycètes du sol dans la rhizosphère est la clé des futures pratiques agricoles durables. À notre connaissance, peu d'études sur la biofertilisation de la betterave à sucre par des bactéries sont rapportés: *Bacillus* (Sahin et al. 2004), Actinomycètes (Hamdali et al. 2008a, 2021; Aallam et al. 2021a, b) et les champignons (Costa et al. 2015). Tandis qu'aucune étude n'a été rapporté sur la fertilisation biologique de la betterave à sucre en utilisant les Actinomycètes dans un essai au champ. Par conséquent, cette étude a été réalisée afin d'évaluer l'impact de l'amendement du sol avec du phosphate naturel et la co-inoculation des graines de betterave sucrière avec deux *Streptomyces* spp. comme engrais bio phosphaté et leurs effets sur la croissance et le rendement de la betterave à sucre dans des expériences au champ.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1.1. Description de la zone d'étude et d'échantillonnages**

L'expérience au champ a été réalisée en mars 2020 dans une ferme privée non fertilisée et située (32°28'54.9 "N, 6°10'50.5 "W) à 25 km au sud de la ville de Béni Mellal au Maroc. Le climat de cette région est méditerranéen chaud avec une température comprise entre 1,1 et 40 °C et une pluviométrie annuelle moyenne généralement comprise entre 350 et 650 mm/an (Barakat et al. 2019).

### **1.2. Analyse physico-chimique du site d'étude**

Les propriétés physico-chimiques du sol sont listées dans le tableau 20. Selon la classification FAO-UNESCO (1990), le sol est un calcisol calcaire avec une faible teneur en P et K disponibles. Diverses caractéristiques ont été mesurées en utilisant des procédures standards, distribution granulométrique (NFX 31-107), pH et conductivité électrique (NF ISO 10390 et NF ISO 11265), carbonate de calcium CaCO<sub>3</sub> (NF EN ISO 10693), matière organique (MO) (NF ISO 14235), éléments échangeables (NFX 31-108 et NF ISO 11263), oligo-éléments (Cu, Fe, Mn, Zn) (NFX 31-121) et N, P et K totaux (Kjeldahl et ICP-OES (Agilent 5110 150 ICP-OES, USA)). En

général, le sol était limono-sableux avec 4,81% de MO, 86,00 mg/kg de P échangeable et 4933,00 mg/kg de P total.

Le phosphate naturel broyé utilisé comme supplément est une hydroxyapatite de calcium constituée de O : 56,53% ; F : 2,42% ; Na : 1,81% ; Mg : 1,94% ; Al : 2,03% ; P : 9,37% ; S : 0,77% ; Sn : 0,12% ; Ca : 16,35% ; Fe : 0,60% (Hamdali et al. 2008a).

**Tableau 20.** Caractéristiques physico-chimiques du sol du test agronomique au champ

Paramètre		Valeur
<b>Granulométrie</b>	Argile (%)	22.00 ± 1.00
	Limon (%)	53.67 ± 2.08
	Sable (%)	24 ± 2.65
<b>pH</b>		8.03 ± 0.04
<b>Conductivité électrique (EC) (mS/cm)</b>		0.16 ± 0.02
<b>Carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>)</b>		5.87 ± 0.35
<b>Matière organique (OM)</b>		4.81 ± 0.05
<b>Phosphore (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (mg/kg)</b>		86.00 ± 2.00
<b>Les éléments échangeables</b>	Potassium (K <sub>2</sub> O) (mg/kg)	435.00 ± 5.00
	Sodium (Na <sub>2</sub> O) (mg/kg)	65.00 ± 2.65
	Magnesium (MgO) (mg/kg)	1438.00 ± 2.60
	Calcium (CaO) (mg/kg)	10343.33 ± 4.62
<b>Les oligo-éléments</b>	Cuivre (Cu) (mg/kg)	0.94 ± 0.02
	Manganèse (Mn) (mg/kg)	7.96 ± 0.02
	Iron (Fe) (mg/kg)	7.71 ± 0.03
	Zinc (Zn) (mg/kg)	2.60 ± 0.04
<b>Azote total (N) (%)</b>		0.09 ± 0.02
<b>Phosphate total (P) (mg/kg)</b>		4933.00 ± 3.00
<b>Potassium total (K) (mg/kg)</b>		5612.67 ± 1.15

### 1.3. Préparation de l'inoculum et traitement des graines

*Streptomyces bellus* MW797036 (SB) et *Streptomyces saprophyticus* MW797316 (SS) isolées des champs de la betterave à sucre ont été précédemment sélectionnées pour leurs capacités multiples de croissance potentielle des plantes (PGP) (Aallam et al. 2021a, b). Les spores, de chaque souche, conservées dans du glycérol stérile à 20 °C, ont été utilisées pour inoculer (à 10<sup>6</sup> spores/ml) des cultures de 50 ml de milieu Bennett liquide (Jones 1949) incubées dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml (x 4) pendant 3 jours à 28 °C sous agitation constante sur un agitateur rotatif (180 g/min). Le mycélium de *Streptomyces* a été centrifugé à 10 000 × g pendant 10 minutes, lavé deux fois avec une solution saline de tampon phosphate (PBS ; pH 7,2, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,14 M NaCl), fragmenté à travers l'aiguille d'une seringue stérile et remis en suspension dans 40 ml d'eau déminéralisée stérile. 20 ml de la suspension mycélienne ont été ajoutés à 10 g de carboxyméthylcellulose humide (CMC, Merck). Cette pâte a ensuite été mélangée à 200 g de graines de betterave à sucre stérilisées en surface. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque traitement et pour chaque parcelle des expériences en plein champ.

Les graines de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* L.) ont été obtenues auprès de COSUMAR en octobre 2019, le principal producteur de sucre marocain ([www.cosumar.co.ma](http://www.cosumar.co.ma)). La stérilisation de la surface des graines a été réalisée en trempant les graines dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,4 % et de Tween 80 à 0,1 % pendant 5 min. Ensuite, les graines ont été rincées intensivement avec de l'eau désionisée stérile et inoculées comme décrit précédemment. Chaque graine a été recouverte d'une fine couche de CMC humide, contenant 10<sup>6</sup> ufc de bactéries, comme déterminé par étalement sur la gélose Bennett.

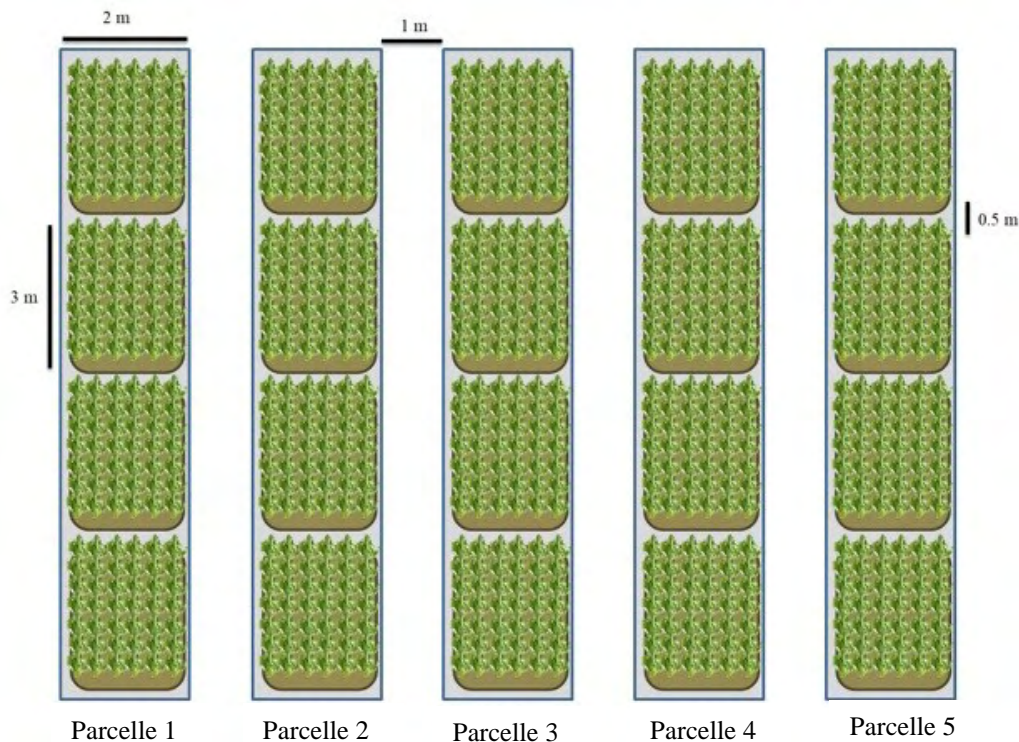
### 1.4. Essai en plein champ sur la betterave sucrière

Les essais au champ ont été menés dans une zone cultivée par la betterave à sucre (*Beta vulgaris* L.) pendant six mois consécutifs. Des engrais minéraux et des biofertilisants ont été appliqués dans différents traitements selon un plan en blocs complètement randomisés (RCBD) sur une parcelle de 2 m x 10 m avec quatre sous-parcelles de 6 m<sup>2</sup> (3m x 2m) dans chaque zone et un espacement de 0,5 m x 2 m avec quatre répétitions (Figure 32). Cette superficie mesurée contient 180 plantes dans chaque parcelle (Figure 32). Après le semis, les parcelles ont été irriguées immédiatement. En outre, toutes les autres pratiques telles que l'irrigation, la fertilisation et le contrôle des herbes ont été effectuées de la même manière que les agriculteurs de la région. Après

30 jours à partir du semis, les plantes ont été réduites à une plante par colline pour permettre à la racine de se développer et d'augmenter son diamètre.

Les cinq traitements utilisés dans cette étude sont indiqués dans la Figure 32.

Pour la fertilisation (NPK), l'azote a été appliqué sous forme d'urée (33% N) à raison de 300 kg N/ha, deux fois au stade de 6 feuilles (2 mois) et après 4 mois de semis. Le phosphore et le potassium ont été appliqués sous forme d'anhydride phosphorique (23%  $P_2O_5$ ) à raison de 250 kg/ha et sous forme de sulfate de potassium (50%  $K_2O$ ) à raison de 250 kg/ha respectivement, une fois au moment du semis.



**Figure 32.** Schéma de l'expérimentation au champ

Parcelle 1 : Sol amendé avec du NPK (azote, phosphore et potassium) comme témoin positif (NPK). Parcelle 2 : Sol sans NPK comme témoin négatif ( $N_0P_0K_0$ ). Parcelle 3 : Graines de betterave sucrière enrobées avec la souche SS dans un sol amendé avec du RP comme source de phosphore, de l'urée comme source d'azote et du sulfate de potassium comme source de potassium (SS). Parcelle 4 : Graines de betterave sucrière enrobées avec la souche SB dans un sol amendé avec du RP comme source de phosphore, de l'urée comme source d'azote et du sulfate de potassium comme source de potassium (SB). Parcelle 5 : Graines dans un sol amendé avec du RP comme

source de phosphore, de l'urée comme source d'azote et du sulfate de potassium comme source de potassium (RP).

### **1.5. Échantillonnage des plantes et analyse des paramètres agronomiques**

Les paramètres agronomiques tels que la hauteur de la plante (cm) (de la base de la plante au sommet de la feuille la plus développée) et la longueur des racines (cm), la matière sèche, la teneur en chlorophylle et la teneur en eau relative (RWC) ont été mesurés en récoltant quatre plantes par parcelle à 30, 60, 90, 120, 150 et 180 jours après le semis. La surface foliaire a également été déterminée après 1, 3 et 6 mois de culture. Après la récolte, les plantes de la betterave sucrière ont été séchées à l'étuve à 70 °C pour obtenir un poids constant ; puis broyées et tamisées.

À maturité (180 jours), les plantes d'une surface de 1 m x 1 m ont été récoltées dans chaque sous-parcelle pour mesurer les paramètres suivants : rendement des racines (tonne/ha), rendement des tiges (tonne/ha), teneur en saccharose (%) par réfractomètre (Atago Co, Japon) et le diamètre des racines. Ensuite, le matériel végétal (une plante/sous-parcelle) a été séché pour déterminer l'accumulation d'azote total (N), de phosphore (P) et de potassium (K) dans les racines et les tiges. Des échantillons de sol de chaque sous-parcelle ont été collectés et analysés pour la détermination de N, P et K. L'azote total a été analysé en utilisant la méthode de Kjeldahl, le P disponible selon la norme NF ISO 11263 et le K disponible selon la norme NFX 31-108. L'estimation de P et K totaux a été mesurée en utilisant ICP-OES (Agilent 5110 ICP-OES, USA).

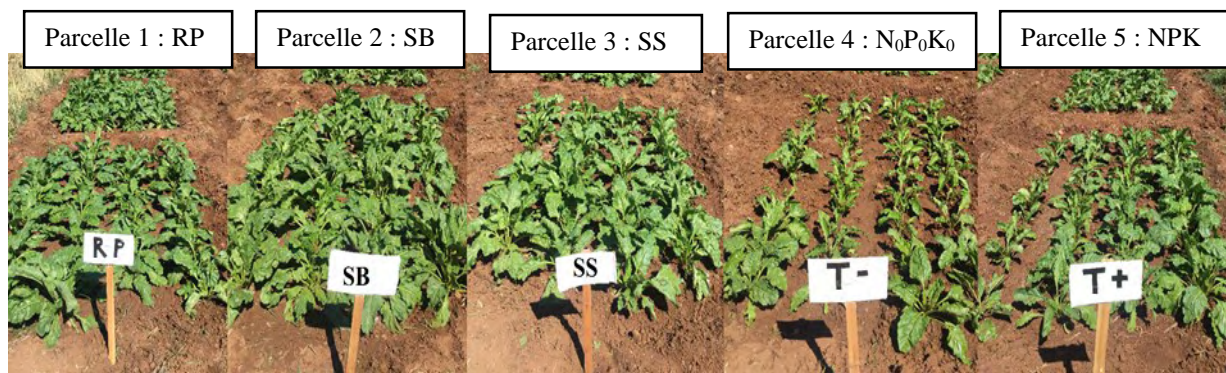
### **1.6. Analyses statistiques**

La longueur et le poids sec des racines et des tiges ont été soumis à une analyse de variance à deux voies (ANOVA) pour déterminer l'effet des traitements et du temps de culture. Une analyse unidirectionnelle a été effectuée pour comparer l'effet des différents traitements sur la teneur en saccharose, la teneur en chlorophylle, la teneur relative en eau, le rendement des tiges, le rendement des racines et la concentration des éléments N, P, K dans le sol, les racines et les tiges. Les différences entre les traitements et les moyennes des facteurs principaux ont été évaluées par le test de Duncan à un taux de 5%. Toutes les données ont été traitées en utilisant le logiciel SPSS 20.0 package pour Windows.

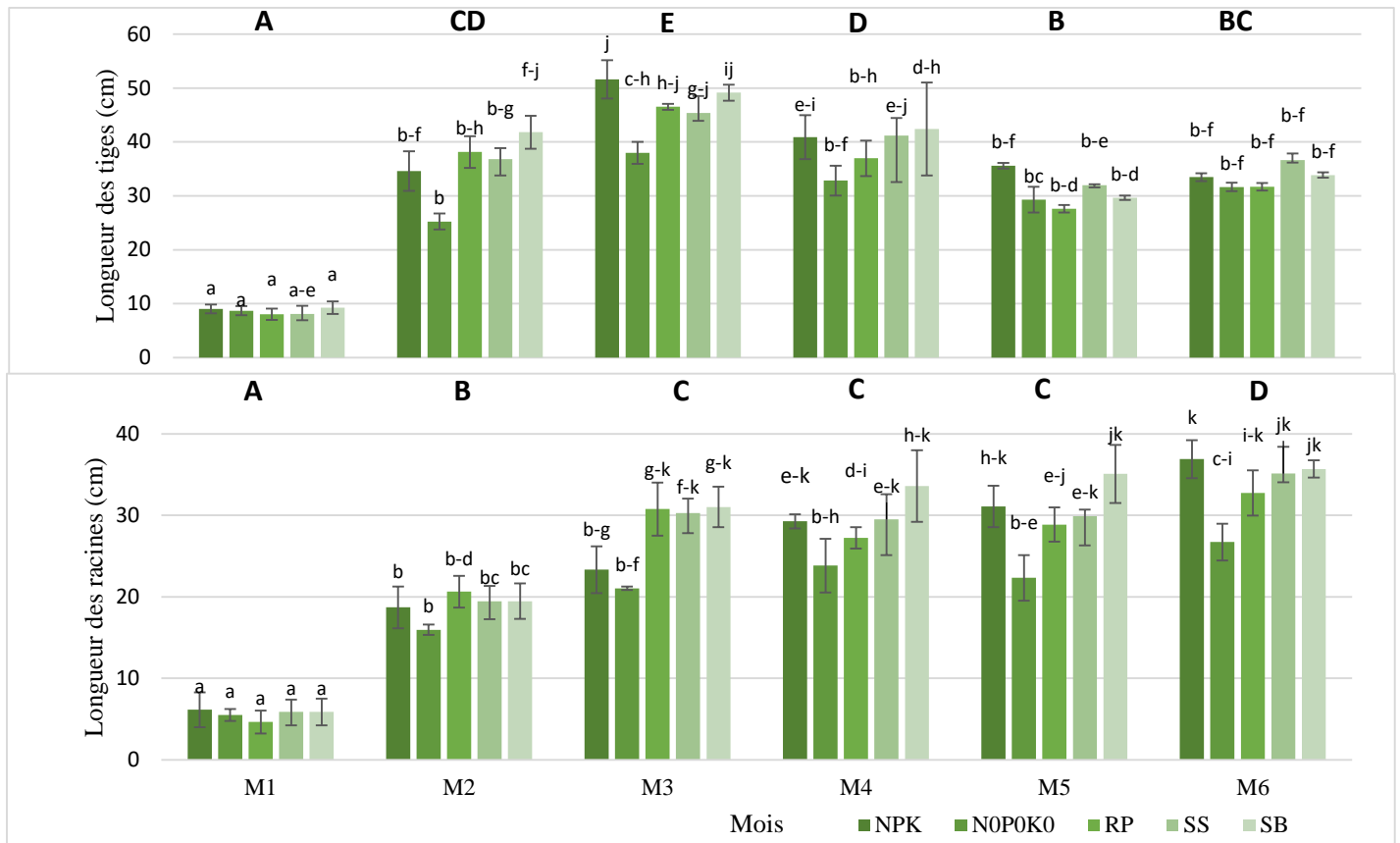
### III. Résultats

#### 3.1. L'effet de l'inoculation avec *Streptomyces bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS) sur la croissance de la betterave sucrière

La betterave sucrière a été cultivée pendant 6 mois dans des essais au champ sans l'ajout d'éléments nutritifs ( $N_0P_0K_0$ ), avec l'ajout d'éléments nutritifs recommandés (NPK), avec du phosphate naturel (RP) et en présence de SB ou SS. L'ANOVA à doubles voies a indiqué un effet significatif sur la longueur des racines et des tiges de la betterave sucrière selon le traitement et le temps, ainsi que leur interaction ( $p < 0,05$ ). En absence d'inoculation, les paramètres de croissance des plantes étaient à leur plus bas niveau sur le sol original non supplémenté ( $N_0P_0K_0$ ) qui a été considéré comme un traitement témoin négatif (Figure 35). La croissance des semis a augmenté avec le temps pour tous les traitements, la longueur maximale étant observée au cours du troisième mois (M3). En M3, l'application de RP et l'inoculation avec les souches SB ou SS ont augmenté la longueur des tiges par rapport au témoin négatif, soit 49,13 cm; 45,4 cm et 38,0 cm pour SB, SS et  $N_0P_0K_0$ , respectivement. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans la longueur des racines pour SB (35,7 cm) et SS (35,1 cm) par rapport au témoin négatif (26,7 cm) à la fin de l'expérience (6 mois). Aussi, il est intéressant de signaler qu'aucune différence significative n'a été observée dans les paramètres de croissance entre l'inoculation avec les souches SB ou SS et l'application des engrais chimiques NPK en comparaison avec le témoin négatif ( $N_0P_0K_0$ ) (Figure 33 et 34).



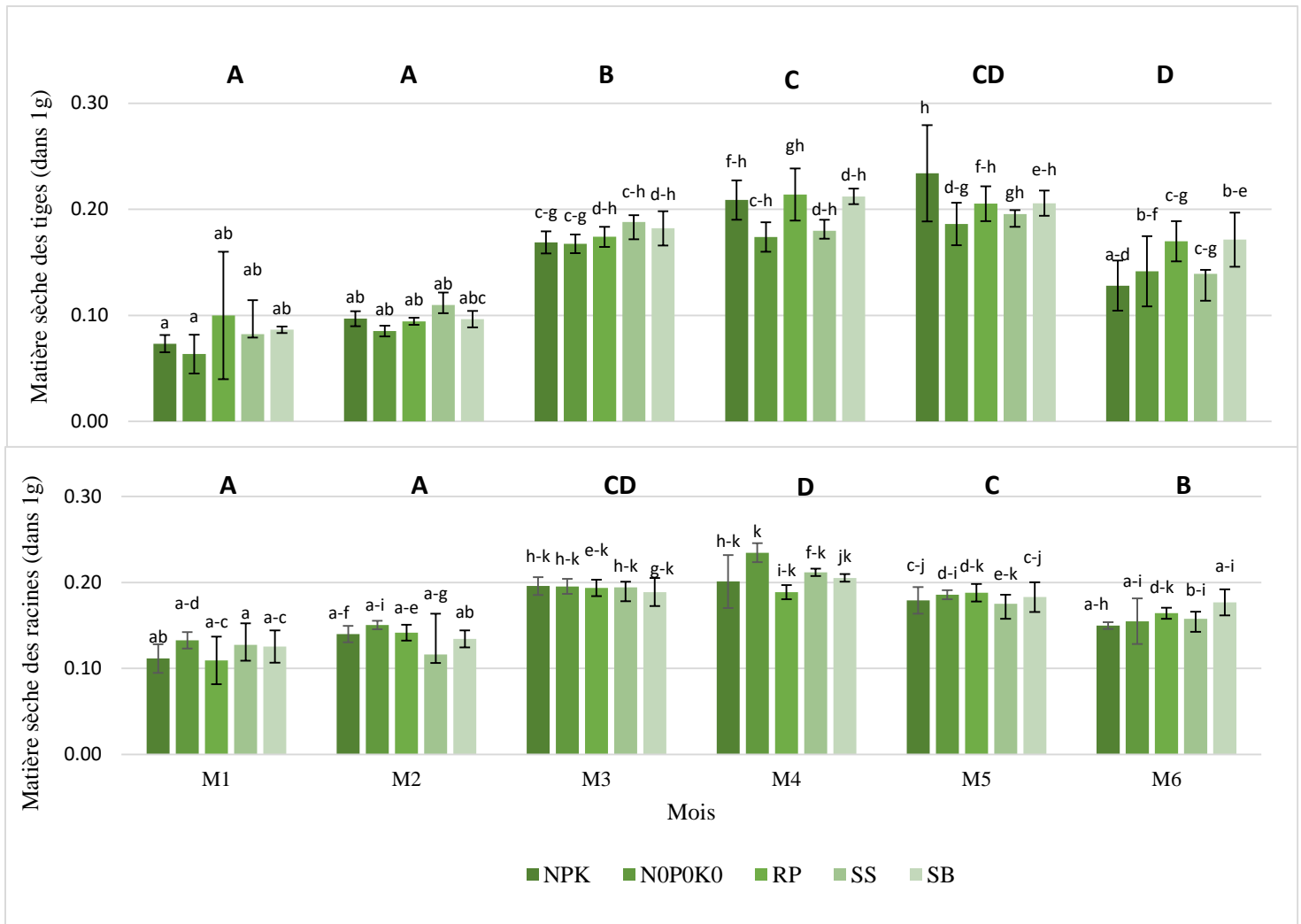
**Figure 33.** Les parcelles et l'état de développement des plantes de la betterave sucrière au cours de l'expérience en plein champ.



**Figure 34.** Suivi de la longueur des racines et des tiges (cm) de betteraves sucrières pendant 6 mois après l'inoculation par *Streptomyces bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif; NPK : témoin positif; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions et les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements et les majuscules indiquent des différences significatives entre les mois dans la limite de  $p \leq 0,05$ .

La figure 35 montre l'effet de la combinaison des souches SB ou SS avec RP sur la biomasse sèche des tiges et des racines de la betterave sucrière. Les résultats indiquent que le traitement affecte significativement le poids sec des tiges et que le temps affecte à la fois le poids sec des tiges et des racines. De plus, il n'y a pas d'effet significatif du traitement sur le poids sec des racines ( $p=0.150$ ). Aussi, l'interaction de RP et de la bactérie n'a pas d'effet significatif sur la biomasse sèche des tiges ( $p=0.203$ ) et des racines ( $p=0.385$ ). Il est à noter qu'un effet significatif de l'inoculation par la souche SB a été enregistré pour le paramètre de la biomasse sèche qui était plus élevé pour les tiges (30,7%) et les racines (20%) que l'application du témoin positif NPK (Figure 35).



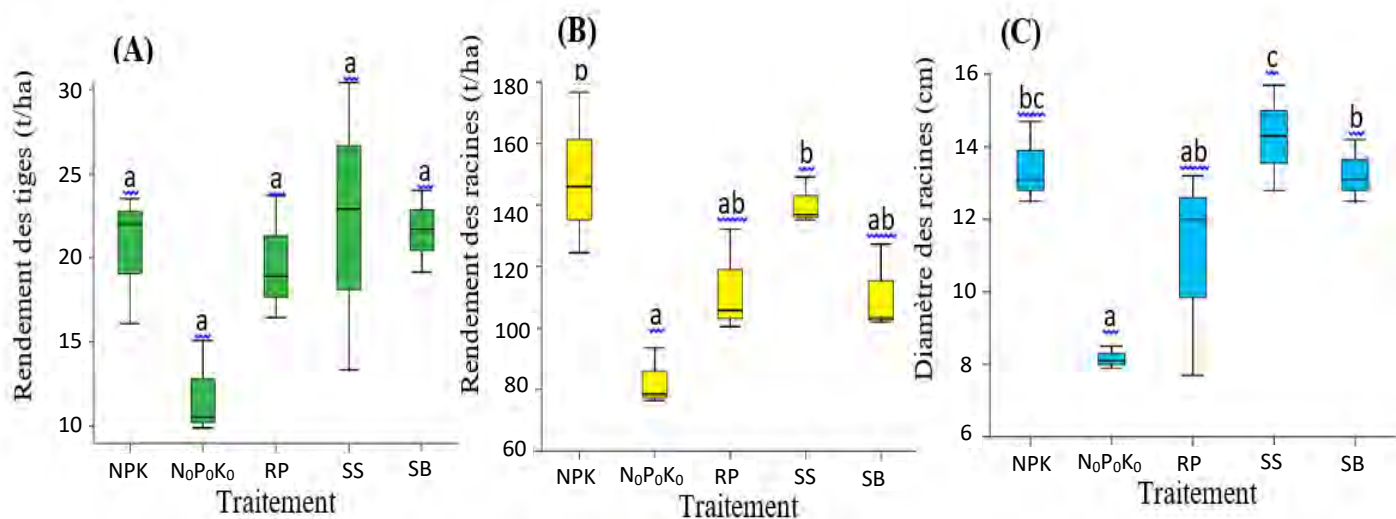


**Figure 35.** Suivi de la matière sèche des racines et des tiges de betteraves sucrières pendant 6 mois après inoculation de *Streptomyces bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif ; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les valeurs sont la moyenne de quatre répétitions et les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements à l'intérieur de  $p \leq 0,05$ .

### 3.2. 3.2. Effet de l'inoculation des *Streptomyces* spp. sur le rendement de la betterave à sucre

La combinaison de l'inoculum SB ou SS avec RP n'a pas eu d'effet significatif sur le rendement en tige ( $p=0,13$ ) avec les valeurs de SS (22,21 t/ha) et SB (21,61 t/ha) par rapport à NPK (20,53 t/ha) ou N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> (11,85 t/ha) (Figure 36A). Cependant, un effet significatif a été enregistré dans le rendement en racines ( $p=0,004$ ) (Figure 36B). Le rendement en racines de la betterave sucrière dans le traitement témoin négatif (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>) était inférieur à celui des autres

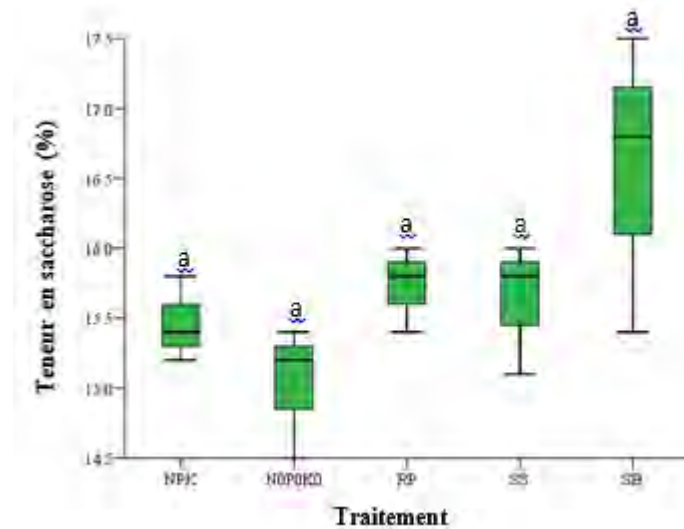
traitements. Il est intéressant de noter que l'inoculation avec la souche SS combinée avec RP (140,41 t/ha) a eu un rendement en racines significatif et comparable à celui de l'application d'engrais NPK (témoin positif) après 180 jours de culture de betterave sucrière au champ (Figure 36B). Le traitement NPK a présenté le rendement en racines le plus élevé par rapport à tous les traitements (149,02 t/ha). Cependant, le rendement moyen des racines dans le cas des plantes non fertilisées était le plus faible avec une moyenne de 82,81 t/ha. Le diamètre des racines des plantes de betterave sucrière a augmenté de manière significative ( $p=0,005$ ) par rapport au témoin (Figure 36C). L'inoculation avec SS a augmenté de manière significative le diamètre des racines (14,27 cm) par rapport au traitement NPK (13,4 cm) à la fin de l'expérience (Figure 39C). Les plantes de betterave à sucre inoculées avec *S. bellus* + RP (13,27 cm) ont montré des différences significatives par rapport au témoin négatif ( $N_0P_0K_0$ ) (8,17 cm).



**Figure 36.** Paramètres de croissance des plantes de betterave à sucre. (A) Rendement en tiges, (B) Rendement en racines et (C) Diamètre des racines des plants de betteraves sucrières sans inoculation bactérienne ou avec *S. bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS), et en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P.  $N_0P_0K_0$  marque le témoin négatif. Les boxplots représentent quatre répétitions après 6 mois de culture. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements dans la limite de  $p \leq 0,05$ .

### 3.3. Effet des *Streptomyces* spp. sur la teneur en saccharose

L'application de l'inoculant Actinomycetal n'a pas montré d'effet significatif ( $p=0.096$ ) sur la teneur en saccharose des plantes de betterave à sucre par rapport aux plantes non inoculées après 180 jours de croissance (Figure 37). La plus faible concentration de saccharose a été trouvée dans le traitement  $N_0P_0K_0$  (15,03 %). La teneur en saccharose dans les traitements où la souche SS était combinée ou non avec la RP était comparable et représente, respectivement, 15,63 % et 15,73 % (Figure 37). Les valeurs les plus basses ont été observées en présence de RP, SS+RP et NPK. En revanche, le traitement SB+RP a montré la valeur la plus élevée de saccharose (16,57 %) (Figure 37).



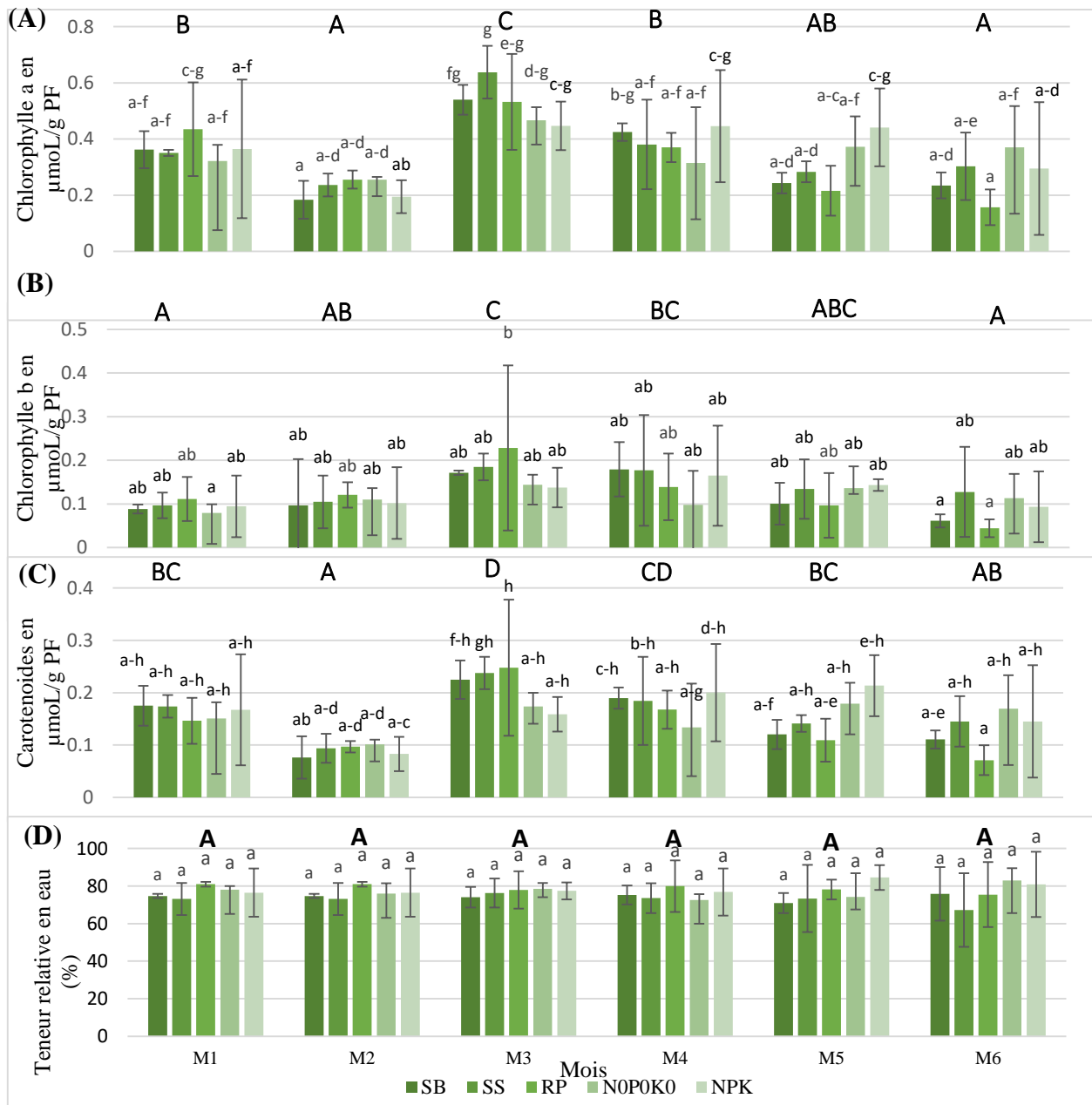
**Figure 37.** Teneur en saccharose des betteraves sucrières après inoculation par *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P.  $N_0P_0K_0$  : témoin négatif ; NPK : témoin positif ; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les boxplots représentent quatre répétitions après 6 mois de culture. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements dans la limite de  $p \leq 0,05$ .

### 3.4. Effet des *Streptomyces* spp. sur la teneur en pigments, la teneur relative en eau et la surface des feuilles

L'influence de la bactérie sur les teneurs en chl a, chl b et caroténoïdes est présentée dans la figure 38. Pour ces trois biomarqueurs, des différences significatives ont été observées pour la chl a ( $p=0.000$ ) et les caroténoïdes ( $p=0.005$ ) alors qu'aucune signification n'a été observée pour

la chl b ( $p=0.569$ ). L'effet de la bactérie est très variable selon les mois et les traitements. Dans tous les traitements, les valeurs les plus élevées des contenus en chl a, chl b et caroténoïdes ont été enregistrées au cours du troisième mois. De plus, les plantes dans les traitements SS ou SB ont montré des valeurs élevées de tous les biomarqueurs par rapport au témoin.

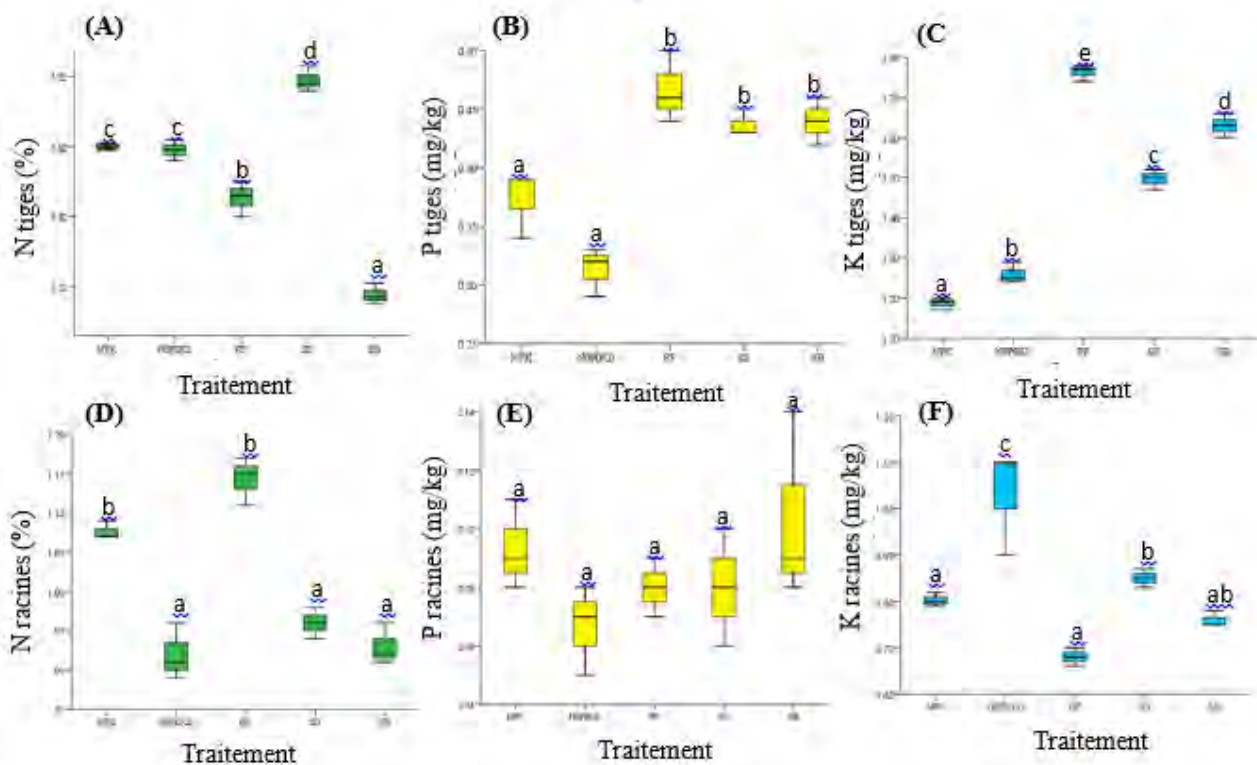
Les résultats obtenus pour la teneur relative en eau (RWC) étaient similaires dans tous les traitements sans qu'aucun effet significatif ne soit observé (Figure 38D). Par conséquent, ce paramètre n'a pas été affecté par le temps ou les traitements.



**Figure 38.** Effets de l'inoculation de *Streptomyces* sur les valeurs moyennes de (A): teneur en chlorophylle a, (B): teneur en chlorophylle b, (C): teneur en caroténoïdes et (D): contenu relatif en eau. (NPK) représente le témoin positif avec l'engrais minéral recommandé, (RP): traitement avec le phosphate naturel seul, et (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>) représente le témoin négatif sans fertilisation et sans inoculation bactérienne. Des plantes de betterave à sucre avec inoculation bactérienne avec *Streptomyces bellus* (SB) ou *S. saprophyticus* (SS) et le RP comme seule source de P. Les valeurs sont la moyenne de quatre répétitions et les barres d'erreur représentent l'écart type. Les lettres différentes au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements et les lettres majuscules indiquent des différences significatives entre les mois dans la limite de  $p \leq 0,05$ .

### 3.5. Effet de l'inoculation des souches sur les teneurs en N, P et K dans la betterave à sucre

Les concentrations de P et de K dans les tiges de la betterave à sucre ont augmenté de manière significative après la combinaison de l'inoculum SS ou SB avec le RP (Figure 39 B, C). En revanche, la teneur en N des tiges, à l'exception du traitement SS, a significativement diminué dans le traitement (RP + SB) par rapport aux plantes non fertilisées et non inoculées (N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>) (Figure 39 A). La teneur en N était plus élevée dans le traitement SS que dans les traitements N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> et (RP + SB), soit 5,79 mg/kg, 5,59 mg/kg et 5,17 mg/kg, respectivement (Figure 39A). Par rapport au traitement N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> (P<sub>tiges</sub>= 0,31 mg/kg, K<sub>tiges</sub>= 1,26 mg/kg), la teneur en P et K était légèrement plus élevée dans le traitement SB (P<sub>SB-tiges</sub>= 0,44 mg/kg, K<sub>SB-tiges</sub>= 1,63 mg/kg) que dans le traitement SS (P<sub>SS-tiges</sub>=0,43 mg/kg, K<sub>SS-tiges</sub>= 1,49 mg/kg) (Figure 39B, C). Pour les teneurs en N, P et K dans les racines, aucune signification n'a été observée pour la teneur en P (p<0,005) (Figure 39 E). En revanche, les teneurs en N et K étaient significativement différentes (Figure 39 D, F). On a remarqué un effet significatif de la souche SS sur la teneur en K par rapport aux traitements non fertilisés et non inoculés.



**Figure 39.** Estimation de N, P et K dans les racines et les tiges de betterave à sucre après inoculation de *S. bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) en présence de phosphate naturel (RP) comme seule source de P. N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif ; RP : phosphate naturel sans inoculation. Les boxplots représentent quatre répétitions après 6 mois de culture. Les différentes lettres minuscules au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements dans la limite de  $p \leq 0,05$ .

### 3.6. Effet des *Streptomyces* spp. sur les teneurs en N, P et K dans le sol

Les betteraves à sucre traitées avec SB et SS ont présenté des teneurs plus élevées en P et K solubles dans le sol (Tableau 21). La combinaison de *S. bellus*, *S. saprophyticus* et RP a remarquablement augmenté la concentration totale de P disponible (SB : 89.33 mg/kg, SS : 79.17 mg/kg) et de K (SB : 586.33 mg/kg, SS : 391.00 mg/kg) dans le sol par rapport au témoin négatif N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> (P : 55 mg/kg, K : 295.67 mg/kg). De même, l'inoculation du sol avec SB et SS augmente la concentration d'azote total dans le sol (SB : 0,15 %, SS : 0,11 %) par rapport au témoin N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> (0,06 %) (Tableau 21). En revanche, le traitement NPK a augmenté la teneur totale en P du sol qui était de 5777,3 mg/kg par rapport au contrôle N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> (5068,67 mg/kg). En général, il est à noter que l'inoculation avec SB a augmenté les concentrations de N, P, K dans le sol par rapport au traitement SS après 180 jours de croissance des plantes (Tableau 21).

**Tableau 21.** Estimation des concentrations de N, P et K dans le sol après 180 jours de croissance de la betterave sucrière en conditions du champ. RP : graines de betterave sucrière inoculées par le phosphate naturel comme seule source de P ; SB : graines de betterave sucrière inoculées par *S. bellus* (SB) avec RP ; SS : graines de betterave sucrière inoculées avec *S. saprophyticus* (SS); N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub> : témoin négatif ; NPK : témoin positif avec la fertilisation recommandée. Les valeurs sont la moyenne de trois échantillons ± SD.

	Total			Disponible	
	N	P	K	P	K
	%	mg/kg			
<b>SB</b>	0.15 ± 0.020	4832.67 ± 2.517	5774.67 ± 2.89	89.33 ± 3.05	586.33 ± 2.08
<b>SS</b>	0.11 ± 0.021	4861.33 ± 1.528	5075.67 ± 4.62	79.17 ± 0.76	391.00 ± 2.65
<b>RP</b>	0.14 ± 0.010	4646.33 ± 0.577	5960.00 ± 5.00	61.33 ± 1.16	384.67 ± 1.53
<b>N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub></b>	0.06 ± 0.015	5068.67 ± 3.215	5544.00 ± 4.58	55.00 ± 2.65	295.67 ± 1.53
<b>NPK</b>	0.15 ± 0.020	5777.33 ± 7.506	5721.67 ± 2.08	74.67 ± 2.08	358.33 ± 2.52

## IV. Discussion

Deux *Streptomyces* spp. endémiques solubilisant le phosphate naturel, précédemment isolées des sols rhizosphériques de la betterave sucrière de la région de Béni Mellal au Maroc, ont été sélectionnées pour leurs capacités à solubiliser le P et leurs multiples activités PGP favorisant la croissance des plantes (Aallam et al. 2021a, b). Les résultats de cette étude démontrent que les deux *Streptomyces bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) sélectionnées favorisent la croissance, améliorent les paramètres morphologiques de la betterave à sucre et les concentrations de P, K et

N totaux et disponibles dans le sol. Cela confirme les résultats suggérant que les Actinomycètes associés aux plantes fournissent de multiples traits PGP bénéfiques aux plantes (Goudjal et al. 2013; Nafis et al. 2019; Olanrewaju and Babalola 2019; Worsley et al. 2020). De manière significative, la souche *S. bellus* était classée meilleure que *S. saprophyticus* dans les conditions de champ. Cela peut être dû à sa grande capacité à solubiliser la RP et à produire de l'acide indole acétique (AIA) par rapport à *S. saprophyticus* (Aallam et al. 2021a, b).

L'inoculation des graines de betteraves sucrières avec SB combinée avec RP a stimulé de manière significative la longueur des tiges et des racines, la production de matière sèche des tiges et des racines et les teneurs en N, P, K dans les plantes et dans le sol par rapport au traitement RP seul. Ce qui confirme que la mobilisation du P par ces souches est le principal moyen de promouvoir la croissance des plantes de betterave sucrière en conditions de champ. De même, l'inoculation des graines de maïs et de blé avec *Pantoea cypripedii* et *Pseudomonas plecoglossicida* (Kaur and Reddy 2015) ou des graines de tomates avec *Paenibacillus polymyxa* et *Bacillus megaterium* (Elyazied and Abou-aly 2011) en présence de RP a favorisé la croissance des racines et des tiges lors des expériences en champ. De nombreux travaux ont rapporté que les micro-organismes favorisent la croissance des plantes lorsque le RP est ajouté au sol, comme les plants de chili inoculés avec *Pseudomonas aeruginosa* (Jayakumar et al. 2019) et le blé inoculé avec *Enterobacter aerogenes* ou *Bacillus megaterium* et *B. safensis* (Mukhtar et al. 2017).

En outre, la combinaison des souches SB ou SS avec RP améliore la teneur en sucre des plants de betterave à sucre. De même, on a rapporté que *Bacillus megatherium* améliore la teneur en sucre des plants de canne à sucre dans des conditions de champ (Sundara et al. 2002). Les chlorophylles ont également été améliorées en présence de souches de *Streptomyces*. Ainsi, d'autres études ont mentionnées que des souches de *Gluconacetobacter* et d'*Azospirillum* spp. augmentent également de manière significative les teneurs en chlorophylles des plants de canne à sucre (Chauhan et al. 2013). Parallèlement, l'application de nos souches de *Streptomyces* augmente la matière sèche de la betterave sucrière, de même que la souche *Klebsiella variicola* augmente significativement la matière sèche du chou-fleur après application de RP comme source de P insoluble dans des conditions de champ (Nacoon et al. 2021). La longueur des racines et des tiges est également affectée positivement par l'application de RP + SB ou SS, ce qui est en accord avec les résultats de Mohamed et El Sebai (2019) utilisant *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp. et *Acinetobacter* sp.



Nous avons également révélé une augmentation significative des teneurs en N, P et K dans les plantes traitées avec SB ou SS. Ceci est similaire à d'autres études montrant que *Pseudomonas fluorescens* et *P. chlororaphis*, augmentent la teneur en P et K dans les plantes de betterave à sucre (Sacristán-pérez-minayo et al. 2020). En outre, la teneur en P disponible dans le sol a été augmentée en présence de SB ou SS avec RP, ce qui confirme l'efficacité et la capacité solubilisatrice du RP de nos *Streptomyces* sélectionnés qui ont été utilisés dans les essais au champ. De même, l'azote total dans le sol a été augmenté par l'inoculation de SB. Cet élément stimule la croissance rapide des plantes de betterave à sucre, l'absorption et l'utilisation du phosphore et du potassium (Leilah and Khan 2021). Ces éléments sont très importants pour la croissance de la betterave à sucre, en particulier le P qui joue un rôle crucial dans la physiologie de la plante, le transfert d'énergie et la constitution des acides nucléiques et des membranes (Hadir et al. 2021). De même, l'inoculation de *Pseudomonas* spp. avec RP a augmenté la teneur en P et N dans les tiges et les racines des plantes de blé, ce qui suggère que l'assimilation de l'azote peut être stimulée par la mobilisation de P (Elhaissofi et al. 2020), ce qui explique l'augmentation du pourcentage de N dans les tiges et le sol des plantes traitées par rapport aux plantes non fertilisées et non inoculées.

Selon Sahin et al. (2004), l'inoculation d'une seule souche de *Bacillus* avec des bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> a augmenté le rendement des racines de la betterave à sucre, et la double inoculation avec une bactérie solubilisatrice de P a donné des augmentations plus importantes. De même, Çakmakçi et al. (2006) rapportent que l'inoculation de la betterave à sucre par *Bacillus megaterium* a augmenté le rendement des feuilles, des racines et du sucre dans des conditions de serre et de champ. Un certain nombre d'espèces de *Streptomyces* ont été impliquées dans la solubilisation du P en convertissant le phosphate insoluble en formes disponibles et en favorisant la croissance de plusieurs cultures comme le blé, le maïs et le riz (Hamdali et al. 2008b; Tamreihao et al. 2019; Boubekri et al. 2021; Soumare et al. 2021). À notre connaissance, aucune étude similaire n'a utilisé des souches de *Streptomyces* combinées au phosphate naturel comme biofertilisant de la betterave à sucre dans des conditions de champ.

De plus, nos deux souches *Streptomyces bellus* et *S. saprophyticus* ont la capacité de libérer le K disponible à partir de sources minérales (Aallam et al. 2021b) ce qui explique leurs capacités à augmenter le rendement de la betterave à sucre. D'autant plus que le K est connu par sa capacité

à améliorer le rendement, la longueur, le diamètre, le poids des racines fraîches et la qualité de la betterave à sucre (Abdel-Motagally and Attia 2009; Hanafy et al. 2019).

Plusieurs études rapportent les activités antimicrobiennes de *Streptomyces* contre les phytopathogènes (Hamdali et al. 2008b, 2021; Evangelista-Martínez 2014; Aallam et al. 2021b). Il était donc plausible que la capacité des souches SB et SS appliquées à contrôler *Fusarium* spp., agents causaux de la maladie de la pourriture racinaire chez les plantes de betterave sucrière (Aallam et al. 2021b), supporte leurs capacités d'améliorer la croissance de la betterave à sucre.

Par conséquent, nous suggérons que nos deux souches de *Streptomyces*, en particulier *Streptomyces bellus* (SB), peuvent constituer un nouvel outil de fertilisation utile pour solubiliser le phosphate dans le sol et stimuler la croissance de la betterave à sucre. Une telle souche pourrait être utilisée comme bio-fertilisant écologique et durable pour l'agriculture de la betterave à sucre.

## SYNTHÈSE ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Avec 8.1 millions hectares des terres agricoles arables, le secteur agricole au Maroc représente l'un des piliers de l'économie nationale avec une contribution de 13% au PIB (Produit intérieur brut) (Harbouze et al. 2019). Le Maroc assure son autosuffisance de plusieurs produits agricoles tels que la viande, les fruits et les légumes. De plus, il possède 75% des réserves mondiales de phosphate naturel (PN) (De Boer et al. 2019). Ce PN représente une forme insoluble du phosphore et non disponible à la nutrition des plantes. C'est pourquoi ce PN est exploité par des voies chimiques pour produire des engrais solubles afin de les utiliser en agriculture dans l'objectif de maintenir une production agricole optimale et d'assurer une autosuffisance alimentaire. En revanche, lorsque ces engrais chimiques et les pesticides sont utilisés dans les terres agricoles, ils sont transmis directement ou indirectement dans les végétaux ce qui affectent la santé humaine (Sharma and Singhvi 2017). Notamment, juste 30 à 50% des engrais chimiques sont absorbés par les cultures, ainsi qu'une grande quantité des composants appliqués est perdue dans le sol où elle entrave la qualité des eaux souterraines (Wang et al. 2018). Il est donc nécessaire de développer et d'étudier d'autres alternatives de fertilisation phosphatée et aussi potassique pour augmenter la production agricole d'une façon saine et plus écologique. En effet, l'utilisation des microorganismes du sol peut être une solution alternative complémentaire et écologique des engrais chimiques et des pesticides. Hu et al. (2006) rapportent que les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans le cycle de P et de K naturels. Il existe des populations considérables de bactéries solubilisatrices de P et/ou K dans le sol et dans les rhizosphères des plantes telles que *Acidithiobacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, et *Bacillus* (Sharma et al. 2016; Kalayu 2019). L'inoculation des sols et des graines par des microorganismes ayant à la fois une capacité de solubilisation de P et de K va réduire l'utilisation excessive des engrais chimiques et améliorer l'absorption du P et du K par les plantes. Certains microorganismes ont aussi une capacité de biocontrôle de plusieurs phytopathogènes donc leurs utilisations peuvent être une alternative complémentaire et réduite à l'excès d'utilisation des pesticides dans l'agriculture.

Par conséquent, cette recherche s'installe dans le cadre d'isoler et de caractériser des Actinomycètes solubilisatrices de phosphate et de potassium naturels. Cette étude nous a permis de sélectionner des *Streptomyces* solubilisatrices de P et de K naturels et de dévoiler leurs capacités à promouvoir la croissance de notre plante modèle la betterave sucrière (*Beta vulgaris*

L.) dans des conditions de déficience en P et K assimilables en conditions de laboratoire et aussi en plein champ. Ces Actinomycètes ont montré aussi une activité de biocontrôle contre *Fusarium* spp. agents causaux de la pourriture racinaire chez la betterave à sucre. Cette étude constitue un plus à la recherche scientifique relative aux études d'impact de bioinoculants des microorganismes comme des biofertilisants. Suite aux questions et aux expériences scientifiques présentées et développées dans cette thèse, les résultats obtenus lors de ce présent travail ont permis :

i) L'isolement et la caractérisation des Actinomycètes solubilisatrices du phosphate et du potassium naturels présentant des aptitudes multiples de promotion de la croissance et de protection de la betterave sucrière (Chapitre II).

ii) Caractérisation du sol et évaluation de la contamination des sols des sites d'étude en oligo-éléments toxiques des champs de la betterave sucrière (Chapitre III).

iii) Mettre en évidence l'efficacité agronomique des souches d'Actinomycètes sélectionnées solubilisatrices de phosphate et de potassium naturels et la protection contre la pourriture des racines de la betterave sucrière (*beta vulgaris* L.) (Chapitre IV).

**i) Isolement et caractérisation des Actinomycètes solubilisatrices du phosphate et du potassium naturels présentant des aptitudes multiples de promotion de la croissance et de protection de la betterave sucrière.**

La première partie de cette étude a été dédiée à l'isolement et la caractérisation des Actinomycètes solubilisatrices du phosphate et du potassium naturel présentant des aptitudes multiples de promotion de la croissance et de protection de la betterave sucrière. Cependant, à partir, de trois différents sites d'étude, des échantillons de sol rhizosphérique de la betterave sucrière, 164 isolats d'Actinomycètes ont été isolés et purifiés. Après, nous avons testé leur capacité de croître sur un milieu minimum synthétique (MMS) contenant le PN insoluble sous forme de roche phosphatée (RP) comme seule source de phosphate (P). Parmi les 164 isolats d'Actinomycètes retenus, 57 avaient la capacité de croître sur MMS + RP comme seule source de P. Parmi ces 57 isolats, seuls 27 isolats (47,36 %) avaient également la capacité de croître sur MMS + TCP comme unique source de P. Dix des vingt-sept isolats, montrant le rendement de biomasse le plus élevé sur MMS + RP et avec des caractéristiques morphologiques différentes, ont été sélectionnés pour des études ultérieures. Sept de ces dix isolats d'Actinomycètes provenaient du site 1, un du site 2 et deux du site 3. La capacité de ces 10 souches à solubiliser le PN a ensuite

été suivie par des dosages de P soluble dans le milieu MMS liquide. La souche DE2 libère une concentration maximale de phosphate soluble (180 µg/ml) du TCP, tandis que la souche BYC libère une quantité maximale de phosphate soluble du RP (148,05 µg/ml). Par la suite l'analyse des caractères morphologiques, biochimiques, culturels et moléculaires des 10 souches sélectionnées, a montré que les 10 appartiennent au genre *Streptomyces*. Cette capacité solubilisatrice de phosphate par les *Streptomyces* a été rapporté par pas mal d'études (Ben Farhat et al. 2015; Chouyia et al. 2020; Dutta and Thakur 2020). Les taux de P libéré par les souches sélectionnées étaient comparables à celui de *Streptomyces roseocinereus* MS1B15, de *S. natalensis* MS1B13 et de *Pseudomonas donghuensis* (Chen et al. 2021; Chouyia et al. 2020) mais beaucoup plus élevés que ceux trouvés par *Streptomyces griseus* et *Micromonospora aurantiaca* (Hamdali et al. 2008a). L'utilisation de ces microorganismes comme biofertilisants de phosphate représente une approche prometteuse pour améliorer la production alimentaire en augmentant le rendement agricole (Alori et al. 2017). Car une grande partie du phosphore provenant des engrais chimiques devient insoluble par sa conversion en sels de calcium ou de magnésium dans les sols et devient ainsi indisponible pour les plantes (Awais et al. 2017). Donc, l'exploitation de la capacité solubilisatrice des microorganismes représente une alternative durable et respectueuse à l'environnement.

La deuxième partie de ce travail a été consacré à l'évaluation de la capacité solubilisatrice de potassium minéral par les 10 souches de *Streptomyces*. Ces dernières ont montré aussi une capacité solubilisatrice d'orthoclase comme source naturelle de potassium et la quantité de K soluble libérée variait grandement d'une souche à l'autre et allait de 3,8 mg/ml à 216,6 mg/ml. Cette thématique de recherche des microorganismes solubilisateurs de K naturel (MSK) a attiré plus d'attention en raison de leur capacité à augmenter la croissance et le rendement des plantes (Sattar et al. 2018). Cependant, très peu d'études ont rapporté les capacités solubilisatrices des MSK (Ali et al. 2020; Boubekri et al. 2021; Meena et al. 2014; Saha et al. 2016; Sun et al. 2020). Afin de bien exploité les souches sélectionnées, il a été nécessaire d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes de solubilisation adoptés par ces *Streptomyces* et qui ont prouvé une grande capacité à solubiliser le phosphate et le potassium naturels. Selon la littérature, les Actinobactéries solubilisent le P par différents mécanismes tel que la libération des acides organiques (Jog et al. 2014), la chélation (par sécrétion des sidérophores) (Hamdali et al. 2008; Hamdali et al. 2021) et par la sécrétion des enzymes comme les phosphatases non spécifiques, C-

P lyase et les phytases (Yadav et al. 2018). De même, des chercheurs ont suggéré que la solubilisation de potassium pourrait être par excrétion de protons, H<sup>+</sup> ou CO<sub>2</sub> et des acides organiques soit par excrétion de substances chélateurs (comme les sidérophores) qui forment des complexes stables avec des éléments adsorbants de potassium (aluminium, fer et calcium) (Bashir et al. 2019; Dominguez-Nunez et al. 2016; Etesami et al. 2017; Prasad et al. 2019). Dans le cas de cette étude, le test CAS-agar a indiqué que les dix souches d'Actinomycètes solubilisatrices de P et de K produisaient des sidérophores qui pourront être impliquées dans le processus de solubilisation (Hamdali et al. 2010; 2021). Alors que la solubilisation de P, par certaines souches, et la libération de K par les dix souches sélectionnées s'accompagne par une chute du pH. Cela pourrait être dû à l'excrétion des acides organiques, ce qui entraîne une acidification du milieu et par conséquent une solubilisation de la roche phosphatée et d'orthoclase. A savoir que l'analyse HPLC a indiqué que certaines souches produisent les acides organiques tels que l'acide L-malique, l'acide citrique et l'acide succinique. Une étude plus approfondie est en cours afin de mieux caractériser et d'identifier les acides organiques produits par nos souches sélectionnées.

Ensuite, nous avons cherché à savoir si ces *Streptomyces* spp. représentent les activités multiples PGP en testant leurs capacités à produire l'acide indole acétique (AIA) et leurs aptitudes inhibitrices contre les bactéries Gram-négatives suivantes : *Escherichia coli* CCMM/B4 et *Pseudomonas aeruginosa* CCMM/B90, *Klebsiella pneumonia* E40, *Salmonelle* sp. CCMM/B17, les bactéries Gram-positives suivantes : *Bacillus subtilis* ATCC 9524, *Staphylococcus aureus* CCMM/B2, *Streptococcus* sp. CCMM/B24 et la levure *Candida albicans* CCMM/L11 (toutes les souches sont de la collection du laboratoire BVRP, USMS- Béni Mellal) et trois champignons isolés et identifiés du champ infecté de la rhizosphère de betterave sucrière (*Fusarium equiseti* MW824656, *Fusarium fujikuroi* MW824923 et *Fusarium fujikuroi* MW825349). De point de vue production d'AIA, toutes les souches ont montré une aptitude de sécrétion d'AIA avec des quantités significativement différentes et importantes, allant de 7,9 à 22,3 g/ml. Également, les dix *Streptomyces* spp. sélectionnées ont montré l'activité de biocontrôle contre les bactéries pathogènes et les champignons phytopathogènes avec des pourcentages d'inhibition (PI) qui allaient de 6,9% à 55,4%. Cependant, l'originalité des souches de *Streptomyces* que nous avons sélectionnées est d'avoir plusieurs aptitudes bénéfiques à la croissance (solubilisation de RP et de K minéral) et la santé des végétaux (production des sidérophores, des auxines, des acides organiques et capacité de biocontrôle) dans la même souche, ce qui leur permet d'être classés

comme des PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria). D'autres bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* (David et al. 2018), *Bacillus subtilis* (Lau et al. 2020), *Acromobacter insolitus* S3 (Oo et al. 2020), *Enterobacter hormaechei* LMG 27195 et *Pseudomonas grimontii* CFML97-514 (Chen et al. 2021) ont été classées PGPB du fait de leurs aptitudes à solubiliser le phosphate et le potassium naturels, à produire de l'AIA, d'ammoniac, des chitinases, des sidérophores et des substances antifongiques, qui toutes contribuent à l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes.

## **ii) Caractérisation du sol et évaluation de la contamination des sols des sites d'étude en oligo-éléments toxiques des champs de la betterave sucrière.**

Dans la troisième partie de ce travail, et avant d'entamer les essais agronomiques, nous avons caractérisé et évalué la contamination des sols des sites d'étude en oligo-éléments toxiques. Cette évaluation a été réalisée par le calcul des indices de pollution évalués tels que le facteur d'enrichissement (FE), le facteur de contamination (FC), l'indice de géoaccumulation (Igeo), l'indice de risque écologique (RI) (Afshar et al. 2019) et par comparaison avec les recommandations pour la qualité des sols et d'autres sols agricoles hors de la région de Béni Mellal-Khenifra. Cette région possède l'une des plaines agricoles les plus vastes au Maroc avec des terres arables cultivées généralement par des céréales, des olives, des agrumes et de la betterave sucrière. Cette dernière est la principale culture industrielle de la région de Béni Mellal-Khenifra, elle occupe une superficie de 15 000 hectare et contribue de 20,5% aux superficies nationales de la betterave (COSUMAR 2020; Redani 2015), ce qui représente environ 26% de la production nationale de sucre et joue un rôle essentiel dans le développement économique local (Jabir et al. 2021). Par conséquent, cette production et les longues périodes d'exploitations des terres par cette culture ont provoqué des impacts négatifs sur l'environnement. Il est connu que les pratiques agricoles et l'eau d'irrigation peuvent entraîner l'enrichissement des sols par des métaux lourds tels que Cd, Cr, Cu, Pb, Zn et Fe (Afshar et al. 2019; Alam et al. 2020; Barakat et al. 2019), alors que la betterave sucrière est sensible à des niveaux accrus de métaux lourds (Nada et al. 2007).

Cependant les résultats de notre étude indiquent que les sols testés sont considérés comme pollués par des métaux lourds et des métalloïdes. Notre comparaison avec les recommandations canadiennes pour la qualité des sols agricoles a révélé que certains éléments tels que As, B, Co, Ge, Nb et Mo dépassaient les niveaux standards indiquant une pollution considérable des sols de

betterave sucrière agricole de la région de Béni-Mellal. Alors que les valeurs élevées des résultats obtenus du facteur d'enrichissement (FE) de Mo, Ge, As et Co suggèrent que ces éléments ont été introduits au sol peut-être à cause des activités agricoles telles que l'utilisation excessive d'engrais chimiques, d'herbicides et d'insecticides. Selon les chercheurs qui rapportent que lorsque les valeurs de FE dépasse la valeur de 1, cela signifie que les métaux provenaient de sources anthropiques (Maanan et al. 2015; Sakan et al. 2009). De plus, l'indice Igeo qui évalue la contamination sols par les éléments traces (Keshavarzi and Kumar 2020) montre une variation des valeurs Igeo d'un site à l'autre et d'un métal à l'autre. Ceci est en accord avec d'autres études menées dans la même région (Barakat et al. 2019; El Hamzaoui et al. 2020; Oumenskou et al. 2018).

Dans l'ensemble, les concentrations d'As, B, Co, Ge, Nb et Mo dans la présente étude étaient plus élevées que les niveaux proposés par les recommandations canadiennes pour la qualité des sols agricoles et leurs niveaux dans la croûte continentale (CCME 2001; Rudnick and Gao 2003). Alors que les autres éléments traces tels que Ba, Cr, Ni, Sr, Cu et Zn ne présentaient pas de risque écologique puisque leurs concentrations étaient inférieures aux limites des normes. Donc, la recherche des méthodes durables de détoxification des sols agricoles représente une nécessité. Cependant, l'utilisation des Actinomycètes pourrait être une solution écologique et moins coûteuse afin de contribuer à résoudre ce problème de contamination des sols agricoles par les éléments traces. Plusieurs études ont rapporté l'effet bioremédiateur des Actinobactéries et leurs capacités de dépolluer les sol et l'environnement (Kannabiran 2017; Rathore et al. 2021).

Ainsi, les résultats de cette étude révèle que le site 3 (zone de Béni-Moussa) présentait les niveaux d'enrichissement les plus faibles, alors que le site 1 (zone de Béni Amir) a montré le plus haut niveau d'enrichissement. De ce fait, le sol du site 3 a fait l'objet des études ultérieures des essais agronomiques sous serre afin d'évaluer l'efficacité des souches d'Actinomycètes sélectionnées sur la croissance et la protection de la betterave sucrière.

### **iii) Efficacité agronomique des souches d'Actinomycètes sélectionnées solubilisatrices de phosphate et de potassium naturels et de protection contre la pourriture racinaire de la betterave sucrière (*beta vulgaris* L.).**

La quatrième partie de ce travail a été consacrée aux essais agronomiques sous serre et au champ. Deux souches *Streptomyces bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) ont été choisi en fonction



de leurs performances de point de vue solubilisation de P et de K naturels, production des phytohormones et activité antifongique contre les *Fusarium* spp., agents causaux de la pourriture racinaire de la betterave à sucre, en conditions *in vitro*, suivi pour deux mois de culture. Les résultats des essais agronomiques sous serre ont montré que l'inoculation des graines de la betterave sucrière par chacune des deux souches *Streptomyces bellus* et *S. saprophyticus* en combinaison avec la roche phosphate et l'orthoclase comme seules sources naturelles de P et de K, améliore la longueur des racines, la longueur des tiges, le nombre des feuilles et la biomasse sèche des racines et des tiges des plantes de la betterave à sucre par rapport aux traitements non inoculés et d'une façon comparable à l'addition d'engrais phosphaté et potassique soluble. De même, l'inoculation de graines de riz avec *Enterobacter ludwigii* GAK2 et l'inoculation de graines de maïs avec *Bacillus pumilus* HL3RS14 en présence de phosphate insoluble ont favorisé la croissance et le poids sec des racines et des tiges (Lee et al. 2019; Mukhtar et al. 2019). Ainsi, d'autres études ont signalé que des microorganismes ont l'aptitude de favoriser la croissance des plantes en combinaison avec le phosphate et le potassium naturels comme exemple de l'inoculation du blé par *Bacillus* sp. MWT-14 (Tahir et al. 2018), du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* (Meena et al. 2018) et du riz par la souche *Pseudomonas aeruginosa* (Khan et al. 2017).

De plus, les teneurs en P et K sont significativement élevées dans les plantes inoculées par *Streptomyces bellus* par rapport au témoin négatif. Li et al. (2017) rapportent que l'inoculation des graines de maïs par les deux souches *Paenibacillus* sp. B1 et *Pseudomonas* sp. SX1 améliore l'absorption de P et de N par les plantes. L'augmentation de la concentration de P et K dans les plantes supplémentées avec les souches de *Streptomyces* suggère qu'il existe une interaction positive entre la colonisation des racines, la concentration de P et de K et la promotion de la croissance de la betterave sucrière. Selon nos résultats obtenus non seulement les teneurs de P et K des plantes qui ont été augmenté mais encore la teneur en N total, P et K assimilable du sol qui ont été significativement affectée par l'inoculation de *S. bellus* ou *S. saprophyticus* des graines de la betterave sucrière supplémentées en RP et/ou OT. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Han and Lee (2006) qui ont constaté que les deux souches *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* et *Bacillus mucilaginosus* avaient la capacité d'augmenter la concentration de P et de K assimilables dans le sol. Alors, les *Streptomyces* solubilisatrices de P et de K minérales peuvent résoudre le paradoxe dans lequel le sol est à la fois pauvre en P et K disponible et riche en P et K total (Bakhshandeh et al. 2017; Meena et al. 2015; Sattar et al. 2018). Pour la teneur en pigment tels

que les chlorophylles a , b et les caroténoïdes, l'application des deux Actinomycètes affecte significativement leurs teneurs dans les feuilles des plantes par rapport aux témoins non inoculés.

Dans les mêmes conditions contrôlées (sous serre), nous avons étudié l'activité de biocontrôle de deux espèces de *Fusarium* spp., agents causaux de la pourriture racinaire de la betterave sucrière dans la région de Béni Mellal (Maroc), par les deux souches *S. bellus* et *S. saprophyticus* avec un suivi en cinq semaines de culture. Les deux souches ont un effet protecteur efficace contre la pourriture des racines. Ainsi, la souche SS a montré une meilleure protection avec un taux d'infection qui ne dépasse pas 6% alors que le taux d'infection chez les plantes non-inoculées atteint 93%. Ces résultats s'accordent avec ceux d'autres études qui ont démontré le rôle important des Actinomycètes dans le biocontrôle des phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Goudjal et al. 2016), *Fusarium graminearum* (Han et al. 2018) et *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Saikia and Bora 2021).

Dans la dernière partie de cette étude, et en se basant sur les différents résultats recueillis, il paraît que dans les conditions contrôlés (sous serre), l'inoculation avec les deux souches *S. bellus* et *S. saprophyticus* stimulent de manière significative la croissance et la nutrition minérale des plantes de la betterave sucrière. Par conséquent, il est intéressant d'évaluer leurs effets sur le champ où il y a une multitude de contraintes d'ordre biotiques et abiotiques. Pour cela, nous avons réalisé une expérimentation au champ dont les plantes de la betterave sucrière ont été inoculées par chacune des deux souches *S. bellus* et *S. saprophyticus* en combinaison avec la roche phosphatée. Après 6 mois de culture, les résultats de cette expérience ont montré que la combinaison de RP et les souches d'Actinomycètes testées a stimulé de manière significative la longueur des racines, la biomasse des feuilles et des racines par rapport aux plantes non inoculées. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Agbodjato et al. (2015) concernant *Pseudomonas fluorescens* en association avec la plante de maïs. Également, le rendement de la betterave a été augmenté par l'inoculation des deux souches. Semblablement, une souche de *Bacillus* améliore le rendement des racines de la betterave à sucre (Sahin et al. 2004). Pour la teneur en sucres qui est un paramètre très important et qui détermine la qualité de la betterave sucrière, les plantes traitées par les deux souches montrent un pourcentage en sucre plus élevé par rapport aux autres non-inoculées. De même Çakmakçi et al. (2006) rapportent que l'inoculation de la betterave sucrière par *Bacillus megaterium* a augmenté le rendement des feuilles, des racines et en sucre aussi bien en serre qu'au en champ.

Les résultats obtenus ont montré un impact nettement positif de l'inoculation de SB et SS sur la nutrition minérale (NPK) de la betterave à sucre sous les conditions du champ. Les teneurs en N, P et K dans les plantes traitées ont été plus élevées par rapport aux témoins. Alors que la réponse des plantes aux deux souches était variable d'une souche à l'autre, ce qui peut être lié à la différence de leurs traits PGP individuels et à leurs compétences rhizosphériques. L'augmentation significative de la croissance et des teneurs en N, P et K à la fois dans les feuilles et les racines de la betterave à sucre par l'application des *Streptomyces* est une indication claire de l'effet positif des souches sur l'apport des nutriments à la plante ce qui a entraîné une augmentation des paramètres de croissance des plantes inoculées. De plus, la combinaison de *S. bellus*, *S. saprophyticus* et la RP a remarquablement augmenté la concentration de P soluble dans le sol par 62% dans le cas de SB et par 44% dans le cas de SS par rapport au témoin négatif. Cette augmentation de P soluble des sols en présence des *Streptomyces* est attribuée à leurs capacités de solubiliser la RP en rendant le P disponible pour les plantes et ceci par différents mécanismes tels que l'acidification (production des acides organiques) et/ou par la chélation (production des sidérophores) (Aallam et al. 2021a; Bhatti et al. 2017; Hamdali et al. 2021). D'autres études des mécanismes de solubilisation de P et de K par nos souches sélectionnées sont en cours d'étude afin d'approfondir la compréhension de ces processus.

L'utilisation des engrais phosphatés et potassiques nécessite un financement coûteux que la majorité des agriculteurs ne peuvent pas l'assurer. Cependant, une industrialisation qui transforme le phosphate et le potassium naturels insolubles en engrais chimiques solubles provoquent des dégâts environnementaux importants. Les chercheurs ont donc la responsabilité vis-à-vis de la communauté et l'environnement de trouver des alternatives écologiques pour rendre le phosphore et le potassium disponibles aux cultures. Alors que la plupart des sols manquent de phosphore et de potassium disponibles pour les cultures, il est donc intéressant d'utiliser des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'inoculant en combinaison avec le phosphate et le potassium naturels pour mobiliser le P et le K à partir de sources peu disponibles. De nombreuses études ont rapporté qu'il y a plusieurs souches bactériennes exerçant leurs effets bénéfiques *in vitro*. Tandis que, un nombre plus faible succède dans des conditions contrôlées et un nombre encore plus faible réussit au champ.

En conclusion, dans cette étude nous anticipons que la combinaison du phosphate et de potassium naturels et avec les souches les plus performantes de point de vue solubilisation du RP

et d'Orthoclase, pourrait constituer un nouveau engrais écologique utile pour la fertilisation des sols afin de nourrir et stimuler la croissance des cultures. En plus de la capacité solubilisatrice les résultats de ce travail de thèse suggèrent que les souches de *Streptomyces* spp. sélectionnées dans cette étude, présentent les meilleures activités PGPR multifonctions tels que la production d'AIA, des sidérophores et l'inhibition de la croissance des phytopathogènes. À la lumière des différents résultats obtenus, nous avons sélectionné deux souches *Streptomyces bellus* (SB) et *S. saprophyticus* (SS) qui présentent les meilleurs caractères PGPR pour évaluer leur effet sur la croissance et la protection de la betterave sucrière.

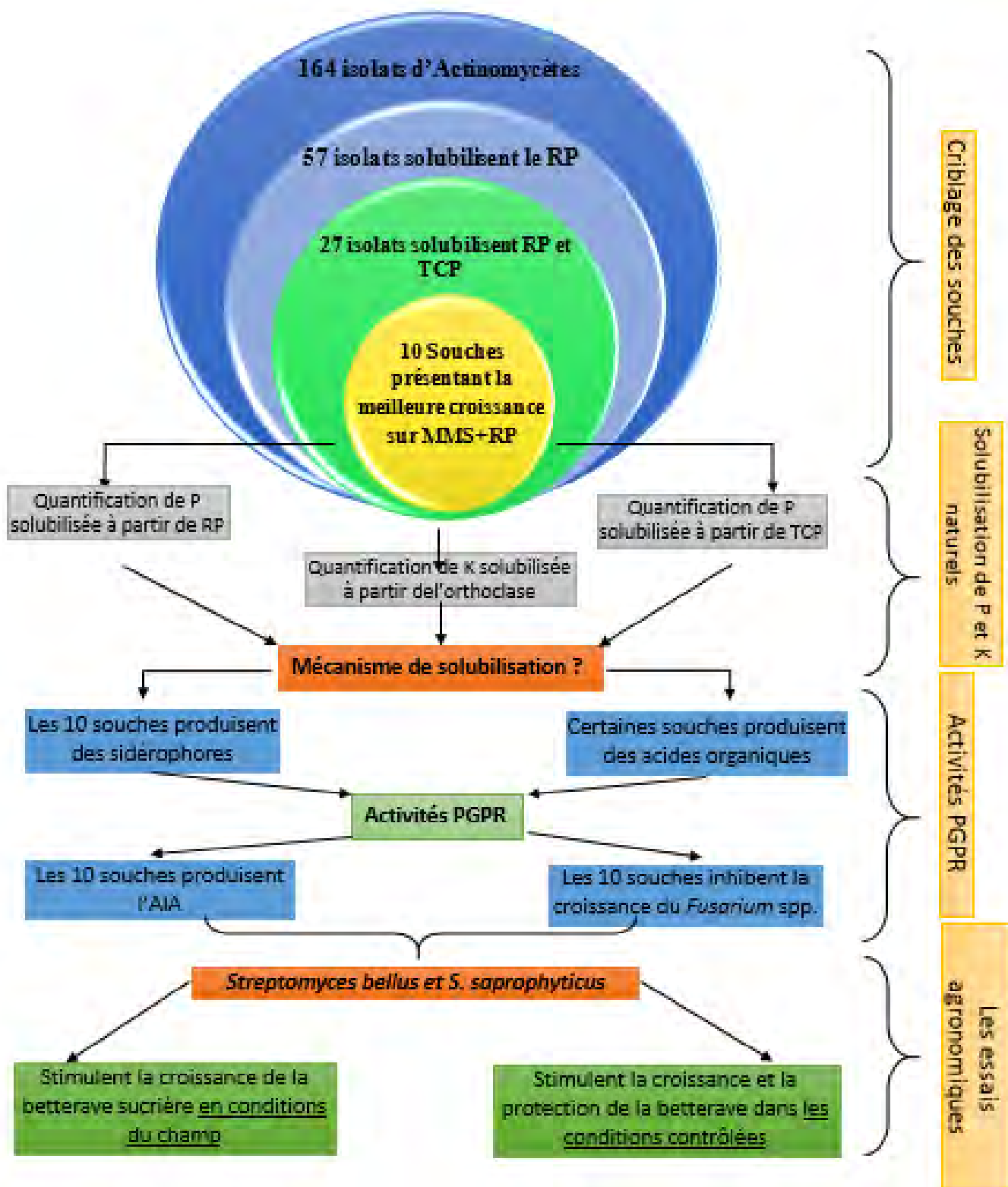
Les résultats des essais aux conditions contrôlées indiquent que les deux souches *Streptomyces bellus* et *S. saprophyticus* solubilise efficacement le phosphate et le potassium naturels dans le sol et améliore la nutrition et la croissance de la betterave sucrière sous serre. Les deux souches sélectionnées ont montré aussi une activité inhibitrice contre des espèces de *Fusarium* l'un des agents causals de la pourriture racinaire chez la betterave sucrière.

Cette étude nous a permis de démontrer que nos souches d'Actinomycètes sélectionnées, et particulièrement *Streptomyces bellus* et *Streptomyces saprophyticus*, étaient capables de favoriser une bonne croissance des plantes de la betterave sucrière combinée à une protection efficace de la plante contre l'attaque des *Fusarium* spp., agents causaux de la pourriture racinaire. L'aptitude à stimuler la croissance de la betterave à sucre est sans aucun doute liée à leur capacité à solubiliser le P et le K naturels et à la production des auxines (AIA). Aussi leur aptitude au biocontrôle et de la bio-protection des plantes, elle est probablement liée à leur capacité à excréter des substances antifongiques et des sidérophores, qui limitent la croissance du pathogène, et des métabolites qui stimulent le système de résistances naturelles chez les plantes.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette thèse apporte des voies intéressantes pour l'avenir de l'agriculture durable et/ou écologique. L'interaction entre les Actinomycètes solubilisatrices de P et de K naturels et la roche de phosphate et d'orthoclase a une influence significative sur l'amélioration de la croissance de la betterave sucrière en serre et en plein champ. Ainsi que l'absorption des nutriments permettra de réduire l'utilisation des produits agrochimiques et des pesticides voire même les compléter par l'apport des ressources naturelles et écologiques. Enfin, il serait donc nécessaire de formuler un bio engrais à base de et/ou des spores des deux

souches sélectionnées et de roche phosphatée et potassique naturelles. Une telle stratégie contribuerait au développement d'une agriculture durable et plus respectueuse de l'environnement.

## SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU TRAVAIL RÉALISÉ DANS LA THÈSE





## PERSPECTIVES

Les Actinomycètes solubilisatrices du phosphate et de potassium étudiées peuvent servir à la mise en évidence d'une banque de souches bactériennes présentant une multitude d'activités promotrices des plantes cultivées et la formulation de biofertilisants efficaces pour l'amélioration de croissance et la nutrition minérale des plantes. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes relatifs à la solubilisation du phosphate et du potassium ainsi que différentes applications agronomiques possibles doivent être plus approfondies. Ci-dessous les différents points complémentaires qui nous semblent importants à développer en perspectives de ce travail.

- La recherche des gènes impliqués dans la solubilisation du phosphate et du potassium.
- Développer des méthodes de caractérisation de la flore microbienne endémique afin d'évaluer l'impact de l'introduction de la nouvelle souche sur la flore endémique.
- Développer des méthodes de suivi de l'effet de l'introduction de la souche sur la structure pédologique du sol, notamment sur la teneur en phosphate et en potassium immobilisés.
- Relancer des essais agronomiques dans d'autres sites pour vérifier la reproductibilité des résultats
- Bioformulation d'un produit qui peut être commercialisé comme bioengrais.
- Faire une étude de marché pour la commercialisation de ce nouveau produit auprès des exploitations agricoles.
- Mettre au point un processus de production de mycélium et/ou spores des souches d'Actinomycètes sélectionnées à grande échelle



# Références bibliographiques

- Aallam Y, Dhiba D, Lemriss S, et al (2021a) Isolation and characterization of phosphate solubilizing *streptomyces* sp. Endemic from sugar beet fields of the beni-mellal region in morocco. *Microorganisms* 9:1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050914>
- Aallam Y, Maliki B El, Dhiba D, et al (2021b) Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic Streptomyces spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp. *Microorganisms* 9:1-15 <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071429>
- Abdalla ME, Seadh SE, Hamza S (2019) Inhibitory Effect and Morphological Changes by Organic Acids to Bacterial Strains Causing Sugar Beet Soft Root Rot In Vitro. *J Plant Prot Pathol* 10:187–193
- Abdel-Motagally FMF, Attia KK (2009) Response of sugar beet plants to nitrogen and potassium fertilization in sandy calcareous soil. *Int J Agric Biol* 11:695–700
- Adeleke R, Nwangburuka C, Oboirien B (2016) Origins, roles and fate of organic acids in soils : A review. *South African J Bot* 108:393–406. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.002>
- Adimalla N, Qian H, Wang H (2019) Assessment of heavy metal (HM) contamination in agricultural soil lands in northern Telangana, India: an approach of spatial distribution and multivariate statistical analysis. *Environ Monit Assess* 191:1–15. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7408-1>
- Afshar RK, Nilahyane A, Chen C, et al (2019) Soil & Tillage Research Impact of conservation tillage and nitrogen on sugarbeet yield and quality. *Soil Tillage Res* 191:216–223. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.03.017>
- Agbodjato NA, Noumavo PA, Adjanohoun A, et al (2015) Response of maize (*Zea mays* L .) crop to biofertilization with plant growth promoting rhizobacteria and chitosan under field conditions *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* Response of maize (*Zea mays* L .) crop to biofertilization W. *J Exp Biol Agric Sci* 3:566–574. [https://doi.org/10.18006/2015.3\(6\).566.574](https://doi.org/10.18006/2015.3(6).566.574)
- Aharonowitz Y, Demain AL (1977) Microbiology Influence of Inorganic Phosphate and Organic Buffers Potassium Phosphate as Buffer System. *Arch Microbiol* 173:169–173. <https://doi.org/10.1007/bf00406371>
- Ahemad M, Kibret M (2013) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria : Current perspective. *J King Saud Univ - Sci* 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmad M, Lee SS, Lee SE, Al-wabel MI (2017) Biochar-induced changes in soil properties affected immobilization/mobilization of metals/metalloids in contaminated soils. *J soils Sediments*. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1339-4>
- Ahmadi SD, Mahin D, Majid K (2019) Heavy metal pollution assessment in agricultural soils of Kermanshah province , Iran. *Environ Earth Sci* 78:1-12. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8093-7>
- Ahmed E, Holmström SJM (2014) Minireview Siderophores in environmental research : roles and applications. *Microbes Environ* 7:196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Aiman U, Mahmood A, Waheed S, Malik R (2016) Enrichment, geo-accumulation and risk surveillance of toxic metals for different environmental compartments from Mehmood Booti dumping site, Lahore city, Pakistan. *Chemosphere* 144:2229–2237. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.077>
- Ait Barka E, Vatsa P, Sanchez L, et al (2016) Taxonomy , Physiology , and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15.Address>

- Akhtar SS, Mekureyaw MF, Pandey C, Roitsch T (2020) Role of Cytokinins for Interactions of Plants With Microbial Pathogens and Pest Insects. *Front Plant Sci* 10:1–32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>
- Aksu G, Altay H (2020a) The Effects of Potassium Applications on Drought Stress in Sugar Beet: Part II. Plant Nutrition Content. *J Sci Perspect* 4: 203-216 <https://doi.org/10.26900/jsp.4.015>
- Aksu G, Altay H (2020b) The Effects of Potassium Applications on Drought Stress in Sugar Beet. *Sugar Tech* 22:1092–1102. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00851-w>
- Alam M, Hussain Z, Khan A, et al (2020) The effects of organic amendments on heavy metals bioavailability in mine impacted soil and associated human health risk. *Sci Hortic (Amsterdam)* 262:109067. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109067>
- Alaylar B, Güllüce M, Karadayi M, Isaoglu M (2019) Rapid Detection of Phosphate - Solubilizing Bacteria from Agricultural Areas in Erzurum. *Curr Microbiol* 76:804–809. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01688-7>
- Ali AM, Awad MYM, Hegab SA, et al (2020) Effect of potassium solubilizing bacteria (*Bacillus cereus*) on growth and yield of potato. *J Plant Nutr* 1–10. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1822399>
- Almquist C, Persson L, Olsson Å, et al (2016) Disease risk assessment of sugar beet root rot using quantitative real-time PCR analysis of *Aphanomyces cochlioides* in naturally infested soil samples. *Eur J Plant Pathol* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0862-5>
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO (2017) Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front Microbiol* 8:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Alvarez A, Saez JM, Costa JSD, et al (2017) Chemosphere Actinobacteria : Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* 166:41–62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.070>
- Anandan R, Dharumadurai D, Manogaran GP (2016) An Introduction to Actinobacteria. In: Dhanasekaran D, Jiang Y (eds) *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* colonies. pp:1-37. <https://doi.org/10.5772/62329>
- Anitha A, Rabeeth M (2009) Control of Fusarium Wilt of Tomato by Bioformulation of *Streptomyces griseus* in Green House Condition. *African J Basic Appl Sci* 1:9–14
- Anwar S, Ali B, Sajid I (2016) Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. *Front Microbiol* 7:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01334>
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts *Polyphenoloxidase Beta Vulgaris*. *Physiol Plant* 24:1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09206.x>
- Asher JC, Ozanne PG (1967) Growth and potassium content of plants in solution cultures. *Soil Sci* 103:155–161
- Asher MJC (1993) Rhizomania. In: Cooke D, Scott RK (eds) *The Sugar Beet Crop*. World Crop Series. Springer, Dordrecht, pp 311–346
- Ashfaq M, Hassan HM, Ghazali HA, Ahmad M (2020) Halotolerant potassium solubilizing plant growth promoting rhizobacteria may improve potassium availability under saline conditions. *Environ Monit Assess* 192:1–20
- Astriani M, Zubaidah S, Abadi AL, Suarsini E (2020) *Pseudomonas plecoglossicida* as a novel bacterium for phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid-producing from soybean rhizospheric soils of East Java, Indonesia. *Biodiversitas* 21:578–586. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210220>
- Awais M, Tariq M, Ali A, et al (2017) Isolation, characterization and inter-relationship of

- Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of Sugarcane and Rice. *Biocatal Agric Biotechnol* 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.018>
- Azamovna MM, O'g'li ASS, Nuritdinovna AD, Qizi NFJ (2020) Biology Of Sugar Beet , As Well As The Scientific Basis For The Cultivation Of Ecologically Pure Products. *Am J Agric Boimedical Eng* 02:7–10. <https://doi.org/10.37547/tajabe/Volume02Issue11-02>
- Azaroual SE, Hazzoumi Z, El Mernissi N, et al (2020) Role of Inorganic Phosphate Solubilizing Bacilli Isolated from Moroccan Phosphate Rock Mine and Rhizosphere Soils in Wheat (*Triticum aestivum* L) Phosphorus Uptake. *Curr Microbiol* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02046-8>
- Azevedo PF De, Almeida AC De, Marques RD, et al (2021) In vitro inhibition of *Fusarium solani* by *Trichoderma harzianum* and biofertilizer. *Res Soc Dev* 10:1–13. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.12994>
- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
- Baghel V, Thakur JK, Yadav SS, et al (2020) Phosphorus and Potassium Solubilization From Rock Minerals by *Endophytic Burkholderia* sp . Strain FDN2-1 in Soil and Shift in Diversity of Bacterial Endophytes of Corn Root Tissue with Crop Growth Stage. *Geomicrobiol J* 1–14. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1734691>
- Bagyalakshmi B, Ponmurugan P, Balamurugan A (2017) Potassium solubilization, plant growth promoting substances by potassium solubilizing bacteria (KSB) from southern Indian Tea plantation soil. *Biocatal Agric Biotechnol* 12:116–124. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.011>
- Bahadur I, Meena VS, Kumar S (2015) Importance and Application of Potassic Biofertilizer in Indian Agriculture. *Int Res J Biol Sci* 3:80–85
- Bakhshandeh E, Pirdashti H, Shahsavarpour K (2017) Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. *Ecol Eng* 103:164–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.03.008>
- Bal HB, Das S, Dangar TK, Adhya TK (2013) Research Paper ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J Basic Microbiol* 53: 972–984. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200445>
- Baltas H, Sirin M, Gökbayrak E, Ozcelik AE (2019) A case study on pollution and a human health risk assessment of heavy metals in agricultural soils around Sinop province, Turkey. *Chemosphere*. 241: 125015. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125015>
- Baoune H, El Hadj-khelil OA, Pucci G, et al (2018) Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp . isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. *Ecotoxicol Environ Saf* 147:602–609. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.013>
- Barakat A, El Baghdadi M, Rais J, Nadem S (2012) Assessment of Heavy Metal in Surface Sediments of Day River at Beni-Mellal Region, Morocco. *Res J Environ Earth Sci* 4:797–806
- Barakat A, Ennaji W, Krimissa S, Bouzaid M (2019) Heavy metal contamination and ecological-health risk evaluation in peri-urban wastewater-irrigated soils of Beni-Mellal city (Morocco). *Int J Environ Health Res* 00:1–16. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1595540>
- Bargaz A, Lyamlouli K, Chtouki M, et al (2018) Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. *Front Microbiol* 9:1–25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606>
- Barker A V, Pilbeam DJ (2007) *Handbook of Plant Nutrition*, 1st edn. Taylor & Francis group,

Boca Raton

- Barker A V, Pilbeam DJ (2015) Handbook of Plant Nutrition. 2nd edn. Taylor & Francis group, Boca Raton
- Barlog P, Grzebisz W, Peplinski K, Szczepaniak W (2013) Sugar Beet Response To Balanced Nitrogen Fertilization With Phosphorus And Potassium. *Bulg J Agric Sci* 19:1311–1318
- Bashir Z, Zargar MY, Vishwakarma DK (2019) Potassium-solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. In: *Applied Agricultural Practices for Mitigating Climate Change*. pp 17–28
- Batjes NH (2011) Global distribution of soil phosphorus retention potential. Wageningen
- Battini F, Grønlund M, Agnolucci M, et al (2017) Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Sci Rep* 7:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>
- Bauer AW, Kirby M, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493–496
- Beaudin I, Giroux M, Michaud A, Beudet P (2008) Les sources, les formes et la gestion du Phosphore en milieu agricole. (Fiche technique n 2). Institut de recherche et de développement en agroenvironnement inc.(IRDA) et le Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ) pp 1-12.
- Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE, Lechevalier HA (1964) Rapid Differentiation Between *Nocardia* and *Streptomyces* by Paper Chromatography of Whole-Cell Hydrolysates. *Appl Microbiol* 12:421–423
- Ben-laouane R, Baslam M, Ait-el-mokhtar M, et al (2020) Potential of Native *Arbuscular Mycorrhizal* Fungi, Rhizobia, and / or Green Compost as Alfalfa (*Medicago sativa*) Enhancers under Salinity. *Microorg Artic* 8:1–26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111695>
- Ben Farhat M, Boukhris I, Chouayekh H (2015) Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp . CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. *FEMS Microbiol Lett* 362:1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv008>
- Berdi D (1973) Laboratory Identification of Clinically Important Aerobic Actinomycetes. *Appl Microbiol* 25:665–681
- Bhatti AA, Haq S, Bhat RA (2017) Microbial Pathogenesis Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microb Pathog* 111:458–467. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>
- Bhatti SS, Bhat SA, Kumar V, et al (2018) Ecological risk assessment of metals in roadside agricultural soils: A modified approach
- Bhutiani R, Kulkarni DB, Khanna DR, Gautam A (2017) Geochemical distribution and environmental risk assessment of heavy metals in groundwater of an industrial area and its surroundings, Haridwar, India. *Energy, Ecol Environ* 2:155–167. <https://doi.org/10.1007/s40974-016-0019-6>
- Biancardi E, Mcgrath JM, Panella LW, et al (2010) Sugar Beet. In: Bradshaw JE (ed) *Root and Tuber Crops, Handbook of Plant Breeding 7*. Springer Science+Business Media, pp 173–219
- Boamponsem LK, Adam JI, Dampare SB, et al (2010) Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B Assessment of atmospheric heavy metal deposition in the Tarkwa gold mining area of Ghana using epiphytic lichens. *Nucl Inst Methods Phys Res B* 268:1492–1501. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2010.01.007>
- Bolivar-anillo HJ, González-Rodríguez VE, Cantoral JM, et al (2021) Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis*, Isolated from *Zea mays*, as Potential Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea*. *Biology (Basel)* 10:20–40
- Boubekri K, Soumare A, Mardad I, et al (2021) The Screening of Potassium- and Phosphate-

- Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. microorganisms
- Brouder S (2011) Potassium Cycling. In: Hatfield JL, Sauer TJ (eds) Soil Management: Building a Stable Base for Agriculture. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, pp 79–102
- Cai L, Xu Z, Ren M, et al (2012) Source identification of eight hazardous heavy metals in agricultural soils of Huizhou, Guangdong Province, China. *Ecotoxicol Environ Saf* 78:2–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.004>
- Cakmak I (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J Plant Nutr Soil Sci* 168:521–530. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420485>
- Çakmakçı R, Donmez F, Aydın A, Sahin F (2006) Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem* 38:1482–1487. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.019>
- Cao S, Yang N, Zhao C, et al (2018) Diversity of *Fusarium* species associated with root rot of sugar beet in China. *J Gen Plant Pathol* 84:321–329. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0792-5>
- Carter MR, Gregorich EG (2006) Soil Sampling and Methods of Analysis (2nd ed). In: Canadian Society of Soil Science. Taylor & Francis, Abingdon. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420005271>
- CCME (2001) Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health SUMMARY Canadian Soil Quality Guidelines for the. Can Counc Minist Environ
- ÇelİK H, Katkat AV, Aşık BB, Turan MA (2010) Effects of humus on growth and nutrient uptake of maize under saline and calcareous soil conditions. *Agriculture* 97:15–22
- Chabbi I, Baati H, Dammak R, et al (2020) Toxic metal pollution and ecological risk assessment in superficial soils of “rural-agricultural and coastal-urban” of Monastir region, Eastern Tunisia. *Hum Ecol Risk Assess An Int J* 1–20. <https://doi.org/10.1080/10807039.2020.1732189>
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar, *phaseoli*. *Plant Soil* 311–321. <https://doi.org/10.1007/BF00010460>
- Challis GL, Hopwood DA (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14555–14561
- Chandra D, Srivastava R, Gupt VVSR, et al (2019) Evaluation of ACC deaminase producing rhizobacteria to alleviate water stress impacts in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Can J Microbiol* 65:387–403. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0636>
- Chater KF, Biro S, Lee KJ, et al (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34:171–198. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x>
- Chauhan H, Bagyara DJ, Sharma A (2013) Plants Growth-promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. *Exp Agric* 49:43–52. <https://doi.org/10.1017/S0014479712001019>
- Cheesman DO (2004) Environmental Impacts of Sugar Production. CABI Publishing, Trowbridge
- Chen J, Zhao G, Wei Y, et al (2021) Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth - promoting effect on Chinese fir seedlings. *Sci Rep* 11:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88635-4>
- Chen W, Chang AC, Wu L (2007) Assessing long-term environmental risks of trace elements in phosphate fertilizers. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:48–58.

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.013>
- Chen YF, Yin, YN, Zhang, et al (2007). *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola*, a new pathovar of pathogens in sugar beet. *Plant disease* 91:677-684. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0677>
- Chenaoui M, Amar M, Benkhemmar O, et al (2017) Isolation and characterization of fungi from sugar beet roots samples collected from Morocco. *J Mater Environ Sci* 8:3962–3967
- Childers DL, Corman J, Edwards M, Elser JJ (2011) Sustainability Challenges of Phosphorus and Food : Solutions from Closing the Human Phosphorus Cycle. *Bioscience* 61:117–124. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.2.6>
- Chouyia FE, Romano I, Fechtali T, et al (2020) P-solubilizing *streptomyces roseocinereus* ms1b15 with multiple plant growth-promoting traits enhance barley development and regulate rhizosphere microbial population. *Front Plant Sci* 11:1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01137>
- Christenson DR, Draycott AP (2006) Nutrition – Phosphorus, Sulphur, Potassium, Sodium, Calcium, Magnesium and Micronutrients – Liming and Nutrient Deficiencies. In: Draycott AP (ed) sugar beet. Blackwell Publishing Ltd, pp 185–220
- Chukwuneme CF, Babalola OO, Kutu R, Ojuederie OB (2020) Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. *J plant Interact* 15:93–105. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1752833>
- Colombo EM, Kunova A, Pizzatti C, et al (2019) Selection of an Endophytic *Streptomyces* sp . Strain DEF09 From Wheat Roots as a Biocontrol Agent Against *Fusarium graminearum*. *Front Microbiol* 10:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02356>
- Cordell D, Drangert J, White S (2009) The story of phosphorus : Global food security and food for thought. *Glob Environ Chang* 19:292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Costa ME da, Lima W De, Oliveira-longatti SM, Souza FM De (2015) Phosphate-solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate. *Ecol Eng* 83:380–385. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.06.045>
- COSUMAR (2020) Rapport Financier annuel 2020 COSUMAR
- Dalal JM, Kulkarni NS (2014) Antagonistic and Plant growth Promoting Potentials Of Indigenous Endophytic Actinomycetes of Soybean (*Glycine Max* (l) Merrill). *CIBTech J Microbiol* 3:1–12
- Damam M, Kaloori K, Gaddam B, Kausar R (2016) Plant Growth Promoting Substances (Phytohormones) Produced by Rhizobacterial Strains Isolated from the Rhizosphere of Medicinal Plants. *Int J Pharm Sci Rev Res* 37:130–136
- Das I, Pradhan M (2016) Potassium-Solubilizing Microorganisms and Their Role in Enhancing Soil Fertility and Health. In: Meena V, Maurya B, Verma J, Meena R (eds) Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer, New Delhi, pp 281–291
- Dauvalter V, Rognerud S (2001) Heavy metal pollution in sediments of the Pasvik River drainage. *Chemosphere* 42:9–18. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00094-1)
- David B V, Chandrasehar G, Selvam PN (2018) *Pseudomonas fluorescens*: A Plant- Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. In: Prasad R, Gill SS, Tuteja N (eds) Crop Improvement through Microbial Biotechnology. Elsevier B.V., pp 221–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00010-4>
- Day AD, Ludeke KL (1993) Plant Nutrients in Desert Environments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- De Boer MA, Wolzak L, Sloopweg JC (2019) Phosphorus : Reserves , Production , and Applications. In: Ohtake H., Tsuneda S. (eds) Phosphorus Recovery and Recycling. Springer,

- Singapore. pp 75-100. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8031-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8031-9_5)
- Dhiman S, Dubey RC, Baliyan N, et al (2019) Application of potassium-solubilising *Proteus mirabilis* MG738216 inhabiting cattle dung in improving nutrient use efficiency of *Foeniculum vulgare* Mill . Environ Sustain 2: 401–409. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00088-8>
- Diep CN, Hieu TN (2013) Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain , Ha Tien , Kiên Giang province, Vietnam. Am J Life Sci 1:88–92. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20130103.12>
- Djebaili R, Pellegrini M, Smati M, et al (2020) Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils : Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum lycopersicum*. Sustainability 1–19. <https://doi.org/10.3390/su12114617>
- Doilom M, Guo J, Phookamsak R, et al (2020) Screening of Phosphate-Solubilizing Fungi From Air and Soil in Yunnan , China : Four Novel Species in Collection and Isolation of Fungi From. Front Microbiol 11:1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585215>
- Dominguez-Nunez JA, Benito B, Berrocal-Lobo M, Albanesi A (2016) Mycorrhizal Fungi: Role in the Solubilization of Potassium. In: Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer, New Delhi. pp 77–98. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_6)
- Dotaniya ML, Meena VD (2014) Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants : A Review. Proc Natl Acad Sci India Sect B - Biol Sci 85:1–12. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0297-0>
- Doyi I, Essumang D, Gbeddy G, et al (2018) Ecotoxicology and Environmental Safety Spatial distribution , accumulation and human health risk assessment of heavy metals in soil and groundwater of the Tano Basin , Ghana. Ecotoxicol Environ Saf 165:540–546. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.015>
- Draycott AP (2006) Sugar Beet. World Agriculture Series, Blackwell Publishing, p 444
- Drmić Z. (2016). The sugar-beet weevil (*Bothynoderes punctiventris* Germar 1824., Col.: Curculionidae). Thèse de doctorat. Université de Zagreb. Faculté d'Agriculture.
- Dutta J, Thakur D (2020) Evaluation of Antagonistic and Plant Growth Promoting Potential of *Streptomyces* sp. TT3 Isolated from Tea (*Camellia sinensis*) Rhizosphere Soil. Curr Microbiol 77:1829–1838. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02002-6>
- El Baghdadi M, Barakat A, Sajieddine M, Nadem S (2012) Heavy metal pollution and soil magnetic susceptibility in urban soil of Beni Mellal City (Morocco). Environ Earth Sci 66:141–155. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1215-5>
- El Hammoumi N, Sinan M, Lekhlif B, Lakhdar M (2013) Use of multivariate statistical and geographic information system (GIS)-based approach to evaluate ground water quality in the irrigated plain of Tadla (Morocco). Int J W Res Env 5:77–93. <https://doi.org/10.5897/IJWREE12.078>
- El Hamzaoui EH, Baghdadi M El, Oumenskou H, et al (2020) Spatial repartition and contamination assessment of heavy metal in agricultural soils of Beni - Moussa , Tadla plain (Morocco). Model Earth Syst Environ. <https://doi.org/10.1007/s40808-020-00756-3>
- El Rasafi T, Oukarroum A, Haddioui A, et al (2020) Cadmium stress in plants : A critical review of the effects , mechanisms , and tolerance strategies. Crit Rev Environ Sci Technol 0:1–52. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435>
- Elbehri A, Felloun, Nbou H, et al (2011) Actes de l'Atelier de travail, Projet pilote d'appui aux petits producteurs pour une meilleure adaptation aux changements climatiques dans la région du Tadla Azilal, Centre national de documentation.



- Elbendary AA, Hessain AM, El- MD, et al (2017) Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. Saudi J Biol Sci 25:44-46. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>
- Elhaissofi W, Khourchi S, Ibnasser A, et al (2020) Phosphate Solubilizing Rhizobacteria Could Have a Stronger Influence on Wheat Root Traits and Aboveground Physiology Than Rhizosphere P Solubilization. Front Plant Sci 11:1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00979>
- Elshahed MS (2010) Microbiological aspects of biofuel production : Current status and future directions. J Adv Res 1:103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.03.001>
- Elyazied AA, Abou-aly H (2011) Enhancing Growth, Productivity and Quality of Tomato Plants Using Phosphate Solubilizing Microorganisms. Aust J Basic Appl Sci 5:371–379
- Emenecker RJ, Strader LC (2020) Auxin-Abscisic Acid Interactions in Plant Growth and Development. Biomolecules 10:1–15
- Errakhi R, Lebrihi A, Barakate M (2009) In vitro and in vivo antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii* : a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). J Appl Microbiol 107:672–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04232.x>
- Etesami H, Emami S, Alikhani HA (2017) Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. J Soil Sci Plant Nutr 17:897–911. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>
- Evangelista-Martínez Z (2014) Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World J Microbiol Biotechnol 30:1639–1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Eziz M, Mohammad A, Mamut A, Hini G (2018) A human health risk assessment of heavy metals in agricultural soils of Yanqi Basin, Silk Road Economic Belt, China. Hum Ecol Risk Assess 24:1352–1366. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1412818>
- Fageria KN, Stone FL (2006) Physical , Chemical , and Biological Changes in the Rhizosphere and Nutrient Availability. J Plant Nutr 29:37–41. <https://doi.org/10.1080/01904160600767682>
- FAOSTAT (2021a) Crops - Production/Yield quantities of Sugar beet
- FAOSTAT (2021b) Food and Agriculture Organization
- FAOUN (1984) Physical and chemical methods of soil and water analysis.
- Farhat M Ben, Boukhris I, Chouayekh H (2015) Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp . CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. FEMS Microbiol Lett 362:1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv008>
- Fasahat P, Aghaezadeh M, Jabbari L, et al (2018) Sucrose Accumulation in Sugar Beet: From Fodder Beet Selection to Genomic Selection. Sugar Tech 20:635–644. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0617-z>
- Fatima T, Arora NK (2020) Pseudomonas entomophila PE3 and its exopolysaccharides as biostimulants for enhancing growth, yield and tolerance responses of sunflower under saline conditions. Microbiol Res 244:1–57. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126671>
- Felsenstein J (1985) Phylogenies And The Comparative Method. Am Nat 125:1–15
- Fernando Gil J., Wibberg D, Eini O, et al (2020) Comparative transcriptome analysis provides molecular insights into the interaction of Beet necrotic yellow vein virus and Beet soil-borne mosaic virus with their host sugar beet. Viruses, 12: 1-21. <https://doi.org/10.3390/v12010076>
- Finkenstadt VL (2014) A Review on the Complete Utilization of the Sugarbeet. Sugar Tech 16:339–346. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0285-y>

- Flandrois JP, Perrière G, Gouy M (2015) leBIBIQBPP: A set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinformatics* 16:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0692-z>
- Gao X, Zhang S, Zhao X, Wu Q (2018) Potassium-induced plant resistance against soybean cyst nematode via root exudation of phenolic acids and plant pathogen-related genes. *PLoS One* 13:1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200903>
- Garcia K, Zimmermann SD (2014) The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition maintained at constant potassium concentrations. *Front Plant Sci* 3–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00337>
- Gebauer L, Bouffaud M, Ganther M, et al (2021) Soil Texture , Sampling Depth and Root Hairs Shape the Structure of ACC Deaminase Bacterial Community Composition in Maize Rhizosphere. *Front Microbiol* 12:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616828>
- Genilloud O (2017) Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep* 34:1203–1232. <https://doi.org/10.1039/c7np00026j>
- Getha K, Vikineswary S, Wong WH, et al (2005) Evaluation of *Streptomyces* sp . strain g10 for suppression of *Fusarium wilt* and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:24–32. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0199-5>
- Ghaly FA, Abd MR, Mosallm MEA (2019) Effect of Varieties, Phosphorus and Boron Fertilization on Sugar Beet Yield and its Quality. *J Soil Sci Agric Eng* 10:115–122
- Ghorbani-Nasrabadi R, Greiner R, Alikhani HA, et al (2013) Distribution of Actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. *J Soil Sci Plant Nutr* 13:223–236. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000020>
- Giri S, Singh AK, Mahato MK (2017) Metal contamination of agricultural soils in the copper mining areas of Singhbhum shear zone in India. *J Earth Syst Sci* 126:. <https://doi.org/10.1007/s12040-017-0833-z>
- Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. *Scientica* 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Goodfellow M, Stackebrandt E, Koppenstedt M (1988) Chemotaxonomy and actinomycetes systematics. Tokyo: Japan. Scientific Societies Press. In: Okami Y, Beppu T, Ogawara H (eds) *Biology of Actinomycetes '88*. pp 233–238
- Gopalakrishnan S, Pande S, Sharma M, et al (2011) Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium wilt* of chickpea. *Crop Prot* 30:1070–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.006>
- Gopalakrishnan S, Upadhyaya HD, Vadlamudi S, et al (2012) Plant growth-promoting traits of biocontrol potential bacteria isolated from rice rhizosphere. *Springerplus* 1:1–7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-71>
- Goudjal Y, Toumatia O, Yekkour A, et al (2013) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol Res* 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.014>
- Goudjal Y, Zamoum M, Sabaou N, Mathieu F (2016) Potential of endophytic *Streptomyces* spp . for biocontrol of *Fusarium* root rot disease and growth promotion of tomato seedlings. *Biocontrol Sci Technol* 26:1691–1705. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1234584>
- Graham MDR, Michael GK, Mutasa-göttgens ES, Stevens M (2009) Plant diseases that changed the world Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Mol Plant Pathol* 10:129–141. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2008.00514.X>
- Groth I, Saiz-Jimenez C (1999) Actinomycetes in Hypogean Environments. *Geomicrobiol J* 16:1–

8. <https://doi.org/10.1080/014904599270703>
- Ha S, Tran L (2014) Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Crit Rev Biotechnol* 34:16–30. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.783549>
- Hadir S, Gaiser T, Hüging H, et al (2021) Sugar beet shoot and root phenotypic plasticity to nitrogen, phosphorus, potassium and lime omission. *Agriculture* 11:1–20. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010021>
- Hajjaji M, Belkabar A, Berrada SH (2008) Peraluminous rocks of Bou-Azzer region ( Morocco ): Geology and firing transformations. *J African Earth Sci J* 52:114–120. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2008.06.005>
- Hakanson L (1980) An ecological risk index for aquatic pollution control. a sedimentological approach. *Water Res* 14:975–1001. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90143-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90143-8)
- Hakkou R, Benzaazoua M, Bussière B (2016) Valorization of Phosphate Waste Rocks and Sludge from the Moroccan Phosphate Mines: Challenges and Perspectives. *Procedia Eng* 138:110–118. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.02.068>
- Hamayun M, Khan SA, Khan AL, et al (2010) Gibberellin-Producing Endophytic Fungi Isolated from *Monochoria vaginalis*. *J Microbiol Biotechnol* 20:1744–1749. <https://doi.org/10.4014/jmb.1005.05018>
- Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, et al (2008a) Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl soil Ecol* 38:12–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.08.007>
- Hamdali H, Hafidi M, Joe M, Ouhdouch Y (2008b) Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl Soil Ecol* 40:510–517. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.08.001>
- Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y (2008c) Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes : screening for plant growth-promoting activities. *World J Microbiol Biotechnol* 24:2565–2575. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9817-0>
- Hamdali H, Lebrihi A, Monje MC, et al (2021) A Molecule of the Viridomycin Family Originating from a *Streptomyces griseus* -Related Strain Has the Ability to Solubilize Rock Phosphate and to Inhibit Microbial Growth. *antibiotics* 10:1–9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010072>
- Hamdali H, Moursalou K, Tchangbedji G, et al (2012) Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolese phosphate mine. *African J Biotechnol* 11:312–320
- Hamdali H, Smirnov A, Esnault C, et al (2010) Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of Actinomycetales originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. *Appl Soil Ecol* 44:24–31. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.09.001>
- Hamdali H, Virolle MJ, Jan M Von, Spro C (2011) *Streptomyces youssoufiensis* sp . nov ., isolated from a Moroccan phosphate mine. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1104–1108. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023036-0>
- Hamedi J, Mohammadipanah F (2015) Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42:157–171. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1537-x>
- Hamedi J, Poorinmohammad N, Wink J (2017) The Role of Actinobacteria in Biotechnology. In: Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J (eds) *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*.

- Springer International Publishing, pp 269–327
- Hamid ME, Mahgoub A, Babiker AJO, et al (2020) Isolation and Identification of *Streptomyces* spp . from Desert and Savanna Soils in Sudan. *Int J Environ Res Public Health* 17:1–10. <https://doi.org/10.3390/ijerph17238749>
- Hamim A, Boukeskase A, Ouhdouch Y, et al (2019) Phosphate solubilizing and PGR activities of *Ericaceous shrubs* microorganisms isolated from Mediterranean forest soil. *Biocatal Agric Biotechnol* 19:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101128>
- Han D, Wang L, Luo Y (2018) Isolation, identification, and the growth promoting effects of two antagonistic actinomycete strains from the rhizosphere of *Mikania micrantha* Kunth. *Microbiol Res* 208:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.003>
- Han HS, Lee KD (2006) Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil Environ* 52:130–136
- Hanafy E, El-Bana A, Yasin M, El-Naggar N (2019) Impact of Planting Density, Nitrogen and Potassium Fertilizer Levels on Yield and Quality of Sugar Beet. *Zagazig J Agric Res* 46:2133–2143. <https://doi.org/10.21608/zjar.2019.65067>
- Hanson L, Lucchi C De, Stevanato P, et al (2017) Root rot symptoms in sugar beet lines caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*. *Eur J Plant Pathol.* 150:589-593. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1302-x>
- Hanson LE, Hill AL, Jacobsen BJ, Panella L (2009) Response of Sugarbeet Lines to Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Betae* from the United States. *J Sugar beet Res* 46:11–26. <https://doi.org/10.5274/jsbr.46.11>
- Harbouze R, Pellissier JP, Rolland JP, Khechimi W (2019) Rapport de synthèse sur l’agriculture au Maroc. Thèse de doctorat. CIHEAM-IAMM.
- Harir M (2018) Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d’actinobactériés isolées des sols arides et semi arides d’Algérie. Thèse de doctorat, Oran 1
- Haro R, Benito B (2019) The Role of Soil Fungi in K + Plant Nutrition. *Int J Mol Sci* 20:1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20133169>
- Harveson RM, Rush CM (1997) Genetic Variation Among *Fusarium oxysporum* Isolates from Sugar Beet as Determined by Vegetative Compatibility. *Plant Dis* 81:85–88
- Harveson RM, Rush CM (1998) Characterization of *Fusarium* Root Rot Isolates from Sugar Beet by Growth and Virulence at Different Temperatures and Irrigation Regimes. *Plant Dis* 82:1039–1042
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Nahar K, et al (2018) Potassium : A Vital Regulator of Plant Responses and Tolerance to Abiotic Stresses. *agronomy* 8:1–29. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030031>
- Hatamy N, Bonjar GHS, Sadeghy B (2014) Screening and isolation of Actinomycetes isolates in biological control of *Fusarium solani* , *F . moniliforme* and *F . subglutinans* the causal agent of rot root of greenhouse cucumber in vitro conditions. *Arch of Phytopathology Plant Prot* 47:437–441. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2013.811801>
- He YQ, Zhu YG, Smith SE, Smith FA (2002) Interactions between Soil Moisture Content and Phosphorus Supply in Spring Wheat Plants Grown In Pot Culture. *J Plant Nutr* 25:913–925. <https://doi.org/10.1081/PLN-120002969>
- Heick MT, Hansen LA, Munk L, et al (2020) The effect of fungicide sprays on powdery mildew and rust and yield of sugar beet in Denmark. *Crop Prot* 135:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105199>
- Hillnhütter C, Mahlein A, Sikora RA, Oerke E (2011) Field Crops Research Remote sensing to

- detect plant stress induced by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* in sugar beet fields. *F Crop Res J* 122:70–77. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.02.007>
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, et al (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual*. Norwich, UK: John Innes Foundation. pp 201–207. <https://doi.org/10.1017/S0016672300025027>
- Hossain R, Menzel W, Lachmann C, Varrelmann M (2021) New insights into virus yellows distribution in Europe and effects of beet yellows virus , beet mild yellowing virus , and beet chlorosis virus on sugar beet yield following field inoculation. *Plant Pathol* 70:584–593. <https://doi.org/10.1111/ppa.13306>
- Hozzein WN, Abuelsoud W, Wadaan MAM, et al (2019) Exploring the potential of actinomycetes in improving soil fertility and grain quality of economically important cereals. *Sci Total Environ* 651:2787–2798. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.048>
- Hu J, Lin B, Yuan M, et al (2019) Trace metal pollution and ecological risk assessment in agricultural soil in Dexing Pb/Zn mining area, China. *Environ Geochem Health* 41:967–980. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0193-x>
- Hu X, Chen J, Guo J, Hangzhou X (2006) Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain ., 983–990. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9144-2>
- Hu X, Roberts DP, Xie L, et al (2013) Development of a biologically based fertilizer, incorporating *Bacillus megaterium* A6, for improved phosphorus nutrition of oilseed rape. *Can J Microbiol* 59:231–236. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0579>
- IFA (2009) *Energy Efficiency and CO2 Emissions in Ammonia Production 2008-2009 Summary Report*. Paris, France.
- Ignatov AN, Panycheva JS, Spechenkova N, Taliansky M (2017) First report of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* infecting sugar beet in Russia. *Plant Dis* 3–5. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0693-PDN>
- Illmer P, Schinner F (1992) Solubilization Of Inorganic Phosphates By Microorganisms Isolated From Forest Soils. *Soil Biol Biochem* 24:389–395
- Iqbal N, Khan NA, Ferrante A, et al (2017) Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence : Interaction with Other Phytohormones. *Front Plant Sci* 8:1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>
- Jabir B, Falih N, Sarih A, Tannouche A (2021) A Strategic Analytics Using Convolutional Neural Networks for Weed Identification in Sugar Beet Fields. *Agris On-Line Pap Econ Informatics* 13:49–57. <https://doi.org/10.7160/aol.2021.130104>
- Jacobsen BJ (2006) Root Rot Diseases of Sugar Beet. *Proc Nat Sci Matica Srp Novi Sad* 9–19. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN0610009J>
- Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A (2017) The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition — Current Knowledge and Future Directions. *Front Plant Sci* 8:1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>
- Jayakumar N, Paulraj P, Sajeesh P, et al (2019) Application of native phosphate solubilizing bacteria for the use of cheap organic and inorganic phosphate source in agricultural practise of *Capsicum annum* (Chili) - A pilot scale field study. *Mater Today Proc* 16:1630–1639. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.028>
- Jbawi EA, Raei AF Al, Ali AAA, Zubi H Al (2013) Genotype-Environment Interaction Study in SugarBeet (*Beta Vulgaris* L.). *Int J Environ* 5:9–19
- Jiang Q (2016) Characterizing the Diversity of Fungicide Resistance in *Cercospora beticola* on Sugarbeet in Michigan and Ontario. Michigan State University. *Plant Pathology*.
- Jing F, Chen X, Yang Z, Guo B (2018) Heavy metals status, transport mechanisms, sources, and

- factors affecting their mobility in Chinese agricultural soils. *Environ Earth Sci* 77:1–9. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7299-4>
- Jog R, Nareshkumar G, Rajkumar S (2012) Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp . from wheat rhizosphere. *J Appl Microbiol* 113:1154–1164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05417.x>
- Jog R, Pandya 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074146-0>
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205:25–44
- Jones DL, Oburger E (2011) Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In: Bünemann E, Oberson A, Frossard E (eds) *Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 169–198
- Jones KL (1949) Fresh Isolates Of Actinomycetes in Which the Presence of Sporogenous Aerial Mycelia Is a Fluctuation Characteristic. *J Bacteriol* 57:141–145
- Jung C (2005) Genome analysis: Mapping in sugar beet. In: Lorz H, Wenzel G (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Heidelberg, pp 121–138
- Kakoi K, Yamaura M, Kamiharai T, et al (2014) Isolation of Mutants of the Nitrogen-Fixing Actinomycete *Frankia*. *Microbes Environ* 29:31–37. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13126>
- Kalakoutskii L V, Agre NS (1976) Comparative Aspects of Development and Differentiation in Actinomycetes. *Bacteriol Rev* 40:469–524
- Kalayu G (2019) Phosphate Solubilizing Microorganisms : Promising Approach as Biofertilizers. *Int J Agron* 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Kang S, Adhikari A, Lee K, et al (2019) Gibberellin producing rhizobacteria *pseudomonas koreensis* mu2 enhance growth of lettuce (*Lactuca sativa*) and chinese cabbage (*Brassica rapa, chinensis*). *J Microbiol Biotechnol food Sci* 9:166–170. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.166-170>
- Kang S, Khan AL, Hamayun M, et al (2012) Gibberellin-Producing *Promicromonospora* sp . SE188 Improves *Solanum lycopersicum* Plant Growth and Influences Endogenous Plant Hormones. *J Microbiology* 50:902–909. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2273-4>
- Kannabiran K (2017) Actinobacteria are better bioremediating agents for removal of toxic heavy metals : an overview. *Int J Environ Technol Manag* 20:129–138
- Kao T, Mejahed KEL, Bouzidi A (2007) Evaluation de la pollution métallique dans les sols agricoles irrigués par les eaux usées de la ville de Settat ( Maroc ). *Bull l’Institut Sci Rabat, Sect Sci la Vie* 29:89–92
- Karimi E, Safaie N, Shams-Baksh M, Mahmoudi B (2016) *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere *Alleviates Rhizoctonia* damping-off disease on sugar beet. *Microbiol Res* 192:221–230. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.011>
- Kaur G, Reddy MS (2015) Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere* 25:428–437. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)30010-2)
- Kenneth CO (2017) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Bioprotectant bioinoculant for Sustainable Agrobiolgy. A Review. *Int J Adv Res Biol Sci* 4:123–142. <https://doi.org/10.22192/ijarbs>
- Keshavarzi A, Kumar V (2019) Ecological risk assessment and source apportionment of heavy metal contamination in agricultural soils of Northeastern Iran. *Int J Environ Health Res*

- 29:544–560. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1555638>
- Keshavarzi A, Kumar V (2020) Spatial distribution and potential ecological risk assessment of heavy metals in agricultural soils of Northeastern Iran. *Geol Ecol Landscapes* 00:1–17. <https://doi.org/10.1080/24749508.2019.1587588>
- Keswani C, Singh SP, Cueto L, et al (2020) Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:8549–8565. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10890-8>
- Khalifa M, Gad A (2018) Assessment of Heavy Metals Contamination in Agricultural Soil of Southwestern Nile Delta, Egypt. *Soil Sediment Contam* 27:619–642. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1498445>
- Khan AL, Waqas M, Kang S, et al (2014) Bacterial Endophyte *Sphingomonas* sp . LK11 Produces Gibberellins and IAA and Promotes Tomato Plant Growth. *J Microbiol* 52:. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>
- Khan MMA, Haque E, Paul NC, et al (2017) Enhancement of Growth and Grain Yield of Rice in Nutrient Deficient Soils by Rice Probiotic Bacteria. *Rice Sci* 24:264–273. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.rsci.2017.02.002>
- Khatoon Z, Huang S, Rafique M, et al (2020) Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *J Environ Manage* 273:111118. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>
- Khurana SMP, Gaur RK (2019) Importance of Actinobacteria for Bioremediation. In: Khurana SMP, Gaur RK (eds) *Biotechnology : Progress in Genomic Era*. Springer Nature Singapore, pp 277–307. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8499-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8499-8_13)
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kishore N, Pindi PK, Reddy SR (2015) Plant biology and biotechnology: Plant diversity, organization, function and improvement. In: *Plant Biology and Biotechnology*. pp 1–827
- Kılıç O, Boz I, Eryılmaz GA (2020) Comparison of conventional and good agricultural practices farms : A socio-economic and technical perspective. *J Clean Prod* 258:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120666>
- Kolekar PD, Phugare SS, Jadhav JP (2014) Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp . BCH2 to N -isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites. *Environ Sci Pollut Res* 21:2334–2345. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2151-6>
- Koohafkan P, Altieri MA, Gimenez EH (2013) Sustainability Green Agriculture : foundations for biodiverse, resilient and productive agricultural systems. *Int J Agric* 10:37–41
- Kour D, Lata K, Nath A, et al (2020) Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Microbial biofertilizers : Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatal Agric Biotechnol* 23:101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>
- Kowalska J, Mazurek R, Gąsiorek M, et al (2016) Soil pollution indices conditioned by medieval metallurgical activity – A case study from Krakow (Poland). *Environ Pollut* 218:1023–1036. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.053>
- Krishnaraj PU, Dahale S (2014) Mineral phosphate solubilization: Concepts and prospects in sustainable agriculture. *Proc Indian Natl Sci Acad* 80:389–405. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55116>
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al (2018a) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Kumar V, Sharma A, Kaur P, et al (2018b) Pollution assessment of heavy metals in soils of India and ecological risk assessment: A state-of-the-art. *Chemosphere* 216:449–462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.066>
- Kurth F, Feldhahn L, Bönn M, et al (2015) Large scale transcriptome analysis reveals interplay between development of forest trees and a beneficial mycorrhiza helper bacterium. *BMC Genomics* 16:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1856-y>
- Kurth F, Mailänder S, Bönn M, et al (2014) *Streptomyces* - induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defence, photosynthesis and secondary metabolism pathways. *Mol Plant Microbe Interact* 27:891–900. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0296-R>
- Lateef, Abd El E, Abd, El-salam M, Farrag A, Amin G (2019) Fertilizer Inputs Impact Of Different Bio-Solid Sources On Sugar Beet Yield In Sandy Soil. *Int J Agric For Life Sci* 3:106–114
- Lau ET, Tani A, Khew CY, et al (2020) Plant growth-promoting bacteria as potential bio-inoculants and biocontrol agents to promote black pepper plant cultivation. *Microbiol Res* 240:126549. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126549>
- Laufer M, Mohammad H, Maiss E, et al (2018) Biological properties of Beet soil-borne mosaic virus and Beet necrotic yellow vein virus cDNA clones produced by isothermal in vitro recombination: Insights for reassortant appearance. *Virology* 518:25–33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.029>
- Leaw S, Chang H, Sun H, et al (2006) Identification d'espèces de levure médicalement importantes par analyse de séquence des régions d'espaceur transcrites internes. *J Clin Microbiol* 44:693–699. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.693-699.2006>
- Lechevalier HA, Lechevalier MP, Gerber NN (1971) Chemical Composition as a Criterion in the Classification of Actinomycetes. *Adv Appl Microbiol* 14:47–72. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70539-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70539-2)
- Lechevalier MP, Lechevalier HA (1980) The chemotaxonomy of actinomycetes. In: Dietz A, Thayer DW (eds) *Actinomycetes taxonomy*. Virginia Society of Industrial Microbiology, Arlington, pp 225–292
- Lee K, Adhikari A, Kang S, et al (2019) Isolation and Characterization of the High Silicate and Phosphate Solubilizing Novel Strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that Promotes Growth in Rice Plants. *agronomy* 9:1–12. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030144>
- Lehr N, Schrey SD, Hampp R, Tarkka MT (2008) Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol* 177:965–976. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x>
- Leilah AAA, Khan N (2021) Interactive Effects of Gibberellic Acid and Nitrogen Fertilization on the Growth, Yield, and Quality of Sugar Beet. *agronomy* 11:1–14. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010137>
- Li S, Zou D, Li L, et al (2020a) Evolution of heavy metals during thermal treatment of manure: A critical review and outlooks. *Chemosphere* 247:125962. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125962>
- Li Y, Guo Q, He F, et al (2020b) Biocontrol of Root Diseases and Growth Promotion of the Tuberos Plant *Aconitum carmichaelii* Induced by Actinomycetes Are Related to Shifts in the Rhizosphere Microbiota. *Microb Ecol* 79:134–147. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01388-6>
- Li Y, He F, Lai H, Xue Q (2017a) Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes. *Eur J Plant Pathol* 149:299–311. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1177-x>



- Li Y, Li Q, Guan G, Chen S (2020c) Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. *PeerJ* 2020:1–15. <https://doi.org/10.7717/peerj.9062>
- Li Y, Liu X, Hao T, Chen S (2017b) Colonization and Maize Growth Promotion Induced by Phosphate Solubilizing Bacterial Isolates. *Int J Mol Sci* 18:1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms18071253>
- Liu DF, Lian B, Wang B (2016) Solubilization of potassium containing minerals by high temperature resistant *Streptomyces* sp. isolated from earthworm's gut. *Acta Geochim* 35:262–270. <https://doi.org/10.1007/s11631-016-0106-6>
- Liu W, Xu X, Wu X, et al (2006) Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environ Geochem Heal* 133–140. <https://doi.org/10.1007/s10653-005-9022-0>
- Loginova K (2011) Mise en œuvre de champs électriques pulsés pour la conception d'un procédé de diffusion à froid à partir de betteraves à sucre et d'autres tubercules alimentaires (étude multi-échelle). Thèse de doctorat. Compiègne.
- Loper, Schroth (1986) Influence of Bacterial Sources of Indole3-acetic Acid on Root Elongation of Sugar Beet. *Physiol Biochem* 76:386–389. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-386>
- Louden BC, Haarmann D, Lynne AM (2011) Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ* 12:51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- Lucchi C De, Piergiorgio S, Linda H, et al (2017) Molecular markers for improving control of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* in sugar beet. *Euphytica* 213:. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1859-7>
- Maanan M, Saddik M, Maanan M, et al (2015) Environmental and ecological risk assessment of heavy metals in sediments of Nador lagoon, Morocco. *Ecol Indic* 48:616–626. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.034>
- Macías FA, Marín D, Oliveros-bastidas A, et al (2003) Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biol Sci Sp* 17:18–23. <https://doi.org/10.2187/bss.17.18>
- Madani H, Borji S, Sajedi N (2017) Sugar Beet Leaf Characteristics and Wite Sugar Contents Change by Zinc and Phosphorus. *Sci Pap Ser A Agron* 25:302–306
- Mahamuni S V, Wani P V, Patil AS (2012) Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. *Asian J Biochem Pharm Res* 2:237–244
- Maharana R, Basu A, Dhal NK, Adak T (2020) Biosolubilization of rock phosphate by *Pleurotus ostreatus* with brewery sludge and its effect on the growth of maize ( *Zea mays* L .) brewery sludge and its effect on the growth of maize ( *Zea*. *J Plant Nutr* 1–16. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1822397>
- Maharana R, Basu A, Dhal NK, Adak T (2021) Biosolubilization of rock phosphate by *Pleurotus ostreatus* with brewery sludge and its effect on the growth of maize ( *Zea mays* L .). *J Plant Nutr* 44:395–410. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1822397>
- Maharjan B, Hergert GW (2019) Composted Cattle Manure as a Nitrogen Source for Sugar Beet Production. *Soil Fertil Crop Nutr* 3:917–923. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.09.0567>
- Mahdi I, Fahsi N, Hafidi M, et al (2021) Rhizospheric Phosphate Solubilizing *Bacillus atrophaeus* GQJK17 S8 Increases Quinoa Seedling , Withstands Heavy Metals , and Mitigates Salt Stress. *Sustainability* 13:1–22
- Majeed A, Kaleem Abbasi M, Hameed S, et al (2015) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Front Microbiol* 6:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00198>

- Makhlouf BSI, Gadallah AFI, El-Laboudy EHS (2020) Effect of Phosphorus , Boron and Magnesium Fertilization on Yield and Quality of Sugar Beet Grown in a Sandy Soil. J plant Prod 11:485–493. <https://doi.org/10.21608/jpp.2020.103564>
- Manzoor M, Abbasi MK, Sultan T (2016) Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Maize Rhizosphere and Their Potential for Rock Growth Promotion. Geomicrobiol J ISSN 0451: <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1146373>
- Marschner H (2012) Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants, Third. Academic Press, London
- Mathew BT, Torky Y, Amin A, et al (2020) Halotolerant Marine Actinobacteria Promote *Salicornia bigelovii* Growth and Seed Production Using Seawater Irrigation. Front Microbiol 11:1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00552>
- McVitte A, Wildermuth H, Hopwood DA (1972) Fine Structure and Surface Topography of Endospores of *Thermoactinomyces vulgaris*. J Gen Microbiol (1972), 71:367–381
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP (2014) Does a rhizospheric microorganism enhance K+ availability in agricultural soils? Microbiol Res 169:337–347. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP, et al (2015) Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. Ecol Eng 81:340–347. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.065>
- Meena VS, Zaid A, Maurya BR, et al (2018) Evaluation of potassium solubilizing rhizobacteria ( KSR ): enhancing K-bioavailability and optimizing K-fertilization of maize plants under Indo-Gangetic Plains of India. Environ Sci Pollut Res 25:36412–36424
- Mehta P, Sharma R, Putatunda C, Walia A (2019) Endophytic Fungi: Role in Phosphate Solubilization. In: Singh D (ed) Advances in Endophytic Fungal Research. Fungal Biology. Springer, Cham, Faridabad, pp 183–209
- Mekdad AAA, Shaaban A (2020) Integrative applications of nitrogen , zinc , and boron to nutrients-deficient soil improves sugar beet productivity and technological sugar contents under semi-arid conditions technological sugar contents under semi-arid conditions. J Plant Nutr 0:1–16. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1757701>
- Mekdad AAA, Shaaban A, Rady MM, et al (2021) Integrated Application of K and Zn as an Avenue to Promote Sugar Beet Yield , Industrial Sugar Quality , and K-Use Efficiency in a Salty Semi-Arid Agro-Ecosystem. agronomy 11:1-22. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040780>
- Miransari M (2011) Soil microbes and plant fertilization. Appl Microbiol Biotechnol 92:875–885. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3521-y>
- Mishra KB, Kumar K, Dubey PN, et al (2016) Influence on yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill .) grown under semi-arid saline soil , due to application of native phosphate solubilizing rhizobacterial isolates. Ecol Eng 97:327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.034>
- Mohamed EAH, Farag AG, Youssef SA (2018) Phosphate Solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* Isolated from Tomato Plant Rhizosphere. J Environ Prot (Irvine, Calif) 9:266–277. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.93018>
- Mohamed H, El Sebai TN (2019) Effect of Bio-stimulant (Phosphate Solubilizing Microorganisms) on Yield and Quality of Some Sugar Beet Varieties. Egypt J Appl Sci 34:114–129
- Mohammadipanah F, Dehghani M (2017) Classification and Taxonomy of *Actinobacteria*. In: Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J (eds) Biology and Biotechnology of Actinobacteria. Springer, pp 51–77. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1_4)

- Moharana PC, Meena MD, Biswas DR (2018) Role of Phosphate-Solubilizing Microbes in the Enhancement of Fertilizer Value of Rock Phosphate Through Composting Technology. In: Meena S V (ed) Role of Rhizospheric Microbes in Soil. Springer, Singapore. pp 167–202. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0044-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0044-8_6)
- Mohcine H, Saber N, Moustahfer K (2016) Heavy Metal in Agricultural Soils in The Sahel Region of Doukkala (Morocco). 7:414–422
- Moliszewska E, M N, J P, J P (2018) Tubercle disease of sugar beet roots ( *Beta vulgaris* ) found in Poland is neither caused by *Xanthomonas beticola* nor by *tumorigenic Agrobacterium / Rhizobium*. J Plant Dis Prot 125:581–583. <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0183-3>
- Moncheva P, Tishkov S, Dimitrova N, et al (2002) Characteristics of Soil Actinomycetes from Antarctica. J Cult Collect 3:3–14
- Montange D, Truong B (1998) Valorisation des phosphates naturels pour un usage agricole en Chine. Agric développement 89\_98
- Mosa FWAE, Paszt LS, El-megeed NAA (2014) The Role of Bio-Fertilization in Improving Fruits Productivity — A Review. Adv Microbiol 4:1057–1064
- Mukherjee D, Biswas N (2020) Mining Phosphate from Wastewater: Treatment and Reuse. In: Stagner JA, Ting DSK (eds) Sustaining Resources for Tomorrow Green Energy and Technology. Springer, Cham, Switzerland. pp. 67-81. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-27676-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-27676-8_3)
- Mukhtar S, Shahid I, Mehnaz S, Malik KA (2017) Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). Microbiol Res 205:107–117. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.011>
- Mukhtar S, Zareen M, Khaliq Z, et al (2019) Phylogenetic analysis of halophyte-associated rhizobacteria and effect of halotolerant and halophilic phosphate- solubilizing biofertilizers on maize growth under salinity stress conditions. J Appl Microbiol 128:556--573. <https://doi.org/10.1111/jam.14497>
- Muliani S, Inderiati S, Wisdawati E (2015) Study on application of endophytic Actinomycetes and Mycorrhizae to Induce Resistance toward *Rhizoctonia Solani* and Growth Promotin Activity. J Agrotan 1:15–24
- Musa Z, Ma J, Egamberdieva D, et al (2020) Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Endophytic Actinobacteria Associated With the Medicinal Plant *Thymus roseus*. Front Microbiol 11:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00191>
- Nacoon S, Jogloy S, Riddech N, et al (2021) Combination of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria on growth and production of *Helianthus tuberosus* under field condition. Sci Rep 11:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86042-3>
- Nada E, Ferjani BA, Ali R, et al (2007) Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. Acta Physiol Plant 29:57–62. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0009-y>
- Nafis A, Raklami A, Bechtaoui N, et al (2019) Actinobacteria from Extreme Niches in Morocco and Their Plant Growth-Promoting Potentials. diversity 11:1–15
- Naik K, Mishra S, Srichandan H, et al (2019) Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Plant growth promoting microbes : Potential link to sustainable agriculture and environment. Biocatal Agric Biotechnol 21:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>
- Nanjwade BK, Chandrashekhara S, Ali M, et al (2010) Isolation and Morphological Characterization of Antibiotic Producing Actinomycetes. Trop J Pharm Res 9:231–236
- Nampijja M, Derie M, Du Toit LJ (2021). First Report of Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on Swiss Chard, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, in Arizona.

Plant Disease. 1-6

- Naoufal D, Ilham B, Amine H, Khadija O (2018) Isolation and Characterisation of Endophytic Strain *Paenibacillus polymyxa* SR19 from *Urtica dioica* and the Study of Their Effect against *Fusarium oxysporum* f. sp *Tomato*. *Annu Res Rev Biol* 29:1–8. <https://doi.org/10.9734/arrb/2018/44746>
- Narula N, Kumar V, Behl RK, et al (2000) Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. *J Plant Nutr Soil Sci* 163:393–398. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<393::AID-JPLN393>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<393::AID-JPLN393>3.0.CO;2-W)
- Nath D, Maurya BR, Meena VS (2017) Documentation of five potassium- and phosphorus-solubilizing bacteria for their K and P-solubilization ability from various minerals. *Biocatal Agric Biotechnol* 10:174–181. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.007>
- Naveedullah, Hashmi MZ, Yu C, et al (2013) Risk assessment of heavy metals pollution in agricultural soils of siling reservoir watershed in Zhejiang province, China. *Biomed Res Int* 2013:1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/590306>
- Nechwatal J, Leiminger J, Poschenrieder G, Zellner M (2012) Evidence for the involvement of *Aphanomyces cochlioides* and *Pythium* spp . in ‘ girth scab ’ disease of sugar beet in Bavaria. *J Plant Dis Prot* 119:85–91
- Nemr A El, El-said GF, Ragab S, et al (2016) Chemosphere The distribution , contamination and risk assessment of heavy metals in sediment and shell fi sh from the Red Sea coast , Egypt. *Chemosphere* 165:369–380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.048>
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol Agron Société Environ* 15:327–337
- Nikolić I, Stanković S, Dimkić I, et al (2018) Genetic diversity and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. aptata isolated from sugar beet. *Plant Pathol* 67:1194–1207. <https://doi.org/10.1111/ppa.12831>
- Nonomura H (1974) Key for classification and identification of 485 species of the *Streptomyces* included in the ISP. *J Ferment Technol* 52:78–92
- Nouioui I, Ghodhbane-Gtari F, Klenk HP, Gtari M (2018) *Frankia saprophytica* sp. Nov., an atypical, non-infective (Nod-) and non-nitrogen fixing (Fix-) actinobacterium isolated from *coriaria nepalensis* root nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:1090–1095. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002633>
- Nouri M, Haddioui AEM (2016) Ases ment of metals con tamina tion and ecological risk in ait ammar abandoned iron mine soil , Morocco. *Ekol Bratislava* 35:32–49. <https://doi.org/10.1515/eko-2016-0003>
- Nyoki D, Ndakidem PA (2016) Intercropping System , Rhizobia Inoculation , Phosphorus and Potassium Fertilization : A Strategy of Soil Replenishment for Improved Crop Yield. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 5:504–522. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.056>
- Olanrewaju OS, Babalola OO (2018) *Streptomyces* : implications and interactions in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol* 1–10
- Olanrewaju OS, Babalola OO (2019) *Streptomyces* : implications and interactions in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:1179–1188. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y>
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33:1–16. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Olsen SR, Sommers LE (1982) *Methods of Soil Analysis, Part 2*. pp 403–430

- Oo KT, Win TT, Khai AA, Fu P (2020) Isolation , Screening and Molecular Characterization of Multifunctional Plant Growth Promoting Rhizobacteria for a Sustainable Agriculture. 773–792. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.116055>
- Orakçı GE, Yamaç M, Amoroso MJ, Cuzzo SA (2010) Selection of antagonistic Actinomycete isolates as biocontrol agents against root-rot fungi. *Fresenius Environ Bull* 19:417–424
- Oumenskou H, El Baghdadi M, Barakat A, et al (2018) Assessment of the heavy metal contamination using GIS-based approach and pollution indices in agricultural soils from Beni Amir irrigated perimeter, Tadla plain, Morocco. *Arab J Geosci* 11:1–18. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-4021-5>
- Oumenskou H, El Baghdadi M, Barakat A, et al (2019) Multivariate statistical analysis for spatial evaluation of physicochemical properties of agricultural soils from Beni-Amir irrigated perimeter, Tadla plain, Morocco. *Geol Ecol Landscapes* 3:83–94. <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1504272>
- Palyzová A, Svobodová K, Sokolová L, et al (2019) Metabolic profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2 in dual cultures with biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol (Praha)* 64:779–787. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00690-7>
- Panda P, Somsubhra C, Ray, D P, et al (2015) Solubilization of Tricalcium Phosphate and Production of IAA by Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Tea Rhizosphere Soil. *Econ Aff* 60:805–809. <https://doi.org/10.5958/0976-4666.2015.00113.8>
- Park JH, Lamb D, Paneerselvam P, et al (2011) Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *J Hazard Mater* 185:549–574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.082>
- Parmar KB, Mehta BP, Kunt MD (2019) Isolation, Characterization and Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria from Rhizosphere Soil of Maize (*Zea mays*). *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 8:1065–1068. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.810.125>
- Parmar P, Sindhu SS (2018) The novel and efficient method for isolating potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soil. *Geomicrobiol J* 1–7. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1514442>
- Passari AK, Mishra VK, Gupta VK, Yadav MK (2015) In Vitro and In Vivo Plant Growth Promoting Activities and DNA Fingerprinting of Antagonistic Endophytic Actinomycetes Associates with Medicinal Plants. *PLoS One* 10:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139468>
- Patel K, Goswami D, Dhandhukia P, Thakker J (2015) Techniques to Study Microbial Phytohormones. In: Maheshwari DK (ed) *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*. Springer, Cham, Switzerland, pp 1–27. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_1)
- Patel KB, Thakker JN (2019) Growth promotion and biocontrol activity of *Nocardioopsis dassonvillei* strain YM12 : an isolate from coastal agricultural land of Khambhat. *Vegetos* 32:571–582. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00064-x>
- Paul D, Sinha SN (2016) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Ann Agrar Sci* 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.10.001>
- Penn CJ, Camberato JJ (2019) A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants. *Agriculture* 9:1–18. <https://doi.org/10.3390/agriculture9060120>
- Pereira, F. (2003). Production d'acide phosphorique par attaque chlorhydrique de mineraux

- phosphatés avec réduction des nuisances environnementales et récupération des terres rares en tant que sous-produits. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- Pikovskaya RI (1948) Mobilization of Phosphorus in Soil Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species. *Microbiology* 17:362–370
- Pizzeghello D, Berti A, Nardi S, Morari F (2011) Agriculture , Ecosystems and Environment Phosphorus forms and P-sorption properties in three alkaline soils after long-term mineral and manure applications in north-eastern Italy. *Agric Ecosyst Environ* 141:58–66. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.02.011>
- Plassard C, Robin A, Le Cadre E, et al (2015) Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol? *Innov Agron* 43:115–138
- Pons S, Fournier S, Chervin C, et al (2020) Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *PLoS One* 15:1–13 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240886>
- Prasad M, Srinivasan R, Chaudhary M, et al (2019) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges Mahendra. In: *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*. Elsevier Inc., pp 129–157
- Qarni A, Billah M, Hussain K, et al (2021) Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Rock Phosphate Mines and Their Potential Effect for Sustainable Agriculture. *Sustainability* 13:1–14
- Qin S, Li J, Chen H-H, et al (2009) Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol* 75:6176–6186. <https://doi.org/10.1128/AEM.01034-09>
- Qiuguo Z, Zou D, Zeng X, et al (2021) Effect of the direct use of biomass in agricultural soil on heavy metals — activation or immobilization? *Environmental Pollution*. 272: 115989. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115989>
- Quin P, Joseph S, Husson O, et al (2015) Lowering N<sub>2</sub>O emissions from soils using eucalypt biochar : the importance of redox reactions. *Sci Rep* 5:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep16773>
- R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rai A, Rai PK, Singh S (2017) Characterization of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of *Aloe vera* ( L . ) *pseudomonads* from the rhizosphere of *Aloe vera* ( L . ). *Arch Agron Soil Sci* 1–9. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1407869>
- Raj DPRS, Linda R, Babyson RS (2014) Molecular characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria ( PSB ) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria ( PGPR ) from pristine soils. *Int J Innov Sci Eng Technol* 1:317–324
- Rajaeifar MA, Hemayati SS, Tabatabaei M, et al (2019) A review on beet sugar industry with a focus on implementation of waste-to- energy strategy for power supply. *Renew Sustain Energy Rev* 103:423–442. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.12.056>
- Rathore DS, Sheikh M, Singh SP (2021) Marine Actinobacteria: New Horizons in Bioremediation. In: Prasad R, Kumar V, Singh J, Upadhyaya CP (eds) *Recent Developments in Microbial Technologies*. Environmental and Microbial Biotechnology. Springer, Singapore, pp 425–449. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4439-2\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4439-2_20)

- Raymond NS, Raymond NS, Beatriz G, et al (2020) Phosphate-solubilising microorganisms for improved crop productivity: a critical assessment. *New Phytol* 229:1268–1277. <https://doi.org/10.1111/nph.16924>
- Recatala L, Peris M, Sa J (2006) Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65:863–872. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.016>
- Redani L (2015) *Competitivite, Valorisation des Ressources et Objectifs de Sécurité Alimentaire pour la Filier Sucrière au Maroc*. Thèse de doctorat. Gembloux Agro-Bio Tech Université de Liège, Gembloux, Belgique.
- Reddy KRK, Jyothi G, Sowjanya C, et al (2016) Plant Growth-Promoting Actinomycetes: Mass Production, Delivery systems, and commercialization. In: Subramaniam G (ed) *Plant Growth Promoting Actinobacteria*. Springer, Singapore, pp 1–298. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0707-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0707-1_19)
- Resende MP, Cristina I, Cardoso M, et al (2014) Phosphate solubilization and phytohormone production by endophytic and rhizosphere *Trichoderma* isolates of guanandi ( *Calophyllum brasiliense* Cambess). *African J Microbiol Res* 8:2616–2623. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6633>
- Reyes-castillo A, Gerding M, Oyarzúa P, et al (2019) Plant growth-promoting rhizobacteria able to improve NPK availability: selection, identification and effects on tomato growth. *Chil J Agric reserach* 79:473–485. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000300473>
- Reyes-Tena A, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L, et al (2017) Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annuum* L. against *Phytophthora capsici*. *Pakistan J Agric Sci* 54:513–522. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.4245>
- Richard PO, Adekanmbi AO, Ogunjobi AA (2018) Screening of bacteria isolated from the rhizosphere of maize plant (*Zea mays* L.) for ammonia production and nitrogen fixation. *African J Microbiol Res* 12:829–834. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8957>
- Richardson AE, Barea J, McNeill AM, Prigent-combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Rivera-cruz C, Narcı AT, Ballona GC rdova, et al (2008) Soil Biology & Biochemistry Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. *Soil Biol Biochem* 40:3092–3095. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.003>
- Rodrigues MC, Müdsam C, Keller I, et al (2020) Vernalization Alters Sink and Source Identities and Reverses Phloem Translocation from Taproots to Shoots in Sugar Beet ( *Beta vulgaris* ). *Plant Cell Adv Publ* 4:1–32. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00072>
- Rotondo F, Vrisman CM, Rani R, et al (2020) First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* Causing Bacterial Leaf Spot on Common Beet ( *Beta vulgaris* ) in Ohio . *Plant Dis* 104:561–561. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-19-1720-pdn>
- Rozycki H, Strzelczyk E (1986) Organic acids production by *Streptomyces* spp. isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Soil* 96:337–345
- Rudnick RL, Gao S (2003) Composition of the Continental Crust. *Treatise on Geochemistry* 3:1–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00301-6>
- Sachdev DP, Chaudhari HG, Kasture VM, et al (2009) Isolation and characterization of indole acetic acid ( IAA ) producing *Klebsiella pneumonia* strains from rhizosphere of wheat ( *Triticum aestivum* ) and their effect on plant growth. *Indian J Exp Biol* 47:993–1000
- Sacristán-pérez-minayo G, López-robles DJ, Rad C, et al (2020) Microbial Inoculation for

- Productivity Improvements and Potential Biological Control in Sugar Beet Crops. *Front Plant Sci* 11:1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.604898>
- Saddik M, Fadili A (2019) Assessment of heavy metal contamination in surface sediments along the Mediterranean coast of Morocco. *Environ Monit Assess* 191: 1-19. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7332-4>
- Saha M, Maurya BR, Meena S, et al (2016) Identification and characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from Indo-Gangetic Plains of India. *Biocatal Agric Biotechnol* 2–29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.007>
- Sahin F, Çakmakçi R, Kantar F (2004) Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 265:123–129
- Saikia K, Bora LC (2021) Exploring actinomycetes and endophytes of rice ecosystem for induction of disease resistance against bacterial blight of rice. *Eur J Plant Pathol* 159:67–79. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02141-3>
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sakan SM, Dordević DS, Manojlović DD, Predrag PS (2009) Assessment of heavy metal pollutants accumulation in the Tisza river sediments. *J Environ Manage* 90:3382–3390. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.05.013>
- Saleemi M, Kiani MZ, Sultan T, et al (2017) Integrated effect of plant growth - promoting rhizobacteria and phosphate - solubilizing microorganisms on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under rainfed condition. *Agric Food Secur* 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0123-7>
- Saravanakumar K, Arasu VS, Kathiresan K (2013) Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquat Bot* 104:101–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.09.001>
- Sathya A, Vijayabharathi R, Gopalakrishnan S (2017) Plant growth-promoting actinobacteria : a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech* 7:1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0736-3>
- Sattar A, Naveed M, Ali M, et al (2018) Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Appl Soil Ecol* 0–14. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.012>
- Schwoebel V, Sauthier N, Durand C, Dor F (2013) Évaluation des conséquences sur la santé d'une exposition à des sols pollués au plomb, au cadmium et à l'arsenic en Aveyron, France. *Bull épidémiologique Hebd* 267–272
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Secco D, Bouain N, Rouached A, et al (2017) Phosphate, phytate and phytases in plants : from fundamental knowledge gained in *Arabidopsis* to potential biotechnological applications in wheat. *Crit Rev Biotechnol* 1–13. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1268089>
- Selvakumar G, Bhatt RM, Upreti KK, et al (2015) *Citricoccus zhacaiensis* B-4 ( MTCC 12119 ) a novel osmotolerant plant growth promoting actinobacterium enhances onion (*Allium cepa* L.) seed germination under osmotic stress conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 4:833–839. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1837-y>
- Sharma A, Shankhdhar D, Shankhdhar SC (2016) Potassium-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Potassium Solubilization and Uptake. In: Meena V, Maurya B, Verma J, Meena R (eds) *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*.



- Springer, New Delhi, pp 203–219. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_15)
- Sharma M, Dangi P, Choudhary M (2014) Actinomycetes : Source, Identification, and Their Applications Actinomycetes : Source, Identification, and Their Applications. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 3:801–832
- Sharma N, Singhvi R (2017) Effects of Chemical Fertilizers and Pesticides on Human Health and Environment: A Review. *Int J Agric Environ Biotechnol* 10:675. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2017.00083.3>
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes : sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2:1–14
- Shelobolina E, Xu H, Konishi H, et al (2012) Microbial Lithotrophic Oxidation of Structural Fe ( II ) in Biotite. *Appl Environ Microbiol* 78:5746–5752. <https://doi.org/10.1128/AEM.01034-12>
- Shen J, Yuan L, Zhang J, et al (2011) Phosphorus Dynamics : From Soil to Plant. *Plant Physiol* 156:997–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>
- Sheng XF, He LY (2006) Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can J Microbiol* 72:66–72. <https://doi.org/10.1139/W05-117>
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313–340
- Shivlata L, Satyanarayana T (2017) Actinobacteria in Agricultural and Environmental Sustainability. In: Singh JS, Seneviratne G (eds) *Agro-Environmental Sustainability*. Springer Cham, New Delhi, pp 173–217. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2_9)
- Shrivastava P, Kumar R (2015) Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci* 22:123–131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Simeis D De, Serra S (2021) Actinomycetes : A Never-Ending Source of Bioactive Compounds — An Overview on Antibiotics Production. *antibiotics* 10:1–32
- Sims DA, Gamon JA (2002) Relationships Between Leaf Pigment Content and Spectral Reflectance Across a Wide Range of Species , Leaf Structures and Developmental Stages. *Remote Sens Environ* 81 81:337–354. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00010-X)
- Sims TJ, Pierzynski GM (2005) Chemistry of Phosphorus in Soils. In: Tabatabai A, Sparks D (eds) *Chemical processes in soil*. SSSA book Series, Madison, pp 151–192
- Singh DP, Patil JH, Prabha R, et al (2018) Actinomycetes as Potential Plant Growth-Promoting Microbial Communities. In: *Crop Improvement through Microbial Biotechnology*. Elsevier B.V., pp 27–38
- Singh M, Singh D, Gupta A, Pandey KD (2019) Plant Growth Promoting Rhizobacteria : Application in Biofertilizers and Biocontrol of Phytopathogens. In: Singh AK, Kumar A, Singh PK (eds) *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*. Elsevier Inc., pp 41–66
- Singh SP, Gupta R, Gaur R, Srivastava AK (2015) Antagonistic Actinomycetes Mediated Resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. Against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Proc Natl Acad Sci India Sect B - Biol Sci* 87:789–798. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0651-5>
- Smith J, Putnam A, Nair M (1990) In Vitro Control of Fusarium Diseases of *Asparagus officinalis* L. with a Streptomyces or Its Polyene Antibiotic , Faeriefungin. *J Agric Food Chem* 38:1729–1733
- Smith LED, Siciliano G (2015) Agriculture , Ecosystems and Environment A comprehensive review of constraints to improved management of fertilizers in China and mitigation of

- diffuse water pollution from agriculture. *Agric Ecosyst Environ* 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.02.016>
- Soares ACF, Sousa CDS, Garrido MDS, et al (2006) Soil *Streptomyces* with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Brazilian J Microbiol* 37:456–461. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400010>
- Solans M, Scervino JM, Messuti MI, et al (2016) Potential biocontrol actinobacteria: Rhizospheric isolates from the Argentine Pampas lowlands legumes. *J Basic Microbiol* 56:1289–1298. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600323>
- Solans M, Vobis G, Cassan F, et al (2011) Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophila trinervis*. *World J Microbiol Biotechnol* 27:2195–2202. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0685-7>
- Sørensen BL, Dall OL, Habib K (2015) Environmental and resource implications of phosphorus recovery from waste activated sludge. *waste Manag* 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.02.012>
- Soumare A, Boubekri K, Lyamlouli K, et al (2020) From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. *Front Bioeng Biotechnol* 7:1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00425>
- Soumare A, Boubekri K, Lyamlouli K, et al (2021) Efficacy of phosphate solubilizing Actinobacteria to improve rock phosphate agronomic effectiveness and plant growth promotion. *Rhizosphere* 17:100284. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100284>
- Sparks DL, Huang PM (1985) Physical chemistry of soil potassium. In: Munson RD, editor. *Potassium in agriculture*. Madison, WI: American Society of Agronomy, pp 201–276. <https://doi.org/10.2134/1985.potassium.c9>
- Stackebrandt E, Schumann P (2006) Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria. *Prokaryotes* 3:297–321
- Stojšin V, Balaz J, Budakov D, et al (2015) First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* Causing Bacterial Leaf Spot on Sugar Beet in Serbia. *Plant Dis* 99:281–281
- Sugumaran P, Janarthanam B (2007) Solubilization of Potassium Containing Minerals by Bacteria and Their Effect on Plant Growth. *World J Agric Sci* 3:350–355
- Suleman M, Yasmin S, Rasul M, et al (2018) Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PLoS One* 13:1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204408>
- Sun F, Ou Q, Wang N, et al (2020) Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. *Glob Ecol Conserv* 23: 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01141>
- Sundara B, Natarajan V, Hari K (2002) Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *F Crop Res J* 77:43–49
- Sustr M, Soukup A, Tylova E (2019) Potassium in Root Growth and Development. *Plants* 8:1–16. <https://doi.org/10.3390/plants8100435>
- Taha EM (2020) Archives of Phytopathology and Plant Protection Morphological , phylogenetic , and pathogenic analyses of *Fusarium andiyazi* associated with sugar beet root diseases with sugar beet root diseases. *Arch Phytopathol Plant Prot* 1–19. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1829873>
- Tahir M, Khalid U, Ijaz M, et al (2018) Combined application of bio-organic phosphate and phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus* strain MWT 14) improve the performance of bread wheat with low fertilizer input under an arid. *Brazilian J Microbiol* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.11.005>

- Talukdar M, Bordoloi M, Dutta PP, et al (2016) Structure elucidation and biological activity of antibacterial compound from *Micromonospora auratinigra*, a soil actinomycetes. J Appl Microbiol 121:973–987. <https://doi.org/10.1111/jam.13233>
- Tamreihao K, Nimaichand S, Chanu SB, et al (2019) *Streptomyces manipurensis* MBRL 201 T as potential candidate for biocontrol and plant growth promoting agent for rice. Indian J Exp Biol 57:741–749
- Tarkka M, Hampp R (2008) Secondary Metabolites of Soil Streptomyces in Biotic Interactions. In: Karlovsky P (ed) Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 107–126
- Taški-Ajduković K, Čurčić NŽ, Miroslav Z (2017) Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers. Electron J Biotechnol 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.02.001>
- Thakur IB, Putatunda C (2017) In vitro Phosphate Solubilization by *Enterobacter* spp . Isolated from Wheat Rhizosphere. J Pure Appl Microbiol 11:2007–2015
- Tirado R, Allsopp M (2012) Phosphorus in agriculture Problems and solutions. Greenpeace International: Greenpeace Research Laboratories 2: 3–30
- Tobi G, Bahloul YE, Oumouss S, et al (2021) Productivity , heritability and stability analysis of a Moroccan sugar beet germplasm. Agron Res 19:612–628. <https://doi.org/10.15159/AR.21.022>
- Tomlinson DL, Wilson JG, Harris CR, Jeffrey DW (1980) Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. Helgoländer Meeresuntersuchungen 33:566–575. <https://doi.org/10.1007/BF02414780>
- Trujillo ME, Riesco R, Benito P, Carro L (2015) Endophytic Actinobacteria and the Interaction of *Micromonospora* and Nitrogen Fixing Plants. Front Microbiol 6:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01341>
- Tumbariski Y, Georgiev V, Nikolova R, Pavlov A (2018) Isolation, Identification and Antibiotic Susceptibility of *Curtobacterium Flaccumfaciens* Strains PK\_Yt from Sa Daffodil (*Pancratium Maritimum* L.) Shoot Cultures. J Microbiol Biotechnol food Sci 623–627. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.6.623-627>
- USGS (2021a) Phosphate Rock: Mineral Commodity Summaries. USGS Unnumbered Series. US Geological Survey: Reston, VA, 2021, p. 200.
- USGS (2021b) Potash: Mineral Commodity Summaries. USGS Unnumbered Series. US Geological Survey: Reston, VA, 2021, p. 200.
- Vainio EJ, Hantula J (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Myco Res 104:927–936. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002471>
- Vakalounakis DJ, Kavroulakis N (2017) Occurrence of powdery mildew caused by *Erysiphe betae* on chard [ *Beta vulgaris* L . subsp . *cicla* ( L . ) Koch ] in Greece. Crop Prot 99:128–131. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.017>
- Varol M (2011) Assessment of heavy metal contamination in sediments of the Tigris River (Turkey) using pollution indices and multivariate statistical techniques. J Hazard Mater 195:355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.051>
- Vasseur-coronado M, du Boulois HD, Pertot I, Puopolo G (2021) Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. Microbiol Res J 245:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126672>
- Vassilev N, Vassileva M, Fenice M, Federici F (2001) Immobilized cell technology applied in

- solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresour Technol* 79:263–271
- Vassilev S V, Tasco JMD (2003) Methods for Characterization of Inorganic and Mineral Matter in Coal : A Critical Overview. *Energy & Fuels* 17:691–701
- Verma PJ, Yadav J, Tiwari NK, Jaiswal KD (2014) Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biol Biochem* 70:33–37. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.001>
- Verma VC, Singh SK, Prakash S (2011) Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A . Juss . *J Basic Microbiol* 51:550–556. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000155>
- Vetterlein D, Carminati A, Kögel-knabner I, et al (2020) Rhizosphere Spatiotemporal Organization – A Key to Rhizosphere Functions. *Front Agron* 2:1–22. <https://doi.org/10.3389/fagro.2020.00008>
- Vojvodić M, Lazić D, Mitrović P, et al (2019) Conventional and real-time PCR assays for detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-2-2, the causal agent of root rot of sugar beet. *Pestic Phytomed* 34:19–29. <https://doi.org/doi.org/10.2298/PIF1901019V>
- Waksman SA (1940) On the Classification of actinomycetes. *J Bacteriol* 39:549–558. <https://doi.org/10.1128/jb.39.5.549-558.1940>
- Waksman SA, Woodruff B (1940) The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease producing bacteria. *J Bacteriol* 4:581–600. <https://doi.org/10.1128/jb.40.4.581-600.1940>
- Walpola BC, Yoon M (2013) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. *African J Microbiol Res* 7:266–275. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.2282>
- Wang C, Wang H, Li Y, et al (2021) Plant growth-promoting rhizobacteria isolation from rhizosphere of submerged macrophytes and their growth-promoting effect on *Vallisneria spiralis* under high sediment organic matter load. *Microb Biotechnol*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13756>
- Wang H, Wang H (2009) Mitigation of lake eutrophication : Loosen nitrogen control and focus on phosphorus abatement. *Prog Nat Sci* 19:1445–1451. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2009.03.009>
- Wang Q, Ye J, Wu Y, et al (2019) Promotion of the root development and Zn uptake of *Sedum alfredii* was achieved by an endophytic bacterium Sasm05. *Ecotoxicol Environ Saf* 172:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.009>
- Wang T, Liu MQ, Li HX (2014a) Inoculation of phosphate-solubilizing bacteria *Bacillus thuringiensis* B1 increases available phosphorus and growth of peanut in acidic soil. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci* 64:252–259. <https://doi.org/10.1080/09064710.2014.905624>
- Wang W, Qiu Z, Tan H, Cao L (2014b) Siderophore production by actinobacteria. *Biometals* 27:623–631. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9739-2>
- Wang Y, Zhu Y, Zhang S, Wang Y (2018) What could promote farmers to replace chemical fertilizers with organic fertilizers? *J Clean Prod* 199:882–890. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.222>
- Weissmannová HD, Pavlovský J (2017) Indices of soil contamination by heavy metals – methodology of calculation for pollution assessment (minireview). *Environ Monit Assess* 189:1–25. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6340-5>
- Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR (1999) Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem* 31:655–665.

- [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00130-8)
- Wiche O, Székely B, Moschner C, Heilmeyer H (2018) Germanium in the soil-plant system—a review. *Environ Sci Pollut Res* 25:31938–31956. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3172-y>
- Wintermantel WM (2005) Co-infection of Beet mosaic virus with beet yellowing viruses leads to increased symptom expression on sugar beet. *Plant Dis* 89:325–331. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0325>
- Wolfgang A, Zachow C, Müller H, et al (2020) Understanding the Impact of Cultivar, Seed Origin, and Substrate on Bacterial Diversity of the Sugar Beet Rhizosphere and Suppression of Soil-Borne Pathogens. *Front Plant Sci* 11:1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.560869>
- Worsley SF, Macey M, Prudence S, et al (2021) Investigating the role of root exudates in recruiting *Streptomyces* bacteria to the *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Front Mol Biosci* 8:1–30. <https://doi.org/10.1101/2020.09.09.290742>
- Worsley SF, Newitt J, Rassbach J, et al (2020) *Streptomyces* Endophytes Promote Host Health and Enhance Growth across Plant Species. *Appl Environ Microbiol* 86:1–17
- Xiao C, Chi R, Li X, et al (2011) Biosolubilization of Rock Phosphate by Three Stress-Tolerant Fungal Strains. *Appl Biochem Biotechnol* 165:719–727. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9290-3>
- Xiao C, Wu X, Zhu L, et al (2019) Enhanced biosolubilization of mid-low grade phosphate rock by formation of microbial consortium biofilm from activated sludge. *Physicochem Probl Miner Process* 55:217–224. <https://doi.org/10.5277/ppmp18123>
- Xiao CQ, Chi RA, Fang YJ (2013) Effects of *Acidiphilium cryptum* on biosolubilization of rock phosphate in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Trans Nonferrous Met Soc China* 23:2153–2159. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(13\)62711-9](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(13)62711-9)
- Xiao K, Kinkel LL, Samac DA (2002) Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol Control* 23:285–295. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1015>
- Xiao Y, Wang X, Chen W, Huang Q (2017) Isolation and identification of three potassium-solubilizing bacteria from rape rhizospheric soil and their effects on ryegrass. *Geomicrobiol J* ISSN 0451:3–32. <https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1286416>
- Xu L, Wu C, Oelmüller R, et al (2018) Role of Phytohormones in *Piriformospora indica*-Induced Growth Promotion and Stress Tolerance in Plants: More Questions Than Answers. *Front Microbiol* 9:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01646>
- Yadav AN, Verma P, Kumar S, et al (2018) Actinobacteria from Rhizosphere: Molecular Diversity, Distributions, and Potential Biotechnological Applications. In: Singh BP, Gupta VK, Passari AK (eds) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp 13–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00002-3>
- Yadav BK, Sidhu AS (2016) Dynamics of Potassium and Their Bioavailability for Plant Nutrition. In: Meena V, Maurya B, Verma J, Meena R (eds) *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, New Delhi, pp 187–201. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_14)
- Yang Y, Zhang S wen, Li K tai (2019) Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* stain AUH-1 against phytopathogenic fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 35:1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2720-z>
- Yi J, Krusenbaum L, Unger P, et al (2020) Deep Learning for Non-Invasive Diagnosis of Nutrient Deficiencies in Sugar Beet Using RGB Images. *sensors Artic* 20:1–19. <https://doi.org/10.3390/s20205893>

- Yin Z, Shi F, Jiang H, et al (2015) Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Can J Microbiol* 61:1–11. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1139/cjm-2015-0358>
- Yoolong S, Kruasuwan W, Phạm HT thanh, et al (2019) Modulation of salt tolerance in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. *venezuelae* ATCC 10712) expressing ACC deaminase. *Sci Rep* 9:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37987-5>
- Yu X, Liu X, Zhu TH, et al (2012) Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *Eur J Soil Biol* 50:112–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.004>
- Yuan ZS, Liu F, Zhang GF (2015) Characteristics and biodiversity of endophytic phosphorus- and potassium-solubilizing bacteria in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Acta Biol Hung* 66:449–459. <https://doi.org/10.1556/018.66.2015.4.9>
- Zamoum M, Goudjal Y, Sabaou N, Mathieu F (2017) Development of formulations based on *Streptomyces rochei* strain PTL2 spores for biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato seedlings Development of formulations based on *Streptomyces rochei* strain PTL2 spores for biocontrol of *Rhizoctonia sola*. *Biocontrol Sci Technol* 00:1–16. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1334257>
- Zapata F, Roy RN (2004) Utilisation des phosphates naturels pour une agriculture durable. Italie: FAO.
- Zengin M, Gokmen F, Yazici MA, Gezgin S (2009) Effects of potassium, magnesium, and sulphur containing fertilizers on yield and quality of sugar beets (*Beta vulgaris* L.). *Turk J Agric* 33:495–502. <https://doi.org/10.3906/tar-0812-19>
- Zhang C, Kong F (2014) Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Appl Soil Ecol* 82:18–25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.002>
- Zhang C, Li Z, Yang W, et al (2013) Assessment of metals pollution on agricultural soil surrounding a lead-zinc mining area in the Karst Region of Guangxi, China. *Bull Environ Contam Toxicol* 90:736–741. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-0987-6>
- Zhang D, Lu Y, Chen H, et al (2020) Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *J Antibiot (Tokyo)* 73:265–282. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>
- Zhang D, Zhang C, Tang X, et al (2016) Increased soil phosphorus availability induced by faba bean root exudation stimulates root growth and phosphorus uptake in neighbouring maize. *New Phytol* 209:823–831. <https://doi.org/10.1111/nph.13613>
- Zhang Y, Li G, Wang X, et al (2017) Transcriptomic profiling of taproot growth and sucrose accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) at different developmental stages. *PLoS One* 1–28
- Zhao S, Du C, Tian C (2012) Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber Fusarium Wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2919–2927. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1102-6>
- Zhao S, He P, Qiu S, et al (2014) Field Crops Research Long-term effects of potassium fertilization and straw return on soil potassium levels and crop yields in north-central China. *F Crop Res* 169:116–122. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.09.017>
- Zhou N, Zhao S, Tian C (2017) Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS Microbiol Lett* 364:1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx091>
- Zhu J, Li M, Whelan M (2018) Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability

- in agricultural soils: A review. *Sci Total Environ* 612:522–537.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>
- Zidack NK, and Jacobsen BJ (2001). First Report and Virulence Evaluation of *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum* on Sugarbeet in Montana. *Plant health progress* 2: 6.  
<https://doi.org/10.1094/PHP-2001-0706-02-RS.Bacterial>
- Zörb C, Senbayram M, Peiter E (2013) Potassium in agriculture – Status and perspectives. *J Plant Physiol* 171:656–669. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.08.008>
- Zou X, Binkley D, Doxtader KG (1992) A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant Soil* 147:243–250.  
<https://doi.org/10.1007/BF00029076>

# ANNEXES

# Annexe 1 : Publications

## Publication 1 :



microorganisms



Article

### Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco

Yassine Aallam <sup>1</sup>, Driss Dhiba <sup>2</sup>, Sanaâ Lemriss <sup>3</sup>, Amal Souïri <sup>3</sup>, Fatma Karray <sup>4</sup>, Taoufik El Rasafi <sup>1,5</sup>, Nezha Saïdi <sup>6</sup>, Abdelmajid Haddioui <sup>1</sup>, Saâd El Kabbaj <sup>3</sup>, Marie Joëlle Virolle <sup>7,\*</sup> and Hanane Hamdali <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biotechnology and Valorization of Plant Genetic Resources, Faculty of Sciences and Technology, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, Beni-Mellal 23000, Morocco; yassine.aallam@gmail.com (Y.A.); elrasafi\_toufik@hotmail.com (T.E.R.); ahaddioui@yahoo.fr (A.H.)

<sup>2</sup> International Water Research Institute, University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), Moulay Rachid, Beni Guerir 43150, Morocco; driss.dhiba@um6p.ma

<sup>3</sup> Laboratory of Research and Medical Analysis of Gendarmerie Royale, Department of Biosafety PCL3, Rabat, Morocco; slemriss@lram-igr.ma (S.L.); asouiri@lram-igr.ma (A.S.); selkabbaj@lram-igr.ma (S.E.K.)

<sup>4</sup> Center of Biotechnology of Sfax (CBS), Laboratory of Environmental Bioprocesses (LBPE), Sfax BP: 1177-3018, Tunisia; karray.fatma@gmail.com

<sup>5</sup> HTMR Laboratory, University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), Moulay Rachid, Ben Guerir 43150, Morocco

<sup>6</sup> CRRA Rabat, Plant Breeding, Conservation and Valorization of Plant Genetic Resources Research Unit, B.P: 6356-Rabat Institutes, Rabat 415, Morocco; nezsaidi@yahoo.fr

<sup>7</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France

\* Correspondence: marie-joelle.virolle@i2bc.paris-saclay.fr (M.J.V.); hamdali\_hanane@yahoo.fr (H.H.); Tel.: +212-523485112 (H.H.)

† Hanane Hamdali and Marie Joëlle Virolle contributed equally.



Citation: Aallam, Y.; Dhiba, D.; Lemriss, S.; Souïri, A.; Karray, F.; Rasafi, T.E.; Saïdi, N.; Haddioui, A.; El Kabbaj, S.; Virolle, M.J.; et al. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco. *Microorganisms* 2021, 9, 914. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050914>

Academic Editors: Pedro M. Santos and Pedro Castro

Received: 7 April 2021  
Accepted: 22 April 2021  
Published: 24 April 2021

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



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In the course of our research, aimed at improving sugar beets phosphorus nutrition, we isolated and characterized *Streptomyces* sp. strains, endemic from sugar beet fields of the Beni-Mellal region, which are able to use natural rock phosphate (RP) and tricalcium phosphate (TCP) as sole phosphate sources. Ten *Streptomyces* sp. isolates yielded a comparable biomass in the presence of these two insoluble phosphate sources, indicating that they were able to extract similar amount of phosphorus (P) from the latter for their own growth. Interestingly, five strains released soluble P in large excess from TCP in their culture broth whereas only two strains, BP, related to *Streptomyces bellus* and BYC, related to *Streptomyces enissocaealis*, released a higher or similar amount of soluble P from RP than from TCP, respectively. This indicated that the rate of P released from these insoluble phosphate sources exceeded its consumption rate for bacterial growth and that most strains solubilized TCP more efficiently than RP. Preliminary results suggested that the solubilization process of BYC, the most efficient RP and TCP solubilizing strain, involves both acidification of the medium and excretion of siderophores. Actinomycete strains possessing such interesting RP solubilizing abilities may constitute a novel kind of fertilizers beneficial for plant nutrition and more environmentally friendly than chemical fertilizers in current use.

**Keywords:** insoluble phosphate; biosolubilizing; biofertilizer; Actinobacteria; sugar beet

#### 1. Introduction

Phosphorus (P) is one of the 16 elements essential for plant growth [1]. Phosphate availability greatly determines growth and fitness of the plants and thus crops quality and yields [2]. In condition of P deficiency, plant root development is inhibited and this leads to a delay in plant growth [3]. Phosphorus concentration in natural soils varies from 50 to 3000 mg kg<sup>-1</sup> of soil, yet only 0.1% of total phosphorus is really accessible to plants [4,5]. Indeed, most phosphate is immobilized in the soil [6] either via its adsorption



on soil particles, precipitation with various minerals (Al, Fe and Ca) or interconversion into organic forms by soil-born micro-organisms [7]. To overcome this problem, nearly two millions tons of soluble chemical phosphate fertilizers are spread each year on agricultural fields worldwide [8]. However, still a significant fraction of these fertilizers is converted into insoluble forms [9].

The increasing awareness of environmental issues linked to agrochemical inputs stimulates the development of a sustainable agriculture and the replacement or complementation of the chemical fertilizers by other more ecological and environmentally friendly processes [10]. The direct use of natural rock phosphate in traditional agriculture in Morocco is one of such processes [11]. Morocco contains three quarters of the world's rock phosphate (RP) reserves [12]. RP is an hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CaF}_2$ ) not directly usable by plants [13] except in some acidic soils or in soils rich in specific micro-organisms able to convert insoluble phosphate into a form easily assimilable by plants [14]. Several reports demonstrated that these P-solubilizing microorganisms (PSM) could increase growth and crops yields of several agricultural plants including wheat [15], chickpea [16], rice and tomato [17] and can potentially be used as P-biofertilizers.

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is the main industrial crop grown in the vast agricultural lands of the Beni-Mellal region of Morocco and constitutes 21.2% of the national production of sugar beet [18]. Since increasing growth and yield of this economically important crop is a constant concern, we investigated the presence of PSM endemic to these specific soils.

Among these PSM, Actinobacteria, including Actinoplanes, Streptomyces and *Micromonospora* [7,13], are of special interest since besides their PSM abilities, they also produce bioactive secondary metabolites able to limit growth of various phytopathogens agents [9,15,19–22] or molecules stimulating growth or eliciting natural plant defenses [23,24]. Exploring the richness of endemic PSM Actinobacteria in the soils specifically used for sugar beet cultivation is of interest to develop adequate new bio-fertilizer agents to stimulate sugar beet growth in the Beni-Mellal region. We thus screened for and isolated Actinomycetes endemic to these sugar beet rhizospheric soils that were able to grow and release soluble phosphate from insoluble phosphate sources in laboratory conditions. Putative solubilization mechanisms used by these bacteria were discussed and taxonomic characterization of the most efficient solubilizing isolates was achieved.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Location and Collection of Soil Samples

The area of interest is located in the Beni-Mellal region of Morocco (3220'22" N, 6°21'39" W), that has an altitude of approximately 400 m. This region is located in the irrigated perimeter of Beni Amir-Beni Moussa separated by the Oum er Rbia river [25] that creates two independent irrigated perimeters: Beni-Moussa and Beni-Amir (Figure 1; Table 1) of 33,000 ha and 69,500 ha, respectively [26]. This region is characterized by a semi-arid climate with an average rainfall generally below 280 mm [27] and an average temperature of 19 °C [28].

Soil samples were collected in June 2017 from three different fields (Figure 1; Table 1). From each sampling point, 3 cm surface residues were first removed and three subsamples distant of 10 m from each other and in different directions were collected from 0 to 10 cm depth and thoroughly mixed to ensure samples homogeneity. All soil samples were then air dried, homogenized, sieved (<2 mm), placed in a sterile tightly closed polyethylene bag, stored at 4 °C and the soil was used for further experiments within 48 h.

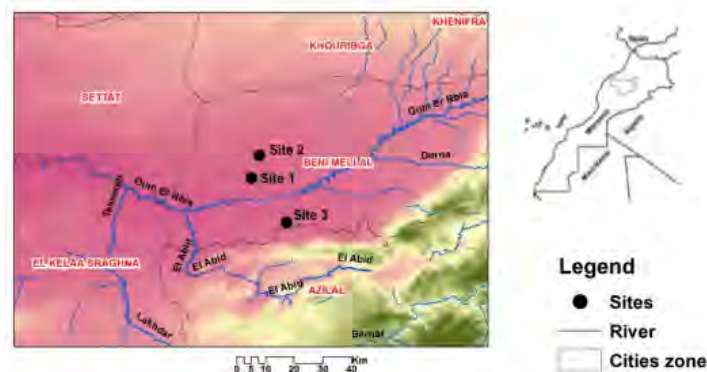


Figure 1. Map of the sampling sites of the three sugar beet agricultural soils of the Beni-Mellal region of Morocco.

Table 1. Physico-chemical characteristics of the three sugar beet soils of the Beni-Mellal region.

Parameters	Site 1	Site 2	Site 3	ANOVA
Perimeter	Beni Amir		Beni Moussa	
Graphical situation	3240'10.8" N, 6°84'14" W	3247'34.45" N, 6°81'52.3" W	3226'31.29" N, 6°73'36.30" W	
pH <sub>water</sub>	7.44 ± 0.27 <sup>a</sup>	7.31 ± 0.26 <sup>a</sup>	7.49 ± 0.14 <sup>a</sup>	
pH <sub>KCL</sub>	6.49 ± 0.16 <sup>a</sup>	6.93 ± 0.06 <sup>b</sup>	7.09 ± 0.04 <sup>c</sup>	<i>p</i> < 0.001
Organic matter (%)	4 ± 0.3 <sup>a</sup>	6 ± 0.3 <sup>b</sup>	4 ± 0.2 <sup>a</sup>	<i>p</i> < 0.001
Mineral matter (%)	89 ± 0.2 <sup>a</sup>	81 ± 0.2 <sup>b</sup>	88 ± 0.1 <sup>c</sup>	<i>p</i> < 0.001, <i>p</i> = 0.026
Water content (%)	7.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	7.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	<i>p</i> < 0.001
Electrical conductivity (µS/cm)	0.40 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.009 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.002 <sup>ac</sup>	<i>p</i> = 0.015
Total nitrogen (%)	2.62 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.87 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.50 <sup>a</sup>	
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	4.96 ± 1.22 <sup>a</sup>	5.23 ± 1.24 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>b</sup>	<i>p</i> = 0.001
Magnesium oxide MgO (%)	0.95 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.28 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0.001
Potassium oxide K <sub>2</sub> O (%)	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.14 <sup>c</sup>	<i>p</i> = 0.026, <i>p</i> < 0.001
Manganese oxide MnO (%)	0.10 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.006 <sup>b</sup>	<i>p</i> = 0.009, <i>p</i> = 0.019

Different letters indicate significant differences at *p* < 0.05. LSD test was used to compare the parameter concentrations between sampling sites.

## 2.2. Chemical Analysis

Conductivity and pH (in water) were measured in a soil-water suspension (1:5 *v/v*). Potential acidity was determined after dilution of the soil sample in a suspension of potassium chloride KCl 1N [29]. The organic (OM) and mineral (MM) matter were determined by ignition at 550 °C for 5 h in a furnace, as described in [27]. Soil moisture was assessed by measuring the evolution of the mass of 10 g of each sample maintained in an oven at 105 °C for 24 h [29]. The Kjeldahl method was used to determinate the total concentration of nitrogen. The determination of the phosphorus (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) content was carried out by ICP-AES (Inductively coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Perkin Elmer Wellesley, Waltham, MA, USA) [30].

### 2.3. Isolation of Total Flora and of Actinomycetes

Two grams (wet weight) of each soil sample were suspended in 18 mL of sterile physiological serum (9 g/L, NaCl), homogenized and sonicated as described previously [31]. Next, 0.1 mL of various dilutions of the treated samples was plated in triplicate on the surface of nutrient agar (Difco, Sparks, MD, USA) for Gram positive and Gram negative bacteria and of synthetic minimum medium (SMM) containing 10 g/L glucose, 2 g/L NaNO<sub>3</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L KCl, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g/L, 4.38 mM) as described previously [15]. The pH of SMM was adjusted to 7 and it was sterilized at 121 °C for 20 min. This medium was supplemented with 40 mg mL/L actidione and 10 mg/mL nalidixic acid to inhibit growth of fungi and Gram negative bacteria, respectively. After plating, the agar plates were incubated for 21 days at 28 °C in order to allow growth of the slow growing Actinomycetes. Actinomycetes were recognized on the basis of their morphological features described in the International Streptomyces Project (ISP) [32].

### 2.4. Screening for Actinomycetes Able to Use Rock Phosphate (RP) and Tricalcium Phosphate (TCP) as Sole Phosphorus Source

Selection of Actinomycetes able to use RP originating from Khouribga phosphate mine in Morocco [15], as sole P source, was carried out by plating 300 colonies (100 colonies from each investigated soil) on the SMM containing 0.5 g/L of RP (approximately equivalent to 2.2 mM phosphorus) as a unique P source or on the SMM containing soluble K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g/L, 4.38 mM) or no P source. Spores of Actinomycete isolates showing the most active growth on SMM containing RP as sole P source were stored in 20% (w/v) sterile glycerol at −20 °C and were subsequently tested for their ability to grow on SMM containing TCP (0.5 g/L, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich, Isère, France) as the sole P source.

### 2.5. Quantitative Estimation of the Amount Soluble Phosphate Released in the Growth Medium by the Selected Actinomycete Strains

The selected Actinomycete isolates were inoculated at 10<sup>6</sup> spores/mL in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid SMM medium with 0.5 g/L RP or 0.5 g/L TCP as sole P source, in triplicate, and grown for 5 days at 28 °C on a rotary shaker (180 g/min) [15]. Every day, a 1 mL aliquot of each culture was taken and centrifuged at 10,000 × g for 10 min, dry biomass as well as the pH of the supernatant were determined. The supernatant was analyzed for P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content by the chlorostannous reduced molybdo-phosphoric acid blue color method [33]. Similar measures were carried out in non-inoculated flasks incubated in the same conditions to determine the amount of phosphate spontaneously released from RP and TCP.

### 2.6. Production and Detection of Siderophores: CAS Agar Plate Technique

Siderophores production of the most efficient RP/TCP solubilizing isolates was determined using Chrome Azurol 5 (CAS) agar plate's method described previously [34]. Agar plugs (10 mm diameter) of Actinobacterial cultures grown on solid SMM medium containing 0.5 g/L TCP as sole P source for 5 days at 28 °C were placed aseptically on CAS agar plate and incubated for 3 days at 30 °C. After incubation, the apparition of a yellow halo around the plugs indicated the production of siderophores [35].

### 2.7. Morphological, Physiological and Chemotaxonomic Characterization of the Selected Strains

The morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of the selected isolates were evaluated as described in the International Streptomyces Project [32]. Cultural characteristics were observed after growth on yeast extract–malt, extract agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3) and inorganic salts–starch agar (ISP4) media for 7–21 days at 30 °C and the color series were determined as proposed previously [36]. The assimilation of carbohydrates was determined using the ISP9 medium containing 10 different carbohy-

drates, as sole carbon source, at a concentration of 1% (*w/v*). The chemical analyses of the diaminopimelic acid isomer were performed as described previously [37].

### 2.8. Amplification and Sequencing of the 16S rDNA of the Selected Strains

The 10 TCP/RP solubilizing Actinobacteria isolates were grown for 2 days at 28 °C in 500 mL flasks containing 100 mL of Hickey–Tresner medium (1 g/L yeast extract, 1 g/L beef extract, 2 g/L N-Z-Amine A (Sigma), 10 g/L Dextrin and 20 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) [38], under constant agitation of 180 rpm. Biomass was harvested by centrifugation ( $16,000 \times g$  for 10 min) and the mycelial pellet was used for automated extraction of DNA with the Maxwell<sup>®</sup> RSC Instrument (Promega, Madison, WI, USA) and the Maxwell<sup>®</sup> RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega) according to manufacturer instructions.

The 16S rDNA was amplified with the PCR method using universal primers 27F (AGAGTTTGAMCCTGGCTCAG) and 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT). Amplification was carried out in 25 mL of reaction mixture containing 10  $\mu\text{L}$  of AccuPower Taq PCR PreMix (Bioneer, Oakland, CA, USA), 1.25  $\mu\text{mol}$  of each primer and 50 ng of DNA. PCR condition was as follows: after initial denaturation (96 °C for 1 min), 30 cycles of 96 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 min 30 s were performed, followed by a final extension (5 min, 72 °C). Amplification was carried out using a GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Negative controls were included with no addition of template DNA. The amplified products were visualized on a 2% (*w/v*) agarose gel stained with ethidium bromide. PCR products from each isolate were sequenced using 27F and 1492R primers. Sequence similarity searches were performed against corresponding sequences of members of the Streptomycetaceae family using the online sequence analysis resources LEBIBI database [39] and GenBank through Nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> accessed: 29 March 2021). Unrooted phylogenetic tree was inferred using the Neighbor-Joining method [40]. The percentage of replicate tree in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches [41]. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method [42] and are expressed in number of base substitutions per site. This analysis involved 52 nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [43].

### 2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis of soil chemical parameters, total flora and Actinomycete strains distribution was carried out using ANOVA, and the Duncan test was used to compare the average abundance and percentage contribution of the Actinomycete isolates to the total flora in the three studied sites. All values are means of three replicates plates from the same soil sample. Least Significant Difference (LSD) was used to compare the parameter concentrations between sampling sites and standard deviation was calculated using SPSS software 20.0 package for Windows.

## 3. Results

### 3.1. Soil Analysis

Physico-chemical properties of soil samples are listed in Table 1. The tested sugar beet agricultural soils contained, on average, 5% of Organic Matter (OM) and 86% of Mineral Matter (MM) including 2% nitrogen, 3.5%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 0.35%  $\text{K}_2\text{O}$ , MgO (1.4%) and MnO (0.08%). The pH of the soils was close to neutrality or slightly basic (pH 7.4 on average). The highest electrical conductivity indicating soil salinity was recorded in soil sample 2 with an average of 0.47 ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

### 3.2. Distribution of Total Flora and of Actinomycetes in the Sugar Beet Fields under Study

The distribution of total flora (TF) and Actinomycetes of sugar beet soils collected from the three sites is shown in Table 2. TF was at a similar level in the three sites (on



average  $23 \times 10^7$  cfu/g of soil) (Table 2). The Actinomycete isolates were significantly more abundant in sites 1 (7.2%) and 3 (6.73%) than in site 2 (4.90%) (Table 2).

**Table 2.** Distribution of total flora and of Actinomycete strains in the three sugar beet sites of the Beni-Mellal region.

Perimeter	Site 1	Site 2	Site 3	ANOVA
	Beni Amir		Beni Moussa	
Total flora ( $\times 10^7$ UFC/g of soil)	25.66 <sup>a</sup>	25.91 <sup>a</sup>	17.08 <sup>b</sup>	
Actinomycetes ( $\times 10^7$ UFC/g of soil)	1.84 <sup>a</sup>	1.27 <sup>ab</sup>	1.15 <sup>b</sup>	$p = 0.03$
% des Actinomycetes/Total flora	7.2%	4.90%	6.73%	

Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ . Duncan t-test was used to compare mean percentages and Actinomycetes density.

Among the 164 Actinomycete isolates retained, 57 had the ability to grow on SMM + RP as the sole phosphate source. Among these 57 isolates, only 27 isolates (47.36%) had also the ability to grow on SMM + TCP as unique P source. Ten of the twenty-seven isolates, showing the highest biomass yield on SMM + RP and with different morphological characteristics, were selected for further studies. Seven of these ten Actinomycete isolates were from site 1 (AI, AYD, AV, AZ, BYC, BX, and BP), one (CYM) from site 2 and two from site 3 (DE1 and DE2).

### 3.3. Growth Kinetic of the Selected Actinomycete Strains in SMM + RP and SMM + TCP

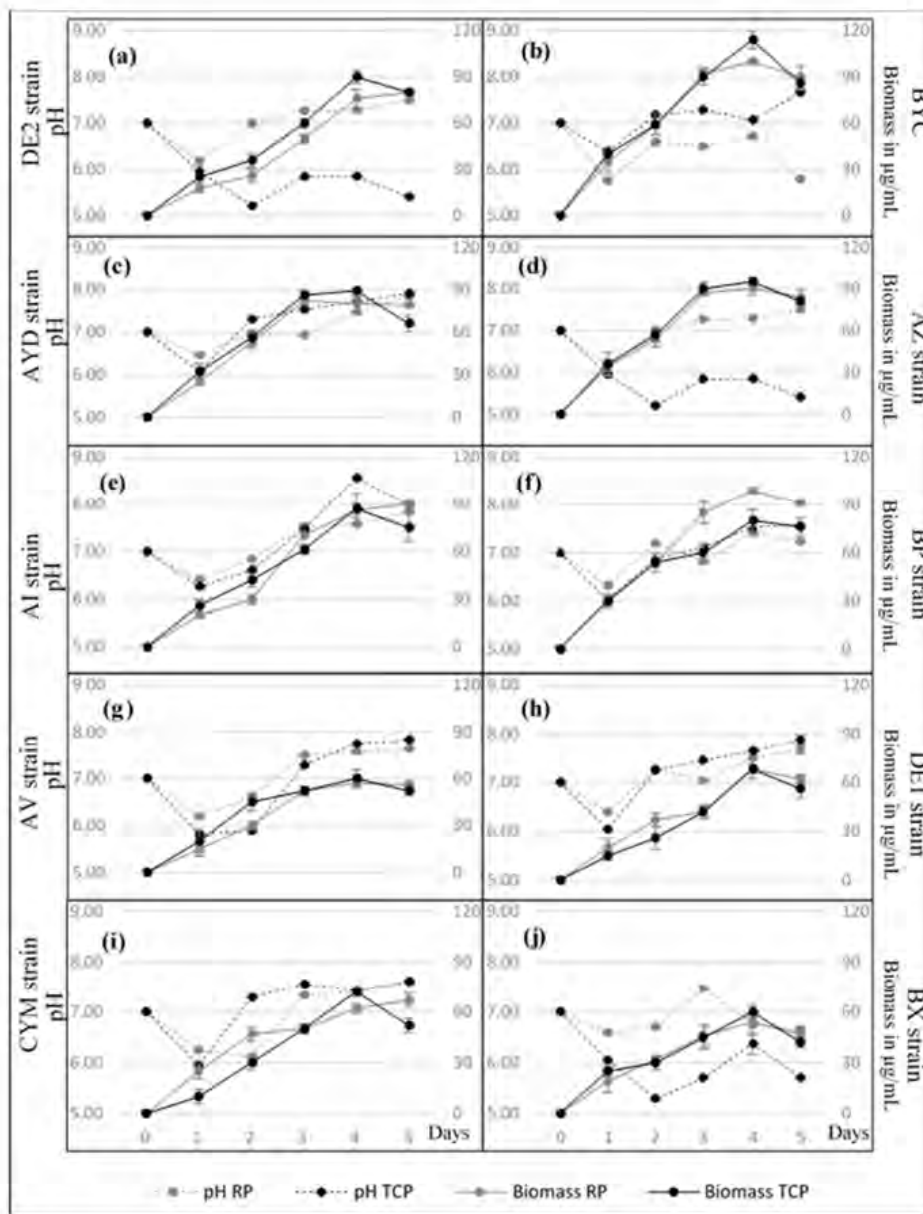
Figure 2 clearly shows that the growth kinetics of most strains was similar in both TCP and RP. This indicated that the strains were able to assimilate similar amounts of phosphorus from these phosphate insoluble sources, with a comparable efficiency, and use it for their own growth. The only exception was the strain BP that showed a better growth on SMM + RP than on SMM + TCP. One notes that, in SMM+ TCP mainly, most strains yielded a lower biomass at day 5 than at day 4, suggesting cell lysis. However, the biomass yield was not the same for all strains and the strains could be grouped into two classes, class I with biomass yield above 70  $\mu\text{g/mL}$  (DE2, BYC, AYD, AZ, AI and BP) and class II with biomass yield comprised between 50 and 70  $\mu\text{g/mL}$  (AV, DE1, CYM and BX) (Figure 3). One notes that strains with the lowest biomass yields are also those yielding the lowest amount of soluble phosphate (Figure 3).

### 3.4. Estimation of the Amount Soluble Phosphate Released from TCP and RP by the Selected Actinomycete Strains

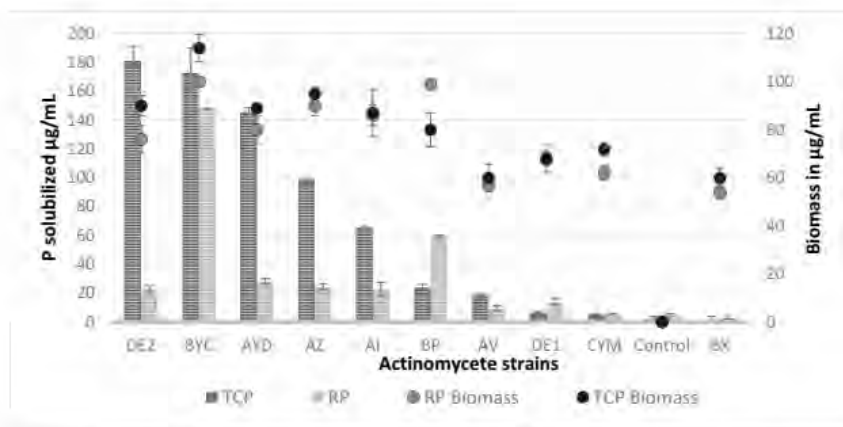
The concentration of free phosphate spontaneously released from TCP and RP in the control non-inoculated flask was 2.5 and 5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The concentration of soluble phosphate in the supernatant of most strains (except perhaps CYM and BX), exceeded this value (Figure 3). This indicated that most strains were able to release phosphate from these two different insoluble phosphate sources in excess of their phosphate need to support their growth. However, the amount of soluble phosphate released greatly varied with the nature of the phosphate source and from strain to strain.

Five strains released a high (>60  $\mu\text{g/mL}$ ) and higher amount of phosphate from TCP than from RP (Figure 3), indicating that TCP was more efficiently solubilized than RP. The presence of large amounts of phosphate in the supernatant of these strains in the presence of TCP simply indicated that the rate of Pi released from TCP exceeded its rate of consumption for bacterial growth.

Strain DE2 (class I) released maximal soluble phosphate concentration (180  $\mu\text{g/mL}$ ) from TCP, whereas strains BYC (class I) and BP (class I) released maximal amounts of soluble phosphate from RP (148.05  $\mu\text{g/mL}$  and 59.44  $\mu\text{g/mL}$ , respectively).



**Figure 2.** Evolution of the biomass (continuous lines) and the pH of the medium (dotted lines) of the selected Actinomycete isolates grown in SMM+ TCP (black circle) and SMM+ RP (gray circle). Error bars represent standard deviations of the mean values of the results of three independent culture replicates.



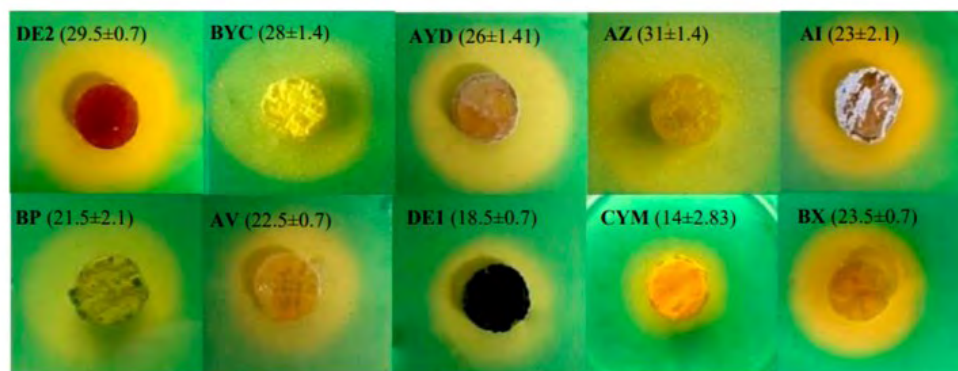
**Figure 3.** Concentration of soluble phosphate released ( $\mu\text{g/mL}$ ) from TriCalcium Phosphate (TCP, dark gray histograms) and natural Rock Phosphate (RP, light gray histograms) in the non-inoculated flasks (control) and in the supernatant of cultures of the ten selected Actinomycete isolates grown for five days in SMM containing 0.5 g/L RP or 0.5 g/L TCP. The maximal biomass yield in  $\mu\text{g/mL}$  of the 10 selected Actinomycete strains is shown above the histograms for TCP (black circles) and RP (gray circles). Error bars represent standard deviations of the mean values of the results of three independent culture replicates.

The strain BYC (class I) is of special interest since it was able to release a similar amount of Pi from RP (150  $\mu\text{g/mL}$ ) and TCP (170  $\mu\text{g/mL}$ ) and its biomass yield was similar with both phosphate sources (only 12% higher in SMM + RP than in SMM + TCP). The strains BP (class I) and DE1 (class II) released over 2 fold more soluble phosphate from RP (60  $\mu\text{g/mL}$  and 15  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) than from TCP (25  $\mu\text{g/mL}$  and 7  $\mu\text{g/mL}$ , respectively). The biomass yield of the strain BP was 20% higher in SMM + RP than in SMM + TCP whereas that of the strain DE1 was similar on both P sources. Interestingly, the strains BX (class II) and CYM (class II) consumed the totality of the phosphate released. This suggested that the solubilizing ability of these strains was less efficient than that of the others.

### 3.5. Cas-Agar Test and Evolution of the pH of the Growth Medium

The CAS-agar test indicated that the six more efficient TCP solubilizing Actinomycete strains (DE2, AYD, BYC, AZ, AI, BP) were producing siderophores (Figure 4) as previously reported for other PSM bacteria [20,44]. However, among these strains only BYC was able to efficiently release phosphate from RP. The strains BX, AV, DE1 and CYM apparently produced little siderophores (Figure 4) and were among the strains releasing very little phosphate from TCP or RP (Figure 3). This suggested that the production of siderophores contributes to the P solubilization process.

The pH of the growth medium of all strains in TCP as in RP fell between 6 and 6.5 at day 1 and raised afterwards in most cases. This indicated that the earliest solubilization process might involve the excretion of organic acids. The pH of the medium remained below 6 for the strains DE2, AZ and BX in TCP for the following days but reached 7 or above in RP. DE2 and AZ release a fair amount of P from TCP (180  $\mu\text{g/mL}$  and 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) but a rather weak amount from RP (20  $\mu\text{g/mL}$ ) whereas BX did not release any P from any of these phosphate sources. DE2 and AZ possibly excreted more siderophores than BX (Figure 4).



**Figure 4.** Halo of discoloration of CAS-agar around agar plugs of the ten most efficient TCP/RP solubilizing Actinomycete isolates originating from sugar beet soils of the Beni-Mellal region grown for five days in solid SMM containing 0.5 g/L TCP and deposited on the surface of a CAS-blue agar plate. The formation of the halo around the plugs is thought to be due to the excretion of siderophores. Diameters of the halos expressed in mm are shown in proximity of the name of the isolates.

In RP, the pH of the medium remained above 7 for most strains except for BYC (pH between 6.5 and 6.8 at days 2, 3 and 4) and CYM (pH 6 at days 1 and 2). BYC released a fair amount of phosphate from RP as well as from TCP (150 µg/mL and 170 µg/mL, respectively) whereas CYM hardly released any P from these two phosphate sources. BYC, but not CYM, was shown to excrete siderophores (Figure 4).

The pH of the medium of the 5 remaining strains (AYD, BP, AV, DE1 and AI) was rather similar in TCP and RP and above 7. AYD and AI, produced siderophores and released a fair amount of phosphate from TCP (140 µg/mL and 60 µg/mL, respectively) but a rather weak amount from RP (20 µg/mL). BP that is producing siderophores released more phosphate from RP (60 µg/mL) than from TCP (24 µg/mL). The latter two strains AV and DE1 were weak siderophore producers and yielded weak amount of phosphate from TCP (18 µg/mL and 7 µg/mL, respectively) as well as from RP (10 µg/mL and 14 µg/mL, respectively).

### 3.6. Taxonomical Characterization of the Selected Isolates

In order to determine whether the 10 isolates were similar or different strains, their ability to assimilate 10 different carbon sources was tested. Most strains were able to use mannitol, lactose, glucose, fructose, maltose, galactose, sucrose, sorbitol and glycerol as sole carbon sources, except AV that did not use mannitol, lactose, maltose, fructose and sorbitol; DE2, BYC, BP, AV and BX that did not use fructose; AYD that did not use maltose (Table 3) and DE2, BP and BX that did not use nor maltose nor fructose (Table 3). This preliminary analysis suggested that these strains were likely to be different.

These 10 isolates were also evaluated for their ability to withstand salt stress by growing at NaCl concentrations of 5, 7 and 10 g/L. All strains showed the best growth at 5 and 7 g/L NaCl (Table 3) except DE2, AYD and DE1, while CYM and BX showed better growth at 10 g/L NaCl (Table 3). Therefore, these strains could potentially be halotolerant. The analysis of cellular constituents of all isolates revealed the presence of L- diaminopimelic acid (DAP) isomer (Table 3), confirming that they belong to the *Streptomyces* genera.

The sequences of 16S rRNA gene of the 10 strains were analyzed using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> accessed: 29 March 2021) and the LEBIBI [39] and GenBank databases. They were all found to belong to the *Streptomyces* genus bearing an identity of at least 99%. Nucleotide sequences of partial 16S rRNA of the identified isolates were deposited into Gen-Bank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/> accessed: 29 March 2021), under the accession numbers listed in Table 4.



**Table 3.** Biochemical and morphological characteristics of the 10 selected isolates.

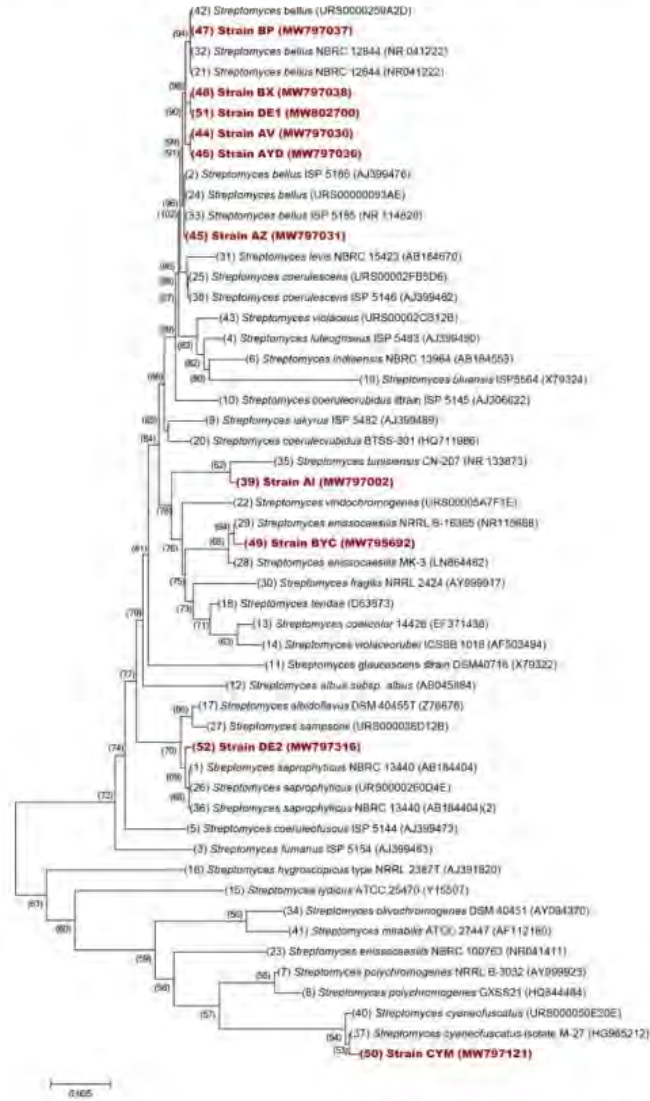
TCP Solubilizing Actinomycete Isolates										
Origin	Site 3			Site 1				Site 3	Site 2	Site 1
Strains	DE2	BYC	AYD	AZ	AI	BP	AV	DE1	CYM	BX
ISP 3	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
ISP4	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISP6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Aerial spore mass	White	White	Gray	Gray	Green	White	White	Clear green	White	White
Soluble pigment	Yellow	-	-	-	-	-	-	Yellow	-	-
Colony reverse	Yellow	Bright yellow	Brown	Yellow	Clear Gray	Yellow	Brown	Brown	Yellow	Green
DAP-isomer	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL
C. source utilization										
Mannitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Fructose	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Growth at different concentration of NaCl (g/L)										
5(g/L)	++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
7(g/L)	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10(g/L)	++	++	+	++	++	+	-	+++	+++	+++

+: Tested positive/utilized as substrate; -: tested negative/not utilized as substrate; +++: Strong growth/production; ++: Medium growth/production; +: Low growth/production.

**Table 4.** 16S rRNA identification of the 10 selected isolates.

Strains	16S rRNA Identification	Accession Number
AYD	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797036
DE2	<i>Streptomyces saprophyticus</i>	MW797316
BYC	<i>Streptomyces enissocaealis</i>	MW795692
AI	<i>Streptomyces tunisiensis</i>	MW797002
AZ	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797031
BP	<i>Streptomyces coeruleus</i>	MW797037
AV	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797030
CYM	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	MW797121
BX	<i>Streptomyces bellus</i>	MW797038
DE1	<i>Streptomyces bellus</i>	MW802700

16S rDNA sequences of *Streptomyces* species retrieved from Genbank as well as that of our strains were used for the construction of a phylogenetic tree (Figure 5). Six strains (BP, BX, DE1, AV, AYD and AZ) were closely related to *Streptomyces bellus*, AI was related to *S. tunisiensis*, BYC to *S. enissocaealis*, DE2 to *S. saprophyticus* and CYM to *S. cyaneofuscatus*.



**Figure 5.** Neighbor-joining phylogenetic tree of the 10 isolated strains and 42 *Streptomyces* species based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (1400 nt). Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on a Neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets; only values >50% are given. Accession numbers are given in parentheses. Bar, 0.005 nucleotide substitutions per site.

#### 4. Discussion

Most publications describing isolation of phosphate-solubilizing bacteria (PSB) used growth on TCP, rather than on RP, but analysis of scientific literature concerning biological P solubilization suggested that this substrate might not be the most appropriate to screen for PSB able to enhance plant growth [45,46]. In consequence, we instead used growth on RP as first screen to isolate PSM and our strategy and outcomes are summarized in Figure 6.



Figure 6. Schematic representation of the experimental strategy used to isolate efficient TCP/RP solubilizing Actinomycete strains.

Our study revealed that 28% of the Actinomycetes isolated from sugar beet soils had the ability to grow on RP as sole phosphate source and among them only 47.36% had also the ability to grow on TCP as sole phosphate source. This difference is difficult to explain but suggested that the TCP and RP solubilizing processes may involve different mechanisms or that the greatest diversity of mineral elements present in RP compared to TCP, is necessary for the growth of some strains.

Five strains (DE2, BYC, AYD, AZ and AI) among the ten strains studied were able to release significant amount of phosphorus from TCP ( $>60 \mu\text{g/mL}$ ). Their solubilization activity was comparable to that of *Azospirillum* sp., *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens*, from wheat rhizosphere in Jensen medium [47]; however, it was much higher than that reported for a *Streptomyces* sp. (AH6 strain) isolated from the rhizospheric soil of *Calluna vulgaris* L [20,48].

However, among these five efficient solubilizing strains, only one strain, BYC related to *Streptomyces enissocaealis* (Figure 5), was able to release similar amount of phosphorus from RP and TCP and another strain, BP, was able to release even more phosphate from RP than from TCP. These two strains are thus of special interest and the mass spec analysis of the molecules present in their supernatant is expected to lead to the purification and structural characterization of potentially novel siderophores and/or organic acids contributing to their efficient RP solubilization process.

In RP the pH of the medium of all strains, except that of BYC, was between 7 and 8, suggesting that the solubilization process does not involve the excretion of organic acids but rather that of siderophores [41,49]. The very efficient solubilization process of BYC might involve both the acidification of the growth medium and the excretion of siderophores.

In TCP, the growth medium of DE2 and AZ turned out to be acidic but that of the other strains was close to or above 7. This suggested that the TCP solubilization process of

DE2 and AZ might involve the excretion of organic acids. To our knowledge, that is the first report of Actinomycete strains solubilizing insoluble P via the production of organic acids. In this process, negatively charged organic acids are thought to chelate  $\text{Ca}^{2+}$  counter ions of phosphate [43,47]. A similar process was reported in other fungi such *Penicillium aurantiogriseum* [50] and *Penicillium radicum* [41,47,49,51].

In conclusion, we anticipate that our most efficient RP solubilizing strain, BYC, produced in large scale may constitute a novel kind of fertilizers useful to solubilize the phosphate trapped in the soil to feed and stimulate sugar beet growth. Such strategy would contribute to the development of a bio-based economy supporting a sustainable and environmentally friendly agriculture.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.H. and Y.A.; methodology, Y.A. and H.H.; software, Y.A., A.S. and S.L.; Validation H.H., S.L., D.D. and M.J.V.; formal analysis, H.H., S.L., A.S., F.K. and M.J.V.; investigation, Y.A. and H.H.; resources, H.H., A.H., S.L., S.E.K. and D.D.; data curation, Y.A., H.H., T.E.R., S.L. and M.J.V.; writing—original draft preparation, Y.A. and H.H.; writing—review and editing, H.H., M.J.V., D.D., S.L., A.S., A.H., N.S., T.E.R. and F.K.; visualization, H.H.; supervision, H.H.; project administration, H.H. and A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors would like to express their appreciation and gratitude to Jamal Koubali, Department of English, Beni Mellal, Sultane Moulay Slimane University, Morocco for his careful revision of the language of this manuscript. Also, authors are grateful for Laila Hamroud from the Laboratory of Zoology, University of Mons, Belgium for her help with soil samplings from the Beni-Mellal region.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Krishnaraj, P.U.; Dahale, S. Mineral phosphate solubilization: Concepts and prospects in sustainable agriculture. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **2014**, *80*, 389–405. [\[CrossRef\]](#)
2. Secco, D.; Bouain, N.; Rouached, A.; Prom-u-thai, C.; Hanin, M.; Pandey, A.K.; Rouached, H. Phosphate, phytate and phytases in plants: From fundamental knowledge gained in *Arabidopsis* to potential biotechnological applications in wheat. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
3. Ha, S.; Tran, L. Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2014**, *34*, 16–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Zou, X.; Binkley, D.; Doxtader, K.G. A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant Soil* **1992**, *147*, 243–250. [\[CrossRef\]](#)
5. Zhu, J.; Li, M.; Whelan, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Sci. Total Environ.* **2018**, *612*, 522–537. [\[CrossRef\]](#)
6. Chabot, R.; Antoun, H.; Cescas, M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar, *phaseoli*. *Plant Soil* **1996**, 311–321. [\[CrossRef\]](#)
7. Kishore, N.; Pindi, P.K.; Reddy, S.R. Plant biology and biotechnology: Plant diversity, organization, function and improvement. In *Plant Biology and Biotechnology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; Volume 1, pp. 1–827; ISBN 9788132222866.
8. Tirado, R.; Allsopp, M. Phosphorus in agriculture Problems and solutions. *Greenpeace Int.* **2012**, *35*, 3–30.
9. Mishra, K.B.; Kumar, K.; Dubey, P.N.; Aishwath, O.P.; Kant, K.; Sorty, A.M.; Bitla, U. Influence on yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) grown under semi-arid saline soil, due to application of native phosphate solubilizing rhizobacterial isolates. *Ecol. Eng.* **2016**, *97*, 327–333. [\[CrossRef\]](#)
10. Ben Farhat, M.; Boukhris, I.; Chouayekh, H. Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **2015**, *362*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
11. Bargaz, A.; Lyamlouli, K.; Chtouki, M.; Zeroual, Y.; Dhiba, D. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–25. [\[CrossRef\]](#)

12. De Boer, M.A.; Wolzak, L.; Slootweg, J.C. *Phosphorus, Reserves, Production and Applications*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; ISBN 9789811080319. [[CrossRef](#)]
13. Vassilev, N.; Vassileva, M.; Fenice, M.; Federici, F. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresour. Technol.* **2001**, *79*, 263–271. [[CrossRef](#)]
14. Karimi, E.; Safaie, N.; Shams-Baksh, M.; Mahmoudi, B. *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates Rhizoctonia damping-off disease on sugar beet. *Microbiol. Res.* **2016**, *192*, 221–230. [[CrossRef](#)]
15. Hamdali, H.; Bouizgame, B.; Hafidi, M.; Lebrihi, A.; Virolle, M.J.; Ouhdouch, Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* **2008**, *38*, 12–19. [[CrossRef](#)]
16. Verma, P.J.; Yadav, J.; Tiwari, N.K.; Jaiswal, K.D. Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *70*, 33–37. [[CrossRef](#)]
17. Walpola, B.C.; Yoon, M. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorus uptake. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 266–275. [[CrossRef](#)]
18. Redani, L. *Competitivité, Valorisation Des ressources et Objectifs de Sécurité Alimentaire pour la Filier Sucrière au Maroc*. Ph.D. Thesis, Gembloux Agro-Bio Tech Université de Liège, Gembloux, Belgium, 2015. Corpus ID: 161085096.
19. Hamdali, H.; Hafidi, M.; Virolle, M.J.; Ouhdouch, Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl. Soil Ecol.* **2008**, *40*, 510–517. [[CrossRef](#)]
20. Hamim, A.; Boukeskase, A.; Ouhdouch, Y.; Farrouki, A.; Barrijal, S.; Lucie, M.; Mrabet, R.; Duponnois, R.; Hafidi, M. Phosphate solubilizing and PGR activities of ericaceous shrubs microorganisms isolated from Mediterranean forest soil. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *19*, 1–8. [[CrossRef](#)]
21. Saravanakumar, K.; Arasu, V.S.; Kathiresan, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquat. Bot.* **2013**, *104*, 101–105. [[CrossRef](#)]
22. Soumare, A.; Boubekri, K.; Lyamlouli, K.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Kouisni, L. From isolation of phosphate solubilizing microbes to their formulation and use as biofertilizers: Status and needs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *7*, 1–14. [[CrossRef](#)]
23. Majeed, A.; Kaleem Abbasi, M.; Hameed, S.; Imran, A.; Rahim, N. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Barka, E.A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Meier-Kolthoff, J.P.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G.P. Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 1–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Elbehri, A.; Felloun, H.; Nbou, M.; Yamini, B.; Balaghi, R.; Hammani, A.; Mzouri, E.H.; Moussadek, R.; Elhaired, T.; Rouchdi, M.; et al. *Actes de l'Atelier de travail: «Projet pilote d'appui aux petits producteurs pour une meilleure adaptation aux changements climatiques dans la région du Tadla Azilal»*; Centre national de documentation; FAO: Beni Mellal, Morocco, 2011.
26. El Hammoumi, N.; Sinan, M.; Lekhlif, B.; Lakhdar, M. Use of multivariate statistical and geographic information system (GIS)-based approach to evaluate ground water quality in the irrigated plain of Tadla (Morocco). *Int. J. W. Res. Environ.* **2013**, *5*, 77–93. [[CrossRef](#)]
27. Barakat, A.; El Baghdadi, M.; Rais, J.; Nadem, S. Assessment of Heavy Metal in Surface Sediments of Day River at Beni-Mellal Region, Morocco. *Res. J. Environ. Earth Sci.* **2012**, *4*, 797–806.
28. El Baghdadi, M.; Barakat, A.; Mohamed, S.; Nadem, S. Heavy metal pollution and soil magnetic susceptibility in urban soil of Beni Mellal City (Morocco). *Environ. Earth Sci.* **2011**, 1–15. [[CrossRef](#)]
29. Carter, M.R.; Gregorich, E.G. *Physical and Chemical Methods of Soil and Water Analysis*, 2nd ed.; Canadian Society of Soil Science, Taylor & Francis: Abingdon, UK, 2006.
30. Hakkou, R.; Benzaazoua, M.; Bussière, B. Valorization of phosphate waste rocks and sludge from the Moroccan phosphate mines: Challenges and perspectives. *Procedia Eng.* **2016**, *138*, 110–118. [[CrossRef](#)]
31. Quin, P.; Joseph, S.; Husson, O.; Donne, S.; Mitchell, D.; Munroe, P.; Phelan, D.; Cowie, A.; van Zwieten, L. Lowering N<sub>2</sub>O emissions from soils using eucalypt biochar: The importance of redox reactions. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–14. [[CrossRef](#)]
32. Shirling, E.B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1966**, *16*, 313–340. [[CrossRef](#)]
33. Olsen, S.R.; Sommers, L.E. *Methods of Soil Analysis, Part 2*; American Society of Agronomy: Madison, WI, USA, 1982; pp. 403–430.
34. Schwyn, B.; Neilands, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 47–56. [[CrossRef](#)]
35. Loudon, B.C.; Haarmann, D.; Lynne, A.M. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J. Microbiol. Biol. Educ.* **2011**, *12*, 51–53. [[CrossRef](#)]
36. Nonomura, H. Key for classification and identification of 485 species of the *Streptomyces* included in the ISP. *J. Ferment. Technol.* **1974**, *52*, 78–92.
37. Becker, B.; Lechevalier, M.P.; Gordon, R.E.; Lechevalier, H.A. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **1964**, *12*, 421–423. [[CrossRef](#)]
38. Hopwood, A.D.; Bibb, J.M.; Chater, F.K.; Kjeser, T.; Bruton, C.J.; Kieser, H.M.; Lydiate, J.D.; Smith, P.C.; Werd, J.M.; Schrempf, H. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*; The John Innes Foundation: Norwich, UK, 1986. [[CrossRef](#)]

39. Flandrois, J.P.; Perrière, G.; Gouy, M. le BIBIQBPP: A set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinform.* **2015**, *16*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Felsenstein, J. Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* **1985**, *125*, 1–15. [[CrossRef](#)]
42. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111–120. [[CrossRef](#)]
43. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
44. Ahemad, M.; Kibret, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. KING SAUD Univ. Sci.* **2013**, 1–20. [[CrossRef](#)]
45. Mahamuni, S.V.; Wani, P.V.; Patil, A.S. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. *Asian J. Biochem. Pharm. Res.* **2012**, *2*, 237–244.
46. Nath, D.; Maurya, B.R.; Meena, V.S. Documentation of five potassium- and phosphorus-solubilizing bacteria for their K and P-solubilization ability from various minerals. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2017**, *10*, 174–181. [[CrossRef](#)]
47. Narula, N.; Kumar, V.; Behl, R.K.; Deubel, A.; Gransee, A.; Merbach, W.; Science, S.; Nutrition, P. Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2000**, *163*, 393–398. [[CrossRef](#)]
48. Pikovskaya, R.I. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology* **1948**, *17*, 362–370.
49. Panda, P.; Somsubhra, C.; Ray, D.P.; Mahato, B.; Pramanik, B.; Choudhury, A. Solubilization of tricalcium phosphate and production of IAA by phosphate solubilizing bacteria isolated from tea rhizosphere soil. *Econ. Aff.* **2015**, *60*, 805–809. [[CrossRef](#)]
50. Illmer, P.; Schinner, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **1992**, *24*, 389–395. [[CrossRef](#)]
51. Whitelaw, M.A.; Harden, T.J.; Helyar, K.R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* **1999**, *31*, 655–665. [[CrossRef](#)]



Article

# Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp.

Yassine Aallam <sup>1</sup>, Bouchra El Maliki <sup>2</sup>, Driss Dhiba <sup>3</sup>, Sanaa Lemriss <sup>1,4</sup>, Amal Souiri <sup>4</sup>, Abdelmajid Haddioui <sup>1</sup>, Mika Tarkka <sup>5</sup> and Hanane Hamdali <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Biotechnology and Valorization of Plant Genetic Resources, Faculty of Sciences and Technology, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, Beni-Mellal 23000, Morocco; yassine.aallam@gmail.com (Y.A.); slemriss@lram-fgr.ma (S.L.); ahaddioui@yahoo.fr (A.H.)
- <sup>2</sup> Faculty of Medicine and Pharmacy, University Hassan II, Casablanca 20250, Morocco; b.elmaliki@gmail.com
- <sup>3</sup> International Water Research Institute (IWRI), Moulay Rachid, University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), Ben Guerir 43150, Morocco; driss.dhiba@um6p.ma
- <sup>4</sup> Laboratory of Research and Medical Analysis of Gendarmerie Royale, Department of Biosafety PCL3, Rabat 10090, Morocco; asouiri@lram-fgr.ma
- <sup>5</sup> UFZ—Helmholtz-Centre for Environmental Research, Soil Ecology Department, Theodor-Lieser-Straße 4, 06120 Halle, Germany; mika.tarkka@ufz.de
- \* Correspondence: hanane.hamdali@usms.ac.ma; Tel.: +212-523485112; Fax: +212-523485201



**Citation:** Aallam, Y.; Maliki, B.E.; Dhiba, D.; Lemriss, S.; Souiri, A.; Haddioui, A.; Tarkka, M.; Hamdali, H. Multiple Potential Plant Growth Promotion Activities of Endemic *Streptomyces* spp. from Moroccan Sugar Beet Fields with Their Inhibitory Activities against *Fusarium* spp. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1429. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071429>

Academic Editors: Pedro M. Santos and Pedro Castro

Received: 19 May 2021

Accepted: 11 June 2021

Published: 2 July 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The characterized 10 *Streptomyces* isolates were previously selected by their abilities to solubilize phosphates. To investigate whether these isolates represent multifaceted plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), their potassium-solubilizing, auxin-producing and inhibitory activities were determined. The 10 *Streptomyces* spp. yielded a variable biomass in the presence of insoluble orthoclase as the sole potassium (K) source, indicating that they were able to extract different amounts of K from this source for their own growth. Three strains (AZ, AYD and DE2) released soluble K from insoluble orthoclase in large amounts into the culture broth. The production levels ranged from 125.4 mg/L to 216.6 mg/L after 5 days of culture. Only two strains, *Streptomyces enissocaealis* (BYC) and *S. tunisiensis* (AI), released a larger amount of soluble K from orthoclase and yielded much more biomass. This indicated that the rate of K released from this insoluble orthoclase exceeded its consumption rate for bacterial growth and that some strains solubilized K more efficiently than others. The results also suggest that the K solubilization process of AZ, AYD and DE2 strains, the most efficient K-solubilizing strains, involves a slight acidification of the medium. Furthermore, these 10 *Streptomyces* spp. were able to secrete indole acetic acid (IAA) in broth medium and ranged from 7.9 ± 0.1 µg/mL to 122.3 ± 0.1 µg/mL. The results of the antibiosis test proved the potential of the 10 tested strains to limit the growth of fungi and bacteria. In dual culture, *S. bellus* (AYD) had highest inhibitory effect against the three identified fungal causal agents of root rot of sugar beet: *Fusarium equiseti* and two *F. fujikuroi* at 55, 43 and 36%, respectively. *Streptomyces enissocaealis* (BYC), *S. bellus* (AYD) and *S. saprophyticus* (DE2) exhibited higher multifaceted PGPR with their potassium-solubilizing, auxin-producing and inhibitory activities, which could be expected to lead to effectiveness in field trials of sugar beet.

**Keywords:** *Streptomyces* spp.; potassium solubilization; orthoclase; biocontrol; root rot; sugar beet

## 1. Introduction

One of the most commonly cultivated plants used in the sugar industry is sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Production of sugar from this crop is the second largest in the world after production from sugar cane [1], but sugar beet is more resilient, coping with less favorable environmental conditions than sugar cane [2]. In Morocco, sugar beet occupies an area of 57,171 hectares with a production of 3.7 million tons in 2019 [3]. The Beni Mellal- Khenifra

region (east of Casablanca), located in a vast agricultural plain in Morocco, represents 26% of the national production with an area of 15,000 hectares [4], and contributes 20.5% and 21.2% to the national area and production of sugar beet in Morocco, respectively [5].

Sugar beet requires balanced fertilization by the three macronutrients, nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K). Potassium is one of the most important elements for sugar beet nutrition and plays a significant role in enzyme activation, charge balance, osmoregulation and reduction in the negative effects of drought stress [6,7]. In sugar beet, K is also involved in biosynthesis and transfer of sucrose to storage roots [8]. Harafy et al. [9] found that the application of K significantly improved root yield, length, diameter and fresh root weight of sugar beet. Additionally, many studies have reported that K and N enhance the biosynthesis of organic metabolites which increase the yield and quality of sugar beet [10]. In soil, K is a mineral element which represents a minor soluble part, ranging from 1.00 to  $1.5 \times 10^{-3}$  mmol/L, and is thus unavailable for plant uptake [11]. In soil, potassium (98%) exists in the form of silicate minerals (orthoclase, feldspars, muscovite, microline, etc.) [12].

In contrast to the well-documented action of phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing microorganisms in plant P and N nutrition [13,14], the importance of microbial activity on plant K nutrition is less well understood. It has been shown that bacteria and mycorrhizal fungi do solubilize mineral K by various mechanisms such as production of alkaline substances including ammonia and other metabolites upon death of microbial cells and subsequent proteolysis [15,16]. K-solubilizing bacteria (KSB) have attracted more attention because of their ability to increase plant growth and yield [17]. However, very few studies have demonstrated these abilities of KSB [18–23]. To date and to the best of our knowledge, this is the first time that such a study has been undertaken, especially on the endemic Actinobacteria from sugar beet rhizospheres in the Beni-Mellal region with these PGPR criteria.

As in all plants, sugar beets are parasitized by a number of fungi that are able to attack one or more of their organs, reducing their growth and the reserves accumulated in roots. *Rhizoctonia solani* represents one of the major constraints in the production of sugar beets around the world [24] and is the main cause of various plant diseases, especially root rot [25]. *Fusarium* sp. is another damaging agent of sugar beet, causing root rot [26–28]. Plants infected with *Fusarium* spp. show early symptoms: the color of the leaves turns yellow and they die, the petioles also wilt around the crown and the root yield and the percentage of sucrose are reduced [29]. Moreover, *Rhizoctonia crocorum*, *Phoma betae*, *Aphanomyces cochlidioides*, *Macrophomina phaeseolina*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora drechsleri*, *Sclerotium rolfsii* and *Rhizopus stolonifer* are also causative agents of root rot of sugar beets [30,31].

Actinobacteria are known by the production of phytohormones such as ethylene, gibberellic acid, indole-3-acetic acid (IAA), cytokines and ACC deaminases [32–35]. Moreover, Actinomycetes can have antimicrobial activities and effects against phytopathogens [36–38]. From the 10,000 antimicrobial molecules produced by Actinomycetes, more than 50% were isolated from Streptomycetes [39].

Therefore, this research aimed to assess if the 10 strongly P-solubilizing strains of Streptomycetes of the sugar beet rhizosphere in Beni-Mellal [40] possess multifaceted PGPR activities, and tested their abilities to solubilize K from insoluble orthoclase, produce auxins and inhibit sugar beet root pathogens in laboratory conditions. Through these experiments, we expected to identify the most effective strains of the collection for future field trials.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Actinomycete Strains

Ten selected Actinomycete strains used in this study were isolated from three different sugar beet rhizospheres that were previously selected for their abilities to solubilize insoluble phosphate forms (a Moroccan natural rock phosphate and a synthetic tricalcium phosphate) using the SMM medium and to produce siderophores [40]: AYD, AZ, AV and



BX related to *Streptomyces bellus*; BYC: *Streptomyces enissocaesilis*; AI: *Streptomyces tunisiensis*; BP: *Streptomyces coeruleus*; CYM: *Streptomyces cyaneofuscatus*; DE1: *Streptomyces bellus* and DE2: *Streptomyces saprophyticus*. Spores of the selected Actinomycete isolates were stored in 20% sterile glycerol at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for the next tests.

## 2.2. Actinomycete Abilities to Use Orthoclase as Sole Potassium Source

Potassium solubilization by the 10 Actinomycete strains was carried out on modified Aleksandrov agar medium (AMM) [41], containing 5.0 g/L glucose, 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{CaCO}_3$ , 0.006 g/L  $\text{FeCl}_3$ , 2.0 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and orthoclase powder (2.0 g/L) [42] as a unique K source, or on AMM containing soluble  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.5 g/L) as a positive control or no K source as a negative control. After plating, the agar plates were incubated for 21 days at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  in order to allow growth of the slow-growing Actinomycetes.

## 2.3. Quantitative Estimation of the Amount of Solubilized Potassium by the Selected Actinomycete Strains

Three different tests with  $10^6$  spores/mL of each of the ten selected Actinomycete strains were inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid AMM with 2 g/L of orthoclase as the sole natural K source were carried out in triplicate, and the cultures were grown for 5 days at  $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  on a rotary shaker (180 g/min) [41]. Every day, a 1 mL aliquot of each culture was taken and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min, and dry biomass and the pH of the supernatant were determined. The supernatant was analyzed for soluble K content by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy according to Liu et al. [43]. Similar measures were carried out in non-inoculated flasks incubated in the same conditions.

## 2.4. Assay for Indole Acetic Acid (IAA) Production

The production of IAA was evaluated on liquid Luria-Bertani (LB) medium supplemented with L-tryptophan (Merck, Darmstadt, Germany) (1 g/L) [44]. The growth medium used contained tryptone (Merck) (10 g); yeast extract (Merck) (5 g); NaCl (5 g) in 1 L of deionized water. This medium was sterilized at  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Sterilized tubes containing 10 mL of the medium were inoculated with 20  $\mu\text{L}$  of actinobacterial cultures ( $10^7$  cfu/mL) and incubated at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 72 h with moderate stirring at 130 rpm/min. The determination of the IAA concentration was carried out by the addition of 2 mL of Salkowski's reagent (2% (w/v) 0.5 M  $\text{FeCl}_3$  in 35% perchloric acid) to 1 mL of the culture supernatant previously centrifuged for 10 min at  $10,000 \times g$ . A pink color indicated the presence of IAA. The IAA concentration produced was estimated by measuring the OD at 530 nm after 30 min of incubation in the dark [45]. The concentration of IAA produced by each Actinomycete strain was determined by the generation of a standard curve.

## 2.5. Isolation of Fungi from Symptomatic Sugar Beet Roots

Filamentous fungi were collected during a sugar beet harvesting campaign in June 2020. The contaminated sugar beet site was located 25 km from Beni Mellal city ( $32^{\circ}29'34.2''$  N  $6^{\circ}10'56.1''$  W, center of Morocco). This infected site has a warm Mediterranean climate with a temperature ranging between 1.1 and  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and a mean annual rainfall generally between 350 and 650 mm/year [46]. In sterile plastic bags, roots with symptoms of damage and fungi infection were harvested and isolated aseptically (Figure 1).

According to the modified protocol of Chenaoui et al. [47], the surface soil of contaminated sugar beet root was removed. To cultivate rhizoplane fungi that may be associated with the root symptoms and interact with rhizosphere Streptomyces, the mycelium on the root surface was scraped off with a sterile platinum loop and plated on potato dextrose agar (PDA) medium (Merck, France). The PDA medium used contained potato infusion (4 g), dextrose (20 g) and agar (17 g) in 1L of deionized water at a final pH of  $5.6 \pm 0.2$ . Plates were incubated in the dark at  $26 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 7–8 days and checked every day. Hyphae were purified and preserved on PDA medium for further study.



**Figure 1.** Symptomatic sugar beet roots and field with the isolated *Fusarium* spp. causal agent of root rot disease in Beni Mellal, Morocco.

#### 2.6. Molecular Determination of Isolated Fungi (DNA Extraction and ITS Amplification)

Preliminary identification of the three selected fungi (CHAMP1, CHAMP2 and CHAMP3) was performed by microscopic observation of the plates with lacto phenol blue, direct examination with 20% KOH Chinese ink and by description of the macroscopic features of colonies after a period of incubation of eight to ten days at 25 °C.

For molecular identification, fungal DNA was isolated from pure cultures on Sabouraud agar medium of three selected isolates. Approximately 1 cm<sup>2</sup> of mycelium was collected and added to an Eppendorf tube containing 1 mL of distilled water and 12 to 15 glass beads with a diameter of 3 mm (Merck). After vortexing at maximum speed for 2 min, 300 µL of the suspension containing fragmented mycelium was used for automated extraction of DNA with the Maxwell<sup>®</sup> RSC Instrument (Promega, Madison, WI, USA) and the Maxwell RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified with the universal primers ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [48]. The nuclear rDNA segment corresponding to the D2 region of the fungal 28S ribosomal RNA (28S-D2 rDNA) was amplified with the primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3') [49]. The 18S ribosomal RNA region was amplified with the primers FR1 (5'-ANC CAT TCA ATC GGT ANT-3') and FF390 (5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3') [48].

Amplifications were carried out in a 25 mL reaction mixture containing 5 µL of PuRe Taq Ready-To-Go PCR Mix (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), 4.5 pmol of each primer, 9.1 µL of water and 50 ng of DNA. PCR conditions were as follows: after initial denaturation (95 °C for 3 min), 45 cycles of 95 °C for 1 min, 54 °C for 1 min s and 72 °C for 2 min, followed by a final extension (7 min, 72 °C). All amplifications were carried out using a GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems). Negative controls were included with no addition of template DNA. PCR products were visualized on a 2% (*w/v*) agarose gel stained with ethidium bromide. The nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 region, 28S ribosomal RNA region and 18S ribosomal RNA region were sequenced bidirectionally with primers ITS1 and ITS4, NL1 and NL4, and FR1 and FF390, respectively.

Sequences similarities were performed against corresponding sequences of *Fusarium* species using GenBank through Nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (accessed on 3 April 2021)). An unrooted phylogenetic tree was inferred using the neighbor-joining method [50]. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches [51]. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method [52] and

are in the units of the number of base substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [53].

### 2.7. In Vitro Antagonistic Activity Assays

The plate diffusion method was used to assess the wide-spectrum antimicrobial activity of the 10 selected strains [54] against the following Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* CCMM/B4 and *Pseudomonas aeruginosa* CCMM/B90, *Klebsiella pneumoniae* E40, *Salmonella* sp. CCMM/B17; the following Gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis* ATCC 9524, *Staphylococcus aureus* CCMM/B2, *Streptococcus* sp. CCMM/B24; and the yeast *Candida albicans* CCMM/L11 (all strains from the collection of BVRP Laboratory, USMS Beni Mellal) and three fungi isolated from the infected field of sugar beet rhizospheres, Beni Mellal, Morocco, as described above. These 10 selected *Streptomyces* spp. were grown on solid SMM [55] for 14 days and then three disks (diameter 10 mm) were cut out and placed on lawns grown for 48 h of the different microorganisms on nutrient agar (Difco, Sparks, MD, USA) for bacteria and yeast. Plates were first stored at  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at least 2 h to allow the diffusion of any substances produced, and then incubated at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sizes of the inhibition zones were determined after 24 h of incubation for bacteria and yeast. Controls involved the use of sterile agar plugs. Three replicates were performed for each isolate in each microorganism test.

For fungi, we followed the technique of dual culture from Karimi et al. [56], which was slightly modified. Briefly, disks of 10 mm in diameter from 5-day-old cultures of fungi were placed in the center of Sabouraud agar plates and the disks of tested Actinomycete strains were placed on either side of Sabouraud plates at a distance of 2.5 cm. After 5 days of incubation at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the diameter of propagation of the fungi was recorded and the percentage of inhibition (PI) was calculated:  $PI = [(T - S)/T] \times 100$ ; where T represents the mycelial colony radius (mm) of a control culture and S represents the mycelial colony radius of the fungus in the presence of the *Streptomyces* strain [40].

### 2.8. Statistical Analysis and Detection of the Most Promising Strains for Simultaneous Biofertilizer and Biocontrol Applications

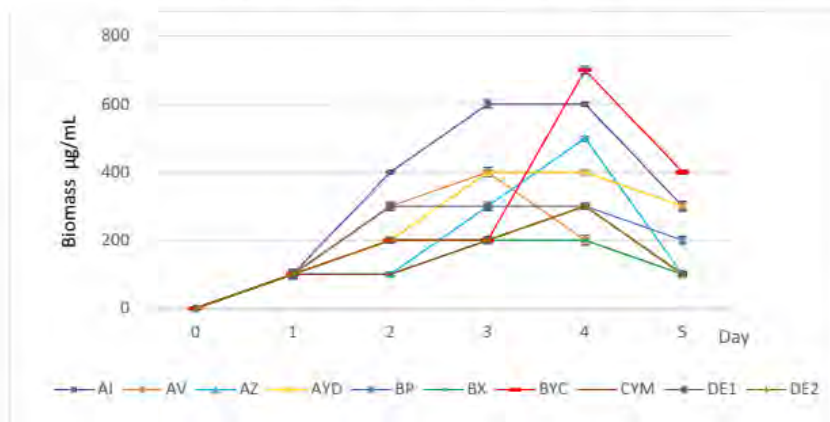
All experimental results were subjected to analysis of variance (ANOVA) using SPSS statistical software, version 23.0 (IBM, New York, NY, USA). The results were expressed as mean  $\pm$  SD. The means were compared using the least significant difference (LSD) test.  $p < 0.05$  indicates significant differences. To select the most promising *Streptomyces* isolates for combined biofertilizer and biocontrol applications, their relative activities in rock phosphate and tricalcium phosphate and of potassium solubilization, antifungal activity against *Fusarium* spp., antibacterial activity and production of IAA and siderophores were cross-compared between the strains and used to grade them from 1 (lowest) to 10 (highest activity). In order to achieve the aim of selecting combined biofertilizer and biocontrol agents, the rating values for rock phosphate and potassium solubilization, IAA production and *Fusarium* inhibition were weighted by 2 (doubled).

## 3. Results

### 3.1. Growth Kinetics of the Selected Actinomycete Strains in AMM + Orthoclase

The ten tested Actinomycete strains exhibit clear development on solid AMM with orthoclase as the sole potassium source. Figure 2 shows that the growth kinetics of most strains was variable from strain to strain. This indicated that the strains were able to assimilate variable amounts of potassium from these insoluble K sources, with a different efficiency, and use it for their own growth. The only exceptions were the strains BYC and AI that showed a better growth on AMM + orthoclase. In mainly AMM + orthoclase, all strains yielded a lower biomass at day 5 than at day 4, suggesting cell lysis. However, the biomass yield was not the same for all strains and the strains could be grouped into three classes: class I with biomass yield  $\geq 600\text{ }\mu\text{g/mL}$  (BYC and AI), class II with biomass yield

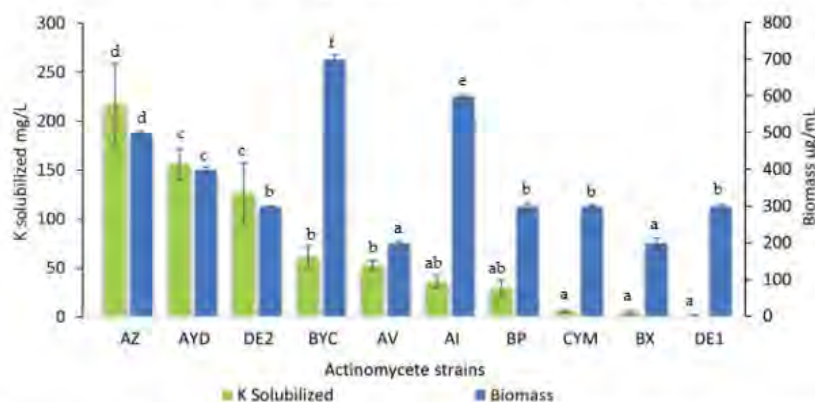
between 300 and 600  $\mu\text{g/mL}$  (AZ, DE1, BP, CYM, DE2, AV and AYD) and class III with biomass yield below 200  $\mu\text{g/mL}$  (BX strain) (Figure 2).



**Figure 2.** Evolution of the biomass of the selected Actinomycete strains grown in the liquid AMM + orthoclase. Error bars represent standard deviations of the mean values of the results of three independent culture replicates.

### 3.2. Estimation of the Amount Soluble Potassium Released from Orthoclase by the Selected Actinomycete Strains

The concentration of soluble K in the supernatant of all 10 selected Streptomyces strains from the sugar beet rhizospheres was assessed (Figure 3).



**Figure 3.** Concentration of soluble potassium released (mg/L) from orthoclase in the supernatant of cultures of the ten selected Actinomycete strains (green bars) grown for five days in AMM containing 2 g/L orthoclase with values subtracted from those of the non-inoculated flasks. The maximal biomass yield in  $\mu\text{g/mL}$  of the 10 selected Actinomycete strains is shown in the histogram (blue bars). Error bars represent standard deviations of the mean values of the results of three independent culture replicates. Different lowercase letters above bars show significant differences between treatments at  $p \leq 0.05$ .

All strains were able to release potassium, except for the DE1 strain that likely used it for its own growth. The amount of soluble K released greatly varied from strain to strain and ranged from 3.8 mg/L to 216.6 mg/L. Three strains (AZ, AYD and DE2) released a large amount of potassium in the AMM supernatants (>100 mg/L) (Figure 3). The presence of

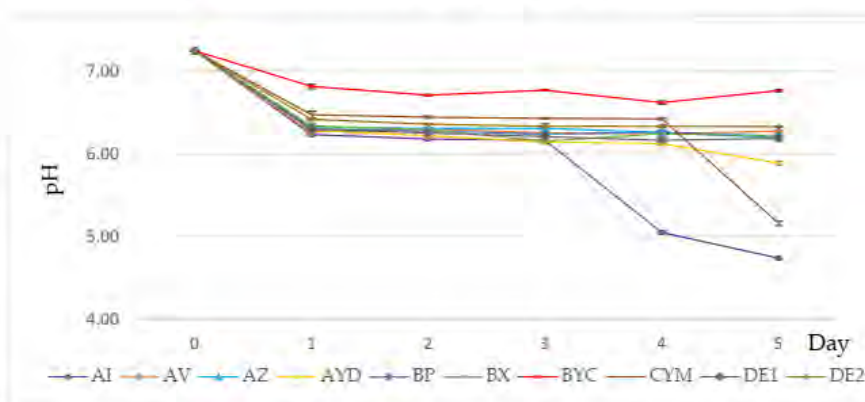
large amounts of K in the supernatant of these strains in the presence of orthoclase simply indicated that the rate of K released from orthoclase exceeded its rate of consumption for bacterial growth. As expected, strains with the lowest biomass yields (Figure 2) solubilized the smallest amounts of potassium (Figure 3).

Strains AZ and AYD (class II) released the maximal soluble K concentration (216.6 mg/L and 155.6 mg/L, respectively), whereas strains BYC and AI (class I) released approximately 2- to 3-fold smaller amounts of soluble K from orthoclase (61 mg/L and 35.8 mg/L, respectively) (Figure 3).

The strain BYC (class I) is of special interest since it was able to release a large amount of K from orthoclase (61 mg/L) and its biomass yield was the highest (Figure 3). The strains AYD and DE2 (class II) released over 2-fold more soluble K from orthoclase (155.6 mg/L and 125.4 mg/L, respectively) than the BYC strain (Figure 3). The biomass yield of the strain AI was 14% lower than that of the strain BYC in similar culture conditions. Interestingly, the strains DE1 (class II) and BX (class III) did not increase the amount of soluble potassium in the culture medium. This suggested that the K-solubilizing ability of these strains was less efficient than that of the others.

### 3.3. PH Evolution of the Growth Medium

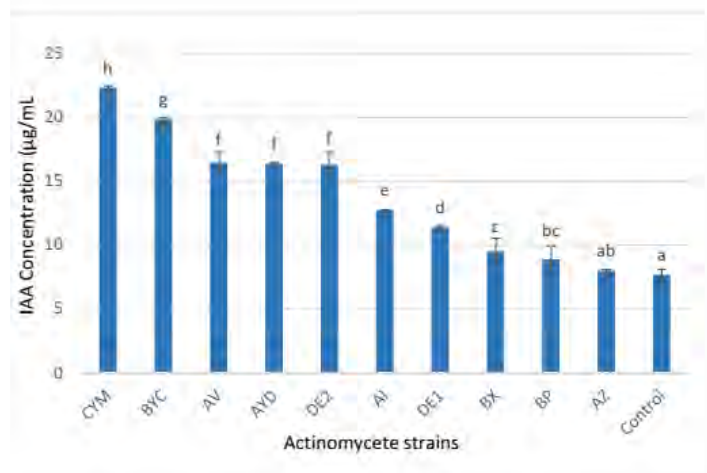
The pH of the growth medium of all strains in orthoclase was between 7.2 and 6.2 at day 1 and stabilized afterwards in most cases at approximately pH 6.2, except for AI, CYM and AYD strains (Figure 4). This indicated that the solubilization process might involve the excretion of organic acids. The pH of the medium decreased below 6 for the AI strain from day 3 (Figure 4). The AYD strain released the largest amount of K (155.6 mg/L) whereas AI released a fair amount of K from orthoclase (35.8 mg/L) and CYM released a rather small amount (5.15 mg/L) (Figure 3). The pH of the medium of the seven remaining strains (AZ, AYD, DE2, BYC, AV, BP and BX) was similar and stabilized at pH 6 (Figure 4), suggesting their abilities to solubilize K by organic acid production.



**Figure 4.** Evolution of the pH of the medium of the selected Actinomycete strains grown in AMM + orthoclase. Error bars represent standard deviations of the mean values of the results of three independent culture replicates.

### 3.4. Indole Acetic Acid (IAA) Production

The results of IAA production of the 10 selected *Streptomyces* spp. are shown in Figure 4. IAA production was detected in all strains in significantly different amounts, ranging from 7.9 to 22.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The highest concentration was produced by the CYM and BYC strains ( $22.3 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $19.8 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) followed by AV ( $16.4 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), AYD ( $16.3 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) and DE2 ( $16.2 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). The lowest values,  $7.9 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $8.8 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ , were obtained by BP and AZ, respectively (Figure 5).



**Figure 5.** Concentration of indole acetic acid released ( $\mu\text{g/mL}$ ) in the non-inoculated flasks (control) and in the supernatant of cultures of the ten selected Actinomycete strains grown for 72 h in liquid LB medium containing L-tryptophan (1 g/L). After addition of 2 mL of Salkowski's reagent, the formation of the pink color indicated the presence of IAA and the IAA concentration produced was estimated by measuring the OD at 530 nm after 30 min of incubation in the dark. Error bars represent standard deviations of the mean values of the results of three independent culture replicates. Different lowercase letters above bars shows significant differences between treatments at  $p \leq 0.05$ .

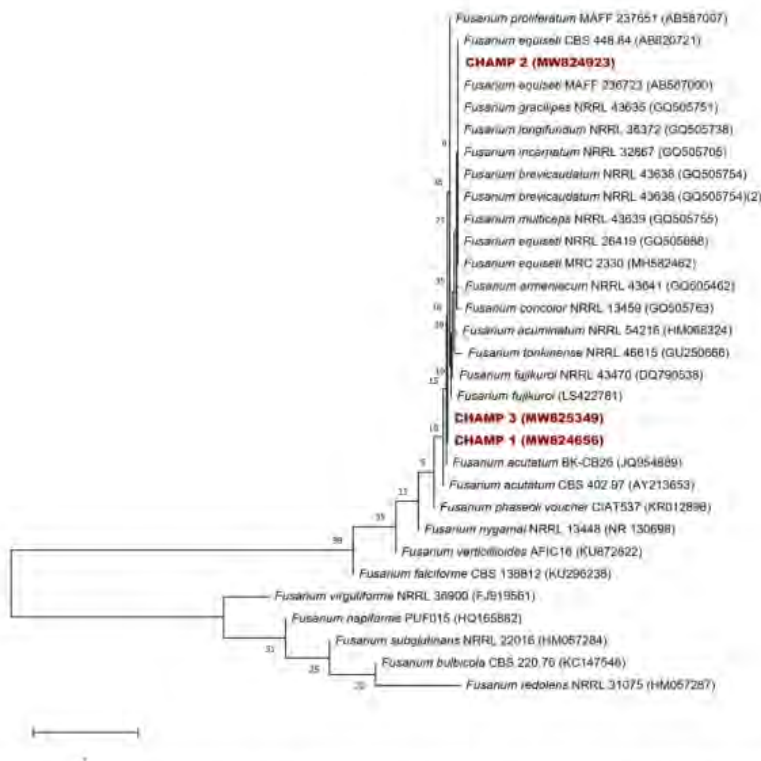
### 3.5. Identification of the Isolated Fungi from the Field

The result of preliminary identification shows that the three selected isolates (CHAMP1, CHAMP2 and CHAMP3) belong to the genus *Fusarium*. Macroscopically, most colonies were characterized by their cottony appearance, salmon pigmentation and purple, lilac, light brown, yellow or gray color. Microscopically, colonies were characterized by hyaline hyphae, septate and filamentous; septate macroconidia, fusiform with characteristic appearance of alantoespora, oval microconidia and, in some cases, chlamydoconidia of thick walls.

The fungi sequences of three selected isolates were analyzed using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (accessed on 3 April 2021)). They belonged to the *Fusarium* genus, bearing an identity of at least 99% and confirmed our result of preliminary identification.

Nucleotide sequences of the identified fungi were deposited in the GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/> (accessed on 3 April 2021)), and were assigned accession no. MW824656 (*Fusarium equiseti*), MW824923 (*Fusarium fujikuroi*) and MW825349 (*Fusarium fujikuroi*).

A small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 sequences (513 nt) of 28 *Fusarium* species retrieved from GenBank, as well as those of our strains, were used for the construction of a phylogenetic tree (Figure 6). Two fungi (CHAMP1 and CHAMP3) were closely related to *F. fujikuroi* and the isolate CHAMP2 was related to *F. equiseti*.

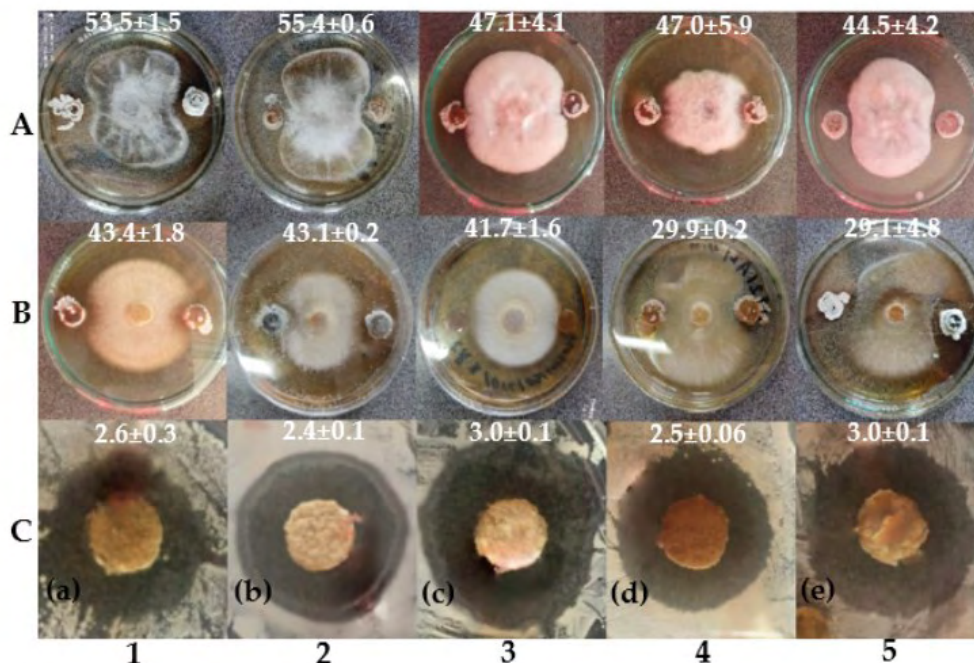


**Figure 6.** Neighbor-joining phylogenetic tree of the three isolated fungal strains (CHAMP 1, CHAMP 2 and CHAMP 3) and 28 *Fusarium* species based on small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2 sequences (513 nt). Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets; only values > 50% are given. Accession numbers are given in parentheses. Bar marks one nucleotide substitution per site.

### 3.6. In Vitro Antagonistic Activity Assays

We evaluated the antagonistic activity of our 10 selected *Streptomyces* spp. against the three identified sugar beet rhizoplane fungi, pathogenic bacteria and yeast (Figure 7). All *Streptomyces* spp. showed an antagonistic activity at different inhibition percentages (PIs). PIs ranged from 6.9% (BX strain) to 55.4% (AYD strain). The AYD strain exhibited a significantly higher inhibitory effect (PI) against the identified fungi, two *Fusarium fujikuroi* (CHAMP1) and *F. equiseti* (CHAMP2), at 55.4% ± 0.6 and 43.1% ± 0.2, respectively (Figure 7), whereas the lowest activity was shown by the AZ strain.

None of the 10 tested *Streptomyces* isolates showed activity against the Gram-positive *Bacillus subtilis* or *Streptococcus* sp., or Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*. Significant inhibition activity was shown by CYM, DE1 and AZ strains against *Staphylococcus aureus*. The 10 *Streptomyces* spp. were not able to limit growth of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, except the AYD strain. Only the BYC and AYD strains had a significantly strong inhibitory activity against *Salmonella* sp. Except the AYD and AV strains, all the tested strains had inhibitory activity against *Klebsiella pneumoniae*. The BYC, BP and DE1 strains produced the largest inhibition zones. Nine out of the ten *Streptomyces* sp. (except the BX strain) inhibited growth of *Candida albicans*, and the DE2, CYM and DE1 strains produced the largest inhibition zones (Table 1).



**Figure 7.** Performance comparison between the five most active *Streptomyces* spp. (1: DE2; 2: AYD; 3: BYC; 4: AI and 5: AV) against the three isolated phytopathogenic fungi from sugar beet rhizosphere in Beni Mellal, Morocco: (A) *Fusarium fujikuroi* (CHAMP1) and (B) *F. equiseti* (CHAMP2); (C) yeast: (a) *Candida albicans* CCMM/L11; pathogenic bacteria: (b) *Escherichia coli* CCMM/B4; (c) *Salmonella* sp. CCMM/B17; (d) *Klebsiella pneumonia* E40; (e) *Staphylococcus aureus* CCMM/B2.

**Table 1.** In vitro antagonistic activities of the ten *Streptomyces* strains against the three *Fusarium* isolates from diseased sugar beet roots from Beni Mellal, Morocco: Two *Fusarium fujikuroi* (CHAMP1; CHAMP3) and *F. equiseti* (CHAMP2); yeast: *Candida albicans* CCMM/L11; human pathogenic bacteria: *Escherichia coli* CCMM/B4; *Salmonella* sp. CCMM/B17; *Klebsiella pneumonia* E40; *Staphylococcus aureus* CCMM/B2; *Bacillus subtilis* ATCC 9524; *Streptococcus* sp. CCMM/B24; *Pseudomonas aeruginosa* CCMM/B90 (zone of inhibition ± SD cm) (percentage of inhibition ± SD mm). Different lowercase letters above bars show significant differences between treatments at  $p \leq 0.05$ .

Streptomyces Strains	Fungi			Bacteria Gram+	Bacteria Gram-			Yeast
	CHAMP 1	CHAMP 2	CHAMP 3	<i>S. aureus</i> CCMM/B2	<i>Salmonella</i> sp. CCMM/B17	<i>K. pneumonia</i> E40	<i>E. coli</i> CCMM/B4	<i>C. albicans</i> CCMM/L11
	Percentage of Inhibition (PI ± SD mm)			Zone of Inhibition ± SD cm				
CYM	41.3 ± 8.8 d	35.4 ± 3.5 de	30.7 ± 5.7 b	2.8 ± 0.1 e	0	2.7 ± 0.1 bc	0	2.9 ± 0.1 d
BP	24.2 ± 1.2 c	8.2 ± 7.5 a	23.8 ± 5.3 ab	1.3 ± 0.0 a	0	3.0 ± 0.1 d	0	1.3 ± 0.1 a
DE1	20.4 ± 4.2 bc	13.7 ± 7.3 ab	23.0 ± 4.3 ab	2.5 ± 0.2 cd	0	2.8 ± 0.2 c	0	2.6 ± 0.1 c
AZ	7.6 ± 3.4 a	19.2 ± 11 abc	18.5 ± 2.6 ab	2.3 ± 0.2 c	0	2.2 ± 0.1 a	0	1.7 ± 0.5 ab
BX	12.7 ± 3.3 ab	7.6 ± 0.7 a	6.9 ± 0.4 a	2.2 ± 0.4 c	0	2.3 ± 0.1 a	0	2.3 ± 0.3 c

Finally, the results were combined together to identify the multifaceted strains with the highest potential for sugar beet growth promotion in order to use them for further experiments in field trials (Table 2).



**Table 2.** The criteria score for screening of the 10 selected *Streptomyces* sp. with multifaceted PGP activities from sugar beet rhizospheres in Beni Mellal, Morocco. The numbers in the table represent a score out of 10, assigned to each strain according to its solubilization capacity, antimicrobial activity and the rate of IAA and siderophore release.

Streptomyces Strains	Solubilization of RP <sup>*ψ</sup>	Solubilization of TCP <sup>*</sup>	Potassium Solubilization <sup>ψ</sup>	Antifungal Activity <sup>ψ</sup>	Antibacterial Activity	Production of IAA <sup>ψ</sup>	Production of Siderophores <sup>*</sup>	Final Score
BYC	20	9	14	16	4	18	9	90
AYD	16	8	18	20	3	14	8	87
DE2	10	10	16	18	7	12	10	83
AZ	14	7	20	4	6	2	7	60
AI	12	6	10	14	1	10	6	59
CYM	8	2	6	10	10	20	2	58
AV	4	4	12	12	5	16	4	57
BP	18	5	8	8	9	4	5	57
DE1	6	3	2	6	8	8	3	36
BX	2	1	4	2	2	6	1	18

\* Aallam et al. [40], <sup>ψ</sup> criteria score doubled.

#### 4. Discussion

In our previous research [40], we successfully isolated 10 *Streptomyces* spp. and revealed their phosphate solubilization capacities and siderophore production. In this study, we investigated whether these *Streptomyces* spp. represent multifaceted PGP by testing their abilities to solubilize potassium from orthoclase as the sole K source and to produce IAA and their inhibitory activities against *Fusarium* sp., the causal agent of sugar beet root rot in the Beni Mellal region (Morocco).

More than 90% of K exists as an insoluble rock form in soils, and the amount of soluble K is very small [57]. It has become a necessity to isolate and screen K-solubilizing microorganisms in order to improve the amount of soluble K in soil and to meet the requirements of growing plants. Thus, the results of this study showed that the 10 *Streptomyces* spp. were able to solubilize K using AMM with orthoclase as the sole K source. Interestingly, in the AMM broth, the amount of soluble K ranged from 3.8 mg/L to 216.6 mg/L after 5 days of cultivation. Similarly, Han et al. [58] reported that *Streptomyces rochei* and *S. sundarbensensis* released amounts of K of 7.46 to 13.71 mg/L in the same conditions. Other studies showed that *Streptomyces alboviridis* P18, *S. griseorubens* BC3, *S. griseorubens* BC10 and *Nocardioopsis alba* BC11 had the ability to solubilize K in AMM and amounts of K ranged from 2.6 to 41.45 mg/L after 11 days of cultivation [23]. Reyes-Castillo et al. [59] reported that *Bacillus mucilaginosus* dissolved K from motmorillonite, kaolinite and K-feldspar, showing values of 90 to 140 mg/L after 7 days of cultivation.

Microorganisms have many mechanisms to solubilize K from a mineral source. Researchers have suggested that this solubilization might be either due to the excretion of protons, H<sup>+</sup> or CO<sub>2</sub> and organic acids, causing acidification of the external medium, or to the excretion of chelating substances (such as siderophores) that form stable complexes with potassium adsorbents (aluminum, iron and calcium) [57,60–63]. In this research, the pH of the growth medium of all strains in AMM broth with orthoclase was between 7.2 and 6.2 at day 1 and stabilized afterwards in most cases at approximately pH 6.2, except for the AI and CYM strains (Figure 2). This indicated that the solubilization process might involve the excretion of organic acids. Interestingly, AI yielded much better biomass (Figure 3) and was shown to excrete siderophores, but not the CYM strain [40], whereas BYC released a rather small amount (2-fold less, 61 mg/L). However, this strain produced siderophores and was selected as the best phosphate-solubilizing strain from both RP and TCP [40]. The purification and structural characterization of potentially novel siderophores and/or organic acids are in progress. Our results are in agreement with other investigations performed by Bagyalakshmi et al. [64], which reported that KSB prefer an acidic to neutral range of pH. Moreover, other researchers reported that the production of some different primary proteins and polysaccharides can also control the release of K from K-bearing minerals [65–67]. In contrast, Dhiman et al. [68] have observed that at pH 7, the strains show the best K solubilization activity in the presence of *Proteus mirabilis* MG738216.

Furthermore, the 10 selected *Streptomyces* spp., except the DE1 strain, had the ability to produce IAA (Figure 4). The CYM, BYC, AV, AYD and DE2 strains were the best IAA producers, with values of more than 15 µg/mL to 22.3 µg/mL. According to Djebaili et al. [32], the bacteria with the ability to produce more than 13.0 µg/mL have PGP activity. Similarly, *Streptomyces atrovirens* showed an interesting growth-promoting activity in groundnut, cotton and maize [69]. Several other studies have demonstrated the ability of Actinomycetes to secrete IAA in several other plant rhizospheres [23,58].

Multiple potential PGP activities by the selected 10 *Streptomyces* spp. were performed by their antagonistic activity against three *Fusarium* sp. isolated and identified from the infected sugar beet rhizosphere (Figures 1 and 5). In dual culture, *S. bellus* (AYD) had a higher inhibitory effect against the three fungal causal agents of root rot of sugar beet: *Fusarium equiseti* and two *F. fujikuroi* at 55%, 43% and 36%, respectively. Similarly, Getha et al. [70] demonstrated the ability of a *Streptomyces* sp. to inhibit the growth of *Fusarium* wilt of banana. Moreover, *Streptomyces bikiniensis* HD-087 isolated from Hulunbeier grassland soil show a strongly antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* [71]. *Streptomyces* have also shown an ability to control *Fusarium* wilt of tomato in greenhouse conditions [72]. According to Yang et al. [73], 60% of antibiotics used in agriculture are produced by different *Streptomyces* species. To explain the biocontrol ability of Actinomycetes, many mechanisms have been suggested, such as secreting extracellular cell wall hydrolases [74], production of secondary metabolites [75], inducing plant resistance [76,77], competing for nutrients such as iron (siderophores) in the environment and by producing hydrolytic enzymes, especially chitinase, which degrades the crucial constituent of the fungal cell wall, chitin [78,79].

These results suggest that our selected species, *Streptomyces enissocaesilis* (BYC), *S. bellus* (AYD) and *S. saprophyticus* (DE2), exhibit the highest multifaceted PGPR activities, and they may represent efficient biofertilizers and biocontrol agents (Table 2). Further studies on the effectiveness of their use in controlled pot experiments and in the field are in progress. The use of these endemic selected *Streptomyces* spp. as both P and K solubilizers, in addition to their biological control ability, could be considered as an innovative pathway to sustainable and ecofriendly agriculture.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.H. and Y.A.; methodology, Y.A. and H.H.; software, Y.A. and S.L.; validation, H.H., S.L., D.D. and M.T.; formal analysis, H.H., S.L., A.S. and M.T.; investigation, Y.A. and H.H.; resources, H.H., A.H., S.L., B.E.M. and D.D.; data curation, Y.A., H.H. and S.L.; writing—original draft preparation, Y.A. and H.H.; writing—review and editing, H.H., M.T., D.D., S.L., A.S., A.H. and B.E.M.; visualization, H.H.; supervision, H.H. and A.H.; project administration, H.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lateef, E.; Abd El-salam, M.; Farrag, A.; Amin, G. Fertilizer Inputs Impact Of Different Bio-Solid Sources On Sugar Beet Yield In Sandy Soil. *Int. J. Agric. For. Life Sci.* **2019**, *3*, 106–114.
2. Al Jbawi, E.; Al Raei, A.F.; Ali, A.A.A.; Al Zubi, H. Genotype-Environment Interaction Study in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Int. J. Environ.* **2013**, *5*, 9–19. [CrossRef]
3. FAOSTAT Food and Agricultural Organization Statistics. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 15 April 2021).
4. ORMVAT Office Régional de Mise en Valeur Agricole de Tadra. Available online: [www.ormvat.ma](http://www.ormvat.ma) (accessed on 3 February 2021).
5. Redani, L. Competitivite, Valorisation des Ressources et Objectifs de Sécurité Alimentaire pour la Filière Sucrière au Maroc. Ph.D Thesis, University of Liège, Gembloux, Belgium, 2015.

6. Cakmak, I. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J. Plant Nutr. Soil. Sci.* **2005**, *168*, 521–530. [CrossRef]
7. Aksu, G.; Altay, H. The Effects of Potassium Applications on Drought Stress in Sugar Beet. *Sugar Tech.* **2020**, *22*, 1092–1102. [CrossRef]
8. Barlog, P.; Grzebisz, W.; Peplinski, K.; Szczepaniak, W. Sugar Beet Response to Balanced Nitrogen Fertilization with Phosphorus and Potassium. *Bulg. J. Agric. Sci.* **2013**, *19*, 1311–1318.
9. Hanafy, E.; El-Bana, A.; Yasın, M.; El-Naggar, N. Impact of Planting Density, Nitrogen and Potassium Fertilizer Levels on Yield and Quality of Sugar Beet. *Zagazig J. Agric. Res.* **2019**, *46*, 2133–2143. [CrossRef]
10. Abdel-Motagally, E.M.; Attia, K.K. Response of Sugar Beet Plants to Nitrogen and Potassium Fertilization in Sandy Calcareous Soil. *Int. J. Agric. Biol.* **2016**, *11*, 695–700.
11. Sparks, D.L.; Huang, P.M. Physical Chemistry of Soil Potassium. In *Potassium in Agriculture*; Mounson, R.D., Ed.; American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America: Madison, WI, USA, 1985; pp. 201–276.
12. Sugumaran, P.; Janarthanam, B. Solubilization of Potassium Containing Minerals by Bacteria and Their Effect on Plant Growth. *World J. Agric. Sci.* **2007**, *3*, 350–355.
13. Li, Y.; Li, Q.; Guan, G.; Chen, S. Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. *PeerJ* **2020**, *8*, 1–15. [CrossRef] [PubMed]
14. Wang, Z.; Chen, Z.; Xu, Z.; Fu, X. Effects of phosphate-solubilizing bacteria and N<sub>2</sub>-fixing bacteria on nutrient uptake, plant growth, and bioactive compound accumulation in *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinškaja. *Forests* **2019**, *10*, 772. [CrossRef]
15. Baghel, V.; Thakur, J.K.; Yadav, S.S.; Manna, M.C.; Mandal, A.; Shirale, A.O.; Sharma, P.; Sinha, N.K.; Mohanty, M.; Singh, A.B.; et al. Phosphorus and Potassium Solubilization From Rock Minerals by *Endophytic burkholderia* sp. Strain FDN2-1 in Soil and Shift in Diversity of Bacterial Endophytes of Corn Root Tissue with Crop Growth Stage. *Geomicrobiol. J.* **2020**, 1–14. [CrossRef]
16. Ben-laouane, R.; Baslam, M.; Ait-el-mokhtar, M.; Anli, M.; Boutasknit, A.; Ait-Rahou, Y.; Toubali, S.; Mitsui, T. Potential of Native Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Rhizobia, and/or Green Compost as Alfalfa (*Medicago sativa*) Enhancers under Salinity. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1695. [CrossRef]
17. Sattar, A.; Naveed, M.; Ali, M.; Zahir, Z.A.; Nadeem, S.M.; Yaseen, M.; Singh, S.V.; Farooq, M.; Singh, R.; Rahman, M.; et al. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Appl. Soil. Ecol.* **2018**, *133*, 146–159. [CrossRef]
18. Meena, V.S.; Maurya, B.R.; Verma, J.P. Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils? *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 337–347. [CrossRef]
19. Ali, A.M.; Awad, M.Y.M.; Hegab, S.A.; Abd, A.M.; Gawad, E.; Eissa, M.A.; Ali, A.M.; Awad, M.Y.M.; Hegab, S.A.; Abd, A.M. Effect of potassium solubilizing bacteria (*Bacillus cereus*) on growth and yield of potato. *J. Plant Nutr.* **2020**, *44*, 411–420. [CrossRef]
20. Xiao, Y.; Wang, X.; Chen, W.; Huang, Q. Isolation and identification of three potassium-solubilizing bacteria from rape rhizospheric soil and their effects on ryegrass. *Geomicrobiol. J.* **2017**, *34*, 873–880. [CrossRef]
21. Sun, F.; Ou, Q.; Wang, N.; Ou, Y.; Li, N.; Peng, C. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. *Glob. Ecol. Conserv.* **2020**, *23*, 1–27. [CrossRef]
22. Saha, M.; Maurya, B.R.; Meena, S.; Bahadur, I.; Kumar, A. Identification and characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from Indo-Gangetic Plains of India. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *7*, 202–209. [CrossRef]
23. Boubekri, K.; Soumare, A.; Mardad, I.; Lyamlouli, K.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Kouisni, L. The Screening of Potassium- and Phosphate-Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. *Microorganisms* **2021**, *9*, 470. [CrossRef]
24. Hillnhütter, C.; Mahlein, A.; Sikora, R.A.; Oerke, E. Field Crops Research Remote sensing to detect plant stress induced by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* in sugar beet fields. *F. Crop. Res. J.* **2011**, *122*, 70–77. [CrossRef]
25. Wolfgang, A.; Zachow, C.; Müller, H.; Grand, A.; Temme, N.; Tilcher, R.; Berg, G. Understanding the Impact of Cultivar, Seed Origin, and Substrate on Bacterial Diversity of the Sugar Beet Rhizosphere and Suppression of Soil-Borne Pathogens. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1–15. [CrossRef]
26. De Lucchi, C.; Piergiorgio, S.; Linda, H.; Mitch, M.; Lee, P.; De, B.M.; Chiara, B.; Marco, B.; Sella, L.; Concheri, G. Molecular markers for improving control of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* in sugar beet. *Euphytica* **2017**, *213*, 1–14. [CrossRef]
27. Harveson, R.M.; Rush, C.M. Genetic Variation among *Fusarium oxysporum* Isolates from Sugar Beet as Determined by Vegetative Compatibility. *Plant Dis.* **1997**, *81*, 85–88. [CrossRef]
28. Harveson, R.M.; Rush, C.M. Characterization of *Fusarium* Root Rot Isolates from Sugar Beet by Growth and Virulence at Different Temperatures and Irrigation Regimes. *Plant Dis.* **1998**, *82*, 1039–1042. [CrossRef]
29. Hanson, L.E.; Hill, A.L.; Jacobsen, B.J.; Panella, L. Response of Sugarbeet Lines to Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Betae* from the United States. *J. Sugar Beet Res.* **2009**, *46*, 11–26. [CrossRef]
30. Jacobsen, B.J. Root Rot Diseases of Sugar Beet. *Proc. Nat. Sci. Matica Srp. Novi. Sad.* **2006**, 9–19. [CrossRef]
31. Errakhi, R.; Lebrihi, A.; Barakate, M. In vitro and in vivo antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: A causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 672–681. [CrossRef] [PubMed]
32. Djebaili, R.; Pellegrini, M.; Smati, M.; Del Gallo, M.; Kitouni, M. Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability* **2020**, *12*, 4617. [CrossRef]

33. Yoolong, S.; Kruasuwan, W.; Pham, H.T.; Jaemsang, R.; Jantasuriyarat, C.; Thamchaipenet, A. Modulation of salt tolerance in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. venezuelae cv KDLM105) by *Streptomyces* ATCC 10712 expressing ACC deaminase. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)]
34. Gebauer, L.; Bouffaud, M.; Ganther, M.; Yim, B.; Vetterlein, D.; Smalla, K.; Buscot, F.; Heintz-buschart, A.; Tarkka, M.T. Soil Texture, Sampling Depth and Root Hairs Shape the Structure of ACC Deaminase Bacterial Community Composition in Maize Rhizosphere. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Elbendary, A.A.; Hessain, A.M.; El, M.D.; Seida, A.A.; Moussa, I.M.; Mubarak, A.S.; Kabli, S.A.; Hemeg, H.A.; Kamal, J.; Jakee, E. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *25*, 44–46. [[CrossRef](#)]
36. Olanrewaju, O.S.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, 1–16. [[CrossRef](#)]
37. Hamdali, H.; Bouizgarne, B.; Hafidi, M.; Lebrihi, A.; Virolle, M.J.; Ouhdouch, Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* **2008**, *38*, 12–19. [[CrossRef](#)]
38. Hamdali, H.; Lebrihi, A.; Monje, M.C.; Benharref, A.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Virolle, M.J. A Molecule of the Viridomycin Family Originating from a *Streptomyces* griseus-Related Strain Has the Ability to Solubilize Rock Phosphate and to Inhibit Microbial Growth. *Antibiotics* **2021**, *10*, 72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Evangelista-Martinez, Z. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1639–1647. [[CrossRef](#)]
40. Aallam, Y.; Dhiba, D.; Lemriss, S.; Souiri, A.; Karray, F.; El Rasafi, T.; Saïdi, N.; Haddioui, A.; El Kabbaj, S.; Virolle, M.J.; et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from sugar beet fields of the beni-mellal region in morocco. *Microorganisms* **2021**, *9*, 914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Meena, V.S.; Maurya, B.R.; Verma, J.P.; Aeron, A.; Kumar, A.; Kim, K.; Bajpai, V.K. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecol. Eng.* **2015**, *81*, 340–347. [[CrossRef](#)]
42. Hui, X.; Chen, J.; Guo, J.; Hangzhou, X. Two Phosphate- and Potassium-solubilizing Bacteria Isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 983–990. [[CrossRef](#)]
43. Liu, D.F.; Lian, B.; Wang, B. Solubilization of potassium containing minerals by high temperature resistant *Streptomyces* sp. isolated from earthworm's gut. *Acta Geochim.* **2016**, *35*, 262–270. [[CrossRef](#)]
44. Sachdev, D.P.; Chaudhari, H.G.; Kasture, V.M.; Dhavale, D.D.; Chopade, B.A. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumonia* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian J. Exp. Biol.* **2009**, *47*, 993–1000.
45. Loper, J.E.; Schroth, M.N. Influence of Bacterial Sources of Indole3-acetic Acid on Root Elongation of Sugar Beet. *Physiol. Biochem.* **1986**, *76*, 386–389. [[CrossRef](#)]
46. Barakat, A.; Ennaji, W.; Krimissa, S.; Bouzaid, M. Heavy metal contamination and ecological-health risk evaluation in peri-urban wastewater-irrigated soils of Beni-Mellal city (Morocco). *Int. J. Environ. Health Res.* **2019**, *30*, 372–387. [[CrossRef](#)]
47. Chenaoui, M.; Amar, M.; Benkhemmar, O.; El Aissami, A.; Arahou, M.; Rhazi, L. Isolation and characterization of fungi from sugar beet roots samples collected from Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* **2017**, *8*, 3962–3967.
48. Leaw, S.; Chang, H.; Sun, H.; Barton, R.; Bouchara, J.; Chang, T. Identification d'espèces de levure médicalement importantes par analyse de séquence des régions d'espaceur transcrits internes. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 693–699. [[CrossRef](#)]
49. Vainio, E.J.; Hantula, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **2000**, *104*, 927–936. [[CrossRef](#)]
50. Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[CrossRef](#)]
51. Felsenstein, J. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* **1985**, *125*, 1–15. [[CrossRef](#)]
52. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bauer, A.W.; Kirby, M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493–496. [[CrossRef](#)]
55. Hamdali, H.; Hafidi, M.; Joe, M.; Ouhdouch, Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl. Soil Ecol.* **2008**, *40*, 510–517. [[CrossRef](#)]
56. Karimi, E.; Safaie, N.; Shams-Baksh, M.; Mahmoudi, B. *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates Rhizoctonia damping-off disease on sugar beet. *Microbiol. Res.* **2016**, *192*, 221–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Prasad, M.; Srinivasan, R.; Chaudhary, M.; Choudhary, M.; Jat, L.K. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*; Singh, K.A., Kumar, A., Singh, K.P., Eds.; Woodhead: Sawston, UK, 2019; pp. 129–157. [[CrossRef](#)]
58. Han, D.; Wang, L.; Luo, Y. Isolation, identification, and the growth promoting effects of two antagonistic actinomycete strains from the rhizosphere of *Mikania micrantha* Kunth. *Microbiol. Res.* **2018**, *208*, 1–11. [[CrossRef](#)]

59. Reyes-castillo, A.; Gerding, M.; Oyarzúa, P.; Zagal, E.; Gerding, J. Plant growth-promoting rhizobacteria able to improve NPK availability: Selection, identification and effects on tomato growth. *Chil. J. Agric. Res.* **2019**, *79*, 473–485. [\[CrossRef\]](#)
60. Etesami, H.; Emami, S.; Alikhani, H.A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects—A review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2017**, *17*, 897–911. [\[CrossRef\]](#)
61. Yuan, Z.S.; Liu, F.; Zhang, G.F. Characteristics and biodiversity of endophytic phosphorus- and potassium solubilizing bacteria in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Acta Biol. Hung.* **2015**, *66*, 449–459. [\[CrossRef\]](#)
62. Dominguez-Nunez, J.A.; Benito, B.; Berrocal-Lobo, M.; Albanesi, A. Mycorrhizal Fungi: Role in the Solubilization of Potassium. In *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*; Meena, V., Maurya, B., Verma, J., Meena, R., Eds.; Springer: New Delhi, India, 2016; pp. 77–98. [\[CrossRef\]](#)
63. Bashir, Z.; Zargar, M.Y.; Vishwakarma, D.K. Potassium-solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. In *Applied Agricultural Practices for Mitigating Climate Change*; Kumar, R., Singh, P.V., Jhajharia, D., Mirabbasi, R., Eds.; Taylor & Francis: New York, NY, USA, 2019; pp. 17–28.
64. Bagyalakshmi, B.; Ponnuragan, P.; Balamurugan, A. Potassium solubilization, plant growth promoting substances by potassium solubilizing bacteria (KSB) from southern Indian Tea plantation soil. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2017**, *12*, 116–124. [\[CrossRef\]](#)
65. Liu, W.; Xu, X.; Wu, X.; Yang, Q.; Luo, Y.; Christie, P. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environ. Geochem. Health* **2006**, *28*, 133–140. [\[CrossRef\]](#)
66. Sheng, X.F.; He, L.Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can. J. Microbiol.* **2006**, *72*, 66–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Shelobolina, E.; Xu, H.; Konishi, H.; Kukkadapu, R.; Wu, T.; Blöthe, M.; Roden, E. Microbial Lithotrophic Oxidation of Structural Fe (II) in Biotite. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5746–5752. [\[CrossRef\]](#)
68. Dhiman, S.; Dubey, R.C.; Baliyan, N.; Kumar, S.; Maheshwari, D.K. Application of potassium—Solubilising *Proteus mirabilis* MG738216 inhabiting cattle dung in improving nutrient use efficiency of *Foeniculum vulgare* Mill. *Environ. Sustain.* **2019**, *2*, 401–409. [\[CrossRef\]](#)
69. Reddy, K.R.K.; Jyothi, G.; Sowjanya, C.; Kusumarajali, K.; Malathi, N.; Reddy, K.R.N. Plant Growth-Promoting Actinomycetes: Mass Production, Delivery systems, and commercialization. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria*; Subramanian, G., Arumugam, S., Rajendran, V.G., Eds.; Springer: Singapore, 2016; pp. 1–298. [\[CrossRef\]](#)
70. Getha, K.; Vikineswary, S.; Wong, W.H.; Seki, T.; Ward, A.; Goodfellow, M. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *32*, 24–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Zhao, S.; Du, C.; Tian, C. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber *Fusarium* Wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 2919–2927. [\[CrossRef\]](#)
72. Anitha, A.; Rabeeth, M. Control of *Fusarium* Wilt of Tomato by Bioformulation of *Streptomyces griseus* in Green House Condition. *Afr. J. Basic. Appl. Sci.* **2009**, *1*, 9–14.
73. Yang, Y.; Zhang, S.W.; Li, K.T. Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against phytopathogenic fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
74. Li, Y.; He, F.; Lai, H.; Xue, Q. Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *149*, 299–311. [\[CrossRef\]](#)
75. Soares, A.C.F.; Sousa, C.D.S.; Garrido, M.D.S.; Perez, J.O.; De Almeida, N.S. Soil *streptomyces* with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostidis* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Braz. J. Microbiol.* **2006**, *37*, 456–461. [\[CrossRef\]](#)
76. Li, Y.; Guo, Q.; He, F.; Li, Y.; Xue, Q.; Lai, H. Biocontrol of Root Diseases and Growth Promotion of the Tuberous Plant *Aconitum carmichaelii* Induced by Actinomycetes Are Related to Shifts in the Rhizosphere Microbiota. *Microb. Ecol.* **2020**, *79*, 134–147. [\[CrossRef\]](#)
77. Kürth, F.; Mailänder, S.; Bönn, M.; Feldhahn, L.; Herrmann, S.; Große, L.; Buscot, F.; Schrey, S.D.; Tarkka, M.T. *Streptomyces*—Induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defence, photosynthesis and secondary metabolism pathways. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2014**, *27*, 891–900. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Musa, Z.; Ma, J.; Egamberdieva, D.; Abdelshafy, M.O.A.; Abaydulla, G.; Liu, Y.; Li, W.; Li, L. Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Endophytic Actinobacteria Associated With the Medicinal Plant *Thymus roseus*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Singh, S.P.; Gupta, R.; Gaur, R.; Srivastava, A.K. Antagonistic Actinomycetes Mediated Resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. Against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* **2015**, *87*, 789–798. [\[CrossRef\]](#)



## Assessing the contamination of trace toxic elements in the soils of sugar beet field (Beni-Mellal, Morocco)

Aallam Yassine<sup>1</sup> · El Rasafi Taoufik<sup>2</sup> · Hakkou Rachid<sup>3</sup> · Dhiba Driss<sup>2</sup> · Nouri Mohamed<sup>4</sup> · Haddioui Abdelmajid<sup>1</sup> · Hamdali Hanane<sup>1</sup>

Received: 21 September 2020 / Accepted: 29 April 2021  
 © Saudi Society for Geosciences 2021

### Abstract

Trace toxic elements concentrations (arsenic (As), boron (B), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), germanium (Ge), molybdenum (Mo), niobium (Nb), nickel (Ni), selenium (Se), zinc (Zn), yttrium (Y)) in sugar beet soils of Beni-Mellal region in Morocco were analyzed to evaluate their potential contamination level. The pollution was evaluated in three different sugar beet soils using enrichment factor (EF), geo-accumulation index ( $I_{geo}$ ), contaminant factor (CF), potential contamination index (Cp), and pollution load index (PLI). The obtained results show that the studied agricultural soils were contaminated with various heavy metals and metalloids such as As ( $<8-34.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Ba ( $186.5-241.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), B ( $73.0-103.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Co ( $24.7-34.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Ge ( $10.7-25.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Nb ( $11.5-25.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), and Mo ( $32.3-35.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). The results of EF (99.04–2.60), CF (31.81–1.43) indices showed that these soils are heavily polluted with various elements (Mo > Ge > As > B > Co) suggesting their anthropogenic source. Moreover, these elements are higher than the limits proposed by the Canadian soil quality guidelines which oblige farmers to change their farming habits in order to protect and maintain ecological balance of the soil.

**Keywords** Heavy metals · Trace toxic elements · Agricultural soil · Sugar beet · Contamination

### Introduction

In the last decades, the human population growth around the world increased the need of food supply to ensure the food safety. This leads to the use in agriculture of various pesticides, fertilizers, and organic amendments which might be a potential

source of soil alteration. Several authors have reported that agricultural practices such as pesticide application, non-adequate use of fertilizers, and excessive use of manure and compost may cause soil contamination with trace toxic elements (Doyi et al. 2018; Khalifa and Gad 2018; Keshavarzi and Kumar 2019; Li et al. 2020). Trace toxic elements in the polluted agricultural soil could be transferred to food products leading to significant health hazards (Oumenskou et al. 2018; Adimalla et al. 2019; Qiuguo et al. 2020) especially, due to their persistence, non-biodegradability and irreversible nature of contamination (Cai et al. 2012; Jing et al. 2018; El Rasafi et al. 2020).

The identification of sources of contamination, the assessment of pollution degree, and the evaluation of the ecological risks of contaminated agricultural soil have gained much interest in recent years. The evaluation of the health risks connected to contaminated agricultural soils in China (Zhang et al. 2013; Eziz et al. 2018; Hu et al. 2019), in Egypt (Khalifa and Gad 2018), in India (Bhatti et al. 2018; Adimalla et al. 2019), and in Tunisia (Chabbi et al. 2020) have shown high contamination with various heavy metals and metalloids such as Cu, Zn, Fe, Cr, Ni, Cd, Pb, and As. However, very few studies have been carried out in Beni-

Responsible Editor: Haroun Chenchoumi

✉ Hamdali Hanane  
[hamdali\\_hanane@yahoo.fr](mailto:hamdali_hanane@yahoo.fr)

<sup>1</sup> Laboratory of Biotechnology and Valorization of Plant Genetic Resources, Faculty of Sciences and Technology, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, 23000 Beni-Mellal, Morocco

<sup>2</sup> University Mohammed VI Polytechnic (UM6P), Hay Moulay Rachid, 43150 Ben Guerir, Morocco

<sup>3</sup> Imed-Lab, Faculty of Sciences and Technology, Cadi Ayyad University, Abdelkarim Elkhatabi Avenue, Gueliz, P.O. Box 549, 40000 Marrakech, Morocco

<sup>4</sup> Laboratory of Biotechnology and Sustainable Development of Natural Resources, Faculty of Polydisciplinary, University of Sultan Moulay Slimane, P.O. 523, 23000 Beni-Mellal, Morocco

Mellal region which is known for its rich and varied agriculture in Morocco (Barakat et al. 2019). This study has demonstrated that Cr, Fe, Zn, Cu, and Cd concentrations were above the local geochemical background values suggesting an extreme contamination of soils by these elements. In all of these studies, the authors have used indices and factors such as enrichment factor (EF), contamination factor (CF), geo-accumulation index ( $I_{geo}$ ), and ecological risk index (RI). These indices are highly useful in the determination of soil quality (Kowalska et al. 2016; Kumar et al. 2018; Keshavarzi and Kumar 2019).

Beni-Mellal region is located in a vast agricultural plain in Morocco, and it is known for its large areas of arable land devoted to cereal crops, plantation crops (olives and citrus), vegetables, and industrial crops. Sugar beet (*Beta vulgaris*) is the main industrial crop in this region and contributes with 20.5% and 21.2%, respectively, to the national areas and to the national production of sugar beet in Morocco (Redani et al. 2015). Therefore, in this large cultivated land, long period of cultivation and high amount of produced sugar beet have caused various risks to the environment. It has been reported that agricultural practice and irrigation water may cause the enrichment of soils with heavy metals such as Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, and Fe (Barakat et al. 2019; Keshavarzi and Kumar 2019; Alam et al. 2020). In fact, sugar beet has been reported to be sensitive to increased levels of heavy metals such as cadmium (Nada et al. 2007) and zinc (Sagardoy et al. 2009). To our knowledge, this is the first time that such a study has been undertaken especially on the agricultural soils of sugar beet in this region with a large trace toxic elements evaluation. Hence, the main objectives of the present study were as follows: (i) determination of the concentrations of trace toxic elements in three different agriculture soils of sugar beet in Beni-Mellal region and (ii) apportion of the source of contamination using the pollution indices.

## Materials and methods

### Study area and soil samplings

The study area is located in Beni-Mellal region in the center of Morocco (32° 20' 22" N, 6° 21' 39" W). This region distributed in the irrigated perimeter of Beni-Amir-Beni-Moussa separated by the Oum er-Rbia River (Elbehri et al. 2011) that creates two independent irrigated perimeters: Beni-Moussa shown above and Beni-Amir shown in bat one (Fig. 1). These areas are characterized by two irrigated perimeters of 33,000 ha and 69,500 ha, respectively (Hammoumi et al. 2013). The climate in this area is semi-arid with an average temperature of 19°C (El Baghdadi et al. 2012) and an average annual rainfall generally below 280 mm (Barakat et al. 2012).

Soil samples were collected during June 2017 from the sugar beet growing lands in the Beni-Mellal region. These

areas were judged as the most known area by cultivation of sugar beet in the region (Elbehri et al. 2011). A topsoil layer (0–10 cm) was collected after removing surface residues in triplicate from three different zones (Fig. 1): sample 1 (32° 24' 3.888" N, 6° 50' 29.04" W), sample 2 (32° 28' 24.402" N, 6° 48' 54.828" W), and sample 3 (32° 15' 47.2644" N, 6° 44' 1.068" W). Each soil sample consisted of a composite of three subsamples collected from an area of 10m × 10m and were then homogenized, air-dried, and sieved through a 2-mm sieve and placed in a sterile tightly closed polyethylene bag and transported to laboratory physico-chemical characterization.

### Chemical analysis

Conductivity and pH (in water) are measured in a soil-water suspension (1:5 v/v). Potential acidity was measured after dilution in a suspension of potassium chloride 1N KCl (Faoun 1970). The organic matter and mineral matter were determined after ignition at 550°C for 5 h in a furnace (Vassilev and Tascón 2003). The ash resulted from ignition represents mineral matter, while the quantity disappeared after ignition represents the organic matter (total weight = mineral matter + organic matter). The humidity was evaluated by measuring the evolution of the mass of 10 g of each sample after passing through the oven at 105 °C (Faoun 1970). The Kjeldahl method was used to determine the concentration of total nitrogen. For chemical analyses, soil samples were ground using an agate mortar and digested using a strong multi-acid method (HNO<sub>3</sub>/Br<sub>2</sub>/HF/HCl) that dissolves most minerals. Then, solutions were analyzed using inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) (PerkinElmer Optima DV 7000 ICP-OES, relative precision of 5%).

### Soil contamination evaluation using pollution indices

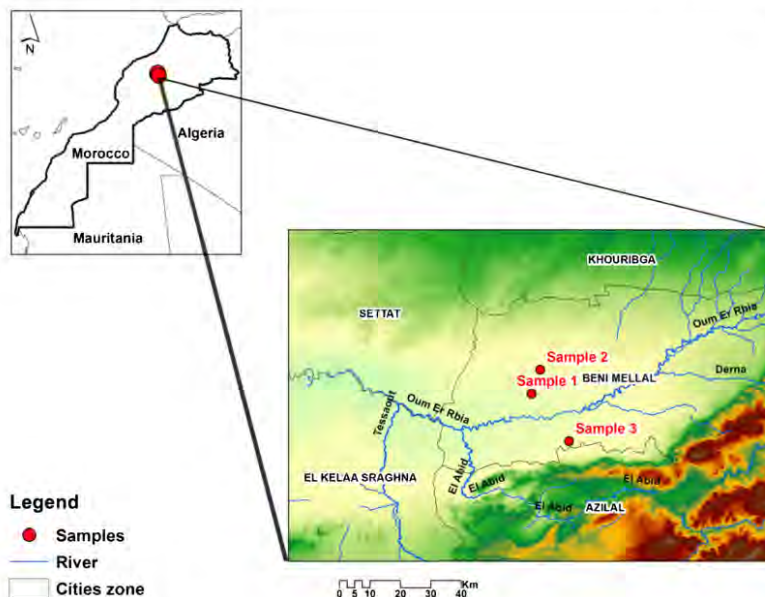
The degree of soil contamination can be assessed using several indices such as enrichment factor (EF), geo-accumulation index ( $I_{geo}$ ), contamination factor (CF), contamination degree ( $C_{deg}$ ), and potential contamination index ( $C_p$ ) (Weissmannová and Pavlovský 2017).

#### Enrichment factor

Enrichment factor (EF) is used to measure the possible impact of anthropogenic activity on the concentration of trace toxic elements in soils (Aiman et al. 2016; Bhatti et al. 2018). In this study, enrichment factor of the agricultural soils of sugar beet was calculated using Fe as the elements of reference, and EF was calculated using the following generalized equation according to Baltas et al. (2020):

$$EF = \frac{C(s)/Fe(s)}{C(b)/Fe(b)}$$

**Fig. 1** The sampling sites of the three sugar beet agricultural soils of Beni-Mellal region



where  $C(s)$  is the concentration of the element in the sample,  $Fe(s)$  is the concentration of iron in the simple,  $C(b)$  is the concentration of the trace elements in the reference background, and  $Fe(b)$  is the concentration of iron in the background. The background concentration of iron is its concentrations in the continental crust (Rudnick and Gao 2003). EF values were interpreted according to Saddik and Fadili (2019) (Table 1).

#### Geo-accumulation index

The geo-accumulation index ( $I_{geo}$ ) has been used to assess the degree of pollution by trace toxic elements in the soil. The  $I_{geo}$  values can be calculated by the following formula given by Baltas et al. (2020):

$$I_{geo} = \text{Log}_2 (C_{(s)}/1.5C_{(b)})$$

where  $C_{(s)}$  is the concentration of the element in the soil samples and  $C_{(b)}$  is the geochemical background value of a given element. The values are given by Rudnick and Gao (2003) are used as background values. The factor 1.5 is the background matrix correction factor due to lithological variations (Bhutiani et al. 2017). The seven classifications of the index of geo-accumulation are given by Saddik and Fadili (2019) (Table 1).

#### Contamination factor and contamination degree

Contaminant factor (CF) is the quotient obtained by dividing the concentration of each metal in the soil by the

background value (Hakanson 1980). This index is calculated using the formula given by Hakanson (1980):

$$CF = C_{(s)}/C_{(b)}$$

where  $C_{(s)}$  is the concentration of the element in the soil samples and  $C_{(b)}$  is the geochemical background value of a given element. In addition, Hakanson (1980) proposes the calculation of contamination degree ( $C_{deg}$ ) in order to simplify contamination control and to have a global evaluation of soil pollution which is the sum of all the CF values of each metal in all the sampling sites.  $C_{deg}$  was calculated as:

$$C_{deg} = \sum_{i=1}^n CF$$

Hakanson (1980) suggested this classification indicating anthropogenic pollution (Table 1). In this study,  $n$  (number of measured elements) = 18.

#### Potential contamination index

The potential contamination index ( $C_p$ ) is calculated using the formula of Nouri and Haddioui (2016):

$$C_p = C_{(s)max}/C_{(b)}$$

where  $C_{(s)max}$  is the maximum concentration of a metal in sediment and  $C_{(b)}$  is the average value of the same element



**Table 1** Classification of soil pollution indices used in the present study

Pollution index	Formula	Classification	Soil quality
EF	$EF = \frac{C(s)/Fe(s)}{C(b)/Fe(b)}$	EF<1 1≤EF<3 3≤EF<5 5≤EF<10 10≤EF<25 25≤EF<50 50<EF	No enrichment Minor enrichment Moderate enrichment Moderately severe enrichment Severe enrichment Very severe enrichment Extremely severe enrichment
$I_{geo}$	$I_{geo} = \text{Log}_2 (C(s)/1.5C(b))$	$I_{geo} \leq 0$ $0 < I_{geo} < 1$ $1 < I_{geo} < 2$ $2 < I_{geo} < 3$ $3 < I_{geo} < 4$ $4 < I_{geo} < 5$ $I_{geo} > 5$	Uncontaminated slightly contaminated Moderately contaminated Moderately to heavily contaminated Heavily contaminated Heavily to extremely contaminated Extremely contaminated
CF	$CF = C(s)/C(b)$	CF<1 1≤CF≤3 3≤CF≤6 6≤CF	Low contamination factor Moderate contamination factor Considerable contamination factor Very high contamination factor
$C_{deg}$	$C_{deg} = \sum_{i=1}^n C_f$	$C_{deg} < n$ $n < C_{deg} < 2n$ $2n < C_{deg} < 4n$ $C_d > 4n$	Low degree of contamination Moderate degree of contamination Considerable degree of contamination High degree of contamination
Cp	$C_p = C(s)_{max}/C(b)$	$C_p \leq 1$ $1 < C_p \leq 3$ $C_p > 3$	Indicates low pollution Moderate pollution Severe or very severe pollution
PLI	$PLI = \sqrt[3]{CF1 * CF2 * \dots * CFn}$	PLI < 1 PLI = 1 PLI > 1	Unpolluted soil Pollutant present in soil Deterioration of site quality

to a background level. Cp values were interpreted as proposed by Dauvalter and Rognerud (2001) (Table 1).

#### Pollution load index (PLI)

The PLI is calculated using the obtained CF values of all the metals studied ( $n$ ) using the following formula given by Tomlinson et al. (1980):

$$PLI = \sqrt[3]{CF1 * CF2 * \dots * CFn}$$

The PLI classes are given in Table 1.

#### Statistics

Descriptive statistics such as mean, minimum, maximum, and standard deviation were calculated using SPSS software 20.0 package for windows. Moreover, coefficient of

variation was calculated using the equation  $CV = (\text{standard deviation}/\text{mean}) \times 100\%$ .

## Results

### Physico-chemical properties of soils in the Beni-Mellal region

Soil pH was found neutral in the 3 samples ranged between 7.31 and 7.49 with an average value of 7.41 (Table 2). The range of 0.25 and 0.47  $\mu\text{s cm}^{-1}$  for electrical conductivity (EC) was recorded in the present study. The organic matter was similar in both samples 1 and 3 (0.04), while sample 2 showed 0.06 of organic matter. Sample 2 showed higher water content with 0.12 (1g) comparing to sample (0.072) and 3 (0.074). Low values of  $P_2O_5$  (0.34%) and CaO (3.51%) were found in sample 3 and total nitrogen (1.75) and  $K_2O$  (0.04%) in sample 2.

**Table 2** Physico-chemical characterization of the soil samples from the three different agricultural sugar beet soils in Beni-Mellal region

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average value
pH <sub>H2O</sub>	7.44±0.27	7.31±0.26	7.49±0.14	7.41
pH <sub>KCl</sub>	6.49±0.16	6.93±0.06	7.09±0.04	6.84
Organic matter (1g)	0.04±0.003	0.06±0.003	0.04±0.002	0.05
Mineral matter (1g)	0.89±0.002	0.81±0.002	0.88±0.001	0.86
Water content (1g)	0.074±0.002	0.12±0.001	0.072±0.001	0.09
Electrical conductivity (µs/cm)	0.40±0.13	0.47±0.009	0.25±0.002	0.37
Total nitrogen	2.62±0.00	1.75±0.87	2.33±0.50	2.23
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	4.96±1.22	5.23±1.24	0.34±0.02	3.51
CaO (%)	10.13±0.82	8.95±1.06	3.51±0.46	7.53
K <sub>2</sub> O (%)	0.25±0.03	0.04 ±0.03	0.77 ±0.14	0.35

**Trace elements concentrations in soils**

Concentrations of heavy metals and metalloids in the tested agricultural soils of sugar beet in Beni-Mellal region were listed in Table 3. Metal concentrations (mg kg<sup>-1</sup>) were variable in the three soil samples. Higher values were recorded for Ba (186.50–213.50 mg kg<sup>-1</sup>), Sr (74.00–105.67 mg kg<sup>-1</sup>), B (73.00–103.67 mg kg<sup>-1</sup>), and Cr (48.33–60.00 mg kg<sup>-1</sup>),

while Cd (<2 mg kg<sup>-1</sup>) has the lowest concentrations in all soils (Table 3). The concentrations of Co, Ni, Zn, Cr, and As range from 24.67 to 34.67, 34.67 to 45.33, 12 to 26.00, and <8 and 34.50 mg kg<sup>-1</sup> in all samples, respectively (Table 4). In general, the concentrations of the tested elements of the three sugar beet agricultural soils in Beni-Mellal region followed the order: Ba > Sr > B > Cr > Ni > Mo > Co > As > Y > Zn > Cu > Nb > Ge > Cd.

**Table 3** Heavy metals and metalloids concentrations of the three agricultural sugar beet soils in Beni-Mellal region

Elements	Units	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
		Mean-SD	Min-Max	CV (%)	Mean-SD	Min-Max	CV (%)	Mean-SD	Min-Max	CV (%)
MnO	%	0.10–0.03	0.08–0.13	30	0.09–0.01	0.07–0.10	11.11	0.04–0.006	0.03–0.04	15.00
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		7.22–0.98	6.62–8.35	13.57	7.36–0.64	6.74–8.03	8.70	10.06–0.62	9.60–10.77	6.16
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		1.89–0.68	1.43–2.68	35.98	1.66–0.53	1.15–2.22	31.93	3.51–0.31	3.25–3.85	8.83
MgO		0.95–0.16	0.79–1.12	16.84	1.00–0.11	0.87–1.09	11.00	2.22–0.28	1.95–2.51	12.61
TiO <sub>2</sub>		0.33–0.04	0.30–0.38	12.12	0.32–0.04	0.28–0.36	12.50	0.47–0.01	0.46–0.49	2.13
As	mg kg <sup>-1</sup>	34.50–0.71	34–166	2.06	12.50–3.5	10–15	28.00	<8	-	-
B		78.00–11.4	70.0–91.0	14.62	73.00–8.00	65.0–81.0	10.96	103.67–3.79	101.0–108.0	3.66
Ba		213.50–19.09	200.0–268.0	8.94	241.00–8.48	207.0–247.0	3.52	186.50–12.02	178.0–348.0	6.45
Co		34.67–4.04	31.0–39.0	11.65	24.67–3.79	22.0–29.0	15.36	31.67–10.26	23.0–43.0	32.40
Cr		60.00–3.36	57.0–65.0	5.60	48.67–13.01	36.0–62.0	26.73	48.33–4.73	43.0–52.0	9.79
Ge		12.33–2.08	10–14	16.87	10.67–0.58	11–11	5.44	25.67–3.78	23–30	14.73
Mo		35.00–3.60	32–39	10.29	32.33–7.37	24–38	22.80	33.67–0.58	33–34	1.72
Nb		16.00–4.24	8–19	26.50	11.50–0.71	3–12	6.17	25.50–6.36	21–30	24.94
Ni		45.33–3.21	43.0–49.0	7.08	34.67–3.05	32.–38.0	8.80	36.33–2.52	34.0–39.0	6.94
Pb		55.00–41.01	26–84	74.56	30.50–6.36	26–35	20.85	<26	-	-
Sr		105.67–7.57	97.0–111.0	7.16	88.33–3.78	84.0–91.0	4.28	74.00–8.18	67.0–83.0	11.05
Y		27.67–8.08	26–27	29.20	19.00–7.55	11–26	39.74	<2	-	-
Cu		22.50–12.50	10–35	55.56	14.00–0.00	14–14	0	<2	-	-
Zn		26.00–0.00	113–164	0.00	19.00–0.00	19–19	0	12–0.00	12–12	0
Se		<40	-	-	<40	-	-	<40	-	-
Cd		<2	-	-	<2	-	-	<2	-	-

*Min* minimum, *Max* maximum, *SD* standard deviation; coefficient of variation is calculated using the equation CV = (standard deviation/mean) × 100%

**Table 4** Comparison of the obtained concentrations of some heavy metals and metalloids in the tested agricultural sugar beet soils in the Beni-Mellal region with other soil quality guidelines of some research around the world

Units	Sample 1	Sample 2	Sample 3	CCME <sup>1</sup>	Continental crust <sup>2</sup>	Agricultural soil		
						Morocco <sup>3</sup>	Spain <sup>4</sup>	India <sup>5</sup>
As mg kg <sup>-1</sup>	34.5	12.5	<8	12	2	-	-	2.4–5.3
B	78	73	103.67	2	15	-	-	-
Ba	213.5	241	186.5	750	550	-	-	576.7–895.2
Co	34.67	24.67	31.67	40	17	-	2.9–10.1	12.7–35.6
Cr	60	48.67	48.33	64	85	16.07–294.0	14.8–42.5	55.9–135.8
Ge	12.33	10.67	25.67	-	1.6	-	-	-
Mo	35	32.33	33.67	5	1.5	-	-	-
Nb	16	11.5	25.5	-	12	-	-	-
Ni	45.33	34.67	36.33	50	44	-	11.4–32.0	0.5–27.6
Pb	55	30.5	<26	70	17	3.4–134.7	6.8–101.3	5.9–26.8
Sr	105.67	88.33	74	-	350	-	-	-
Y	27.67	19	<2	-	22	-	-	-
Cu	22.50	14	<2	63	25	1.46–191.2	12.6–76.8	12.7–69.6
Zn	26.00	19.00	12	200	71	24.5–1272.0	20.3–88.8	71.3–173
Se	<40	<40	<40	1	0.083	-	-	-
Cd	<2	<2	<2	1.4	0.098	2.5–40.08	0.1–0.88	-

<sup>1</sup>(CCME 2001)<sup>2</sup>(Rudnick and Gao 2003)<sup>3</sup>(Oumenskou et al. 2018)<sup>4</sup>(Recatala et al. 2006)<sup>5</sup>(Adimalla et al. 2019)

### Enrichment factor

Calculation of the enrichment factor of all tested soils showed a variation between metals and sites (Table 5). Extremely severe enrichment of Mo was observed in samples 1 and 2 with high values of EF (92.16 and 99.04, respectively); however, sample 3 was characterized by a very severe enrichment of Mo ( $25 \leq EF < 50$ ). With respect to Ge, sample 3 showed a very severe enrichment ( $25 \leq EF = 26.44 < 50$ ), while both samples 1 and 3 showed severe enrichment ( $10 \leq EF < 25$ ). Moreover, severe enrichment was observed for As (sample 1) and B (samples 1 and 2). Sample 2 for As, sample 3 for B, and sample 1 for Co showed moderately severe enrichment. The lowest values of EF are seen for Sr and Fe with a range of 0.33–0.93 and 0.39–0.90, respectively, indicating no enrichment. In contrast, EF values of Cr (1.41), Ni (2.08), Al (1.26), Mn (1.95), Ti (1.36), and Mg (1.22) indicate a minor enrichment of these elements.

### Geo-accumulation index

The geo-accumulation index ( $I_{geo}$ ) values of trace toxic elements in soils of the studied areas are presented in Table 5.

Large variation of the  $I_{geo}$  values for the metals measured in the three agricultural soils varies from class 0 ( $I_{geo} \leq 0$ ) to class 5 ( $3 < I_{geo} < 4$ ).  $I_{geo}$  of most elements (e.g., Fe, Ba, Cr, Sr, Y, Al, Mn, Ti, Mg, Zn, and Ni) were  $\leq 1$  which indicated uncontaminated to slightly contaminated soils. However, samples 1 and 3 are judged moderately contaminated soil ( $1 < I_{geo} < 2$ ) of As and B soil respectively. Samples 1 and 2 are moderately contaminated, and sample 3 is judged as heavily contaminated soil for the Ge. The highest values of  $I_{geo}$  (ranged from 5.90 to 6.39) were found in the three samples for Mo which revealed an extremely contaminated soil with this metal.

### Contamination factor and contamination degree

CF is classified from low contamination ( $CF < 1$ ) to very high contamination factor ( $CF > 6$ ). In this study, the results of the calculated CF are shown in Table 5. CF values of several elements such as Fe, Ba, Cr, Sr, Al, Mn, Ti, Mg, and Zn in the three soil samples ranging from 0.18 to 0.97 indicate a low contamination factor ( $CF < 1$ ), while elements such as Co, Y, Nb, and B in the sample 1; Co, As (2.60), and B in the sample 2; and Co and Nb in the sample 3 show a moderate to considerable contamination factor ( $1 \leq CF \leq 6$ ) in the tested

**Table 5** Enrichment factor (EF), geo-accumulation index ( $I_{geo}$ ), contamination factor (CF), contamination degree ( $C_{deg}$ ), and pollution load index (PLI) of the heavy metals and metalloids analyzed in the three agricultural sugar beet soils of Beni-Mellal region

		EF				$I_{geo}$				CF			
		Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Fe	Sample 1	0.39	0.15	0.30	0.57	0.08	0.03	0.06	0.11	0.38	0.14	0.28	0.53
	Sample 2	0.44	0.10	0.34	0.54	0.07	0.02	0.05	0.09	0.33	0.11	0.23	0.44
	Sample 3	0.90	0.05	0.84	0.94	0.14	0.01	0.13	0.15	0.70	0.06	0.64	0.76
As	Sample 1	18.30	7.13	13.32	23.41	1.44	0.03	1.42	1.46	7.19	0.15	7.08	7.29
	Sample 2	7.26	3.57	4.73	9.78	0.52	0.15	0.42	0.63	2.60	0.74	2.08	3.13
	Sample 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	Sample 1	12.81	2.56	10.07	15.13	0.92	0.13	0.83	1.07	4.59	0.67	4.12	5.35
	Sample 2	13.67	2.98	10.82	16.76	0.86	0.09	0.77	0.96	4.29	0.47	3.82	4.76
	Sample 3	8.78	0.50	8.32	9.30	1.22	0.04	1.19	1.27	6.10	0.22	5.94	6.35
Ba	Sample 1	1.04	0.24	0.81	1.28	0.07	0.01	0.06	0.09	0.37	0.05	0.32	0.43
	Sample 2	1.18	0.30	0.85	1.45	0.07	0.01	0.07	0.08	0.37	0.03	0.33	0.40
	Sample 3	0.43	0.02	0.41	0.44	0.06	0.00	0.06	0.06	0.30	0.02	0.29	0.31
Co	Sample 1	5.80	2.12	3.70	7.95	0.40	0.05	0.36	0.45	2.00	0.23	1.79	2.25
	Sample 2	4.78	2.27	3.02	7.35	0.29	0.04	0.26	0.34	1.43	0.22	1.27	1.68
	Sample 3	2.60	0.65	1.95	3.25	0.37	0.12	0.27	0.50	1.83	0.59	1.33	2.49
Cr	Sample 1	1.85	0.45	1.33	2.18	0.13	0.01	0.12	0.14	0.65	0.05	0.62	0.71
	Sample 2	1.63	0.09	1.53	1.71	0.11	0.03	0.08	0.14	0.53	0.14	0.39	0.67
	Sample 3	0.75	0.06	0.71	0.83	0.11	0.01	0.09	0.11	0.53	0.05	0.47	0.57
Ge	Sample 1	24.60	5.52	18.81	29.81	1.77	0.30	1.43	2.01	8.81	1.49	7.14	1.00
	Sample 2	21.22	4.78	17.84	24.60	1.58	0.00	1.58	1.58	7.86	0.00	7.86	7.86
	Sample 3	26.44	4.55	22.44	31.40	3.68	0.54	3.30	4.30	18.33	2.70	16.43	21.43
Mo	Sample 1	92.16	33.43	58.13	124.96	6.39	0.66	5.84	7.12	31.81	3.28	29.09	35.45
	Sample 2	99.04	45.64	49.53	139.45	5.90	1.34	4.38	6.93	29.40	6.70	21.81	34.54
	Sample 3	44.16	4.44	39.27	47.93	6.14	0.11	6.02	6.20	30.60	0.52	30.0	30.90
Nb	Sample 1	3.44	2.16	1.25	5.58	0.22	0.09	0.13	0.32	1.11	0.46	0.67	1.58
	Sample 2	2.57	0.42	2.27	2.87	0.19	0.01	0.18	0.20	0.96	0.06	0.92	1.00
	Sample 3	2.99	0.40	2.71	3.27	0.43	0.11	0.35	0.50	2.13	0.53	1.75	2.50
Ni	Sample 1	2.78	0.88	1.76	3.35	0.19	0.01	0.21	0.18	0.96	0.07	0.91	1.04
	Sample 2	2.36	0.58	1.84	2.98	0.15	0.01	0.14	0.16	0.74	0.07	0.68	0.81
	Sample 3	1.11	0.07	1.06	1.19	0.16	0.01	0.15	0.17	0.77	0.05	0.72	0.83
Sr	Sample 1	0.94	0.27	0.65	1.20	0.07	0.00	0.06	0.07	0.33	0.02	0.30	0.35
	Sample 2	0.90	0.30	0.65	1.23	0.06	0.00	0.05	0.06	0.28	0.01	0.26	0.28
	Sample 3	0.33	0.02	0.31	0.35	0.05	0.01	0.04	0.05	0.23	0.03	0.21	0.26
Y	Sample 1	3.73	0.91	2.69	4.36	0.26	0.02	0.25	0.29	1.32	0.10	1.24	1.43
	Sample 2	2.70	0.36	2.30	2.98	0.18	0.07	0.11	0.25	0.90	0.36	0.52	1.24
	Sample 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Al	Sample 1	1.31	0.26	1.02	1.52	0.09	0.01	0.09	0.11	0.47	0.06	0.42	0.54
	Sample 2	1.53	0.37	1.18	1.92	0.10	0.01	0.09	0.10	0.48	0.04	0.44	0.52
	Sample 3	0.94	0.03	0.92	0.97	0.13	0.01	0.13	0.14	0.65	0.04	0.62	0.70
Mn	Sample 1	2.61	0.19	2.44	2.82	0.19	0.06	0.16	0.26	0.97	0.29	0.80	1.30
	Sample 2	2.72	0.41	2.27	3.07	0.17	0.03	0.14	0.20	0.87	0.15	0.70	1.00
	Sample 3	0.52	0.06	0.47	0.59	0.07	0.01	0.06	0.08	0.37	0.06	0.30	0.40
Ti	Sample 1	1.44	0.30	1.12	1.71	0.10	0.01	0.06	0.09	0.52	0.07	0.47	0.59
	Sample 2	1.59	0.32	1.28	1.92	0.10	0.01	0.09	0.09	0.50	0.06	0.44	0.56
	Sample 3	1.06	0.07	1.00	1.14	0.15	0.00	0.14	0.15	0.74	0.02	0.72	0.77
Mg	Sample 1	1.07	0.25	0.85	1.35	0.08	0.01	0.06	0.09	0.38	0.07	0.32	0.45
	Sample 2	1.31	0.45	1.00	1.82	0.08	0.01	0.07	0.09	0.40	0.05	0.35	0.44

**Table 5** (continued)

Zn	Sample 3	1.29	0.12	1.15	1.38	0.18	0.02	0.16	0.20	0.90	0.11	0.79	1.01
	Sample 1	1.37	-	1.37	1.37	0.08	-	0.08	0.08	0.39	-	0.39	0.39
	Sample 2	0.89	-	0.89	0.89	0.06	-	0.06	0.06	0.28	-	0.28	0.28
	Sample 3	0.23	-	0.23	0.23	0.04	-	0.04	0.04	0.18	-	0.18	0.18
	$C_{deg}$												
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max					
	Sample 1	60.13	2.72	58.23	63.24	1.19	0.18	1.06	1.40				
	Sample 2	48.38	8.31	41.75	57.70	0.95	0.17	0.76	1.09				
	Sample 3	64.14	1.50	62.41	65.06	1.22	0.07	1.17	1.30				

SD standard deviation, *Min* minimum, *Max* maximum

agricultural sugar beet soils. The highest CF values were found for B in the sample 3 (6.10). As in the sample 1 (7.19), Ge (7.86–10.33) and Mo (29.40–31.81) in all samples indicate that the samples are very high contaminated with these elements.

$C_{deg}$  results in the studied areas were ranged between 48.38 and 64.14 indicating a considerable degree of contamination due to anthropogenic pollution.

#### Pollution load index (PLI)

The evaluation of the toxicity status of the tested soil samples indicates that it was found lower than 1 ( $PLI < 1$ ) in the sample 2 suggesting no polluted soil. However,  $PLI > 1$  in both samples 1 and 3 indicates soil pollution and deterioration of the studied agricultural soils (Table 5).

#### Potential contamination index

Based on the results of  $C_p$  presented in Table 6, the studied elements could be grouped into 3 classes. In all samples,  $C_p$  of Fe, Cr, Al, Sr, Ti, Ba, and Mg was ranged between 0.23 and 1.0 indicating a low pollution of the soils. The second class grouped Co, Nb, and Y where  $1 < C_p \leq 3$ , revealing a moderate pollution. The highest values of  $C_p$  were found for B, As, Ge, and Mo ranging between 3.13 and 35.45, which indicated severe or very severe pollution levels.

#### Discussion

The pH, which is considered as one of the important soil characteristics, was found neutral with an average value of 7.41. It has been reported that soil pH plays an essential role in mobility and retention of trace toxic elements (Jing et al. 2018; Barakat et al. 2019) and plant growth (especially between 6 and 8) (Day and Ludeke 1993). The organic matter was found to be ranged between 4 and 6% which indicated that the tested soils are fertile. Our findings are similar to these

found by Oumenskou et al. (2019) in the same region (Beni-Amir region). The authors found that this area is rich on organic matter (5.72%). Organic matter may influence metals mobility and absorption in soils and increase soil nutrients and modify soil characteristics (Park et al. 2011; Khalifa and Gad 2018; Ahmadi et al. 2019). The range of EC recorded ranged from 0.25 to 0.47  $\mu\text{S cm}^{-1}$  which indicate that the tested soils are not saline since the EC values were lower than 4  $\text{mS cm}^{-1}$  (Shrivastava and Kumar 2015).

The heavy metals and metalloids concentrations in studied soil samples, in particular those that are toxic (As, Co, Ni, and Cr), have a higher concentration than those recorded in other Moroccan agriculture soils (Kao et al. 2007; Mohcine et al. 2016; Barakat et al. 2019). Recently, El Hamzaoui et al. (2020) indicates that the Beni-Moussa perimeter, cultivated

**Table 6** Potential contamination index of the heavy metals and metalloids analyzed in the tested agricultural sugar beet soils of Beni-Mellal region

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Fe	0.53	0.44	0.76
As	7.29	3.13	-
B	5.35	4.76	6.35
Ba	0.43	0.40	0.31
Co	2.25	1.68	2.49
Cr	0.71	0.67	0.57
Ge	10.00	7.86	21.43
Mo	35.45	34.55	30.91
Nb	1.58	1.00	2.50
Ni	1.04	0.81	0.83
Sr	0.35	0.28	0.26
Y	1.43	1.24	-
Zn	2.45	-	0.00
Al	0.53	0.51	0.68
Mn	1.30	1.00	0.40
Ti	0.55	0.52	0.71
Mg	0.24	0.23	0.54

with beet root, wheat, potato, carrot, pea roots, olive trees, oranges, alfalfa, and sugar cane, is slightly contaminated by heavy metals with a positive correlation between Cr, Zn, Cu, Fe, Ni, As, and Cd. Moreover, a comparison of the obtained heavy metals and metalloids concentrations with other soil quality guidelines (SQGs) has been used (Table 4). It has been reported that the comparison of the obtained results and background values found in the soil quality guidelines is widely used to assess the soil contamination with heavy metals and metalloids (Ahmad et al. 2017; El Nemr et al. 2016). To actual date and to the best of our knowledge, no environmental guidelines in Morocco are established in order to be used in the evaluation of agricultural soil contamination. So, SQGs given by the Canadian Council of Ministers of the Environment in the agricultural soil (CCME 2001) were applied as interim measures. The results showed that As, B, and Mo concentrations were higher than the CCME values (12.2 and 5 mg kg<sup>-1</sup>, respectively) and the concentrations of these elements in the continental crust (2.15 and 1.5 mg kg<sup>-1</sup>, respectively) as suggested by Rudnick and Gao (2003). The obtained concentration of Ge exceeded 1.6 mg kg<sup>-1</sup>, its concentrations in the continental crust (Rudnick and Gao 2003; Wiche et al. 2018). Concentration of elements such as Ba, Co, Cr, Ni, Cu, and Zn were below the guidelines established by CCME. In comparison to other agricultural soil, Cr concentration was lower than the maximum values found in other soils in Morocco and India (Table 4), while Cu and Zn values were higher than those found in Morocco (Oumenskou et al. 2018), Spain (Recatala et al. 2006), and India (Adimalla et al. 2019). Overall, concentrations of As, B, Co, Ge, Nb, and Mo in the present study were higher than the levels proposed by the Canadian soil quality guidelines for agricultural soil and/or their levels in the continental crust.

In order to assess the origin of the heavy metals contamination in the agricultural sugar beet soil, we calculate EF. It has been reported that values of EF lower than one indicated that metals are originated from natural sources, while values higher than one are from anthropogenic sources (Sakan et al. 2009; Maanan et al. 2015). In present study, high values of EF of Mo, Ge, As, and Co were found suggesting that these elements may be introduced into the soil due to the agricultural activities such as the excessive use of chemical fertilizers, herbicides, and insecticides.

The EF calculated for other elements such as Nb, Y, Mn, Ni, and Cr indicated a minor to moderate enrichment. It is worthy to note that the sample 3 (Beni-Moussa area) had the lowest levels of enrichment; however, the sample 1 (Beni-Amir area) showed the highest level of enrichment. Similar findings are obtained in other irrigated agricultural soils in Beni-Moussa and Beni-Amir areas (Oumenskou et al. 2018; Barakat et al. 2019; El Hamzaoui et al. 2020).

Moreover, the geo-accumulation index is used to assess soil contamination and judge the quality of soils in terms of

trace elements pollution (Aiman et al. 2016; Alam et al. 2020; Keshavarzi and Kumar 2020). The highest values of  $I_{geo}$  (ranged from 5.90 to 6.39) were found in the three samples for Mo revealed an extremely contaminated soil with this metal. The obtained highest values were probably due to pesticides, fertilizers, and wastewater irrigation (Jing et al. 2018). Variation of the  $I_{geo}$  values from site to site and metal to metal is reported in agricultural soils in Beni-Amir area (Oumenskou et al. 2018) and Beni-Moussa area (Barakat et al. 2019; El Hamzaoui et al. 2020). Barakat et al. (2019) reported that lower anthropogenic contamination with some elements such as Cd, Cr, Cu, Zn, and Fe ranged from moderately to considerably enrichment by these heavy metals due to wastewater irrigation in Beni-Mellal region.

Contamination factor is calculated to evaluate the degree of contamination by different metals (Naveedullah et al. 2013; Giri et al. 2017) and their sources in agricultural soils (Keshavarzi and Kumar 2020). Similar results obtained by several authors showed that CF values for Fe, Ni, Cu, Mn, Cr, and Zn in the agricultural soils indicated very low to moderate pollution level (Varol 2011; Naveedullah et al. 2013; Baltas et al. 2020). Moreover, our results showed that As in the sample 1, Ge and Mo in the sample 2, and B, Ge, and Mo in the sample 3 denote the highest values of CF ranging between 6.10 and 31.81 indicating a very high contamination factor of these elements which can be attributed to anthropogenic inputs.

In addition, by calculating PLI, we can also evaluate the soil contamination caused by anthropic activities (Boamponsem et al. 2010). El Hamzaoui et al. (2020) showed that the PLI values indicate anthropogenic contamination which originates from human and agricultural activities located around Oulad Ayad, Had Bou Moussa, and Afourer (Beni-Moussa area). Furthermore, potential contamination index was used to assess the degree of metal pollution in the agricultural soils (Adimalla et al. 2019). In our case, the highest values of Cp were found for B, As, Ge, and Mo, detected in the sample 1 existing in the Beni-Amir area, which indicated severe or very severe pollution levels. Similarly, Barakat et al. (2019) reported that the irrigated agricultural soils in Beni-Amir were moderately to considerably enriched by heavy metals due to the anthropogenic activities, especially the reuse of wastewater in irrigation.

## Conclusion

In this study, the environmental pollution of several trace elements in the three agricultural sugar beet soils of Beni-Mellal region was examined. Based on the evaluated pollution indices, the comparison with the soil quality guidelines and other agricultural soils, the tested soils are considered polluted with heavy metals and metalloids. Our comparison revealed that some elements such as As, B, Co, Ge, Nb, and Mo exceeded standard levels indicating a considerable pollution of

agricultural sugar beet soils of Beni-Mellal region. Moreover, other trace elements such as Ba, Cr, Ni, Sr, Cu, and Zn did not present an ecological risk since their concentrations were below the standards limits. The EF demonstrate that the soil of the study area was extremely severe enriched by Mo and severe enriched by Ge. In addition,  $I_{geo}$  of elements Fe, Ba, Cr, Sr, Y, Al, Mn, Ti, Mg, and Zn indicates that our soil was uncontaminated to slightly contaminated. CF indicate a moderate to considerable contamination of the soils in the study area by Co, Mo, Ni, Nb, Zn Y, As, and B. These results will provide basic information for the improvement of soil environment management and trace toxic elements pollution prevention in Beni-Mellal region which should be taken into account to monitor and improve the accumulation of trace toxic elements in soil and reduce application rates of agrochemicals. In addition, more studies are needed to assess the human health risks of trace toxic elements contents in region. However, further researches need to be carried out in other agricultural soils and for other types of crops in order to establish a clear picture of the environmental pollution by the trace toxic elements in the Beni-Mellal region.

## Declarations

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

## References

- Adimalla N, Qian H, Wang H (2019) Assessment of heavy metal (HM) contamination in agricultural soil lands in northern Telangana, India: an approach of spatial distribution and multivariate statistical analysis. *Environ Monit Assess* 191:1–15. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7408-1>
- Ahmad M, Lee SS, Lee SE, Al-Wabel MI, Tsang DCW, Ok YS (2017) Biochar-induced changes in soil properties affected immobilization/mobilization of metals/metalloids in contaminated soils. *J. Soils Sediments* 17(3):717–730
- Ahmadi SD, Mahin D, Majid K (2019) Heavy metal pollution assessment in agricultural soils of Kermanshah province, Iran. *Environ Earth Sci* 0:0. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8093-7>, 78
- Aiman U, Mahmood A, Waheed S, Malik RN (2016) Enrichment, geo-accumulation and risk surveillance of toxic metals for different environmental compartments from Mehmood Booti dumping site, Lahore city, Pakistan. *Chemosphere* 144:2229–2237. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.077>
- Alam M, Hussain Z, Khan A, Khan MA, Rab A, Asif M, Shah MA, Muhammad A (2020) The effects of organic amendments on heavy metals bioavailability in mine impacted soil and associated human health risk. *Sci Hortic (Amsterdam)* 262:109067. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109067>
- Baltas H, Sirin M, Gökbayrak E, Özcelik AE (2020) A case study on pollution and a human health risk assessment of heavy metals in agricultural soils around Sinop province, Turkey. *Chemosphere* 241:125015. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125015>
- Barakat A, El Baghdadi M, Rais J, Nadem S (2012) Assessment of heavy metal in surface sediments of day river at Beni-Mellal region, Morocco. *Res J Environ Earth Sci* 4:797–806
- Barakat A, Ennaji W, Krimissa S, Bouzaid M (2019) Heavy metal contamination and ecological-health risk evaluation in peri-urban wastewater-irrigated soils of Beni-Mellal city (Morocco). *Int J Environ Health Res* 00:1–16. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1595540>
- Bhatti SS, Bhat SA, Kumar V, Kaur M, Minakshi, Sambyal V, Singh J, Vig AP, Nagpal AK (2018) Ecological risk assessment of metals in roadside agricultural soils: a modified approach. *Hum Ecol Risk Assess* 24:186–201. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1373328>
- Bhutiiani R, Kulkarni DB, Khanna DR, Gautam A (2017) Geochemical distribution and environmental risk assessment of heavy metals in groundwater of an industrial area and its surroundings, Haridwar, India. *Energy, Ecol Environ* 2:155–167. <https://doi.org/10.1007/s40974-016-0019-6>
- Boamponsem LK, Adam JI, Dampare SB, Nyarko BJB, Essumang DK (2010) Nuclear instruments and methods in physics research B assessment of atmospheric heavy metal deposition in the Tarkwa gold mining area of Ghana using epiphytic lichens. *Nucl Inst Methods Phys Res B* 268:1492–1501. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2010.01.007>
- Cai L, Xu Z, Ren M, Guo Q, Hu X, Hu G, Wan H, Peng P (2012) Source identification of eight hazardous heavy metals in agricultural soils of Huizhou, Guangdong Province, China. *Ecotoxicol Environ Saf* 78: 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.004>
- CCME (2001) Canadian Council of Ministers of the Environment, Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. Technical Report. In Canadian environmental quality guidelines, 1999. Winnipeg, Manitoba. Available at: <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/274/>
- Chabbi I, Baati H, Dammak R, Bahloul M, Azri C (2020) Toxic metal pollution and ecological risk assessment in superficial soils of “rural-agricultural and coastal-urban” of Monastir region, Eastern Tunisia. *Hum Ecol Risk Assess An Int J* 0:1–20. <https://doi.org/10.1080/10807039.2020.1732189>, 27
- Dauvalter V, Rognerud S (2001) Heavy metal pollution in sediments of the Pasvik River drainage. *Chemosphere* 42:9–18. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00094-1)
- Day AD, Ludeke KL (1993) *Plant Nutrients in Desert Environments*, 1st edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Doyi I, Essumang D, Gbeddy G, Dampare S, Kumassah E, Saka D (2018) Ecotoxicology and environmental safety spatial distribution, accumulation and human health risk assessment of heavy metals in soil and groundwater of the Tano Basin, Ghana. *Ecotoxicol Environ Saf* 165:540–546. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.015>
- El Baghdadi M, Barakat A, Sajieddine M, Nadem S (2012) Heavy metal pollution and soil magnetic susceptibility in urban soil of Beni Mellal City (Morocco). *Environ Earth Sci* 66:141–155. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1215-5>
- El Hamzaoui EH, El Baghdadi M, Oumenskou H et al (2020) Spatial repartition and contamination assessment of heavy metal in agricultural soils of Beni - Moussa, Tadla plain (Morocco). *Model Earth Syst Environ* 6:1387–1406. <https://doi.org/10.1007/s40808-020-00756-3>
- El Nemr A, El-Said GF, Ragab S et al (2016) The distribution, contamination and risk assessment of heavy metals in sediment and shellfish from the Red Sea coast, Egypt. *Chemosphere* 165:369–380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.048>
- El Rasafi T, Oukarroum A, Haddioui A, et al (2020) Cadmium stress in plants: a critical review of the effects, mechanisms, and tolerance

- strategies. *Crit Rev Environ Sci Technol* 0:1–52. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435>
- Eziz M, Mohammad A, Mamut A, Hini G (2018) A human health risk assessment of heavy metals in agricultural soils of Yanqi Basin, Silk Road Economic Belt, China. *Hum Ecol Risk Assess* 24:1352–1366. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1412818>
- Elbehri A, Felloun H, Nbou M, Yamini B, Balaghi R, Hammani A, Mzouri EH, Moussadek R, Elhared T, Rouchdi M, et al (2011). Actes de l'Atelier de travail, Projet pilote d'appui aux petits producteurs pour une meilleure adaptation aux changements climatiques dans la région du Tadla Azilal, Centre national de documentation, FAO: Beni Mellal, Morocco
- Giri S, Singh AK, Mahato MK (2017) Metal contamination of agricultural soils in the copper mining areas of Singhbhum shear zone in India. *J Earth Syst Sci* 126. <https://doi.org/10.1007/s12040-017-0833-z>
- Hakanson L (1980) An ecological risk index for aquatic pollution control. a sedimentological approach. *Water Res* 14:975–1001
- Hammoumi NEL, Sinan M, Lekhlif B, Lakhdar M (2013) Use of multivariate statistical and geographic information system (GIS) -based approach to evaluate ground water quality in the irrigated plain of Tadla (Morocco). *Int J Water Resour Environmen tal Eng* 5:77–93. <https://doi.org/10.5897/IJWREE12.078>
- Hu J, Lin B, Yuan M, Lao Z, Wu K, Zeng Y, Liang Z, Li H, Li Y, Zhu D, Liu J, Fan H (2019) Trace metal pollution and ecological risk assessment in agricultural soil in Dexing Pb/Zn mining area, China. *Environ Geochem Health* 41:967–980. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0193-x>
- Jing F, Chen X, Yang Z, Guo B (2018) Heavy metals status, transport mechanisms, sources, and factors affecting their mobility in Chinese agricultural soils. *Environ Earth Sci* 77:1–9. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7299-4>
- Kao T, Mejahed KEL, Bouzidi A (2007) Evaluation de la pollution métallique dans les sols agricoles irrigués par les eaux usées de la ville de Settat ( Maroc ). *Bull l'Institut Sci Rabat, Sect Sci la Vie* 29: 89–92
- Keshavarzi A, Kumar V (2019) Ecological risk assessment and source apportionment of heavy metal contamination in agricultural soils of Northeastern Iran. *Int J Environ Health Res* 29:544–560. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1555638>
- Keshavarzi A, Kumar V (2020) Spatial distribution and potential ecological risk assessment of heavy metals in agricultural soils of Northeastern Iran. *Geol Ecol Landsc* 4:87–103. <https://doi.org/10.1080/24749508.2019.1587588>
- Khalifa M, Gad A (2018) Assessment of Heavy Metals Contamination in Agricultural Soil of Southwestern Nile Delta, Egypt. *Soil Sediment Contam* 27:619–642. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1498445>
- Kowalska J, Mazurek R, Gąsiorek M, Setlak M, Zaleski T, Waroszewski J (2016) Soil pollution indices conditioned by medieval metallurgical activity – A case study from Krakow (Poland). *Environ Pollut* 218:1023–1036. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.053>
- Kumar V, Sharma A, Kaur P, Singh Sidhu GP, Bali AS, Bhardwaj R, Thukral AK, Cerda A (2018) Pollution assessment of heavy metals in soils of India and ecological risk assessment: A state-of-the-art. *Chemosphere*. 216:449–462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.066>
- Li S, Zou D, Li L, Wu L, Liu F, Zeng X, Wang H, Zhu Y, Xiao Z (2020) Evolution of heavy metals during thermal treatment of manure : a critical review and outlooks. *Chemosphere* 247:125962. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125962>
- Maanan M, Saddik M, Maanan M, Chaibi M, Assobhei O, Zourarah B (2015) Environmental and ecological risk assessment of heavy metals in sediments of Nador lagoon, Morocco. *Ecol Indic* 48: 616–626. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.034>
- Mohcine H, Saber N, Moustarhfer K (2016) Heavy metal in agricultural soils in the Sahel Region of Doukkala (Morocco). *Int J Sci Eng Res* 7:414–422
- Nada E, Ferjani BA, Ali R, Bechir BR, Imed M, Makki B (2007) Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiol Plant* 29:57–62. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0009-y>
- Naveedullah HMZ, Yu C, Shen H et al (2013) Risk assessment of heavy metals pollution in agricultural soils of Siling reservoir watershed in Zhejiang province, China. *Biomed Res Int* 2013:1–10
- Nouri M, Haddioui A (2016) Assessment of metals contamination and ecological risk in ait Ammar abandoned iron mine soil. Morocco. *Ekol Bratislava* 35:32–49. <https://doi.org/10.1515/eko-2016-0003>
- Oumenskou H, El Baghdadi M, Barakat A et al (2018) Assessment of the heavy metal contamination using GIS-based approach and pollution indices in agricultural soils from Beni Amir irrigated perimeter, Tadla plain, Morocco. *Arab J Geosci* 11. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-4021-5>
- Oumenskou H, El Baghdadi M, Barakat A et al (2019) Multivariate statistical analysis for spatial evaluation of physicochemical properties of agricultural soils from Beni-Amir irrigated perimeter, Tadla plain, Morocco. *Geol Ecol Landsc* 3:83–94. <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1504272>
- Park JH, Lamb D, Paneerselvam P, Choppala G, Bolan N, Chung JW (2011) Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *J Hazard Mater* 185:549–574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.082>
- Qiuguo Z, Zou D, Zeng X et al (2020) Effect of the direct use of biomass in agricultural soil on heavy metals-activation or immobilization? *Environ Pollut* 115989:115989. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115989>
- Recatala L, Peris M, Sa J (2006) Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65:863–872. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.016>
- Redani L (2015) Competitivite, valorisation des ressources et objectifs de securité alimentaire pour la filier sucrière au Maroc. *Political Science, Corpus ID:161085096*.
- Rudnick RL, Gao S (2003) Composition of the Continental Crust. *Treatise Geochem* 3:1–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00301-6>
- Saddik M, Fadili A (2019) Assessment of heavy metal contamination in surface sediments along the Mediterranean coast of Morocco. *Environ Monit Assess* 191:1–19
- Sagardoy R, Morales F, López-Millán AF, Abadía A, Abadía J (2009) Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol* 11:339–350. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00153.x>
- Sakan SM, Dordević DS, Manojlović DD, Predrag PS (2009) Assessment of heavy metal pollutants accumulation in the Tisza river sediments. *J Environ Manag* 90:3382–3390. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.05.013>
- Shrivastava P, Kumar R (2015) Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci* 22:123–131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Tomlinson DL, Wilson JG, Harris CR, Jeffrey DW (1980) Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. *Helgoländer Meeresun* 33:566–575. <https://doi.org/10.1007/BF02414780>



- Varol M (2011) Assessment of heavy metal contamination in sediments of the Tigris River (Turkey) using pollution indices and multivariate statistical techniques. *J Hazard Mater* 195:355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.051>
- Vassilev SV, Tascón JMD (2003) Methods for characterization of inorganic and mineral matter in coal: a critical overview. *Energy Fuel* 17:271–281. <https://doi.org/10.1021/ef020113z>
- Weissmannová HD, Pavlovský J (2017) Indices of soil contamination by heavy metals – methodology of calculation for pollution assessment (minireview). *Environ Monit Assess* 189(12)
- Wiche O, Székely B, Moschner C, Heilmeier H (2018) Germanium in the soil-plant system—a review. *Environ Sci Pollut Res* 25:31938–31956. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3172-y>
- Zhang C, Li Z, Yang W, Pan L, Gu M, Lee DK (2013) Assessment of metals pollution on agricultural soil surrounding a lead-zinc mining area in the Karst Region of Guangxi, China. *Bull Environ Contam Toxicol* 90:736–741. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-0987-6>

## Annexe 2: Composition des différents milieux de culture utilisés

### 1. Composition de milieu minimum synthétique (MMS)

Composition	MMS-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MMS-Roche phosphate	MMS-Roche phosphate
Glucose	10 g/l	10 g/l	10 g/l
NaNO <sub>3</sub>	2 g/l	2 g/l	2 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l
KCl	0,5 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l	0,01 g/l	0,01 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/l	-	-
RP	-	0.5 g/l	-
TCP	-	-	0.5 g/l

### 2. Composition du milieu modifié d'Aleksandrov (MMA)

Composition	MMA- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MMA-Orthoclase
Glucose	5 g/l	5 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l	0,5 g/l
CaCO <sub>3</sub>	0,1 g/l	0,1 g/l
FeCl <sub>3</sub>	0,006 g/l	0,006 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/l	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	2,0 g/l
Orthoclase	-	2,0 g/l

### 3. Composition du milieu LB (Lauria-Burtani)

Composition	Quantité
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	5 g/l
L- tryptophane	1 g/l
Eau distillée 1 litre	
pH= 7,0	

4. Composition du milieu Hickey Tresner

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
<b>Extrait de levure</b>	1 g/l
<b>Extrait de bœuf</b>	1 g/l
<b>Amine A NZ</b>	2 g/l
<b>Dextrine</b>	10 g/l
<b>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	20 mg/l

5. Composition du milieu Bennett

<b>Composition</b>	<b>Bennett solide</b>	<b>Bennett liquide</b>
<b>Glucose</b>	10 g/l	10 g/l
<b>Extrait de levure</b>	2 g/l	10 g/l
<b>Extrait de bœuf</b>	1 g/l	1 g/l
<b>Peptone</b>	2 g/l	2 g/l
<b>Agar</b>	20 g/l	20 g/l
<b>Eau distillée 1 litre</b>		
<b>pH= 7,3</b>		

6. Composition du Milieu PDA

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
<b>Dextrose</b>	20 g/l
<b>Extrait de pomme de terre</b>	4 g/l
<b>Agar</b>	15 g/l
<b>Eau distillée 1 litre</b>	
<b>pH= 5,6</b>	

7. Composition du milieu gélosé

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
<b>Peptone</b>	5 g/l
<b>Chlorure de sodium</b>	5 g/l
<b>Extrait de levure</b>	2.5 g/l
<b>Extrait de viande</b>	1 g/l
<b>Agar</b>	15 g/l
<b>Eau distillée 1 litre</b>	
<b>pH= 7,0</b>	