

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Science Biologique
Option : Microbiologie de l'environnement



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Effet du stress salin sur les bactéries
nodulant les légumineuses**

Présenté par :

Benhammouche Assia et Makdoud Samia

Soutenu le : **14 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mr. Ladjouzi R.	MAA	President
Mr. Belhadi D.	MAA	Encadreur
Mr. Bensaid K.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Tout d'abord, on remercie le bon Dieu de nous avoir accordé la santé, le courage et la force d'aller jusqu'au bout de notre travail.

Nous tenons également à remercier infiniment notre promoteur Mr BELHADJ D., pour l'honneur qu'il nous a fait, de nous avoir encadré ainsi pour les conseils, les orientations et le temps qu'il nous a consacré afin de réaliser ce travail, qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Nos profonds remerciements s'adressent aussi à Mr LADJOUZI pour l'honneur qu'il nous a fait de présider ce jury.

Nous adressons aussi nos plus vifs remerciements à Mr BENSALD d'avoir bien voulu s'intéresser à ce travail et d'accepter de l'examiner, nous sommes très honorés de sa présence dans ce jury.

Enfin nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés de près et de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

*J'ai le grand plaisir de dédier ce travail
A la lumière de ma vie, mes très chers parents
Qui ont attendu avec patience les fruits de leur bonne éducation pour toutes les
peines endurées, toutes les privations et les sacrifices consentis. Je ne les
remercierai jamais assez pour tous ce qu'ils m'ont fait.*

*A mes très chers frères : Rafik, Nassim, Fahim, Razik, Pour leur soutien moral
et leur sacrifice.*

*A la mémoire de mes grands-parents paternels et ma tante Karima que Dieu les
accueille dans son vaste paradis.*

A toute ma famille Benhammouche mes cousins et mes cousines.

*A mes grands parents maternels à qui je souhaite une longue vie et à toutes mes
tantes et mes oncles.*

*A mon mari Nabil ma source d'espoir, de générosité et de sacrifices. Il était
toujours là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec ses
précieux conseils.*

*A ma belle-famille surtout Vava Mohand et Yema Saliha merci d'être toujours à
mes cotés*

*A mes très chères copines de chambre : Syla, Lahna, Yasmina, Katia merci pour
les bons moments qu'on a passé ensemble.*

A mes amis : Zahira, Nawel, Tassadit, Rosa, Amal, Celia, Jugo,

A mon binôme et amie Samia et à toute sa famille.

Assia

Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédier ce travail

A la lumière de ma vie, mes très chers parents

A celle qui ma donné la vie, le symbole de tendresse ma mère la perle la plus chère La source de tous mes espoirs pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.

A mon père, La base de toute ma carrière, le plus cher qui existe sur terre, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

Que Dieu les garde et les protège.

A la mémoire de mon très cher frère Saïd que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

A mes très chers frères Mourad, Ouali, Aziz, qui m'ont toujours encouragé.

A mes très chères sœurs Rahima, Kahina, Wacila, Nabila et Thoria

A toute ma famille Makdoud mes cousins et mes cousines sans exception.

A ma grand-mère à qui je souhaite une longue vie et à toutes mes tantes et mes oncles

A toute les filles A36

A mes copines de chambre : Lynda, Asma, Sabrina, Samia, Belkïs

A tous mes amis : Zahira, Nawal, Tassadit, Kamy

A mon cher binôme et amie Assia et à toute sa famille

Samia

Liste des abréviations

Ca⁺² : Calcium

CaCl₂: chlorure de calcium

Cd : Cadmium

CMI : Concentration minimale inhibitrice

Cr : Chrome

Cu : Cuivre

Hg : Mercure

K⁺ : Potassium

KCl : Chlorure de potassium

Mg⁺² : Magnesium

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

Na⁺ : Sodium

NaCl : Chlorure de Sodium

NH₄⁺: Ions ammonium

Ni: Nickel

NO₃⁻ : Nitrate

Pb : Plomb

RLV: *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*

TG : Temps de génération

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol Broth

Zn: Zinc

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Effet du chlorure de sodium sur la croissance des souches de rhizobium	09
02	Effet du chlorure de potassium sur la croissance des souches de rhizobium	10
03	Effet du sulfate de magnésium sur la croissance des souches de rhizobium	11
04	Effet du chlorure de calcium sur la croissance des souches de rhizobium	12
05	Evolution de la croissance de la souche ES8 en présence des différents osmoprotecteurs	15
06	Evolution de la croissance de la souche EC3 en présence des différents osmoprotecteurs	15
07	Effet du mercure sur la croissance des souches de rhizobium	17
08	Effet du cadmium sur la croissance des souches de rhizobium	18
09	Effet du cuivre sur la croissance des souches de rhizobium	19
10	Effet du chrome sur la croissance des souches de rhizobium	21
11	Effet du zinc sur la croissance des souches de rhizobium	22
12	Effet du plomb sur la croissance des souches de rhizobium	23

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
I	Concentrations en ions de sels métalliques utilisées	6
II	Tolérance au chlorure de sodium	8
III	Tolérance au chlorure de potassium	9
IV	Tolérance au sulfate de magnésium	10
V	Tolérance au chlorure de calcium	11
VI	Concentrations minimales inhibitrices des différentes souches testées	12
VII	Effet des osmoprotecteurs sur le temps de génération des souches EC3 et ES8	16
VIII	Variation de la tolérance au mercure	17
IX	Variation de la tolérance au cadmium	18
X	Variation de la tolérance au cuivre	19
XI	Variation de la tolérance au chrome	20
XII	Variation de la tolérance au zinc	21
XIII	Variation de la tolérance au plomb	22
XIV	Concentrations minimales inhibitrices des différentes souches testées	23

Sommaire

Problématique	1
Matériel et méthodes	
I. Souches bactériennes	5
II. Revivification des souches	5
III. Evaluation de l'effet des sels minéraux sur les souches de rhizobium	5
IV. Etude de l'effet osmoprotecteur de certains composés sur la croissance des rhizobia	5
V. Etude de la sensibilité des rhizobiums aux métaux lourds	6
Résultats et discussions	
I. Détermination de la tolérance aux sels minéraux	8
I.1. Tolérance au NaCl	8
I.2. Tolérance au KCl	9
I.3. Tolérance au MgSO ₄	10
I.4. Tolérance au CaCl ₂	11
I.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	12
II. Effet des osmoprotecteurs sur la croissance des rhizobiums.....	14
III. Etude de la sensibilité des Rhizobium aux métaux lourds.....	17
III.1. Tolérance au mercure	17
III.2. Tolérance au cadmium	18
III.3. Tolérance au cuivre	19
III.4. Tolérance au chrome	20
III.5. Tolérance au zinc	21
III.6. Tolérance au plomb	22
III.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	23
Conclusion	26
Références bibliographiques	
Annexes	

Problématique

Problématique

L'azote est l'un des éléments les plus importants dans les processus biologiques (Chanway et al., 2014). Les organismes ont besoin d'azote car il rentre dans la composition des acides nucléiques, des enzymes et des protéines (Ahmad et al., 2012). La fixation biologique d'azote est le processus responsable de la transformation de l'azote atmosphérique en ammonium, qui est la forme assimilable par les plantes (Janczarek et al., 2015).

Environ 80% de l'azote fixé est issu de la symbiose entre les légumineuses et les différentes espèces des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Allorhizobium* (Mabrouk et Belhadj, 2012), mais la symbiose légumineuses- rhizobium est la plus importante source d'azote (Abd-Alla et al., 2014). Elle est une composante importante vu ses intérêts agronomiques, économiques et écologiques (Faghire, 2012). En effet, cette symbiose contribue à une nutrition azotée adéquate aux plantes et garantir une production convenable permettant ainsi aux agriculteurs d'épargner le coût des fertilisants chimiques et soulager l'environnement de leur pollution (Zahran et al., 2012). Cependant, ce processus naturel est affecté d'une part par les contraintes abiotiques telles que les variations de température, la sécheresse, le stress hydrique et la salinité qui réduisent son efficacité et d'autre part, par des contraintes biotiques causées par les microorganismes (bactéries, champignons) (Cacciari et al., 2003).

La salinisation des sols est un facteur limitatif majeur de la production agricole dans plusieurs pays méditerranéens (Kulkarni et al., 2000). Elle affecte environ 7% des terres du monde (Chrivastava et Kumar, 2015). L'Algérie, dont une grande partie des régions agricoles se caractérise par un climat aride et semi-aride, est touchée par le processus de salinité. Près de 3,2 millions d'hectares sont menacés de salinisation dans ce pays (Benmahioul et al., 2009).

Généralement, les rhizobiums sont plus tolérants à la salinité que leurs plantes hôtes (Abolhasani et al., 2010), mais ils montrent une variabilité considérable dans leur croissance et leur survie dans des conditions salines (Swaraj et Bishnoi, 1999).

La croissance de la majorité des rhizobiums est réduite ou inhibée quand la concentration en sel dans l'environnement racinaire s'élève au-dessus de 100 mM de NaCl (Zahran, 1999). Cependant, il existe des souches très tolérantes au NaCl, comme *Sinorhizobium meliloti* qui peut croître à des concentrations variant de 300 à 700 mM. (Lebrazi et Benbrahim, 2014).

Dans les conditions optimales, les plantes maintiennent un haut ratio cytosolique K^+/Na^+ . Le stress salin entraîne la diminution de ce ratio (Bulut et Akinci, 2010), du fait que les ions Na^+ sont en concurrence avec les ions K^+ (Hasanuzzaman et al., 2013). De même, une forte concentration de potassium augmente le potentiel osmotique qui entraîne une entrée d'eau à partir du milieu extérieur. Le prélèvement de K^+ est essentiel pour la turgescence cellulaire et le déroulement des processus biochimiques sous stress salin (Farissi et al., 2014).

La salinité affecte la multiplication et la survie des rhizobiums dans le sol et la rhizosphère (Alexander, 1984), inhibe le processus d'établissement de l'infection rhizobienne, entraînant une diminution du nombre de nodule, réduit leur contenu en leghémoglobine (Delgado et al., 1994), diminue l'activité de la nitrogénase (Bolanos et al., 2006), modifie le statut ionique (Serraj et al., 1998) et inhibe la fixation d'azote, ce qui est due principalement à la diminution de la diffusion d' O_2 dans les nodules (L'taief et al., 2007).

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobium indirectement, en réduisant la croissance de la plante hôte et en affectant certains de ses processus physiologiques (Zahran, 1999) ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules (Delgado et al., 1994). Il affecte sévèrement le métabolisme azoté et la synthèse protéique, il en résulte un développement anormal des plantes et une diminution du rendement (Pessarakli et al., 1989).

Le stress salin engendre un déséquilibre de la nutrition minérale de la plante qui résulte d'une perturbation de l'absorption et du transport des éléments essentiels (Hasanuzzaman et al., 2013). En général, la présence du NaCl dans le milieu de culture inhibe l'absorption des ions K^+ , Ca^{2+} , Pi , NO_3^- , NH_4^+ et renforce celle des ions salins, Na^+ et Cl^- qui s'accumulent jusqu'à devenir toxiques pour la plante (Farissi et al., 2014).

Dominguez-Ferreras et al., (2006), ont rapporté que plusieurs activités physiologiques et biologiques sont inhibées, d'autres sont stimulées pour s'adapter aux conditions de stress. Ainsi, la synthèse des exo-polysaccharides et des lipopolysaccharides est significativement perturbée (Ventorino et al., 2012), alors que des nouvelles protéines spécifiques reconnues comme des protéines de choc osmotique, sont induites (Karmakar et al., 2015).

L'effet de la salinité sur les bactéries est dû essentiellement à l'augmentation de l'osmolarité, mais aussi à la toxicité de quelques ions constitutifs des sels (Cacciari et al., 2003). Par conséquent, plusieurs activités physiologiques et biochimiques sont inhibées (Dominguez-Ferreras et al., 2006). Cependant, les bactéries ont impliqué une série de mécanismes adaptatifs pour réduire au minimum l'effet de l'osmolarité en réduisant le

potentiel osmotique entre la cellule et l'environnement (Brhada *et al.*, 1989). Parmi ces mécanismes, on distingue l'accumulation des ions tels que le potassium et les solutés compatibles organiques comme les acides aminés et leurs dérivés, les sucres, les bêtaïnes et les éctoïnes (Essendoubi *et al.*, 2006).

Les solutés compatibles sont des molécules dipolaires, non toxiques, solubles et ne portent pas une charge électrique (Rontein *et al.*, 2002). Ils sont accumulés à des fortes concentrations intracellulaires (1 M), sans aucun effet sur les fonctions cellulaires, mais ils ont un rôle dans la stabilité des protéines et des membranes (Rasanen *et al.*, 2004). Ces derniers agissent à des concentrations extérieures aussi faibles que 1mM et leur accumulation est accompagnée par une augmentation du volume d'eau du cytoplasme en évitant la déshydratation cellulaire (Rabhi, 2011).

Certaines bactéries utilisent les solutés compatibles comme source d'azote ou de carbone pour leur croissance (Werner *et al.*, 2005) et protègent leurs macromolécules vitales comme les protéines et les lipides contre l'effet de l'osmolarité élevée (Essendoubi *et al.*, 2006).

La contamination du sol par des métaux lourds est devenue un sérieux problème (Karaca *et al.*, 2010). Elle résulte essentiellement des activités humaines, agricoles et industrielles (Kinkle *et al.*, 1987). Ces activités ont comme conséquence l'accumulation des oligo-métaux dans les sols agricoles (Fatnassi *et al.*, 2014), créant une menace à la sécurité alimentaire et à la santé publique (Paul *et al.*, 2014).

Les métaux lourds sont présents naturellement dans le sol suite à la dégradation des roches mères. Plusieurs paramètres influencent la disponibilité des métaux dans le sol, les plus importants à signaler sont le pH du sol, le potentiel redox (Robles *et al.*, 2014) et le type du sol (Elekes, 2014).

Certains métaux tels que le Ni, Cu, Zn, Cd, Pb sont essentiels pour les processus métaboliques des bactéries à des faibles concentrations mais à des fortes concentrations ils peuvent devenir toxiques (Chanda *et al.*, 2014), en affectant la croissance, la morphologie et les activités métaboliques (Bahig *et al.*, 2008).

Les rhizobiums réagissent variablement aux différents types de métaux lourds et ceci en fonction des concentrations appliquées (El-Hillali, 2006).

Les métaux lourds sont des inhibiteurs puissants des activités de biodégradation, leur toxicité résulte de leur interaction avec les protéines (enzymes) et de l'inhibition des processus métaboliques (Lucious *et al.*, 2013). Ils influencent négativement les

microorganismes, en affectant leur croissance, abondance, diversité génétique, capacité de nodulation et leur efficacité (Stan et *al.*, 2011).

Les métaux peuvent interagir directement avec les composants cellulaires des plantes et perturber les activités métaboliques cellulaires (Madhava Rao et *al.*, 2006). Peu de légumineuses tolèrent la présence des métaux dans le sol (Frérot et *al.*, 2006). Selon Nath et *al.* (2012), certaines espèces ont développé des stratégies d'adaptation. Elles sont conditionnées par les caractéristiques physico-chimiques du sol, la nature du métal, sa concentration ainsi que la durée de son exposition (Soussou, 2013).

A des concentrations élevées, le cadmium a un impact négatif sur l'établissement et le fonctionnement de la symbiose en affectant le nombre des nodules (Mahieu et *al.*, 2011).

Wilson et Reinsensauer (1970), ont rapporté que le manganèse et le zinc affectent négativement la croissance des rhizobiums. Un excès de zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur leur croissance, mais aussi sur leur efficacité, à travers la perte des plasmides symbiotiques (Giller et *al.*, 1998).

Le cuivre a un effet inhibiteur sur la croissance et les activités enzymatiques des Bradyrhizobium à toutes les concentrations (Ahmad et *al.*, 2012). Le plomb réduit le nombre et la taille des racines et la surface totale des feuilles (Chaudhary et *al.*, 2004).

La dégradation et la pollution des sols agricoles, provoquées par l'augmentation des concentrations en sels minéraux et métalliques, constituent de nos jours une sérieuse menace à prendre en charge. Elles agissent négativement sur le développement des populations rhizobiennes et sur leurs partenaires symbiotiques et provoquent, par conséquent la diminution des rendements agricoles en plus de leur influence sur la qualité de l'environnement. Il devient donc, primordial de rechercher des rhizobiums présentant des performances en qualité de tolérance et de persistances aux conditions défavorables générées par la présence de ces sels.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui a pour objectifs :

- Déterminer l'effet des sels minéraux sur la croissance des souches isolées à partir de *Vicia faba*.
- Etude de l'effet osmoprotecteur de certains composés sur la croissance des souches de rhizobium, les moins tolérantes au NaCl.
- Déterminer l'effet des métaux lourds sur la croissance des souches isolées à partir de *Vicia faba*.

Matériels
et
Méthodes

Matériel et méthodes

I. Souches bactériennes

Dans la présente étude, douze souches de *Rhizobium* à croissance rapide appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne ont été utilisées. Ces souches (ES8, EA2, MEK6, EB1, AKE1, EC3, UE28, EC6, AM11R, UM2 et MT2) proviennent de différentes régions de Béjaïa et sont isolées à partir des nodules de *Vicia faba*. La souche de *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* (RLV) est intégrée dans cette étude comme souche de référence. Elles ont été conservées à 4 °C dans des tubes inclinés contenant la gélose YMA.

II. Revivification des souches

En vue de revivification, les souches sont d'abord ensemencées sur milieu YMB pour l'enrichissement. Après incubation à 28°C pendant 24h, elles sont repiquées sur milieu YMA incliné pour un usage ultérieur.

III. Evaluation de l'effet des sels minéraux sur les souches de rhizobium

L'évaluation de la tolérance aux différents sels ($MgSO_4$, KCl, NaCl, $CaCl_2$) est réalisée sur milieu YMA qu'on a modifié, en remplaçant l'extrait de levure par KNO_3 . Le milieu est réparti dans des flacons de 100ml, auxquels les sels sont additionnés à des concentrations variables (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 et 4%). Les milieux sont ajustés à un pH de 6,80 puis autoclavés. L'ensemencement est réalisé par la méthode des spots à raison de 10 μ l à partir des suspensions bactériennes d'une densité optique de 0,1 à 620 nm. Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration et chaque souche. Après incubation à 28°C pendant 72h la croissance est évaluée par l'apparition des colonies sur le milieu.

IV. Etude de l'effet osmoprotecteur de certains composés sur la croissance des rhizobiums

Ce test est effectué dans le but d'améliorer la tolérance des souches sensibles au sel. Ainsi, pour vérifier la capacité des souches de rhizobium à utiliser certains composés dits « osmoprotecteur » pour améliorer leur croissance. D'abord on a étudié la sensibilité des souches aux sels, les souches EC3 et ES8 présentent une forte sensibilité au NaCl sont retenus.

La croissance des souches EC3 et ES8 est suivie dans des tubes contenant 4ml de milieu YMB, additionné d'une concentration de 0,5% en NaCl. En présence ou en absence des différents osmoprotecteurs à une concentration de 5mM. Les composés osmoprotecteurs (bétaine, proline et saccharose), sont testés à une concentration de 5mM. Un témoin sans NaCl et autre contenant du NaCl à 0,5% mais sans osmoprotecteurs sont prévus. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement.

Les milieux sont ensuite inoculés par 0,1ml d'une pré-culture dont la DO_{620nm} est de 0,1. Après incubation à 28°C. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à 620nm chaque 24h.

V. Etude de la résistance des rhizobiums aux métaux lourds

L'étude de la résistance des différentes souches de rhizobium aux métaux lourds est réalisée sur milieu YMA. Ce test est réalisé avec six métaux hydrosolubles et à différentes concentrations (tableau I). Les métaux testés sont : le zinc, mercure, cadmium, chrome, plomb et le cuivre. Les concentrations en sels de métaux utilisés pour préparer les solutions mères sont comme suit :

- ❖ Sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) : 100 mg /ml
- ❖ Chlorure de mercure ($HgCl_2$) : 5 mg /ml
- ❖ Sulfate de cadmium ($3CdSO_4 \cdot 8H_2O$) : 10 mg /ml
- ❖ Chromate de potassium (CrK_2O_4) : 200 mg /ml
- ❖ Acétate de plomb ($Pb(OOCCH_3)_2 \cdot 3H_2O$) : 30 mg /ml
- ❖ Sulfate de cuivre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) : 50 mg / ml

Tableau I : Concentrations en ions de sels métalliques utilisées

Ions métalliques	Concentrations (μg /ml)													
	5	10	25	50	75	100	150	200	250	300	-	-	-	-
Zn²⁺	5	10	25	50	75	100	150	200	250	300	-	-	-	-
Hg²⁺	2	5	10	20	50	75	100	-	-	-	-	-	-	-
Cd²⁺	2	5	10	20	50	75	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr²⁺	5	10	20	25	50	75	-	-	-	-	-	-	-	-
Pb²⁺	10	25	50	75	100	150	175	200	250	300	350	400	450	500
Cu²⁺	2	5	10	20	50	100	-	-	-	-	-	-	-	-

Des volumes définis des solutions mères de métaux lourds, préparées auparavant, sont additionnées à un volume adéquat de gélose YMA en surfusion, pour avoir un volume final de 100 ml de chaque concentration. Après solidification, les inocula préparés précédemment sont utilisés pour ensemercer en spot à raison de 10 μ l les différents milieux. Ainsi, trois répétitions sont réalisées pour chacune des concentrations.

Après incubation à 28°C/72h, la présence ou l'absence de croissance est notée pour chaque souche et chaque concentration en sels de métaux. Ainsi, les concentrations minimales inhibitrices qui correspondent aux plus faibles concentrations inhibant toute croissance sont déterminées pour chaque métal.

Résultats
et
discussion

Résultats et Discussion

I. Détermination de la tolérance aux sels minéraux

I.1. Tolérance au NaCl

Les résultats de test de tolérance au chlorure de sodium montrent que les différentes souches présentent une variabilité dans leur sensibilité (tableau II).

Tableau II : Tolérance au chlorure de sodium

Souches	Concentrations en NaCl (%)									
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	
ES8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEK6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
EB1	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-
AKE1	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-
EC3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UE28	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EC6	+	+	+	+	±	±	±	-	-	-
AM11R	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-
UM2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RLV	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MT2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

Les résultats du tableau II montrent que les souches EA2 et MT2 sont les plus tolérantes en présentant une croissance jusqu'à 4% de NaCl. Elles présentent une tolérance plus élevée comparée à celle de la souche de référence *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui est inhibée à partir de 2%. Les souches ES8 et EC3 sont les moins tolérantes, leur croissance est inhibée à la plus faible concentration (0.5%). Les autres souches présentent une tolérance plus au moins variable, elles tolèrent des concentrations allant de 1 à 3.5%.

La figure 01 illustre une faible croissance des souches EB1, AKE1 avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Le même constat a été observé chez EC6 et AM11R.

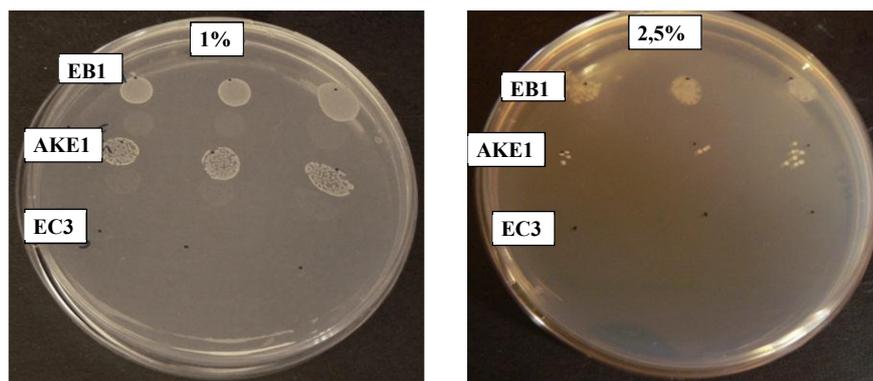


Figure 01 : Effet du chlorure de sodium sur la croissance des souches de rhizobium

I.2.Tolérance au KCl

La tolérance des souches au KCl apparait plus au moins variable (tableau III).

Tableau III : Tolérance au chlorure de potassium

Souches	Concentrations en KCl (%)							
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5
ES8	+	-	-	-	-	-	-	-
EA2	+	+	+	+	+	+	+	±
MEK6	+	+	±	-	-	-	-	-
EB1	+	+	+	+	+	+	+	±
AKE1	+	+	±	±	±	±	±	±
EC3	+	-	-	-	-	-	-	-
UE28	+	+	-	-	-	-	-	-
EC6	+	+	+	+	+	+	±	±
AM11R	+	+	+	+	+	+	±	-
UM2	+	+	+	-	-	-	-	-
RLV	+	+	+	+	-	-	-	-
MT2	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence de la croissance;

(-) : Absence de croissance;

(±) : Croissance faible.

Les souches EA2, EB1, AKE1 et EC6 présentent une croissance plus ou moins variables sur les différentes concentrations testées. Seule la souche MT2 (figure 02) présente une bonne croissance sur toutes les concentrations. La plupart des souches présentent une tolérance plus élevée comparée à la souche de référence, qui présente une tolérance modérée (jusqu'à 1.5%). Les souches ES8 et EC3 sont les plus sensibles, elles sont inhibées à une concentration de 0.5%.

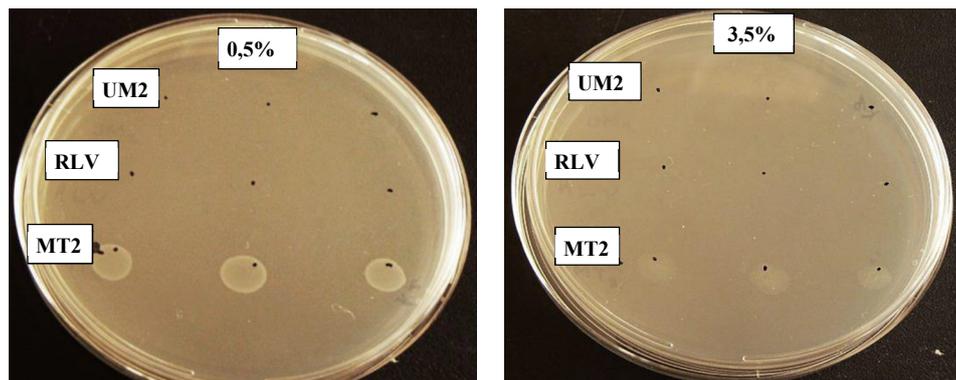


Figure 02 : Effet du chlorure de potassium sur la croissance des souches de rhizobium

I.3.Tolérance au MgSO₄

Les résultats de la tolérance des rhizobiums au MgSO₄ sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Tolérance au sulfate de magnésium

Souches	Concentrations en MgSO ₄ (%)								
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
ES8	+	+	±	±	±	±	±	-	-
EA2	+	+	±	±	±	±	±	±	±
MEK6	+	+	±	±	±	±	-	-	-
EB1	+	±	±	±	±	±	±	±	±
AKE1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EC3	+	±	±	-	-	-	-	-	-
UE28	+	±	±	±	±	-	-	-	-
EC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AM11R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UM2	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RLV	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MT2	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence de la croissance;

(-) : Absence de croissance;

(±) : Croissance faible.

Les résultats du tableau IV montrent une forte tolérance dans le cas de MgSO₄ où, la majorité des souches présentent une croissance aux différentes concentrations (figure 03). Elles présentent une croissance comparable à celle de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Toutefois, on constate que malgré la persistance de certaines souches à savoir EA2 et EB1, leur croissance est affectée à des concentrations de 1 et 0.5% respectivement. La souche UM2 est la moins tolérante, elle est inhibée à la concentration de 1%.

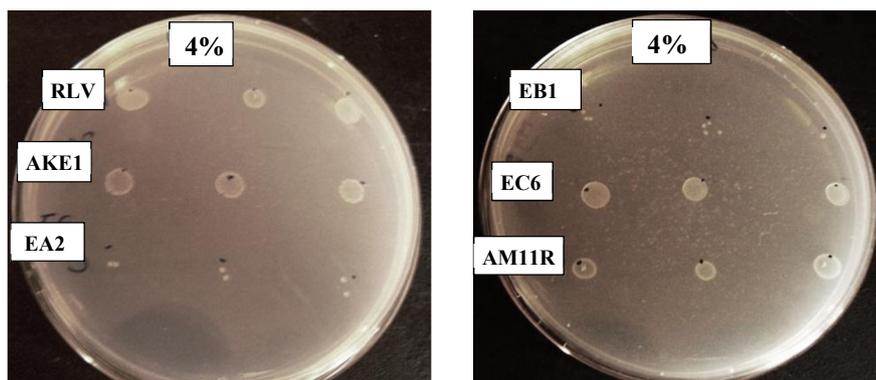


Figure 03 : Effet du sulfate de magnésium sur la croissance des souches de rhizobium

I.4. Tolérance au CaCl_2

La variation de la tolérance des différentes souches au CaCl_2 est présentée dans le tableau V.

Tableau V : Tolérance au chlorure de calcium

Souches	Concentrations en CaCl_2 (%)									
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	
ES8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EA2	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
MEK6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EB1	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±
AKE1	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
EC3	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±
UE28	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
EC6	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±
AM11R	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
UM2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RLV	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
MT2	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

Les résultats présentés dans le tableau V montrent que la plupart des souches sont inhibées à partir d'une concentration de 2% (20 mg/ml). La croissance des souches EA2, MEK6, AKE1, UE28, AM11R est comparable à celle de la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui est inhibée à une concentration de 2%. Toutefois, on

remarque que malgré la diminution de la croissance des souches EB1, EC3, EC6 et MT2 à des concentrations de 2, 1, 3.5 et 2% respectivement, elles survivent jusqu'à la concentration la plus élevée (4%). La souche UM2 est inhibée à la plus faible concentration (figure 04).

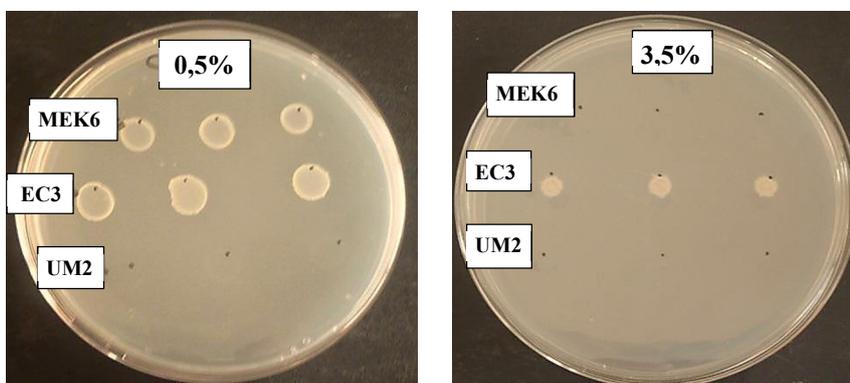


Figure 04 : Effet du chlorure de calcium sur la croissance des souches de rhizobium

I.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats de la recherche des concentrations minimales inhibitrices montrent une variabilité entre les souches et entre leurs réponses aux différentes concentrations en sels minéraux (tableau VI).

Tableau VI: Concentrations minimales inhibitrices des différentes souches testées

Souches	Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml)			
	NaCl	KCl	MgSO ₄	CaCl ₂
ES8	0.5	0.5	3.5	1
EA2	>4	>3.5	>4	2
MEK6	1.5	1.5	3	2
EB1	4	>3.5	>4	>4
AKE1	2.5	>3.5	>4	2
EC3	0.5	0.5	1.5	>4
UE28	1	1	2.5	2
EC6	3.5	>3.5	>4	>4
AM11R	2.5	3.5	>4	2
UM2	1	1.5	1	0.5
RLV	2.5	2	>4	2
MT2	>4	>3.5	>4	>4

La tolérance des souches de rhizobiums testées au NaCl est très variable. Les souches EA2 et MT2 présentent une tolérance très importante avec une croissance observée même à la concentration la plus élevée (CMI > 4%). Elles présentent une croissance comparable à celle observée par Abolhasani *et al.* (2010) sur des souches de *Sinorhizobium* isolées à partir des nodules de *Medicago sativa* qui tolèrent une concentration de 4.5% en NaCl. Les souches ES8 et EC3 sont les moins tolérantes, elles sont inhibées en présence de la plus faible concentration (CMI de 0.5%). Ces souches sont sensibles comparées à la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et à celles isolées par Zahran *et al.* (2012) à partir des nodules de *Vicia faba*, où toutes les souches se développent à des concentrations de 2% de NaCl.

En ce qui concerne le KCl, les souches testées présentent des CMI comprises entre 0.5 et 3.5%. Les souches EA2, EB1, AKE1, EC6 et MT2 tolèrent des concentrations élevées en KCl (CMI > 3.5%). Ces résultats sont comparables à ceux d'Abdelmoumen *et al.* (1999) isolées à partir des nodules d'*Adenocarpus decorticans* et qui ont trouvé que certaines souches tolèrent jusqu'à 5% de KCl. Cependant, les souches ES8 et EC3 sont inhibées à la plus faible concentration (0.5%). Ces souches sont moins tolérantes que *Rhizobium ciceri* obtenue par Berraho *et al.* (2003) à partir de nodosités de deux variétés de pois chiche.

Dans le cas de MgSO₄, la plupart des souches tolèrent des concentrations élevées en MgSO₄, elles présentent des CMI supérieures à 4%. Ces résultats sont plus au moins similaires à ceux obtenus par Elsheikh et Wood (1990), où les souches de *Rhizobium fredii* et *Rhizobium sp.* isolées de pois chiche tolèrent des concentrations allant jusqu'à 3.5%. La souche UM2 est la plus sensible, elle est inhibée à une concentration de 1 %.

Les concentrations minimales inhibitrices du CaCl₂ vis-à-vis des souches de rhizobium testées varient de 0.5 (5 mg/ml) à 4% (40 mg/ml). 50 % des souches ont des CMI de 2% (20 mg/ml) et 33,3 % des souches présentent des CMI >4% (40 mg/ml). Ces souches présentent une tolérance plus importante comparées aux souches de *Rhizobium ciceri* isolées de nodosités de deux variétés du pois chiche par Berraho *et al.* (2003) qui sont inhibées à partir de 1% (10 mg/ml) en CaCl₂ et aux souches de *Bradyrhizobium* isolées par Hasan (2013) à partir des nodules de *Vigna radiata* qui tolèrent jusqu'à 16,65mg/ml. La souche UM2 est la plus sensible, elle présente une CMI de 0,5%.

Les résultats du tableau VI, montrent que les sels affectent différemment la croissance des souches de rhizobium. Ces souches sont plus tolérantes *vis-à-vis* du $MgSO_4$ et $CaCl_2$, où la plupart des souches tolèrent des concentrations supérieures à 4 % (40mg/ml). Cependant, en présence de KCl et NaCl, les souches montrent une tolérance moins importante.

Le $MgSO_4$ semble être le sel le moins inhibiteur de la croissance. Ce résultat est comparable à celui observé par Abdelmoumen et *al.* (1999) sur des souches de rhizobium isolées des nodules de fenugrec. L'ensemble des résultats obtenus sur la tolérance des différentes souches aux sels minéraux testés montre que le NaCl est le sel le plus inhibiteur de la croissance. Ce même constat a été rapporté par Hasan (2013).

L'ordre de tolérance aux différents sels testés est comme suit : $MgSO_4 > CaCl_2 > KCl > NaCl$. D'après Hasan (2013), cet ordre de tolérance observé est dû à la différence au niveau de la toxicité que présentent les différents ions. Les ions Cl^- sont plus toxiques que les ions SO_4^- et les ions Na^+ sont plus toxiques sur les bactéries que les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .

La souche MT2 est la plus tolérante aux sels minéraux. Alors que, la souche UM2 est la plus sensible.

II. Effet des osmoprotecteurs sur la croissance des rhizobiums

Les cinétiques de croissance des souches de rhizobium sélectionnées (EC3 et ES8) pour leur sensibilité au NaCl sont étudiées en présence et en absence d'osmoprotecteur. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 05 et 06.

La courbe d'évolution de la densité optique de la souche ES8 en fonction du temps montre une croissance importante au niveau du témoin. En présence de 0.5% de NaCl, on constate une diminution remarquable de la croissance. L'addition de saccharose à permet d'observé une légère amélioration pendant toute la durée d'incubation avec une stabilisation de la croissance au-delà de 48h. La proline et la betaine n'ont exercé aucun effet osmoprotecteur sur la croissance de la souche ES8.

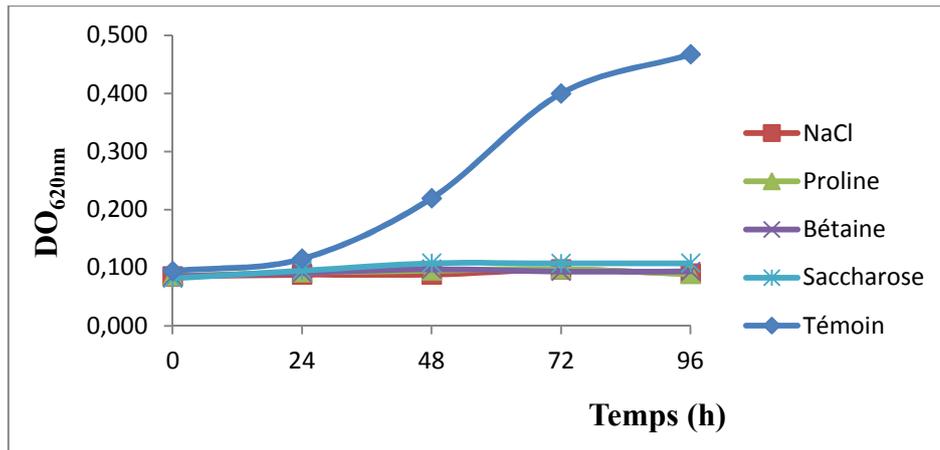


Figure 05 : Evolution de la croissance de la souche ES8 en présence des différents osmoprotecteurs

Les résultats illustrés dans la figure 06 montrent une augmentation de la croissance de la souche EC3 pour le témoin pendant les 48h d'incubation. Au-delà de cette période, une diminution importante est observée. La croissance est réduite en présence de 0.5% de NaCl comparée à celle du témoin, avec une stabilisation de la croissance après 72h d'incubation. L'addition de la proline et du saccharose dans le milieu a restauré partiellement la croissance de la souche EC3 pendant les 72h d'incubation, au-delà desquelles, on constate une diminution de la croissance. Cependant, en présence de la bétaine, la souche EC3 montre une meilleure amélioration de la croissance pendant 72h d'incubation. Une diminution similaire à celle de la proline et du saccharose est observée.

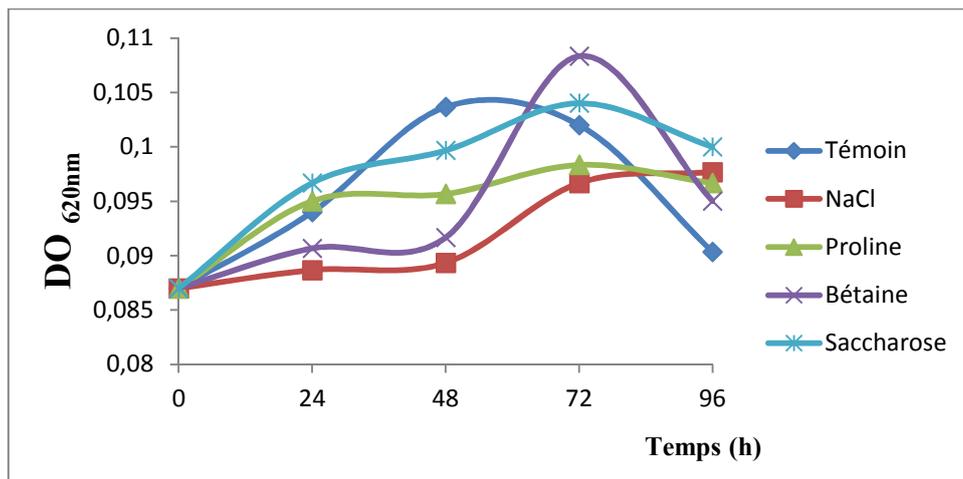


Figure 06 : Evolution de la croissance de la souche EC3 en présence des différents osmoprotecteurs

Pour évaluer l'effet osmoprotecteur des composés compatibles utilisés dans le cadre de ce travail, nous avons calculé, pour chaque souche le temps de génération (TG).

Tableau VII : Effet des osmoprotecteurs sur le temps de génération des souches EC3 et ES8

Souches	Temps de génération (h)	
	ES8	EC3
Témoin	27,72	169,95
NaCl	184,53	210,86
Proline	245,74	217,34
Bétaine	231,48	99,58
Saccharose	132,91	313,23

Les résultats du tableau VII montrent que la présence de 0.5 % de NaCl a provoqué une augmentation du temps de génération pour les deux souches EC3 et ES8 comparé à celui du témoin, ce qui a généré un ralentissement de la croissance bactérienne.

L'effet des osmoprotecteurs diffère selon leur nature et la souche testée. L'addition de la bétaine à exercer un effet très efficace en réduisant le temps de génération de 210,86 à 99,58 h, ce qui se manifeste à travers l'augmentation de la croissance de la souche EC3. Selon Gouffi et *al.* (2000), la bétaine joue le rôle d'osmoprotecteur. Dans le cas de la proline et du saccharose, on constate une augmentation du temps de génération, ce qui explique la réduction de la croissance de la souche EC3.

Dans le cas de la souche ES8, l'ajout du saccharose a provoqué une diminution du temps de génération de 184.53 à 132.91h. Cependant, on remarque une augmentation du temps de génération en présence de la bétaine et la proline. Ces dernières n'ont pas exercé un effet osmoprotecteur. Selon Gloux et Le Rudulier (1989) puis Talibert et *al.* (1997), ces solutés compatibles peuvent être utilisés comme source de carbone.

III. Etude de la sensibilité des Rhizobiums aux métaux lourds

Les souches testées dans cette étude présentent une variabilité dans leur croissance sur le milieu YMA additionné de différentes concentrations en métaux lourds. Toutefois, leur croissance diffère en fonction de la souche, du métal et de la concentration considérée.

III.1. Tolérance au mercure

Les résultats de la tolérance au mercure sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Variation de la tolérance au mercure

Souches	Concentrations en Hg ($\mu\text{g/ml}$)							
	0	2	5	10	20	50	75	100
ES8	+	+	-	-	-	-	-	-
EA2	+	+	-	-	-	-	-	-
MEK6	+	-	-	-	-	-	-	-
EB1	+	-	-	-	-	-	-	-
AKE1	+	+	-	-	-	-	-	-
EC3	+	-	-	-	-	-	-	-
UE28	+	+	-	-	-	-	-	-
EC6	+	-	-	-	-	-	-	-
AM11R	+	+	-	-	-	-	-	-
UM2	+	-	-	-	-	-	-	-
RLV	+	+	+	-	-	-	-	-
MT2	+	+	+	+	-	-	-	-

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

Dans le cas du mercure, la tolérance des souches de rhizobium est très faible. On constate que les souches MEK6, EB1, EC3, EC6 et UM2 sont inhibées à partir de la première concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$. Cependant, la souche MT2 est inhibée à partir de 20 $\mu\text{g/ml}$ (figure 07). A l'exception de MT2, toutes les souches présentent une tolérance inférieure à celle de la souche de référence *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

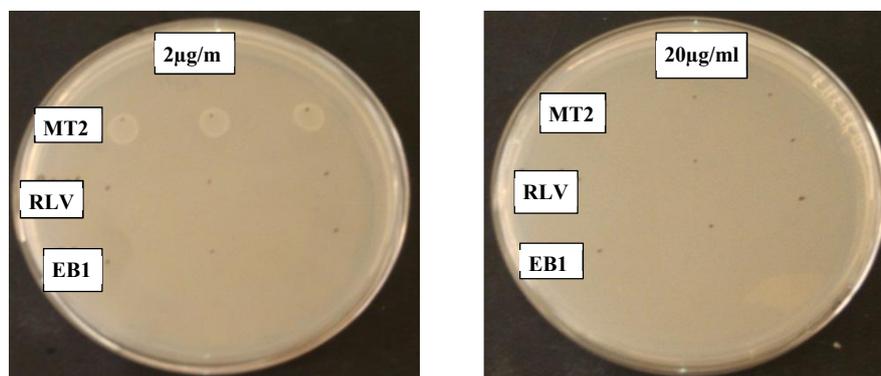


Figure 07 : Effet du mercure sur la croissance des souches de rhizobium

III.2. Tolérance au cadmium

Les résultats du tableau IX montrent une variation de la tolérance des souches testées aux différentes concentrations de cadmium.

Tableau IX : Variation de la tolérance au cadmium

Souches	Concentrations en Cd ($\mu\text{g/ml}$)						
	0	2	5	10	20	50	75
ES8	+	+	±	±	-	-	-
EA2	+	+	+	+	+	+	+
MEK6	+	+	±	±	-	-	-
EB1	+	+	-	-	-	-	-
AKE1	+	+	±	±	-	-	-
EC3	+	+	±	±	-	-	-
UE28	+	+	±	-	-	-	-
EC6	+	+	-	-	-	-	-
AM11R	+	+	±	±	±	±	±
UM2	+	-	-	-	-	-	-
RLV	+	+	±	±	-	-	-
MT2	+	+	+	+	±	±	±

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

On remarque que la croissance de la majorité des souches est inhibée à partir de $20\mu\text{g/ml}$ de cadmium. La croissance des souches AM11R et MT2 est affectée à partir de 5 et $20\mu\text{g/ml}$ respectivement. Toutefois, leur croissance persiste même à la concentration la plus élevée ($75\mu\text{g/ml}$). Les souches ES8, MEK6 et EC3 présentent le même seuil de tolérance que celui de la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*, qui est inhibée à $20\mu\text{g/ml}$. La souche EA2 est la plus tolérante, elle présente une bonne croissance sur l'ensemble des concentrations testées (figure 08). La souche UM2 ne tolère aucune concentration de cadmium.

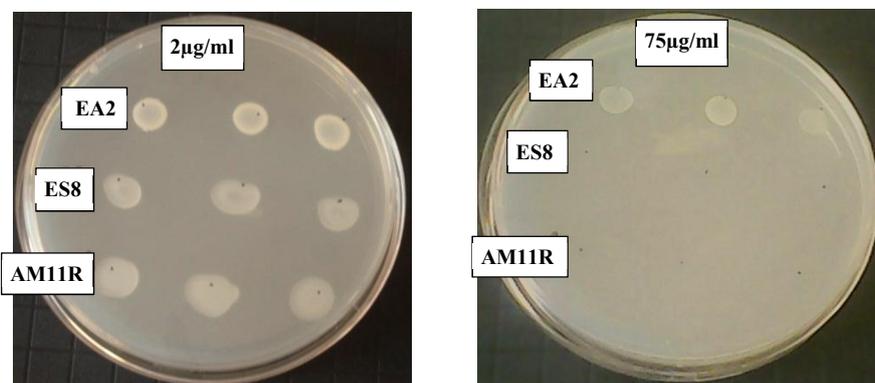


Figure 08 : Effet du cadmium sur la croissance des souches de rhizobium

III.3. Tolérance au cuivre

Les différents résultats obtenus du test de la tolérance au cuivre sont illustrés dans le tableau X.

Tableau X : Variation de la tolérance au cuivre

Souches	Concentrations en Cu ($\mu\text{g/ml}$)						
	0	2	5	10	20	50	100
ES8	+	+	+	±	-	-	-
EA2	+	+	+	+	+	+	-
MEK6	+	+	+	±	-	-	-
EB1	+	+	±	±	-	-	-
AKE1	+	+	+	+	-	-	-
EC3	+	+	+	+	-	-	-
UE28	+	+	+	±	-	-	-
EC6	+	+	±	±	-	-	-
AM11R	+	+	+	±	-	-	-
UM2	+	+	-	-	-	-	-
RLV	+	+	±	±	-	-	-
MT2	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

Le test de tolérance au cuivre montre une inhibition de la croissance chez la plupart des souches à partir de 20 $\mu\text{g/ml}$, c'est le cas des deux souches MEK6 et EC3 qui sont illustrées dans la figure 09. Elles présentent le même seuil de tolérance que la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. La souche UM2 est la plus sensible, elle est inhibée à 5 $\mu\text{g/ml}$. Seules, les souches EA2 et MT2 tolèrent respectivement les concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$.

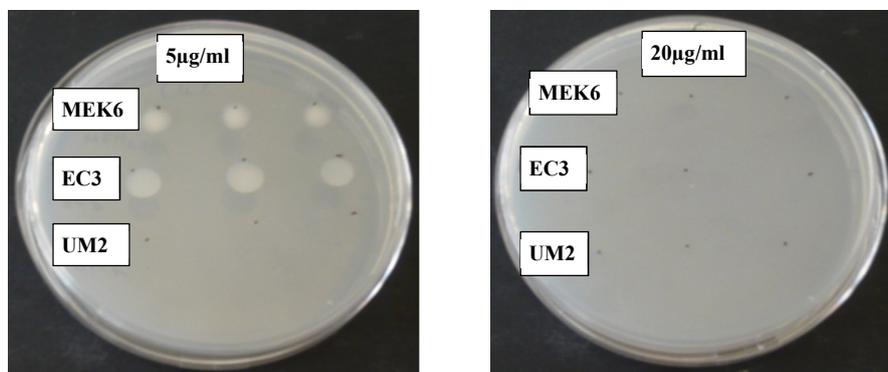


Figure 09 : Effet du cuivre sur la croissance des souches de rhizobium

III.4. Tolérance au chrome

Les résultats du test de tolérance aux différentes concentrations du chrome sont illustrés dans le tableau XI.

Tableau XI : Variation de la tolérance au chrome

Souches	Concentrations en Cr ($\mu\text{g/ml}$)						
	0	5	10	20	25	50	75
ES8	+	+	+	-	-	-	-
EA2	+	+	+	±	±	±	±
MEK6	+	+	±	±	±	-	-
EB1	+	+	-	-	-	-	-
AKE1	+	+	+	+	+	-	-
EC3	+	+	+	+	+	-	-
UE28	+	+	±	±	±	-	-
EC6	+	-	-	-	-	-	-
AM11R	+	+	±	±	±	±	-
UM2	+	+	+	+	+	-	-
RLV	+	+	±	±	-	-	-
MT2	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

La croissance des différentes souches sur milieu additionné de chrome est très affectée aux concentrations supérieures à 25 $\mu\text{g/ml}$ (tableau XI). On constate une diminution de la croissance pour les souches MEK6, UE28, AM11R à partir d'une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. Toutefois, leur croissance persiste même à des concentrations élevées (25 et 50 $\mu\text{g/ml}$). Une diminution similaire est observée pour la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*, mais qui survie jusqu'à 20 $\mu\text{g/ml}$. La figure 10 montre la persistance de la souche MT2 à des concentrations élevées et l'inhibition de la croissance des souches RLV et EB1. La croissance de la souche EC6 est inhibée même à la plus faible concentration (5 $\mu\text{g/ml}$).

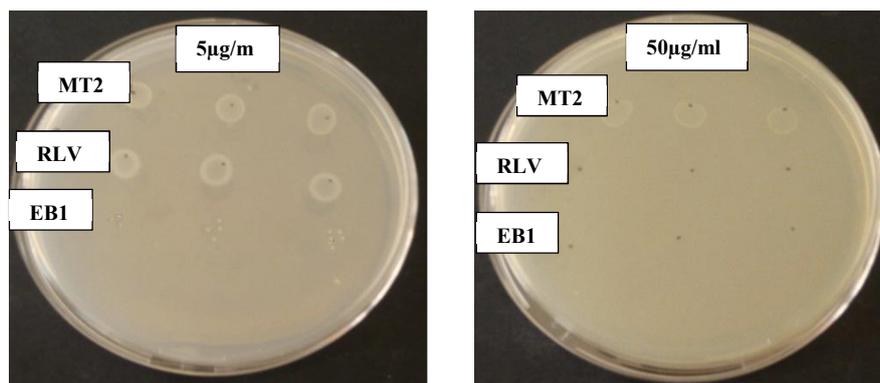


Figure 10 : Effet du chrome sur la croissance des souches de rhizobium

III.5. Tolérance au zinc

Les résultats du tableau XII, montrent une variation de la tolérance des différentes souches *vis-à-vis* du zinc.

Tableau XII : Variation de la tolérance au zinc

Souches	Concentrations en Zn ($\mu\text{g/ml}$)										
	0	5	10	25	50	75	100	150	200	250	300
ES8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
EA2	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-	-
MEK6	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-	-
EB1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
AKE1	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
EC3	+	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-
UE28	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-	-
EC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AM11R	+	+	+	+	±	±	±	-	-	-	-
UM2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RLV	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-
MT2	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

La majorité des souches se sont avérées tolérantes à des concentrations élevées en zinc (jusqu'à 100 $\mu\text{g/ml}$). Les souches EC6 et EB1 tolèrent des concentrations de 200 et 250 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, elles présentent une tolérance plus importante que celle de la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Les souches UE28 et AKE1 sont inhibées à des concentrations de 75 et 150 $\mu\text{g/ml}$, par contre la souche EC6 tolèrent des

concentrations élevées (jusqu'à 200 µg/ml) (figure 11). La souche UM2 est la moins tolérante, sa croissance est inhibée à la concentration de 10 µg/ml.

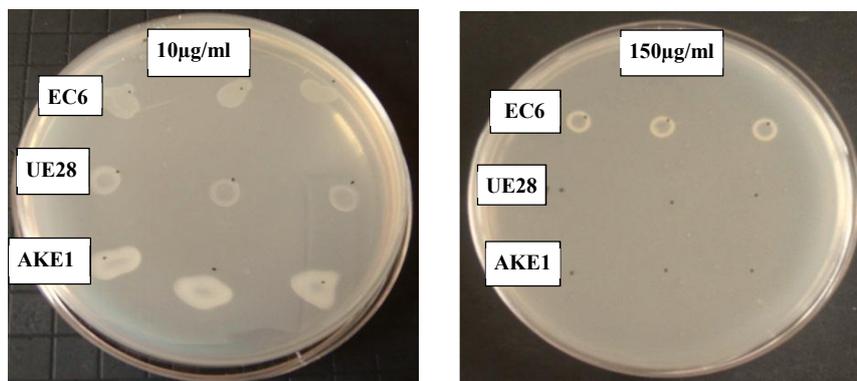


Figure 11 : Effet du zinc sur la croissance des souches de rhizobium

III.6. Tolérance au plomb

La variation de la tolérance au plomb est représentée dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Variation de la tolérance au plomb

Souches	Concentrations en Pb (µg/ml)														
	0	10	25	50	75	100	150	175	200	250	300	350	400	450	500
ES8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
EA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MEK6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
EB1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AKE1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EC3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UE28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
EC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
AM11R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-
UM2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RLV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
MT2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-

(+) : Présence de la croissance ;

(-) : Absence de croissance ;

(±) : Croissance faible.

Contrairement aux autres métaux testés, la plupart des souches se développent en présence de concentrations très élevées en plomb (figure 12). Les souches EB1, AKE1, EC3 et EC6 tolèrent les concentrations les plus élevées (500 µg/ml). Les souches ES8, EA2 et MEK6 tolèrent des concentrations de l'ordre de 400 µg/ml. Tandis que, les souches AM11R et MT2 tolèrent le même seuil que la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui est de 300 µg/ml.

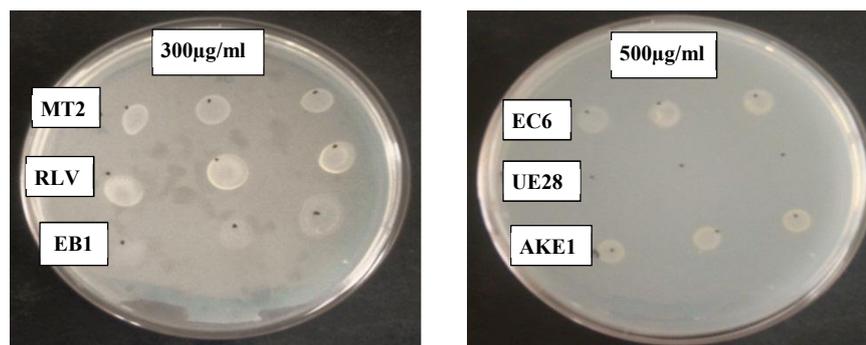


Figure 12 : Effet du plomb sur la croissance des souches de rhizobium

III.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices sont évaluées afin de révéler le degré de tolérance des souches retenues dans cette étude *vis-à-vis* des métaux lourds testés. Les valeurs des CMI des différentes souches de rhizobium sont représentées dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Concentrations minimales inhibitrices des différentes souches testées

Souches	Concentrations minimales inhibitrices (µg/ml)					
	Hg	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
ES8	5	20	20	20	150	450
EA2	5	>75	100	>75	150	450
MEK6	<2	20	20	50	150	450
EB1	<2	5	20	10	300	>500
AKE1	5	20	20	50	75	>500
EC3	<2	20	20	50	100	>500
UE28	5	10	20	50	150	350
EC6	<2	5	20	<5	250	>500
AM11R	5	>75	20	75	150	400
UM2	<2	<2	5	50	10	250
RLV	10	20	20	25	200	400
MT2	20	>75	>100	>75	150	400

Dans le cas du mercure, près de la moitié (41,67%) des souches tolèrent de faibles concentrations, elles présentent des CMI de 5 µg/ml (18 µM). La souche MT2 est plus tolérante que la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui présente une CMI de 20 µg/ml (72 µM). Les autres souches présentent des CMI inférieurs à 2 µg/ml (7,36 µM). Ces résultats montrent que ces souches sont plus tolérantes que les rhizobiums isolés par Ruiz-Diez et al. (2012) à partir de différentes légumineuses (*Medicago*, *Trifolium*, *Vicia*,

Lupinus, *Phaseolus*, et *Retama*). Ces derniers ont obtenu des concentrations qui varient entre 3 et 30 μM . Mais elles ont plus sensibles que les rhizobiums isolés par EL-Hillali (2006) à partir des nodules du lupin où la plupart des souches tolèrent jusqu'à 40 $\mu\text{g/ml}$.

La tolérance des rhizobiums au cadmium est très variable, les CMI obtenues sont comprises entre 2 (0,026 mM) et 75 $\mu\text{g/ml}$ (0,097 mM). 25 % des souches tolèrent des concentrations supérieures à 75 $\mu\text{g/ml}$. Ces souches sont moins tolérantes que celles isolés de *Pisum sativum* par Figueira et al. (2005), où 89% des souches résistent à 1mM de cadmium. Cependant, nos souches montrent une tolérance plus élevée que les souches de *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* isolés de nodules de *Vicia faba* par El- Deeb et al. (2005), où 24% des souches présentent une CIM de 0.0039 mM.

En ce qui concerne le cuivre, un taux d'inhibition de 75 % pour une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ (0,08mM) est observé. Ces résultats montrent une sensibilité des souches par rapport à celle des rhizobiums isolés par Fatnassi et al. (2015) à partir des nodules de *Vicia faba*, qui présentent des CMI de 0.15 à 2 mM. Un taux de 16.67% d'inhibition est enregistré pour des concentrations égales ou supérieures à 100 $\mu\text{g/ml}$ (0,4 mM). La tolérance de ces souches est comparable à celle observée chez des souches de rhizobiums isolées par Carrasco et al. (2005) à partir de différentes légumineuses, où 41% des souches résistent jusqu'à 100 $\mu\text{g/ml}$. Elles sont par contre moins tolérantes que les rhizobiums isolées à partir de la rhizosphère d'*Alyssum murale* par Abou- Shanab et al. (2007), qui présentent des CMI qui se situent entre 1 et 10 mM.

Les souches testées présentent des CMI variant de 5 à 75 $\mu\text{g/ml}$ vis-à-vis du chrome. 41.67% des souches sont inhibées à partir de 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,25 mM). Ce résultat est comparable à celui obtenu par Pereira et al. (2006) sur des souches de *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* isolées de *Pisum sativum*. Les souches EA2 et MT2 poussent même à 75 $\mu\text{g/ml}$ (0,37mM) (CMI > 75 $\mu\text{g/ml}$). La tolérance de ces souches au chrome est inférieure à celle obtenue par Altaf et al. (2008) (CMI de 1600 $\mu\text{g/ml}$) sur des souches de rhizobiums isolées à partir de *Trifolium alexandrinum*.

Les concentrations minimales inhibitrices du zinc vis-à-vis des souches de rhizobiums testées varient de 10 (0.034 mM) à 300 $\mu\text{g/ml}$ (1.04 mM). La souche UM2 est la plus sensible, elle présente une CMI de 10 $\mu\text{g/ml}$. Ces souches sont plus sensibles comparées à celles de rhizobiums isolées des nodules de *Vicia palaestina* par Cevheri et al. (2011) avec une CMI de 2 mM. Elles sont également sensibles comparées aux souches de

rhizobiums isolées par Fatnassi et al. (2014) à partir de *Vicia faba* et qui tolèrent des concentrations allant jusqu'à 1,75 mM.

Une large tolérance en présence du plomb a été constatée pour toutes les souches, qui présentent des CMI allant de 250 à 500 µg/ml. 33,33% des souches montrent une tolérance à des concentrations supérieures à 500 µg/ml. Elles sont plus tolérantes que les souches isolées de différentes légumineuses par Carrasco et al. (2005), qui sont inhibées à 500 µg/ml.

Le mercure peut être considéré comme le métal le plus toxique, tandis que le plomb est le métal le moins toxique. L'ordre de toxicité des métaux est comme suit : Hg > Cd > Cu > Cr > Zn > Pb. Des résultats comparables sont observés par Chanda et al. (2014) sur des souches de *Cellulosimicrobium* par contre, une différence au niveau de l'ordre de toxicité entre le cuivre et le cadmium a été rapportée par Abou-Shanab et al. (2007) chez des souches de rhizobium isolées à partir de la rhizosphère d'*Alyssum murale*.

Sur l'ensemble des souches testées, la souche EA2 et MT2 sont les plus tolérantes aux métaux lourds testés tandis que, la souche UM2 est la plus sensible.

Conclusion
et
Perspectives

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'effet des sels minéraux et des sels métalliques sur la croissance des souches de rhizobium isolées de *Vicia faba*.

L'évaluation de la sensibilité aux sels minéraux a permis de mettre en évidence une grande diversité de réponses. La plus grande tolérance est enregistrée pour le $MgSO_4$ et $CaCl_2$ alors que, en présence de NaCl et KCl, les souches montrent une tolérance moins importante. Les souches EA2 et MT2 sont les plus tolérantes au NaCl avec des CMI supérieures à 4%. Dans le cas de KCl les souches EA2, EB1, AKE1, EC6 et MT2 tolèrent des concentrations élevées (CMI >3.5%). Une tolérance variable *vis-à-vis* de $CaCl_2$ a été obtenue, les souches EB1, EC3, EC6 et MT2 sont les plus tolérantes avec des CMI > 4%.

L'effet osmoprotecteur de certains solutés compatibles a été étudié sur deux souches de rhizobium choisies sur la base de leur sensibilité à la salinité. L'impact de ces composés diffère selon leur nature et la souche testée. La croissance des souches est nettement améliorée en présence du saccharose dans le cas de la souche ES8 et en présence de la bétaine dans le cas de la souche EC3.

L'évaluation de la résistance aux métaux lourds montre différents niveaux de tolérance chez les souches de rhizobium étudiés *vis à vis* du mercure, cadmium, cuivre, chrome, zinc et plomb. La plus grande résistance est enregistrée pour le zinc et le plomb, où les souches tolèrent des concentrations allant jusqu'à 250 et 500 $\mu g/ml$ respectivement. La résistance des souches est moindre pour le chrome, le cuivre et le cadmium, où la majorité des souches présentent des CMI de 20 $\mu g/ml$ pour le cuivre et près de la moitié des souches présentent des CMI de 20 et 50 $\mu g/ml$ *vis a vis* du cadmium et du chrome respectivement. La tolérance la plus faible est obtenue pour le mercure, où les souches présentent des CMI < 2 $\mu g/ml$.

La résistance aux sels minéraux et aux métaux lourds chez les souches EA2 et MT2 serait d'un grand intérêt en agriculture, en écologie et en biotechnologie comme inocula bactériens, particulièrement pour la féverole et serait bien adapté pour nettoyer les environnements contaminés ou pollués. Toutefois, il serait souhaitable de compléter ce travail par d'autres tests comme :

- Tester d'autres sels minéraux et d'autres métaux lourds à des concentrations élevées ;
- Caractériser des gènes impliqués dans la tolérance ;

- Etudier l'effet d'autres osmoprotecteurs ;
- Etudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au stress salin ;
- Produire des inocula et faire des expérimentations aux champs.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

Abd-Alla MH, Issa AA et Ohyama T. (2014). Impact of Harsh Environmental Conditions on Nodule formation and dinitrogen Fixation of Legumes. In: Ohyama T (Eds). *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, pp. 131-193.

Abdelmoumen H, Filali-Maltouf A, Neyra M, Belabed A et Missbah El Idrissi M. (1999). Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal of Applied Microbiology*. **86**, 889-898.

Abolhasani M, Lakzian A, Tajabadipour A et Haghnia G. (2010). The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline condition. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **4**(5): 882-886.

Abou-Shanab RAI, Berkum PV, Angle JS. (2007). 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.

Ahmad E, Zaidi A, Saghir Khan M et Oves M. (2012). Heavy Metal Toxicity to Symbiotic Nitrogen-Fixing Microorganism and Host Legumes. In: Zaidi A, Wani PA et Khan MS (Eds), *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*. India. 29-44.

Alexander M. (1984). Ecology of *Rhizobium*. In: *Biological Nitrogen Fixation, Ecology, Technology and Physiology*, Plenum Press N.Y. 39–50.

Altaf MM, Masood F, Abdul M. (2008). Impact of long-term application of treated tannery effluents on the emergence of resistance traits in *Rhizobium sp.* isolated from *Trifolium alexandrinum*. *Turk J Biol* .**32**.1-8.

Bahig AE, Aly EA, Khaled AA et Amel KA. (2008). Isolation, characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag Province, Egypt. *Malaysian Journal of Microbiology*. **4**(2), 42- 50.

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.

Berraho EL, Maatallah J et Felali- Maltouf A. (2003). Diversité des souches de *Rhizobium ciceri* isolées des régions arides du maroc : ineffectivité efficacité et tolérance à la salinité. pp : 149-160

- Bolanos L, Marta M, El-Hamdaoui A, Rivilla R et Ildefonso Bonilla I. (2006).** Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant and Soil*.**280**, 135-142
- Brhada F, Poggi MC et Le Rudulier D. (1997).** Choline and Glycine Betaine Uptake in Various Strains of Rhizobia Isolated from Nodules of *Vicia faba* var. *major* and *Cicer arietinum* L.: Modulation by Salt, Choline, and Glycine Betaine. *Current Microbiology*. **34**, 167–172.
- Bulut F et Akinci S. (2010).** The effect of salinity on growth and nutrient composition in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings. *Fresenius Environmental Bulletin*. **19**(10), 2091-2910.
- Cacciari I, Di Mattia E, Quatrini P, Moscatelli MC, Grego S, Lippi D et De Paolis MR. (2003).** Réponses adaptatives des isolats de Rhizobium aux stress. In : un arbre au desert : *Acacia raddiana*. (ed). Le Floch E. Paris.183-200.
- Carrasco JA, Armarioc P, Pajueloa E, Burgosa A, Caviedesc MA, Lopezb R, Chambera MA, Palomaresc AJ. (2005).** Isolation and characterisation of symbiotically effective Rhizobium resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the aznalcollar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry*.**37**, 1131- 1140.
- Cevheri C, Ç Küçük et Çetin E. (2011).** Fungicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Vicia palaestina* *African Journal of Biotechnology*. **10**(13), 2423-2429.
- Chanda D, Sharma GD, Jha DK, Hijri M et Al-Otaibi F. (2015).** Isolation and characterization of heavy metal resistant *Cellulosimicrobium sp.* from paper mill polluted soil.
- Chanway CP, Anand R et Yang H. (2014).** Nitrogen fixation outside and inside plant tissues. In: Ohyama T (Eds). *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*.pp. 36-21.
- Chaudhary P, Dudeja SS et Kapoor KK. (2004).** Effectivity of host-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. *Microbial Research*. **159**, 121-127.
- Delgado MJ, Ligerio F et Lluch C (1994).** Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants, *Soil Biol. Biochem*. **26** (3), 371–376.
- Dominguez-Ferreras A, Perez-Arnedo A, Jose A, Olivares MJ et Sanjuan J (2006).** Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of microbiology* **188**, 7617-7625.

Elekes CC. (2014). Assessment of historical heavy metal pollution of Landin the proximity of industrial area of Targoviste, Romania. Environmental risk assessment of soil contamination.pp. 257-284.

El-Hilali I (2006). La symbiose rhizobium-lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V- Agdal. Faculté des Science, Rabat, 206p.

Elsheikh EAE et Wood M. (1990). Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. Soil Biol. Biochem. **22**(3), 343-347.

Essendoubi M, Brhada F, Eljamali JE Filali-Maltouf A, Bonnassie S, Georgeault S, Blanco C et Jebbar M. (2006). Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara. Environmental Microbiology. **9**(3), 603–611.
El-Deeb SM et Al-Sheri. (2005). Role of some chemical compounds on the detoxification of *Rhizobium leguminosarum biovar vicia* by some heavy metals.

Faghire M. (2012). Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* stress salin. Thèse de doctorat de Biotechnologie et Bio-ingénierie de la Production Végétale. Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech.96P

Farissi M, Aziz F, Bouizgaren A et Ghoulam C. (2014). Legume-rhizobia symbiosis under saline conditions: Agro-physiological and biochemical aspects of tolerance. International Journal of Innovation and Scientific Research. **11**(1), 96-104.

Fatnassi IC, Chiboub M, Jebara M et Jebara SH. (2014). Bacteria associated with different legume species grown in heavy-metal contaminated soils. International Journal of Agricultural Policy and Research.**2** (12), 460-467.

Fatnassi IC, Chiboub M, Saadani O, Jebara M, Jebara SH. (2015). Impact of dual inoculation with Rhizobium and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba L.* under copper stress. University Tunis El Manar, Laboratory of Legumes C. R. Biologies. **338**, 241–254.

Figueira EMAP, Lima AIG et Pereira SIA. (2005). Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum bv. viciae*: glutathione as a detoxifying agent. Can .J. Microbiol. **51**. 7-14.

Frérot H, Lefèbvre C, Gruber W, Collin C, Santos AD et Escarré J. (2006). Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. Plant and Soil. **282**, 53-65.

Giller KE, Witter E, McGrath SP. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agriculture soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **30**, 1389-1414.

Gloux K et Le Rudulier D. (1989). Transport and catabolism of proline betaine in salt-stressed *Rhizobium meliloti*. *Arch Microbiol*. **151**.143-148.

Gouffi K, Bernard T et Blanco C. (2000). Osmoprotection by pipecolic acid in *Sinorhizobium meliloti*: specific effects of D and L isomers. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(6). 2358-2364.

Hasan AE. Effect of irrigation water salinity on growth of *Bradyrhizobium* spp. In: proceedings of the 48th Croatian and 8th International Symposium on Agriculture, 2013 February.75-77.

Hasanuzzaman M, Nahar K et Fujita M. (2013). Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages. In: Amed P, Azooz MM et Prasad MNV (Eds.), *Ecophysiology and responses of plant under salt stress*.pp.26-72. *Int. J. Bioassays*.4 (01). 3648-3653.

Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, Grzadziel J et Palusinska-Szys M. (2015). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* **85**, 94–113.

Karaca A, Cetin SC, Turgay OC et Kizilkaya R. (2010). Effects of Heavy Metals on Soil Enzyme Activities. In: Sherameti I and Varma A (eds.). *Soil Heavy Metals, Soil Biology*.**19**, 237-261.

Karmakar K, Rana A, Rajwar A, Sahgal M et Johri B N. (2015): Legume-Rhizobia Symbiosis Under Stress. In : Arora NK (ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer India, 241-258.

Kinkle BK, Angle JS et Keyser HH. (1987). Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**(2), 315-319.

Kulkarni S, Surang S et Nautiyal CS. (2000): Crossing the limits of Rhizobium existence in extreme conditions. *Current Microbiology*. V 41. Pp :402-409.

L'taief B, Sifi B, Zaman-Allah M, Drevon JJ, Lachaal M. (2007). Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum*–*Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *J Plant Physiol* . **164**, 1028-1036.

Lebrazi S ET Fikri Benbrahim K. (2014). Environmental stress conditions affecting the N₂ fixing rhizobium-legumes symbiosis and adaptation mechanisms. *African journal of microbiology research*. **8** (53), 4053-4061.

Lucious S, Reddy ES, Anuradha V, Vijaya PP, Syed Ali M, Yogananth N, Rajan R et KalithaParveen P. (2013). Heavy Metal Tolerance and Antibiotic Sensitivity of Bacterial Strains Isolated From Tannery Effluent. *Asian J. EXP. BIOL. SCI.* **4** (4), 597-606.

Mabrouk Y et Belhadj O. (2012). Enhancing the biological nitrogen fixation of leguminous crops grown under stressed environments. *African Journal of Biotechnology.* **11**(48), 10809-10815.

Madhava Rao KV, Raghavendra AS et Janardhan Reddy V. (2006). Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. India. 335p.

Mahieu S, Frérot H, Vidal C, Galiana A, Heulin K, Maure L, Brunel B, Lefèbvre C, Escarré J et Cleyet-Marel JC. (2011). *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd .*Plant Soil* . **342**,405-417.

Nath S, Deb B et Sharma I. (2012). Isolation and characterization of cadmium and lead resistant bacteria. *Global Advanced Research Journal of Microbiology.* **1**(11), 194-198.
Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* .**68**, 360–367.

Paul MS, Varun M, D'Souza R, Favas PJC et Pratas J. (2014). Metal contamination of soils and prospects of phytoremediation in and around river Yamuna: A case study from North-Central India. <http://dx.doi.org/10.5772/57239> .Pp:545-573.

Pereira SIA, Lima AIG, Figueira EMAP. (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.

Pessaraki M, Huber JT, Tucker TC. (1989). Protein synthesis in green beans under salt stress with two nitrogen sources, *J. Plant Nutr.* **12**, 1261–1377.

Rabhi NH. (2011). Isolement de *Pseudomonas* spp. Fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Thèse de magister en Génie microbiologique. Université Ferhat Abbas Setif. Faculté des sciences de la nature et de la vie, 121p.

Räsänen LA, Saijets S, Jokinen K et Lindström K. (2004). Evaluation of the roles of two compatible solutes, glycine betaine and trehalose, for the *Acacia senegal–Sinorhizobium* symbiosis exposed to drought stress. *Plant and Soil.* **260**, 237–251.

Robles I, Lakatos J, Scharek P, Planck Z, Hernandez G, Soli S and Bustos E. (2014). Characterization and remediation of soils and sediments polluted with mercury: occurrence, transformations, environmental considerations and San Joaquin's Sierra Gorda case. Environmental risk assessment of soil contamination. pp. 827-850.

Rontein D, Basset G et Hanson AD. (2002). Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering* . **4**, 49-56.

Ruiz-Diez B, Quinones MA, Fajardo S, Lopez ML, Higuera P et Fernandez-Pascual M. (2012). Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol.* **96**:543-554.

Serraj R, Vasquez-Diaz H, Drevon JJ. (1998). Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion, and distribution in soybean, common bean and alfalfa. *J. Plant Nutr.* **21**, 475–488.

Shrivastava P et Kumar R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* **22**, 123–131.

Soussou S. (2013). Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*. Thèse de Doctorat de Microbiologie, Parasitologie. Institut supérieur agronomique de Chott Meriem. Université de Sousse. 220p.

Stan V, Gament E, Cornea CP, Voaides C, Dusa M et Plopeanu G. (2011). Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, **39**(1):88-95.

Swaraj K et Bishnoi NR. (1999). Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian journal of experimental biology*, **37**, 843-848.

Talibart T, Jebbar M, Gouffi K, Pichereau V, Gouesbet G, Blanco C, Bernard T et Pocard JA. (1997). Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in salt-stressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and environmental microbiology*, **63** (12). 4657- 4663.

Ventorino V, Caputo R, De Pascale S, Fagnano M, Pepe O et Moschetti G. (2012). Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. *Ann Microbiol.* **62**, 811–823.

Werner D et Newton W. (2005). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. 347p.

Wilson DO et Reisenauer HM. (1970). Effect of manganese and zinc ions on the growth of *Rhizobium*. *J Bacteriol.* **102**, 729–732.

Zahran HH, Abdel-Fattah M, Yasser MM, Mahmoud AM et Bedmar EJ. (2012). Diversity and environmental stress responses of rhizobial bacteria from Egyptian grain legumes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **6**(10): 571-583, 1991-8178

Zahran HH. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **63**(4), 968-989.

Annexes

Annexe

Composition du milieu : Yeast Mannitol Agar (YMA)

Mannitol	10g
Extrait de levure	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
NaCl	0.1g
Agar.....	15g
H ₂ O.....	qsp 1000ml
Ajuster le pH à 6.8	

Composition du milieu : Yeast Mannitol Broth (YMB)

Mannitol	10g
Extrait de levure	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
NaCl	0.1g
H ₂ O.....	qsp 1000ml
Ajuster le pH à 6.8	

Résumé

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué l'effet des sels minéraux et des sels métalliques sur la croissance des douze souches de rhizobia isolées de *Vicia faba*. L'évaluation de la sensibilité aux sels minéraux a révélé une plus grande tolérance pour le MgSO₄ et CaCl₂. Cependant en présence de NaCl et KCl les souches montrent une tolérance moins importante.

Afin d'étudier l'effet osmoprotecteur de certains solutés compatibles, deux souches de rhizobium ont été choisies sur la base de leur sensibilité à la salinité. La croissance des souches est nettement améliorée en présence du saccharose dans le cas de la souche ES8 et en présence de la bétaine dans le cas de la souche EC3.

Etude de la résistance aux métaux lourds montre une grande résistance pour le zinc et le plomb, où les souches tolèrent des concentrations allant jusqu'à 250 et 500 µg/ml respectivement. La résistance des souches est moindre pour le cuivre, le chrome et le cadmium, avec des CMI respectivement, 20 µg/ml, 50 µg/ml et 20µg/ml. La tolérance la plus faible est obtenue pour le mercure, où les souches présentent des CMI < 2 µg/ml.

Sur l'ensemble des souches, la plus grande tolérance *vis à vis* des sels minéraux et sels métalliques est enregistrée pour les souches EA2 et MT2.

Mots clés : Rhizobium, *Vicia faba*, sels minéraux, osmoprotecteurs, sels métalliques.

Abstract

In this study, we evaluated the effect of minerals salts and metal salts on the growth of twelve isolated rhizobia strains *Vicia faba*. The evaluation of sensitivity to minerals salts found greater tolerance for MgSO₄ and CaCl₂. However in the presence of NaCl and KCl strains show less tolerance.

To study the osmoprotector effect of some compatible solutes, two rhizobium strains were selected based on their sensitivity to the salinity. The growth of the strains is significantly improved in the presence of sucrose in the case of the strain ES8 and in the presence of betaine in the case of the strain EC3.

Study of resistance to heavy metals shows great resistance for zinc and lead, where the strains tolerate concentrations up to 250 and 500 µg/ml, respectively. The resistance of the strains is lower for copper, chromium and cadmium, with MIC respectively of 20 µg/ml, 50 µg/ml and 20µg/ml. The lowest tolerance is achieved for mercury, which strains have MIC <2 µg/ml.

Of all strains, the greater tolerance towards mineral salts and metal salts is recorded for EA2 and MT2 strains.

Keywords: Rhizobium, *Vicia faba*, minerals salts, osmoprotectants, metal salts.