

*République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Béjaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie*

*Mémoire de fin de cycle*

*En vue de l'obtention du Diplôme de Master*

*Option : Ecologie Microbienne et Environnement*

## *Thème*

**Evaluation de l'effet de la salinité sur les rhizobiums  
et sur la symbiose *Rhizobium sp.*–*Vicia faba***

### **Membre du jury :**

Président : M<sup>r</sup> HAMLAT M.

Promoteur : M<sup>r</sup> BELHADI D.

Examineurs : M<sup>r</sup> BENSALD K.

M<sup>r</sup> LADJOUZI R.

### **Présenté par :**

M<sup>lle</sup> BEMMEZIANE Djahida

M<sup>lle</sup> BENNACER Sonia

**PROMOTION 2012/2013**

## *Remerciements*

*Nous adressons nos profonds remerciements à Monsieur BELHADI D., notre encadreur dont disponibilité, les qualités professionnelles, la gentillesse et la rigueur n'ont jamais fait défaut durant le long de notre mémoire.*

*Pour la même occasion, nous tenons à remercier les membres de l'équipe de recherche du « Laboratoire d'Ecologie Microbienne » de nous avoir accueillies au sein du laboratoire.*

*Nos sincères remerciements sont adressés aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail, nous les en remercions profondément.*

*Ainsi, nous adressons nos remerciements les plus chaleureux à toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin par le fruit de leur connaissance pendant toute la durée de notre parcours éducatif.*

## *Dédicaces*

*A*

*La mémoire de mon père.*

*Celle qui m'a donné la vie, la personne la plus chère à mon cœur « Ma maman chérie », aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur mon amour profond.*

*Mes frères et sœurs, qui ont toujours cru en moi et encouragé.*

*Toutes mes amies : Célia, Dihia, Nadia, Nesrine, Ounissa, Yasmine et Yousra.*

*Aux adorables petits poussins : Aziz et Adel.*

**DJAHIDA**

## *Dédicaces*

*A*

*Tous ceux qui m'aiment*

*Tous ceux que j'aime*

*Je dédie ce travail*

*SONIA*

# *Sommaire*

## Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

I- Problématique .....	1
V- Matériel et Méthodes .....	10
1- Souches bactériennes .....	10
2- Effet des sels sur les souches de <i>Rhizobium sp.</i> .....	10
2-1- Evaluation de l'effet du NaCl.....	10
2-2- Evaluation de l'effet du MgSO <sub>4</sub> et du KCl .....	10
2-3- Evaluation de l'effet des sels métalliques .....	10
3- Effet du NaCl sur la symbiose <i>Rhizobium sp.</i> / <i>Vicia faba</i> .....	12
3-1- Stérilisation des graines et germination .....	12
3-2- Transfert des plantules .....	12
3-3- Inoculation des plantes .....	13
3-4- Estimation de l'effet du NaCl.....	13
VI- Résultats et Discussions.....	14
1- Détermination de la tolérance aux sels minéraux .....	14
1-1- Tolérance au NaCl.....	14
1-2- Tolérance au KCl.....	15
1-3- Tolérance au MgSO <sub>4</sub> .....	16
2- Résistance aux métaux lourds .....	16
2-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	19
2-2- Détermination des profils de résistance .....	22
3- Effet du NaCl sur la symbiose <i>Rhizobium sp.</i> / <i>Vicia faba</i> .....	23
3-1- Effet du NaCl sur le poids frais de la partie aérienne.....	25
3-2- Effet du NaCl sur le poids sec de la partie aérienne .....	28
3-3- Effet du NaCl sur le nombre de nodules .....	30
VII- Conclusion et Perspectives .....	34
Références bibliographiques	
Annexe	

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
I	Préparation des solutions des différents sels métalliques	11
II	Valeurs critiques définissant la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds	12
III	Variation de la tolérance au chlorure de potassium	15
IV	Variation de la tolérance Sulfate de Magnésium	16
V	Variation de la tolérance au cuivre	17
VI	Variation de la tolérance au zinc	17
VII	Variation de la tolérance au mercure	18
VIII	Variation de la tolérance au plomb	18
IX	Variation de la tolérance au cadmium	19
X	Concentrations minimales inhibitrices	19
XI	Résistance des souches aux métaux lourds	22
XII	Analyse de la variation du poids frais des parties aériennes en fonction des concentrations en NaCl	28
XIII	Analyse de la variation du poids sec des parties aériennes en fonction des concentrations en NaCl	30
XIV	Analyse de la variation du nombre de nodules en fonction des concentrations en NaCl	31
XV	Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 0 mM	32
XVI	Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 25 mM	32
XVII	Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 50 mM.	32
XVIII	Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 75 mM.	32
XIX	Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 100 mM.	33

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Courbes de croissance des souches de <i>Rhizobium sp.</i> à différentes concentrations en NaCl	14
02	Pourcentages de résistance des souches à différentes concentrations en sels métalliques	21
03	Taux de résistance aux métaux lourds.	23
04	ffet du NaCl sur la symbiose <i>Rhizobium sp.</i> - <i>Vicia faba.</i>	25
05	Variation du poids frais des plantes inoculées et témoins en fonction des concentrations en NaCl.	27
06	Variation du poids sec des plantes inoculées et témoins en fonction des concentrations en NaCl	29
07	Variation du poids sec des plantes inoculées et témoins en fonction des concentrations en NaCl.	31

# *Problématique*

## I- Introduction

Les activités anthropiques conduisant au dépôt volontaire ou involontaire de contaminants peuvent être nocives pour le sol, affecter les activités des enzymes du sol à différents niveaux fonctionnels, réduire la croissance et le rendement des plantes et augmenter les concentrations de polluants dans les plantes (Feng et *al.*, 2006).

L'irrigation et l'utilisation de produits agrochimiques ont dominé la pratique agricole pour longtemps, leur utilisation améliore le rendement des cultures et la production alimentaire. Il est cependant douteux que ces pratiques améliorent la durabilité des ressources environnementales. L'irrigation répétée (avec de l'eau de mauvaise qualité) et l'utilisation des pesticides pourraient conduire à la salinisation des sols et à la contamination métallique respectivement, en particulier dans les couches supérieures du sol (Owojori et *al.*, 2009).

Un élément essentiel de la durabilité agricole est la gestion efficace de l'azote dans l'environnement. Cela implique généralement une fixation biologique d'azote qui est utilisé directement par la plante, et est donc moins sensible à la volatilisation, dénitrification et lessivage (Graham et Vance, 2000). Ceci a été démontré dans un grand nombre d'études, en particulier celles qui concernent l'impact de la gestion des sols sur les populations de rhizobiums dans les régions arides ainsi que celles qui traitent l'isolement et la caractérisation des souches résistantes à la sécheresse et au sel (Cacciari et *al.*, 2003).

## II- La symbiose *Rhizobium sp./* légumineuses

Le recours à des légumineuses pérennes, telles que la fève (*Vicia faba*), peut être une stratégie intéressante pour la réhabilitation des zones affectées par les processus de désertification ayant provoqué la perte de fertilité, en augmentant la porosité du sol ainsi que l'infiltration de l'eau (Cacciari et *al.*, 2003).

Cette plante a une capacité d'améliorer la bioproduktivité des terres marginales. D'un côté, elle sert comme fourrage nutritif grâce à ses graines et fruits riches en protéines, de l'autre elle enrichit le sol en azote une fois en association symbiotique avec des espèces de rhizobiums (Cordovilla et *al.*, 1998).

Grâce à leur capacité de fixer l'azote en symbiose, la croissance des légumineuses est moins sensible à la limitation de la source d'azote dans le sol. La fixation symbiotique d'azote dans les plantes, ainsi que la proportion de légumineuses contribuent à l'introduction de plus d'azote dans l'écosystème. La fixation symbiotique d'azote peut donc améliorer le statut de la disponibilité en azote dans l'écosystème terrestre (Hartwig, 1998).

Une symbiose pleinement fonctionnelle nécessite donc la capacité de survie des bactéries même dans des conditions environnementales défavorables (Cevheri et al., 2011). Pour cela le choix des partenaires (plante\ bactérie) tolérants aux sels est très important, *Vicia faba* est souvent cultivé sur des sols salins au Moyen-Orient et dans la région Méditerranéenne (Cordovilla et al., 1998).

### III- Les sels minéraux

On estime que 6,5 % des terres du globe, soit 9 millions de km<sup>2</sup>, sont déjà affectés par le phénomène de salinité (Cheverry et Bourrié, 1998), en particulier dans la région méditerranéenne. En Algérie, plus de 20 % des sols irrigués sont concernés par le problème de la salinité à cause de l'irrigation par de l'eau de mer (Douaoui, 2012).

Le problème de salinité correspond à l'accumulation excessive de sels très solubles (chlorures, sulfates, carbonates, de sodium ou de magnésium) dans la partie superficielle des sols. Ceci se traduit par une diminution de la fertilité des sols et l'alimentation en eau des plantes est rendue plus difficile (Cheverry et Bourrié, 1998).

La salinisation peut être « primaire », c'est-à-dire héritée des conditions naturelles, liées par exemple à la présence de couches géologiques salées. Elle peut également être « secondaire », c'est-à-dire liée à l'activité de l'homme et en particulier aux pratiques d'irrigation. Elle peut enfin être considérée comme « potentielle », si l'homme ne modifie pas ses pratiques actuelles (Cheverry et Bourrié, 1998).

L'effet du sel sur la plante se traduit par l'endommagement de la structure cellulaire inhibant ainsi la croissance végétale. Il altère plusieurs étapes du cycle de vie cellulaire, la germination de la graine, la réduction de la synthèse des phytohormones ainsi que d'autres enzymes de croissance, la perturbation de la photosynthèse à cause de l'effet négatif du sel

dans le stroma des chloroplastes, l'altération de la morphologie de la plante, l'altération et parfois même inhibition de l'activité enzymatique (Nabti, 2008).

La tolérance au sel est un caractère signalé dans plusieurs variétés de féverole et peut être importante dans certaines zones méditerranéennes. Cette tolérance est considérée par quelques physiologistes par rapport à la tolérance de la symbiose plante-Rhizobium (Duc, 1997).

Le stress salin inhibe les étapes initiales de la symbiose Rhizobium-légumineuses. La colonisation bactérienne et le recourbement des poils racinaires de *V. faba* sont réduits en présence de NaCl à 100 mM. La proportion des poils absorbants contenant des filaments d'infection est réduite de 30 % en présence de NaCl (Zahran, 1999).

L'effet du sel sur la symbiose se traduit non seulement en inhibant la formation des nodules, mais entraîne également la réduction de la croissance de la plante hôte, et la formation de nodules non fonctionnels ayant une structure anormale. La présence du sel affecte en plus le chimiotactisme bactérien, la colonisation, le recourbement des poils racinaires, la réduction de la respiration nodulaire, et de l'activité fixatrice d'azote (Predeepa et Ravindran, 2010).

Le stress salin accélère le jaunissement des nodules et abaisse la teneur en leghémoglobine, ce qui est considéré comme un indice de la sénescence. Ce processus implique généralement une production accrue d'espèces actives d'oxygènes toxiques (Tejera et al., 2004). Une réduction de la production de la matière sèche, du nombre de nodules, du poids des nodules, du contenu en  $K^+$  et l'augmentation de la teneur en  $Na^+$  sont observées chez les pois chiches et la féverole (Elsheikh, 1998).

Après une augmentation de la pression osmotique, un ralentissement dans le métabolisme est observé. Des gènes impliqués dans le cycle de Krebs, les chaînes respiratoires et 25% des gènes codant pour des protéines ribosomiques sont réprimés. Les gènes impliqués dans le métabolisme du glycogène sont exprimés à des degrés plus élevés conduisant à l'accumulation des sources de carbone sous forme de glycogène, qui peut aider à restaurer le volume de la cellule après le choc osmotique. Les cellules accumulent les solutés

compatibles, qui comprennent les glucides, et des acides aminés dont principalement le glutamate et la proline (Vriezen et *al.*, 2007).

Les effets des sels varient dans leur intensité sur la croissance et la survie des rhizobiums. L'acétate de sodium (CH<sub>3</sub>COONa) est plus nocif que le chlorure de potassium (KCl) et le chlorure de sodium (NaCl), et le di-chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est plus nocif que le chlorure de sodium (NaCl). Les sulfates sont toxiques à des pressions osmotiques beaucoup plus faibles que les chlorures, indiquant que l'effet osmotique n'est pas le principal facteur déterminant la toxicité. L'effet du sel sur les rhizobiums semble être dû à un ion spécifique et non purement osmotique (Elsheikh et Wood, 1989).

Les gènes de sensibilité aux chlorures, sulfates et ions potassium sont impliqués dans la réponse au stress, ils sont cependant sans grande importance dans la survie des rhizobiums. Ceci n'est pas le cas pour l'accumulation des osmoprotecteurs et des solutés compatibles, qui peuvent assurer la protection et renforcer la survie. Ainsi, des mécanismes génétiques qui favorisent l'accumulation de bêtaïnes ont été identifiés (Elsheikh, 1990), en plus du tréhalose qui s'accumule dans les bactéries et offre une protection contre la dessiccation en maintenant l'intégrité de la membrane (Vriezen et *al.*, 2007).

Les bactéries rhizosphériques produisent des cytokines et des anti-oxydants, aboutissant à la dégradation des espèces réactives de l'oxygène. Et réduisent l'effet asphyxiant de l'excès de l'éthylène par la production d'une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase et améliore ainsi la croissance de la plante. La production de polysaccharides microbiens liant les particules du sol pour former des micro-agrégats et macro-agrégats permettant ainsi l'aération et la perméabilité du sol et confèrent à la plante traitée une résistance au stress hydrique. Les exopolysaccharides peuvent aussi se lier aux cations Na<sup>+</sup>, les rendant inaccessibles aux plantes dans des conditions salines (Grover et *al.*, 2011).

#### **IV- Les sels métalliques**

Les métaux lourds sont naturellement présents dans le sol à de faibles concentrations et ont comme origine l'altération de la roche mère. Ces oligo-éléments jouent un rôle de cofacteurs et de biocatalyseurs dans un grand nombre de molécules biologiques. Environ 30% des enzymes sont des métalloenzymes assurant plusieurs fonctions dont le site actif comporte

un atome métallique. A ceci s'ajoute les ions métalliques qui remplissent plusieurs fonctions structurales. C'est le cas des ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui interviennent dans le repliement des protéines, dans le transport d'électrons et la transmission des signaux et sont impliqués dans les réactions photoredox (Atkins, 1990).

Malgré leur origine naturelle et leur rôle indispensable au bon déroulement des processus biologiques, la plupart des métaux s'avèrent toxiques dès que leur teneur excède un seuil limite (Baize, 1997). N'étant pas biologiquement dégradables, ces éléments persistent dans l'environnement et s'accumulent dans les chaînes alimentaires (Pulles et *al.*, 2012) et constituent des menaces pour la santé humaine et les écosystèmes (Abd-Alla et *al.*, 2012).

La pollution par les métaux lourds pose, elle aussi, une grave menace pour les plantes, les animaux et même les êtres humains en raison de leur propriété non biodégradable et leur toxicité même à faibles concentrations (Mouni et *al.*, 2009). Les Usines de traitement des eaux usées, à elles seules, génèrent des millions de tonnes de boues résiduelles dans le monde chaque année. La production de l'Union Européenne en 1996 était d'environ 5,9 millions de tonnes par an (García-Delgado, 2007).

Les sources anthropiques les plus importantes sont les activités faisant appel à la combustion de fioul lourd ou de minéraux combustibles, les incinérateurs de déchets et les industries. Les industries métallurgiques sont des sources importantes de retombées atmosphériques qui contaminent les sols environnants (Baize et Tercé, 2002). A celles-ci s'ajoute le transport routier comme une source éventuellement importante des émissions métalliques dans l'atmosphère (Pulles et *al.*, 2012).

Le risque de dissémination dans l'environnement est aussi lié au phénomène de drainage minier à cause des activités minières. Les apports d'origine agricole sont une autre source de contamination des sols en éléments traces métalliques ; les amendements organiques, les engrais phosphatés et les pesticides contiennent de grandes quantités de métaux qui s'accumulent dans les sols cultivés. Enfin, tous les déchets issus de la consommation et de la vie urbaine (gaz d'échappement, boues de stations d'épuration, composts, effluents et déchets divers) complètent la liste des apports en éléments trace métalliques d'origine anthropique (Monchy, 2007).

Une ample importance est accordée à la spéciation des métaux dans les sols en particulier pour deux raisons, faire le lien avec la biodisponibilité potentielle et de prévoir la mobilité. La spéciation est liée à leur réactivité biogéochimique et à plusieurs conditions physico-chimiques du sol dont le plus important est le pH (Kabata-Pendias, 2004).

La plupart des sels métalliques sont solubles, ce qui facilite leur mobilité et c'est sous cette forme qu'ils contaminent l'environnement (Melquiot, 2003). La toxicité de ces éléments résulte de leur affinité pour les groupements –SH des enzymes qu'ils inactivent après s'y être liés (Davet, 1997).

La contamination métallique affecte les communautés microbiennes dans les sols de plusieurs façons. Elle peut conduire à une réduction de la biomasse microbienne totale, diminuer le nombre de populations spécifiques, ou encore changer la structure de la communauté microbienne (Zhuang *et al.*, 2007).

La sensibilité des plantes aux métaux lourds varie beaucoup en fonction des espèces. De nombreuses espèces poussent bien sur des sols riches en métaux, mais qui ne sont pas absorbés par les racines du fait de la sélectivité des membranes des cellules racinaires (Hopkins, 2003). Cependant, pour un nombre important d'espèces des concentrations accrues de métaux dans le sol peuvent également avoir des effets indésirables. L'accumulation des métaux dans les organes de la plante à un niveau indésirable est à l'origine d'effets limitatifs sur les processus physiologiques tels que la photosynthèse et la synthèse de la chlorophylle et l'inactivation des protéines végétales, ce qui réduit par la suite les rendements (Wani *et al.*, 2007). C'est le cas des plantes exposées à des niveaux élevés de cadmium, qui présentent des symptômes visibles tels que des blessures réfléchies, inhibition de la croissance, le brunissement des pointes des racines, et finalement la mort. Des niveaux élevés de zinc dans le sol inactivent de nombreuses fonctions métaboliques chez la plante entraînant un retard de croissance et la sénescence ainsi que la chlorose chez les jeunes feuilles, qui peuvent s'étendre aux feuilles plus âgées après une exposition prolongée. Ces carences ont été attribuées à un transfert empêché des micronutriments de la racine à la tige. Cet obstacle est basé sur le fait que la concentration de Fer et de Manganèse dans la racine est supérieure à celle de la tige (Yadav, 2010).

L'effet des métaux lourds sur la symbiose rhizobium-légumineuse se traduit par une diminution du nombre de nodules, causée par différents facteurs, tels que l'atrophie des poils racinaires, le déclin du nombre total de poils racinaires, le raccourcissement de la zone des racines sensibles à la nodulation et la diminution du nombre d'infections. Une fois la nodulation établie, la capacité de fixation d'azote chez les légumineuses cultivées en présence de métaux lourds est affectée selon le type de métal et les espèces de légumineuses. Une augmentation du stress oxydatif et les espèces réactives de l'oxygène, avec déséquilibre red/ox ont été rapportés chez les plantes cultivées en présence de métaux comme l'aluminium, le cadmium ou le mercure. En outre, les niveaux d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase sont gravement diminués dans les nodules des légumineuses, ce qui entraîne un grand stress oxydatif, destruction de la leghémoglobine, et réduction de l'activité de la nitrogénase. Les enzymes assimilatrices d'azote dont la glutamate déshydrogénase (GDH), la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) sont également affectées par des métaux tel que l'aluminium (50-500 mM) (Pajuelo, 2011).

Il existe des espèces capables d'accumuler les métaux à des concentrations très élevées soit en combinant l'élément toxique avec une molécule organique (acide aminé ou acide organique) formant ainsi un complexe organo-métallique, ou par synthèse de petits peptides riches en soufre appelés phytochélatines, qui stockent les éléments métalliques dans des groupements thiols de la cystéine puis les transporter dans la vacuole. Le pH acide permet de détacher le métal qui se placera alors sur un acide organique permettant ainsi au peptide de retourner dans le cytoplasme (Hopkins, 2003).

Malgré leur développement récent, les méthodes basées sur l'utilisation de végétaux supérieurs dans un but de dépollution (phytoremédiation) sont variées et des résultats encourageants ont déjà été obtenus pour des problématiques diverses (Remon, 2006). Leur succès cependant, ne peut pas dépendre uniquement de la plante elle-même, mais aussi de l'interaction entre les racines des plantes avec les bactéries et la quantité de métaux lourds accumulés dans le sol ( Wani et *al.*, 2007).

En effet, pour contourner la contrainte de métaux lourds, les bactéries ont développé un certain nombre de mécanismes qui affectent la spéciation des métaux et donc la mobilité

par différents procédés directs ou indirects. Ceux-ci comprennent les transformations redox, les précipitations, l'absorption, la production d'agents complexant tels que les sous-produits du métabolisme microbien, comme les composés organiques simples, et des composés extracellulaires (sidérophores, exopolysaccharides et protéines) (Slaveykova et *al.*, 2010) .

Ainsi, les bactéries nodulantes peuvent protéger les plantes contre les effets toxiques du nickel et du zinc par le mécanisme d'adsorption, favoriser la croissance des plantes en synthétisant un nombre important de substances (sidérophore, l'acide indole acétique, le cyanure d'hydrogène et l'ammoniac). Ceci augmente la productivité des cultures en plus de la stimulation de la croissance des plantes hôtes par la fixation de l'azote atmosphérique et la solubilisation des phosphates (Wani et *al.*, 2007).

La tolérance bactérienne au cadmium a été différemment décrite par plusieurs auteurs, entre facilitée par des systèmes de type plasmidique codant pour un transport actif et des systèmes d'exclusion appelés pompes chimiosmotiques, dans lesquelles le cadmium est déplacé à partir du cytoplasme vers l'espace périplasmique en dehors de la cellule, où a lieu son adsorption dans les revêtements capsulaires bactériens (Robinson et *al.*, 2001).

Les cellules libres de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* WSM710 produisent un sidérophore nommé vicibactin qui est un trihydroxamate cyclique. La synthèse est amplement améliorée dans les milieux à faible concentration en fer, du fait que l'opéron vbsSO est fortement exprimé (Carter et *al.*, 2002). Ces Sidérophores pourraient aider les plantes à se procurer suffisamment de fer en présence de quantités importantes de métaux potentiellement compétitifs (Nonnoi et *al.*, 2012).

Ces mêmes cellules possèdent en plus, des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques pour maintenir l'état redox cellulaire et atténuer les dommages causés par le stress oxydatif. Le glutathion (GSH) est l'un des meilleurs exemples d'un système de défense non enzymatique, qui agit comme capteur de radicaux pour produire le glutathion oxydé. D'autre part, les défenses antioxydantes cellulaires comprennent également plusieurs enzymes telles que la superoxyde dismutase et la catalase, qui sont capables d'éliminer les radicaux d'oxygène et leurs produits (Corticeiro et *al.*, 2006).

Les profils de tolérance au sel et à la sécheresse, et de résistance aux métaux lourds chez les souches de rhizobium indigènes reflètent la pression des contraintes prédominantes dans leurs milieux. Les rhizobiums à potentiel génétique pour augmenter la tolérance à la sécheresse et/ou à la salinité pourraient augmenter la production des légumineuses dans les régions arides et semi-arides du monde (Abdel-Salam, 2010).

Il est largement reconnu que les rhizobiums indigènes jouent un rôle important dans la domination des Fabacées dans des sols pauvres et arides. Les légumineuses infestées avec des souches effectives de rhizobium peuvent en effet garantir un rendement plus élevé et une amélioration du bilan azoté de ces sols appauvris. 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 (Cacciari et *al.*, 2003).

La recherche d'un partenaire symbiotique adéquat tel que les rhizobiums, peut se révéler utile pour la plante, car ces souches ont une capacité remarquable de fixer l'azote atmosphérique une fois en symbiose avec des légumineuses, et à faire face au stress abiotiques. En outre, tout facteur nutritionnel ou environnemental influant soit sur la bactérie, soit sur la légumineuse, se répercute sur le rendement global de la symbiose. Et compte tenu de l'importance des apports nutritionnels des légumineuses, et leur rôle face aux stress abiotiques, on s'est proposé d'évaluer :

- I- La tolérance de souches *Rhizobium sp* à la présence de différents sels minéraux, et à différentes concentrations ;
- II- La tolérance de souches *Rhizobium sp* à la présence de différents sels métalliques, et à différentes concentrations ;
- III- La capacité de la symbiose *Rhizobium sp.*- *Vicia faba* de s'établir en présence de différentes concentrations en NaCl.

*Matériel*

*et*

*Méthodes*

## V- Matériel et Méthodes

### 1- Souches bactériennes

Dix souches de *Rhizobium sp.* appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne sont utilisées dans cette étude. Ces souches (AKE1, EA2, EEK4R, EEK11R, AM11R, SM21R, UE28, MC2, EC6 et REF3) proviennent de différentes régions de Bejaia et sont isolées à partir des nodules de *Vicia faba*. Elles sont repiquées sur milieu YMA (annexe) incliné en vue de revivification.

### 2- Effet des sels sur les souches Rhizobium

#### 2.1- Evaluation de l'effet du NaCl

L'évaluation de la tolérance au NaCl est réalisée sur milieu YMB (annexe) modifié, en remplaçant l'extrait de levure par le chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), réparti dans des tubes de 5mL. Le milieu YMB ainsi modifié est additionné de différentes concentrations en NaCl (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mM). Pour chaque souche, trois tubes de chaque concentration sont ensemencés avec 10  $\mu\text{L}$  d'une suspension bactérienne obtenue sur YMB et ayant une DO de 0,1 à 600nm. Après incubation à 28°C pendant 5 jours, la croissance est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm.

#### 2.2- Evaluation de l'effet du KCl et du $\text{MgSO}_4$

L'effet du KCl et du  $\text{MgSO}_4$  est évalué sur milieu YMA additionné de concentrations variables allant de 100 à 500 mM. Le test est réalisé par dépôts de 10 $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne de chaque souche et des témoins négatifs sont aussi ensemencés. Après incubation à 28°C pendant 72 heures, toute croissance sur le milieu indique la tolérance au sel et à la concentration correspondante.

#### 2.3- Evaluation de l'effet des sels métalliques

L'évaluation de l'effet des sels métalliques sur la croissance des différentes souches de *Rhizobium sp.* est réalisée sur milieu YMA. Cinq sels métalliques à savoir, le sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ), le sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ), l'acétate de plomb ( $\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2$ ), le chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) et le sulfate de cadmium ( $3\text{CdSO}_4$ ) sont testés à différentes concentrations (tableau I). Les concentrations en sels métalliques des solutions mères utilisées sont les suivantes :

- $\text{CuSO}_4/5\text{H}_2\text{O}$ : 0,05g/ml
- $\text{ZnSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5g/ml
- $\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2/3\text{H}_2\text{O}$ : 0,1g/ml
- $\text{HgCl}_2$ : 0,01g/ml
- $3\text{CdSO}_4/8\text{H}_2\text{O}$ : 0,1g/ml

A partir de ces solutions, des volumes définis de chaque solution sont prélevés et additionnés au milieu YMA pour obtenir les différentes concentrations à tester (tableau I).

**Tableau I** : Préparation des solutions des différents sels métalliques

<b>Cas du cuivre</b>										
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	100	200	300	400	500	600	700	800		
Volume de la solution mère ( $\mu\text{l}$ )	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600		
Volume du milieu (ml)	99,8	99,6	99,4	99,2	99	98,8	98,6	98,4		
<b>Cas du zinc</b>										
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	100	200	300	400	500	600	700	800		
Volume de la solution mère ( $\mu\text{l}$ )	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600		
Volume du milieu (ml)	99,8	99,6	99,4	99,2	99	98,8	98,6	98,4		
<b>Cas du mercure</b>										
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	5	10	15	20	25	30	35	40		
Volume de la solution mère ( $\mu\text{l}$ )	50	100	150	200	250	300	350	400		
Volume du milieu (ml)	99,95	99,9	99,85	99,8	99,75	99,7	99,65	99,6		
<b>Cas du plomb</b>										
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200		
Volume de la solution mère ( $\mu\text{l}$ )	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200		
Volume du milieu (ml)	99,6	99,2	98,8	98,4	98	97,6	97,2	96,8		
<b>Cas du cadmium</b>										
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125
Volume de la solution mère ( $\mu\text{l}$ )	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125
Volume du milieu (ml)	99,98	99,97	99,96	99,95	99,93	99,92	99,91	99,9	98,88	99,87

L'ensemencement est réalisé sous forme de spots de 10 $\mu\text{l}$  à partir d'une suspension bactérienne d'une densité optique de 0,1 à 600nm. Trois dépôts sont effectués pour chaque concentration et chaque souche. Après incubation à 28°C pendant 72 heures, la croissance est évaluée par l'apparition de colonies sur le milieu. Les concentrations minimales inhibitrices sont ensuite déterminées pour chaque sel métallique.

L'étude de la croissance des souches *Rhizobium* en présence de différents métaux et à différentes concentrations permet de qualifier de résistantes toutes les souches qui poussent des concentrations supérieures aux valeurs critiques représentées dans le tableau (II) (Nonnoi et *al.*, 2012).

**Tableau II** : Valeurs critiques définissant la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds (Nonnoi et *al.*, 2012)

Métal	Concentrations (mM)	Concentrations (µg/ml)
<b>Cd</b>	1 mM	112,41
<b>Zn</b>	1 mM	65,38
<b>Cu</b>	1 mM	63,5
<b>Pb</b>	1 mM	207,2
<b>Hg</b>	0,1 mM	20,06

### 3- Effet du NaCl sur la symbiose *Rhizobium sp.* / *Vicia faba*

#### 3.1- Stérilisation des graines et germination

Les graines sont plongées dans un bain d'alcool absolu pendant 1 minute puis portées dans une solution d'eau de javel (13°) pendant 10 minutes. Les graines sont ensuite rincées aseptiquement plusieurs fois à l'eau distillée stérile dans le but d'éliminer l'effet toxique de l'eau de javel.

Les graines désinfectées sont mises à germer aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles tapissées de coton puis arrosées avec une eau distillée stérile. Elles sont ensuite incubées à température ambiante jusqu'à germination.

#### 3.2- Transfert des plantules

Après incubation, les graines germées sont transférées stérilement dans des flacons contenant 250ml du milieu Jensen (annexe). Les flacons sont bouchés avec du coton cardé et afin d'assurer l'obscurité nécessaire au développement de la plante, la partie racinaire est recouverte avec du papier.

### 3.3- Inoculation des plantes

Seules les souches retenues pour leur tolérance au NaCl sont utilisées pour la mise en évidence de l'effet du NaCl sur la symbiose *Rhizobium sp.* / Légumineuses. Il s'agit de AKE<sub>1</sub>, EA<sub>2</sub>, EEK<sub>4</sub>R et MC<sub>2</sub>. Avant l'inoculation des plantules, une solution du NaCl est additionnée à chaque flacon pour obtenir les concentrations de 25, 50, 75 et 100 mM. Trois plantules sont aussi prévues pour chaque concentration et pour chaque souche.

Juste après addition du NaCl, les plantules sont inoculées avec 1ml d'une suspension bactérienne d'une densité de 0,1 correspondant à 10<sup>8</sup> cellules/ml. Un témoin négatif ne contenant pas du NaCl et des témoins non inoculés sont prévus pour chaque concentration.

Les plantes sont ensuite incubées dans les conditions de laboratoire (température et éclairage naturel).

### 46-4- Estimation de l'effet du NaCl

Après 30 jours de culture, les plantes sont récoltées et le nombre de nodules est déterminé pour chacune des plantes. Les parties aériennes sont ensuite découpées et pesées pour déterminer les poids frais. Après séchage à l'étuve à 60°C jusqu'à obtention d'un poids stable le poids sec est déterminé.

*Résultats*

*et*

*Discussions*

## VI- Résultats et Discussion

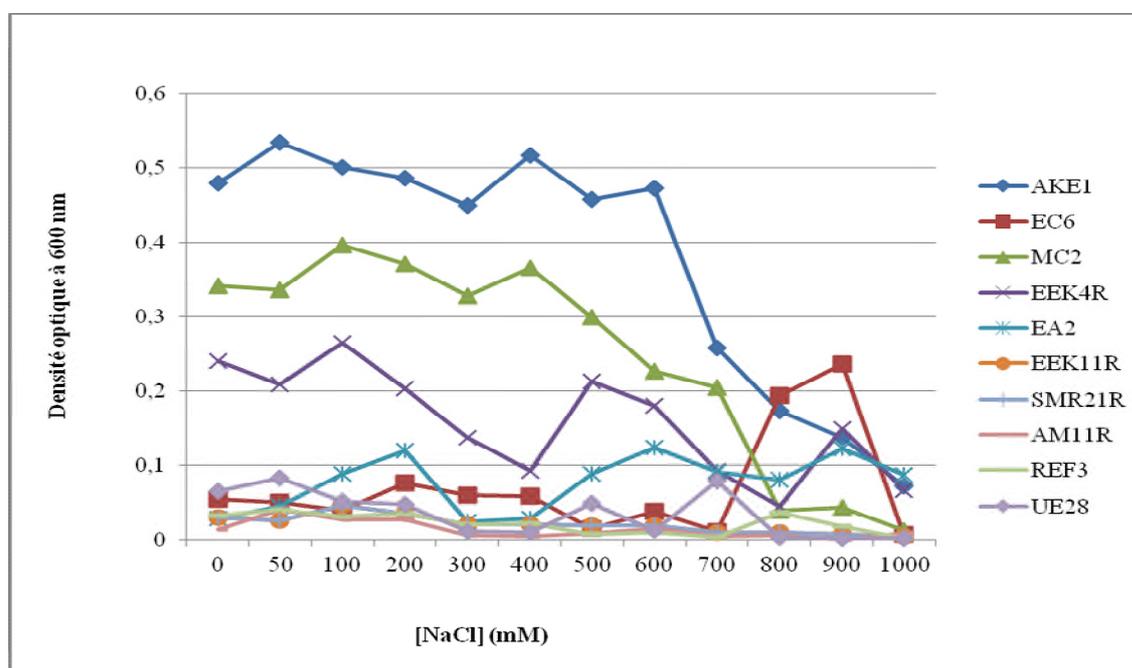
### 1- Détermination de la tolérance aux sels minéraux

#### 1.1- Tolérance au NaCl

Le test de tolérance au chlorure de sodium a permis de suivre l'évolution de la croissance en fonction de la concentration en NaCl (figure 1).

La courbe d'évolution de la densité optique en fonction de la concentration en NaCl, montre que la croissance de la plupart des souches est faible quelque soit la concentration considérée. Toute fois les souches AKE1, MC2, EEK4R et EA2 présentent une croissance assez importante sur la gamme allant de 0 à 600 mM et l'optimum de croissance serait à 50 mM pour AKE1, et 100mM pour MC2 et EEK4R.

Il y'a lieu de signaler que la souche EA2 présente une croissance optimale à 200mM malgré que sa croissance est faible.



**Figure 1 :** Courbes de croissance des souches de *Rhizobium sp.* à différentes concentrations en NaCl

Selon Cacciari *et al.* (2003), la tolérance des rhizobia à des concentrations de NaCl supérieur à 1,5 % (256,67 mM) est rare, même si certaines souches sont capables de croître en présence de 2 % (342,23 mM) de NaCl.

Les souches AKE1 et EA2 présentent une tolérance très importante avec une croissance observée même à la concentration la plus élevée à savoir 1000 mM.

Les différences observées confirment que les espèces d'un même genre peuvent avoir une tolérance variable au stress salin (Ventorino *et al.*, 2012).

La capacité de croissance des souches de rhizobiums indigènes sur des concentrations élevées en chlorure de sodium peut leur donner une valeur concurrentielle dans la rhizosphère. Cela leur permettra de survivre et noduler des plantes hôtes dans des conditions environnementales difficiles et particulièrement à des concentrations élevées en sel dans le sol (Kenei *et al.*, 2010).

Lorsqu'elles sont exposées à des environnements salins, de nombreuses souches de rhizobiums répondent en accumulant de manière synchrone le potassium intracellulaire et le glutamate. La capacité de Rhizobium d'accumuler le K<sup>+</sup> en présence de niveaux élevés de Na<sup>+</sup>, est un mécanisme qui améliore la tolérance au sel (Le Redulier et Bernard, 1986).

## 1.2- Tolérance au KCl

Les résultats du test de tolérance au chlorure de potassium montrent que les différentes souches présentent une variation dans leur sensibilité (Tableau III).

Les souches EA2, AM11R, UE28 présentent la meilleure tolérance avec une croissance observée sur les différentes concentrations testées. La souche REF3 présente une tolérance modérée et se développe jusqu'à 300 mM de KCl. La souche EEK11R est la moins tolérante, elle est inhibée en présence de la plus faible concentration (100mM).

**Tableau III :** Variation de la tolérance au chlorure de potassium

Souches	EA 2	SM21 R	MC 2	EEK4 R	EEK11 R	EC6	AM11 R	UE2 8	AKE 1	REF3
Concentrations										
100	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
200	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
300	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
400	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
500	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-

### 1.3. Tolérance au MgSO<sub>4</sub>

Selon les résultats du tableau IV, montrent qu'à l'exception d'EC6 dont la croissance est inhibée à 500 Mm, toutes les souches testées présentent une croissance aux différentes concentrations en MgSO<sub>4</sub>.

**Tableau IV** : variation de la tolérance au sulfate de magnésium

Souches	EA2	SM21R	MC2	EEK4R	EEK11R	EC6	AM11R	UE28	AKE1	REF3
<b>Concentrations</b>										
<b>100</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>200</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>300</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>400</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>500</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Ces résultats sont comparables à ceux observés par Abdelmoumen *et al.* (1999) sur une souche de rhizobium isolée à partir de *Cytisus arboreus* qui montre une sensibilité au Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub> et K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mais qui montre une tolérance importante au MgSO<sub>4</sub>.

Selon Amara et Miller (1986), les ions magnésium sont moins inhibiteurs pour la croissance que les autres ions (Abdelmoumen *et al.*, 1999).

Elsheikh et Wood (1989) ont rapporté que la croissance des rhizobiums n'est pas affectée par 1 ou 1,5 % des différents sels comme : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, et le KCl, mais leur croissance est inhibée par tous ces sels à des concentrations allant de 2,5 à 3,5 %, excepté dans le cas du MgSO<sub>4</sub> et de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> où un développement a été remarqué à 3,5 % de concentration en sel. (Abdelmoumen *et al.*, 1999).

## 2- Résistance aux métaux lourds

Le test d'évaluation de la sensibilité aux sels métalliques montre des comportements différents *vis-à-vis* des différentes concentrations testées.

Dans le cas du cuivre (tableau V), on remarque une forte sensibilité chez la plus part des souches. Toutefois, il y a lieu de signaler une forte tolérance chez la souche AKE1 à toutes les concentrations testées. La souche EA2 présente une tolérance moyenne, elle se développe jusqu'à 400 mM tandis que les souches EC6 et AM11R ne tolèrent que 100 mM de cuivre.

**Tableau V :** Variation de la tolérance au cuivre

Souches Concentrations	EA 2	SM21 R	MC 2	EEK4 R	EEK11 R	EC 6	AM11 R	UE 28	AKE 1	REF 3
100	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
200	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
300	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
400	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
600	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
700	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
800	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

La tolérance des souches au zinc apparaît plus ou moins variable (tableau VI). Parmi les souches testées, six présentent une sensibilité à de faibles concentrations, leur croissance est inhibée en présence de concentrations dépassant 100 µg/ml, les souches SM21R, REF3 et EA2 tolèrent des concentrations de l'ordre de 200, 300 et 400 µg/ml. Seule la souche AKE1 tolère des concentrations en zinc allant jusqu'à 800 µg/ml.

**Tableau VI :** Variation de la tolérance au zinc

Souches Concentrations	E A2	SM21 R	M C2	EEK4 R	EEK11 R	EC 6	AM11 R	UE2 8	AK E1	REF 3
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
200	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
300	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
400	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
600	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
800	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Le test de tolérance au mercure montre une inhibition de la croissance chez la plupart des souches à partir de 15 µg/ml (tableau VII). Toutefois, on constate que la souche AKE1 n'est inhibée par aucune des concentrations testées.

**Tableau VII :** Variation de la tolérance au mercure

Souches	E A2	SM21 R	M C2	EEK4 R	EEK11 R	E C6	AM11 R	UE 28	AKE 1	RE F3
<b>5</b>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<b>10</b>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
<b>15</b>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<b>20</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>25</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>30</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>35</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>40</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Les résultats représentés dans le tableau (VIII) résument la tolérance des souches au plomb. On constate que toutes les souches se développent à 800 µg/ml. Les souches EA2, SM21R, MC2 et REF3 tolèrent quant à elles des concentrations allant jusqu'à 1200 µg/ml. Seule la souche AKE1 présente une croissance sur les différentes concentrations testées.

**Tableau VIII :** Variation de la tolérance au plomb

Souches	EA 2	SM21 R	M C2	EEK4 R	EEK11 R	E C6	AM11 R	UE2 8	AKE 1	REF 3
<b>400</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>800</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>1200</b>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<b>1600</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>2000</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>2400</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>2800</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>3200</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

La croissance des différentes souches sur milieu additionné au cadmium est très affectée puisque la plupart des souches sont inhibées en présence de 12,5 µg/ml. Cependant, les deux souches (EA2 et AKE1) font la différence en tolérant des concentrations élevées (87,5 et 125 µg/ml respectivement) (tableau IX).

**Tableau IX :** Variation de la tolérance au cadmium

Souches	EA 2	SM2 1R	M C2	EEK4 R	EEK1 1R	EC 6	AM1 1R	UE 28	AK E1	RE F3
12,5	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
25	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
37,5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
50	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
62,5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
75	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
87,5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
112,5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
125	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

### 2.1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats de tolérance aux sels métalliques nous ont permis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (tableau X). Celles-ci varient de 100 à 800 µg/ml pour le cuivre et le zinc, de 5 à 40 µg/ml pour le mercure, de 1200 à 3200 µg/ml pour le plomb et de 12,5 à 125 µg/ml pour le cadmium. Les concentrations minimales inhibitrices les plus élevées sont observées chez la souche AKE1 avec l'ensemble des sels métalliques testés.

**Tableau X :** Concentrations minimales inhibitrices

Souches	EA 2	SM21 R	MC2	EEK4 R	EEK11 R	EC6	AM11 R	UE2 8	AKE 1	REF 3
<b>Cu</b>	500	<100	<100	<100	<100	200	200	<100	>800	<100
<b>Zn</b>	500	300	200	200	200	200	200	200	>800	400
<b>Hg</b>	25	20	15	10	15	<5	<5	20	>40	15
<b>Pb</b>	1600	1600	1600	1200	1200	1200	1200	1200	>3200	1600
<b>Cd</b>	100	<12,5	<12,5	25	25	<12,5	<12,5	<12,5	>125	<12,5

Une large résistance à divers métaux a été constatée (figure 02). Dans le cas du cuivre 60% des souches sont inhibées à la concentration 100 µg/ml, ces souches sont donc plus sensibles que la souche *Bradyrhizobium sp. 750* isolée par Darya et al. (2010). Une seule souche présente une concentration minimale inhibitrice supérieure à 800 µg/ml, et donc

résiste à des concentrations plus fortes que la souche *Pseudomonas sp. AZ13* isolée par Darya et al. (2010).

Les souches *Rhizobium sp.*, avec un taux de résistance de 100% à la concentration 100 µg/ml et 10% à partir de la concentration 500 µg/ml de cuivre, se montrent plus tolérantes que celle isolée par Cevheri et al. (2011) à partir de *Vicia palaestina* avec un taux de résistance de 100% à la concentration 16,34 µg/ml et 100% d'inhibition à 130 µg/ml.

Selon Cevheri et al. (2011), la résistance au cuivre peut résulter d'une séquestration. Le gène codant pour l'utilisation du cuivre dans le métabolisme se trouve dans le chromosome, tandis que celui de la résistance se trouve dans des plasmides. Cependant, l'implication des gènes chromosomiques dans la résistance au cuivre a été démontrée chez des bactéries Gram négatives.

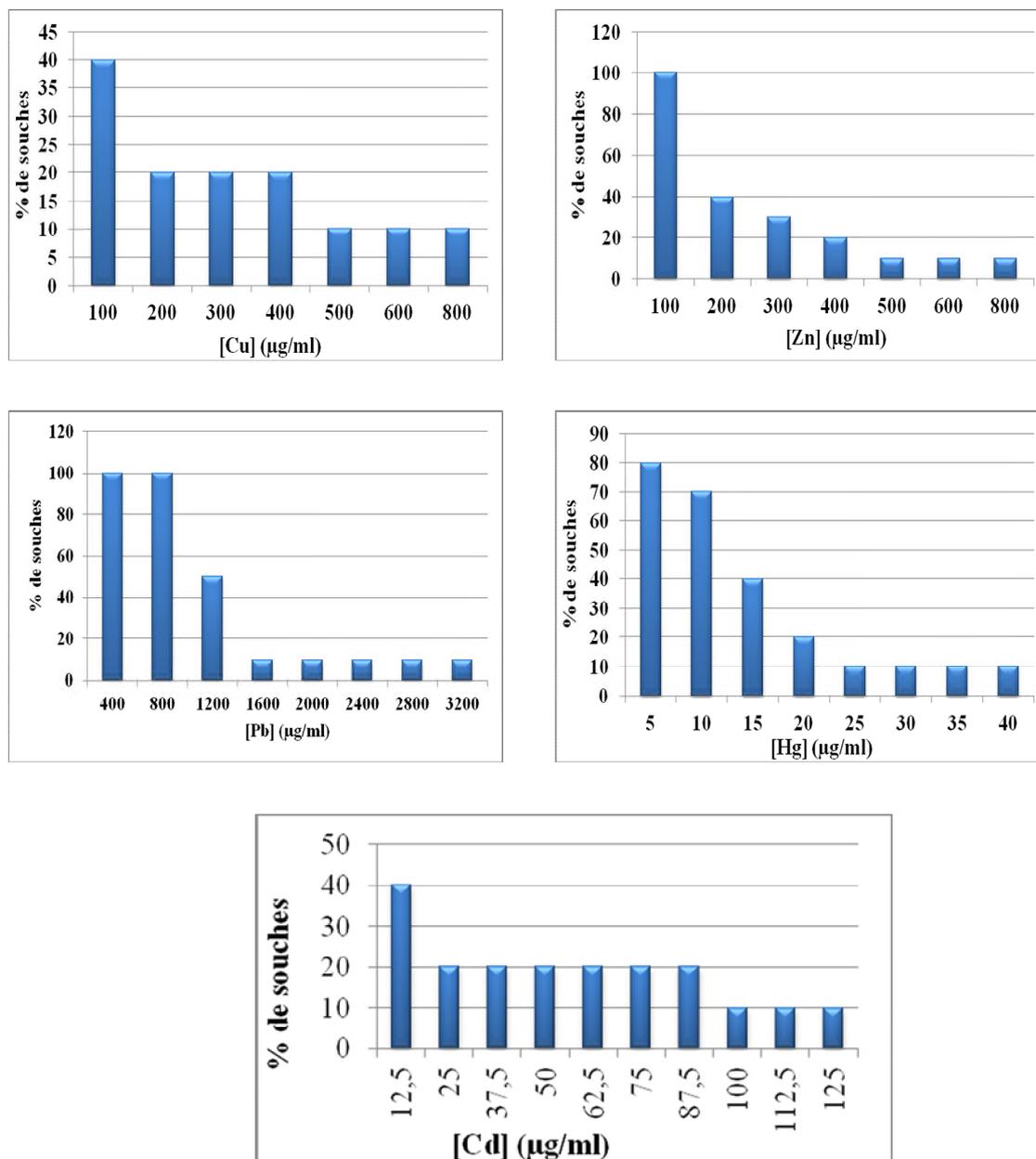
Le taux de résistance dans le cas du plomb est de 100% à 800 µg/ml, ce taux est supérieur à celui trouvé par Carrasco et al., (2005). Au-delà de la concentration 1200 mM, seule la souche AKE1 montre une résistance allant jusqu'à 3200 mM, et tolère ainsi la présence de concentrations supérieures à celles tolérées par la souche *Ochrobactrum cytisi Azn6-2* isolée par Darya et al. (2010).

Selon Carrasco et al. (2005), la plus grande partie de l'arsenic et du plomb est adsorbée à la surface de la cellule de *Sinorhizobium meliloti Alf 12*, mais il y a aussi 20% du plomb total accumulé à l'intérieur de celle-ci.

Dans le cas du mercure un taux d'inhibition de 20% pour une concentration de 5µg/ml est observé. 90% d'inhibition sont enregistrés pour toute concentration dépassant 25µg/ml. Les souches de *Rhizobium sp.* sont plus résistantes que les souches isolées par Pereira et al. (2006) qui sont inhibées à 2 µg/ml de mercure.

Les résultats du test de résistance au cadmium sont illustrés dans la figure (06). 60% des souches sont inhibées à 12,5 µg/ml, ce taux atteint 80% à une concentration de 25 µg/ml et 90% à 100 µg/ml. Ce taux reste inférieur en comparaison à celui obtenu par Cevheri et al. (2011), sur des souches isolées à partir de *Vicia palaestina* où un taux d'inhibition de 100% est obtenu à une concentration de 28,125 µg/ml.

Selon El-Aziz et al. (1992), les métaux sont éliminés par appariement d'ions, précipitation et sorption sur les surfaces des colloïdes. Les métaux qui ont été précipités ou chélatés ne sont pas actifs dans la solution du sol et n'ont donc aucun effet sur les plantes ou sur les microorganismes.



**Figure 02 :** Pourcentages de résistance des souches à différentes concentrations en sels métalliques

## 2.2- Détermination des profils de résistance

Les profils de résistance déterminés à partir des résultats du test de tolérance aux sels métalliques sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau XI). Les souches de *Rhizobium sp.* étudiées montrent divers profils. La plupart des souches montrent une double résistance au zinc et au plomb, trois souches (EA2, EC6 et AM11R) présentent une triple résistance (Zn, Cu et Pb). La souche AKE1 présente une résistance aux cinq métaux testés.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Giller et *al.* (1998), les microorganismes, et même les souches de la même espèce, ainsi que les activités de ces mêmes espèces peuvent présenter des différences considérables dans leur sensibilité à la toxicité des métaux lourds.

**Tableau XI** : Résistance des souches aux métaux lourds

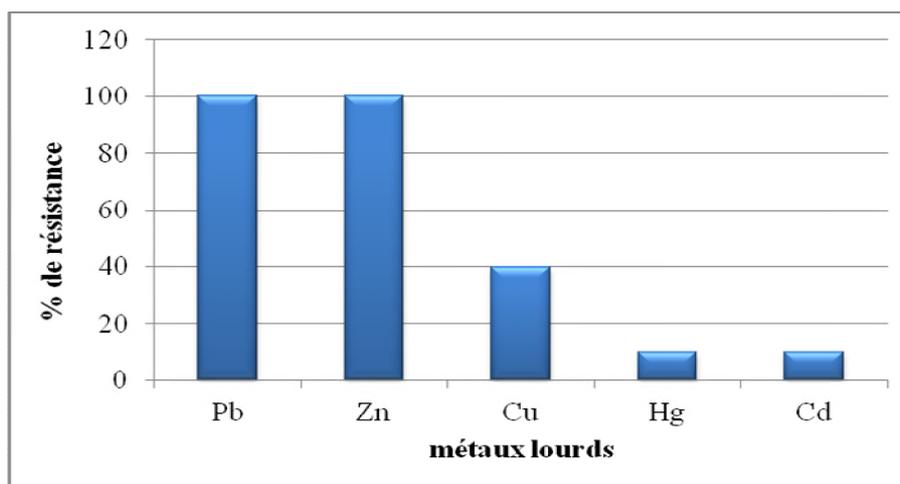
Souches	EA 2	SM21 R	MC 2	EEK4 R	EEK11 R	EC 6	AM11 R	UE2 8	AKE 1	REF 3
<b>Métal</b>										
<b>Cu</b>	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S
<b>Zn</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Hg</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<b>Pb</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Cd</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

R : résistance

S : sensibilité

La figure 03 représente les taux de résistances des souches de *Rhizobium sp.* aux différents métaux. On constate que le taux de résistance le plus élevé (100%) est observé dans le cas du zinc et du plomb, et le plus faible taux de résistance est enregistré en présence de cadmium et mercure avec seulement 10% de souches résistantes. Le taux de résistance au cuivre est de 40%.

Les résultats concernant le zinc et le plomb sont en accord avec ceux observés sur des isolats de *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* par Pareira et *al.* (2006) et ceux observés sur des souches isolées à partir de *Alyssum murale* par Abou-Shanab et *al.* (2007). Par contre, les taux de résistance aux autres sels métalliques sont inférieurs.



**Figure 03 :** Taux de résistance aux métaux lourds

### 3- Effet de la salinité sur la symbiose *Rhizobium sp.* / *Vicia faba*

Après 30 jours de culture sur milieu Jensen on constate qu'en absence du NaCl, la plupart des plantes présentent un développement comparable. Les plantes inoculées avec la souche MC2 présentent la hauteur la plus élevée (environ 65cm) (figure 04).

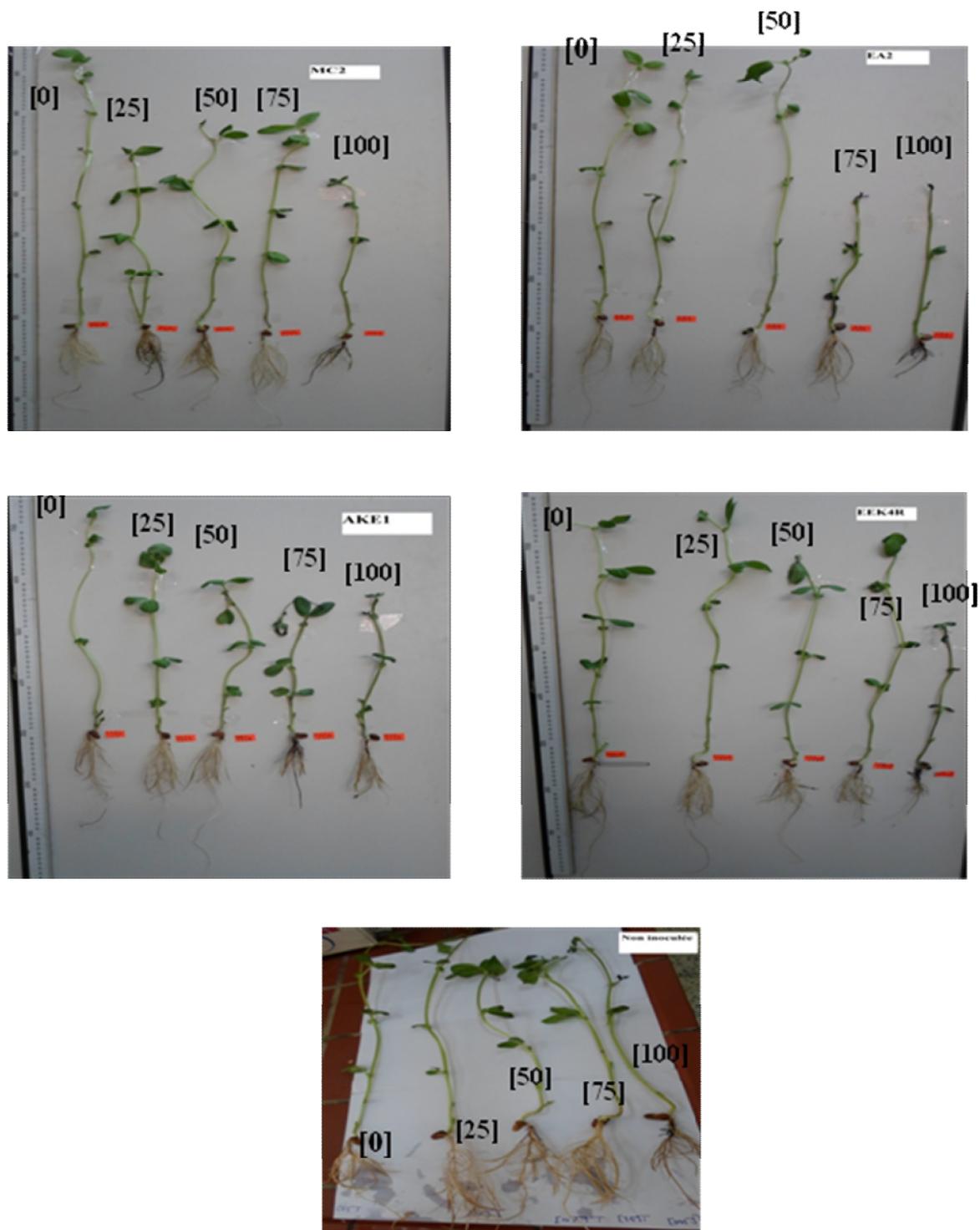
En présence de 25mM en NaCl, on constate que les plantes inoculées avec les souches EEK4R et EA2 gardent la même longueur tandis qu'une diminution est constatée chez les plantes inoculées avec les souches AKE1 et MC2. A 50mM, seule la croissance de la plante inoculée avec EEK4R est affectée, les plantes inoculées avec les autres souches présentent un développement comparable à celui observé en présence du NaCl à 25mM. A 75mM, le développement des plantes inoculées avec les souches EEK4R, MC2 et AKE1 est comparable à celui obtenu à 50mM tandis que celui de la souche EA2 est très affecté.

En présence de 100mM en NaCl, toutes les plantes sont affectées quelque soit la souche avec laquelle elles sont inoculées. Cette diminution est, selon Benmahioul et *al.*, (2009), le résultat d'une baisse du nombre de divisions cellulaires lors du stress abiotique (stress salin et hydrique).

L'effet du sel est moins agressif sur les parties racinaires comparées aux parties aériennes et on remarque un développement comparable aux concentrations allant de 0 à 75mM avec toutes les souches. Seules les racines des plantes inoculées avec AKE1 ne sont pas affectées.

Selon Benmahioul et *al.*, (2009), le sel provoque la réduction des poids frais et sec des parties aériennes alors qu'il améliore ceux des racines. La réduction de croissance de l'appareil végétatif aérien est une capacité adaptative nécessaire à la survie des plantes exposées à un stress abiotique. Ce retard de développement permet à la plante d'accumuler de l'énergie et des ressources pour combattre le stress, avant que le déséquilibre entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme n'augmente jusqu'à un seuil où les dommages sont irréversibles. Les plantes protègent donc leurs organes aériens contre l'invasion des ions toxiques ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) par une rétention de ceux-ci dans les racines.

Selon Grover et *al.* (2010) la production d'acide indole acétique et de gibbérellines entraîne une augmentation de la longueur des racines, de la surface de la racine et le nombre de pointes des racines. Ceci conduit à une meilleure absorption des nutriments améliorant ainsi la santé des plantes dans des conditions de stress.



**Figure 04** : Effet du NaCl sur la symbiose *Rhizobium sp.*- *Vicia faba*

### 3.1- Effet du NaCl sur le poids frais de la partie aérienne

La figure (05) montre une différence de poids entre les plantes non traitées avec du NaCl inoculées et non inoculées. L'inoculation des plantes avec les souches de *Rhizobium sp.*

a permis une amélioration de la production du poids frais de la partie aérienne chez toutes les plantes inoculées par rapport à celles non inoculées. Le même résultat est enregistré en présence du sel à une concentration de 25mM. Un maximum de production est atteint à cette concentration chez toutes les plantes inoculées sauf dans le cas de la souche EA2 où une légère baisse de production est observée.

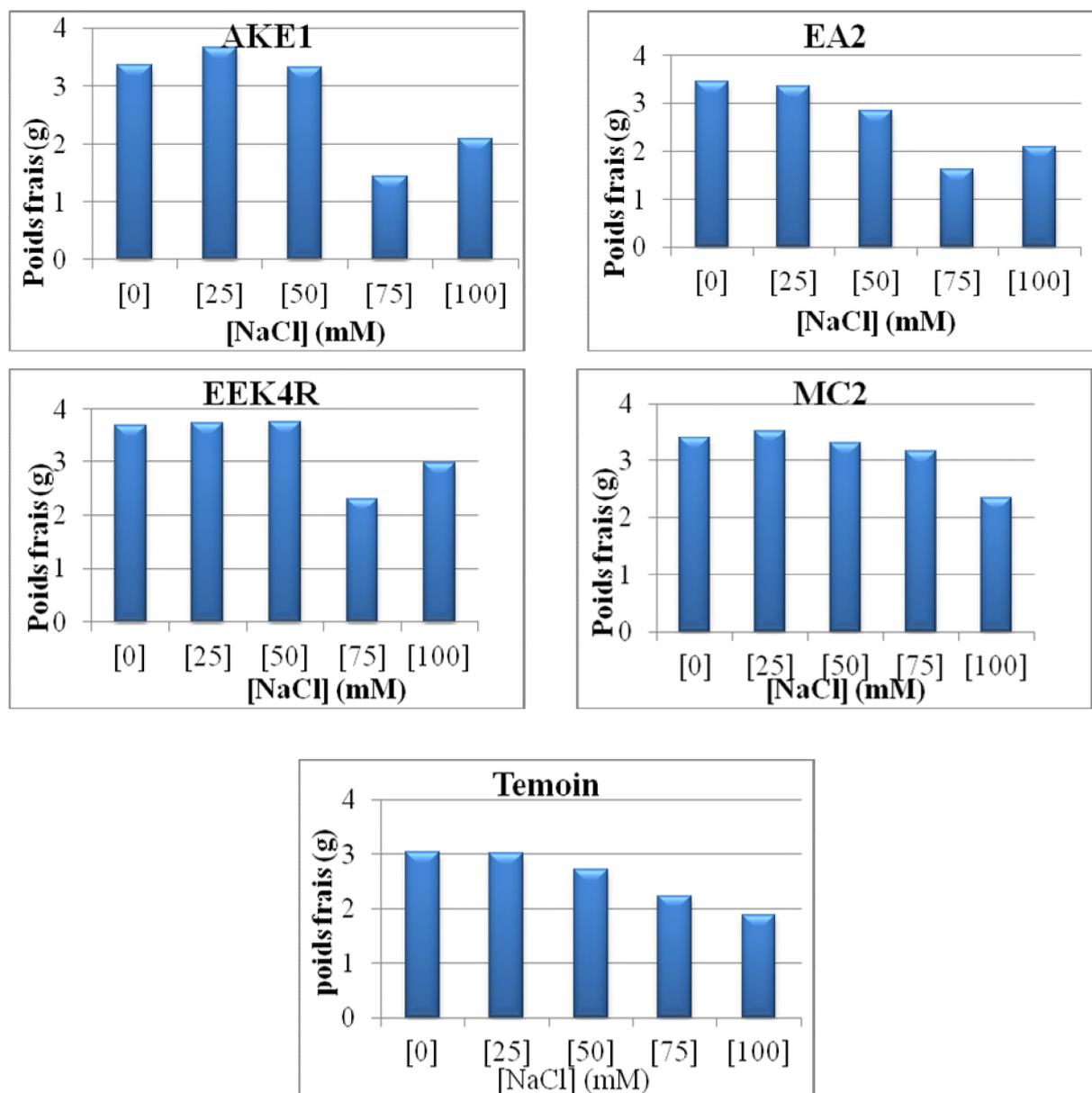
La présence de 50 mM en NaCl conduit à une baisse du poids frais de la partie aérienne chez les plantes témoins et celles inoculées avec EA2 et AKE1. Toutefois, le niveau de la biomasse fraîche est maintenu chez les plantes inoculées avec MC2 et EEK4R.

Au-delà de cette concentration, et bien que la production soit plus importante que chez les plantes témoins, le poids frais de la partie aérienne est affecté chez toutes les plantes inoculées. Cependant, les plantes inoculées avec la souche MC2 et à une concentration de 75mM l'exception en montrent une production aussi importante qu'aux faibles concentrations.

En comparaison avec les plantes non inoculées, trois souches permettent une amélioration remarquable de la production de la biomasse à 25 mM et à 50 mM.

Chez *Vicia faba*, la salinité affecte la croissance de la partie aérienne plus que la partie racinaire (Cordovilla et al., 1999). La réduction de la croissance de la partie aérienne observée peut s'expliquer par des perturbations des taux de certains régulateurs de croissance, notamment l'acide abscissique et les cytokinines induites par le sel (Benmahioul et al., 2009).

Bouhamouch et al. (2005), ont relié cette diminution de la biomasse à l'absence de la fixation d'azote chez les légumineuses. D'autres hypothèses ont été avancées pour expliquer cet effet négatif, il s'agit du faible approvisionnement en photosynthétat pour les nodules, une diminution de la fourniture de substrats respiratoires pour les bactéroïdes et des modifications dans la barrière de diffusion d'oxygène.



**Figure 05 :** Variation du poids frais des plantes inoculées et témoins en fonction des concentrations en NaCl

L'analyse de la variance du poids frais de la partie aérienne montre une différence non significative pour les différentes souches et à toutes les concentrations (tableau XII).

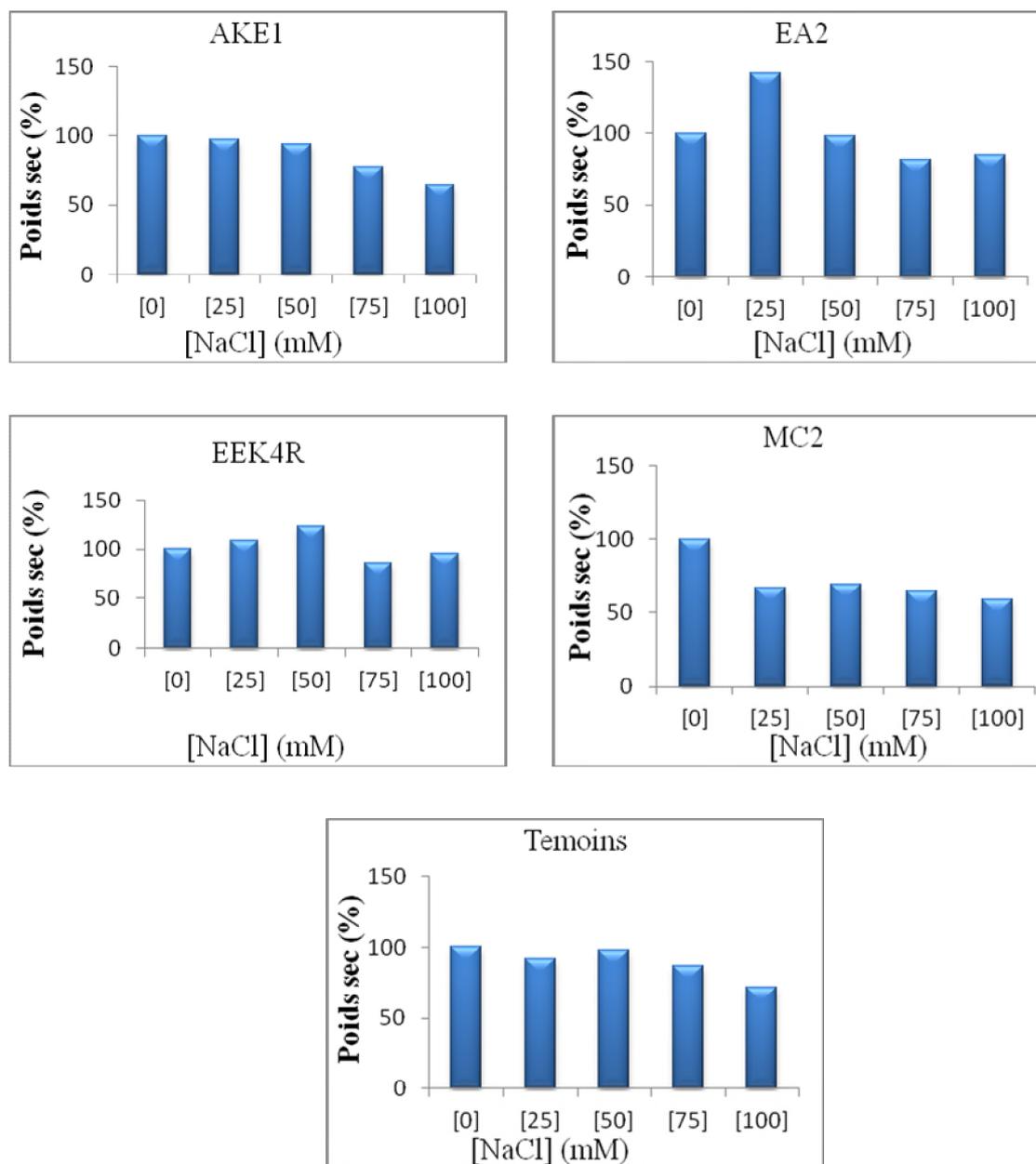
**Tableau XII** : Analyse de la variation du poids frais de la partie aérienne en fonction des concentrations en NaCl

<b>Pf</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
<b>F</b>	1,2428465	3,05227148	0,62675417	2,31147763	0,97255856
<b>Pr&gt;r</b>	0,35657082	0,09195506	0,62028636	0,15275631	0,45776995

### 3.2- Effet du NaCl sur le poids sec de la partie aérienne

Selon Elsheikh (1998), le traitement salin agit sur la plante et conduit à une réduction dans la production de la matière sèche. Ainsi, on a constaté une réduction du poids sec de la partie aérienne en présence de forte concentration en NaCl. Celle-ci reste proportionnelle au poids frais de la même partie, sauf dans le cas des plantes inoculées avec MC2 où une réduction d'environ 40% est observée à partir de la concentration 25mM (figure 06).

Selon Tejera et *al.* (2004), l'effet du sel sur le poids sec des pousses est plus prononcé que sur le poids sec des racines, augmentant ainsi le ratio racine/tige.



**Figure 06 :** Variation du poids sec des plantes inoculées et témoins en fonction des concentrations en NaCl

L'analyse de la variance du poids sec de la partie aérienne, ne montre pas de différence entre les résultats obtenus pour toutes les souches et à toutes les concentration (tableau XIII).

**Tableau XIII** : Analyse de la variation du poids sec des parties aériennes en fonction des concentrations en NaCl

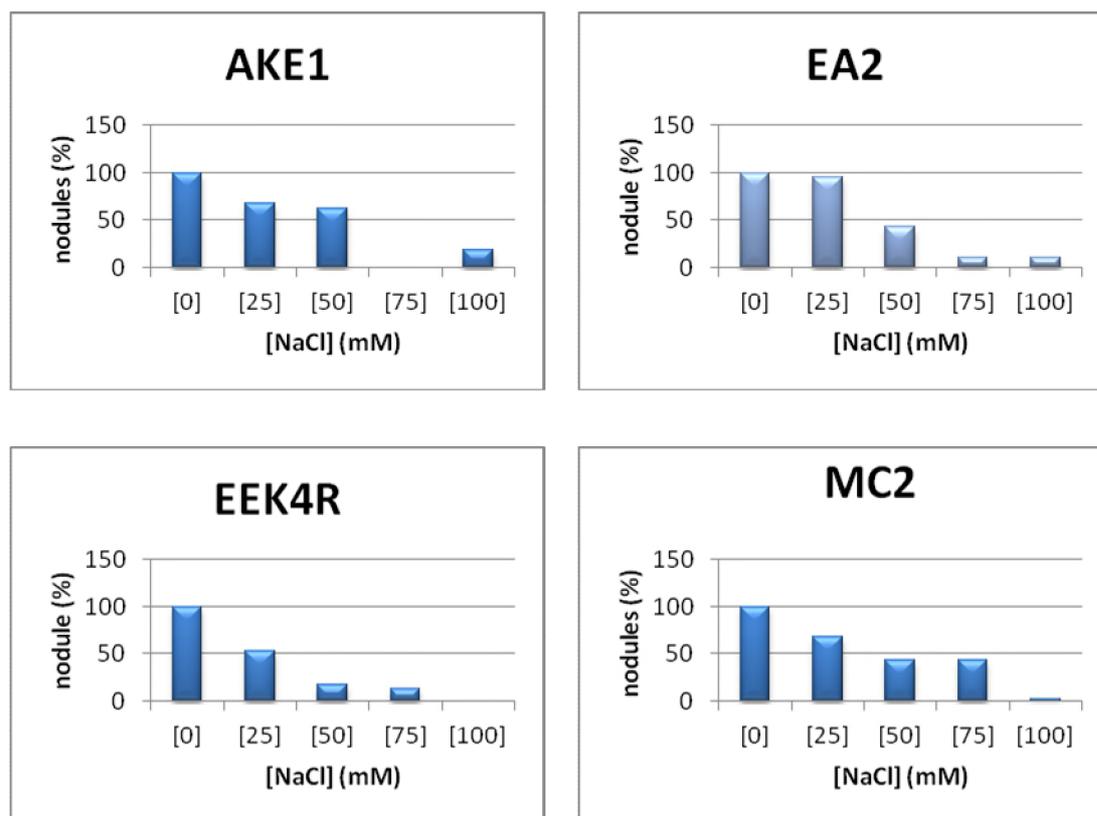
<b>Ps</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
<b>F</b>	3,425	0,797	0,684	0,364	0,763
<b>Pr&gt;r</b>	0,073	0,533	0,589	0,781	0,550

### 3.3- Effet du NaCl sur le nombre de nodules

La figure 07 représente la variation du nombre de nodules par souche et en fonction des concentrations en NaCl. La nodulation est observée chez toutes les plantes inoculées non traitées avec le sel, mais elle diminue d'environ 50% à la concentration 25mM chez les plantes inoculées avec les souches AKE1, EEK4R, MC2. Ce taux est atteint à 34,2 mM de NaCl chez le soja (Elsheikh et Wood, 1995). Seule la souche EA2 maintient le même taux de nodulation qu'en absence du NaCl. Le taux de nodule diminue à la concentration 50mM pour atteindre environ 25% chez les plantes inoculées avec les souches AKE1, EA2, et MC2. Les plantes inoculées avec MC2 maintiennent ce taux même à 75mM. Le taux de nodulation continue diminuer, pour atteindre à la concentration 100 mM des taux très bas et disparaître complètement chez les plantes inoculées avec la souche EEK4R.

L'étude de Singleton et Ben Bohlool (1983), montre que l'initiation de la formation des nodules est affectée par des concentrations en NaCl n'inhibant pas les rhizobiums, ni la colonisation des surfaces racinaires.

Dans notre étude, on a remarqué que le nombre de nodules formés sur les racines secondaires est plus important que sur la racine principale. Selon Predeepa et *al.* (2010), la formation de nodules sur la racine principale est considérée comme une caractéristique souhaitable que sur les racines secondaires, car les nodules formés sur les racines primaires sont plus efficaces.



**Figure 07 :** Variation du nombre de nodules des plantes inoculées en fonction des concentrations en NaCl

L'analyse de la variation présentée dans le tableau XIV montre une différence non significative entre le nombre de nodules obtenus pour les différentes souches et à différentes concentrations.

**Tableau XIV :** Analyse de la variation du nombre de nodules en fonction des concentrations en NaCl

Ps	0	25	50	75	100
F	0,2848883	1,27437642	0,39083879	0,58518519	0,64268585
Pr>r	0,83510108	0,3470333	0,76299203	0,64141673	0,6088315

A la concentration 0mM, le test de corrélation entre les différents paramètres montre une corrélation significative entre la production de la matière fraîche et le nombre de nodules (tableau XV).

**Tableau XV :** Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 0 mM

variables	Pf	Ps	Nombre de nodules
Pf	1		
Ps	-0,20	1	
Nombre de nodules	<b>0,84</b>	-0,55	1

Le tableau XVI représente les résultats du test de corrélation pour les différents paramètres à la concentration 25 mM. On remarque une corrélation entre le poids sec et le nombre de nodules.

**Tableau XVI:** Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 25 mM

variables	Pf	Ps	Nombre de nodules
Pf	1		
Ps	-0,73	1	
Nombre de nodules	-0,25	<b>0,82</b>	1

A la concentration 50mM, les résultats du test de corrélation montrent une corrélation entre le poids frais et le poids sec de la partie aérienne (tableau XVII).

**Tableau XVII :** Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 50 mM

	<i>Pf</i>	<i>Ps</i>	Nombre de nodules
Pf	1		
Ps	<b>0,95</b>	1	
Nombre de nodules	-0,26	-0,49	1

Le test de corrélation dans le cas des traitements à 75 mM montre une corrélation entre les différents paramètres (tableau XVIII).

**Tableau XVIII :** Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 75 mM

	<i>Pf</i>	<i>Ps</i>	Nombre de nodules
Pf	1		
Ps	<b>0,88</b>	1	
Nombre de nodules	<b>0,98</b>	<b>0,79</b>	1

A la concentration 100mM, les résultats du test de corrélation résumés dans le tableau XIX., montrent une corrélation entre le poids frais et le poids sec de la partie aérienne.

**Tableau XIX :** Test de corrélation entre les différents paramètres à la concentration 100 mM

	<i>Pf</i>	<i>Ps</i>	Nombre de nodules
Pf	1		
Ps	<b>0,90</b>	1	
Nombre de nodules	-0,75	-0,96	1

*Conclusion*

*et*

*Perspectives*

## VI- Conclusion et Perspectives

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'effet de la désertification et des stressés abiotiques sur les populations de rhizobiums visant à la sélection de souches tolérantes et leur utilisation pour la réhabilitation des zones affectées. On s'est proposé d'évaluer la sensibilité de dix souches de *Rhizobium sp.* aux sels métalliques et aux sels minéraux, mais aussi, celle de l'interaction symbiotique *Rhizobium sp.* / *Vicia faba* au NaCl.

L'évaluation de la sensibilité aux sels minéraux a permis de mettre en évidence une grande diversité de réponses. Chez toutes les souches, une tolérance jusqu'à 500 mM est obtenue pour le KCl et le MgSO<sub>4</sub>. Cependant, une différence importante a été enregistrée pour le NaCl où seules quatre souches (AKE1, EA2, MC2, EEK4R) ont pu croître à des concentrations de l'ordre de 800 mM pour MC2 et EEK4R, et 1000 mM pour la souche AKE1.

La sensibilité des dix souches aux sels métalliques révèle une large diversité. La plus grande tolérance est enregistrée pour le zinc et le plomb aux quels les dix souches se sont montrées résistantes. La résistance est moindre pour le cuivre où seules quatre souches ont montré une résistance *vis-à-vis* de la présence du métal. Il s'agit de EC6, AM11R, EA2 et AKE1. Le taux de tolérance le plus faible est obtenu pour le mercure et cadmium où seule la souche AKE1 montre une résistance même à des concentrations très élevées.

Les plantes *Vicia faba* inoculées avec les quatre souches retenues pour leur tolérance aux concentrations élevées en NaCl, montrent une sensibilité à l'augmentation de ces concentrations dans le milieu. Ce sel affecte la plante en diminuant la longueur de la tige et le feuillage, et en favorisant le développement de la partie racinaire. La réduction de la croissance de la partie aérienne est une capacité adaptative nécessaire à la survie des plantes exposées à un stress abiotique. Ce retard de développement permet à la plante d'accumuler de l'énergie pour faire face au stress. Ainsi, le bon développement des racines permet une meilleure absorption des nutriments et la recherche de l'eau pour préserver l'équilibre osmotique chez la plante.

Une amélioration de la production du poids frais de la partie aérienne chez toutes les plantes inoculées par rapport à celles non inoculées en absence de sel. Trois quarts des souches permettent une amélioration remarquable de la production à la concentration 25mM

et à 50mM, et allant jusqu'aux concentrations les plus élevées (75mM et 100mM) mais avec des degrés moins importants.

Pour ce qui est du nombre de nodules, une diminution d'environ 50% à la concentration 25mM été remarquée chez les plantes inoculées avec les souches AKE1, EEK4R et MC2. Seule la souche EA2 maintient le même taux de nodulation qu'en absence du NaCl, ceci pourrait être dû à l'effet du sel sur le processus d'initiation de la nodulation, qui est un événement très sensible au stress.

En perspectives, il est souhaitable de compléter ce travail par d'autres tests comme :

- Evaluer une gamme plus large de sels et de leurs concentrations ;
- Détermination de l'activité nitrogénase et des profils protéiques et polysaccharidiques dans les conditions du stress salin ;
- L'évaluation de l'effet des sels métallique sur la symbiose *Rhizobium sp.* - *Vicia faba* ainsi que sur la plante ;
- Caractérisation des gènes impliqués dans la réponse et la tolérance, ce qui permettra d'évaluer leur utilisation potentiel dans l'assainissement des sols pollués ;
- Evaluation de la tolérance aux sels *in situ*.

*Références*

*Bibliographiques*

*A*

**Abd-Alla M.H., Morsy F.M., El-Enany A. E. et Ohyama T.** (2012). Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **67**: 48-55.

**Abdelmoumen H. Filali-Maltouf A. Neyra M. Belabed A et Messbah El Idrissi M.** (1999).effect of high salts concentration on the growth of rhizobia and responses to added osmotic. *Applied Microbiology*. **86**: 889-898.

**Abdel-Salam M. S., Ibrahim S. A., Abd-El-Halim M.M., Badawy F.M. et Abo-Abal S.E.M.** (2010). Phenotypic characterization of indigenous Egyptian Rhizobial strains for abiotic stresses performance. *Journal of American Science*. **6**: 498-503.

**Abou-Shanab R.A.I., van Berkum P. et Angle J.S.** Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. **68**: 360–367.

**Atkins P.W. et Shriver D.F.** (2001). *Chimie inorganique*. (ed). Boeck Supérieur. Paris. 788p.

*B*

**Baize D.** (1997). *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France)*. (ed). Quae. INRA, Paris. 408p.

**Baize D. et Tercé M.** (2002). *Point sur... les éléments traces métalliques dans les sols: approches fonctionnelles et spatiales*. (ed). Quae. Paris. 565p.

**Benmahioul B., Daguin F. et Kaid-Harche M.,** (2009). Effet du stress salin sur la germination et la croissance *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.). *C. R. Biologies*. **332** :752–758.

**Bouhmouch I., Bouchra S.M., Brhada F. et Aurag J.** (2005). Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *Journal of Plant Physiology*. **162**: 1103—1113

C

**Cacciari I., Di Mattia E., Quatrini P., Moscatelli M.C., Grego S. Lippi D. et De Paolis M.R.** 2003. Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In : Un arbre au désert : *Acacia raddiana*. (ed). Le Floc'h E. Paris. 183-200.

**Carrasco J.A., Armario P., Pajuelo E, Burgos A., Caviedes M.A., Lopez R, Chamber M.A. et Palomares A.J.** 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology & Biochemistry*. **37**:1131–1140.

**Carter R.A., Worsley P.S., Sawers G., Challis G.L., Dilworth M.J., Carson K.C., Lawrence J.A., Wexler M., Johnston A.W. et Yeoman K.H.** (2002). The vbs genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: their expression in other genera requires ECF sigma factor RpoI. *Mol Microbiol*. **44**:1153-66.

**Cevheri C., Küçük Ç. et Çetin E.** (2011). Fungicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Vicia palaestina*. *African Journal of Biotechnology*. **10**: 2423-2429.

**Cheverry C, et Bourrié G.** (1998). La salinisation des sols *In sol interface fragile*.(ed). Quae. Paris. 109-128.

**Cordovilla M, Ligeró G. et Lluch C.** (1998). Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba L*). *Applied Soil Ecology*. **11**:1-7.

**Cordovilla M.D., Berrido S.I., Ligeró F. Et Lluch C.** (1999). *Rhizobium* Strain Effects on the Growth and Nitrogen Assimilation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* Plant Growth under Salt Stress. *J Plant Physiol WJL*. **154**: 127-13.

**Corticeiro C.S, Gusmao Lima A.I. et Figueira E.M.A.P.** (2006). Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**: 763–76.

**D**

**Darya M., Chamber-Pérezb M.A., Palomaresa A.J. et Pajueloa E.** (2010). “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*. **177** : 323–330.

**Davet P.** (1997). La Vie microbienne du sol et production végétale. (ed). Quae. Paris. 383p.**Douaoui D. et Hartani H.** (2012). Impact de l’irrigation par les eaux souterraines sur la dégradation des sols de la plaine du Bas-Chéliff. 1557–1572.

**Duc G.** (1997). Faba bean ( *Vicia faba* L.). *Field crops research*. **53**: 99-109.

**E**

**El-Aziz R., Asgle J. S., et Chaney R. L.** (1992). Metal tolerance of *Rhizobium Meliloti* Isolated from heavy-metal Contaminated Soils. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 795-798.

**Elsheikh E.A.E.** (1998) Response of Legume-Rhizobium symbiosis to salinity in the Sudan. *U.K.J. Agric. Sci.* **6**: 142-156.

**Elsheikh E.A.E. et Wood M.** (1989). 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. et Wood M.** (1990). Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. *Soil Biol Biochem.* **22**: 343-347.

**Elsheikh, E.A.E. et Wood M.** (1995) Nodulation and nitrogen fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**, 657-661.

**F**

**Feng S., Yang Z., Liu S. et Zheng D.** (2006). Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences*. **18**: 1135-1114.

*G*

**García-Delgado M., Rodríguez-Cruz M.S., Lorenzo L.F., Arienzo M., Sánchez-Graham P.H. et Vance C.P.** (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Applied Soil Ecology*. **41**: 277–285.

**Giller K.E., Witter E. et McGrath S.P.** (1998). Toxicity Of Heavy Metals To Microorganisms And Microbial Processes in Agricultural Soils. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1389-1414.

**Grover M., Ali S.Z., Sandhya V., Rasul A. et Venkateswarlu B.** (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **27**: 1231-1240.

*H*

**Hartwig U.A.** (1998). The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. **1**: 92–120.

**Hopkins W.G.** (2003) *Physiologie Végétale*. (ed). De Boeck Supérieur. Paris. 532p.

*K*

**Kabata-Pendias A.** (2004). Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma*. **122**: 143–149.

**Keneni K., Assefa F. et Prabul C.J.** (2010). Characterization of Acid and Salt Tolerant Rhizobial Strains Isolated from Faba Bean Fields of Wollo, Northern Ethiopia. *J. Agr. Sci. Tech.* **12**: 365-376.

*L*

**Le Rudulier D. et Bernard T.** (1986). Salt tolerance in Rhizobium: a possible role of betaines. *FEMS Microbiology*. **39**, 67-72

*M*

**Melquiot P.** (2003). Mille et un mots et abréviations de l'environnement et du développement durable. (ed). Librairie de l'environnement. Paris. 190p.

**Monchy S.** (2007). Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans CH34*. Thèse de doctorat. Université de Bruxelles. 98p.

**Mouni L., Merabet D., Robert D. et Bouzaza A.** (2009). Batch studies for the investigation of the sorption of the heavy metals  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  onto Amizour soil (Algeria). *Geoderm*, **154** : 30–35.

*N*

**Nabti. E.** (2008). Restauration de la croissance de *Azospirillum brasilens* et de blé dure et leur osmoprotection par *Ulva lactuca*. Thèse de Doctorat en sciences biologiques. Université Abderhmane Mira de Béjaia. 147p.

**Nonnoi F., Chinnaswamy A., García de la Torre V.S., Coba de la Pena T., Lucas M. et Pueyo J.J.** (2012). Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*. **61**: 49– 59.

*O*

**Owojori O.J., Reinecke A.J. et Rozanov A.B.** (2009). The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology*. **41**: 277 – 285.

*P*

**Pajuelo E., Rodríguez-Llorente I.D., Lafuente A. et Caviedes M.Á.** (2011). Legume–*Rhizobium* Symbioses as a Tool for Bioremediation of Heavy Metal Polluted Soils. *In: Biomangement of Metal-Contaminated Soils. Environmental Pollution*. **20**: 409-438.

**Pereira A.S.I., Gusmao Lima A.I. et Figueira E.M.A.P.** (2006). Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* isolated from soils subjected to different sources of

heavy-metal contamination: Effects on protein expression. *Applied Soil Ecology*. **33**: 286–293.

**Predeepa R.J. et Ravindran D.A.** (2010). Nodule formation, distribution and symbiotic efficacy of *Vigna unguiculata* L. under different soil salinity regimes. *Emir. J. Food Agricultur.* **22**: 275-284.

**Pulles T., Van Der Gon D.H., Appelman W. et Verheul M.** (2012). Emission factors for heavy metals from diesel and petrol used in European vehicles. *Atmospheric Environment*. **61**: 641-651.

*R*

**Remon E.** (2006) .Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse de doctorat en biologie végétale. Université Jean Monnet. Saint-Etienne. 166p.

**Robinson B., Russell C., Hedley M., Clothier B.** (2001). Cadmium adsorption by Rhizobacteria: implications for New Zealand pastureland. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **87**, 315–321.

*S*

**Singleton P.W. et Ben Bohlool B.** (1984). Effect of Salinity on Nodule Formation by Soybean. *Plant Physiol.* **74**: 72–76.

**Slaveykova V.I., Parthasarathy N., Dedieu K. et Toescher D.** (2010). Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Environmental Pollution*. **158** : 2561-2565.

*T*

**Tejera N.A., Campos R., Sanjuan J. et Lluch C.** (2004). Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *J. Plant Physiol.* **161**: 329–338.

V

**Ventorino V., Caputo R., De Pascale S., Fagnano M., Pepe O. et Moschetti G.** (2011). Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. *Annals of Microbiology*. **62**: 811-823.

**Vriezen J.A.C., de Bruijn F.J. et Nüsslein K.** (2007). Responses of Rhizobia to Desiccation in Relation to Osmotic Stress, Oxygen, and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 3451–3459.

W

**Wani P.A. et Khan M.S.** (2010). *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 3262–3267.

**Wani P.A., Khan M.S. et Zaidi A.** (2007). Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium sp.* (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by green gram plants. *Chemosphere*. **70**: 36–45.

Y

**Yadav S.K.** (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*. **76**: 167–179.

Z

**Zahran H.H.** (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology*. **63**: 968–989.

**Zhuang X, Chen J, Shim H. et Bai Z.** (2007 sous presse). New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*. **33**: 406–413.

# *Annexes*

## Annexe

### Composition du milieu: Yeast Mannitol Agar (YMA)

Mannitol .....10

Extrait de levure .....0,4g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....0,5

MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0,2g

NaCl .....0,1g

Agar .....15g

H<sub>2</sub>O.....qsp 1000ml

Ajuster le pH à 6.8

### Composition du milieu: Yeast Mannitol Broth (YMB)

Mannitol .....5g

Extrait de levure .....0,4g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....0,5

MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0,2g

NaCl .....0,1g

H<sub>2</sub>O.....qsp 1000ml

Ajuster le pH à 6,8

**Composition du milieu Jensen**

CaHPO<sub>4</sub>/ 2H<sub>2</sub>O..... 1g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....0,2g

MgSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O.....0,2g

NaCl .....0,2g

Solution stock..... 1ml

FeCl<sub>3</sub>/6H<sub>2</sub>O.....0,1g

H<sub>2</sub>O..... qsp 1000ml

Ajuster le pH à 7

## Résumé

La salinité des sols réduit déjà, ou menace à court terme, une partie non négligeable des superficies cultivables du globe. Notre étude est essentiellement basée sur l'évaluation de la sensibilité de dix souches de *Rhizobium sp.* aux différentes concentrations en sels métalliques ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $3\text{CdSO}_4$  et  $\text{Pb}(\text{OOCH}_3)_2$ ) et en sels minéraux ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  et  $\text{MgSO}_4$ ). Les résultats ont montré une grande diversité de réponse et la souche AKE1 montre une multirésistance aux différents métaux testés. Pour évaluer l'effet de la salinité sur la symbiose *Rhizobium sp.* - légumineuses, des plantes de *Vicia faba* inoculées avec quatre souches, retenues pour leur tolérance aux concentrations élevées en  $\text{NaCl}$ . L'inoculation a permis une amélioration de la production du poids frais et sec de la partie aérienne. Et dans le cas des plantes inoculées avec les souches EA2 et AKE1, des nodules sont observés à 100mM.

**Mots clés :** salinité, symbiose, Rhizobium, *Vicia faba*, légumineuse, sels métalliques, sels minéraux.

## Summary

Salinity already reduced, or short-term threat, a significant proportion of arable land in the world. Our study is mainly based on the evaluation of the sensitivity of ten strains of *Rhizobium sp.* to different concentrations of metal salts ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $3\text{CdSO}_4$  and  $\text{Pb}(\text{OOCH}_3)_2$ ) and mineral salts ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  and  $\text{MgSO}_4$ ). The results showed a wide variety of response and the strain AKE1 shows resistance to various metals tested. To evaluate the effect of salinity on symbiotic *Rhizobium sp.* - legumes, *Vicia faba* plants inoculated with four strains selected for their tolerance to high concentrations of  $\text{NaCl}$ . Inoculation has improved the production of fresh and dry weight of the aerial part. And in the case of plants inoculated with the strains and EA2 AKE1, nodules were observed at 100 mM.

**Keywords:** salinity, symbiosis, Rhizobium, *Vicia faba*, leguminous, metal salt, mineral salt.