

Effect of *Rhizobium* as Plant Promoting Bacteria for Improving Plant Growth and Rehabilitation of Saline Soil

Hamida Sadji-AitKaci¹, Assia Chaker-Haddadj² and Farida Taguett³

1-2-3- Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes (LBPO), Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), B P 32 El-Alia Bab Ezzouar 16111 Alger, Algérie.

Abstract: Mineral nutrition is essential for growth, development and plant reproduction. However, the mineral nutrients availability is directly or indirectly related to biotic factors of the soil. Plant growth promoting bacteria (PGPR) including those belonging to the genus *Rhizobium* has received more interest worldwide. It represents microbial groups able to colonize and influence positively plant growth through the phosphate solubilizing activity (BSP), ability to fixing atmospheric nitrogen in symbioses with legumes in order to promote its growth and/or protect it from diseases or damage due to insect attack. Plant mineral nutrition is also affected by abiotic stress such a soil salinity which considerably reduces their absorption and therefore affects plant growth. The aim of this work is to improve the tolerance of chickpea plants growing under salinity by improving the phosphate nutrition of plants throughout phosphate solubilizing ability of symbiotic bacteria. The study is carried out by the isolation and characterization of symbiotic chickpea bacteria grown under salinity supplemented with two levels of phosphorus fertilizer and the effects of isolates on plant growth.

The results showed that among the strains isolated from the nodules, four of them belong to the genus *Rhizobium*, moderately tolerant to salinity and with PGPR effects in rhizosphere. This result was confirmed by the ability of strains to produce the growth hormone of plants AIA. The isolates were also able to solubilize the phosphate indicated by the solubilizing index (SI). These indexes allow classifying the isolates into two categories: (i) strains which low SI under low salt stress and (ii) isolates with high SI increasing with the severity of salt stress. Moreover, salinity and phosphorus combination enhance the plant growth parameters and symbiotic efficiency. In order to use PGPR for improving the yields of the soils affected by salinity, the inoculation of plants with strains resistant to severe stress, symbiotically efficient and with a high capacity of phosphate solubilization, is one of important criteria for the selection of strains for the rehabilitation of degraded soils and the improvement of plant productivity.

Keywords: PGPR, salinity, interaction plant-bacteria, phosphorus solubilization, AIA.

1. Introduction

La nutrition végétale est un ensemble de processus qui permettent aux végétaux d'utiliser dans le milieu ambiant les éléments minéraux nécessaires à leur fonction physiologique impliquée dans la croissance, le développement et la reproduction. Parmi les légumineuses, le pois chiche (*cicer arietinum* L.) exerce une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec des souches bactériennes du genre *Rhizobium* (Liu et al 2003). Cependant, Le pois chiche est une espèce sensible aux différents stress de l'environnement dont la salinité et la déficience des sols en éléments minéraux notamment en P (Graham, 1981 ; Bennanie.al ,2005) ce qui induisent des

fluctuations des rendements notamment dans les zones arides et semi-arides du pays. Par ailleurs, la salinité du sol réduit considérablement l'absorption des nutriments minéraux en particulier le phosphore car les ions de phosphore se précipitent avec des ions calcium dans le sol salin et deviennent inaccessibles aux plantes (Grattan et Grieve, 1999). Le phosphore est un élément nécessaire à la croissance des plantes, il agit sur le développement des racines. Une carence en phosphore peut être remédiée par l'utilisation des fertilisants phosphatés et/ou l'utilisation des bactéries dites à effets PGPR (Promotrice de la croissance) qui sont capables de solubiliser le phosphate inorganique du sol et le rendre disponible aux plantes et de produire des hormones de croissance dont l'AIA afin d'atténuer les effets négatifs dus au stress salin. L'objectif est de déterminer les caractères phénotypiques et d'estimer le pouvoir de solubilisation du phosphate par les souches extraites des nodules du pois chiche.

2. Matériel et Méthodes

La culture des plantes est réalisée sur un sol argilo-limoneux provenant de de la station expérimentale de l'ITGC dont les caractères physico-chimiques indiquent qu'il est composé de 44% d'argile, 7,2% de sable et le reste est du limon. Après germination, trois plantules de pois chiche variété Flip 84-92C sont mises dans des pots troués contenant le sol de l'ITGC. Avant le stade de nodulation, les plantules sont arrosées avec des solutions de composition différente en sel (NaCl) et/ou en engrais phosphaté (Triple Super-Phosphate TSP). Pour chaque traitement, trois répétitions sont prévues, Les pots sont ensuite placés à la température ambiante et à une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit. Au bout d'un mois et demi de culture, les plantes ont été déterrées, le système racinaire a été lavé pour mettre en évidence les nodules formés. Les nodules sont désinfectés, puis écrasés et le broyat est ensemencé sur le milieu YMA additionné de rouge Congo et incubées à une température de 28°C pendant 72h.

La capacité de solubilisation du phosphate des isolats a été testé sur le milieu Sperber contenant le phosphate tri-calcique (Ca_3PO_4) comme source de phosphore. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique que l'isolat est capable de solubiliser le phosphate tricalcique pour libérer du phosphore sous forme HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^- . Le pouvoir de solubilisation du phosphate de chaque souche est estimé par le calcul de l'Indice de Solubilisation (IS) représenté selon la formule de Firew (2016) : **IS % = ((Diamètre colonie+diamètre halo)/diamètre colonie) x 100**

Indice de solubilisation (IS) %=

× 100

L'effet PGPR des souches isolées est mis en évidence par la production ou non de l'hormone auxine (AIA) sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Lauria Broth Agar (LBA) additionné de tryptone 0.2%. Un volume de 10µl d'une jeune suspension bactérienne est étalé sur le milieu puis recouverte par un disque stérile de papier Whatman. Au bout de 48 heures à 28 °C, le papier filtre est retiré et inondé du réactif de Salkowski. Les bactéries qui synthétisent l'AIA sont identifiées par l'apparition de la couleur rose violacée.

L'effet de la salinité sur la croissance des souches a été étudié sur les isolats cultivés sur le milieu M79 différentes concentrations de NaCl (0mM, 150mM, 300mM) pendant au moins 48h. L'estimation de la tolérance des isolats au NaCl est déterminée par la mesure de la densité optique à la longueur d'onde ($\lambda=600$ nm).

3. Résultats et Discussion

A partir des nodules des plantes de pois chiche, cinq souches ont été isolées étudiées sur le plan phénotypique, de tolérance à la salinité, du pouvoir solubilisant le phosphate et l'effet PGPR par la production de l'AIA. Les résultats obtenus indiquent Les souches isolées des nodules de pois chiche cultivées sur le milieu YMA présentent une forme arrondie, à bord régulier, une surface lisse et une texture muqueuse due aux exo-polysaccharides. Les 4 souches (Pc1, Pc2, Pc3, Pc4) absorbent très peu ou pas du tout le rouge Congo à la différence de la souche Pc5 qui absorbe fortement ce colorant. Les souches isolées ont fait l'objet du test de la coloration de Gram afin de déterminer leur groupe bactérien .L'observation au microscope photonique indique que les souches (Pc1, Pc2, Pc3 et Pc4) sont des bacilles (bâtonnets) de couleur rose à Gram négatif compatibles à l'aspect microscopique des *Rhizobia* (Vincent, 1970).Cependant, la souche Pc5 présente une forme coccobacille de couleur violacée ce qui correspond à une bactérie Gram positif. En condition témoin, les souches Pc1 et Pc2 montrent la plus faible croissance avec une DO moyenne de 0,065. Les souches Pc3, Pc4 ont une croissance légèrement plus importante avec une DO de 0,224 alors que la souche Pc5 est celle qui prolifère le mieux avec une DO de 0,322. En conditions de salinité, seule la souche Pc2 qui présente une croissance significativement 4 fois élevée comparée au témoin, suivie de la souche Pc5 avec une DO de 0,309. Les autres isolats maintiennent une croissance faible à 150mM de NaCl (Fig. 1). La sélection des microorganismes à effets bénéfiques (effets PGPR) sur la croissance des plantes est basée sur certains caractères dont la production de l'hormone acide indole acétique (AIA). Le test qualitatif des cinq souches isolées du pois chiche, sur milieu LBA, a permis de mettre en évidence la production de l'AIA chez les quatre souches Pc1, Pc2, Pc3, Pc4 alors que la souche Pc5 n'a montré aucune réaction avec le réactif de Salkowski d'où la souche Pc5 serait non productrice d'AIA. Le pouvoir de solubilisation est révélé par le diamètre de la zone claire (halo) qui entoure la colonie bactérienne. Les résultats obtenus permettent de classer nos souches en en trois catégories selon Berraquero et *al.*, (1976) in Abreu: les souches Pc3 et Pc4 à faible pouvoir de solubilisation du P correspondent à celles qui présentent un ($IS < 2$); des souches moyennement solubilisant avec ($2 < IS \leq 4$) soit les souches Pc1 et Pc2 et la souche Pc5 qui ne solubilise pas le P indiqué par un IS nul (Tab. 1).

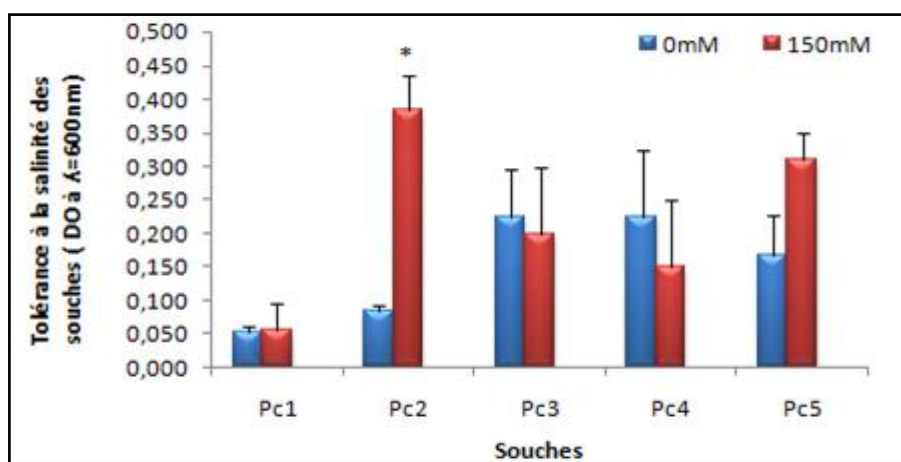


Fig. 1. Effet de la salinité sur la croissance des souches isolées des nodules de pois chiche cultivées sur le milieu M79 additionné ou non de NaCl. Les histogrammes représentent la moyenne de trois répétitions. Les étoiles représentent la significativité du test LSD à $p \leq 0,05$

Tableau 1. Classement des isolats en fonction du pouvoir de solubilisation du P suivant la classification Berraquero et *al.*, (1976) (IS :Indice de Solubilisation).

Souches	IS (mm) < 2	2< IS (mm) ≤ 4	IS (mm)> 4	Classement
Pc1	-	2,1	-	Moyennement efficiente
Pc2	-	2,4	-	Moyennement efficiente
Pc3	1,1	-	-	Faiblement efficiente
Pc4	1,4	-	-	Faiblement efficiente
Pc5	-	-	-	Absence de solubilisation

L'analyses macroscopiques et microscopes des souches extraire des nodules de pois chiche indiquent que les quatre isolats (Pc1, Pc2, Pc3 et Pc4) sont des Rhizobia confirmé par l'importante production des exo-polysaccharides bactériens (EPS) (Vincent (1970, Jordan 1984). Les souches sont des bactéries à effet PGPR car elles sont capables de promouvoir la croissance des plantes grâce à la production de l'hormone de croissance des plantes l'acide indole acétique (AIA).

Toutes ces caractéristiques sont en accord avec celles décrites chez le groupe des *Rhizobium* par). Par ailleurs, la souche Pc5 a montré une croissance lente, de forme cocobacille, à Gram positif et absorbe fortement le rouge Congo. Résultat qui laisse suggérer que l'isolat Pc5 ne serait pas un *Rhizobium* mais plutôt une bactérie endophytes des nodules de pois chiche. Selon Jordan (1984) les contaminants dont le genre *Agrobacterium* absorbent fortement le rouge Congo du milieu YMA.

Les cinq souches isolées du pois chiche ont été testées pour leur capacité de solubilisation du phosphate. En conditions témoin et en présence du NaCl (50mM et 150mM). L'indice de solubilisation du P de chaque souches indique qu'en conditions témoin sans sel, les isolats Pc1 et Pc2 s'avèrent les plus solubilisants du P suivis de l'isolat Pc4 avec un moindre IS. Par contre la souche Pc3, bien qu'elle soit la plus acidifiante du milieu de culture, elle montre le plus faible pouvoir de solubilisation du phosphate. Résultat en accord avec ceux trouvés sur les souches nodulant le pois chiche (Bouamama et Harcha, 2016).En présence de sel, la capacité de solubilisation du P est inversement proportionnelle à l'augmentation de la concentration du NaCl avec des IS significativement plus faible que les conditions témoins. Toutefois, une légère reprise de la capacité de solubilisation du P est notée à 150mM de NaCl comparé à la concentration de 50mM qui induit les plus bas IS pour l'ensemble des isolats. Des résultats similaires ont été obtenus chez *Bacillus sp* par Silini et *al.*, (2013).

En conclusion, les isolats du pois chiche ont montré une réponse positive vis-à-vis de leur pouvoir solubilisant lephosphate du sol en présence du NaCl dans le sol et un effet promoteur de la croissance des plantes en conditions de salinité ce qui constitue une selection favorable à la production d'un inoculum en vue d'une bactérisation des grains destinées à la mise en culture en zones arides et semi-arides ou les sols sont caractérisés par par un degré d salinité parfois élevé.

4. Références bibliographiques

- [1] Berraquero, F.R., Baya, A.M., Cormenzana, A.R., 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars. Pharmaceutica*, Granada, v. 17, n. 4 p.399-406.
- [2] Bouamama, M., Harcha, H., 2016. Etude de l'antagonisme entre certaines espèces du *Mesorhizobium* nodulaires et leur effet sur l'alimentation phosphaté et sur l'amélioration de tolérance pour Zinc du pois chiche. Thèse de Master en Ecologie Microbienne option : Université des Frères Mentouri Constantine.p33-34.
- [3] Jordan, D.C., 1984. Rhizobiaceae. In Krieg NR and Holt JG (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. The Williams et Wilkins, Co. Baltimore.pp.234-245.
- [4] Silini, S., 2013. Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'ElAtmania. Thèse de Magister en écologie option : Gestion des déchets : évaluation et solution environnementales. Université des frères Mentouri Constantine. 101p.
- [5] Vincent, J.M., 1970.A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP.Handbook n°15 Blackwell scientific publishers, Oxford.