



Identification de souches de *Rhizobium* efficaces pour améliorer la fertilité des sols oasiens

Identification of rhizobia strains for enhancing the fertility of oasis soils

Oumaima Chaieb^{1,2}, Souhir Abdelkrim¹, Wael Taamalli^{3,4}, Khediri Mannai¹, Fatma Souissi¹, Moez Jebara¹ & Salwa Harzalli Jebara^{1*}

¹ Laboratoire des Légumineuses et Agrosystèmes Durables, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, BP 901, 2050 Hamma- Lif, Tunisie

² Institut Supérieur Agronomique Chott Mériem BP 47, 4042 Chott Mériem Sousse, Tunisie

³ Laboratoire de Biotechnologie de l'Olivier, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, BP 901, 2050 Hamma- Lif, Tunisie

⁴ Institut Supérieur de Biotechnologie de Béja, Université de Jendouba, BP 382, 9000 Béja, Tunisie

Article info

Histoire :

Reçu : 19 Septembre 2024

Accepté : 11 Décembre 2024

Mots-Clés : Fertilité, féverole, inoculation, oasis, PGPR, *Rhizobium*.

* Auteur correspondant

jebarasalwa@yahoo.fr

Résumé

Les sols oasiens de Tunisie sont confrontés à plusieurs contraintes climatiques et pédologiques qui entravent le développement de l'oasis et sa valorisation, ce qui menace sa durabilité. Dans ce contexte, la symbiose *Rhizobium* -féverole (*Vicia faba*) semble être bénéfique pour améliorer la fertilité des sols oasiens. Dans cette étude dix souches de *Rhizobium* ont été isolées des nodules racinaires de *Vicia faba* cultivée sur 12 sols oasiens et ont été identifiées et criblées *in vitro* pour leurs activités favorisant la croissance des plantes (PGP). Le séquençage de l'ADNr 16S a révélé la présence de trois espèces représentées par *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium pusense* et *Rhizobium laguerreae*. L'analyse de la tolérance des souches rhizobiales au stress abiotique, leur efficacité et leur capacité à produire des substances favorisant la croissance des plantes a montré un grand potentiel surtout de 2 souches Vf19 et Vf24 de *R. laguerreae*. L'étude de l'effet de l'inoculation de *Vicia faba* par les deux souches Vf19 et Vf24 de *R. laguerreae* dans un sol pauvre de provenance de l'oasis Ibn Chabbat à Tozeur a montré une efficacité symbiotique élevée de la souche *R. laguerreae* Vf19 en association avec les plantes de féverole avec une augmentation significative de la biomasse sèche des parties aériennes, racinaires et nodulaires. De plus, l'inoculation avec la même souche a améliorée significativement la teneur du sol en azote totale de 50%, par rapport au sol non inoculé. Il ressort de cette étude que la souche Vf19 de *R. laguerreae* est performante pour augmenter la croissance de la féverole et peut être proposée pour améliorer la fertilité du sol dans les oasis du sud Tunisien.

Article info

Article history:

Received: 19 September 2024

Accepted: 11 December 2024

Keywords: Fertility, faba bean, inoculation, oasis, PGPR, *Rhizobium*.



Copyright©2024 JOASD

*Corresponding author

jebarasalwa@yahoo.fr

Abstract

Oases are among the most productive and fragile ecosystems in drylands, playing a vital role in the agricultural and socio-economic development of these regions since ancient times. Nevertheless, the oasis soils of Tunisia face several climatic and soil constraints. In this context, Rhizobium- faba bean (*Vicia faba*) symbiosis seems to be beneficial to improve the fertility of oasis soils. In this study, ten *Rhizobium* strains were isolated from the root nodules of *Vicia faba* grown on 12 oasis soils and were identified and screened *in vitro* for their plant growth promoting (PGP) activities. The 16S rDNA sequencing revealed three species represented by *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium pusense* and *Rhizobium laguerreae*. These bacterial strains possess numerous PGP activities; in particular *R. laguerreae* strains Vf19 and Vf24 were able to tolerate abiotic stresses, to synthesize indoleacetic acid and were siderophore producers. A pot experiment was carried out in a greenhouse to study the potential of *R.*

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

laguerreae strains Vf19 and Vf24 in the soil from Ibn Chabbat oasis, Tozeur. Results showed a high symbiotic efficiency of *R. laguerreae* Vf19, which significantly improved faba bean growth and nodules number. In addition, inoculation with the same strain significantly increased soil total nitrogen content by 50%, compared to the uninoculated soil. This study revealed the great potential of the strain *R. laguerreae* Vf19 as an effective biofertilizer to enhance soil nitrogen content and to improve faba bean growth in oases.

1. INTRODUCTION

Le palmier dattier est la culture pilier dans les écosystèmes oasiens, source de revenus pour les agriculteurs locaux et l'économie nationale. Néanmoins, en raison du changement climatique, les oasis deviennent de plus en plus fragiles et largement impactées par des contraintes naturelles et/ou anthropiques, conduisant ainsi à la désertification. Les palmeraies des régions arides comme la Tunisie sont fréquemment entravé par un bilan hydrique annuel négatif, températures extrêmes, érosion éolienne, ainsi qu'une faible fertilité du sol (Vurukonda et al. 2015, Anli et al. 2021).

A la recherche de solutions pour améliorer la fertilité des sols dans les oasis, les légumineuses apparaissent comme de bonnes candidates, elles sont bien connues pour offrir des avantages indirects/directs aux agroécosystèmes et sont couramment utilisées comme engrais vert ou bien des cultures de couverture. De même, l'inclusion de légumineuses dans la rotation des cultures est une approche durable pour réduire les besoins en engrais azotés et augmenter les rendements des cultures suivantes. Ces plantes exercent plusieurs effets positifs: elles améliorent la fertilité des sols, préviennent l'érosion et assurent la protection des sols (Jach et al. 2022). De plus les légumineuses enrichissent le sol en azote (N). En effet, elles peuvent fixer des quantités importantes d'azote atmosphérique libre via une symbiose avec les rhizobactéries fixatrices d'azote et offrent ainsi un meilleur environnement pour les cultures suivantes améliorant leur croissance et leur productivité. En outre, ces rhizobactéries peuvent présenter d'autres propriétés, tel que la synthèse de phytohormones (comme acide indole-3-acétique), la production de sidérophores, la protection des plantes contre les agents pathogènes, la solubilisation du phosphate (Abdelkrim et al. 2018) et sont ainsi considérées comme des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR). En effet, ces PGPR jouent un rôle crucial dans la croissance des plantes et confèrent à l'hôte la tolérance et la survie dans des environnements stressants et contribuent aussi indirectement à

la stabilisation et maintenance des nutriments du sol (Abdelkrim et al. 2020, Taha et al. 2022).

En raison de ses potentialités symbiotiques et de ses capacités à pousser dans un large éventail de conditions climatiques et pédologiques, la féverole est largement utilisée dans divers systèmes de culture tels que les cultures intercalaires ou en rotation pour améliorer la fertilité du sol et réduire la consommation d'engrais azotés (Saidi et al. 2013a, Nurgi et al. 2023). Ces cultures sont bien nodulées dans plusieurs sols tunisiens ; cependant, ce n'est pas toujours le cas pour les sols des oasis. Néanmoins, jusqu'à présent, la symbiose féverole -*Rhizobium* a été encore très peu exploitée dans les sols oasiens, c'est pourquoi un intérêt particulier a été porté à ce sujet et notamment aux souches de *Rhizobium* efficaces associées aux nodules de *V. faba* dans les oasis ainsi que l'efficacité de leur utilisation comme biofertilisant pour améliorer la fertilité des sols oasiens

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de (i) isoler des souches de *Rhizobium* à partir des nodules racinaires de *Vicia faba* cultivée dans les sols oasiens de la région du Djérid (ii) étudier leur tolérance au stress abiotique, leur efficacité, leur capacité à produire des substances favorisant la croissance des plantes (iii) étudier l'effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de *Vicia faba* et la teneur en N des feuilles et du sol lorsque la plante est cultivée dans un sol pauvre en provenance de l'oasis Ibn Chabbat, Tozeur.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Description du site et échantillonnage

L'étude a été menée dans le gouvernorat de Tozeur caractérisé par un climat aride inférieur à saharien des précipitations peu fréquentes et irrégulières. Les échantillons de sol ont été collectés à partir de 12 oasis (Tableau 1) sous les palmiers dattiers et ont été transférés au laboratoire.

2.2. Culture des plantes et isolement de bactéries symbiotiques

Les graines de féverole (*Vicia faba* L. var. minor) de la variété Saber 02 ont été désinfectées avec

Tableau 1. Provenance des échantillons de sol collectés des oasis du sud de la Tunisie.

Table 1. Origin of soil samples collected from oases in southern Tunisia.

Oasis	Localisation GPS	Type d'oasis	Historique de la culture des légumineuses
Hazoua 1	33.730742, 7.583177	Traditionnel	Pas de culture de légumineuses
Hazoua 3	33.732759, 7.653462	Moderne	<i>Medicago sativa</i>
Chebika	34.317784, 7.937246	Traditionnel	<i>Vicia faba</i>
Tameghza	34.383573, 7.940148	Traditionnel	<i>Vicia faba</i>
Mides	34.410748, 7.918715	Traditionnel	<i>Vicia faba</i>
Hamma du Djérid	34.003176, 8.159327	Moderne	<i>Medicago sativa</i>
Degache 1	33.975352, 8.207589	Moderne	Pas de culture de légumineuses
Degache 2	33.986082, 8.230277	Traditionnel	<i>Medicago sativa</i>
Ibn Chabbat Tozeur	33.942962, 7.996816	Moderne	Pas de culture de légumineuses
Tozeur	33.898963, 8.134240	Traditionnel	<i>Medicago sativa</i>
Ras El Ain Nefta	33.876880, 7.877116	Traditionnel	<i>Medicago sativa</i>
Mrah Lahouar	33.858717, 7.989330	Moderne	<i>Vicia sativa</i>

de l'éthanol 70 % pendant 1 min, lavées plusieurs fois avec de l'eau stérile et germées à 28 °C sur du papier filtre humide dans des boîtes de Pétri. Après 3 jours, les graines ont été plantées dans des pots en plastique contenant les sols échantillonnés. Les plantes de *Vicia faba* ont été irriguées avec une solution nutritive sans nitrate, comme décrit par Vadez et al. (1996). Au stade floraison, les plantes entières ont été récoltées.

Les nodules collectés ont été lavés avec de l'eau stérile ; leurs surfaces ont été désinfectés avec de l'éthanol 70 % et du HgCl₂ 0,2 % puis lavés avec de l'eau distillée stérile selon la méthode décrite par Somasegaran and Hoben (1985). Après, les nodules ont été écrasés et la suspension résultante a été étalée sur le milieu YEMA (Vincent 1970). Les boîtes ont été mises dans l'étuve à 28°C pendant 3 à 6 jours. Chaque colonie obtenue a été repiqué jusqu'à obtention de colonies pures. Tous les isolats ont été conservés dans du glycérol à 20 % à - 80 °C.

2.3. Identification d'isolats sélectionnés par séquençage de l'ADNr 16S

L'extraction de l'ADN chromosomique a été réalisée par lyse thermique (Ahumada et al. 2022). La réaction PCR a été faite en utilisant les amorces universelles fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Le séquençage des amplicons purifiés a été réalisé en utilisant les amorces universelles 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3') et 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Les séquences d'ADNr 16S ont été analysées avec la base de données de nucléotides disponible à la GenBank

à l'aide de l'outil BLAST de la base de données NCBI du National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.4. Evaluation de la performance symbiotique des bactéries isolées

Ce test a été réalisé dans des pots en plastique contenant du sable stérilisé. Les souches rhizobiennes ont été utilisées pour l'inoculation des plantes de *Vicia faba* L. var. minor Sabre 02. Les graines ont été stérilisées en surface, germées sur gélose à 0,9% dans des boîtes de Petri et incubées à 28°C pendant 72h. Chaque souche a été cultivée dans un Erlenmeyer contenant le milieu YEM liquide (Vincent 1970) qui est mis sous agitation continue (150 rpm) à 28 ° C pendant 48 h. Les plantules ont été transférées dans des pots en plastique et inoculées avec 1 ml de chaque suspension bactérienne à part. Les plantes témoins ont été traitées avec du milieu YEM non inoculé. Les plantes ont été cultivées dans une serre à 25 °C/19 °C (jour/nuit), une humidité relative de 60 %, une photopériode de 16 h et arrosées avec une solution nutritive sans azote de Vadez et al. (1996). Les plantes ont été récoltées au stade de floraison et leurs poids sec et leurs nombre de nodules ont été déterminés.

2.5. Criblage *in vitro* de souches bactériennes pour leurs activités favorisant la croissance des plantes (PGP)

Les souches de rhizobium isolées ont été étudiées pour leurs propriétés PGP: production d'acide indole acétique (AIA), sidérophores ainsi que leur capacité à solubiliser le phosphate tricalcique.

Pour ce faire, un test qualitatif pour la production d'IAA a été réalisé comme décrit par Glickmann and Dessaux (1995). Les souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à solubiliser le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme décrit par Nautiyal (1999) en utilisant le milieu phosphate du National Botanical Research Institute (NBRIP) (g L^{-1} : glucose, 10 ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1).

La production de sidérophores a été détectée à l'aide du test universel Chrome Azuroil Sulphonate (CAS), décrit par Schwyn and Neilands (1987).

2.6. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production de cyanure d'hydrogène a été mesurée qualitativement en adaptant la méthode de Feigl and Anger (1966).

2.7. Tolérance des souches rhizobiennes au stress osmotique (salin et PEG)

La tolérance au stress salin a été réalisée sur milieu gélosé contenant différentes concentrations de NaCl (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9 et 1 M) et incubé à 28 °C pendant 5 jours. La tolérance des souches rhizobiennes au stress hydrique a été fait comme décrit par Busse et Bottomley (1989).

2.8. Etude des potentialités des souches rhizobiales pour l'amélioration de la fertilité d'un sol oasien pauvre

Afin d'étudier l'efficacité d'utiliser les souches rhizobiales les plus efficaces, en association avec *Vicia faba* deux souches de *R. laguerreae* (Vf19 et Vf24) ont été sélectionnées sur la base de leur efficacité symbiotique, de leur activité favorisant la croissance des plantes et de leur tolérance au stress abiotique. Dans cette étude, un sol oasien pauvre de provenance de l'oasis Ibn Chabbat, Tozeur a été utilisé afin d'évaluer l'effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de la féverole et la teneur en N des feuilles et du sol.

Le sol est de texture sableuse avec un faible pourcentage de matière organique 0,09 %, caractérisé par un pH alcalin (8,5), avec des teneurs de 53,17 mg kg^{-1} de phosphore assimilable et de 44,56 mg kg^{-1} de potassium échangeable.

La désinfection, la germination, le semis des graines de *Vicia faba* L. var. minor Sabre 02 et l'inoculation bactérienne a été fait comme décrit dans la section 2.4.

Des plantes non inoculées ont été utilisées comme témoin. Dix répétitions pour chaque traitement ont été réalisées.

L'expérience a été menée dans une serre à 25 °C/19 °C (jour/nuit), une humidité relative de 60 %, une photopériode de 16 h/8 h d'obscurité et arrosées uniquement avec de l'eau. Les plantes ont été récoltées au stade de floraison. La biomasse sèche des parties aériennes, racinaires et nodulaires ont été enregistrées, ainsi que de la teneur en azote du sol et des feuilles.

2.9. Analyses statistiques

L'analyse statistique de variance de l'ensemble des données a été accomplie en utilisant le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 18. La comparaison des moyennes a été effectuée en utilisant le test Tukey HSD à $p < 0,05$.

3. RESULTATS & DISCUSSION

3.1. Identification des isolats par séquençage de l'ADNr 16S

Une collection de dix souches de rhizobium a été isolée à partir des nodules racinaires stérilisés en surface de *Vicia faba* L cultivée dans les 12 sols oasiens. Le séquençage de l'ADNr 16S a révélé trois espèces représentées par *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium pusense* et *Rhizobium laguerreae*, ce qui laisse suggérer leur adaptation aux conditions climatiques extrêmes des oasis. Les séquences finales des souches bactériennes isolées sont disponibles dans GenBank (Tableau 2).

L'isolement de ces trois espèces des nodules racinaires de la féverole cultivée sur des sols de différentes provenances de la Tunisie a également été décrite précédemment (Saidi et al. 2013a, Saidi et al. 2013b, Ben Moussa et al. 2022). Des rapports antérieurs ont aussi montré que la féverole était capable de former une relation symbiotique avec la souche *R. laguerreae* au Pérou, en Grèce, en Algérie, en Tunisie et en Espagne (Saidi et al. 2013b, Belhadi et al. 2018, Efstathiadou et al. 2020). Ces souches ne représentent que 17 % des isolats, d'où la fréquence élevée d'espèces non rhizobiennes hébergées dans les nodules racinaires de la féverole cultivée sur les sols oasiens.

3.2. Évaluation des performances des bactéries symbiotiques sur la croissance des plantes et criblage des souches rhizobiales

Les résultats ont montré une augmentation significative de la biomasse sèche des parties aériennes (MSA) et racinaires (MSR), de 5 fois

Tableau 2. Identification des souches rhizobiales isolées des nodules racinaires de *Vicia faba* L. cultivée sur les 12 sols oasiens et provenance de chaque souche.

Table 2. Identification of rhizobial strains isolated from root nodules of *Vicia faba* L. grown on 12 oasis soils and the origin of each strain.

Identifiant GenBank des séquences	Espèce	Pourcentage de similarité	Provenance
ON411691	<i>R. leguminosarum</i> (Vf4)	99,90 %	Tozeur
ON411700	<i>R. leguminosarum</i> (Vf14)	99,81 %	Tameghza
ON411701	<i>R. pusense</i> (Vf15)	100%	Hezoua 3
ON411703	<i>R. pusense</i> (Vf17)	100 %	Mrah Lahouar
ON411705	<i>R. laguerreae</i> (Vf19)	99,90 %	Mides
ON411706	<i>R. pusense</i> (Vf20)	100 %	Mides
ON411710	<i>R. laguerreae</i> (Vf24)	99,81 %	Hezoua 1
ON411713	<i>R. pusense</i> (Vf28)	100 %	Hezoua 1
ON411726	<i>R. pusense</i> (Vf41)	100 %	Chebika
ON411727	<i>R. pusense</i> (Vf42)	100 %	Tameghza

chez les plantes inoculées avec *Rhizobium laguerreae* Vf19, par rapport à celles non inoculées (Fig. 1). Concernant la matière sèche des parties aériennes, les plantes inoculées avec les espèces de *Rhizobium* Vf14, Vf24 et Vf28 ont présenté une augmentation significativement plus élevée par rapport aux autres plantes (Fig. 1). De plus, une hausse significative de la MSR a été enregistrée chez les plantes inoculées avec *R. laguerreae* Vf24.

Concernant la nodulation, une différence significative dans le nombre de nodules par plante a été observée pour seulement quatre souches de rhizobium parmi une collection de dix souches. Les résultats ont révélé que la souche Vf19 de *R. laguerreae* présentait le plus grand nombre de nodules (49 nodules par plante). Les plantes témoins non inoculées n'ont pas présentées des nodules sur leurs racines.

Dans la présente étude, nous avons identifié quatre souches bactériennes capables de noduler et efficaces sur leur hôte d'origine la fève. Elles étaient étroitement liées à *R. leguminosarum* et *R. laguerreae*, ce qui suggère qu'elles pourraient être les principales souches fixatrices d'azote de la fève dans les sols des oasis du sud Tunisien. Ces résultats sont conformes aux conclusions de Belhadi et al. (2018).

Nous avons noté une hausse significative de la biomasse sèche des parties aériennes et racinaires et du nombre de nodules suite à l'inoculation des plantes par la souche *R. laguerreae*, un tel effet peut être lié au métabolisme du partenaire bactérien dans les nodules et à son interaction variable avec le métabolisme de la plante hôte (Mhadhbi et al. 2011, Ben Moussa et al. 2022).

3.3. Activités PGP, production de HCN et tolérance au stress osmotique des souches rhizobiennes

Une analyse a été réalisée pour étudier les différentes activités favorisant la croissance des plantes des souches bactériennes isolées.

3.3.1. Production de l'acide indole acétique

L'étude des traits PGP des souches bactériennes ont été mentionnées dans le Tableau 3. L'estimation quantitative de la production de l'AIA en utilisant le tryptophane comme précurseur a révélé que toutes les souches étaient capables de produire cette phytohormone avec des niveaux variables allant de 3,66 à 40,37 µg ml⁻¹. Parmi les souches rhizobiales, Vf19, Vf28 et Vf42 produisent la plus grande quantité d'AIA (Tableau 3).

3.3.2. Capacité de solubilisation du phosphate

La capacité de solubilisation du phosphate tricalcique était absente chez toutes les souches (Tableau 3).

3.3.3. Production de sidérophores

La capacité des souches bactériennes à produire et sécréter des composés chélateurs du fer est évaluée par le développement de halos orange autour des colonies sur le milieu CAS et a été détectée chez toutes les souches, à l'exception de *R. pusense* (Vf 28). Comme le montre le Tableau 3, Parmi les espèces rhizobiennes, Vf19, Vf24 et Vf42 ont montré une capacité de production de sidérophores plus élevée que les autres souches (Tableau 3).

3.4. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

A l'exception de *R. leguminosarum* (Vf14), un faible potentiel de production de HCN a été observé chez les souches de *Rhizobium* Vf4, Vf17, Vf19 et Vf28 (Tableau 3).

3.5. Tolérance des souches bactériennes au stress salin et osmotique

Les souches de *Rhizobium* ont toléré des concentrations élevées de NaCl allant jusqu'à 0,9

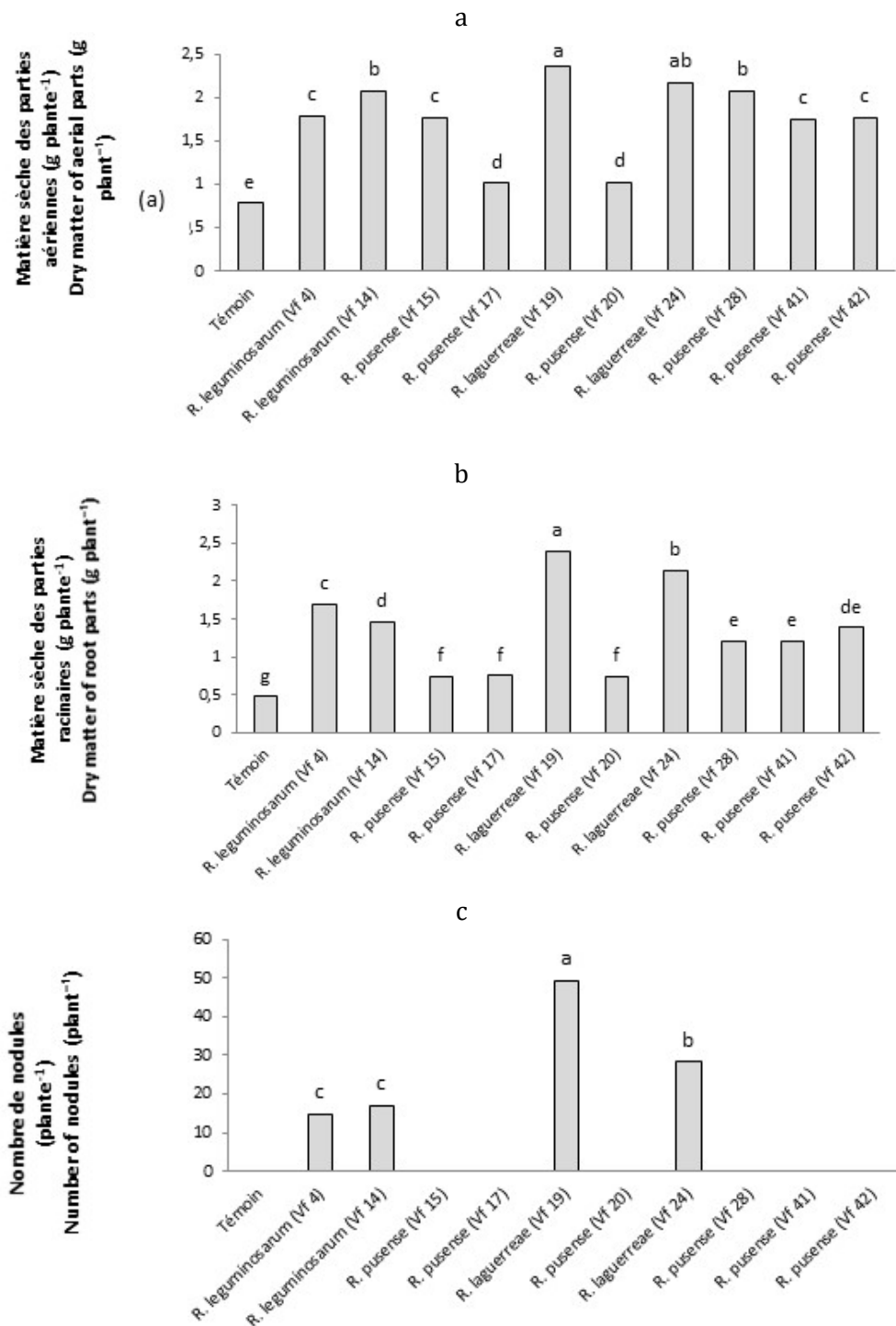


Fig. 1. Effet de l'inoculation bactérienne sur les paramètres de croissance des plantes de fève. (a) Matière sèche des parties aériennes ; (b) Matière sèche des parties racinaires ; (c) Nombre de nodules. Les résultats sont des moyennes (\pm SD) de cinq mesures. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Tukey HSD à $p < 0,05$.

Fig. 1. Effect of bacterial inoculation on growth parameters of faba bean plants. (a) Shoot dry biomass; (b) Root dry biomass; (c) Number of nodules. Results are means (\pm SD) of five replicates. Means with different letters are significantly different according to Tukey test at $p < 0.05$.

Tableau 3. Caractéristiques des souches rhizobiales isolées des nodosités racinaires des plantes de de *Vicia faba* L cultivée sur les 12 sols oasiens.

Table 3. Characteristics of rhizobial strains isolated from faba bean root nodules.

Souche	Espèce	Max NaCl (mM)	PEG 30%	AIA	Sidérophores	PS	HCN
Vf4	<i>R. leguminosarum</i>	900	++	12,20	10,40	nd	+
Vf14	<i>R. leguminosarum</i>	900	++	6,86	10,50	nd	+++
Vf15	<i>R. pusense</i>)	1000	+++	18,30	8,07	nd	-
Vf17	<i>R. pusense</i>	1000	+++	6,05	16,30	nd	+
Vf19	<i>R. laguerreae</i>	900	++	25,36	23,51	nd	+
Vf20	<i>R. pusense</i>	1000	++	3,66	4,87	nd	-
Vf24	<i>R. laguerreae</i>	900	++	12,87	25,07	nd	-
Vf28	<i>R. pusense</i>	1000	+++	31,50	nd	nd	+
Vf41	<i>R. pusense</i>	1000	+++	6,78	18,60	nd	-
Vf42	<i>R. pusense</i>	1000	+++	40,37	26,50	nd	-

AIA: Production de l'acide 3-indole acétique. PS: Solubilisation du phosphate tricalcique. HCN: Production de cyanure d'hydrogène, absente, -; faible, +; modérée, ++; forte, +++. nd: activités non détectées.

M et 1 M. De même, la tolérance des souches au stress osmotique a montré que toutes les souches bactériennes ont été capables de croître en présence de 30% de PEG (Tableau 3).

Les propriétés PGP des bactéries ont été étudiées afin de sélectionner des souches à fort potentiel pour être utilisées comme biofertilisants. La caractérisation in vitro des bactéries a montré que toutes les souches avaient la capacité de produire de l'AIA lorsque le milieu était supplémenté en L-tryptophane. Il a été signalé que 80 % des bactéries isolées de la rhizosphère sont capables de synthétiser cette phytohormone (Khalid et al. 2004). Dans cette étude, la production d'IAA par les bactéries variait de 3,66 à 40,37 µg ml⁻¹. Ceci est en accord avec les observations de Saidi et al. (2013a) sur les nodules racinaires de la féverole. Des résultats similaires ont été obtenus par Rajendran et al. (2012) avec des valeurs observées d'AIA allant de 13,56 jusqu'à 62,64 µg ml⁻¹ chez les bactéries isolées des nodules de racine de fenugrec. De même, Abdelkrim et al. (2018) ont observé des valeurs de 0,89 à 63,55 µg ml⁻¹ dans des bactéries isolées de nodules de gesse cultivés dans les sols tunisiens, suggérant une symbiose potentielle et une relation plus étroite entre les souches bactériennes et leurs hôtes.

Les résultats du test qualitatif de production de HCN ont montré que 50 % des souches bactériennes étaient capables de produire du HCN. Ce métabolite secondaire volatil produit par les micro-organismes joue un rôle majeur dans le mécanisme de biocontrôle visant à

protéger les plantes contre les attaques d'un pathogène fongique (Olanrewaju et al. 2017).

Dans la présente étude, toutes les souches bactériennes étaient tolérantes au stress abiotique. Ce résultat peut être dû aux caractéristiques du climat et du sol d'origine qui peuvent agir comme une pression sélective basée sur des mécanismes d'adaptation bactériens pour faire face aux conditions environnementales difficiles. Résultats corroborés par des études antérieures de Hnini et al. (2022) qui ont démontré une plus grande tolérance aux stress abiotiques des bactéries endophytes habitant les nodules racinaires de l'acacia du désert.

Ces résultats sont prometteurs, puisque ce type de bactéries peut être utilisé pour l'inoculation des plantes sous stress hydrique ou salin. En effet, ces souches peuvent conférer une tolérance et une adaptation à la plante hôte au stress abiotique.

3.4. Effet de l'inoculation avec *R. laguerreae* sur les paramètres de croissance de *Vicia faba* et la teneur des feuilles et du sol en azote

Comme le montre le Tableau 4 les souches rhizobiales ont interagi différemment avec la plante hôte et le sol. En effet, l'inoculation a augmenté de manière significative la biomasse végétale, allant de 30 à 91% dans la partie aérienne et de 155 à 194 % dans les racines des plantes cultivées dans le sol oasien pauvre par rapport aux plantes témoins.

En effets des augmentations significatives de la biomasse sèche des parties aériennes, racinaires et nodulaires (91%, 194% et 587%,

Tableau 4. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de la féverole et la teneur en N des feuilles et du sol.

Table 4. Effect of bacterial inoculation on faba bean growth as well as nitrogen content in leaves and soil.

	Témoin	<i>R. laguerreae</i> (Vf19)	<i>R. laguerreae</i> (Vf24)
MSA (g plante ⁻¹)	1,37c	2,62a	1,78b
MSR (g plante ⁻¹)	0,82c	2,41a	2,09b
MSN (mg plante ⁻¹)	16,04c	110,22a	74,35b
Teneur en azote (%)	2,21c	3,72a	3,28b
Teneur du sol en azote (g kg ⁻¹)	0,10a	0,15b	0,12ab

respectivement), ainsi que de la teneur en azote des feuilles (68%), ont été enregistrées chez les plantes inoculées avec la souche *R. laguerreae* Vf19, par rapport aux plantes non inoculées (Tableau 4). De plus, l'inoculation avec la même souche a amélioré significativement la teneur du sol en azote totale de 50%, par rapport au sol non inoculé.

Parmi les souches rhizobiales étudiées, *R. laguerreae* a montré une efficacité symbiotique élevée sur les plantes de *Vicia faba* et a favorisé une augmentation significative des paramètres de croissance. Récemment, cette espèce a été proposée comme souches nodulantes d'autres légumineuses notamment *Phaseolus vulgaris* et *Lens culinaris* (Taha et al. 2018, Flores-Félix et al. 2019).

En plus de son efficacité de fixation symbiotique de l'azote avec les légumineuses partenaires, *R. laguerreae* a également montré d'intéressantes activités PGP in vitro. Dans notre étude, *R. laguerreae* Vf19 a pu produire de l'AIA, les sidérophores et le HCN ce qui concorde avec les résultats d'autres études menées avec des souches de ce même genre. Ainsi, une croissance améliorée des racines avec une nodulation plus élevée peut avoir été la conséquence d'une production accrue d'AIA, qui stimule la division et l'élongation des cellules végétales, stimulant ainsi l'élongation des racines des plantes, ce qui entraîne une amélioration de l'absorption des minéraux et des nutriments, contribuant ainsi grandement à la croissance des plantes. Ainsi, l'inoculation de la féverole avec la souche rhizobiale *R. laguerreae* Vf19 peut être signalée comme l'une des pratiques durables pour augmenter sa productivité et améliorer la fertilité du sol dans les oasis du sud Tunisien.

4. CONCLUSION

Ce travail a montré que l'isolement des bactéries symbiotiques dans le sud de la Tunisie, pourraient être un outil précieux pour la sélection de bactéries efficaces à des traits PGP importants et une haute tolérance aux stress salins et hydriques, ce qui peut conférer une

meilleure adaptation de la plante hôte aux conditions climatiques les plus difficiles. Aussi, il ressort que la souche *R. laguerreae* Vf19 a un bon potentiel d'amélioration de la croissance des plantes de féverole en conditions contrôlées et peut être proposée pour favoriser la croissance de la féverole et améliorer la fertilité du sol dans les oasis du sud Tunisien. Cette souche peut être considérée comme un biofertilisant. Une étude de son mécanisme d'action ainsi que son potentiel en plein champ va être établie.

Acknowledgment

Les auteurs remercient le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique.

REFERENCES

- Abdelkrim, S., Jebara, S. H., Saadani, O., Abid, G., Taamalli, W., Zemni, H., Mannai, K., Louati, F., and Jebara, M. (2020). In situ effects of *Lathyrus sativus*- PGPR to remediate and restore quality and fertility of Pb and Cd polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 192.
- Abdelkrim, S., Jebara, S. H., Saadani, O., Chiboub, M., Abid, G., and Jebara, M. (2018). Effect of Pb-resistant plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on growth and lead uptake by *Lathyrus sativus*. *Journal of Basic Microbiology* 58, 579–589.
- Ahumada, G., Gómez-ÁlvarezEM, Dell'Acqua, M., Bertani, I., Venturi, V., Perata, P., and Pucciariello, C. (2022). Bacterial endophytes contribute to rice seedling establishment undersubmergence. *Frontiers in Plant Science* 13, 1–13.
- Anli, M., Baslam, M., Boutasknit, A., Ait-el-mokhtar, M., Ben-Laouane, R., Rahou, Y. A., Hafid, M., and Meddich, A. (2021). Soil inoculation with symbiotic microorganisms (Mycorrhizas and *Rhizobium*) and compost promote date palm performance under drought condition: From controlled condition to open field system. .
- Belhadi, D., de Lajudie, P., Ramdani, N., Le Roux,

- C., Boulila, F., Tisseyre, P., Boulila, A., Benguedouar, A., Kaci, Y., and Laguerre, G. (2018). *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and Applied Microbiology* 41 (2), 122–130.
- Ben moussa, S., Nouairi, I., Rajhi, I., Rezgui, S., Manai, K., Taamali, W., Abbas, Z., Zribi, K., Brouquisse, R., and Mhadhbi, H. (2022). Growth performance and nitrogen fixing efficiency of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes in symbiosis with rhizobia under combined salinity and hypoxia stresses. *Agronomy* 12, 606.
- Busse, M.D., Bottomley, P.J., 1989. Growth and Nodulation Responses of *Rhizobium meliloti* to Water Stress Induced by Permeating and Nonpermeating Solutest. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2431–2436.
- Efstathiadou, E., Savvas, D., and Tampakaki, A. P. (2020). Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece. *Systematic and Applied Microbiology* 43, 126149.
- Feigl, F. and Anger, V. (1966). Replacement of benzidine by copper ethylacetoacetate and tetra base as a spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. *Analyst* 91, 282–284.
- Flores-Félix, J. D., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Valverde, A., Mateos, P. F., González-Buitrago, J. M., Velázquez, E., and Rivas, R. (2019). *Phaseolus vulgaris* is nodulated by the symbiovar *viciae* of several genospecies of *Rhizobium laguerreae* complex in a Spanish region where *Lens culinaris* is the traditionally cultivated legume. *Systematic and Applied Microbiology* 42, 240–247.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2), 793–796.
- Hnini, M., Taha, K., and Aurag, J. (2022). Molecular identification and characterization of phyto-beneficial osmotolerant endophytic bacteria inhabiting root nodules of the Saharan tree *Vachellia tortilis* subsp. *raddiana*. *Archives of Microbiology* 205, 45.
- Jach, M.E., Sajnaga, E., Ziaja, M. (2022). Utilization of legume-nodule bacterial symbiosis in phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *Biology* 11, 676.
- Khalid, A., Tahir, S., Arshad, M., and Zahir, Z. A. (2004). Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Australian Journal of Soil Research* 42, 921–926.
- Mhadhbi, H., Fotopoulos, V., Mylona, P.V., Jebara, M., Polidoros, A.N., Aouani, M.E. (2011). Role of antioxidant gene-enzyme responses in *Medicago truncatula* genotypes with different degrees of sensitivity to high salinity. *Physiologia Plantarum* 141, 201–214.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170, 265–270.
- Nurgi, N., Tana, T., Dechassa, N., Tesso, B., and Alemayehu, Y. (2023). Effect of spatial arrangement of faba bean variety intercropping with maize on yield and yield components of the crops. *Heliyon* 9, e16751.
- Olanrewaju, O., Glick, B., and Babalola, O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 197.
- Rajendran, G., Patel, M. H., and Joshi, S. J. (2012). Isolation and characterization of nodule-associated *Exiguobacterium* sp. from the root nodules of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) and their possible role in plant growth promotion. *International Journal of Microbiology* 2012.
- Saidi, S., Chebil, S., Gtari, M., and Mhamdi, R. (2013a). Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting. *World J Microbiol Biotechnol* 29, 1099–1106.
- Saidi, S., Ramirez-Bahena, M.-H., Santillana, N., Zuniga, D., Peix, A., Mhamdi, R., and Velazquez, E. (2013b). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987). Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem* 160, 47–60.
- Somasegaran, P. and Hoben, H. J. (1985). *Methods in legume- Rhizobium Technology*. University of Hawaii, NifTAL Project and MIRCEN, Paia.
- Taha, K., Berraho, E. B., El Attar, I., Dekkiche, S., Aurag, J., and Béna, G. (2018). *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic and Applied Microbiology* 41, 113–121.
- Taha, K., El, I., Hnini, M., Raif, A., Gilles, B., Aurag, J., and Berraho, E. B. (2022). Rhizosphere Beneficial effect of *Rhizobium laguerreae* co-

- inoculated with native *Bacillus* sp . and *Enterobacter aerogenes* on lentil growth under drought stress, Rhizosphere 22, 100523.
- Vadez, V., Rodier, F., Payre, H., and Drevon, J. J. (1996). Nodule permeability to O₂ and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance to P deficiency. Plant Physiology Biochemistry 34, 871–878.
- Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. Blackwell Scientific Publications.
- Vurukonda, S., Vardharajula, S., Shrivastava, M., and Skz, A. (2015). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research.