

# REPONSES ADAPTATIVES ET SYMBIOTIQUES DES ISOLATS DE RHIZOBIA NODULANT LA LUZERNE FACE AUX FACTEURS PREDOMINANTS DANS LES SOLS SAHARIENS

**AZIB S.<sup>1</sup>, CHELOUFI H.<sup>2</sup>, ATTAB S.<sup>1</sup>, FECIH T.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Université KASDI Merbah Ouargla, Laboratoire des Bioressources Sahariennes, Valorisation et Préservation, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Ouargla 30000 Algérie.

<sup>2</sup>Université KASDI Merbah Ouargla, Laboratoire de Recherche en Phoeniciculture, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Ouargla 30000 Algérie.

[s\\_azib@hotmail.com](mailto:s_azib@hotmail.com)

**Résumé :** Les réponses de 35 souches rhizobiennes, provenant de différents sols sahariens (Ouargla et El Oued), à certains facteurs pédo-climatiques (températures, salinité et pH) ont été étudiées. Les résultats montrent que l'optimum de croissance est enregistré dans les conditions standards, à savoir : 28°C, pH neutre et salinité faible (0 à 40 mM de NaCl). Certaines souches sont capables de se multiplier à 45 °C et tolèrent des concentrations en sel supérieures à 640 mM. Pour le pH, toutes les souches se multiplient dans l'intervalle de pH allant de 5 à 9, à signaler que certaines d'entre elles sont capables de croître à même le pH=4.

Les souches ayant exprimées la meilleure résistance, à plusieurs stress abiotiques, peuvent constituer de futures candidates pour la production d'un inoculum, bien adapté, susceptible d'accroître le développement des plantes de luzerne dans les conditions des régions d'El Oued et Ouargla.

**Mots clés :** adaptation, symbioses, rhizobia, luzerne, Sahara.

## الاستجابات التكيفية و التعايشية لعزلات الريزوبيا التي تعقد البرسيم للعوامل السائدة في التربة الصحراوية

**ملخص :** إن استجابات نحو 35 سلالة ريزوبيا معزولة من مختلف الأتربة الصحراوية لبعض العوامل المؤثرة في نموها (درجات الحرارة العالية والملوحة ودرجة الحموضة) قد درست. تظهر نتائجنا أن أحسن نمو قد سجل في درجة الحرارة 28°C، الحموضة المعتدلة والملوحة المنخفضة. بعض السلالات قادرة على التضاعف عند 45 درجة وتحمل تركيزات الملح أكبر من 640 ملليمول. بالنسبة لدرجة الحموضة، تتكاثر جميع السلالات في المجال المحصور بين 5 إلى 9، للإشارة فأن بعض منهم قادر على النمو في درجة الحموضة 4. ويمكن استعمال السلالات التي أظهرت أفضل مقاومة، مع العديد من العوامل اللاحيوية، في إنتاج لقاح متكيف بشكل جيد، قادر على زيادة نمو نباتات البرسيم في ظروف منطقتي الوادي و ورقلة.

**كلمات دالة:** التكيف، التعايش، الريزوبيا، البرسيم، الصحراء

## 1. INTRODUCTION

En Algérie, les terres arides avec climat saharien représentent environ 90% de la surface totale du pays [1]. Ces milieux extrêmes sont, fréquemment, caractérisés par des écosystèmes stables marqués par la présence d'au moins un facteur aux limites de la tolérance pour la plupart des organismes. Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont le déficit hydrique, la salinité, les températures élevées, les pH extrêmes et les carences en éléments nutritionnels [2].

Bien que soumis à des conditions défavorables et contraignantes, les sols sahariens offrent des conditions plus ou moins favorables pour l'installation d'une microflore diversifiée et adaptée aux conditions du milieu, représentée respectivement par les bactéries, les actinomycètes, les champignons et les algues [3, 4, 5, 6].

Les rhizobia, objet de notre travail, sont des bactéries appartenant à famille des rhizobiacées [7], de l'Ordre des Rhizobiales, Classe des  $\alpha$ -Protéobactérie [8]. Les symbioses rhizobium-légumineuses aboutissent à la formation sur les racines de légumineuses d'organes différenciés appelés nodules, dans lesquels les bactéries réduisent l'azote en ammoniac utilisé par la plante hôte [9]. Ces symbioses sont d'une grande importance écologique et agronomique, en raison de leur capacité à fixer de grandes quantités d'azote atmosphérique

pouvant couvrir jusqu'à 80% des besoins des plantes en milieu agricole (30 à 300 kg d'azote par hectare et par an) [10, 11].

L'objectif de ce présent travail est l'étude des réponses de 35 isolats rhizobiens isolés à partir des nodosités racinaires de la luzerne, provenant de 09 stations relevant des wilayas d'El Oued et Ouargla (Tab.1), à certains facteurs pédoclimatiques (températures, salinité et pH) ce qui nous permettra d'une part de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches et d'autre part d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats présentant une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Collecte et conservation des nodules

La collecte des nodules a été réalisée suivant la méthode décrite par [12] et [13], directement à partir des racines des plantes de luzerne cultivée en plein champ (cas des stations de Ouargla) et par piégeage des bactéries par l'intermédiaire des plantes de luzerne mises en culture dans des pots contenant différents sols (cas des stations d'El Oued).

Au laboratoire, les nodules obtenus sont rincés soigneusement à l'eau de robinet. Ils sont ensuite détachés à 1-2 cm de leur point d'attache puis séchés avec du papier filtre et conservés au réfrigérateur à 4°C pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est utilisé [12].

**Tableau 1.** Identification et caractérisation des sites.

Identification du site	Nbre de souches	Le bioclimat	Texture du sol	Salinité des eaux d'irrigation (g/l)	Culture de luzerne	Collecte des nodules
Hassi Ben Abdallah (O1)	5	Hyperaride	Sableuse	2 à 4	Sous palmier dattier	Collecte <i>in situ</i>
Oum Eraneb (O2)	3	Hyperaride	Sableuse	2 à 4	Sous palmier dattier	Collecte <i>in situ</i>
Exploitation FSNV (O3)	4	Hyperaride	Sableuse	2 à 4	Sous palmier dattier	Collecte <i>in situ</i>
Chott (O4)	4	Hyperaride	Sableuse	2 à 4	Plein champ	Collecte <i>in situ</i>
Tenedla (E1)	3	Hyperaride	Sableuse	2 à 6	Sous palmier dattier	Piégeage
El-Meghaier (E2)	5	Hyperaride	Sableuse	2,5 à 6	Sous palmier dattier	Piégeage
Djamaa (E3)	4	Hyperaride	Sableuse	2 à 6	Sous palmier dattier	Piégeage
Guemar (E4)	3	Hyperaride	Sableuse	2 à 4	Sous palmier dattier	Piégeage
Reguiba (E5)	4	Hyperaride	Sableuse	2 à 4	Sous palmier dattier	Piégeage

### 2.2. Stérilisation et isolement des rhizobia

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans de l'éthanol à 96°, puis transférés immédiatement dans une solution d'hypochlorite de sodium 30% pendant 3 à 5 minutes. Une série de lavages successifs, de 5 à 8 fois, s'ensuit à l'eau distillée stérile.

Les différentes étapes d'isolement des rhizobiums sont celles décrites par [12] [13] et [14]. Le broyat obtenu à partir de chaque nodule estensemencé sur boîte contenant le milieu YMA (Mannitol : 2,5g ; Extrait de levure : 0,35g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O : 0,46g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,12g ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 0,46g ; NaCl : 0,1g ; Agar : 15g ; Stériliser à 121°C pendant 20min).

Les différentes boîtes ont été incubées à 28°C pendant 72 h. Une série de repiquage est réalisée afin de purifier les isolats. Toutes les opérations sont effectuées dans des conditions d'asepsie totale.

Les isolats sont conservés sur YMA tamponné avec du CaCO<sub>3</sub> (3g/l) en tube incliné [12] [15]. Après incubation, les souches sont stockées au réfrigérateur en vue de leur caractérisation.

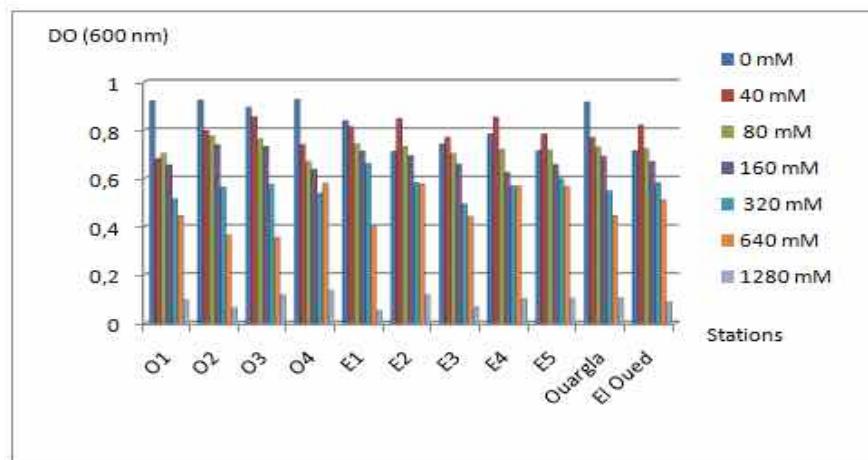
### 2.3. Effet des Facteurs abiotiques

La tolérance des isolats aux différentes températures, aux différentes concentrations en NaCl et de pH est testée sur milieux YM liquide et solide. Le NaCl est rajouté à la concentration voulue : 0, 40, 80, 160, 320, 640 et 1280 mM. Pour le pH, les souches sont cultivées à différents pH: 4, 5, 6, 6.8, 8 et 9. Enfin, les souches ont été soumises à différentes températures d'incubation : 4°C, 28°C, 37°C et 45°C.

La croissance est évaluée dans chaque tube (milieu YM liquide) par la mesure de la densité optique à 600 nm, après 72 heures d'incubation. Pour le milieu YMA (solide), la présence ou l'absence de colonies sur la surface de la boîte de Pétri renseigne sur la croissance des différentes souches.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### 3.1. Effet de la salinité



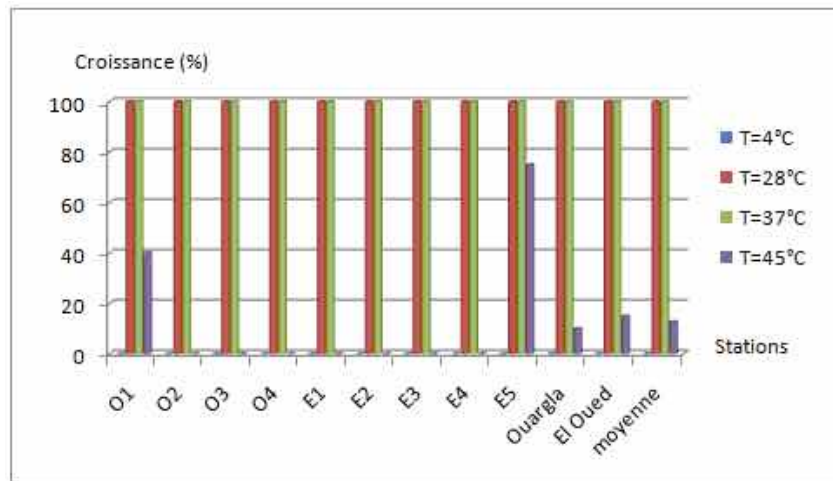
**Figure 1.** Croissance des souches à différentes concentrations de NaCl.

Les résultats obtenus montrent que la croissance des souches, sur milieu liquide, diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Jusqu'à une salinité de 640 mM de NaCl, la croissance des souches semble non affectée dans toutes les stations d'étude. A la concentration 1280 mM, aucune croissance n'est observée. Ces résultats ont été confirmés sur milieu solide où 100% des souches poussent de 0 mM jusqu'à 640 mM,

Nos résultats vont avec ceux obtenus par [16, 17, 18 et 19], qui indiquent que les rhizobiums nodulant la luzerne sont plus tolérants à de fortes concentrations de NaCl (de 0.5 à 1 mM) que d'autres espèces de rhizobiums. Des souches de *Sinorhizobium meliloti* nodulant la luzerne, dans le sud du Maroc, peuvent tolérer jusqu'à 1711 mM de NaCl [20].

#### 3.3. Effet de la température

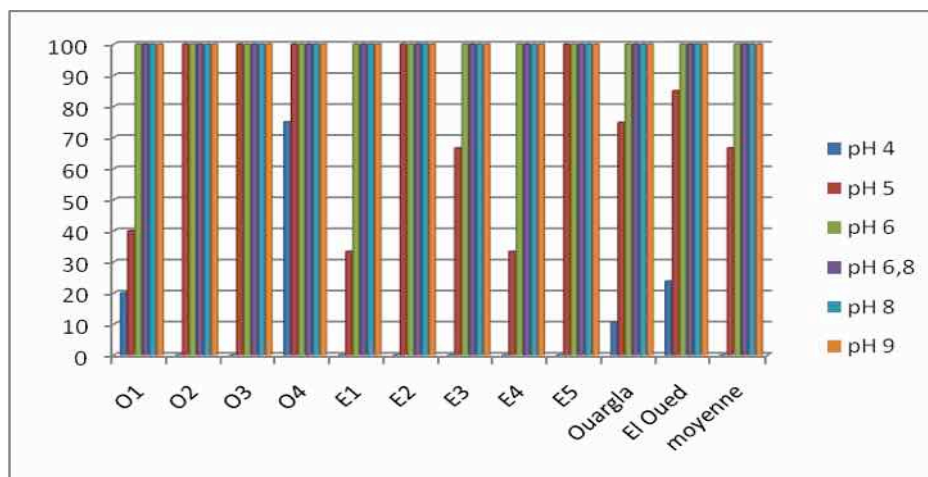
Généralement, toutes les souches ont montré une bonne croissance aux températures 28°C et 37°C, que ce soit sur milieu liquide ou solide (Fig. 2). Dans l'intervalle de 28°C à 37°C, la croissance est optimale, comme l'ont décrit par [21, 22 et 23]. Aux températures extrêmes, la croissance des souches est fortement influencée. Aucune poussée n'est enregistrée à 4°C et seulement 12% de souches ont crû à 45°C. L'effet des températures basses (4°C) sur l'arrêt de la croissance des rhizobia est signalé par [24]. Les résultats enregistrés au niveau des stations de Reguiba (E5) et de Hassi Ben Abdallah (O1) qui sont les seules à montrer une croissance à 45°C, avec respectivement 75% et 40%, vont avec ceux obtenus par [2] qui montrent que de nombreuses souches de rhizobia isolées de sols sahéliens, sénégalais et tunisiens sont capables de se multiplier à 40 °C et même à 45 °C.



**Figure 2.** Croissance des souches à différentes températures.

### 3.2. Effet du pH

L'acidité du sol est un facteur limitant la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du rhizobium et sa persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation [25].



**Figure 3.** Effet du pH sur la croissance des souches

Il ressort de la figure 3 que les souches de toutes les stations sont incapables de pousser à pH 4 sauf une souche appartenant à la station de Hassi Ben Abdallah. Les travaux de [26,27] ont confirmé, en outre, que les rhizobiums de luzerne sont sensibles aux pH 4. En condition de pH 5, quelques souches ont une bonne croissance alors que les autres ont eu une croissance partielle. Ce résultat coïncide avec ceux de [28, 29]. Dans l'intervalle de pH6 jusqu'à pH 9, la totalité des souches poussent avec un optimum de croissance se situant entre 6 et 6.8, ce qui indique que les souches testées sont neutrophiles.

A travers ces résultats, nous constatons clairement que les réponses des souches aux variations de pH sont variées. Quelques unes ont montré une meilleure croissance au pH 6 comparativement à celle obtenue au pH 8 et 9, comme le confirme [23]. D'autres préfèrent le milieu légèrement alcalin (pH = 8) qu'acide (pH 6 et 5). Ces conclusions sont similaires à celles obtenues par [24].

## 4. CONCLUSION

Les 35 souches étudiées montrent des caractéristiques physiologiques qui peuvent contribuer à leur survie dans les environnements peu hospitaliers des sols sahariens. Les souches ayant exprimées la meilleure résistance à plusieurs stress abiotiques peuvent constituer de futures candidates pour d'éventuelles compagnes d'inoculation de la luzerne particulièrement à El Oued et Ouargla.

Une meilleure survie ne signifie pas obligatoirement une efficacité symbiotique avec la plante. Pour cela, un test symbiotique doit être effectué, même avec plusieurs variétés de luzerne afin de sélectionner les meilleurs couples symbiotiques « rhizobium-plante ». En plus, la souche choisie pour faire l'objet d'introduction dans le sol doit : 1) être adaptée aux conditions du sol ; 2) être compétitive par rapport aux autres souches autochtones de rhizobia et les autres microorganismes des sols.

## REFERENCES

- [1] Le Houerou H.N., 1975.- Problèmes et potentialités des terres arides de l'Afrique du Nord. Options Méditerran. Sér. A Mediterr. Semin.: 26-17p.
- [2] Cacciari I., Di Mattia E., Quatrini P., Moscatelli M.C., Grego S., Lippi D., De Paolis M.R., 2015.- Un arbre au désert : Réponses adaptatives des isolats de Rhizobium aux stress. Éd IRD, 1-34 p.
- [3] Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji, H., 1998.- Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse 9: 147–153 p.
- [4] Bazzine M., Hamdi Aissa B., 2014. - Etude des croûtes biologiques de quelques sols gypseux et salins du milieu saharien: cas de la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional est algérien). *Algerian journal of arid environment*. vol. 4, n° 1, Juin 2014: 45-52p.
- [5] Karabi M., Hamdi Aissa B., Zenkhri S., 2016.- Microbial diversity and organic matter fractions under two arid soils in Algerian Sahara. AIP Conference Proceedings 1758, 030006, doi: 10.1063/1.4959402.
- [6] Kaboul A., 2016.- Etude des croûtes biologiques des sols des zones arides (Cas de la région de Ouargla et la région d'El Oued). Mémoire Master, Université KASDI Merbah, Ouargla, 67p.
- [7] Garbaye J., 2013.- La symbiose mycorhizienne : Une association entre les plantes et les champignons, Ed Quae, 280 p.
- [8] Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2003.- Microbiologie. Edition De Boeck Supérieur, 1137 p.
- [9] Denarie J., Debelle F., Truchet G., Prome J.C., 1993.- Rhizobium and legume nodulation: A molecular dialogue, in: Palacios R., Moira J., Newton W.E. (Eds.), New Horizons in Nitrogen Fixation, Kluwer, Dordrecht, the Netherlands, 19–30 p.
- [10] Willems A., Collins M.D., 1993.- Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 305–313 p.
- [11] Farrand S.K., Van Berkum P.B., Oger P. (2003) Agrobacterium is a definable genus of the family Rhizobiaceae, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1681–1687.
- [12] Vincent J.M., 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford. 164 p.
- [13] Somasegaran P and Hoben HJ (1985) Methods in LegumeRhizobium Technology. Nif IAL Project and MIRCEN, University of Hawaii, Paia, Maui, Hawaii. 367p.
- [14] Somasegaran P and Hoben H J 1994 The Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-RhizobiaTechnology. Springer Verlag, New York. 450p.
- [15] Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993.- Practical Rhizobium Legume Technology Manual, vol. 19, Technical Manual International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. (ICARDA), Aleppo, Syria, 21p.

- [16] Bernard T., Pocard J., Perroud B., Le Rudulier P.- 1986 Variation in the response of salt stressed *Rhizobium* strains to betaine. *Archives of microbiology*, 143: 359-356p.
- [17] Breedveld M. W., Dijikema C., Zevenhuizen L. P. T. M., and A. J. B. Zehender. 1993. Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3157-3163.
- [18] Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S. and Nuti M.P., 1998. Metabolic proprieties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. In: *J. Appl. Microbiol.*, 84: p. 81-89.
- [19] Zahran H.H., 1999. *Rhizobium-legume* symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. In: *Micobiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, p. 968-989.
- [20] Thami-Alami, I., Elbouthahiri, N., Udupa, S.M. (2010) Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. In: Porqueddu, C., Ríos, S. (Eds.), *The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 92)*, CIHEAM/CIBIO/FAO/SEE, Zaragoza, pp. P265–P269.
- [21] Drouin P., Prevost D., Antoun H., 2000.- Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiology Ecology*. 32:111-120 p.
- [22] Brenner D.J., Krieg N.R., 2006.- *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part 3*, Springer Science & Business Media, Science, 1388 P.
- [23] Hameed R.A., Hussain N.N., Aljibouri A.M., 2014.- Phenotypic Characterization of Indigenous Iraqi *Sinorhizobium meliloti* Isolates for Abiotic Stress Performance , *Journal of Life Sciences*, Vol. 8, No. 1, 1-9p.
- [24] Niste M., Vidican R., Rotar L., Pop., 2013.- The Effect of pH Stress on the Survival of *Rhizobium Trifolii* and *Sinorhizobium Meliloti* in vitro, *Bulletin UASMV, série Agriculture* 70(2): 449-450p.
- [25] Appunu C., Dhar B., 2006.- Existence and Characteristics of Rhizobiophages in Soybean Grown Fields in India. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5: 818-821p. DOI: 10.3923/ajps.2006.818.821.
- [26] Ali S.F., Rawat L.S., Meghuansi M.K., Mahna, S.K., 2009.- Selection of stress tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan. In: *India. J. Agri Biol. Sci.*, 4: 13-18 p.
- [27] Elbouthahiri N., Thami-Alami I., Udupa S.M., 2010.- Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco, *BMC Microbiology*: 1-13p.
- [28] Satyanarayana T., Johri B.N., 2005.- *Microbial Diversity: Current Perspectives and Potential Applications*, I. K. International Pvt Ltd, Microbial diversity, 1133p.
- [29] Blazinkov M., Vrbanac D., Huic Babic K., Sikora S., 2010. - Phenotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* strains, *Agriculturae Conspectus Scientifici* cus. Vol. 80 (2015) No. 1: 25-29p.

