

Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress

I. CACCIARI,
E. DI MATTIA,
P. QUATRINI,
M. C. MOSCATELLI,
S. GREGO,
D. LIPPI,
M. R. DE PAOLIS



Résumé

Généralement, les souches tropicales de rhizobia possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans les milieux arides et semi-arides. Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont le déficit hydrique, la salinité, les températures élevées, les pH extrêmes et les carences en éléments nutritionnels. Les interactions fréquentes entre ces différentes contraintes affectent la croissance et la capacité de survie des micro-organismes dans les sols arides.

Les résistances à certains de ces facteurs (hautes températures, salinité, stress hydrique) de nombreuses souches de rhizobia isolées de sols sahéliens sénégalais et tunisiens ont été étudiées. Nos résultats montrent que : (1) les souches sont capables de se multiplier à 40 °C et même à 45 °C pour cinq d'entre elles ; (2) les souches des sols sénégalais tolèrent des concentrations en sel supérieures à 2 %, alors que celles des sols de Tunisie sont inhibées à des concentrations de 1 % ; (3) toutes les souches tolèrent plus le stress osmotique que le stress salin.

Une souche d'une espèce de rhizobium tolérante au sel a été retenue comme modèle pour évaluer les capacités de développement en conditions de déficit nutritionnel et salines élevées, conditions qui prévalent généralement en milieu aride. La souche étudiée s'est avérée résistante à une carence nutritionnelle pendant de longues périodes, surtout si elle a été préalablement adaptée à des

conditions salines, tout en conservant des capacités de développement lorsque les nutriments devenaient disponibles. Cette souche peut être utilisée dans l'inoculation des sols arides dans les opérations de réhabilitation.

Mots-clés :

ISOLAT, RHIZOBIUM, ADAPTATION, STRESS HYDRIQUE, STRESS SALIN, OLIGOTROPHIE,
SÉNÉGAL, TUNISIE.

Abstract

It is generally recognized that tropical strains of rhizobia exhibit physiological characteristic that enable them to survive to typical arid and semi-arid soil environmental constraints. The most important factors limiting the growth and activity of rhizobia in soils are drought, salinity, high temperatures, pH and nutrient deprivation. In arid soils, some of these constraints often interact severely affecting the survival of rhizobia.

Numerous strains of rhizobia isolated from different soils of Sahel in Senegal and Tunisia have been tested for their resistance to high temperatures, to salinity and to osmotic pressure. Our results have shown that: (1) the strains were able to grow at 40 °C and five of them at 45 °C; (2) the strains from Senegalese soils tolerated salt concentrations up to 2 % while those from Tunisian soils were inhibited at 1 %; (3) both Senegalese and Tunisian strains were more tolerant to osmotic stress than to salinity.

A salt-tolerant Rhizobium sp. strain was chosen as a « model of study » for evaluating the capacity to survive under conditions of nutrient starvation and high salt concentrations. Dry and saline arid soils are generally low in nutrients so that inoculant strains of root-nodule bacteria have to cope with both high salt and low nutrient conditions. Therefore, a successful inoculation of selected rhizobia in soils requires that the micro-organisms can adapt themselves to very slow or no growth at all and to sudden stressful change in the environmental conditions.

The strain examined can withstand nutrient deprivations for long periods, especially when it is previously adapted to saline conditions, while retaining the capacity for active metabolism, if nutrients become available. This might indicate the potential for a long persistence in soil and for a rapid regrowth in the rhizosphere of an appropriate host and hence for its utilization as inoculant in revegetation strategies for arid and saline soils.

Keywords:

STRAINS, RHIZOBIUM, ADAPTATION, DROUGHT, SALINITY, HIGH TEMPERATURES,
OLIGOTROPHIC CONDITIONS, SENEGAL, TUNISIA.

Introduction

Les milieux extrêmes sont, fréquemment, caractérisés par des écosystèmes stables marqués par la présence d'au moins un facteur aux limites de la tolérance pour la plupart des organismes. Par contre, la majorité des milieux terrestres et aquatiques comportent des écosystèmes fluctuants présentant une grande variabilité des facteurs chimiques et physiques.

On considère que les écosystèmes stables sélectionnent des organismes à spectres étroits de tolérance (ALEXANDER, 1971), alors que les espèces des écosystèmes fluctuants sont elles capables de s'adapter aux changements continus soit des teneurs en éléments nutritifs, soit des conditions physiques.

Les sols tropicaux, parfois les milieux les plus productifs du monde, peuvent également devenir les lieux les plus défavorables à la vie des micro-organismes. Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols tropicaux sont la sécheresse, la salinité, les hautes températures, les pH extrêmes acides ou alcalins et les carences en éléments nutritifs (HENZELL, 1988). Ces sols sont souvent influencés par de nombreux facteurs interagissants (SKUJINS, 1984) susceptibles de réduire la croissance et la capacité de survie des organismes (SAXENA et REWARI, 1992). Aux facteurs abiotiques, il faut encore ajouter les facteurs biotiques négatifs comme la compétition, la prédation, etc.

Dans de tels habitats, la capacité de survie d'une souche bactérienne dépend de sa capacité à croître à un taux suffisant pour compenser la mort causée par les facteurs précédemment recensés (HENZELL, 1988).

En ce qui concerne la symbiose légumineuses-bactéries du genre *Rhizobium*, le facteur susceptible d'entraver la fixation d'azote n'est généralement pas l'absence de souches bactériennes efficaces, mais un ou plusieurs facteurs écologiques qui en limitent les potentialités (ALEXANDER, 1985). Les divers stress biotiques et abiotiques peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des rhizobia à l'état saprophytique (en absence de la plante hôte). Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose (HIRSCH, 1996).

Le recours à des légumineuses pérennes peut se révéler être une stratégie intéressante pour la réhabilitation des zones tropicales et sub-tropicales affectées par les processus de désertification ayant provoqué la perte de fertilité (HERRERA et al., 1993 ; GILLER et CADISH, 1995 ; DANSO et al., 1992 ; DIAGNE, 1988). Les légumineuses infestées avec des souches effectives de rhizobia peuvent en effet garantir un rendement plus élevé et une amélioration du bilan azoté de ces sols appauvris (DREYFUS et DOMMARGUES, 1981 ; NDOYE et al., 1995 ; CORNET et al., 1985 ; LAL et KHANNA, 1994). Il faut pour cela que la souche bactérienne choisie entraîne une nodulation effective, qu'elle soit capable de survivre dans des conditions environnementales défavorables, de se reproduire et de coloniser les racines. Les souches doivent donc posséder les caractéristiques requises pour s'adapter aux diverses contraintes de l'environnement.

Si la résistance des souches de rhizobia infestant les légumineuses des climats tempérés aux facteurs défavorables est déjà amplement étudiée, les connaissances relatives aux souches tropicales sont en revanche encore très fragmentaires. Dans ce travail, nous relatons les résultats d'expériences visant à étudier la réponse de souches de rhizobia collectées dans des sols de zones arides du Sénégal et de Tunisie aux stress de l'environnement naturel.

La résistance aux contraintes abiotiques

Le potentiel hydrique du sol peut influencer la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia et, dans des conditions de sécheresse élevée, la nodulation peut être faible et/ou inefficace. La sécheresse peut aussi influencer la survie des rhizobia pendant leur vie saprophytique (CHAO et ALEXANDER, 1982). En outre, l'aridité peut inhiber la fixation d'azote, la nitrogénase étant très sensible à des variations, même faibles, du potentiel osmotique du sol (SINCLAIR *et al.*, 1987).

Vu qu'environ 15 % des sols des zones arides peuvent subir un excès de salinité, la tolérance au stress salin est une propriété très importante pour la survie au stade saprophytique et la compétitivité des rhizobia tropicaux. Les sols salins, qui se forment en général dans des conditions d'aridité élevée et de hautes températures, sont souvent alcalins et peuvent présenter une disponibilité réduite en phosphore, fer, zinc et manganèse. Une interaction entre salinité, pH et températures élevées peut avoir des effets plus néfastes sur la symbiose que chacun de ces facteurs pris séparément (ELSHEIKH et WOOD, 1989 a).

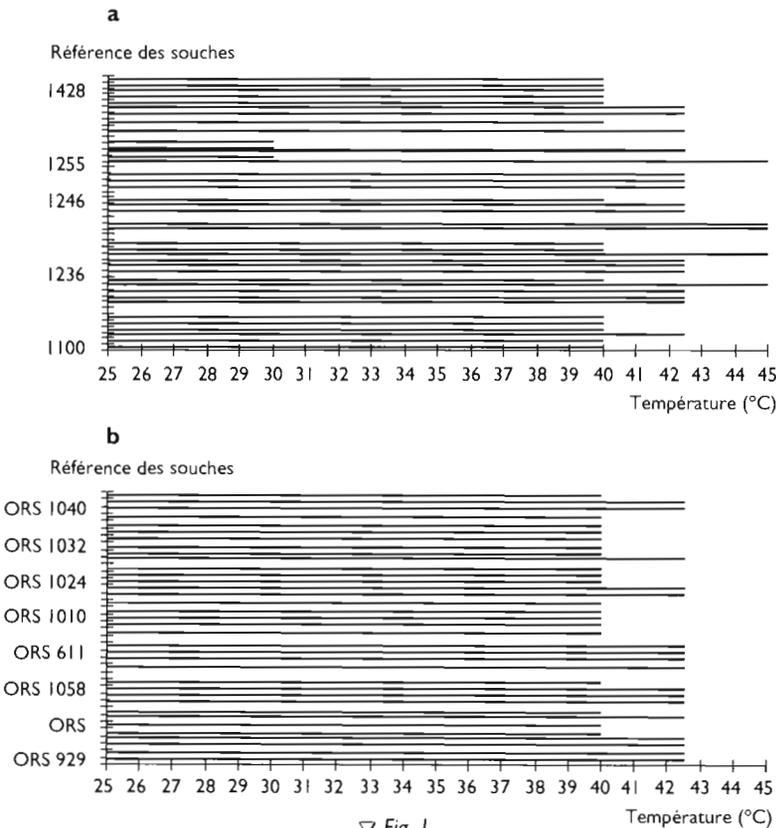
Le sel exerce un double effet sur les microbes : un effet spécifique dû à la toxicité des ions et un second lié au potentiel osmotique (BROWN, 1976). Toutefois, le stress hydrique étant en général de durée limitée, il suffit que les micro-organismes puissent y survivre un certain laps de temps. Le stress salin est lui permanent et les micro-organismes doivent s'y adapter afin non seulement de survivre mais aussi de se reproduire (SPRENT, 1984 ; ZAHARAN, 1992).

Sous les tropiques, la température peut atteindre 65-70 °C à la surface du sol et 50 °C dans les horizons inférieurs. Ces températures élevées inhibent généralement la croissance des micro-organismes. Ainsi chez les rhizobia les hautes températures peuvent empêcher la nodulation et inhiber la fixation d'azote (DAY *et al.*, 1978). Une tolérance à 42,5 °C a été fréquemment signalée pour *R. meliloti*. Une résistance à des températures variant entre 44 °C à 47 °C chez certaines souches isolées au Kenya (ZHANG *et al.*, 1991) et au Soudan (SHOUSHTARI et PEPPER, 1985) a même été observée. La température optimale pour la croissance des rhizobia varie selon la zone climatique où ils sont isolés. L'adaptation à des températures au-dessus de 40 °C peut permettre à certaines souches isolées au Sahel nigérien de maintenir et parfois d'augmenter l'activité de fixation symbiotique de l'azote (EAGLESHAM et AYANABA, 1984).

Pour évaluer la réponse de rhizobia tropicaux à des facteurs abiotiques typiques extrêmes tels qu'une salinité et des températures élevées, nous avons isolé des souches de rhizobia à partir des nodules d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*. Ces souches ont été cultivées sur des sols recueillis au Sénégal et en Tunisie. De plus, nous avons examiné des souches rhizobiales, de la collection du Laboratoire de microbiologie du sol de l'IRD de Dakar, appartenant à trois groupes taxonomiques : *Sinorhizobium saheli* (groupe SA), *Sinorhizobium teranga* (groupe S) et les espèces appartenant au cluster U (DE LAJUDIE *et al.*, 1994).

Toutes les souches, à l'exception de trois d'entre elles provenant d'un échantillon de profondeur du site de Louga (Sénégal), se sont révélées capables de se multiplier à 40 °C. La moitié des souches montrait une croissance à 42,5 °C. Cinq croissaient encore à 45 °C, dont deux souches provenant d'un sol aride, deux d'un sol salin et une d'un isolat de surface (fig. 1).

Nous avons testé la résistance au sel de toutes les souches en évaluant leur croissance en présence de concentrations croissantes de NaCl. En outre, nous avons étudié la tolérance des rhizobia à la sécheresse en utilisant des solutés qui réduisent la disponibilité en eau du milieu de culture (AL-RASHIDI *et al.*, 1982).

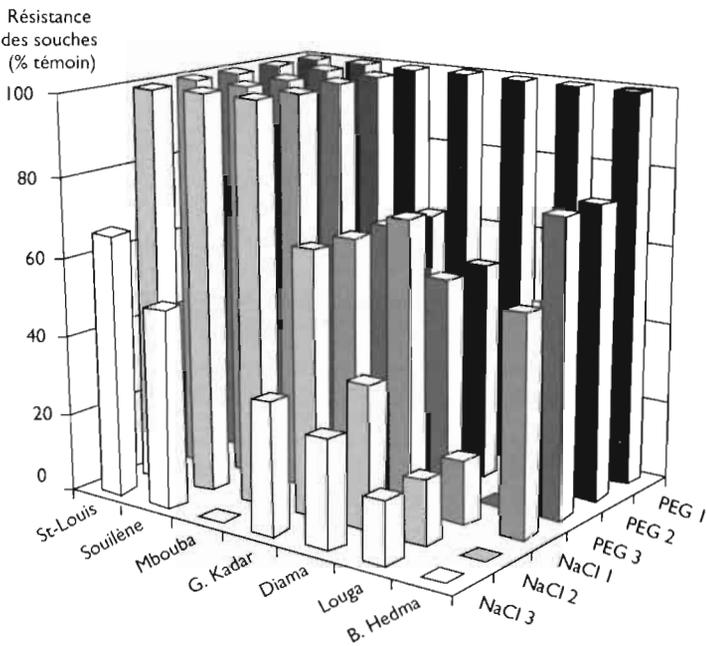


▽ Fig. 1

Résistance à la température des souches isolées des sols sénégalais et tunisiens (a) et des souches de la collection IRD-Dakar (b).

La tolérance des rhizobia à des concentrations de NaCl > 1,5 % est rare, même si certaines souches sont capables de croître en présence de 2 % de NaCl (HUA *et al.*, 1982 ; ZHANG *et al.*, 1991 ; GHITTONI *et BUENO*, 1995) et qu'un isolat obtenu sur *Prosopis* sp. a toléré 3 % de NaCl (KARANJA *et WOOD*, 1988).

Alors que la majorité des isolats des sols du Sénégal montre une croissance à 1 % de NaCl et que certains peuvent tolérer 1,5 % (St-Louis, Souilène, Mbouba) et 2 % (St-Louis), les souches provenant de Tunisie sont déjà inhibées à une concentration de 1 % (fig. 2).



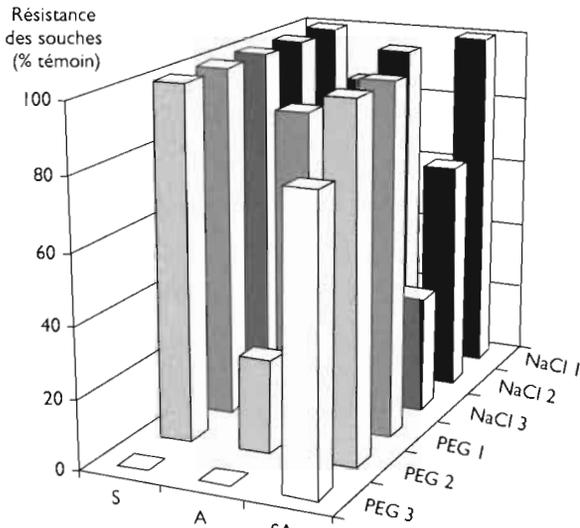
▽ Fig. 2

Tolérance à la salinité et au déficit hydrique développé par le polyéthylène-glycol (PEG) des souches isolées des sols sénégalais et tunisiens.

Les potentiels hydriques correspondant aux niveaux 1, 2 et 3 sont respectivement de :
- 0,98 MPa, - 1,37 MPa et - 1,81 MPa aussi bien pour le PEG que le NaCl.

Les isolats appartenant aux trois groupes taxonomiques de la collection IRD ont des sensibilités différentes au sel (fig. 3). Les plus tolérants sont les isolats du groupe S qui croissent à 2 % de NaCl, suivis par ceux du groupe A, parmi lesquels 45 % tolèrent 1,5 % de NaCl et plus de 30 % croissent en présence de 1 % de sel. Le groupe SA est le plus hétérogène, mais près de la moitié des souches est déjà inhibée à une concentration de 1,5 %.

Le stress osmotique causé par la présence de polyéthylène-glycol, retenu, parmi les polymères de faible masse moléculaire, pour réduire le potentiel osmotique,



▽ Fig. 3

Tolérance à la salinité et au déficit hydrique des souches des groupes S, A et SA de la collection IRD (Orstom).

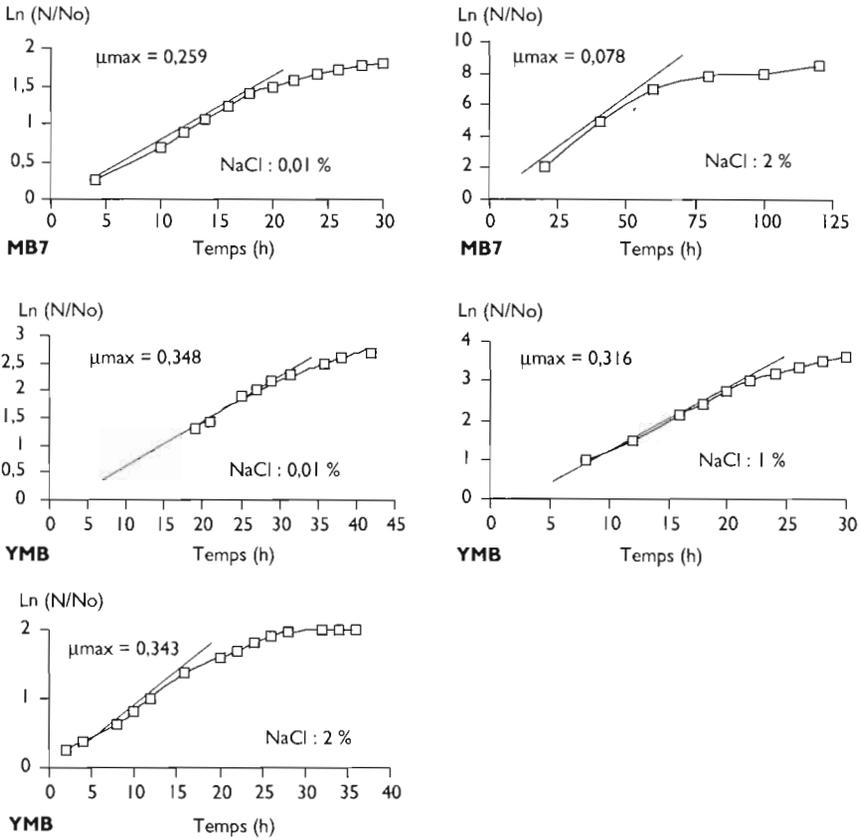
Les potentiels hydriques correspondant aux niveaux 1, 2 et 3 sont respectivement de -0,98 MPa, -1,37 MPa et -1,81 MPa aussi bien pour le PEG que le NaCl.

se révélait être moins inhibiteur pour la croissance des bactéries que le stress salin (fig. 2 et 3). Cela confirme qu'à potentiel égal, l'effet toxique dû aux ions est plus important que l'effet osmotique du sel (ELSHEIKH et WOOD, 1989 b).

L'étude de la croissance des isolats de rhizobia, à différentes concentrations de NaCl, montre que l'effet du sel influence surtout la phase de latence, qu'elle ralentit en comparaison avec le témoin. Ces observations sont confirmées par les courbes de croissance obtenues pour 13 souches témoins inoculées dans un thermoturbidimètre à trois concentrations différentes de sel. La détermination des effectifs de bactéries se développant dans le turbidimètre à des concentrations différentes de NaCl, montre que la présence du sel dans le milieu réduit les taux de croissance et allonge le temps de latence. Cela confirme les résultats obtenus pour d'autres souches de rhizobia (SINGLETON *et al.*, 1982 ; ELSHEIKH et WOOD, 1989 a ; CRAIG *et al.*, 1991 ; GHITTONI et BUENO, 1995).

Les courbes de croissance d'une souche de *Rhizobium* (souche 1230), cultivée sur deux milieux de culture de niveau nutritionnel contrasté (riche [YMB] et pauvre [MB7]) et en présence de concentrations différentes de sel, sont illustrées figure 4. La détermination des effectifs de bactéries a été réalisée d'après le modèle logistique (ZWIETERING *et al.*, 1990).

L'effet du sel sur la phase de latence et sur le taux de croissance est surtout marqué pour les cultures sur le milieu le plus pauvre (fig. 4, MB7), ce qui suggère que la tolérance de *Rhizobium* au sel dépend aussi de la composition du milieu de culture.



▽ Fig. 4

Curves de croissance de la souche Rhizobium 1230
cultivée dans un milieu de culture pauvre (MB7) et riche (YMB)
en présence de différentes concentrations de NaCl.

La résistance aux conditions de l'oligotrophie

Dans la majorité des sols tropicaux les facteurs limitants les plus importants sont, indépendamment du potentiel osmotique, la faible teneur en azote et en matière organique. Cette situation est imputable aux facteurs environnementaux et aux interférences de l'homme sur le développement des systèmes végétaux naturels (WANI *et al.*, 1995).

Il a été évalué que la perte moyenne annuelle des sols tropicaux en azote est de l'ordre de 78 à 570 kg.ha⁻¹, alors que sous climats tempérés elle n'atteint que 30-50 kg (DÖBEREINER et PEDROSA, 1987).

En général, dans les sols portant une végétation non perturbée, les teneurs en substances organiques présentent une limite déterminée par la productivité et la

nature du système végétal en place. Dans les conditions extrêmes des sols tropicaux, l'équilibre climat-végétation-sol peut être altéré par des facteurs abiotiques et biotiques. En effet, en plus des interventions néfastes de l'homme, la vitesse des processus de minéralisation et l'effet lessivant des précipitations modifient les caractéristiques physiques et chimiques du sol, en provoquant un épuisement progressif en substances nutritives. Dans ces conditions, aux limites de l'oligotrophie, les micro-organismes du sol doivent adopter des stratégies particulières pour survivre et rivaliser avec les autres organismes coexistant dans le même habitat. Le processus de survie d'une souche dans des conditions d'absence de sources d'énergie est très important en écologie microbienne. Il représente un mécanisme de conservation d'un génome qui ainsi subsistera et sera à nouveau capable de s'exprimer lorsque les conditions environnementales redeviendront favorables (MORITA, 1982).

Les bactéries du genre *Rhizobium* montrent, en général, une faible persistance dans les sols, ce qui peut entraîner une nodulation insatisfaisante des légumineuses et une réduction conséquente de leur productivité (EVANS *et al.*, 1993 b). Il semble aussi que, pour une même espèce de *Rhizobium*, l'aptitude à survivre varie avec le type du sol.

Les causes les plus importantes de réduction du nombre de rhizobia dans les sols (entraînant en conséquence une nodulation insuffisante), sont l'aridité, un pH au-dessous de 4,6 et une température trop élevée (EVANS *et al.*, 1988 ; EVANS *et al.*, 1993 a).

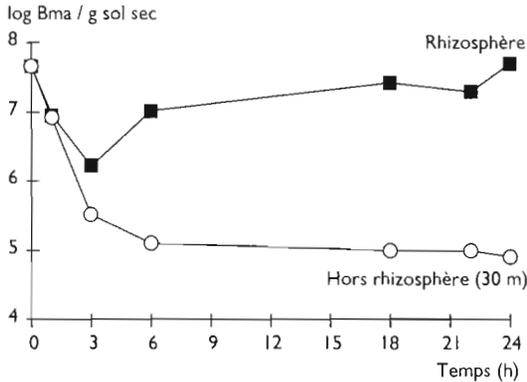
La survie des souches de rhizobia peut varier en fonction de la proximité des racines. La rhizosphère est un habitat particulièrement favorable à la croissance des rhizobia et l'on a pu démontrer une augmentation sensible de la population de rhizobia dans le sol rhizosphérique comparé au sol sans racines. Le niveau de cette stimulation dépend de l'environnement, du type du sol, de l'espèce végétale, de l'âge des plantes et de la souche de *Rhizobium* (HIRSCH, 1996).

La compétence écologique (WELLER, 1988) est la capacité d'un organisme à survivre et à croître à l'état naturel, en particulier dans la rhizosphère ; elle représente donc l'aptitude de cet organisme à coloniser les racines. Pour qu'une bactérie puisse coloniser une racine, elle doit posséder un ensemble de traits physiologiques caractéristiques (WELLER, 1988 ; HOZORE *et ALEXANDER*, 1991) et manifester un large spectre de tolérance aux contraintes abiotiques (ALEXANDER, 1971).

Nous avons choisi, afin d'évaluer son aptitude à survivre et à se développer à l'état saprophytique dans la rhizosphère, la souche de *Rhizobium* (1230) isolée à partir d'un sol aride, sablonneux et pauvre en matière organique du Sénégal. Cette souche tolère également les hautes températures, des niveaux de NaCl jusqu'à 2 %, et un bas potentiel osmotique (GREGO *et al.*, 1995). Cette souche a, par la suite, été inoculée sur deux échantillons d'un sol similaire et de même origine que celui d'où elle a été isolée. Les deux échantillons de sol – dont l'un a été prélevé autour des jeunes racines d'un individu d'*Acacia raddiana* et l'autre à une distance de 30 m du tronc de la même plante – ont été stérilisés par radiation pour assurer la croissance de la souche en absence de compétition.

L'évolution de la densité de la souche de *Rhizobium* a été appréciée grâce à des évaluations périodiques, selon les techniques soit du dénombrement direct au microscope à l'épifluorescence (KEPPNER et PRATT, 1994), soit par la technique indirecte de l'ensemencement sur un milieu gélosé. L'évaluation du nombre de bactéries métaboliquement actives a été effectuée par dénombrement direct au microscope [épifluorescence, coloration avec l'orange d'acridine, incubation en présence de 2-(p-iodophényl)-3-(p-nitrophényl)-5-phényl tétrazolium chlorure (INT)] (FRY, 1990).

Après un déclin initial, les bactéries introduites dans le sol rhizosphérique commencent à se reproduire, et quelques heures après l'inoculation, la population métaboliquement active augmente largement, alors que, dans le même temps, le même inoculum introduit dans le sol sans racines régresse sensiblement (fig. 5). En outre, les comptages des colonies, sur le milieu gélosé, ont révélé que presque toutes les bactéries métaboliquement actives avaient la capacité de se reproduire.



▽ Fig. 5

Aptitude de la souche *Rhizobium* 1230 à survivre à l'état naturel.

Variation du nombre de bactéries métaboliquement actives dans le sol de la rhizosphère et dans un sol témoin situé à 30 m du tronc d'un *Acacia raddiana*.

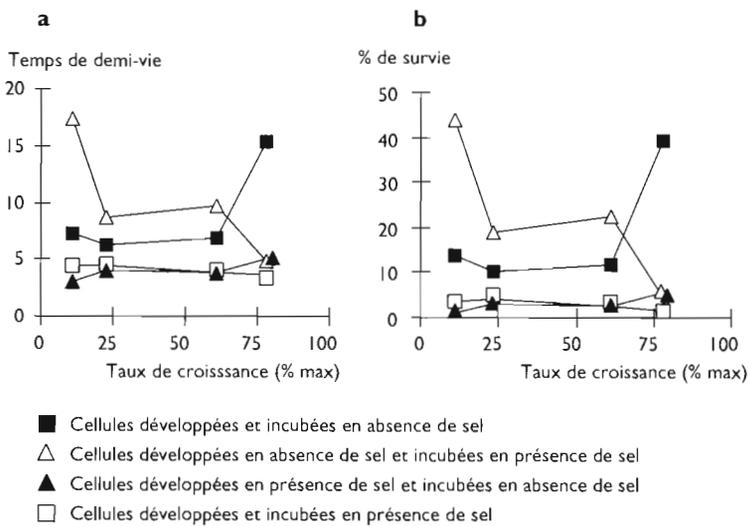
Les différences obtenues, sur sol stérilisé, entre l'essai avec le sol rhizosphérique et le témoin sans racines peuvent, globalement, être attribuées aux différences relevées entre les teneurs en matière organique, en azote et en phosphore des deux échantillons (Grego *et al.*, cet ouvrage)¹. Le sol prélevé à 30 m de la plante était en effet bien plus pauvre en substances nutritives que le sol rhizosphérique. D'autre part, la forte densité des populations bactériennes hétérotrophes et oligotrophes, liée à une teneur plus élevée en azote dans le sol rhizosphérique que dans le sol témoin, conforte ces résultats et confirme que la présence, à proximité de la racine, de substances aisément métabolisables, peut aider les rhizobia à survivre et, parfois, à se reproduire. La persistance de bactéries métaboliquement actives dans le sol rhizosphérique suggère en outre que pour

1. « Activité biochimique de la rhizosphère d'*Acacia raddiana* au nord et au sud du Sahara ». In Grouzis M., Le Floch E., éd. : *Un arbre au désert, Acacia raddiana*. Paris, IRD Éditions, 2003 : 231-248.

les rhizobia cet état physiologique peut représenter une stratégie de survie dans le sol (ROSZAK et COLWELL, 1987).

La capacité des bactéries du genre *Rhizobium* à survivre a été étudiée en laboratoire dans des conditions de privation de nutriments et, parfois, en présence de contraintes abiotiques. CLARKE et al. (1993), par exemple, ont montré l'effet mortel d'un double choc limitation du carbone et faible pH sur la survie d'une souche de *Rhizobium meliloti*.

Pour ce qui concerne la souche 1230, cultivée avec le mannitol comme seul facteur carboné et en présence ou en absence de NaCl à 2 %, la survie, en réponse à une condition soudaine de privation totale de nutriments, semble être liée au taux de croissance et à la présence du sel dans le tampon utilisé pour l'incubation (fig. 6) (LIPPI et al., 2000). Les résultats, qui rejoignent ceux relatifs à d'autres micro-organismes (GARCIA-LARA et al., 1993 ; GAUTHIER et al., 1989 ; HÖFLE, 1984 ; MOYER et MORITA, 1989 ; MUNRO et al., 1987 ; CACCIARI et al., 1995), suggèrent qu'un des facteurs les plus importants pour la survie est l'histoire physiologique de la souche bactérienne, c'est-à-dire les conditions de culture précédant le stress de la privation totale de nutriments (GOTTSHALL, 1990).



▽ Fig. 6 a et b

Effet du taux de croissance et de la concentration en NaCl sur le temps de demi-vie (a) et sur le taux de survie (b) de la souche de *Rhizobium* 1230 incubée durant 21 jours en conditions de privation totale de substances nutritives (données extraites de LIPPI et al., 2000)

La culture de la bactérie s'est effectuée dans le milieu de culture MB7 avec du mannitol comme facteur limitant carboné, et incubée en tampon phosphate 0,033 M, à pH 7

Le temps de demi-vie est obtenu en appliquant l'équation $\ln 2 / \text{taux de mortalité}$.

Le taux de mortalité dérive de l'équation $(\ln \text{c.f.u.}_{t=21} - \ln \text{c.f.u.}_{t=0}) / t$

où t représente les jours d'incubation, et CFU le nombre de colonies formant unité.

Le taux de survie est le rapport entre le nombre de bactéries à la fin de l'incubation et le nombre de bactéries au début de l'incubation.

Les populations adaptées à la salinité sont par ailleurs plus aptes à survivre au double choc de la concentration élevée en sel et de la faible disponibilité en carbone que les autres populations. Les cellules précédemment cultivées sur un milieu salé ont apparemment acquis une plus grande résistance, même à la privation en nutriments. Cependant, si, outre la privation des nutriments, on ajoute du sel dans le tampon d'incubation, les cellules (= les souches) ne sont pas plus résistantes que celles n'ayant subi aucune adaptation (c. à d. préalablement cultivées en milieu salin).

Quoique perdant rapidement leur viabilité, les populations soumises au double choc montrent par contre une extraordinaire aptitude à reprendre leur croissance lorsqu'elles sont à nouveau inoculées dans un milieu de culture salé. Leurs taux de croissance (fig. 6) sont bien plus élevés que ceux obtenus en inoculant, dans les mêmes conditions de culture, les populations pendant leur phase exponentielle de croissance. En outre, cette souche de *Rhizobium* peut encore être mise en culture avec succès après quatre mois d'incubation, en présence comme en absence de NaCl (LIPPI *et al.*, 2000).

L'interprétation de ces résultats suggère que la résistance aux concentrations élevées en sel peut représenter pour les rhizobia tropicales un trait important pour leur survie durant de longues périodes d'inanition et pour leur reproduction en conditions de salinité et de sécheresse. Cela confirme également leur capacité à persister pendant longtemps dans le sol puis à croître rapidement dans la rhizosphère quand les conditions sont appropriées (HIRSCH, 1996). La capacité d'un organisme à supporter les stress abiotiques est aussi liée à son état physiologique et à la possibilité qu'il a de moduler ses réponses aux contraintes de l'environnement naturel.

La compétition

Pour qu'une implantation réussisse, il importe que les bactéries inoculées survivent dans le nouvel environnement. Il est toutefois difficile, du fait de la grande hétérogénéité du milieu qui peut empêcher les bactéries d'atteindre et d'occuper les microhabitats les plus propices à leur survie (POSTMA *et al.*, 1989), de prévoir le taux de survie des souches introduites dans un sol. Les différentes souches de rhizobia coexistant simultanément dans un sol présentent des différences de capacité à rivaliser pour l'occupation des nodules, et le succès dans la symbiose est influencé par les facteurs environnementaux, la plante hôte, la taille initiale de la population de rhizobia et sa répartition dans le sol (HEIJNEN et VAN VEEN, 1991 ; POSTMA *et al.*, 1989). À ces contraintes, il faut ajouter la prédation, surtout par les protozoaires, qui est souvent responsable du déclin des rhizobia, après leur introduction dans le sol (HABTE et ALEXANDER, 1977). Les autres facteurs biotiques qui peuvent réduire le nombre des rhizobia incluent les bactériophages, les parasites comme le *Bdellovibrio* (KEYA et ALEXANDER, 1975), les antibiotiques produits par d'autres micro-organismes

et les bactériocines produites par d'autres rhizobia (HIRSCH, 1979).

Une résistance intrinsèque aux antibiotiques peut donc être importante, du point de vue écologique, pour les micro-organismes du sol, en raison d'une compétitivité plus élevée et d'une plus grande aptitude à survivre, principalement dans les sites arides où la sécheresse et le pH alcalin favorisent la croissance d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques.

En ce qui concerne les isolats provenant des sols du Sénégal et de la Tunisie et les souches de la collection du Laboratoire de microbiologie du sol de l'IRD de Dakar, la résistance intrinsèque aux antibiotiques a été déterminée par l'addition de 9 antibiotiques au milieu de culture (tabl. I et II) (GREGO *et al.*, 1995). Les isolats provenant des sites tunisiens sont, globalement, tolérants à tous les antibiotiques, bien qu'à différents degrés. Les isolats provenant des sites sénégalais ne présentent eux que de faibles niveaux de résistance, à part quelques isolats résistants à un seul antibiotique. La sensibilité aux antibiotiques, plus élevée chez les souches

▽ Tableau I – Résistance aux antibiotiques des souches de rhizobia isolées dans des sols du Sénégal et de Tunisie.

Antibiotiques	% des isolats résistants						Bled Talah
	St-Louis	G.Kadar	Mbouba	Louga	Diana	Souilène	
Streptomycine	50	0	33	0	0	50	13
Ampicilline	67	67	33	40	45	100	38
Erythromycine	67	0	100	80	9	50	100
Polymixine	50	33	33	100	27	0	13
Acide Nalydixique	67	33	100	100	100	100	100
Néomycine	33	0	0	0	0	0	13
Chloramphénicol	33	33	0	0	9	50	25
Kanamycine	33	0	0	0	0	0	38
Rifampicine	0	33	0	60	9	50	50

Les antibiotiques ont été ajoutés à la concentration de 50 µg.ml⁻¹.

▽ Tableau II – Résistance aux antibiotiques des souches de rhizobia appartenant à la collection IRD.

Antibiotiques	% des isolats résistants		
	Groupe SA	Groupe S	Groupe A
Streptomycine	8	0	47
Ampicilline	8	0	21
Erythromycine	100	100	100
Polymixine	0	0	100
Acide Nalydixique	100	100	100
Néomycine	8	0	5
Chloramphénicol	23	75	5
Kanamycine	46	0	58
Rifampicine	8	25	42

Les antibiotiques ont été ajoutés à la concentration de 50 µg.ml⁻¹.

sénégalaises que chez les souches tunisiennes, peut être imputée à la biomasse microbienne moins abondante dans la rhizosphère des *Acacia raddiana* de Tunisie (GREGO *et al.*, 1995).

Conclusion

Les rhizobia tropicaux présentent des caractéristiques physiologiques qui peuvent contribuer à leur survie dans les environnements peu hospitaliers des sols tropicaux. Leur résistance à plusieurs stress abiotiques et leur amplitude écologique sont en faveur de leur utilisation pour les essais d'inoculation des légumineuses pérennes dans les programmes de reforestation. Cependant, une meilleure survie ne signifie pas obligatoirement qu'une fois introduits dans la rhizosphère, ces rhizobia soient capables de s'établir et d'atteindre les sites de la nodulation. Pour qu'elle puisse stimuler le développement de la plante, toute souche isolée doit : 1) être adaptée aux conditions du sol ; 2) être une fixatrice d'azote efficace en symbiose avec la plante hôte ; 3) être capable de s'établir en gagnant la compétition avec les populations rhizobiales indigènes (GILLER et CADISH, 1995).

Plusieurs chercheurs ont orienté leurs recherches vers la manipulation génétique des rhizobia afin de leur faire acquérir certaines propriétés spécifiques et améliorer ainsi leurs performances de souches inoculantes. Par contre, beaucoup d'autres optent pour l'utilisation des souches « site-spécifiques », c'est-à-dire indigènes de l'habitat où elles doivent être inoculées. L'adaptation à un ou plusieurs stress abiotiques augmente l'aptitude d'un organisme et peut contribuer à son succès dans la compétition pour atteindre les sites de pénétration racinaires (ELSHEIKH et WOOD, 1995 ; ZOU *et al.*, 1995). En effet, le stress dû à la compétition et à l'antagonisme microbien s'ajoute souvent aux stress liés aux conditions parfois extrêmes du milieu ; la résultante définit le degré de compétitivité d'une souche.

L'étude de la physiologie des rhizobia face aux contraintes environnementales peut apporter des indications utiles pour une meilleure compréhension des stratégies qu'elles adoptent pour résister aux conditions de privation de nutriments et être capables, les conditions redevenant favorables, de reprendre une activité et d'atteindre les sites de nodulation.

Auteurs

**I. Cacciari, E. Di Mattia, P. Quatrini,
M. Moscatelli et S. Grego**
DABAC, Università della Tuscia,
01100 Viterbo, Italie

**D. Lippi,
M. R. De Paolis**
IBEV-CNR, Area Ricerca di Roma,
Monterotondo Scalo, Italie

Références bibliographiques

- ALEXANDER M.**,
1971 – *Microbial Ecology*. New York,
John Wiley & Sons.
- ALEXANDER M.**,
1985 – Ecological constraints on nitrogen
fixation in agricultural ecosystems.
Adv. Microbial Ecology, 8 : 163-183.
- AL-RASHIDI R. K., LOYNACHAN T. E.,
FREDERICK L. R.**,
1982 – Dessication tolerance of four
strains of *Rhizobium japonicum*.
Soil Biol. Biochem., 14 : 489-493.
- BROWN A. D.**,
1976 – Microbial water stress.
Bacteriol. Rev., 40 : 803-846.
- CACCIARI I., LIPPI D., PIETROSANTI T.,
PIETROSANTI W.**,
1995 – Effect of previous growth
conditions on starvation survival
and endogenous metabolism rate of
Arthrobacter fluorescens.
J. Basic. Microbiol., 35 : 359-366.
- CHAO W. L., ALEXANDER M.**,
1982 – Influence of soil characteristics
on the survival of *Rhizobium* in soils
undergoing drying.
Soil Soc. Am. J., 46 : 949-952.
- CLARK L. M., DILWORTH M. J.,
GLENN A. R.**,
1993 – Survival of *Rhizobium meliloti* WSM419
in laboratory culture: effect of combined
pH shock and carbon substrate stress.
Soil Biol. Biochem., 9 : 1289-1291.
- CORNET F., OTTO C., RINAUDO G.,
DIEM H. G., DOMMERMUES Y.**,
1985 – Nitrogen fixation by *Acacia*
holosericea grown in field-simulating
conditions. *Acta Oecol./Oecol. Plant.*, 6 (20) :
211-218.
- CRAIG G. F., ATKINS C. A., BELL D. T.**,
1991 – Effect of salinity on growth of four
strains of *Rhizobium* and their infectivity
and effectiveness on two species of *Acacia*.
Plant Soil, 133 : 253-262.
- DANSO S. K. A., BOWEN G. D.,
SANGINGA N.**,
1992 – Biological nitrogen fixation
in trees in agro-ecosystems.
Plant Soil, 141 : 177-196.
- DAY J. M., ROUGHLEY R. J.,
EAGLESHEAM A. R. J., DYE M., WHITE S. P.**,
1978 – Effect of high soil temperatures
on modulation of cowpea, *Vigna utiguiculata*.
Annals of Applied Biology, 88 : 476-481.
- DIAGNE O.**,
1988 – Études préliminaires
sur quatre arbres fixateurs d'azote.
Rev. Sénégal. Rec. Agric. Halieut., 1 : 36-46.
- DÖBEREINER J., PEDROSA F. O.**,
1987 – *Nitrogen-fixing bacteria*,
in non leguminous crop plants.
Berlin, Springer-Verlag.
- DREYFUS B. L., DOMMERMUES Y. R.**,
1981 – Nodulation of *Acacia* species by fast-
and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*.
Appl. Environ. Microbiol., 41 : 97-99.
- EAGLESHAM A. R. J., AYANABA A.**,
1984 – « Tropical stress ecology
of rhizobia, root nodulation and legume
nitrogen fixation ».
In Subba Rao N. S., ed. : *Current
Developments in Biological Nitrogen Fixation*.
New Delhi, Oxford and IBH : 1-35.
- ELSHEIKH E. A. E., WOOD M.**,
1989 a – Response of chickpea
and soybean rhizobia to salt: influence
of carbon source, temperature and pH.
Soil Biol. Biochem., 21 : 883-887.
- ELSHEIKH E. A. E., WOOD M.**,
1989 b – Response of chickpea
and soybean rhizobia to salt: osmotic
and specific ion effects of salts.
Soil Biol. Biochem., 21 : 889-895.
- ELSHEIKH E. A. E., WOOD M.**,
1995 – Nodulation and N₂ fixation
by soybean inoculated with salt-tolerant
rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia
in saline soils.
Soil Biol. Biochem., 27 : 657-661.

- EVANS J., HOCHMAN Z., O'CONNOR G. E., OSBORNE G. J.,**
1988 – Soil acidity and *Rhizobium*: their effects on the modulation of subterranean clover on the slopes of southern New South Wales. *Aust. J. Agric. Res.*, 38 : 605-618.
- EVANS J., WALLACE C., DOBROWOLSKI N.,**
1993 a – Interaction of soil type and temperature on the survival of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 1153-1160.
- EVANS J., WALLACE C., DOBROWOLSKI N., PRITCHARD I., O'CONNOR G. E., SULLIVAN B.,**
1993 b – Requirement for inoculation of field pea with *Rhizobium* and lime pelleting seed in soils of western Australia. *Aust. J. Exp. Agric.*, 33 : 49-51.
- FRY J. C.,**
1990 – Direct methods in biomass estimation. *Methods Microbiol.*, 22 : 41-85.
- GARCIA-LARA J., MARTINEZ J., VILAMÚ M., VIVES-REGO J.,**
1993 – Effect of previous growth conditions on the starvation-survival of *L. scherichia coli* in seawater. *J. Gen. Microbiol.*, 139 : 425-431.
- GAUTHIER M. J., MUNRO P. M., BREITTMAYER V. A.,**
1989 – Influence of prior growth conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater. *Can. J. Microbiol.*, 35 : 9-383.
- GHITTONI N. E., BUENO M. A.,**
1995 – Peanut rhizobia under salt stress: role of trehalose accumulation in strain ATCC 51466. *Can. J. Microbiol.*, 41 : 1021-1030.
- GILLER K. E., CADISCH G.,**
1995 – Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture. *Plant Soil*, 174 : 255-277.
- GOTTSCHALL J. C.,**
1990 – Phenotypic response to environmental changes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74 : 93-102.
- GREGO S., QUATRINI P., BADALUCCO L., DE CESARE F., ZANOTTI C., CACCIARI I.,**
1995 – « Souches résistantes de *Rhizobium* dans une rhizosphère caractérisée d'*Acacia* au nord et au sud du Sahara ». In Pontanier R., M'Hiri A., Akrimi N., Aronson J., Le Floch E., éd. : *L'homme peut-il refaire ce qu'il a défait ?*, Paris, John Libbey Eurotext : 201-210.
- HABTE M., ALEXANDER M.,**
1977 – Further evidence for the regulation of bacterial population in soil by protozoa. *Arch. Microbiol.*, 113 : 181-183.
- HEIJNEN C. E., VAN VEEN J. A.,**
1991 – A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 85 : 73-80.
- HENZELL E. F.,**
1988 – The role of biological nitrogen fixation research in solving problems in tropical agriculture. *Plant and Soil*, 108 : 15-21.
- HERRERA M. A., SALAMANCA C. P., BAREA J. M.,**
1993 – Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 : 29-133.
- HIRSCH P. R.,**
1979 – Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbio.*, 113 : 19-228.
- HIRSCH P. R.,**
1996 – Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.*, 133 : 159-171.
- HÖFLE M. G.,**
1984 – Transient response of glucose-limited cultures of *Cytophaga johnsonae* to nutrient excess and starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47 : 356-362.
- HOZORE E., ALEXANDER M.,**
1991 – Bacterial characteristics important to rhizosphere competence. *Soil Biol. Biochem.*, 8 : 717-723.

- HUA S.-S.T., TSAI V.Y., LICHENS G. M., NOMA A. T.,**
1982 – Accumulation of aminoacids in *Rhizobium* sp. strain WRI 00 1 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 135-140.
- KARANJA N. K., WOOD M.,**
1988 – Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L) in Kenya: tolerance of high temperatures and antibiotic resistance. *Plant and Soil*, 112 : 15-22.
- KEPPNER R. L., PRATT J. R.,**
1994 – Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews*, 95 : 603-615.
- KEYA S. O., ALEXANDER M.,**
1975 – Regulation of parasitism by host density: the *Bdellovibrio-Rhizobium* interrelationship. *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 231-237.
- LAJUDIE P. de, WILLEMS A., POT B., DEWETTINCK D., MAESTROJUAN G., NEYRA M., COLLINS M. D., DREYFUS B., KERSESTER K., GILLIS M.,**
1994 – Polyphasic taxonomy within the *Rhizobium-Agrobacterium* RRNA cluster and the proposal of two new species: *Rhizobium teranga* and *Rhizobium sahari*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 : 715-733.
- LAL B., KHANNA S.,**
1994 – Selection of salt tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10 : 637-639.
- LIPPI D., DE PAOLIS M. R., DI MATTIA E., GREGO S., PIETROSANTI T., CACCIARI I.,**
2000 – Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. *Biol. Fertil. Soils*, 30 : 276-283.
- MORITA R. J.,**
1982 – Starvation-survival of heterotrophs in the marine environments. *Adv. Microb. Ecol.*, 6 : 171-198.
- MOYER C. I., MORITA R. Y.,**
1989 – Effect of growth rate and starvation-survival on the viability and stability of a psychrophilic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 : 1122-1127.
- MUNRO P. M., GAUTHIER M. J., LAUMOND F. M.,**
1987 – Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 1476-1481.
- NDOYE I., GUEYE M., DANSO S. K.A., DREYFUS B.,**
1995 – Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Plant Soil*, 172 : 175-180.
- POSTMA J., WALTER S., VAN VEEN J. A.,**
1989 – Influence of different initial moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, 21 : 437-442.
- ROSZAK D. B., COLWELL. R. R.,**
1987 – Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, 51 : 365-379.
- SAXENA A. K., REWARI R. B.,**
1992 – Differential responses of chickpea (*Cicer arietinum* L.) -*Rhizobium* combination to saline soil conditions. *Biol. Fertil. Soils*, 13 : 31-34.
- SHOUSHTARI N. H., PEPPER I. L.,**
1985 – Mesquite *Rhizobia* isolated from the Sonoran desert: physiology and effectiveness. *Soil Biol. Biochem.*, 17 : 797-802.
- SINCLAIR T. R., MUCHOV R. C., LUDLOW M. M., LEACH G. J., LAWN R. J., FOALE M. A.,**
1987 – Field and model analysis of the effect of water deficits on carbon and nitrogen accumulation by soybean, cowpea and black gram. *Field Crops Res.*, 17 : 121-140.

- SINGLETON P. W., EL SWAIFY S. A., BOHLOOL B. B.,**
1982 – Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 884-890.
- SKUJINS J.,**
1984 – Microbial ecology of desert soils. *Adv. Microb. Ecol.*, 7 : 49-91.
- SPRENT J. L.,**
1984 – « Effects of drought and salinity on heterotrophic nitrogen-fixing bacteria and on infection of legumes by *rhizobia* ». In Veeger C., Newton W. E., eds : *Advances in Nitrogen Fixation Research*, The Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk : 295-302.
- WANI S. P., RUPELA O. P., LEE K. K.,**
1995 – Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil*, 174 : 29-49.
- WELLER D. M.,**
1988 – Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26 : 379-407.
- ZAHARAN H. H.,**
1992 – Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbioses in saline environments. *Biol. Fertil. Soils*, 12 : 73-80.
- ZHANG X., HARPER R., KARISTO M., LINDSTRÖM K.,**
1991 – Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 104-113.
- ZOU N., DART P. J., MARCAR N. E.,**
1995 – Interaction of salinity and rhizobial strain on growth and N₂-fixation by *Acacia ampliceps*. *Soil Biol. Biochem.*, 27 : 409-413.
- ZWIETERING M. H., JONGENBURGER I., ROMBOUTS F. M., VAN'T RIET K.,**
1990 – Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 1875-1881.